



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**PROSPECÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FUNCIONAL DE *SHORT-PEPTIDES* VEGETAIS**

**THIAGO LUSTOSA JUCÁ**

**FORTALEZA-CE**  
**Abril de 2014**

**THIAGO LUSTOSA JUCÁ**

**PROSPECÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FUNCIONAL DE *SHORT-PEPTIDES* VEGETAIS**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira

**FORTALEZA-CE**

**Abril de 2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

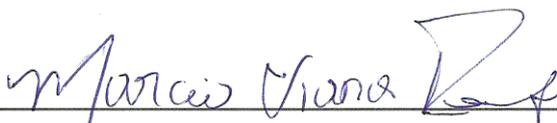
- 
- J84p Jucá, Thiago Lustosa.  
Prospecção molecular e análise funcional de *short-peptides* vegetais. / Thiago Lustosa Jucá. –  
2014.  
172 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.  
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.  
Orientação: Prof. Dr. Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.  
Coorientação: Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
1. Látex. 2. Pinhão-manso. 3. Sementes. 4. Peptídeos. 5. Fitoquímicos. I. Título.

# PROSPECÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FUNCIONAL DE *SHORT-PEPTIDES* VEGETAIS

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Tese aprovada em: 03 / 04 / 2014.

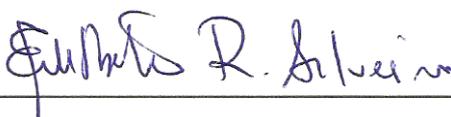
## BANCA EXAMINADORA



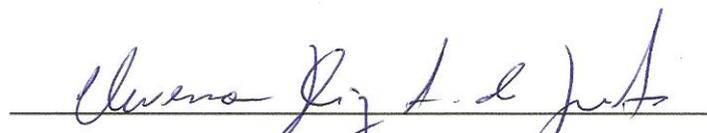
Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira (Co-Orientadora)  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)



Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira (Examinador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas (Examinador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Examinadora)  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

## DEDICATÓRIA

---

Dedico esta tese à minha família (“*Jucá e Cunha*”), pelo apoio incondicional! Em especial, gostaria de dedicar à minha esposa ***Muciana***, pelo amor incondicional, pela leitura e correção minuciosa da escrita da tese, e a meus dois tesouros: ***Ana Beatriz*** e ***Ana Alice***, amos vocês!

## AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

---

**Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:**

- Universidade Federal do Ceará (UFC):
  - Através do Laboratório de Plantas Laticíferas, coordenado pelo Professor Dr. Márcio Viana Ramos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
  - Através do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear, coordenado pelo Dr. Professor Edilberto Rocha Silveira, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica.
  
- Universidade de Fortaleza (Unifor):
  - Através do Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos, coordenado pela Professora Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira e pelo Professor Dr. Renato Azevedo Moreira do Centro de Ciências da Saúde;
  
- Instituto de Física de São Carlos (USP):
  - Na pessoa da Professora Dra. Leila Maria Beltramini e do Dr. José Luiz de Souza Lopes, do grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas;
  
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
  
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

## AGRADECIMENTOS PESSOAIS

---

Ao meu orientador, Professor **Márcio Viana Ramos**. Aceitou orientar-me quando eu pensava seriamente em desistir do doutorado. Aceitou e apoiou incondicionalmente a idéia de trabalhar com peptídeos vegetais de plantas laticíferas. Gostaria de agradecer o voto de confiança depositado em mim e no meu trabalho, e dizer que nesses quase quatros anos de convívio, eu encontrei exatamente aquilo que eu buscava em um orientador, daí minha admiração e respeito. Muito obrigado!

À Professora **Ana Cristina Monteiro Moreira** por ter recebido de braços abertos no seu laboratório, até então, “um estranho”. A professora Cristina não só me deu oportunidades (sem medir esforços), como me inseriu na família do Bloco F e do laboratório F-66. Ao professor **Renato Moreira**, uma figura admirável, sempre disposto a ajudar e a ensinar. Para mim foi uma honra ter o convívio diário desses dois professores e ter presenciado bem de perto a chegada do *Dudu*. Muito obrigado!

Ao Professor **Edilberto Rocha Silveira**, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, sendo sempre muito solícito. É um exemplo de dedicação para com seus alunos e com a Universidade Federal do Ceará;

Ao professor **Cleverson Diniz Teixeira de Freitas** por gentilmente aceitar participar da banca examinadora deste trabalho de doutorado. Obrigado pelas importantes considerações para a melhoria deste trabalho;

À professora **Patrícia Maria Guedes Paiva** por gentilmente aceitar participar da banca examinadora deste trabalho de doutorado;

À Professora **Leila Maria Beltramini** e ao **Dr. José Luiz de Souza Lopes** pelo suporte experimental nos experimentos de dicroísmo circular;

Aos amigos do F66: **Frederico Moreno** (peça chave, sem a qual esta tese não aconteceria, por ter me dado oportunidades e ensinado bastante); **Felipe Sousa** (pela amizade sólida, apoio e grande ajuda nesses quase quatro anos de doutorado); **Leonardo Primo** (pelo apoio e grande amizade); **Marina Lobo** (Pelo ótimo convívio, pessoa do bem, sempre solícita e disposta a ajudar); **Antônio Neto** (Pela amizade, apoio, um cara 10); **Célio Ribeiro** (Pela

amizade e ótimo convívio); **Igor Sá** (Pela amizade e ajuda); **Márcio Cavalcante**, **Pedrinha Vasconcelos** e **Vinícius Oliveira** (Pessoas do bem, obrigado pelo ótimo convívio). O meu muito obrigado às funcionárias do F-66 (**Patrícia**, **Lia** e **Gil**);

À **Carolina Viana**, amiga desde os tempos de graduação passando pela pós-graduação, se mostrou muito presente e ajudou bastante durante o doutorado. À **Bárbara Jéssica** pela ajuda nos ensaios antifúngicos. À **Patrícia Coelho** e **Nayara Coriolano**, estudantes da Química, pela grande ajuda nos experimentos de RMN. Aos amigos **Jefferson Oliveira** e **Edvar Júnior**, pela grande amizade e mais uma vez pelas correções e sugestões na redação desta tese. Ao amigo **Fabiano Texeira**, por estar sempre presente nesses quatro anos e sempre ajudando da maneira que era possível. Ao **Fábio Nogueira**, amigo que sempre contribui bastante para minha formação científica e que nunca deixou de colaborar e estar disponível.

Aos **professores do Departameto de Bioquímica** que contribuíram com minha formação acadêmica durante todos esses anos. Muito obrigado!

*“Nossas atitudes, nossa imaginária auto-importância, a ilusão de que nós temos alguma posição privilegiada no universo é desafiada por um pálido ponto azul chamado Terra, localizada na envolvente e grande escuridão cósmica.”*

Pálido ponto azul, 1994.

Carl Sagan

## RESUMO

---

### Prospecção molecular e análise funcional de *short-peptides* vegetais

Um número crescente de peptídeos isolados a partir dos mais diversos tecidos vegetais tem destacado essas moléculas como alvo potencial de estudo. Estes peptídeos apresentam uma grande diversidade funcional e, por isso, vem sendo descritos frequentemente na literatura científica dos últimos anos. No presente trabalho são relatadas a prospecção molecular e caracterização funcional de “short-peptides” vegetais. Inicialmente, o látex de *Calotropis procera* foi particionado, gerando cinco frações: hexânica (49,4%), diclorometano (5,2%), acetato de etila (2,0%), butanólica (2,1%) e aquosa (41,1%) (Capítulo 1). O perfil fitoquímico e as análises espectroscópicas mostraram que a fração diclorometano foi quimicamente a mais heterogênea. As frações diclorometano e acetato de etila apresentaram toxicidade *in vitro* contra linhagens de células tumorais (DL<sub>50</sub> variando de 0,05 a 3,9 µg/mL) e, *in vivo*, contra o crustáceo *Artemia salina* (DL<sub>50</sub> variando de 10,9 a 65,7 µg/mL). Estas mesmas frações apresentaram atividade antiinflamatória no modelo de peritonite induzida por carragenana em ratos, associadas a uma inibição da migração de neutrófilos de 67% (diclorometano) e 56% (acetato de etila). A reação positiva com tolidina e ninidrina sugere a presença de ciclopeptídeos na fração bioativa acetato de etila. No Capítulo 2, vinte e uma sequências primárias de peptídeos, oriundas da fração 1 de sementes de *Jatropha curcas*, foram deduzidas por meio de sequenciamento *de novo* e confirmadas através de buscas contra um banco de dados genômico de *Jatropha*. A comparação do padrão de fragmentação por MS/MS entre o íon duplamente carregado de m/z de 671,79, presente nas frações 1 e PII-C, e um peptídeo sintético, análogo àquele, mostrou que o uso de passos analíticos adicionais para a identificação e caracterização destes peptídeos não seria necessário. A ferramenta de busca BlastP mostrou que a sequência APTLSGGSVPRDAD apresenta homologia e está inserida no domínio conservado das proteínas de embriogênese tardia (LEA\_6). No Capítulo 3, os dois peptídeos sintéticos análogos, linear (1342,44 g/mol) e cíclico (1324,44 g/mol), obtidos por síntese química em fase sólida, mostraram diferenças que caracterizam seus arranjos, quando comparados pelo padrão de fragmentação por MS/MS e mobilidade iônica. O estado de carga e o tempo de retenção foram similares, do ponto de vista físico-químico. Os estudos de dicroísmo circular mostraram a presença de um estado desordenado para os peptídeos. Os ensaios biológicos com os peptídeos não revelam sinais aparentes de atividade funcional, porém não se pode descartar a possibilidade de que modelos biológicos adicionais sejam testados. Os resultados advindos deste estudo geram novas perspectivas e servem de base para a realização de trabalhos subsequentes que tratem do isolamento e caracterização de peptídeos nas espécies *Calotropis procera* e *Jatropha curcas*.

**Palavras-chaves:** Peptídeos vegetais; *Calotropis procera*; látex; *Jatropha curcas*, sementes.

## ABSTRACT

---

### Molecular prospecting and functional characterization of plant short-peptides

An increasing number of peptides isolated from a range of tissue plants have highlighted these molecules as a potential study target. Those peptides demonstrate a large functional variety and, therefore, have been frequently described in the scientific literature of the last years. The present work reports a molecular prospecting and functional characterization of plant "short-peptides". Initially, the *Calotropis procera* latex was partitioned into five fractions: hexane (49.4%), dichloromethane (5.2%), ethyl acetate (2.0%), butanol (2.1%) and aqueous (41.1%) (Chapter 1). The phytochemical profile and the spectroscopic analysis showed that the dichloromethane fraction was chemically the most heterogeneous. The dichloromethane and ethyl acetate fractions showed *in vitro* cytotoxicity against tumor cell lines (LD<sub>50</sub> ranging from 0.05 to 3.9 mg/mL) and *in vivo* cytotoxicity against the crustacean *Artemia salina* (LD<sub>50</sub> ranging from 10.9 to 65.7 mg/mL). These same fractions showed anti-inflammatory activity in carrageenan-induced peritonitis model in rats, associated to an inhibition of neutrophil migration for the dichloromethane (67%) and ethyl acetate (56%) fractions. A positive reaction with tolidine and ninhydrin suggests the presence of cyclopeptides in the bioactive ethyl acetate fraction. In Chapter 2, twenty primary sequences of peptides derived from the 1 fraction of *Jatropha curcas* seeds were deduced by *de novo* sequencing and confirmed by searches against genomic *Jatropha* database. The comparison of MS/MS fragmentation patterns between the doubly charged ion (671.79 m/z) found in fractions 1 and PII-C and its analogue synthetic peptide has shown that the use of additional analytical steps for the identification and characterization of these peptides would be not necessary. The BlastP search tool showed that the sequence APTLSGGSVPRDAD is homologous to and it is inserted into the conserved domain of the late embryogenesis protein (LEA\_6). In Chapter 3, the two analogues synthetic peptides, linear (1342.44 g/mol) and cyclic (1324.44 g/mol), obtained by solid phase synthesis, showed differences that characterize their arrangement when compared to the pattern fragmentation by MS/MS and ion mobility. The net charge and the retention time had similar physicochemical parameters in both peptides. Dichroism circular studies showed the presence of a disordered state to both peptides. The biological assays of peptides showed no apparent signs of functional activity, however this fact do not exclude the possibility to test additional biological models. The results arising from this study generate new prospects and provide a basis for further work aiming the isolation and characterization of peptides in *C. procera* and *J. curcas* species.

**Key-words:** Plant short-peptides; *Calotropis procera*; latex; *Jatropha curcas*; seeds.

## LISTA DE FIGURAS

---

---

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1 -</b>	Classificação dos ciclopeptídeos vegetais.....	<b>25</b>
<b>Figura 2 -</b>	Mecanismos envolvidos na biossíntese de peptídeos vegetais ....	<b>27</b>
<b>Figura 3 -</b>	Diferentes tecidos vegetais onde os peptídeos antimicrobianos têm sido encontrados.....	<b>31</b>
<b>Figura 4 -</b>	Estratégias para a obtenção de peptídeos.....	<b>33</b>
<b>Figura 5 -</b>	Estruturas de alguns peptídeos cíclicos isolados das espécies do gênero <i>Jatropha</i> .....	<b>35</b>
<b>Figura 6 -</b>	Estrutura do peptídeo cíclico isolado do caule da espécie <i>Stephanotis floribunda</i> .....	<b>36</b>

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1 -</b>	Aspectos morfológicos das secções longitudinais de tecidos de diferentes espécies vegetais produtoras de látex.....	<b>40</b>
<b>Figura 2 -</b>	Aspectos gerais da espécie <i>Calotropis procera</i> .....	<b>41</b>
<b>Figura 3 -</b>	Representação esquemática da partição do látex de <i>C. procera</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 4 -</b>	Representação esquemática dos passos analíticos utilizados nas quatro estratégias adotadas para o isolamento de peptídeos da fração acetato de etila e aquosa do látex de <i>C. procera</i> .....	<b>55</b>
<b>Figura 5 -</b>	Análise espectroscópica por infravermelho das frações do látex de <i>C. procera</i> .....	<b>63</b>
<b>Figura 6 -</b>	Análise espectroscópica por RMN-H <sup>1</sup> das frações hexânica e diclorometano do látex de <i>C.</i>	

	<i>procera</i> .....	64
<b>Figura 7 -</b>	Análise espectroscópica por RMN-H <sup>1</sup> das frações acetato de etila e butanólica do látex de <i>C. procera</i> .....	65
<b>Figura 8-</b>	Análise espectroscópica por RMN-H <sup>1</sup> da fração aquosa do látex de <i>C. procera</i> .....	66
<b>Figura 9 -</b>	Métodos químicos utilizados na detecção de peptídeos das frações do látex de <i>C. procera</i> .....	68
<b>Figura 10 -</b>	Perfis cromatográficos, por exclusão molecular e fase reversa, das frações orgânicas do látex de <i>C. procera</i> .....	72
<b>Figura 11 -</b>	Primeira estratégia empregada na tentativa de isolar peptídeos da fração acetato de etila do látex de <i>C. procera</i> .....	74
<b>Figura 12 -</b>	Segunda estratégia empregada na tentativa de isolar peptídeos da fração aquosa do látex de <i>C. procera</i> .....	75
<b>Figura 13 -</b>	Terceira estratégia empregada na tentativa de isolar peptídeos da fração acetato de etila do látex de <i>C. procera</i> .....	76
<b>Figura 14 -</b>	Quarta estratégia empregada na tentativa de isolar peptídeos da fração aquosa do látex de <i>C. procera</i> .....	77
<b>Figura 15 -</b>	Avaliação do efeito hemolítico das frações do látex de <i>C. procera</i>	80

## CAPÍTULO II

<b>Figura 1 -</b>	Aspectos gerais da espécie <i>Jatropha curcas</i> .....	88
<b>Figura 2 -</b>	Perfis cromatográficos da fração 1 de sementes de <i>J. curcas</i> .....	98
<b>Figura 3 -</b>	Análise por espectrometria de massas.....	101
<b>Figura 4 -</b>	Comparação do padrão de fragmentação por MS/MS e da intensidade do sinal do íon 671,79 (M + 2H) <sup>+</sup> na fração 1.....	104
<b>Figura 5 -</b>	Sítios de clivagem em potencial da sequência peptídica APTLSGGSVPRDAD.....	106

<b>Figura 6 -</b>	Dendograma ilustrando a homologia entre sequências protéicas que contêm um domínio conservado da superfamília LEA_6.....	<b>108</b>
<b>Figura 7 -</b>	Representação esquemática da localização do peptídeo APTLSGGSVPRDAD na sequência codificante de n° de acesso Jcr4U28965.20 de <i>J. curcas</i> .....	<b>109</b>

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1 -</b>	Vantagens e desvantagens das três principais estratégias utilizadas para a obtenção de peptídeos.....	<b>113</b>
<b>Figura 2 -</b>	Esquema geral da síntese química em fase sólida de peptídeos.....	<b>114</b>
<b>Figura 3 -</b>	Escala de hidrofobicidade baseada nas propriedades das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da sequência APTLSGGSVPRDAD.....	<b>126</b>
<b>Figura 4 -</b>	Peptídeos sintéticos linear (1342,44 g/mol) e cíclico (1324,44 g/mol) com mais de 90% de pureza.....	<b>127</b>
<b>Figura 5 -</b>	Variação da carga líquida de PL e PC em função do pH.....	<b>129</b>
<b>Figura 6 -</b>	Análise por cromatografia de fase reversa e espectrometria de massas dos peptídeos PL e PC.....	<b>131</b>
<b>Figura 7 -</b>	Espectro de fragmentação por MS/MS de PL e PC.....	<b>133</b>
<b>Figura 8 -</b>	Representação esquemática de como ocorre a fragmentação por MS/MS do peptídeo cíclico.....	<b>134</b>
<b>Figura 9 -</b>	Espectros de mobilidade iônica dos peptídeos PL e PC.....	<b>136</b>
<b>Figura 10 -</b>	Representação em 3D da relação entre o “Drift time” e a relação m/z de PL e PC.....	<b>136</b>
<b>Figura 11 -</b>	Espectros de dicroísmo circular de PL e PC.....	<b>138</b>
<b>Figura 12 -</b>	Espectros unidimensionais referentes aos deslocamentos químicos dos núcleos de <sup>1</sup> H.....	<b>140</b>

<b>Figura 13 -</b>	Espectros unidimensionais referentes aos deslocamentos químicos dos núcleos de $^{13}\text{C}$ .....	<b>141</b>
<b>Figura 14 -</b>	Avaliação do efeito hemolítico dos peptídeos linear e cíclico sobre hemácias humanas.....	<b>142</b>
<b>Figura 15 -</b>	Efeito dos peptídeos linear e cíclico sobre o crescimento dos fungos fitopatogênicos <i>Fusarium solani</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> .....	<b>144</b>
<b>Figura 16 -</b>	Efeito dos peptídeos linear e cíclico sobre a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos <i>Fusarium solani</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> .....	<b>145</b>
<b>Figura 17 -</b>	Atividade de inibição proteolítica dos peptídeos linear e cíclico frente à protease cisteínica papaína e serínica tripsina.....	<b>146</b>

## LISTA DE TABELAS

---

---

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1 -</b>	Classificação taxonômica da planta <i>C. procera</i> .....	<b>41</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Valores médios e rendimento do peso seco e fresco do látex de <i>C. procera</i> .....	<b>59</b>
<b>Tabela 3 -</b>	Rendimento das frações obtidas por partição do látex de <i>C. procera</i> .....	<b>60</b>
<b>Tabela 4 -</b>	Análise fitoquímica qualitativa das frações do látex de <i>C. procera</i> .	<b>61</b>
<b>Tabela 5 -</b>	Avaliação da toxicidade das frações do látex de <i>C. procera</i> contra células cancerígenas e <i>Artemia salina</i> .....	<b>79</b>
<b>Tabela 7 -</b>	Efeito inibitório das frações do látex de <i>C. procera</i> no modelo de peritonite induzida por carragenana.....	<b>82</b>

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1 -</b>	Peptídeos cíclicos isolados das espécies do gênero <i>Jatropha</i> descritas na literatura.....	<b>86</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Classificação taxonômica da planta <i>J. curcas</i> .....	<b>87</b>
<b>Tabela 3 -</b>	Sequências primárias oriundas do sequenciamento <i>de novo</i> de peptídeos de sementes de <i>J. curcas</i> .....	<b>102</b>
<b>Tabela 4 -</b>	Distribuição das sequências primárias dos peptídeos ao longo das sequências proteicas das sementes de <i>J. curcas</i> .....	<b>107</b>

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1 -</b>	Propriedades físico-químicas da sequência APTLSGGSVPRDAD referente ao íon de m/z 671,79, obtida a partir de sementes de <i>J. curcas</i> .....	<b>125</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Atividade citotóxica em células tumorais após 72h de incubação.....	<b>143</b>

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

---

<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>BANA</b>	N-benzoil-arginina-naftilamida
<b>BAPNA</b>	Benzoil-arginina-p-nitroanilida
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>CD</b>	Dicroísmo Circular
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DDA</b>	Aquisição dependente de dados
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DL</b>	Dose letal
<b>EDTA</b>	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média
<b>ESI</b>	Electron Spray Ionization
<b>E-64</b>	Trans-epoxisuccinil-L-leucil-amido(4-guanidino)-butano
<b>FTIR</b>	Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>h</b>	Hora
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>IAA</b>	Iodoacetamida
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>IMS</b>	Espectrometria de mobilidade iônica
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>LEA</b>	Proteínas de embriogênese tardia
<b>min</b>	Minutos
<b>MW</b>	Marcadores de massa molecular
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NRPS</b>	Peptídeo sintase não-ribossomal
<b>PBS</b>	Tampão fosfato de sódio
<b>PVPP</b>	Polivinilpolipirrolidona
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PC</b>	Peptídeo cíclico
<b>PL</b>	Peptídeo Linear
<b>PMSF</b>	Fenil-metil-sulfonil-flúor
<b>PID</b>	Proteínas intrinsecamente desordenadas
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>SDA</b>	Sabouraud Dextrose Agar
<b>SPE</b>	Solid Phase Extraction
<b>SQFS</b>	Síntese química em fase sólida
<b>TCA</b>	Ácido tricoloracético
<b>TMS</b>	Trimetilsilano
<b>TFA</b>	Ácido Trifluor Acético
<b>TOF</b>	Time of Fly
<b>Tris</b>	Tris-hidroxi-amino-metano
<b>TFE</b>	Trifluoretanol
<b>UA</b>	Unidade de Atividade
<b>UPLC</b>	Ultra Performance Liquid Chromatography
<b>YPD</b>	Yeast Peptone Dextrose
<b>µg, µL, mL</b>	Micrograma, Microlitro, Mililitro

## ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DOS AMINOÁCIDOS-PADRÃO DAS PROTEÍNAS

Nome	Símbolos		Aminoácido	
	3 letras	1 letra	Fórmula	M.M (g/mol)
<i>Cadeia lateral apolar</i>				
Glicina	Gly	G	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75,068
Alanina	Ala	A	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89,095
Valina	Val	V	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	117,149
Leucina	Leu	L	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131,176
Isoleucina	Ile	I	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131,176
Metionina	Met	M	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	149,213
Prolina	Pro	P	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	115,133
Fenilalanina	Phe	F	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	165,194
Triptofano	Trp	W	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204,230
<i>Cadeia lateral neutra</i>				
Serina	Ser	S	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	105,094
Treonina	Thr	T	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	119,121
Asparagina	Asn	N	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	132,120
Glutamina	Gln	Q	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	146,147
Tirosina	Tyr	Y	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	181,193
Cisteína	Cys	C	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	121,159
<i>Cadeia lateral carregada</i>				
Lisina	Lys	K	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	146,191
Arginina	Arg	R	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174,204
Histidina	His	H	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	155,158
Ácido Aspártico	Asp	D	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	133,105
Ácido Glutâmico	Glu	E	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147,132

**M.M – massa molecular**

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS.....	v
AGRADECIMENTOS PESSOAIS.....	vi
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES.....	xvii

### INTRODUÇÃO

1. Peptídeos vegetais.....	23
2. Revisão de literatura.....	24
2.1 Aspectos gerais dos peptídeos vegetais.....	24
2.1.1 <i>Classificação</i> .....	24
2.1.2 <i>Biossíntese</i> .....	26
2.1.3 <i>Detecção</i> .....	28
2.1.4 <i>Extração e isolamento</i> .....	29
2.1.5 <i>Propriedades farmacológicas e atividades envolvidas na defesa de plantas</i> .....	30
2.1.6 <i>Estratégias para a produção de peptídeos e aplicações biotecnológicas</i> .....	32
2.2 Por que estudar os peptídeos vegetais.....	34

### CAPITULO I – Estudos fitoquímicos (*ciclopeptídeos*) e biológicos nas frações do látex de *C. procera*

1 - INTRODUÇÃO.....	39
1.1. Látex e plantas laticíferas.....	39
1.2. Aspectos gerais da espécie <i>C. procera</i> .....	40
1.2.1 <i>Classificação</i> .....	40
1.2.2 <i>Composição química do látex</i> .....	41
1.2.3 <i>Propriedades farmacológicas do látex</i> .....	42
2. OBJETIVOS.....	45
2.1. Objetivos específicos.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46

3.1. Materiais.....	46
3.1.1 Reagentes.....	46
3.1.2 Obtenção do material vegetal.....	46
3.2. Métodos.....	46
3.2.1 Partição do látex de <i>C. procera</i> com solventes orgânicos.....	46
3.3. Métodos químicos de detecção.....	48
3.3.1 Análise qualitativa de metabólitos secundários.....	48
3.3.2 Detecção de peptídeos pelo método Cl <sub>2</sub> /o-tolidina.....	49
3.3.3 Detecção de peptídeos pelo método da ninidrina.....	50
3.4. Análises espectroscópicas.....	50
3.4.1 Infravermelho.....	50
3.4.2 RMN de <sup>1</sup> H.....	50
3.5. Análises cromatográficas.....	51
3.5.1 Exclusão molecular.....	51
3.5.2 Fase reversa.....	52
3.5.3 Estratégia 1 (Sephadex LH-20) .....	52
3.5.4 Estratégia 2 (Sephadex G-10).....	53
3.5.5 Estratégia 3 (Extração em fase sólida).....	53
3.5.6 Estratégia 4 (Centrirep 10 kDa).....	54
3.6. Ensaio biológicos.....	56
3.6.1 Atividade hemolítica.....	56
3.6.2 Avaliação de toxicidade.....	56
3.6.3 Atividade antiinflamatória.....	58
3.6.4 Análise estatística.....	58
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
4.1 Fracionamento do látex de <i>Calotropis procera</i> .....	59
4.2 Perfis fitoquímico das frações do látex.....	60
4.3 Ciclopetídeos nas frações do látex.....	67
4.4 Estratégias de isolamento de peptídeos nas frações do látex.....	70
4.5 Citotoxicidade das frações do látex frente a células tumorais.....	78
4.6 Atividade antiinflamatória das frações do látex.....	81
<b>5- CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>

## **CAPITULO II – Estudos de isolamento, sequenciamento *de novo* e identificação de peptídeos de sementes de *J. curcas***

<b>I - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>85</b>
1.1. O gênero <i>Jatropha</i> .....	85
1.2. Aspectos gerais da espécie <i>J. curcas</i> .....	87
1.3. Estudos com as sementes de pinhão manso.....	88
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>91</b>
2.1. Objetivos específicos.....	91
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>92</b>
3.1. Materiais.....	92
3.1.1 <i>Reagentes</i> .....	92
3.1.2 <i>Obtenção do material vegetal</i> .....	92
3.2. Métodos.....	92
3.2.1 <i>Extração</i> .....	92
3.2.2 <i>Extração em fase sólida</i> .....	93
3.2.3 <i>Cromatografia de exclusão molecular</i> .....	94
3.2.4 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa</i> .....	94
3.2.5 <i>Subfracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa</i> .....	94
3.2.6 <i>Análise por espectrometria de massas</i> .....	95
3.2.7 <i>Sequenciamento de novo</i> .....	95
3.2.8 <i>Busca no banco de sequências genômicas de <i>J. curcas</i></i> .....	96
3.2.9 <i>Identificação e busca de similaridades</i> .....	96
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>97</b>
4.1 Perfis cromatográficos da fração 1 das sementes de <i>J. curcas</i> .....	97
4.2 Análises por espectrometria de massas e sequenciamento <i>de novo</i> .....	99
4.3 Comparação entre frações através dos padrões de fragmentação por MS/MS.	103
4.4 Identificação, busca de similaridades em bancos de dados e predição estrutural.	105
<b>5- CONCLUSÃO.....</b>	<b>110</b>

## **CAPITULO III – Estudos estruturais e biológicos com dois peptídeos sintéticos análogos**

<b>I- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>112</b>
---------------------------	------------

1.1. Estudos com peptídeos sintéticos.....	112
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>117</b>
2.1. Objetivos específicos.....	117
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>118</b>
3.1. Materiais.....	118
3.1.1 <i>Reagentes</i> .....	118
3.1.2 <i>Obtenção dos peptídeos sintéticos</i> .....	118
3.2. Métodos.....	118
3.2.1 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa</i> .....	118
3.2.2 <i>Análise por espectrometria de massas</i> .....	119
3.2.3 <i>Mobilidade iônica</i> .....	119
3.2.4 <i>Dicroísmo circular</i> .....	119
3.2.5 <i>Ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C</i> .....	120
3.3. Ensaio biológicos.....	121
3.3.1 <i>Atividade hemolítica</i> .....	121
3.3.2 <i>Ensaio de citotoxicidade frente a linhagens celulares</i> .....	121
3.3.3 <i>Atividade de inibição proteolítica</i> .....	121
3.3.4 <i>Ensaio antifúngicos</i> .....	123
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>125</b>
4.1 Síntese química de análogos sintéticos lineares e cíclicos a partir de um peptídeo de sementes de <i>J. curcas</i> .....	125
4.2 Análise do estado de carga dos peptídeos sintéticos em função do pH.....	128
4.3 Análises por HPLC, espectrometria de massas e de mobilidade iônica de PL e PC	130
4.4 Análises estruturais de PL e PC por DC e RMN unidimensional de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C.....	137
4.5 Ensaio biológicos.....	142
<b>5 - CONCLUSÃO.....</b>	<b>147</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>148</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>149</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>163</b>

# INTRODUÇÃO

## 1. Peptídeos vegetais

O crescimento de produtos naturais que tiveram aprovação para uso como drogas foi exponencial nos últimos anos, principalmente nas áreas de câncer e doenças infecciosas, onde, respectivamente, 60 e 75% das drogas são de origem natural (KINGHORN *et al.*, 2009; NEWMAN e GRAGG, 2007). Embora a área de fármacos sintéticos tenha se desenvolvido bastante, as plantas tornaram-se a principal fonte de recursos para o desenvolvimento de novos medicamentos (NEWMAN *et al.*, 2003). Assim, além dos compostos de origem natural destacarem-se pelo seu uso direto como fármacos, existe a possibilidade de serem utilizados como protótipos para a síntese de moléculas biologicamente ativas (DEWICK, 2002).

Nesse contexto, os peptídeos de origem vegetal têm se destacado como moléculas promissoras na busca de novos fármacos (PICHI *et al.*, 2009). Estas moléculas apresentam uma série de vantagens em relação a outras biomoléculas como as proteínas, a citar: baixa massa molecular, boa estabilidade, estrutura relativamente simples, além de uma versatilidade química e funcional (SEWALD e JAKUBKE, 2002).

Vale mencionar também que a obtenção de análogos sintéticos a partir de peptídeos naturais por síntese química tem se tornado a cada ano um processo mais rápido, simples e barato, o que tem permitido a obtenção de uma variedade quase inimaginável de moléculas diferentes, com modificações pontuais, a partir de uma única e pequena sequência primária de aminoácidos (CHATTERJEE *et al.*, 2012).

Outro aspecto importante, recentemente posto em debate em torno dos peptídeos vegetais, diz respeito a um fenômeno comum, se não essencial, associado à defesa vegetal, denominado promiscuidade de peptídeos, no qual múltiplas funções estão associadas a uma única estrutura peptídica (FRANCO,

2011). Esse fenômeno pode abrir perspectivas para o desenvolvimento de medicamentos assim como produtos biotecnológicos sintéticos (SILVA *et al.*, 2012).

Todas as questões citadas anteriormente, desconsiderando o imenso potencial ainda inexplorado, têm se refletido em um número crescente de novos peptídeos vegetais isolados e descritos na literatura nos últimos anos, a partir dos mais diversos tecidos vegetais, descrevendo uma impressionante diversidade de atividades biológicas em concentrações baixíssimas (TAN e ZHOU, 2006).

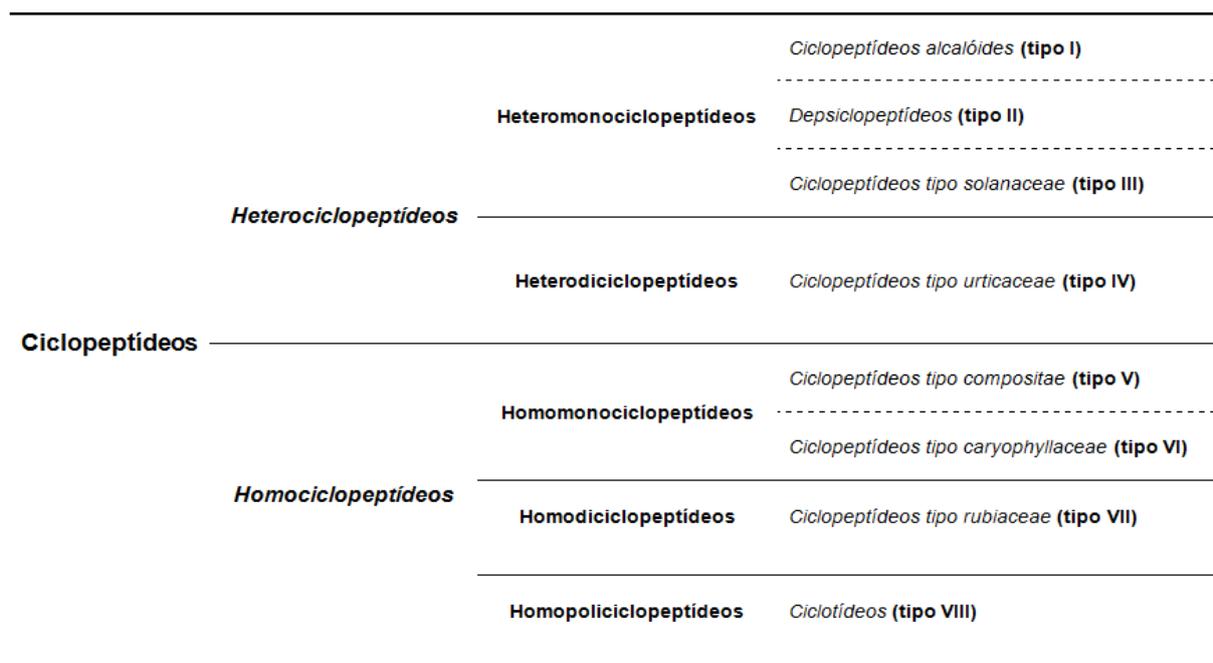
## **2. Revisão de literatura**

### 2.1 Aspectos gerais dos peptídeos vegetais

#### 2.1.1 Classificação

Baseado no arranjo da cadeia peptídica, os peptídeos vegetais são divididos em cíclicos (fechados) e lineares (abertos) (MA *et al.*, 2007). Apesar disto, os esforços para uma classificação adequada destas moléculas têm sido direcionados quase que exclusivamente para as moléculas cíclicas (PICCHI *et al.*, 2009). Desde que o primeiro ciclopeptídeo foi isolado da espécie *Linum usitatissimum*, ainda na década de 50 (Ciclolinopeptídeo, CLA, tipo VI), quase 500 novas moléculas cíclicas foram descobertas, pertencendo a 26 famílias, 65 gêneros e 120 espécies de plantas (TAN e ZHOU, 2006).

TAN e ZHOU (2000) propuseram a primeira classificação para os peptídeos cíclicos, mas após uma extensa revisão bibliográfica, haja vista o grande número de moléculas já descritas até então, esses mesmos autores (TAN e ZHOU, 2006) propuseram uma nova classificação baseada no arranjo estrutural e na sua distribuição botânica, qual seja: duas classes, cinco subclasses e oito tipos (Figura 1).



**Figura 1-** Classificação dos ciclopeptídeos vegetais. Fonte: TAN e ZHOU, 2006.

Nesta classificação estão inclusos tanto os peptídeos cíclicos sintetizados e não-sintetizados ribossomicamente, assim como os peptídeos formados por D e L aminoácidos, além daqueles formados por aminoácidos modificados. Destes, dois tipos merecem destaque: os peptídeos cíclicos tipo-Caryophyllaceae (tipo VI), os quais são ciclos contendo de 2-12 resíduos de aminoácidos proteinogênicos, normalmente L-aminoácidos, bem como os ciclotídeos (tipo VIII), descritos como peptídeos macrocíclicos, consistindo de 28-37 resíduos de aminoácidos com pontes dissulfeto (CRAIK, 2010; MA *et al.*, 2007).

Segundo PICHI e colaboradores (2009), algumas limitações a respeito da classificação proposta por TAN e ZHOU (2006) devem ser consideradas, tais como: 1) a não inclusão, em seu quadro, dos peptídeos de natureza linear, que desempenham papéis centrais para as plantas; 2) o uso de uma nomenclatura baseada em famílias botânicas, o que leva a generalizações e inferências pouco elucidativas quanto à filogenia dos grupos taxonômicos; 3) o fato de não considerarem outros peptídeos cuja natureza cíclica é mantida por pontes dissulfeto, mas que apresentam as extremidades amino- e carboxi-terminal livres; 4) e, por fim, a ausência de critérios baseados na biossíntese destas moléculas.

Mais recentemente, os peptídeos vegetais cíclicos sintetizados ribossomicamente e formados exclusivamente pelos vinte amino ácidos formadores de proteínas foram divididos por THORSTHOLM e CRAIK (2011) em duas classes, os inibidores de tripsina de girassol e os ciclotídeos.

CASTRO e FONTES (2005) chamam a atenção para uma classe bastante estudada de peptídeos vegetais, também conhecidos como peptídeos antimicrobianos. Estas moléculas têm grande importância na defesa de plantas, seja como parte de barreiras constitutivas ou ainda nas respostas induzidas por infecções. Estes peptídeos possuem massas que variam de 2 a 9 kDa e são divididos em dez classes listadas a seguir: tioninas, defensinas, proteínas de transferência de lipídeos, peptídeos semelhantes-à-heveína, peptídeos semelhantes-a-nó, MBP1, IbAMP, snakinas, sheferdinas e peptídeos macrocíclicos.

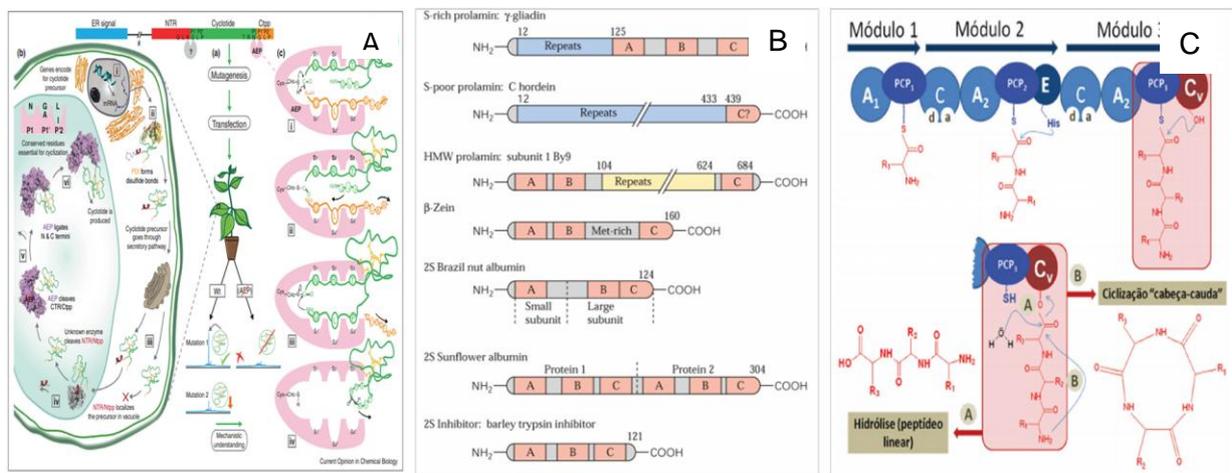
Pode-se concluir que não existe na literatura uma classificação que contemple toda a diversidade de peptídeos vegetais descritos até então, e apesar da revisão de TAN e ZHOU (2006) constituir um trabalho completo e um referencial teórico na área, este trata apenas dos peptídeos cíclicos, desconsiderando, assim, todos os demais tipos de peptídeos, o que inclui outros tipos de peptídeos cíclicos.

### 2.1.2 *Biossíntese*

O processo de síntese de muitos tipos de peptídeos permanece desconhecido (PICCHI *et al.*, 2009). Até o momento existem três mecanismos gerais relacionados à síntese de peptídeos, os quais incluem a síntese dos peptídeos vegetais (BUCHANAN *et al.*, 2000). O primeiro deles envolve um mecanismo ribossomal de síntese dependente de ácido nucléico, ou seja, os peptídeos são produtos da expressão gênica (Figura 2A). Assim, acredita-se que os peptídeos sejam derivados de precursores protéicos maiores, os quais são posteriormente submetidos à clivagem, ciclização da cadeia peptídica (quando ocorre) e outras modificações pós-traducionais. Neste caso incluem-se a sistemina, os inibidores de tripsina do girassol, os ciclotídeos e as defensinas (SEWALD e JAKUBKE, 2002).

O segundo mecanismo também envolve um processo ribossomal de síntese, entretanto os peptídeos são originários de um extenso processamento proteolítico de proteínas maduras, como é o caso dos peptídeos gerados a partir da proteólise de proteínas de reserva em sementes (FRANSSSEN e BISSELING, 2001; BUCHANAN *et al.*, 2000) (Figura 2B).

Acredita-se que no terceiro mecanismo de biossíntese, o qual propõe a síntese dos demais peptídeos cíclicos (tipos I, II, III, IV, V, VI e VII) descritos pela classificação de TAN & ZHOU (2006), estas moléculas sejam sintetizadas através de um complexo multienzimático *in vivo* conhecido como peptídeo sintase não-ribossomal (NRPS) (Figura 2C). Neste processo ocorre a incorporação tanto de aminoácidos formadores de proteínas, como daqueles não-proteinogênicos, além de outras unidades construtoras não usuais, como carboxi-ácidos e hidróxi-ácidos (PICCHI *et al.*, 2009). Segundo TAN e ZHOU (2006), acredita-se que esses tipos de peptídeos sejam metabólitos secundários.



**Figura 2** – Mecanismos envolvidos na biossíntese de peptídeos vegetais. **(A)** Síntese ribossomal e processamento proteolítico para gerar um peptídeo funcional **(B)** Síntese ribossomal e degradação proteica **(C)** Síntese não ribossomal através de um complexo multienzimático. Fonte: CRAIK e MALIK, 2013 (A); BUCHANAN, 2000 (B); PICCHI *et al.*, 2009 (C).

### 2.1.3 Detecção

Juntamente com todo o interesse na descoberta de peptídeos bioativos e com o número crescente de novas moléculas descobertas a cada ano, cresce a importância dos métodos de detecção (PICCHI *et al.*, 2009). TAN e ZHOU (2006), em sua extensa revisão sobre ciclopeptídeos, descrevem os principais reagentes e métodos químicos utilizados para sua detecção, sendo que alguns deles são não-específicos.

Dentre os métodos químicos específicos merece destaque o que emprega o reagente clorox ( $\text{Cl}_2$ /o-tolidina), o qual detecta ligações peptídicas pela reação do grupo amida com  $\text{Cl}_2$  formando N-halogênio. A revelação ocorre pela borrifação de uma solução de o-tolidina/KI, a qual resulta em uma coloração azul escuro quando o teste é positivo (ALTEI, 2009; VAN DEN BERG *et al.*, 1995).

Outro método específico de destaque utiliza placas de cromatografia em camada delgada para revelação com o reagente ninidrina, que reage com os grupos amino livres. TAN e ZHOU (2000) desenvolveram este novo método químico, o qual hidrolisa previamente as amostras sob condições ácidas antes de empregar o reagente ninidrina. Este método mostrou-se eficaz na detecção de peptídeos cíclicos, uma vez que o antigo método que também empregava o reagente ninidrina permitia a detecção apenas de moléculas lineares, ou seja, com extremidades amino livres. Estes autores puderam detectar e isolar, através deste novo método, mais de 73 ciclopeptídeos provenientes de dezessete plantas diferentes, pertencendo a cinco famílias e quatorze gêneros. Recentemente, o método que emprega o reagente ninidrina foi empregado na detecção de um ciclopeptídeo em plântulas da espécie *Santalum album L.* (MISHRA *et al.*, 2014).

Atualmente, a ferramenta analítica mais sofisticada para detecção e confirmação da presença de peptídeos é a espectrometria de massas, apesar do alto custo de aquisição dos equipamentos. A sua grande vantagem reside na rapidez da análise e no grande número de amostras que podem ser analisadas de uma única vez, além das informações adicionais que podem ser obtidas como: massa molecular, sequência primária e presença de aminoácidos modificados (LIU *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2008).

#### 2.1.4 Extração e isolamento

A biomassa vegetal é constituída por uma matriz complexa de diversos tipos de biomoléculas com uma ampla faixa de polaridade e hidrofobicidade, na qual se incluem substâncias pouco polares (ceras e terpenóides), com polaridade intermediária (compostos fenólicos e alguns alcalóides) e muito polares (glicosídeos, alguns alcalóides, sacarídeos, peptídeos e proteínas) (ROMANIK *et al.*, 2007). A grande diversidade e heterogeneidade dos peptídeos vegetais, aliadas a sua presença em quantidades muito pequenas, tornam a missão de extraí-los e isolá-los muito mais complexa. Assim, as etapas de pré-extração, extração, enriquecimento, atreladas aos múltiplos passos cromatográficos são condições essenciais para estudos bem sucedidos de isolamento e purificação de peptídeos (CHIU *et al.*, 2012).

Um protocolo para o isolamento de frações polipeptídicas da biomassa vegetal foi proposto por CLAESON e colaboradores (1998). Este protocolo envolve: uma pré-extração com diclorometano, extração com etanol (50 %), remoção de taninos com poliamida, remoção dos componentes de baixa massa molecular por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-10), remoção de sais e polissacarídeos com cartuchos de extração em fase sólida (fase reversa), e por fim, múltiplos passos de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando colunas de fase reversa.

Já TAN e ZHOU (2006), descrevem pelo menos três métodos para o isolamento de três tipos diferentes de peptídeos cíclicos, os ciclopeptídeos tipo-Caryophyllaceae, ciclopeptídeos alcalóides e ciclotídeos. Isso mostra que em virtude do tipo de tecido a ser estudado e das suas particularidades, além das propriedades da molécula de interesse, as metodologias são bastante divergentes. Apesar de todas estas limitações e dificuldades, cresce a cada dia o número de descobertas de novas moléculas, principalmente de peptídeos tipo ciclotídeos e ciclopeptídeos tipo-Carophyllaceae (GERLACH *et al.*, 2013; PICCHI *et al.*, 2009)

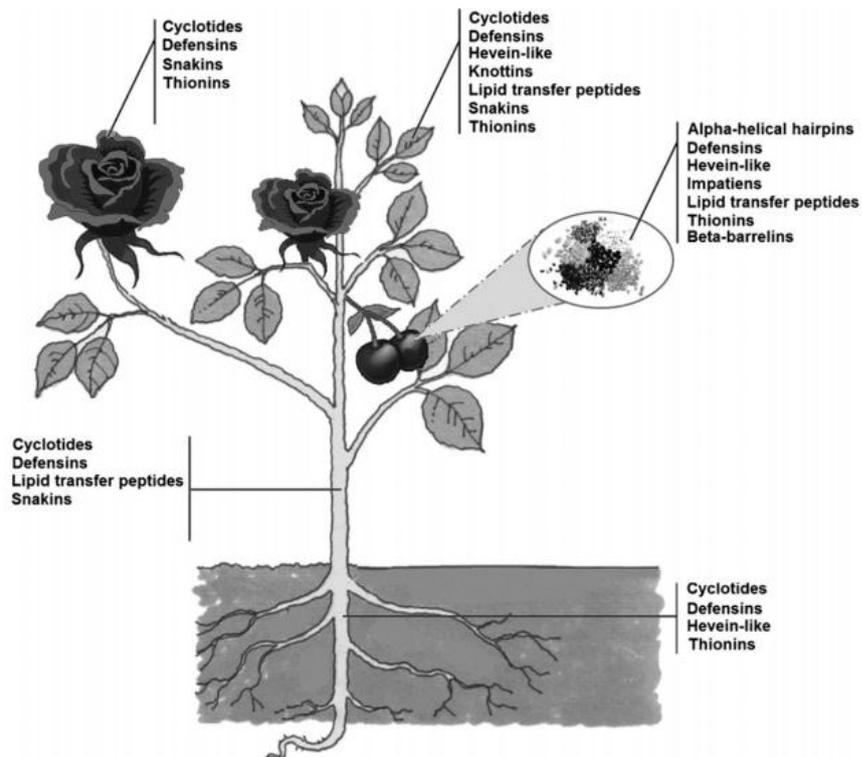
### 2.1.5 Propriedades farmacológicas e atividades envolvidas na defesa de plantas

Um fato que chama a atenção nos estudos com peptídeos vegetais é o espectro de atividades biológicas descritas, o que mostra o potencial farmacológico dessas moléculas (MA *et al.*, 2007). Os novos peptídeos isolados têm revelado uma grande diversidade estrutural o que tem justificado o amplo espectro de atividades biológicas descritas (TAN e ZHOU, 2006).

A ação citotóxica frente a linhagens de células tumorais tem sido bastante observada em peptídeos vegetais, principalmente nos peptídeos cíclicos, como por exemplo, na diantina E que inibiu o crescimento de células cancerosas de fígado (linhagem HepG2), com uma IC<sub>50</sub> de 2,37 µg/ml *in vivo* e a cicloviolacina 2 que apresentou uma potente ação citotóxica (IC<sub>50</sub> de 0,1- 0,3 µM) frente a diversas linhagens celulares *in vivo* (MA *et al.*, 2007). Outros exemplos de peptídeos com atividade semelhante são: a integerrimida A e B (MONGKOLVISUT *et al.*, 2006), o glaucaciclopeptídeo A (WÉLE *et al.*, 2005a), o querimolaciclopeptídeo A e B (WÉLE *et al.*, 2005b), longicalicinina A (HSIEH *et al.*, 2005), Yunanina A (NAPOLITANO *et al.*, 2003), dicotomina H e I (MORITA *et al.*, 1997), Yunanina C (MORITA *et al.*, 1996) e segetalina C (MORITA *et al.*, 1995).

Um aspecto interessante é que os peptídeos isolados da família Euphorbiaceae, particularmente do gênero *Jatropha*, são notórios pela atividade antiproliferativa do parasita *Plasmodium* (PICCHI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009). Outras atividades biológicas que têm sido descritas para peptídeos vegetais são: antimicrobiana (CRAICK *et al.*, 2001), anti-HIV (CRAICK *et al.*, 2010), vasodilatadora (MORITA *et al.*, 2005), atividade estrogênica (YUN *et al.*, 1997), imunomoduladora (VAN DEN BERG *et al.*, 1995) e atividade rotamase da ciclofilina (BARAGUEY *et al.*, 1998).

Outra classe de peptídeos vegetais, os peptídeos antimicrobianos, como as tioninas e defensinas, tem sido descrita como moléculas envolvidas diretamente nos mecanismos de defesa vegetal, principalmente contra organismos fitopatogênicos (CASTRO e WAGNER, 2005) (Figura 3).



**Figura 3** – Diferentes tecidos vegetais onde os peptídeos antimicrobianos têm sido encontrados. Fonte: RIBEIRO *et al.*, 2013.

Estudos recentes têm demonstrado que a sinalização em plantas mediada por peptídeos está relacionada com vários aspectos importantes do seu crescimento e desenvolvimento (FRANSSEN e BISSELING, 2001). Assim, o isolamento e as atividades biológicas desempenhadas por estas moléculas têm confirmado não só sua presença, como também, evidenciado sua atuação como hormônios vegetais, que até recentemente era conhecida por ser atribuída exclusivamente aos fitohormônios como auxinas, citocininas, giberelinas, ácido absísico e etileno (MATSUBAYASHI e SAKAGAMI, 2006).

Apesar de todas as atividades descritas, principalmente a ação citotóxica, os mecanismos de ação dos peptídeos ainda são desconhecidos, e até o momento tem-se dado destaque à restrição estrutural dessas moléculas como importantes para seu modo de ação, daí esforços estarem sendo voltados para a elucidação estrutural e sua relação com a atividade biológica (ALTEI, 2009).

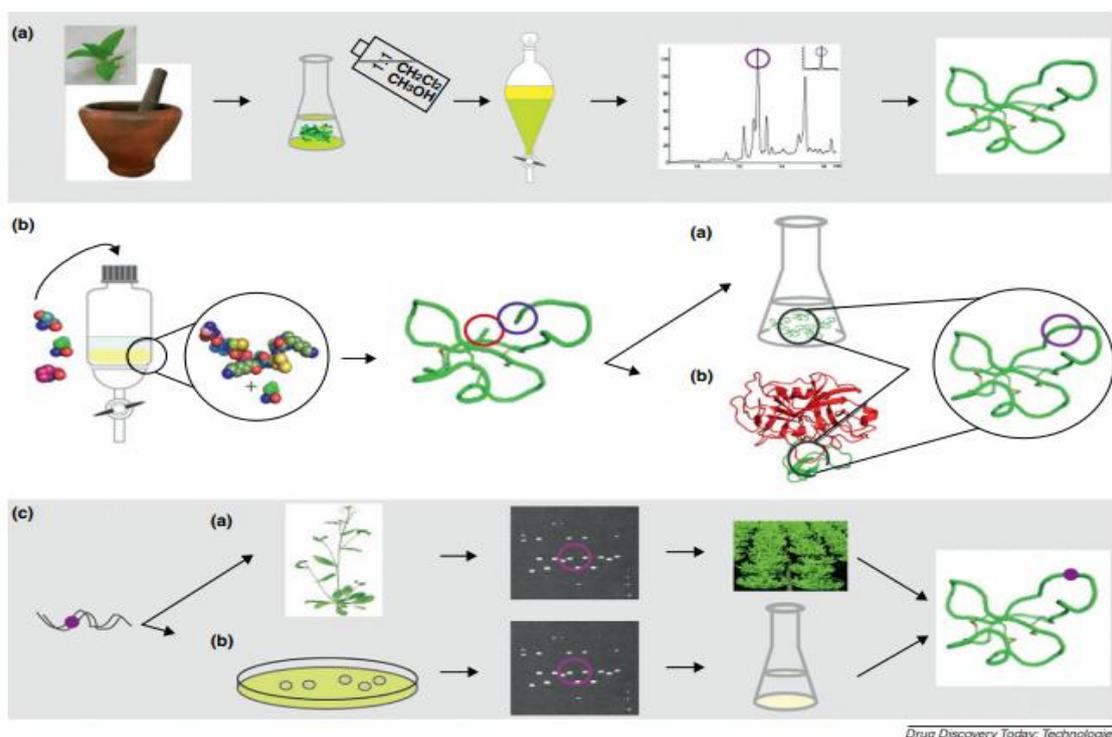
Recentemente BARBOSA e colaboradores (2011), mostraram que a viabilidade celular de células bacterianas gram-positivas (*Streptococcus mutans*) foi

acentuadamente diminuída pelo peptídeo cíclico labadatina quando comparado com seu análogo linear. Este estudo mostra a importância do arranjo mais rígido (cíclico) em relação ao arranjo mais flexível (linear) no que diz respeito à função biológica desempenhada por esta molécula. Alguns estudos têm, inclusive, mostrado a perda da atividade biológica de peptídeos cíclicos, quando estes têm suas cadeias peptídicas linearizadas (ALTEI, 2009; COZZOLINO *et al.*, 2005; MORITA *et al.*, 1997).

TAN e ZHOU (2006) têm atribuído o largo espectro de atividades biológicas destas moléculas ao arranjo rígido e ao grande número de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes. PICCHI e colaboradores (2009) enfatizaram outras características físico-químicas dentre análogos cíclicos e lineares que também têm justificado suas funções biológicas tão distintas como uma maior estabilidade à degradação térmica e enzimática e uma maior afinidade na interação com receptores por parte dos peptídeos cíclicos.

#### *2.1.6 Estratégias para a produção de peptídeos e aplicações biotecnológicas*

THORSTHOLM e CRAIK (2011) descrevem três estratégias para a obtenção de peptídeos cíclicos que, na verdade, se aplicam a todos os peptídeos, incluindo os vegetais (Figura 4). A primeira delas é o isolamento destas moléculas diretamente a partir do organismo hospedeiro (Figura 4A). Essa estratégia é a mais usada atualmente e conta com uma série de metodologias a serem usadas, a depender do tecido em estudo, para a obtenção da sequência primária, resolução de estrutura e testes das possíveis atividades biológicas. TAN e ZHOU (2006) descrevem 455 tipos diferentes de peptídeos isolados a partir de várias destas metodologias. Segundo PICCHI e colaboradores (2009), as desvantagens dessa abordagem são os baixos rendimentos obtidos e o tempo gasto para o isolamento de moléculas de matrizes tão complexas e heterogêneas.



**Figura 4** – Estratégia para a obtenção de peptídeos. **(A)** Isolamento a partir de fontes naturais **(B)** Síntese química ou enzimática **(C)** Síntese biológica. Fonte: THORSTHOLM e CRAIK, 2011.

Por outro lado, o tamanho pequeno dos peptídeos, permitiu o desenvolvimento e aperfeiçoamento das tecnologias de síntese químio-enzimática, dentre as quais a síntese química em fase sólida (SQFS) tem sido a abordagem mais utilizada (MACHADO *et al.*, 2004) (Figura 4B). Uma das grandes vantagens desta tecnologia é a possibilidade de fazer modificações ou incorporações de aminoácidos não naturais na sequência original, através de uma quantidade quase imensurável de modificações químicas diferentes (CHATTERJEE *et al.*, 2012).

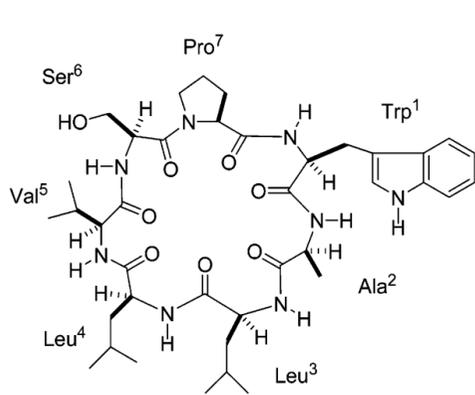
Por último, mas não menos importante, pode-se citar a síntese biológica que faz uso de métodos modernos de clonagem e expressão gênica empregando microrganismos modificados (Figura 4C). Essa abordagem permite produzir um peptídeo recombinante ou vários deles simultaneamente. A grande maioria dos laboratórios utiliza bactérias como sistemas de expressão o que tem como vantagens, o baixo custo, a possibilidade de produção em larga escala, a criação de bibliotecas de peptídeos, além da marcação isotópica com N<sup>15</sup> e/ou C<sup>14</sup> (THORSTHOLM e CRAIK, 2011).

## 2.2 Por que estudar os peptídeos vegetais?

Nas últimas décadas a procura por novas moléculas bioativas, oriundas de produtos naturais, tem ocorrido de maneira incessante (NEWMAN *et al.*, 2003), principalmente diante de estatísticas como as da Organização Mundial de Saúde que prevê a morte de 13,1 milhões de pessoas em 2030 em decorrência de câncer. Vale salientar que essa doença foi responsável pelo óbito de 8,2 milhões de pessoas em 2012 (World Health organization, Fevereiro de 2014).

Atualmente, os peptídeos, especialmente os de natureza cíclica, têm sido considerados um dos grandes destaques na química de produtos naturais (PICCHI *et al.*, 2009). O número crescente de novos peptídeos isolados a partir das mais diversas matrizes biológicas revela uma extensa variedade de tipos estruturais e de atividades biológicas que têm sido alvo de pesquisas bioquímicas, objetivando inibidores de proteases, imunossupressores, antimicrobianos, anticancerígenos, dentre outros (TAN e ZHOU, 2006). Apesar das inúmeras atividades biológicas descritas para os peptídeos vegetais, seus mecanismos de ação ainda permanecem pouco conhecidos. Desta maneira, além da procura por novas moléculas, esforços têm sido voltados para a elucidação estrutural e sua relação com a atividade biológica (ALTEI, 2008).

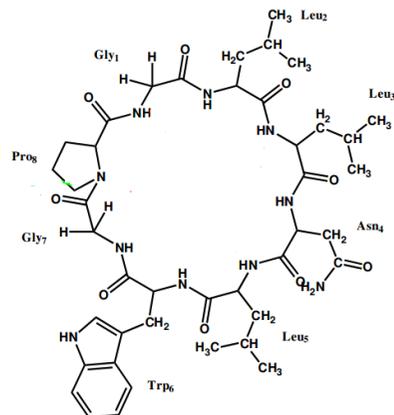
Algumas famílias de angiospermas são notórias por acumularem peptídeos de natureza cíclica (Annonaceae, Caryophyllaceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae e Violaceae) (TAN e ZHOU, 2006). A partir do látex das espécies do gênero *Jatropha*, por exemplo, diversos peptídeos já foram isolados (Integerrimidinas, Curcaciclinas A e B, Jatrophidina, Pohlianinas, Podaciclina, Ciclogossina, Quevalierinas e Mahafaciclina) (Figura 5). Entretanto, em outros tecidos vegetais das espécies deste gênero, como nas sementes de *J. curcas*, há um único relato de um peptídeo isolado (XIAO *et al.*, 2011).



**Integerrimida B**

*J. integerrima*

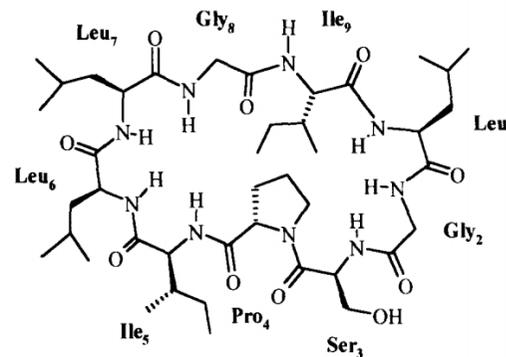
Mongkolvisut et al. (2006)



**Jatrophidina**

*J. curcas*

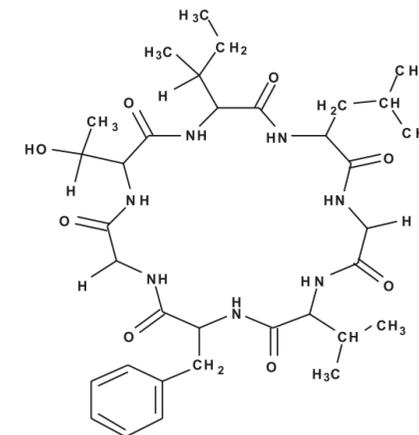
Altei et al. (2007)



**Curaciclina B**

*J. podagrica*

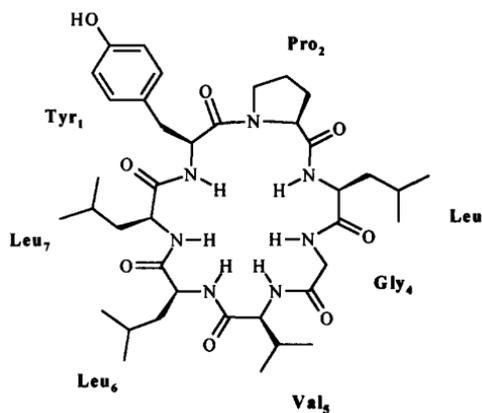
Van den Berg et al. (1996)



**Mahafaciclina A**

*J. mahafalensis*

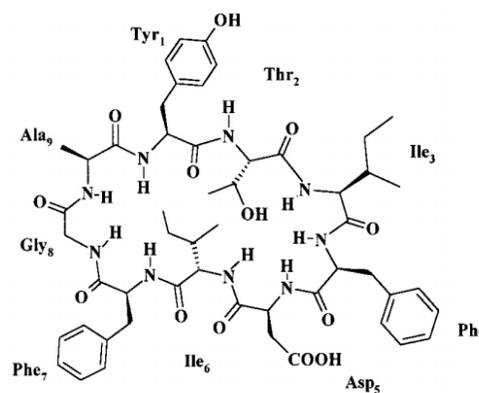
Baraguet et al. (2000)



**Pohlianina A**

*J. pohliana*

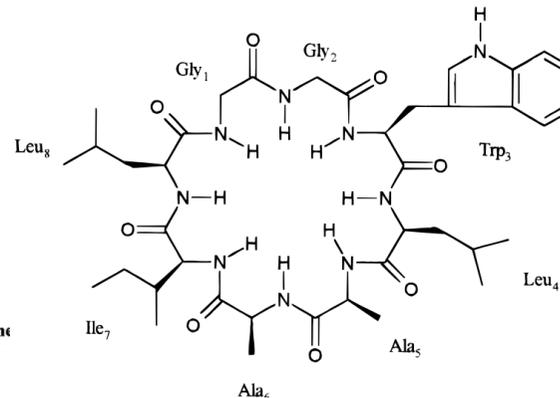
Auvin-Guette et al. (1999)



**Quevalierina C**

*J. chevalieri*

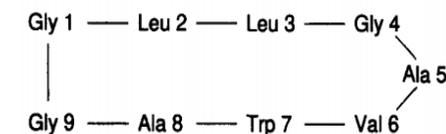
Baraguet et al. (1998)



**Ciclogossina B**

*J. gossypifolia*

Auvin-Guette et al. (1997)



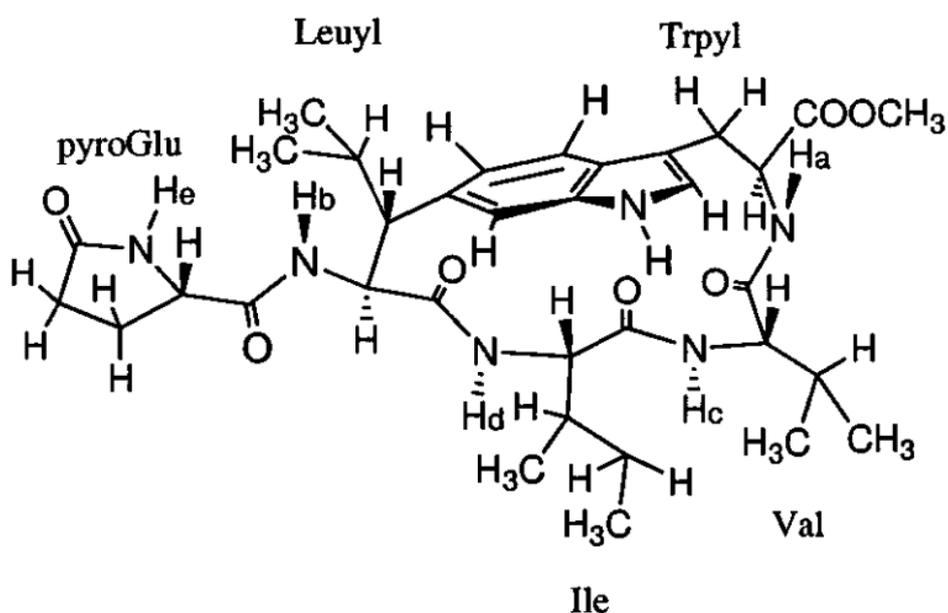
**Podaciclina A**

*J. podagrica*

Van den Berg et al. (1996)

Figura 5 – Estruturas de alguns peptídeos cíclicos isolados das espécies do gênero *Jatropha*.

A espécie *Calotropis procera*, por exemplo, é conhecida por produzir uma grande quantidade de látex, que é muito usado na medicina tradicional para tratar uma grande quantidade de enfermidades (MEENA *et al.*, 2010). Segundo CHOEDON e colaboradores (2006), o látex tem apresentado atividade antitumoral *in vivo* além de propriedades citotóxicas e antiinflamatórias. Entretanto, para a subfamília Asclepiadoideae, da qual faz parte a espécie *C. procera*, há apenas um único trabalho citando o isolamento de um peptídeo, no caso, cíclico, extraído do caule da espécie *Stephanotis floribunda* (YOSHIKAWA *et al.*, 2000) (Figura 6).



**Figura 6** – Estrutura do peptídeo cíclico isolado do caule da espécie *Stephanotis floribunda*.

Baseado no fato de que as plantas acumulam peptídeos únicos e de reconhecido interesse farmacológico e que os estudos com os peptídeos, principalmente de natureza cíclica, apresentam um imenso potencial a ser explorado, a realização de estudos de prospecção, isolamento e caracterização estrutural e biológica destas moléculas torna-se imprescindível.

Por outro lado, este conhecimento possibilitará, também, avanços nos estudos de síntese química com análogos sintéticos de peptídeos vegetais das espécies *Calotropis procera* e *Jatropha curcas*, plantas amplamente distribuídas no Nordeste brasileiro e conhecidas pelos seus mais diversos usos, além do potencial fitoquímico ainda pouco explorado (SABANDAR *et al.*, 2013; CHUNDATTU *et al.*, 2011).

A presente tese tem como tema uma área de conhecimento científico ainda pouco explorada no Brasil, onde os primeiros trabalhos começaram a se desenvolver nos últimos cinco anos (PICCHI *et al.*, 2009). Apesar de vários grupos de pesquisa, distribuídos pelo país, estarem focados há muitos anos nos estudos de peptídeos vegetais antimicrobianos e até possuírem experiência científica no assunto, os demais tipos de peptídeos vegetais, carecem urgentemente de estudos que contemplem, principalmente, a flora nativa do nosso país. Assim, essa linha de pesquisa representa uma área pioneira nos estudos dos peptídeos vegetais no cenário nacional.

Esta tese foi dividida em três capítulos, os quais encontram-se sucintamente descritos adiante: **Capítulo 1** - neste, trata-se da partição do látex de *C. procera* em cinco frações e do estudo do perfil fitoquímico destas frações, incluindo os ciclopeptídeos, além da avaliação do potencial antiinflamatório e citotóxico de cada uma delas; **Capítulo 2** - aqui explora-se a extração, fracionamento, obtenção de sequências primárias de peptídeos, a partir de sementes maduras de *J. curcas*, além da confirmação, no genoma, destas sequências; **Capítulo 3** - por fim, apresenta-se uma análise das diferenças físicas, químicas, estruturais e biológicas de dois peptídeos sintéticos análogos, sendo um linear e outro cíclico, obtidos por síntese química em fase sólida, cujas sínteses foram direcionadas pela identificação e sequenciamento de um peptídeo obtido no capítulo 2.

# Capítulo I

**Estudos fitoquímicos  
(ciclopeptídeos) e biológicos nas  
frações do látex de *C. procera***

# 1. Introdução

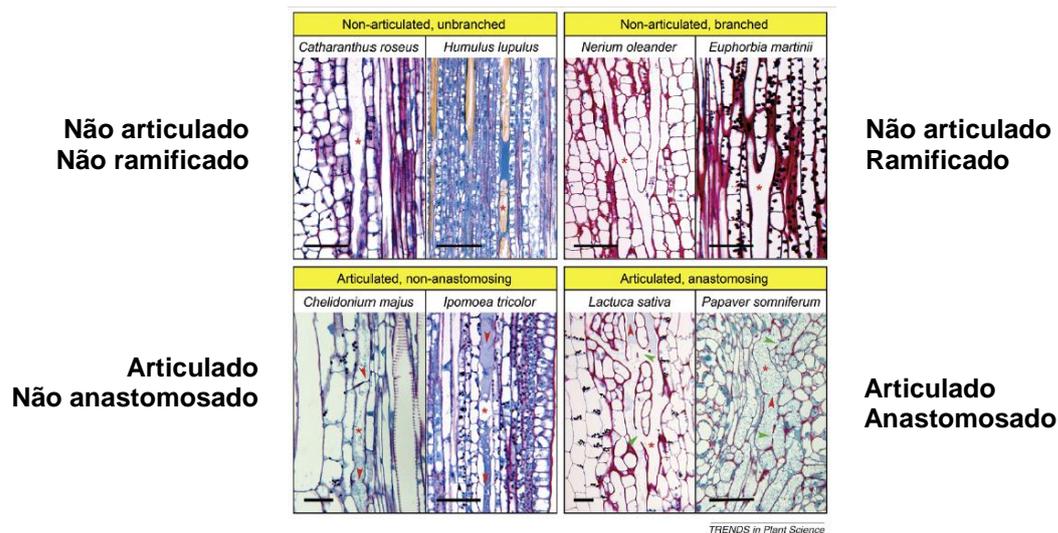
## 1.1 Látex e plantas laticíferas

O termo látex é frequentemente utilizado para descrever uma secreção de aspecto leitoso liberada pela planta quando esta sofre algum tipo de injúria mecânica ou é atacada por herbívoros. Este fluido é exsudado das plantas a partir de estruturas denominadas laticíferos, as quais são células ou fileiras de células especializadas (KONNO, 2011).

O aspecto visual do látex é peculiar de cada espécie (esbranquiçado, amarelado, laranja, incolor, ou ainda, marrom) (PICKARD, 2008). A produção de látex ocorre em mais de 20,000 espécies de plantas compreendendo mais de 40 famílias, o que representa 8,9% de todas as angiospermas, com exceção às coníferas (HAGEL *et al.*, 2008). Dentre as plantas mais comuns e conhecidas que produzem látex estão as espécies das famílias Apocynaceae, Caricaceae e Euphorbiaceae (DOMSALLA e MELZIG, 2008).

O fluido laticífero das plantas contém uma grande diversidade de compostos químicos, principalmente metabólitos secundários (alcalóides, terpenóides, cardenolídeos, compostos fenólicos, dentre outros) e proteínas (oxidases, lectinas, proteínas de ligação à quitina, quitinases, glucosidases e fosfatases) que muitas vezes estão relacionados à defesa vegetal contra insetos herbívoros (AGRAWAL e KONNO, 2009).

Os laticíferos podem ser classificados em articulados, quando formados por fileiras de células bem definidas (como encontradas na *Hevea brasiliensis*), ou não articulados, quando uma única célula alongada se desenvolve através do crescimento intrusivo, de modo semelhante a hifas de fungos (como encontradas em *Asclepias* spp. e *Cannabis* spp.) (HAGEL *et al.*, 2008; KEKWICK, 2001) (Figura 1).



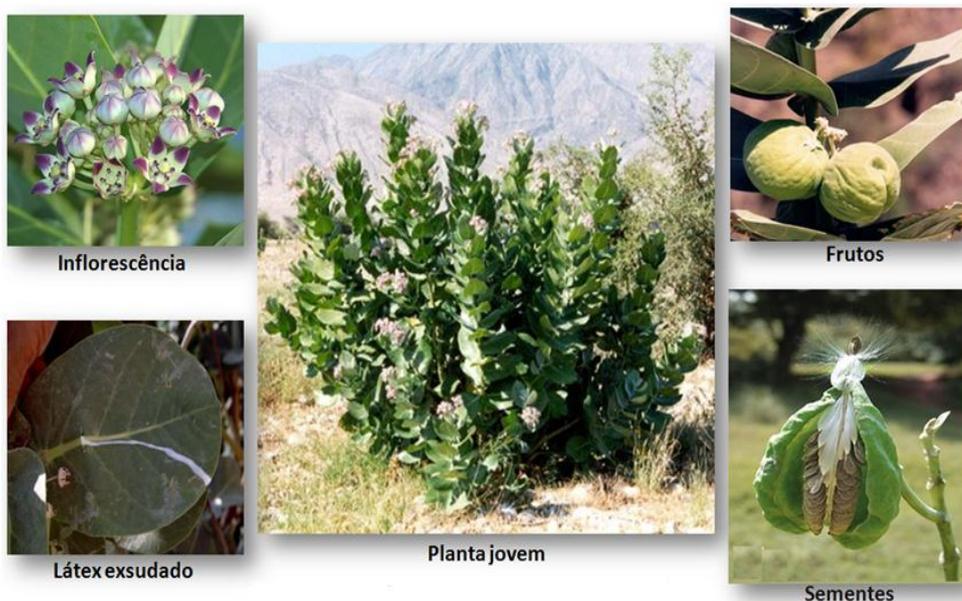
**Figura 1-** Aspectos morfológicos das secções longitudinais de tecidos de diferentes espécies vegetais produtoras de látex. Fonte: HAGEL *et al.*, 2008.

## 1.2 Aspectos gerais da espécie *Calotropis procera*

### 1.2.1 Classificação

Dentre as plantas laticíferas e pertencentes à família Apocynaceae, encontra-se a flor de seda (*Calotropis procera*) (Figura 2), um arbusto perene, ereto, pouco ramificado e que pode alcançar até 3,5 metros de altura (CHUNDATTU *et al.*, 2011). Uma característica peculiar desta espécie é a intensa produção de um látex de aspecto branco, o qual flui abundantemente quando se rompem os tecidos, principalmente nas partes verdes da planta (MEENA *et al.*, 2010).

A família na qual esta planta está inserida apresenta mais de 4.500 espécies, classificadas em aproximadamente 415 gêneros (Tabela 1). Esta espécie é originária da Ásia e África e encontra-se distribuída na região tropical do planeta.



**Figura 2** – Aspectos gerais da espécie *Calotropis procera*. (Fonte: Oliveira, 2011)

**Tabela 1** - Classificação taxonômica da planta *Calotropis procera*

Reino Viridiplantae
Divisão Magnoliophyta
Classe Magnoliopsida
Subclasse Asteridae
Ordem Gentianales
Família Apocynaceae
Tribo Asclepiadeae
Gênero <i>Calotropis</i>
Espécie <i>Calotropis procera</i>
(Ait.) W.T. Aiton

Fonte: <http://www.ncbi.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=141467>, acesso em Janeiro de 2014.

### 1.2.2 Composição química do látex

Baseado na diversidade de compostos químicos presentes nas células especializadas dos fluídos laticíferos (KONNO, 2011), o látex de *C. procera* tem sido alvo de diversos estudos, no intuito de isolar e identificar suas substâncias constituintes. Um estudo fitoquímico, recentemente publicado, além de descrever algumas das substâncias químicas isoladas das mais diversas partes da planta

(triterpenos pentacíclicos, alcalóides e cardenólídeos), descreve também o isolamento e a caracterização estrutural de diversos esteróides presentes neste látex (CHUNDATTU *et al.*, 2011). Em análises químicas anteriores dos extratos brutos do látex de *C. procera*, já haviam sido encontrados compostos tais como cardenólídeos, enzimas proteolíticas, esteróides, triterpenos e carbonatos orgânicos (GALLEGOS-OLEA *et al.*, 2002).

Um aspecto que chama a atenção no látex desta planta é a fração protéica, na qual diversas proteínas relacionadas à defesa vegetal têm sido isoladas e identificadas como osmotinas (FREITAS *et al.*, 2011), além de algumas proteases cisteínicas (RAMOS *et al.*, 2013; RAWDKUEN *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2010; CHAIWUT *et al.*, 2010).

### 1.2.3 Propriedades farmacológicas do látex

Na medicina popular, principalmente na Índia, a espécie *C. procera* vem sendo amplamente utilizada por apresentar diversas propriedades curativas (WARRIER *et al.*, 1994). No estado do Ceará (Brasil), o látex da planta é utilizado, pela população de baixa renda, no tratamento de doenças bacterianas e fúngicas de pele. Diferentes partes da planta são descritas por apresentar propriedades farmacológicas relevantes, dentre as quais grande parte é relacionada ao seu látex (CHUNDATTU *et al.*, 2011).

Estudos mostram que o produto da extração do látex íntegro de *C. procera* com solvente orgânico possui atividade moluscicida (HUSSEIN *et al.*, 1994) e esquistossomicida (SHARMA e SHARMA, 2000). Ensaio preliminares revelaram que o extrato orgânico apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* (SEHGAL *et al.*, 2005). Já os extratos aquosos e/ou orgânicos, obtidos de preparações íntegras do látex, têm mostrado muitas atividades farmacológicas que incluem ação cicatrizante em animais (RASIK *et al.*, 1999), ação antidiarreica em ratos (KUMAR *et al.*, 2001) e efeito antipirético (LARHSINI *et al.*, 2002). Entretanto, apesar do número de propriedades farmacológicas observadas, há pouca informação sobre as possíveis moléculas envolvidas em tais processos (SHIVKAR e

KUMAR, 2003) e se elas seriam compostos do metabolismo secundário e/ou proteínas (SEHGAL *et al.*, 2005). Assim, embora uma riqueza de atividades tenha sido observada em estudos exploratórios, a identificação de princípios ativos é muito pequena.

Por outro lado, alguns trabalhos demonstram o potencial biológico das proteínas do látex de *C. procera*. Nesses estudos, a fração proteica mostrou aparente toxicidade contra as larvas de *Anticarsia gemmatilis* (RAMOS *et al.*, 2007) e *Callosobruchus maculatus* quando misturado em uma dieta artificial (RAMOS *et al.*, 2010), embora estes estudos não tenham mostrado quais proteínas foram responsáveis por essa toxicidade.

Esta fração proteica apresentou também atividades relacionadas à inibição de proteases e atividade quitinásica, ambas relacionadas à defesa vegetal sendo consideradas possíveis candidatos responsáveis pelo papel de defesa do látex de *C. procera* (FREITAS *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2007).

Outro fato observado para esta fração proteica foi a presença de atividade antiinflamatória quando avaliada em diferentes modelos animais (ALENCAR *et al.*, 2006; ALENCAR *et al.*, 2004). KUMAR e colaboradores (2007) verificaram um forte efeito antiinflamatório por parte de dois extratos do látex de *C. procera*, um metanólico e outro aquoso, contra diferentes mediadores de inflamação. Também foi verificado em camundongos, por exemplo, uma ação analgésica de forma dose-dependente (SOARES *et al.*, 2005), além da capacidade de inibir os efeitos letais provocados por uma infecção bacteriana induzida por *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (LIMA-FILHO *et al.*, 2010).

Um fato que chama bastante atenção é o uso de diversas partes da planta de *C. procera* no tratamento de tumores, principalmente na Índia (KUMAR e ARYA, 2006). KUMAR e colaboradores (2008), por exemplo, registraram um pedido de patente, através do qual descrevem um método para prevenção/tratamento de câncer utilizando uma suspensão aquosa de látex de *C. procera* desidratado.

Alguns trabalhos têm relatado que o uso de extratos de raízes e flores têm se mostrado citotóxico frente a linhagens de células tumorais (QUAQUEBEKE *et al.*, 2005) e que, o látex tem apresentado atividade antitumoral *in vivo* (CHOEDON *et al.*, 2006). OLIVEIRA e colaboradores (2011) demonstraram, por exemplo, a capacidade

de uma fração protéica deste látex em inibir o crescimento tumoral de quatro linhagens celulares, HL-60 (leucemia pró-mielocítica), HCT-8 (côlon), MDA-MB-435 (mama) e SF295 (cérebro).

Segundo uma revisão publicada recentemente por SAWADOGO *et al.*, (2013), sobre plantas reconhecidas por apresentarem propriedades anticâncer, a espécie *C. procera* recebe destaque por apresentar três cardenolídeos (2<sup>o</sup>-Oxovoruscarina, uscarina e voruscarina) e um composto hemi-sintético (UB450) com um alto poder antiproliferativo frente a diversas linhagens tumorais Hs683 (glioma neuronal), U373 (glioblastoma), HCT-15 (adenocarcinoma de côlon), LoVo (colon) e A549 (pulmão).

Sabendo que alguns autores, como OLIVEIRA e colaboradores (2011), têm demonstrado que o látex de *C. procera* tem apresentado atividades citotóxicas *in vitro* e antitumoral *in vivo*, e ainda que tem sido comprovado experimentalmente um potente efeito anticâncer a partir dos mais diversos tipos de peptídeos vegetais isolados, em especial os cíclicos (MA *et al.*, 2007), surge a seguinte questão: será que o látex de *C. procera* apresenta ciclopeptídeos e estes mesmos poderiam estar relacionados às atividades antiinflamatória e anticâncer atribuídas a este látex?

Assim, o presente capítulo visa o fracionamento, caracterização fitoquímica e biológica das frações orgânicas do látex de *C. procera*, assim como uma investigação química da presença de ciclopeptídeos.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do capítulo foi fracionar e avaliar fitoquímica e biologicamente o potencial das frações do látex de *C. procera*, assim como investigar quimicamente a presença de peptídeos cíclicos além de sua possível ação antiinflamatória *in vivo* e citotóxica em modelos *in vitro*.

### 2.1 Objetivos específicos:

1. Fracionar o látex de *C. procera* através da partição com solventes orgânicos e avaliar o rendimento das frações obtidas;
2. Investigar a constituição fitoquímica das frações através de análise fitoquímica qualitativa, espectroscopia de infravermelho e RMN de hidrogênio;
3. Identificar através de métodos químicos a presença de peptídeos cíclicos nas frações do látex de *C. procera*;
4. Traçar o perfil cromatográfico das frações orgânicas através de cromatografia de exclusão molecular e fase reversa;
5. Submeter a fração acetato de etila e aquosa do látex a métodos cromatográficos, no intuito de isolar peptídeos.
6. Realizar ensaios biológicos para avaliar o potencial farmacológico das frações através de ensaios de toxicidade *in vivo* e *in vitro* assim como avaliar a atividade antiinflamatória *in vivo*;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Reagentes

Os solventes orgânicos (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) foram de grau analítico. Acetonitrila (grau HPLC), metanol (grau HPLC), carragenana, doxorrubicina, glicina, dicromato de potássio e papaína (E.C. 3.4.22.2) foram obtidos da SIGMA Aldrich Co. (São Paulo, Brazil). Os reagentes tolidina e ninidrina foram adquiridos da VETEC (Rio de Janeiro, Brazil). Tetrametilsilano (TMS) e clorofórmio deuterado foram obtidos da TEDIA Brasil (Rio de Janeiro, Brazil).

##### 3.1.2 Obtenção do material vegetal

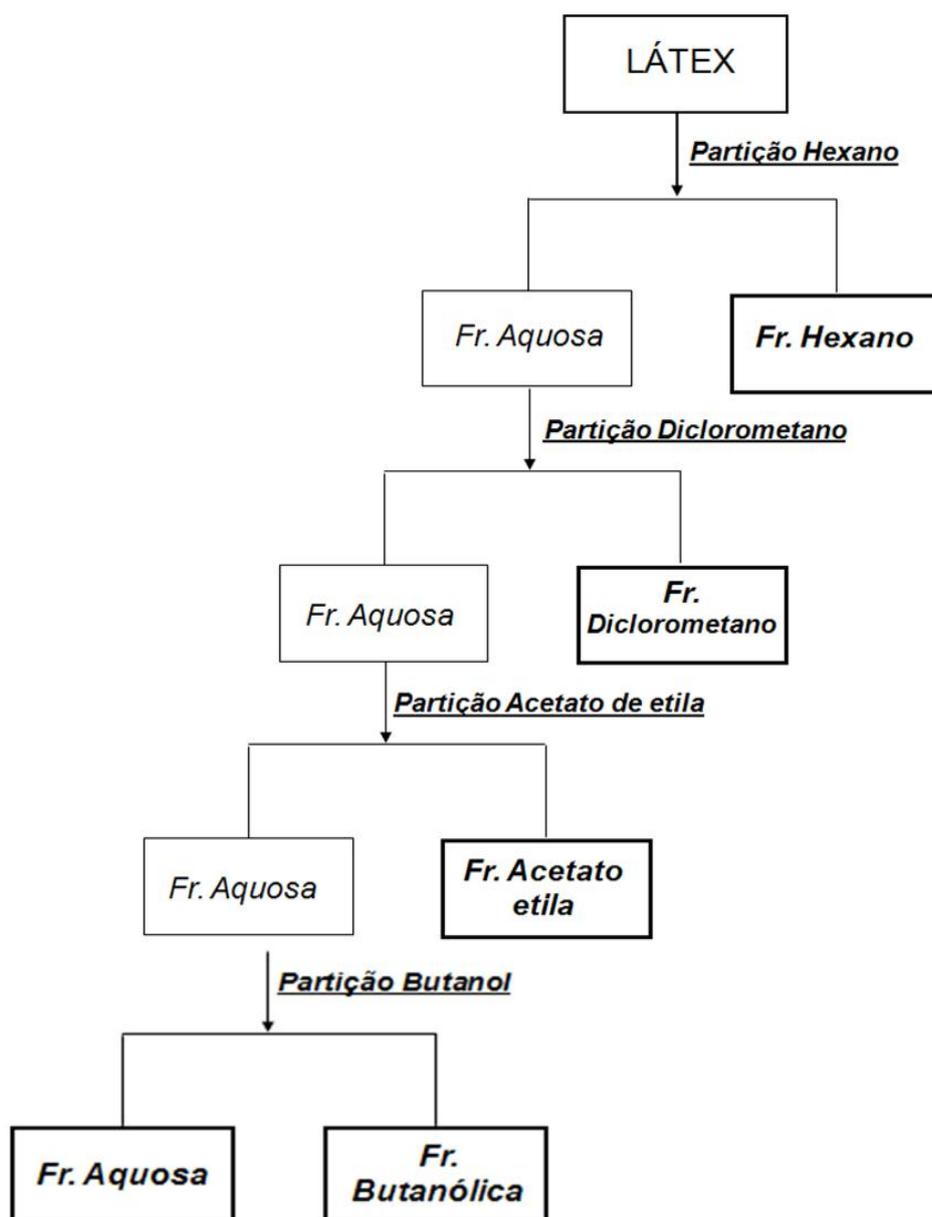
O látex utilizado neste estudo foi coletado de espécimes de *C. procera* encontradas na região metropolitana da cidade de Fortaleza (CE). Um espécime testemunha (n. 32663) foi depositado no herbário Prisco Bezerra localizado na Universidade Federal do Ceará.

O látex foi coletado (200 mL), sempre no período da manhã, por gotejamento após quebra do ápice caulinar da planta. O látex exsudado foi coletado em garrafas de plástico de 500 mL contendo água ultrapura na razão de 1:5 (v/v) e armazenado a 4° C até o uso.

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Partição do látex de *C. procera* com solventes orgânicos

O Látex (200 mL) coletado em água (1:5) foi particionado três vezes, em 600 mL cada (3 x 600 mL), com os seguintes solventes orgânicos de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) (Figura 3). Cada fração (incluindo a fração aquosa) foi removida da respectiva mistura bifásica por um funil de separação e evaporada sob pressão reduzida em um evaporador rotativo a vácuo (Fisatom 801) a 40 °C até a obtenção das frações secas.



**Figura 3** - Representação esquemática da partição do látex de *C. procera*.

### 3.3 Métodos químicos de detecção

#### 3.3.1 *Análise qualitativa de metabólitos secundários*

As frações obtidas foram submetidas à análise qualitativa quanto à presença de determinados tipos de metabólitos secundários (fenóis, taninos, flavonóides, esteróides, triterpenóides, saponinas e alcalóides) como descrito na metodologia de MATOS (1988).

As amostras das frações orgânicas do látex (25 mg/mL) foram dissolvidas em etanol a 95% e solubilizadas com o auxílio de um aparelho de ultrassom (30 min) antes das medições. O resultado de cada um dos ensaios teve como base a observação visual da modificação de cor ou formação de precipitado após a adição dos reagentes específicos.

Inicialmente, as frações do látex (3 mL de cada) foram investigadas quanto a presença de taninos e fenóis através da adição de 60 µL de uma solução contendo 2% de FeCl<sub>3</sub> em etanol. A formação de uma fase solúvel azul-vermelho foi usada como indicativo da presença de fenóis, já um precipitado de cor azul foi usado como indicativo de taninos solúveis, assim como uma cor verde foi usado como um indicativo da presença de taninos condensados e/ou caquéticos.

Para a determinação da presença de flavonóides foi utilizado uma alíquota de 3 mL de cada fração, e o ensaios foram realizados em triplicata. A presença de antocianinas e antocianidinas foi determinada pela formação das cores vermelha e/ou púrpura e/ou azul-violeta após a adição de HCl 0,1M a pH 3, e NaOH 0,1 M a pH 8,5 e pH 11, respectivamente. Já a presença de flavonas, xantonas e flavonóis foi determinada pela formação de uma cor amarela após adição de NaOH 0,1 M em pH 11,0. A cor laranja-vermelha é um indicativo de flavanonóis. Chalconas e auronas tiveram sua presença confirmada pela formação das cores vermelha (pH 3) e vermelho-púrpura (pH 11).

Esteróis e triterpenos foram investigados através da dissolução de 250 mg de cada amostra em 5 mL de clorofórmio. As amostras foram filtradas e os reagentes anidrido acético (1 mL) e ácido sulfúrico (60 mL) adicionados à fase solúvel, já o

material insolúvel foi usado para identificar as saponinas. A cor verde foi usada como um indicativo da presença de esteróis livres, enquanto a cor marrom-vermelho indicativo da presença de triterpenos. Para investigar a presença de saponinas, 5 mL de água destilada foram adicionadas ao precipitado e procedeu-se com uma agitação suave por durante 3 min. A formação de um anel de espuma persistente foi usado como um indicativo da presença de saponinas.

A determinação da presença de alcalóides procedeu-se da seguinte maneira: o reagente hidróxido de amônio concentrado foi adicionado aos 3 mL de cada uma das frações do látex até se chegar ao pH 11. Logo em seguida, volumes diferentes (30, 20 e 10 mL) de uma solução de éter/clorofórmio (3:1) foram adicionados sucessivamente em cada fração uma das frações, após a adição de cada volume, realizou-se uma agitação suave. A fase de éter/ clorofórmio foi eliminada de cada uma das frações e os alcalóides extraídos foram filtrados e secos. Os materiais resultantes de cada uma das frações foram divididos em três partes e, um volume igual de cada uma dessas soluções foi precipitado com os seguintes reagentes de precipitação de alcalóides: Hager, Mayer e Dragendorff. A presença de material floculado em uma das soluções foi usado como indicativo da presença de alcalóides.

### 3.3.2 Detecção de peptídeos pelo método $Cl_2$ /o-tolidina

As frações foram dissolvidas em metanol (a uma concentração final de 25 mg/mL), e centrifugadas por 10 min a  $10.000 \times g$  (25 °C). Os sobrenadantes foram aplicados em placas cromatográficas de camada delgada formadas por sílica gel 60 F254 (Merck). A revelação das placas ocorreu através do borrifamento da solução de o-tolidina/etanol (1%). A formação de uma coloração azul escuro foi usada como um indicativo da presença de peptídeos. A enzima proteolítica papaína (*Carica papaya*), foi usada como controle positivo e o metanol puro usado como controle negativo.

### 3.3.3 Detecção de peptídeos pelo método da ninidrina

As frações foram dissolvidas (10 mg/mL) e aplicadas em placas cromatográficas (como descrito no subitem 3.3.2), só que em duplicata. Uma das placas foi encubada com HCl concentrado (12 M), em uma câmara fechada por 2 minutos, logo em seguida aquecida por 2 horas em estufa a 110 °C. Para a revelação, borrifou-se o reagente ninidrina/acetona (0,2%) nas duas placas cromatográficas: a placa hidrolisada com HCl e a não hidrolisada. A formação de uma coloração amarelada ou laranja na placa tratada com HCl e a ausência dessa coloração na placa não tratada foi usada como um indicativo da presença de peptídeos cíclicos, como relatado na metodologia descrita por TAN e ZHOU, (2000). A enzima proteolítica papaína (*Carica papaya*) e o aminoácido glicina foram usados como controle positivo e o metanol puro usado como controle negativo.

## 3.4 Análises espectroscópicas

### 3.4.1 Infravermelho

Para as análises espectroscópicas por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizado um espectrômetro da marca Bruker, modelo MPA-R, e os espectros de cada fração foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro Excalibur FT 3000 Series detector DGTS, operando em um intervalo de comprimento de onda de 4,000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As pastilhas de KBr foram obtidas aplicando-se uma pressão de 3  $\text{t.cm}^{-2}$ , durante 1 min, a uma mistura de 15 mg de cada fração e 100 mg de KBr.

### 3.4.2 RMN de hidrogênio

Os experimentos de RMN foram realizados no Centro Nordestino de Aplicação e uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do

Ceará (CENAUREMN-UFC), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  unidimensionais foram obtidos em espectrômetros da marca Bruker, modelo Avance DPX-300 e/ou Avance DRX-500 operando na frequência do hidrogênio a 300,13 e a 500,13 MHz. Água, metanol e clorofórmio deuterados foram empregados para a dissolução das amostras e o tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão interno.

### 3.5 Análises cromatográficas das frações do látex de *C. procera*

#### Perfis cromatográficos

Inicialmente as frações foram dissolvidas a uma concentração final de 2 mg/mL em metanol, solvente que apresentou boa solubilidade para todas as frações. O metanol também foi utilizado como fase móvel tanto para cromatografia de exclusão molecular como de fase reversa.

#### 3.5.1 Exclusão molecular

As frações orgânicas, 2 mg de cada fração, foram aplicadas em coluna semi-preparativa, preparada manualmente, tendo como fase estacionária a resina Sephadex LH-20 (100 cm de altura por 1,6 cm de diâmetro, 200 mL de volume e com fluxo de 2,5 ml/min). As frações (3 mL por tubo) foram coletadas e os valores de absorvância registrados através de leitura em espectrofotômetro (Modelo DR 5000) no comprimento de onda de 280 nm.

### 3.5.2 Fase reversa

Cada uma das frações foi analisada em HPLC, da marca GILSON, com detector de UV operando em comprimento de onda de 220 nm. Para isso, foram aplicados 50 µg de amostra dissolvida na fase móvel A (água ultrapura contendo 5% de metanol e 0,045% de ácido trifluoroacético-TFA) em coluna analítica de fase reversa da marca HICHROM, de dimensões de 250 X 4,6 mm, tipo C18 com partículas de 5 µm, poro de 300 Å, sob fluxo de 1,0 mL/min. A fase móvel B foi formada por Metanol 90% contendo 0,036% de ácido trifluoroacético (TFA). Utilizou-se um modo de separação tipo gradiente, de 100% de A para 100% de B em 80 minutos.

### Estratégias para o isolamento de peptídeos das frações do látex de *C. procera*

Foram adotadas quatro estratégias exploratórias, no intuito de isolar peptídeos do látex de *C. procera*, onde, em três delas foram utilizadas a fração acetato de etila como material de partida e, na restante, foi utilizado o látex total (Figura 3).

### 3.5.3 Estratégia 1 (Sephadex LH 20)

A fração acetato de etila foi cromatografada de acordo com a metodologia anteriormente descrita no subitem 3.5.1. A subfração 1 (escolhida por ser de baixa complexidade) foi seca, resuspensa em metanol e aplicada em coluna analítica de fase reversa, seguindo a metodologia acima descrita no subitem 3.5.2. A fim de avaliar a pureza dos picos, um deles (P1), foi solubilizado e recromatografado utilizando-se as mesmas condições de separação previamente descritas. Por fim, as frações (P1-P12) foram analisadas individualmente em espectrômetro de massas da Waters tipo Synapt (Manchester, UK) de alta resolução, em modo ESI positivo,

acoplado a um sistema de nanoUPLC, utilizando-se a técnica de aquisição dependente de dados (Figura 4).

#### *3.5.4 Estratégia 2 (Sephadex G-10)*

A fração acetato de etila foi resuspensa em metanol (a uma concentração final de 2 mg/mL) e aplicada (2,0 mg) em coluna de exclusão molecular semi-preparativa, preparada manualmente, tendo como fase estacionária a resina Sephadex G-10 (25 cm de altura por 1,6 cm de diâmetro, com fluxo de 3,0 mL/min). A fração de interesse foi coletada no volume morto da coluna, seca e ressuspensa para posterior análise por HPLC.

A análise por HPLC seguiu os mesmos passos descritos no subitem 3.5.2, com exceção do uso de acetonitrila ao invés de metanol na preparação dos solventes. As análises posteriores para identificação de peptídeos seguiu os passos descritos no tópico “Estratégia 1” (ver subitem 3.5.3) (Figura 4).

#### *3.5.5 Estratégia 3 (Extração em fase sólida)*

A fração acetato de etila foi extraída com acetonitrila 40% (1:20), em banho de ultrassom por 30 min. Logo em seguida, foi centrifugada a 10.000 x g por 20 min (25 °C). A parte solúvel foi aplicada em cartucho de extração em fase sólida C18-E Phenomenex SPE (200 mg/3 mL), previamente condicionada (5 volumes de coluna) em acetonitrila (95%) e equilibrada (20 volumes de coluna) com 40% de acetonitrila em água. A eluição da amostra ocorreu de acordo com o seguinte gradiente: 1) eluição com 40% de ACN e 60% de água; 2) 70% de ACN e 30% de água e 3) 95% de ACN e 5% de água.

A fração do gradiente 2 foi seca e analisada por HPLC seguindo os mesmos passos descritos no subitem 3.5.2, acrescida da modificação descrita na estratégia 2

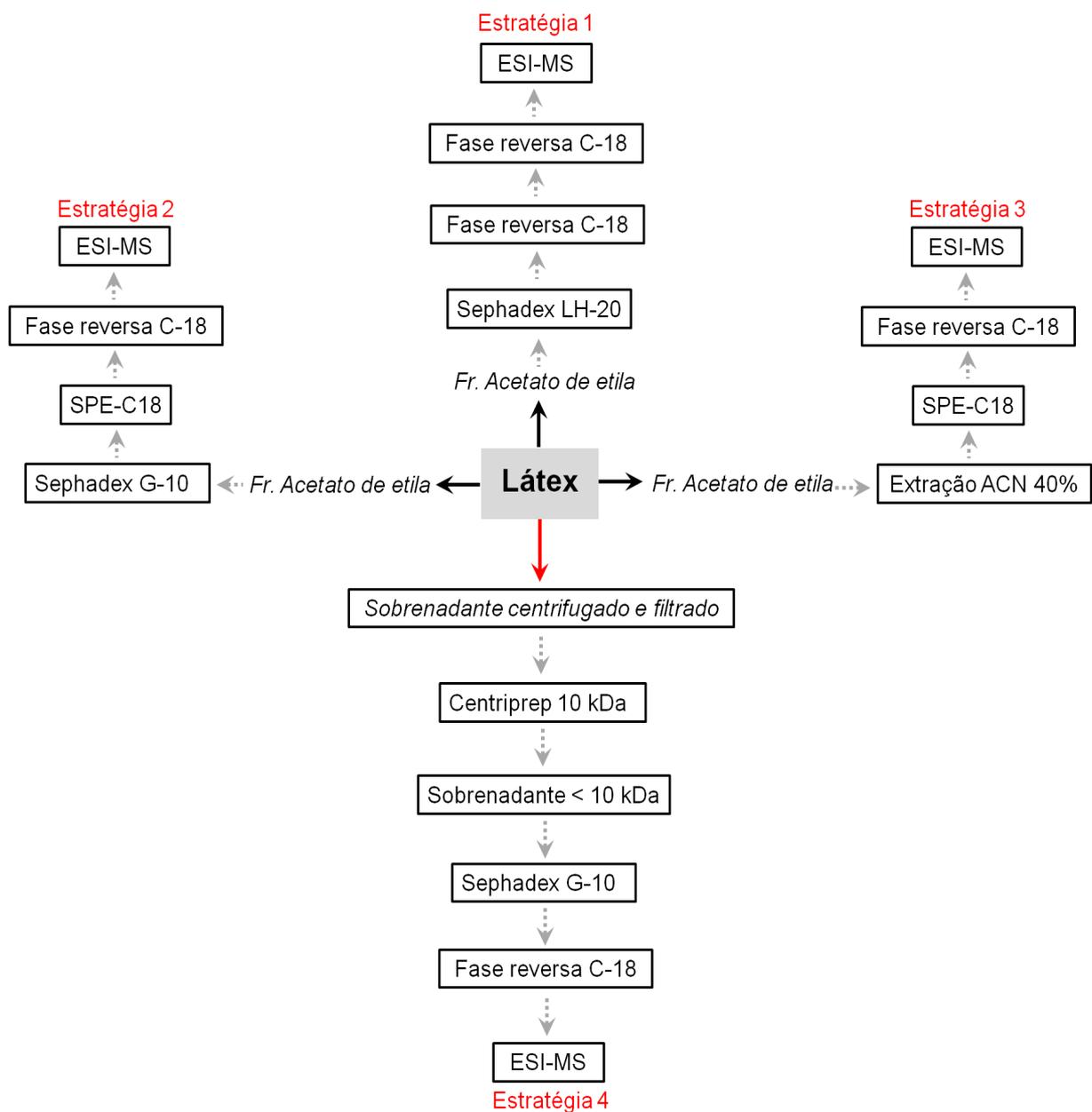
(ver subitem 3.5.4). As análises posteriores para identificação de peptídeos seguiu os passos descritos no tópico “Estratégia 1” (ver subitem 3.5.3) (Figura 4).

#### *3.5.6 Estratégia 4 (Centriprep 10 kDa)*

O látex foi coletado em água (1:5), filtrado em papel de filtro de 0,45 µm (Whatman), e centrifugado por 10 min a 10.000 x g (4 °C). O sobrenadante foi novamente filtrado só que dessa vez em filtro de 0,22 µm da Millipore. Logo em seguida, a amostra foi centrifugada em filtro centriprep (Amicon) com limite de exclusão de 10 kDa a 2900 x g por 60 min (4 °C). Após a completa filtração de toda a amostra, a mesma foi liofilizada.

O material liofilizado foi resuspenso em água ultrapura (a uma concentração final de 10 mg/mL) e aplicado em coluna de exclusão molecular, semi-preparativa, tendo como fase estacionária a resina Sephadex G-10. Depois, seguiu-se a metodologia descrita no subitem 3.5.4. A fase móvel utilizada foi água ultrapura.

A fração de interesse foi coletada no volume morto da coluna, seca e ressuspensa para posterior análise por HPLC. A análise por HPLC seguiu os mesmos passos descritos no tópico 3.5.2, com a modificação descrita na estratégia 2 (item 3.5.4). As análises posteriores para identificação de peptídeos seguiu os mesmos passos descritos no tópico “Estratégia 1” (ver subitem 3.5.3) (Figura 4).



**Figura 4** – Representação esquemática dos passos analíticos utilizados nas quatro estratégias adotadas para o isolamento de peptídeos da fração acetato de etila e aquosa de *C. procera*.

## 3.6 Ensaios biológicos

### 3.6.1 Atividade hemolítica

Os eritrócitos humanos (50 mL), tipo O<sup>+</sup>, foram obtidos do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará. Após três ciclos de lavagem em 150 mM NaCl, os eritrócitos foram suspensos na solução de lavagem a 4%.

As frações do látex foram dissolvidas em 5% de DMSO a uma concentração final de 4 mg/mL. Uma alíquota de 100 µL de cada fração foi adicionada a 100 µL de PBS, e uma diluição seriada foi usada para determinar a concentração final que variou de 1 a 0,07 mg/mL. Finalmente, 100 µL dos eritrócitos (4%) foram incubados em microplacas com 96 poços por 30 min a 37 °C. A placa foi então centrifugada (700 x g por 10 min a 4 °C) para remover as células lisadas. O conteúdo de hemoglobina foi determinado fazendo leitura do sobrenadante em espectrofotômetro a 540 nm e correlacionando estes com os eritrócitos lisados, assim como descrito na metodologia de BARBOSA e colaboradores (2011).

### 3.6.2 Avaliação de toxicidade

#### Ensaio *in vivo*

A toxicidade das frações do látex de *C. procera* foi inicialmente avaliada frente ao teste da *Artemia salina* (*Artemia sp.*) de acordo com a metodologia descrita por CARVALHO e colaboradores (1988). Grupos de dez *Artemias sp. nauplii* (24 horas de idade) receberam diferentes concentrações (10-1000 µg.mL<sup>-1</sup>) dos extratos (100 uL) em triplicata. Após 24 horas, foi registrado o número de animais vivos. Uma solução padrão de dicromato de potássio (DL<sub>50</sub>= 20 µg.mL<sup>-1</sup>) foi utilizada como controle positivo.

## Ensaio *in vitro*

### Células e manutenção da cultura

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: HL-60 (leucemia pró-mielocítica), HCT-116 (cólon), Ovcar-8 (ovário) e SF295 (cérebro) obtidas através de doadores do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD) mantidas permanentemente em camundongos no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com as frações oriundas da partição do látex.

### Avaliação da citotoxicidade das frações sobre células tumorais humanas

A citotoxicidade das frações orgânicas sobre as células tumorais humanas foi quantificada pelo aumento da capacidade das células de reduzir o corante amarelo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium brometo (MTT) para um produto de coloração púrpura (MOSMANN 1983). O ensaio consistiu em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas, assim como descrito por OLIVEIRA (2011).

### 3.6.3 Atividade antiinflamatória

As frações foram dissolvidas em DMSO 5% e o material insolúvel foi removido por centrifugação (10 min; 10 °C; 10,000 x g). As amostras foram injetadas intravenosamente em ratos (n=6, por grupo), em diferentes doses (1,0; 5,0 e 10,0 mg/kg; em 0,2 mL), 30 minutos antes do estímulo da carragenana (700 µg/cavidade). Os animais controle receberam solução salina estéril. Quatro horas depois, os animais foram sacrificados através da inalação de halotano e as cavidades peritoneais lavadas com 10 mL de solução salina contendo 5 UI/mL de heparina. Os fluidos foram recuperados para uma contagem total e diferencial de células usando microscopia de luz de acordo com a metodologia descrita por SOUZA e FERREIRA (1985).

### 3.6.4 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas a partir da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni's para ensaios antiinflamatórios, onde valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados significantes. Para os demais experimentos foram calculadas as médias ± desvio padrão da média (DP) utilizando as ferramentas da plataforma Microsoft Office, *Software Excel*, versão 2007 (Microsoft®).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Fracionamento do látex de *Calotropis procera*

O látex de *C. procera* é composto por aproximadamente 88% de água e 12% de massa seca (Tabela 2). Esse alto teor de água é condizente com alguns dos papéis fisiológicos propostos para fluidos laticíferos, como o de reserva de água e acúmulo de substâncias de defesa do vegetal (KONNO, 2011).

**Tabela 2** - Valores médios e rendimento do peso seco e fresco do látex de *C. procera*.

Látex (mL)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
25	27,41	3,57
25	27,32	3,27
25	26,00	2,85
<i>Média</i>	26,91±0,79 (88%)	3,23±0,36 (12%)

Os valores representam a média ± DP da observação de três experimentos com 25 mL de látex.

A partição do látex de *C. procera* com solventes de polaridade crescente resultou na obtenção de quatro frações orgânicas (hexânica, diclorometano, acetato de etila e butanólica) e uma fração aquosa. As frações hexânica e aquosa representaram mais de 90% da massa seca obtida (Tabela 3).

**Tabela 3** - Rendimento das frações obtidas por partição do látex de *C. procera*

Fração	Massa seca (g)	Rendimento (%)
<i>Hexânica</i>	10,47	49,4
<i>Diclorometano</i>	1,104	5,2
<i>Acetato de etila</i>	0,439	2,0
<i>Butanólica</i>	0,451	2,1
<i>Aquosa</i>	8,708	41,1
Peso seco total das frações	21,17	-
Peso seco total esperado (12%)*	25,74	-
Rendimento da extração	-	82,25

\* A obtenção das frações ocorreu através da partição de 200 mL de látex (214,5 g).

Tais dados refletem, para a fração hexânica, o alto teor de poliisoprenóide, como os triterpenóides, material insolúvel e bastante apolar, o qual deve ter sido majoritariamente extraído (BUCHANAN *et al.*, 2000). Já para fração aquosa, alguns autores têm descrito a presença abundante de substâncias polares como proteínas, enzimas proteolíticas e glicosídeos (FREITAS *et al.*, 2011; MEENA *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2007).

#### 4.2 Perfis fitoquímicos das frações do látex

A análise fitoquímica qualitativa revelou que, enquanto os esteróides estavam presentes em todas as frações testadas, os flavanóides estavam presentes apenas nas frações diclorometano e acetato de etila. Já os triterpenos foram encontrados apenas nas frações hexânica e diclorometano (Tabela 4).

**Tabela 4** - Análise fitoquímica qualitativa das frações do látex de *C. procera*.

Fitoquímicos	Frações				
	<i>Hexânica</i>	<i>Diclorometano</i>	<i>Acetato de etila</i>	<i>Butanólica</i>	<i>Aquosa</i>
<i>Fenóis</i>	-	-	-	-	-
<i>Taninos</i>	-	-	-	-	-
<i>Flavanóides</i>	-	+	+	-	-
<i>Esteróides</i>	+	+	+	+	+
<i>Triterpenóides</i>	+	+	-	-	-
<i>Saponinas</i>	-	-	-	-	-
<i>Alcalóides</i>	-	-	-	-	-

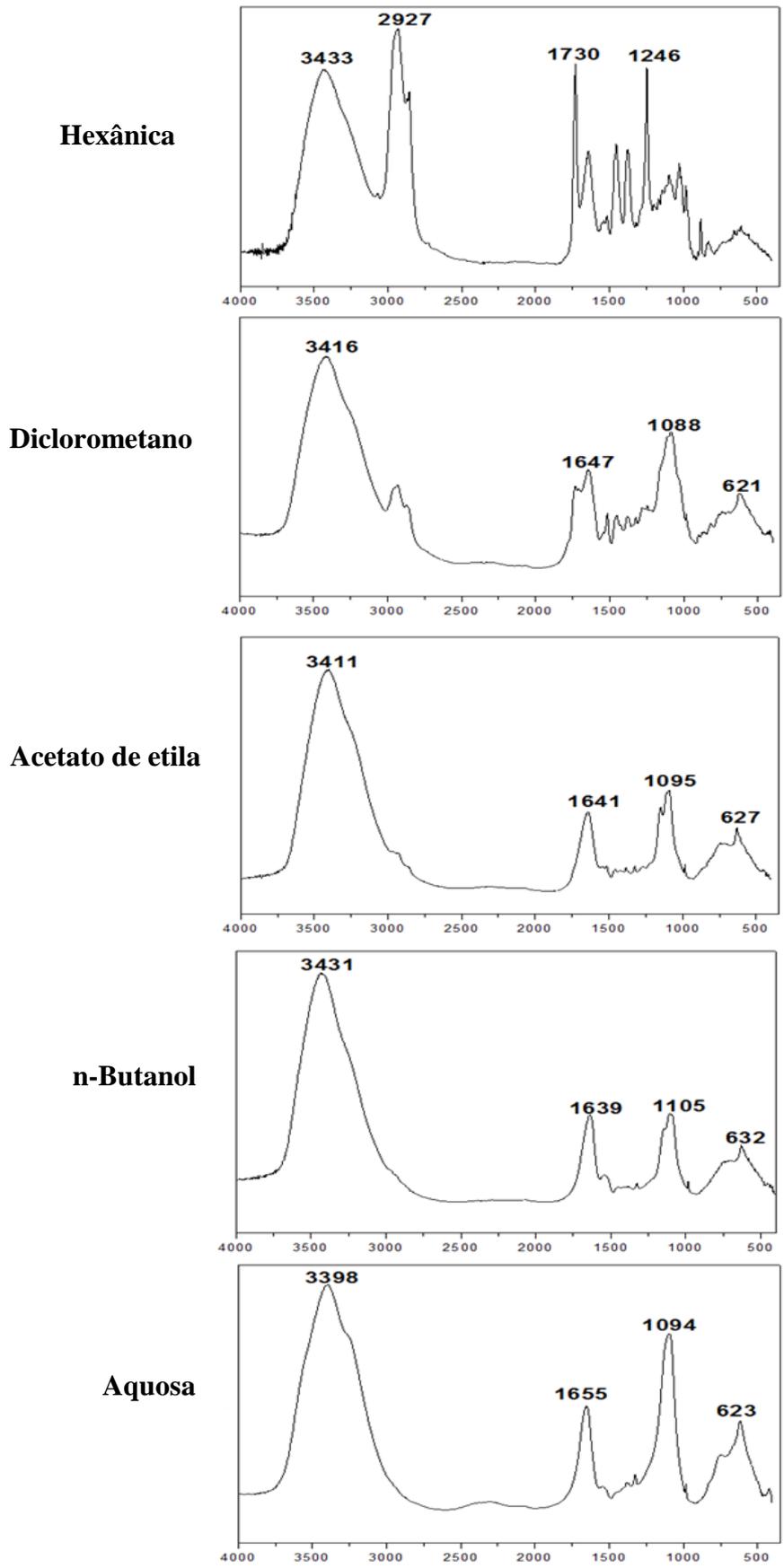
(+) Indica reação positiva para o composto testado, enquanto (-) indica ausência do composto testado.

Os fenóis, taninos, saponinas e alcalóides não foram detectados nas frações do látex de *C. procera*, embora sua presença no látex de espécies das famílias Euphorbiaceae, Convolvulaceae, Anacardiaceae e Papaveraceae tenha sido descrita (KONNO, 2011). Apesar disso, alguns autores têm relatado a presença desses mesmos compostos em outros órgãos e tecidos desta espécie (CHUNDATTU *et al.*, 2011; DOSHI *et al.*, 2011; MAINASARA *et al.*, 2011). MEENA e colaboradores (2010), por exemplo, publicaram uma revisão sobre o perfil fitoquímico, etnobotânico e farmacológico da espécie *C. procera*, na qual estes autores descrevem o látex como uma fonte rica de metabólitos secundários, principalmente cardenolídeos. Já SAWADOGO e colaboradores (2012), em sua revisão sobre plantas Africanas com propriedades anticâncer, descrevem o extrato metanólico das raízes e da casca de *C. procera* como uma rica fonte das seguintes classes de metabólitos secundários: flavanóides, saponinas, taninos, alcalóides e cardenolídeos.

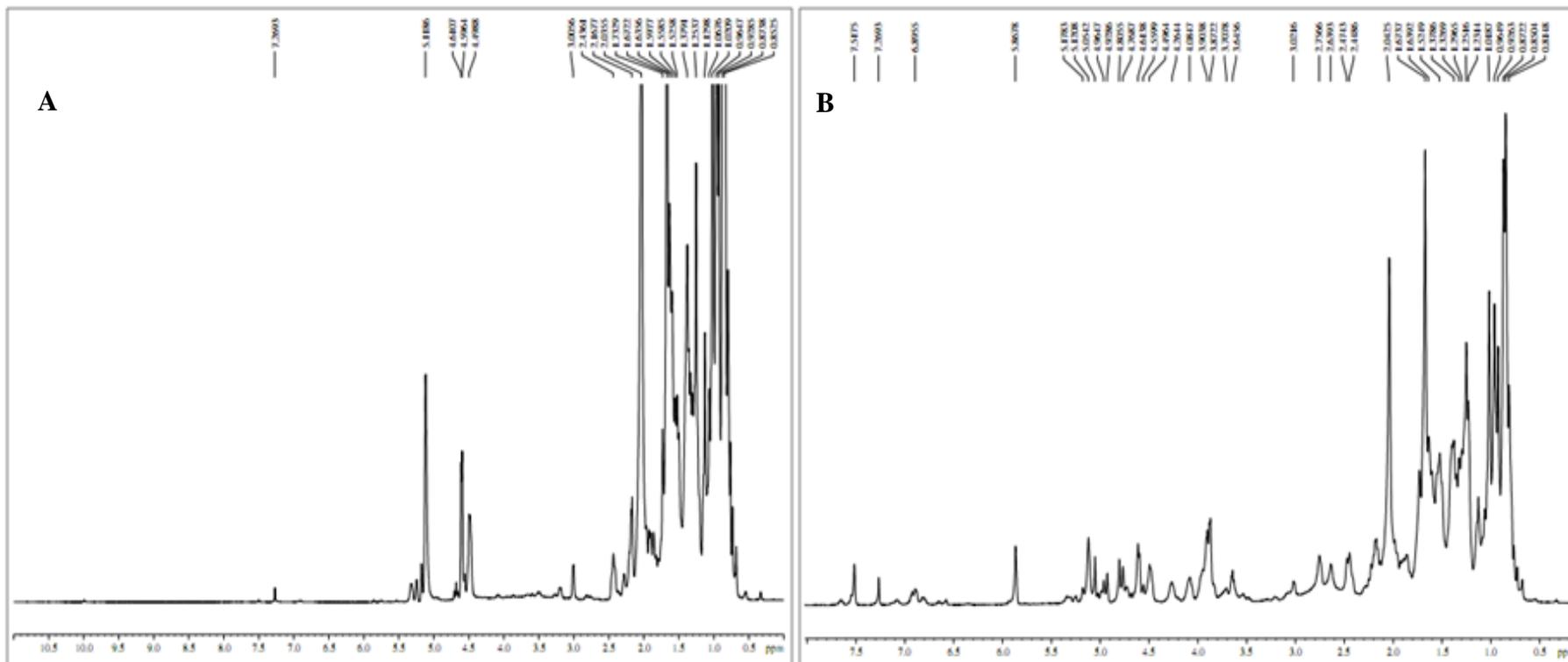
Como parte do estudo do perfil fitoquímico do látex, as frações foram submetidas a duas técnicas complementares de análise espectroscópica: o infravermelho (IV) (Figura 5) e a ressonância magnética de hidrogênio (RMN- $H^1$ ) (Figuras 6, 7 e 8). As frações mais hidrofóbicas, hexânica e diclorometano, produziram espectros diferentes de IV, que por sua vez foram diferentes dos espectros das frações acetato de etila, butanólica e aquosa. Os espectros dessas últimas frações (ordem crescente de polaridade) foram muito similares. Os grupos hidroxila (OH), com picos característicos na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , estiveram presentes em todas as frações.

O espectro de IV das frações hexânica e diclorometano apresentaram picos na faixa de  $2961\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo ao estiramento simétrico e assimétrico de C-H (grupos metila e metileno). Já os picos na faixa de  $1723\text{ cm}^{-1}$  apresentaram estiramento típico de C=O e/ou deformações/vibrações assimétricas típicas de grupos aldeído. Os picos adicionais nas faixas de  $1450\text{ cm}^{-1}$  (deformação C-H) e  $1350\text{ cm}^{-1}$  (deformação em C-H de grupos metila) também foram observados. Por outro lado, a intensidade de todos esses picos foi diminuindo na fração diclorometano.

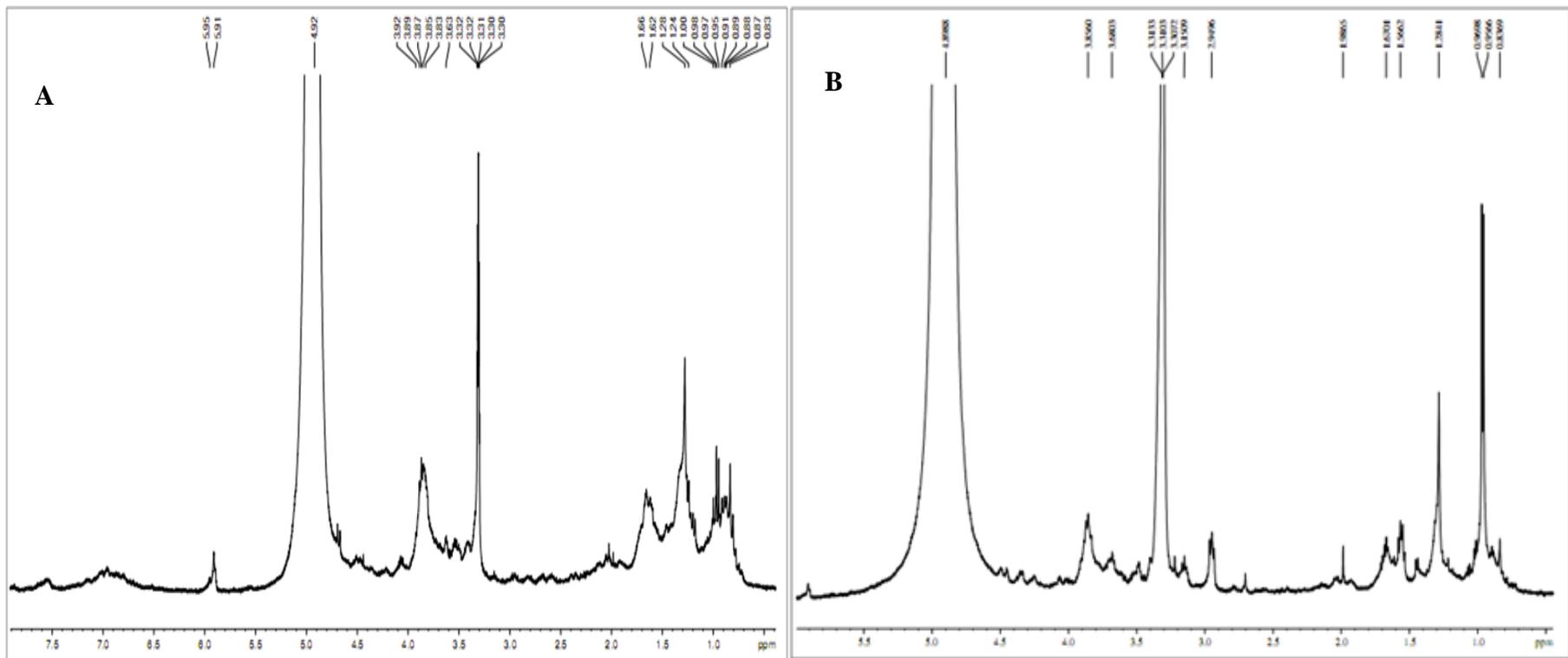
Os poliisoprenos, precursores dos polímeros constituintes da borracha, foram detectados em abundância em frações de hidrocarbonetos em *C. procera*, assim como descrito por KALITA e SAIKIA (2004). De acordo com os espectros de IV das frações hexano e diclorometano, os poliisoprenos de *C. procera* são comuns em ambas as frações hidrofóbicas (hexano e diclorometano), o que está condizente com os dados apresentados na Tabela 4.



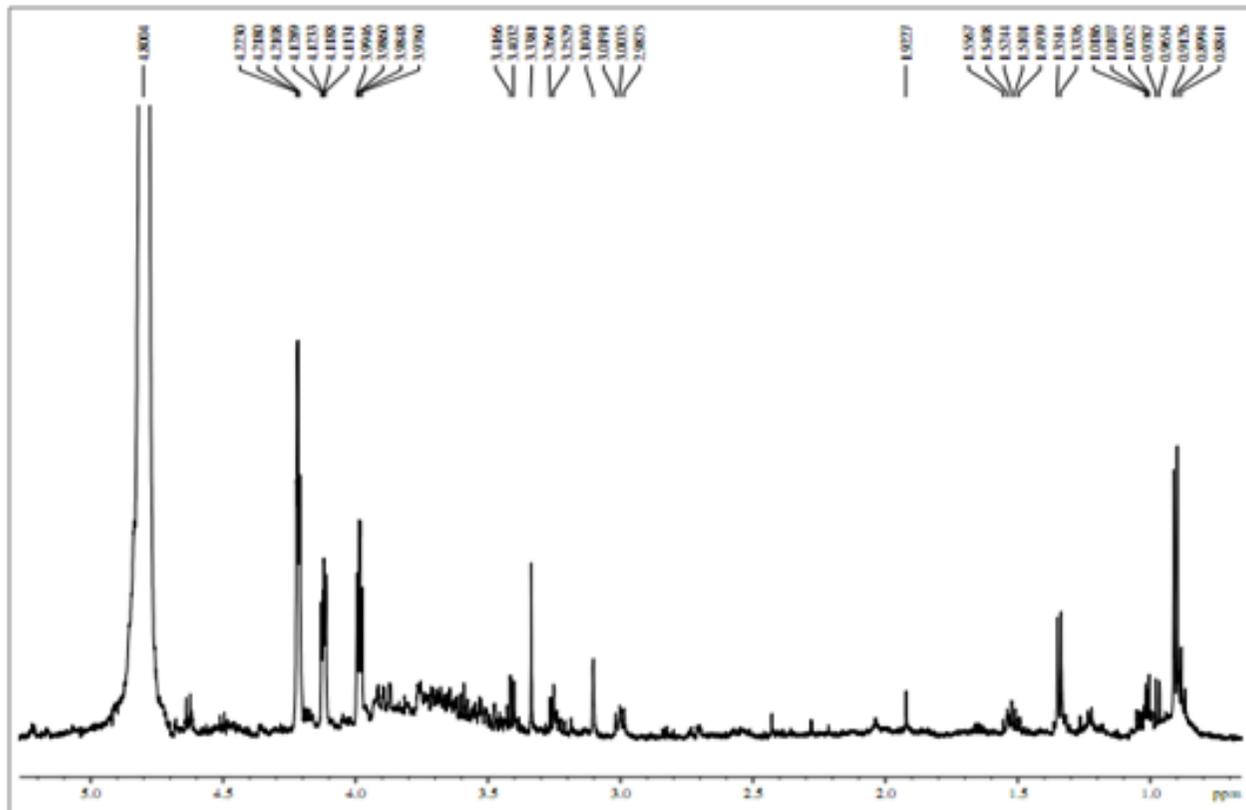
**Figura 5** – Análise espectroscópica por infravermelho das frações do látex de *C. procera*.



**Figura 6** - Análise espectroscópica por RMN-H<sup>1</sup> das frações hexânica **(A)** e diclorometano **(B)** do látex de *C. procera*.



**Figura 7** - Análise espectroscópica por RMN- $H^1$  das frações acetato de etila **(A)** e butanólica **(B)** do látex de *C. procera*.



**Figura 8** - Análise espectroscópica por RMN- $H^1$  da fração aquosa do látex de *C. procera*.

Foram detectados nas frações acetato de etila, butanólica e aquosa, um pico na região de  $\sim 1645\text{ cm}^{-1}$  e outro na região de  $1105\text{-}1093\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo à vibração de estiramento axial de ligação dupla C=C e à deformação axial da ligação C-O, característica de éteres e/ou álcools, respectivamente. A fração Aquosa foi a que produziu maior intensidade de sinal nessa região de  $1093\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H), haja vista sua maior polaridade, o que ainda é sugestivo da presença de esteróides (Tabela 4).

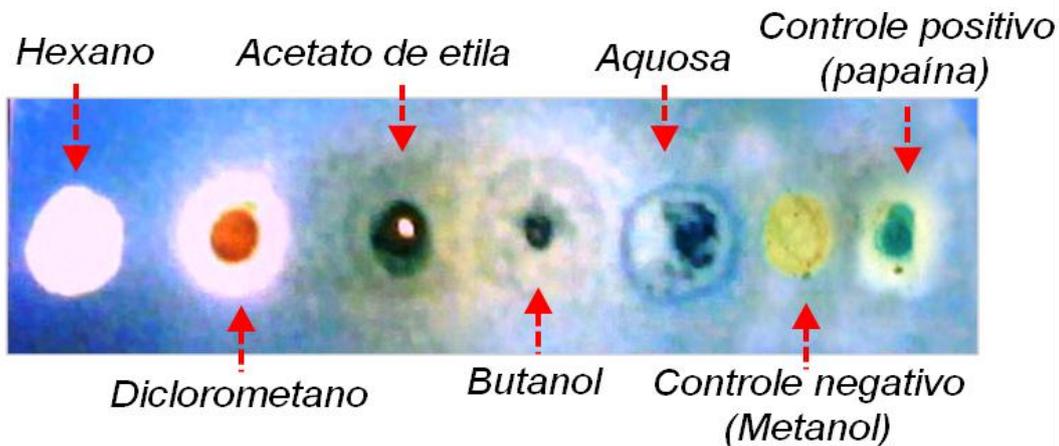
Os espectros de RMN- $\text{H}^1$  na região de campo alto, mostraram níveis elevados de prótons, nas frações hexânica e diclorometano (Figura 6), atribuídos aos grupos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  de cadeia alifática. Prótons residuais, atribuídos a esses mesmos grupos ( $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ ), também foram observados nos espectros das frações acetato de etila, butanólica e aquosa (Figuras 7 e 8). Os espectros de RMN- $\text{H}^1$  da fração diclorometano mostraram picos na região de campo intermediário associados a prótons olefínicos, comumente observados na borracha (KALITA e SAIKIA, 2004). Já na fração aquosa, os picos foram associados a prótons ligados a carbonos oxigenados (Figura 8).

Os picos na região de campo baixo foram observados tanto na fração hexânica como na diclorometano (Figura 6), sendo seus prótons associados a moléculas aromáticas. Estes achados corroboram com os dados da triagem fitoquímica qualitativa (Tabela 4) e com a literatura, nos quais encontram-se descritos triterpenos, esteróides e flavanóides presentes no látex (MEENA *et al.*, 2010).

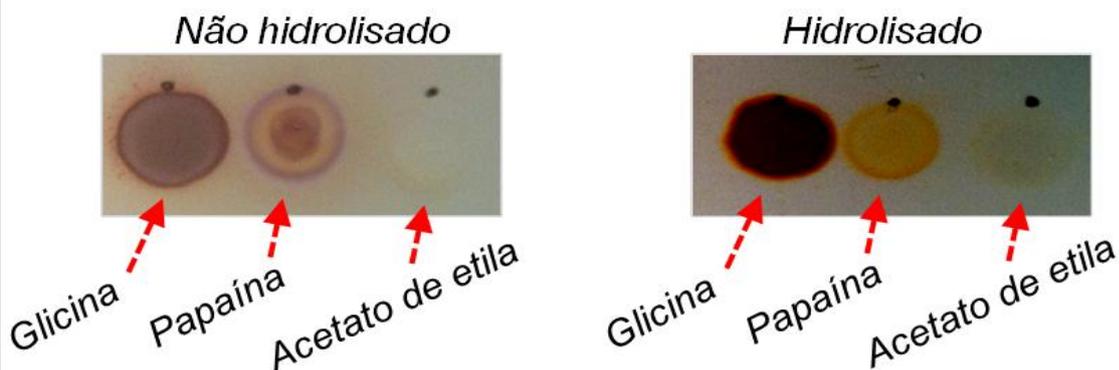
#### 4.3 Ciclopetídeos nas frações do látex

As frações acetato de etila, butanólica e aquosa reagiram positivamente com o reagente  $\text{Cl}_2$ /o-tolidina, fato observado pela presença de uma coloração azul escuro (Figura 9A), o que indica a presença de grupos amidas que são típicos de ligação peptídica (VAN DEN BERG *et al.*, 1995).

**(a) Método químico empregando o reagente o-tolidina**



**(b) Método químico empregando o reagente ninidrina**



**Figura 9** – Métodos químicos utilizados na detecção de peptídeos das frações do látex de *C. procera*

Algumas famílias de angiospermas são notórias por acumularem peptídeos, principalmente os de natureza cíclica (Annonaceae, Caryophyllaceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae e Violaceae) (PICCHI *et al.*, 2009; TAN e ZHOU, 2006). As plantas laticíferas do gênero *Jatropha* são um exemplo disso, a partir das quais diversos peptídeos foram isolados e caracterizados (Integerrimida, curcaciclina, jatrofídina, polianina, podaciclina, ciclogossina, chevalierina e mahafaciclina) (ZHANG *et al.*, 2009).

Atualmente, existe apenas um trabalho na literatura descrevendo o isolamento de um peptídeo cíclico - obtido do caule de *Stephanotis floribunda* - no mesmo táxon (Asclepiadaceae) do qual faz parte a espécie em estudo neste trabalho (YOSHIKAWA *et al.*, 2009). Assim, de acordo com dados da literatura, a fração mais promissora (acetato de etila) foi selecionada e reexaminada para o estudo de ciclopeptídeos.

Muitos relatos na literatura têm demonstrado que os ciclopeptídeos das plantas laticíferas têm sido isolados da fração acetato de etila (ZHANG *et al.*, 2009; BARAGUEY *et al.*, 1998; VAN DEN BERG *et al.*, 1995). Assim, considerando que esta fração reagiu positivamente com grupamentos amidas, ela foi reexaminada com o reagente ninidrina. A ninidrina reage com os grupamentos amino livres que são tipicamente encontrados nas proteínas. Como mostrado na Figura 9B, a ninidrina reagiu positivamente com a papaína (proteína) e com a glicina (aminoácido livre), os quais foram usados como controles positivos. Nota-se ainda que a ninidrina não reagiu com a fração acetato de etila que não foi hidrolisada, o que sugere a ausência/indisponibilidade de grupamentos amino livres. Entretanto, após a hidrólise química com HCl 6 M, a fração acetato de etila reagiu positivamente com a ninidrina, o que sugere a presença de grupos aminos livres. Portanto, pode-se concluir que os ciclopeptídeos estão presentes nesta fração do látex.

Ciclopeptídeos com citotoxicidade e propriedades anticâncer foram descritos em raízes e outros tecidos de diferentes espécies de plantas (COZZOLINO *et al.*, 2005; HSIEH *et al.*, 2004; WELE *et al.*, 2004; NAPOLITANO *et al.*, 2003). O estudo conduzido por MONGKOLVISUT e colaboradores (2006) consiste no único trabalho que descreve a presença de ciclopeptídeos do látex (Integerrimidas A e B) com um efeito inibitório da proliferação de células de melanoma humano (IPC-298), assim como da migração de células de carcinoma de pâncreas humano.

Mais recentemente, estudos com três novos ciclopeptídeos, que exibiram atividade antiinflamatória *in vitro*, usando o modelo de macrófago J774,1 foram publicados (CHUANG *et al.*, 2008). Estes resultados indicam que ciclopeptídeos do látex de *C. procera* podem estar envolvidos com estas propriedades farmacológicas. A detecção de ciclopeptídeos é especialmente importante porque, até o momento, as tentativas de investigar as sequências de aminoácidos dessas pequenas moléculas cíclicas na espécie *C. procera* têm fracassado. O isolamento e os estudos

estruturais destas moléculas são grandes desafios na compreensão das propriedades biológicas apresentadas por esta espécie.

#### 4.4 Estratégias de isolamento de peptídeos nas frações do látex

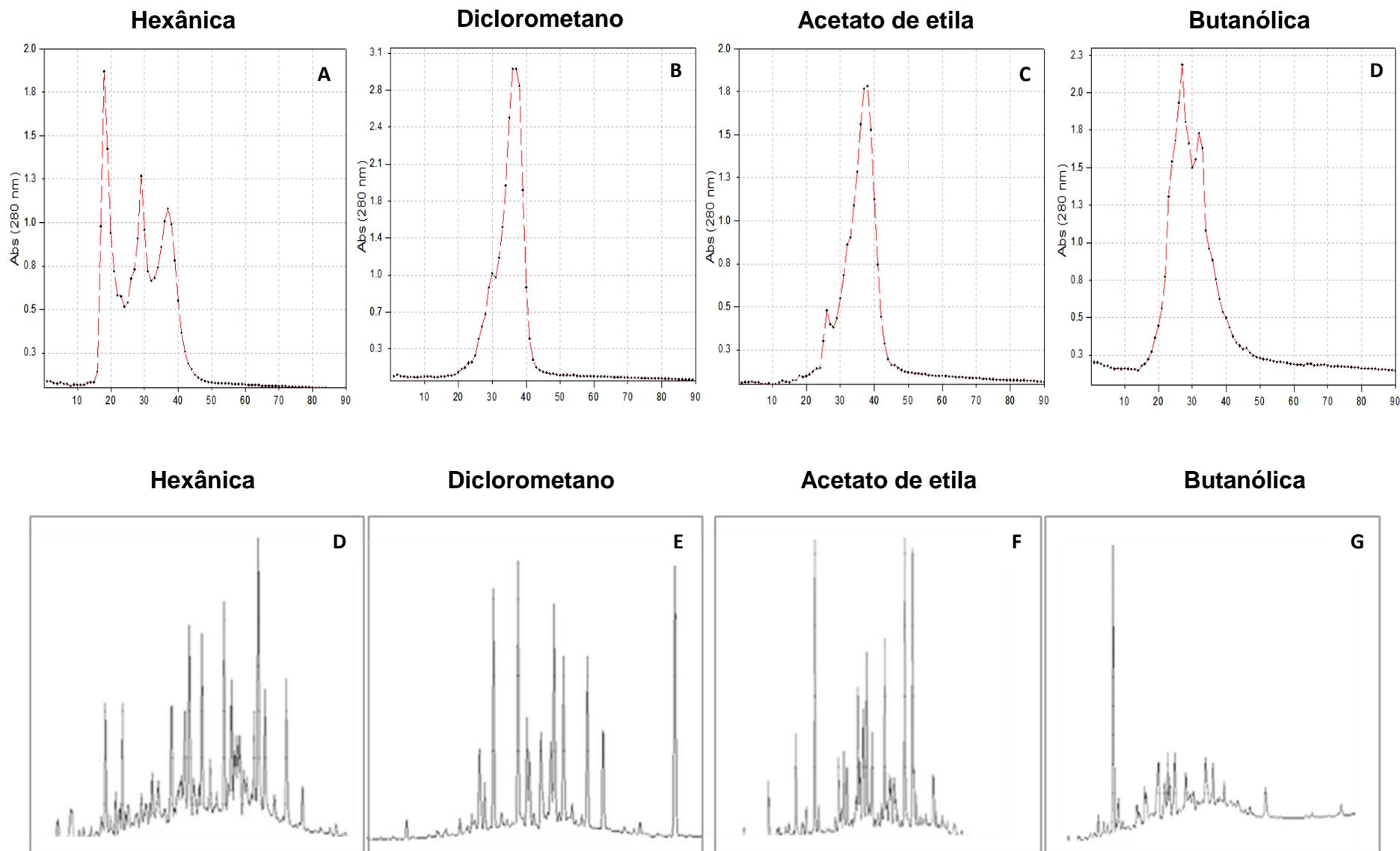
Os perfis cromatográficos, traçados por técnicas de exclusão molecular (LH-20) e fase reversa (C-18) das frações orgânicas do látex de *C. procera*, revelaram matrizes complexas, com alta intensidade de absorção nas regiões de 220 e 280 nm, o que é sugestivo da presença de ligações peptídicas e aminoácidos aromáticos, os quais por sua vez são característicos de peptídeos (Figura 10).

Sabendo que diversos trabalhos de isolamento de peptídeos na literatura utilizaram a fração acetato de etila como ponto de partida (TAN e ZHOU, 2006; BARAGUEY *et al.*, 1998; AUVIN-GUETTE *et al.*, 1997; VAN DEN BERG *et al.*, 1995) e, levando em consideração que esta fração apresentou propriedades biológicas relevantes em estudos preliminares (dados não mostrados), além de reagir positivamente frente aos métodos químicos de detecção de peptídeos (método da tolidina e ninidrina), a mesma foi escolhida como alvo para o isolamento de peptídeos bioativos.

Apesar das três estratégias (Figuras 11, 12 e 13) onde se utilizou a fração acetato de etila terem sido conduzidas por técnicas de fracionamento adequadas (LH-20, Sephadex G-10, SPE-C18 e HPLC C18), empregadas com sucesso no isolamento de outras moléculas da mesma natureza e, ainda, que aquelas estratégias tenham sido auxiliadas por espectrômetro de massas de alta resolução, nenhuma delas foi suficiente para o isolamento de qualquer peptídeo desta fração. Nas três primeiras estratégias de tentar isolar os peptídeos, as matrizes cromatográficas sephadex LH-20 (Figura 11A), sephadex G-10 (Figura 12A) e SPE-C18 (Figura 13A) foram usadas como ponto de partida para o fracionamento da fração acetato de etila. Logo em seguida, a fração 1 (13 picos) da estratégia 1 (Figura 11A), e os picos resultantes das estratégias 2 (4 no total) e estratégia 3 (5 no total) foram recromatografados em colunas de fase reversa (C-18).

Os picos obtidos da recromatografia de cada uma das três estratégias foram analisados individualmente por espectrometria de massas em modo exploratório. A identificação consistia na fragmentação individual de cada íon detectado e na verificação dos respectivos padrões de fragmentação com a do peptídeo tido como referência, a leucina encefalina. Portanto, as abordagens de identificação dos íons referentes a possíveis peptídeos se basearam nos padrões de fragmentação gerados por espectrometria de massas, ao invés da utilização dos métodos químicos. A razão para tal foi que essa abordagem (baseada em espectrometria de massas) é mais rápida, prática e não necessita do acúmulo de material, o que inviabilizou os estudos de detecção química de cada pico oriundo das cromatografias de fase reversa. As análises dos padrões de fragmentação se concentraram nos íons de razão massa carga maior que 700 Da, uma vez que os íons com valores maiores que esse tem se mostrado promissores (TAN e ZHOU, 2006).

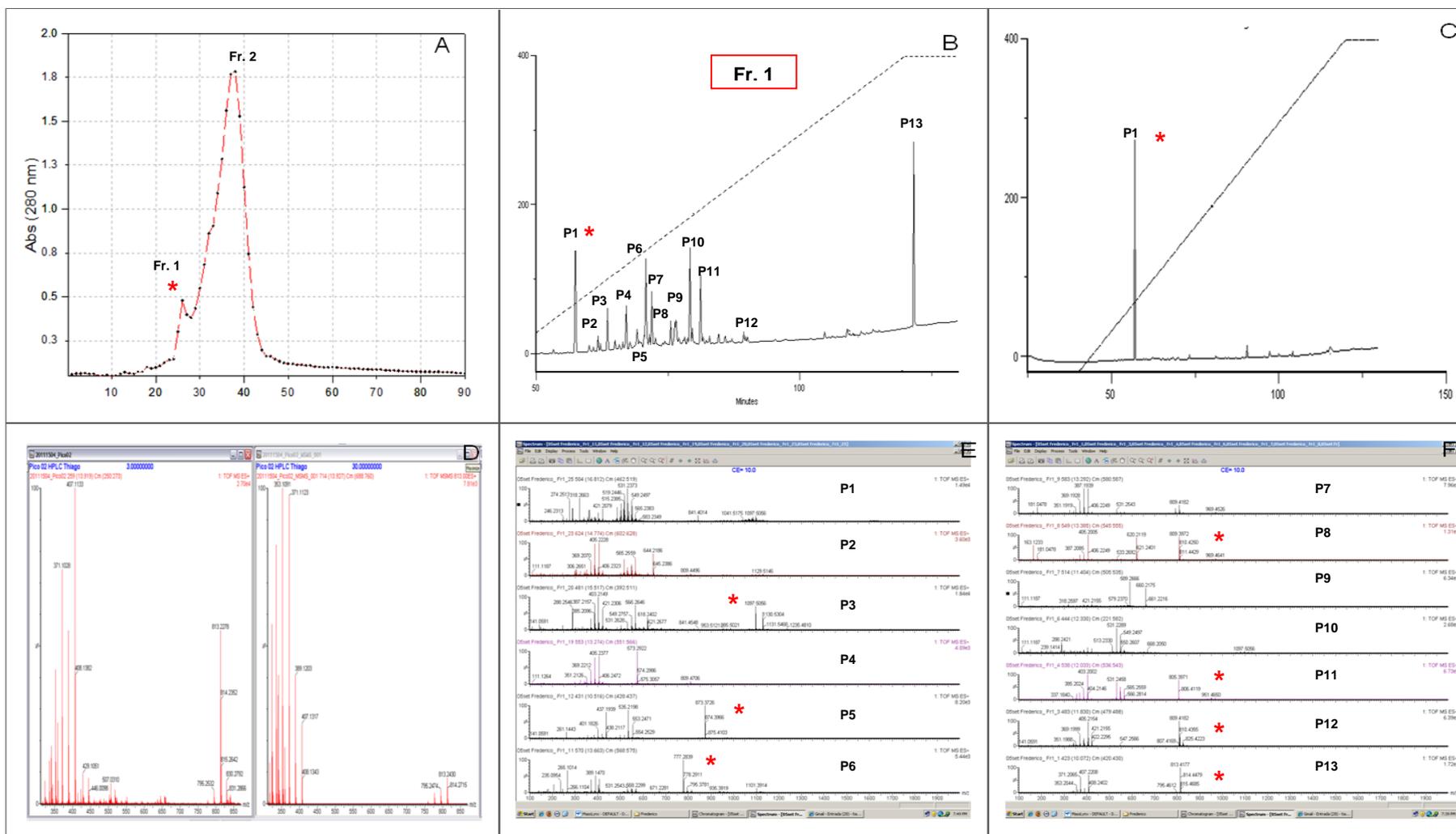
Por fim, uma quarta estratégia foi empregada (Figura 14), tendo o látex total como material de partida. O isolamento de peptídeos se concentrou na fração aquosa, reconhecida por ser rica em proteínas (FREITAS *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Apesar dos passos analíticos adotados nesta estratégia, também não foi possível o isolamento de peptídeos a partir desta fração aquosa do látex total. Nessa estratégia foram usadas as mesmas abordagens analíticas descritas nas estratégias anteriores, e mesmo assim nenhum dos íons com razão massa carga superior a 700 Da, assim como nas estratégias anteriores, apresentou um padrão de fragmentação condizente com o de peptídeos.



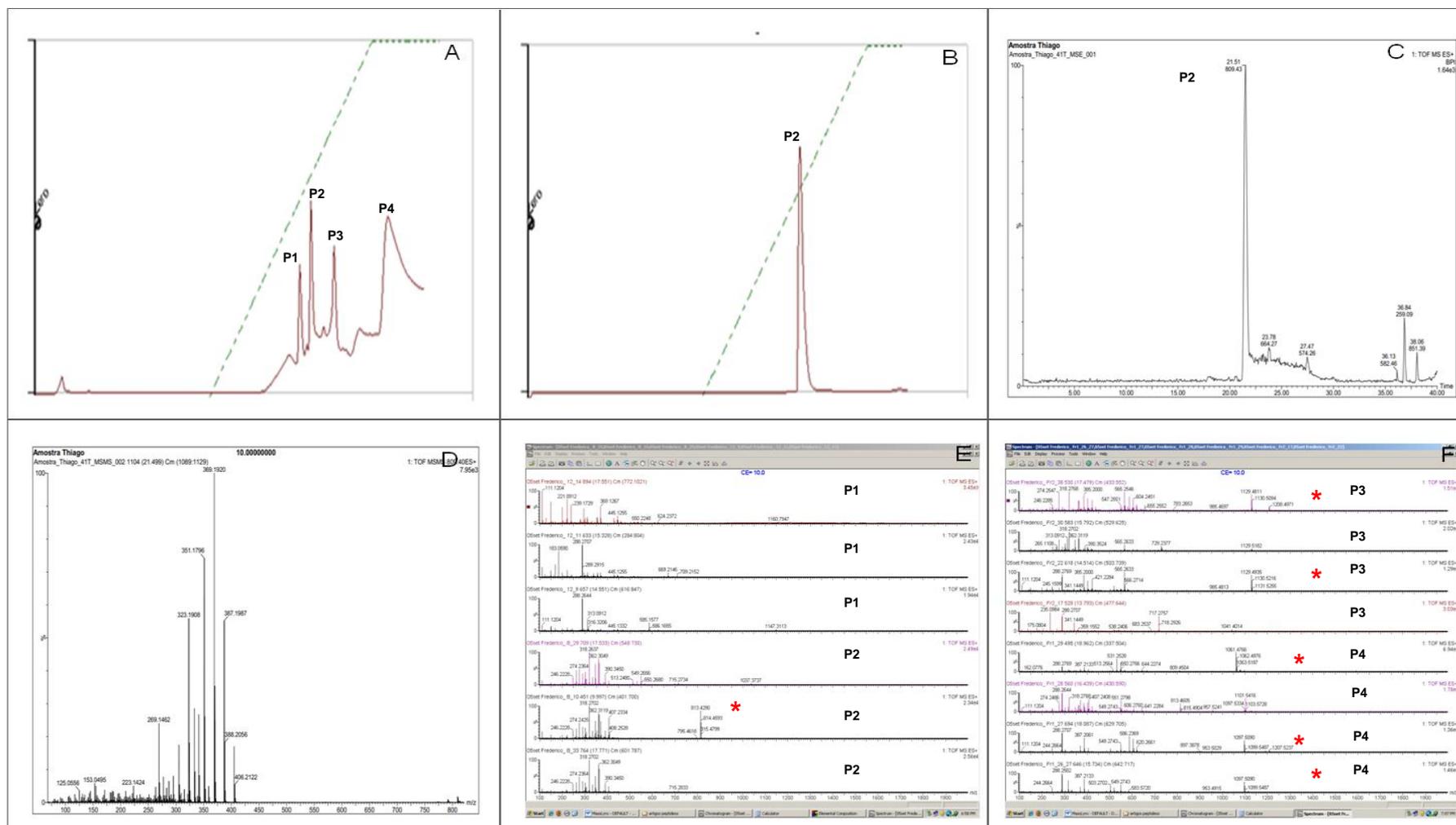
**Figura 10** – Perfis cromatográficos, por exclusão molecular (A, B, C e D) e fase reversa (D, E, F e G), das frações orgânicas do látex de *C. procera*.

Uma das grandes dificuldades encontradas no isolamento de peptídeos da biomassa vegetal, em especial do látex, reside na grande complexidade da matriz biológica, uma vez que além da grande amplitude de polaridade e tamanho das moléculas presentes, os peptídeos, de maneira geral, se apresentam em quantidades traço (CLAESON *et al.*, 1998). Baseado nisso, ROMANIK e colaboradores (2007) destacam que o conhecimento prévio das características químicas da matriz biológica, bem como da molécula de interesse, são essenciais para a escolha das técnicas adequadas de preparo, fracionamento e separação de peptídeos.

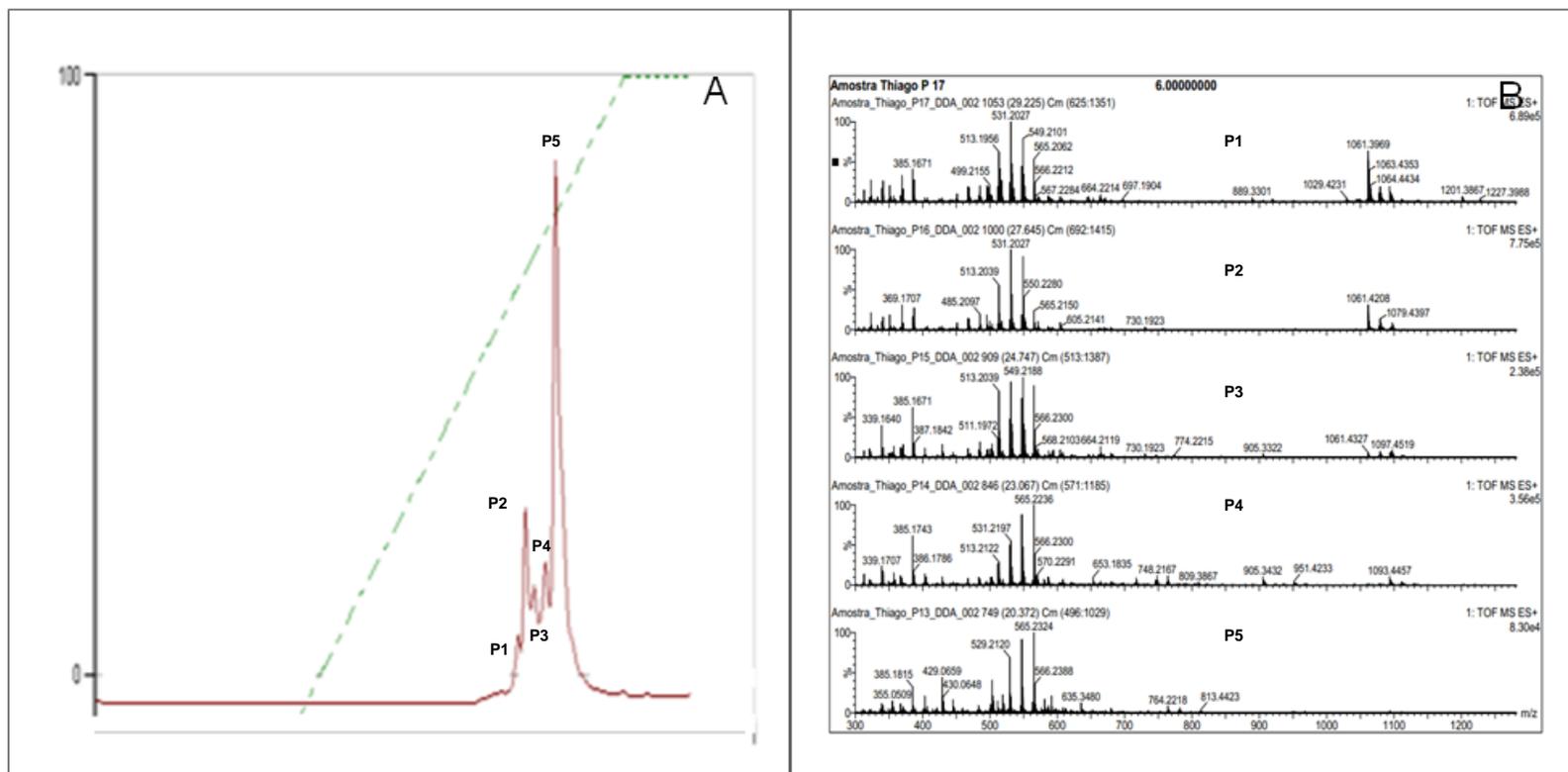
Nos últimos anos, os métodos químicos de detecção avançaram bastante, o que permitiu o isolamento de muitos peptídeos (TAN e ZHOU, 2006), contudo, apesar disto, a identificação daqueles ainda permanece sendo um grande gargalo, o que tem limitado muitos estudos, mesmo os que têm conseguido preparar, fracionar e separar adequadamente suas amostras (YAN *et al.*, 2008). Já HAN e colaboradores (2008), ao estudar extratos de raízes de *Pseudostellaria heterophylla* conseguiram, via LC-TOF-MS, identificar seis peptídeos cíclicos, mostrando que a espectrometria de massas é a ferramenta mais rápida, sensível e confiável para realizar experimentos de bioprospecção e identificação de peptídeos, mesmo que estas moléculas não estejam isoladas. Baseado nisso, vale a pena destacar que a falta de experiência no reconhecimento dos padrões de fragmentação dos íons de interesse pode ter sido um dos motivos principais para o fracasso no isolamento e identificação de peptídeos do látex de *C. procera*.



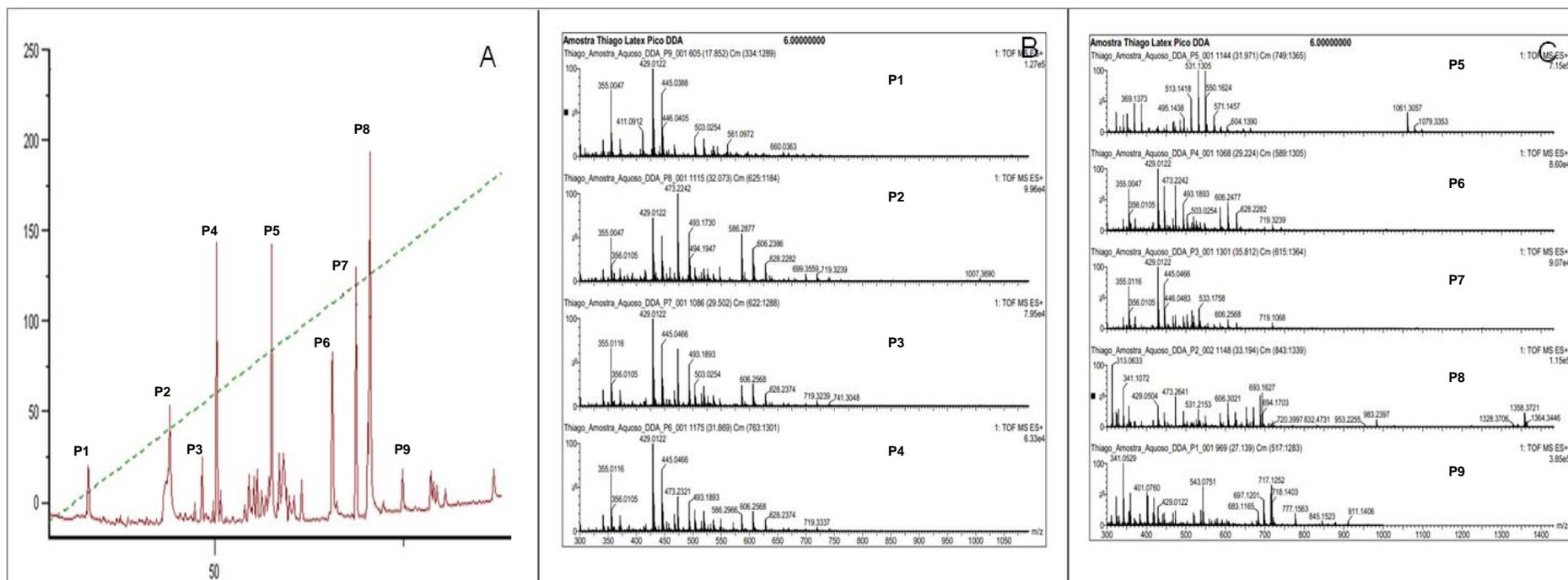
**Figura 11** – Primeira estratégia empregada na tentativa de isolar peptídeos da fração acetato de etila do látex de *C. procera*. **(A)** Exclusão molecular (LH-20) **(B)** Cromatografia de fase reversa (C-18) da fração 1 **(C)** Pico obtido da recromatografia do P1 **(D)** Análise por espectrometria de massas **(E, F)** Análise exploratória por espectrometria de massas das frações obtidas da cromatografia de fase reversa.



**Figura 12** – Segunda estratégia empregada na tentativa de isolar peptídeos da fração acetato de etila do látex de *C. procera* **(A)** Análise por cromatografia de fase reversa da fração oriunda da extração em fase sólida **(B)** Fração obtida por recromatografia do P2 **(C)** Análise por UPLC **(D)** Análise por espectrometria de massas **(E, F)** Análise exploratória por espectrometria de massas das frações obtidas da cromatografia de fase reversa.



**Figura 13** – Terceira estratégia empregada na tentativa de isolar peptídeos da fração acetato de etila do látex de *C. procera* (A) Análise por cromatografia de fase reversa da fração oriunda da extração com acetonitrila 40% seguida por extração em fase sólida (B) Análise exploratória por espectrometria de massas das frações obtidas da cromatografia de fase reversa.



**Figura 14** – Quarta estratégia empregada na tentativa de isolar peptídeos da fração aquosa do látex de *C. procer* **(A)** Análise por cromatografia de fase reversa da fração oriunda da filtração em filtro centripep 10 kDa e cromatografia de exclusão molecular em sephadex G-10 **(B)** Análise exploratória por espectrometria de massas das frações obtidas da cromatografia de fase reversa.

#### 4.5 Citotoxicidade das frações do látex frente a células tumorais

A toxicidade das frações do látex de *C. procera* foi investigada usando o ensaio de MTT frente a quatro linhagens de células tumorais (HL-60, Ovcara-8, HCT-116 e SF-295). As frações mais hidrofóbicas foram citotóxicas contra as células tumorais testadas, onde tiveram  $DL_{50}$  variando de 0,05 a 6,5  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 5). Já as frações mais polares (butanólica e aquosa) não foram citotóxicas.

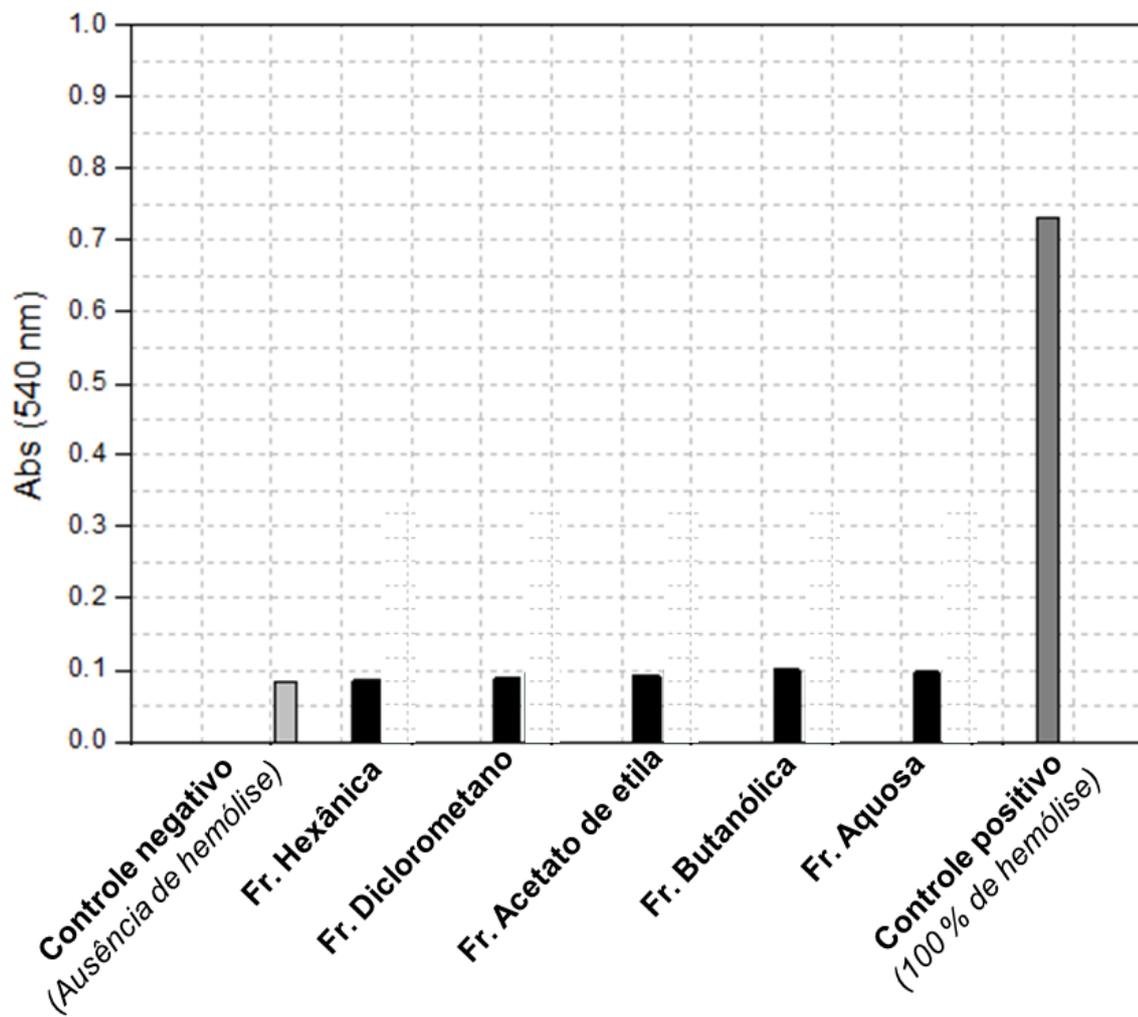
SAWADOGO e colaboradores (2013) publicaram uma revisão sobre plantas do oeste africano com propriedades anticâncer, na qual descrevem três cardenólídeos (2"-Oxovoruscarina, uscarina e voruscarina) presentes na espécie *C. procera*, além de saponinas, taninos, alcalóides e flavanóides, sendo esta última classe de compostos do metabolismo secundário, identificada em todas as frações da partição do látex deste estudo. Estas moléculas demonstraram um alto poder anti-proliferativo frente a diferentes linhagens de células tumorais (Hs683, U373, HCT-15, LoVo e A549), sendo a uscarina e voruscarina presentes no látex (MEENA *et al.*, 2010). O extrato metanólico de *C. procera* também foi descrito como citotóxico frente a linhagens de células tumorais, além disso exibiu atividade químio-preventiva *in vitro* e *in vivo* em carcinoma hepatocelular (CHOEDON *et al.*, 2006). Estudos conduzidos por JUNCKER e colaboradores (2009) mostraram o potencial do UB450, um cardenólídeo hemi-sintético citotóxico, em reprimir a proliferação de células cancerosas e envolvido em vias de indução de apoptose.

**Tabela 5** – Avaliação da toxicidade das frações do látex de *C. procera* contra células cancerígenas e *Artemia salina*.

Frações	Amostras (DL <sub>50</sub> µg.mL <sup>-1</sup> )				Ensaio <i>Artemia salina</i>
	Ensaio de MTT				
	HL-60	Ovcar-8	HCT-116	SF-295	
Hexano	2,9 (2,4 – 3,4)	6,5 (5,6 – 7,6)	3,8 (3,5 – 4,1)	3,2 (2,7 – 3,8)	781,5 ± 31,2 (721,2 – 843,3)
Diclorometano	0,05 (0,04 – 0,06)	0,17 (0,14 – 0,2)	0,11 (0,1 – 0,13)	0,12 (0,1 – 0,14)	10,9 ± 0,9 (9,3 – 12,7)
Acetato de etila	1,8 (1,5 – 2,1)	3,9 (3,4 – 4,4)	1,7 (1,6 – 1,8)	1,8 (1,6 – 1,9)	65,7 ± 4,6 (57,3 – 75,3)
Butanol	>100	>100	>100	>100	237,3 ± 22,3 (195,2 – 284,7)
Aquosa	>100	>100	>100	>100	712,5 ± 39,9 (636,2 – 792,6)
Doxorrubicina <sup>1</sup>	0,02 (0,01-0,02)	1,36 (0,98-1,89)	0,01 (0,01-0,02)	0,24 (0,17- 0,36)	-
Dicromato de potássio <sup>2</sup>	-	-	-	-	20 µg/mL

Dados são apresentados como valores de DL<sub>50</sub> e 95% de intervalo de confiança para células tumorais de leucemia (HL-60), ovário (Ovcar-8), colón (HCT-116) e SF295 (cérebro). <sup>1</sup> Controle positivo no ensaio de MTT e <sup>2</sup> Controle positivo no ensaio de *Artemia salina*

Finalmente, MAGALHÃES e colaboradores (2012) mostraram que as frações acetato de etila, acetona e metanol do caule de *C. procera* são bastante promissoras, uma vez que apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* frente a linhagens de células cancerosas. Vale a pena mencionar que uma citotoxicidade seletiva aliada a propriedades anticâncer *in vivo* foram descritas em frações protéicas do látex de *C. procera* (OLIVEIRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Além disso, as cinco frações testadas no presente trabalho não apresentaram atividade hemolítica em eritrócitos humanos em concentrações de até 1 mg/mL (Figura 15).



**Figura 15-** Avaliação do efeito hemolítico das frações do látex de *C. procerca*

A toxicidade das frações do látex de *C. procera* também foi avaliada através do ensaio de letalidade usando o microcrustáceo *Artemia salina*, considerado um modelo experimental *in vivo*. Como mostrado na Tabela 5, os valores de DL<sub>50</sub> para as frações diclorometano e acetato de etila sugerem uma toxicidade para estas frações. Estes dados são corroborados por estudos *in vivo* que correlacionam constituintes bioativos de plantas com toxicidade (MORSLED *et al.*, 2011). Trabalhos na literatura também mostraram que extratos de plantas com valores de DL<sub>50</sub> menores que 250 µg/mL são significativamente tóxicos (RIESER *et al.*, 1996; MEYER *et al.*, 1982). O valor da DL<sub>50</sub> da fração diclorometano (10,9 µg/mL) foi menor que o da ciclosporina, uma droga que é usada como controle positivo em diversos estudos como demonstrado por MOSHI e colaboradores (2004). Já os altos valores de DL<sub>50</sub> das outras frações sugerem a inexistência de toxicidade aguda.

#### 4.6 Atividade antiinflamatória das frações do látex

As frações diclorometano, acetato de etila e aquosa inibiram a migração de neutrófilos induzida por carragenana em 67, 56 e 72%, respectivamente (Tabela 6). A atividade antiinflamatória está associada a um dos usos mais comuns do látex da espécie *C. procera* na medicina tradicional. De fato, inúmeros trabalhos científicos têm confirmado e caracterizado extensivamente essa importante atividade em diferentes modelos animais (KUMAR e ROY, 2007; KUMAR e ARYA, 2006).

As frações hexânica e butanólica não inibiram a migração de neutrófilos. KUMAR e colaboradores (2009) e (2011) demonstraram e caracterizaram a atividade antiinflamatória de extratos aquosos e alcoólicos do látex de *C. procera*. SEDDEK e colaboradores (2009) estudaram um extrato solúvel em água do látex de *C. procera* e demonstraram que ele ativa macrófagos e facilita a produção de ácido nítrico (NO), via regulação dos genes relacionados com a inibição da enzima de síntese do óxido nítrico (iSON), o que facilita a resposta inflamatória e imune. Mais recentemente, TOUR e TALELE (2011) mostraram que os extratos hidroalcoólicos e de clorofórmio da casca do caule de *C. procera* exibiram atividade antiinflamatória nas concentrações de 200 e 400 mg/kg, respectivamente. Adicionalmente, o extrato

de clorofórmio na concentração de 400 mg/kg também exibiu um efeito protetor gastromucal significativo.

**Tabela 6** - Efeito inibitório das frações do látex de *C. procera* no modelo de peritonite induzida por carragenana

<b>Frações</b>	<b>Neutrófilos x 10<sup>3</sup>/mL</b> <i>(Grupo controle)</i>	<b>Neutrófilos x 10<sup>3</sup>/mL</b> <i>(10 mg/kg)</i>	<b>Inibição (%)</b>
Hexânica	2191 ± 332,0	1422 ± 265,9	35
Diclorometano	2191 ± 332,0	720,4 ± 150,3	67
Acetato de etila	7599 ± 383,5	3369 ± 585,6	56
Butanólica	2869,25 ± 239,5	1409 ± 557,7	51
Aquosa	7515,8 ± 423,3	2118 ± 151,2	72

Os valores representam a média ± DP da observação de três experimentos (n=5;  $p < 0,05$ ; ANOVA seguido pelo teste de Bonferronis).

## 5. CONCLUSÃO

Peptídeos foram detectados quimicamente, através do método da tolidina, nas frações acetato de etila, butanólica e aquosa do látex de *C. procera*. Já a fração acetato de etila reagiu positivamente frente ao método químico da ninidrina, indicando pela primeira vez a presença de ciclopeptídeos no látex desta espécie.

Já as frações diclorometano e acetato de etila exibiram um enorme potencial tóxico tanto *in vitro* como *in vivo*, além de propriedades antiinflamatórias em modelo animal.

Todas essas frações, obtidas da partição do látex de *C. procera*, demonstraram, através de análises espectroscópicas e estudos fitoquímicos qualitativos, uma diversidade razoável quanto à presença de diversos compostos químicos, o que justifica, em parte, a grande diversidade de atividades biológicas atribuídas ao látex desta planta.

Na tentativa de isolar um grupo de biomoléculas – no caso, peptídeos - presentes neste látex, quatro estratégias de isolamento foram utilizadas, mas nenhuma delas foi bem sucedida, o que impossibilitou o isolamento de ao menos um peptídeo. Mesmo assim, houve um grande aprendizado a respeito da complexidade desta matriz vegetal. Esse conhecimento, decisivamente, abre perspectivas, além do que norteará os próximos estudos que tenham enfoque no isolamento destas moléculas.

# Capítulo II

**Estudos de isolamento,  
sequenciamento *de novo* e  
identificação de peptídeos de  
sementes de *J. curcas***

# 1. Introdução

## 1.1 O gênero *Jatropha*

O gênero *Jatropha* é formado por aproximadamente 175 espécies, entre arbustos e árvores, distribuídos em países tropicais e subtropicais, e que pertencem à família Euphorbiaceae. As espécies deste gênero são reconhecidas por suas propriedades medicinais tanto em humanos como em animais (SEGURA-CAMPOS *et al.*, 2013).

Um aspecto que tem chamado bastante atenção é a quantidade de compostos naturais bioativos que têm sido isolados das mais diversas partes de espécies como *Jatropha curcas*, *J. chevalieri*, *J. elliptica*, *J. gaumeri*, *J. glandulifera*, *J. gossypifolia*, *J. grossidentata*, *J. integerrima*, *J. macrantha*, *J. mahafalensis*, *J. multifida*, *J. nana*, *J. podagrica*, *J. pohliana*, *J. tanjorensis*, *J. unicostata* e *J. weddelliana* (ZHANG *et al.*, 2009).

Recentemente, SABANDAR e colaboradores (2013) descreveram as principais propriedades medicinais, fitoquímicas e farmacológicas de algumas classes de compostos naturais, dentre os quais se incluem alcalóides, terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos), flavonóides, compostos fenólicos e muitos outros compostos do metabolismo secundário. No entanto, esses autores dão um grande destaque, não só pelas atividades biológicas descritas, como também pelas peculiaridades do ponto de vista químico, aos peptídeos cíclicos tipo-Carophyllaceae, isolados do látex das espécies deste gênero (Tabela 1). Já SHARMA e SINGH (2012), tem chamado a atenção não só para as atividades farmacológicas dos constituintes químicos isolados, bem como para os extratos orgânicos e/ou aquosos das espécies deste gênero.

SAWADOGO e colaboradores (2012) descreveram recentemente uma revisão das principais espécies vegetais usadas na medicina tradicional da África para o tratamento de câncer. Mais uma vez, as espécies do gênero *Jatropha*, como a espécie *J. curcas*, têm sido destacada.

**Tabela 1-** Peptídeos cíclicos isolados das espécies do gênero *Jatropha* descritos na literatura.

Peptide name	Sequence	N° de residues	MW (Da)	Species	Authors
Labaditin	<b>Cyclo-</b> (Ala-Gly-Val-Trp-Thr-Val-Trp-Gly-Thr-Ile)	10	1070	<i>J. multifida</i>	Kosasi et al. (1989)
Biobollein	<b>Cyclo-</b> (Ala-Ser-Ile-Leu-Gly-Leu-Gly-Trp-Ala)	9	868	<i>J. multifida</i>	Labadie (1993)
Curcacycline A	<b>Cyclo-</b> (Gly-Leu-Leu-Gly-Leu-Leu-Val-Thr)	8	766	<i>J. curcas</i>	Van den Berg et al. (1995)
Podacycline A	<b>Cyclo-</b> (Gly-Leu-Leu-Gly-Ala-Val-Trp-Ala-Gly)	9	824	<i>J. podagrica</i>	Van den Berg et al. (1996)
Podacycline B	<b>Cyclo-</b> (Phe-Ala-Gly-Thr-Ile-Phe-Gly)	7	693	<i>J. podagrica</i>	Van den Berg et al. (1996)
Cyclogossine A	<b>Cyclo-</b> (Leu-Ala-Thr-Trp-Leu-Gly-Val)	7	740	<i>J. gossypiifolia</i>	Horsten et al. (1996)
Cyclogossine B	<b>Cyclo-</b> (Gly-Gly-Trp-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu)	8	781	<i>J. gossypiifolia</i>	Auvin-Guette et al. (1997)
Curcacycline B	<b>Cyclo-</b> (Leu-Gly-Ser-Pro-Ile-Leu-Leu-Gly-Ile)	9	863	<i>J. curcas</i>	Auvin-Guette et al. (1997)
Chevalierin A	<b>Cyclo-</b> (Gly-Ile-Pro-Ile-Leu-Ala-Met)	7	695	<i>J. chevalieri</i>	Baraguey et al. (1998)
Chevalierin B	<b>Cyclo-</b> (Gly-Ile-Pro-Ile-Leu-Ala-Met)	7	695	<i>J. chevalieri</i>	Baraguey et al. (1998)
Chevalierin C	<b>Cyclo-</b> (Tyr-Thr-Ile-Phe-Asp-Ile-Phe-Gly-Ala)	9	1027	<i>J. chevalieri</i>	Baraguey et al. (1998)
Pohlianin A	<b>Cyclo-</b> (Pro-Leu-Gly-Val-Leu-Leu-Tyr)	7	755	<i>J. pohliana</i>	Auvin-Guette et al. (1999)
Pohlianin B	<b>Cyclo-</b> (Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Leu-Tyr)	7	769	<i>J. pohliana</i>	Auvin-Guette et al. (1999)
Pohlianin C	<b>Cyclo-</b> (Gly-Gly-Thr-Ile-Ile-Phe-Gly-Phe)	8	792	<i>J. pohliana</i>	Auvin-Guette et al. (1999)
Mahafacyclin A	<b>Cyclo-</b> (Gly-Thr-Ile-Leu-Gly-Val-Phe)	7	687	<i>J. mahafalensis</i>	Baraguey et al. (2000)
Mahafacyclin B	<b>Cyclo-</b> (Gly-Thr-Phe-Phe-Gly-Phe-Phe)	7	803	<i>J. mahafalensis</i>	Baraguey et al. (2001)
Integerrimide A	<b>Cyclo-</b> (Trp-Gly-Leu-Leu-Leu-Thr-Pro)	7	780	<i>J. integerrima</i>	Mongkolvisut et al. (2006)
Integerrimide B	<b>Cyclo-</b> (Trp-Ala-Leu-Leu-Val-Ser-Pro)	7	766	<i>J. integerrima</i>	Mongkolvisut et al. (2006)
Jatrophidin	<b>Cyclo-</b> (Pro-Leu-Gly-Val-Leu-Leu-Tyr)	7	755	<i>J. curcas</i> ; <i>J. pohliana</i>	Altei et al. (2008)

Fonte: Sabandar *et al.*, 2013

## 1.2 Aspectos gerais da espécie *Jatropha curcas*

Esta planta pertence à família Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae (Tabela 2). A espécie *Jatropha curcas*, conhecida popularmente como pinhão manso, é uma planta oleaginosa que tem o México como provável centro de origem e domesticação (QUINTERO *et al.*, 2014), além do que, é conhecida pela alta produtividade e pelas propriedades do óleo contido em suas sementes, adequadas à produção de biodiesel (PRASAD *et al.*, 2012) (Figura 1). Além disso, merecem destaque o grande número de constituintes químicos descritos e isolados desta planta e a diversidade de atividades biológicas comprovadas até o momento (ZHANG *et al.*, 2009). Merece citar-se, também, as particularidades agrônômicas desta espécie, como a boa adaptação contra as mais diversas condições agroclimáticas (SHARMA e SINGH, 2012).

**Tabela 2** - Classificação taxonômica da planta *Jatropha curcas*

---

Reino Viridiplantae
Divisão Magnoliophyta
Subclasse Rosids
Ordem Malpighiales
Família Euphorbiaceae
Subfamília Crotonoideae
Tribo Jatrophaeae
Gênero <i>Jatropha</i>
Espécie <i>Jatropha curcas</i>

---

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>, acesso Janeiro de 2014.



**Figura 1-** Aspectos gerais da espécie *Jatropha curcas*. Fonte: arquivo pessoal.

Apesar do alto conteúdo de óleo (55-58%), as sementes de pinhão manso, são também uma rica fonte de proteínas e de fatores antinutricionais como os ésteres de forbol, inibidores de tripsina, fitatos, glucanases, lectinas e a curcina, uma toxina vegetal (DEVAPPA *et al.*, 2010). Embora existam genótipos tóxicos, é conhecido um genótipo não tóxico existente no México, o que abre perspectivas para o seu melhoramento genético e consequentes aplicações biotecnológicas (MAGHULY e LAIMER, 2013).

### 1.3 Estudos com as sementes de pinhão manso

Em um estudo clássico de isolamento, purificação e teste da atividade biológica, MACIEL e colaboradores (2009) purificaram e caracterizaram parcialmente a primeira proteína alergênica (2S albumina) das sementes de *J. curcas*. Apesar disto, a disponibilidade de sequências genômicas depositadas em bancos de dados como Kazusa (Fonte: <http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>), atrelada aos estudos em larga escala de proteínas usando ferramentas como a espectrometria de massas, tem sobressaído em relação às estratégias clássicas de

detecção de constituintes químicos e contribuído de maneira mais decisiva para uma maior compreensão da fisiologia e dos mecanismos que norteiam o desenvolvimento das sementes, seja em estágios iniciais, intermediários, maduros, germinativos ou pós-germinativos (MIERNYK e HAJDUCH, 2011).

Recentemente, três trabalhos de análise proteômica de pinhão manso, focados no desenvolvimento das sementes, foram publicados. O primeiro está focado no estudo de plastídios isolados do endosperma em desenvolvimento, no qual se encontram os estágios iniciais de deposição de reservas lipídicas e proteicas (PINHEIRO *et al.*, 2013). Já o segundo trabalho, apresenta proteínas relacionadas ao acúmulo de lipídeos em vários estágios de desenvolvimento, desde os iniciais até os mais avançados (LIU *et al.*, 2013). Já BOORANASRISAK e colaboradores (2013) realizaram estudos com as proteínas relacionadas à biossíntese de ácidos graxos.

O estágio maduro da semente e seus tecidos também foi alvo de estudo. LIU e colaboradores (2011) e (2009), publicaram dois trabalhos similares, nos quais descrevem as proteínas diferencialmente expressas entre o embrião e o endosperma, e apesar das diferenças de expressão, essas proteínas, presentes nos tecidos maduros são mobilizadas durante a germinação. Já YANG e colaboradores (2009) direcionaram seus estudos para as proteínas relacionadas à produção e mobilização de ácidos graxos nas sementes, durante os estágios germinativos e pós-germinativos (YANG *et al.*, 2009).

XIAO e colaboradores (2011) isolaram e identificaram o primeiro peptídeo antimicrobiano (KVFLGLK, JCpep7) descrito na literatura para as sementes desta espécie. Recentemente, SEGURA-CAMPOS e colaboradores (2013), mostraram que um hidrolisado proteico, obtido da semente, constitui-se em uma fonte rica de peptídeos bioativos e que os mesmos são capazes de inibir a enzima conversora de angiotensina I, a qual está envolvida com o controle da pressão arterial. Os dois trabalhos citados anteriormente são os primeiros a descreverem o uso e o potencial de peptídeos bioativos presentes nas sementes de pinhão manso. Apesar do látex do gênero *Jatropha* ser uma fonte rica em peptídeos, em especial os cíclicos, inclusive tendo três peptídeos isolados da espécie *J. curcas*, os trabalhos que tratam de peptídeos bioativos nas sementes são escassos, uma vez que a grande maioria deles tem sido focada em proteínas relacionadas à biossíntese, mobilização e degradação de ácidos graxos.

Tendo em vista que a descoberta e análise de polipeptídeos da biomassa vegetal do pinhão manso se apresentam como etapas limitantes (CLAESON *et al.*, 1998), principalmente no que diz respeito ao preparo da amostra, fracionamento e identificação (ROMANIK *et al.*, 2007), elaborou-se a seguinte pergunta biológica: Será possível estudar/caracterizar peptídeos isolados ou frações enriquecidas obtidas do pinhão manso, por meio do uso de técnicas diferentes das abordagens proteômicas clássicas, como o uso de gel de eletroforese, digestão trípica e identificação em bancos de dados usando MS/MS *ion search*?

Assim, o presente capítulo visa a extração, fracionamento, isolamento, identificação e caracterização de sequências peptídicas com propriedades desconhecidas que possam ser usadas como arcabouço para estudos subsequentes de síntese química e aplicações biotecnológicas.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente capítulo foi extrair e fracionar os peptídeos de sementes de *J. curcas* de maneira que pudesse se obter uma fração enriquecida através de uma metodologia simples e rápida, para que os mesmos fossem alvos de estudos subsequentes de sequenciamento *de novo*, identificação e caracterização funcional e biológica.

### 2.1 Objetivos específicos:

1. Extrair e fracionar peptídeos a partir de sementes de pinhão-mansão;
2. Traçar o perfil cromatográfico, por exclusão molecular e fase reversa, da fração rica em peptídeos;
3. Avaliar por espectrometria de massas a pureza da fração rica em peptídeos assim como suas subfrações;
4. Submeter a fração rica em peptídeos ao sequenciamento *de novo*, manual e automático, a fim de obter sequências primárias de peptídeos;
5. Comparar os espectros de fragmentação de MS/MS do íon de m/z de 671 presente na fração 1, fração purificada e do peptídeo sintético;
6. Confirmar a presença das sequências obtidas através da busca no banco de sequências codificantes do genoma de *Jatropha*;
7. Identificar em bancos de dados as sequências obtidas, assim como realizar estudos de homologia entre sequências conservadas.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Reagentes

Os solventes orgânicos foram de grau analítico (Diclorometano, etanol e ácido acético). Acetonitrila (grau HPLC), ácido trifluoroacético (TFA), polivinilpolipirrolidona (PVPP) e bicarbonato de amônia foram obtidos da SIGMA Aldrich Co. (São Paulo, Brazil). Os peptídeos sintéticos (grau MS), leucina encefalina (555,27 Da) e [Glu1]-fibrinopeptídeo (1568,65 Da) foram adquiridos da Waters (Corp., Milford, EUA).

#### 3.1.2 Obtenção e preparo do material vegetal

As sementes de *J. curcas* foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Renato Moreira Azevedo da Universidade de Fortaleza (UNIFOR). As sementes foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços e submetidas à extração com hexano para a remoção do óleo presente nas mesmas, seguindo a proporção de 1:10 (m/v). Este procedimento foi repetido 5 vezes, até a obtenção de um pó fino e seco que foi armazenado em freezer – 20 °C até o uso.

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Extração

Após a obtenção de um pó fino e seco, 4,0 g da farinha deslipídada das sementes foram extraídas, usando um aparato extrator tipo soxhlet, com 100 mL de

diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) durante uma hora. Logo em seguida, o sobrenadante foi descartado e o resíduo das sementes foi seco à temperatura ambiente. Após a secagem, este material foi extraído com 200 mL de etanol 50% durante uma hora, centrifugado a  $10.000 \times g$  por 20 minutos a  $25^\circ\text{C}$  e o sobrenadante hidroalcolico recuperado. O resíduo foi submetido a este procedimento por pelo menos três vezes com solvente novo. Por fim, todos os sobrenadantes foram reunidos e acidificados com a adição de ácido acético concentrado até a concentração final de 2%.

O sobrenadante acidificado foi agitado por quatro horas com PVPP, a temperatura ambiente, na razão de 1:100 (m/v). Após a centrifugação por 20 minutos a  $10.000 \times g$ , o sobrenadante resultante foi evaporado a um volume de aproximadamente 50 mL, em um rotaevaporador a  $40^\circ\text{C}$ , sob pressão reduzida. O sobrenadante resultante após a rotaevaporação foi liofilizado até a obtenção de um pó seco (0,4 g).

### *3.2.2 Extração em fase sólida*

A partir do pó seco obtido, 100 mg do material extraído, conforme citado acima, foi dissolvido em 100 mL de tampão bicarbonato de amônio (50 mM) na proporção de 1:1 (m/v) e aplicado em um cartucho de extração em fase sólida (C18-E Phenomenex SPE strata column, 200 mg/3 mL), previamente condicionada em acetonitrila (95%), e equilibrada com 60 mL de tampão bicarbonato de amônio.

Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 20 mL do tampão bicarbonato de amônio para a eluição do material não retido. Os analitos retidos na coluna foram sequencialmente eluídos com 10 mL das soluções contendo 50 e 95% de acetonitrila, respectivamente. A fração eluída com 50% de acetonitrila (**nomeada de fração 1**) (6 mg) foi liofilizada e usada no decorrer deste trabalho. Considerando o material de partida (4,0 g), o rendimento desta fração foi de 0,15% em massa. A fração eluída com 95 % de acetonitrila foi liofilizada e congelada a  $-20^\circ\text{C}$  para estudos posteriores.

### *3.2.3 Cromatografia de exclusão molecular*

A fração 1 (1,0 mg) foi dissolvida em 1 mL de acetonitrila 40% contendo 0,1% de TFA. 100 µL desta solução foram analisados por filtração em gel, em uma coluna Superdex Peptide HR 10/30 column (GE Healthcare), tendo como fase móvel acetonitrila 40% com 0,1% de TFA a um fluxo de 0,5 mL/min. O peptídeo Leucina encefalina (Tyr-Gly-Phe-Leu), de massa molecular de 555,277 Da foi usado como padrão cromatográfico.

### *3.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa*

A fração 1 (1,0 mg) foi dissolvida em 1 mL de água ultrapura contendo 0,1% de TFA. Após, 100 µL desta solução foram injetados em uma coluna de fase reversa C-18 (Hamilton PRP-3, 4.1x150 mm), previamente equilibrada com 10 volumes de coluna da solução água/TFA 0,1% (solvente A) sob fluxo de 1 mL/min. Depois de um passo de lavagem por 5 minutos, para a retirada do material não retido, a eluição foi conduzida com um gradiente linear de 0-95% da solução B (95% de acetonitrila/TFA 0,1%) durante 20 minutos e, por fim, um fluxo isocrático de 95% da solução B foi utilizado, por 5 minutos, para a total limpeza da coluna. As corridas foram realizadas em um cromatógrafo AKTApurifier 10 (GE Healthcare Life Sciences) e a absorbância monitorada em 216 e 280 nm pelo próprio equipamento. Todas as frações (PI, PII e PIII), foram coletadas em coletor automático, liofilizadas e congeladas a -20 °C até o uso.

### *3.2.5 Subfracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa*

A fração PII (0,5 mg) foi dissolvida em 1000 µL de água ultrapura, contendo 0,1% de TFA e injetada (100 µL) em uma coluna de fase reversa C18 (Hamilton PRP-3, 4.1x150 mm), previamente equilibrada como descrito no subitem 3.2.4. A eluição foi realizada (fluxo de 1 mL/min) com um gradiente linear de 0-20% do

solvente B durante 2 minutos, 20-40% do solvente B em 12 minutos, 40-100% do solvente B em 5 minutos e um passo final de lavagem da coluna com 100 % do solvente B por 5 minutos.

A corrida foi monitorada através das leituras de absorbância em 216 e 280 nm. Todas as frações foram coletadas (PII-A, PII-B e PII-C), liofilizadas e congeladas a -20 °C até o uso. No último passo, 0,25 mg da fração PII-C foi dissolvido em 1000 µL de água ultrapura, contendo 0,1% de TFA e injetado (100 µL) na mesma coluna e nas mesmas condições descritas no subitem 3.2.4. Finalmente, a fração isolada PII-C foi coletada e seca a vácuo para subsequente análise por espectrometria de massas.

### *3.2.6 Análise por espectrometria de massas*

Os espectros de massas (ESI-Q-TOF) das frações e dos seus fragmentos (MS/MS) foram obtidos num espectrômetro de massas SYNAPT HDMS (Waters Corp., Milford, EUA) acoplado a um sistema de nanoUPLC. Para tanto, as amostras foram diluídas em água contendo ácido fórmico 0,1% na razão de 1:500 (m/v). Nos sistemas cromatográficos, foi utilizado um gradiente de 5 a 80% (v/v) de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico, com um fluxo de 600 nL/min, usando uma coluna nanoACQUITY UPLC C18 BEH (1,7 mm, 100 mm × 10 cm). Todos os dados de MS obtidos no nanoUPLC-MS foram processados e analisados nos softwares MassLynx V3.5 e ProteinLynxGlobalServer (PLGS) versão 2.4v, respectivamente.

### *3.2.7 Sequenciamento de novo*

Os dados oriundos dos espectros de fragmentação, por espectrometria de massas foram interpretados seguindo duas estratégias. A primeira delas foi a interpretação manual do padrão de fragmentação MS/MS dos íons de interesse, oriundos da aquisição dependente de dados (DDA). A segunda estratégia consistiu no uso do programa de sequenciamento e interpretação automática de dados, o software Peaks, como descrito por MA e colaboradores (2003).

### 3.2.8 Busca no banco de sequências genômicas de *Jatropha curcas*

A confirmação da interpretação, seja manual e/ou automática, dos espectros de fragmentação se deu através de buscas no banco de sequências genômicas de *Jatropha* (Fonte: <http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>) versão 4.5. Foram confirmadas e consideradas apenas aquelas sequências que apareceram uma única vez e que exibiram exatamente os mesmos resíduos presentes nas sequências codificantes do banco de dados.

### 3.2.9 Identificação, busca de similaridades e predição estrutural

As sequências codificadas (*contigs*), nas quais os peptídeos estavam inseridos, foram usadas como entradas na ferramenta de busca e identificação por homologia com sequências proteicas, “*protein BLAST*”. A busca foi realizada no banco de dados de sequências proteicas não-redundantes de plantas do GenBank e apenas as identificações com alta homologia foram consideradas.

A sequência completa do íon 671,79 m/z, a qual encontra-se inserida dentro de um domínio conservado tipo LEA, foi escolhida para a construção de uma árvore filogenética baseada nas oito identificações mais significativas com E-value maior que  $10^{17}$ . Para tanto, a ferramenta de alinhamento global Clustalw (1.1.0) foi utilizada.

A ferramenta de predição de estruturas protéicas I-TASSER foi utilizada para a predição estrutural da sequência codificante de 88 resíduos de *J. curcas* (Jcr4U28965.20) e do seu respectivo peptídeo (APTLSGGSVPRDAD). A sequência de 88 resíduos e o peptídeo tiveram uma acurácia estimada de modelo de  $0,33 \pm 0,11$  e  $0,53 \pm 0,15$  (TM-score), respectivamente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Perfis cromatográficos da fração 1 das sementes de *J. curcas*

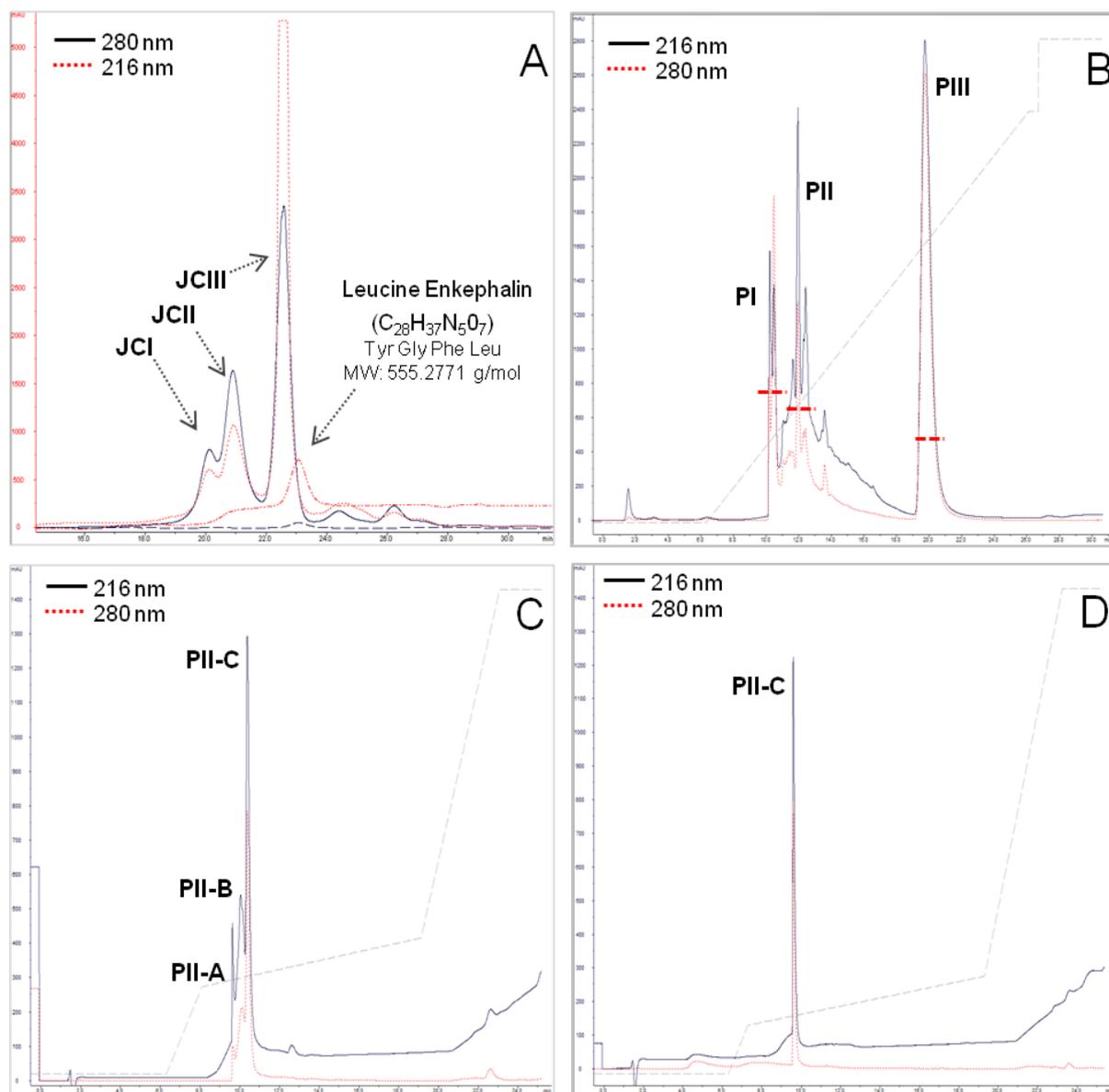
A fração 1 (ver item 3.2.2), oriunda da extração em fase sólida, teve seu perfil e sua complexidade avaliados por meio de duas técnicas cromatográficas complementares, a exclusão molecular e a fase reversa (Figura 2A e 2B).

Esta fração foi analisada, inicialmente, por meio de cromatografia de filtração em gel e o seu perfil comparado ao do peptídeo leucina encefalina (555,27 g/mol), utilizado como referência em função de sua baixa massa molecular. O cromatograma revelou a presença de três frações, nomeadas de JCI, JCII e JCIII, sendo que as duas primeiras (JCI e JCII) apresentaram massa molecular maior que a referência (555,27 g/mol), enquanto a terceira fração (JCIII), a mais intensa, apresentou massa molecular em uma faixa muito próxima à do peptídeo padrão (Figura 2A).

CLAESON e colaboradores (1998) chamam a atenção para a escolha dos alvos adequados nos estudos de fracionamento e isolamento de peptídeos, uma vez que estes, normalmente, são separados dos compostos de baixíssima massa molecular (aminoácidos, açúcares, alcalóides, sais, dentre outros) por apresentarem massa molecular maior que 700 Da, o que reflete na sua eluição no volume morto em colunas de exclusão molecular do tipo Sephadex-G10 (~700 Da). TAN e ZHOU (2006) reforçaram essa idéia ao mostrarem em sua extensa revisão sobre ciclopeptídeos que, apesar de não existir uma regra, a grande maioria dos peptídeos isolados até o momento se concentram em valores de massa molecular a partir desta faixa (~700 Da) em diante.

Logo em seguida, no intuito de se obter picos com alta resolução, a fração 1 foi separada em um sistema cromatográfico de alto desempenho através de colunas de fase reversa (C-18) (Figura 2B). Essa corrida revelou a presença de vários picos que puderam ser agrupados nas frações PI, PII e PIII.

O próximo passo dado foi a recromatografia da fração PII, no intuito de melhorar a resolução dos picos desta fração, visto que já havia sido constatada, através de ESI-MS, a presença de peptídeos, e a ausência dos mesmos nas frações PI e PIII (Dados não mostrados). O procedimento de recromatografia da fração PII resultou na separação de três picos, denominados PII-A, PII-B e PII-C (Figura 2C).



**Figura 2** – Perfis cromatográficos da fração 1 de sementes de *J. curcas* (A) Cromatografia por exclusão molecular (*Superdex Peptide HR 10/30*) (B) Cromatografia por fase reversa (*Hamilton PRP-3, 4.1x150 mm*) (C) Recromatografia da fração PII (D) Recromatografia da fração PII-C em sistema de purificação Akta purifier.

Conforme pôde ser constatado, a estratégia de recromatografia apresentou uma melhor separação e conseqüente resolução dos picos (Figura 2D). Entretanto, as duas primeiras estratégias (filtração em gel e um único passo cromatográfico de fase reversa), mostraram que a fração 1 exibiu baixos níveis de contaminantes, além de não apresentar uma grande complexidade, em termos de composição. Esses dados mostraram que era possível uma análise direta desta fração, sem procedimentos analíticos adicionais de separação, o que, na verdade, constitui-se numa das grandes dificuldades encontradas quando se lida com amostras complexas, como os tecidos vegetais (ROMANIK *et al.*, 2007).

Complementarmente, CLAESON e colaboradores (1998) mostraram que o outro grande problema enfrentado em estudos para se obter polipeptídeos com alto grau de pureza da biomassa vegetal é a presença de contaminantes tais como pigmentos, sais, carboidratos e polifenóis. Assim, a obtenção de frações enriquecidas e livres de interferentes são prioritárias e representam passos essenciais para estudos subsequentes de caracterização destes peptídeos por espectrometria de massas (ASTAFIEVA *et al.*, 2012; EGOROV, *et al.*, 2005).

#### 4.2 Análises por espectrometria de massas e sequenciamento *de novo*

Nesta secção, a fração 1 foi analisada diretamente, sem digestão enzimática prévia, em um espectrômetro de massa de alta resolução, acoplado a um sistema de ultra desempenho cromatográfico (nanoUPLC), em um modo exploratório de análise (Figura 3). A interpretação manual dos padrões de fragmentação (MS/MS) dos íons detectados pelo equipamento, juntamente com a interpretação automática das sequências geradas pelo programa de sequenciamento *de novo*, Peaks, permitiu deduzir totalmente e/ou parcialmente vinte e uma sequências primárias de peptídeos que variaram no seu estado de carga de +1 (íon de m/z de 466,20) a +4 (íon de m/z de 480,74) (Tabela 3).

Entre todos os vinte e um íons que puderam ser sequenciados, o íon duplamente carregado de m/z de 671,79, por exemplo, foi escolhido como íon de referência para estudos subsequentes, pois apresentou o sinal mais intenso de

ionização além de um excelente padrão de fragmentação (MS/MS) com a presença de praticamente todos os íons da série Y. A interpretação manual desse íon permitiu deduzir, de maneira completa, a sequência primária dos seus quatorze resíduos de aminoácidos (APTLSGGSVPRDAD), o que não aconteceu com os outros íons. Adicionalmente, o sequenciamento automático, utilizando o programa Peaks, permitiu deduzir apenas nove dos resíduos do íon em questão (m/z de 671,79). A sequência completa desse íon, juntamente com todas as outras que foram deduzidas, foi utilizada para confirmar sua massa monoisotópica (1341,58 Da).

Nas espécies que carecem de informações genômicas, o que inclui as espécies proximamente relacionadas, o sequenciamento *de novo* representa uma ótima alternativa em relação à busca em bancos de dados (FRANK *et al.*, 2007), muito embora normalmente seja mais trabalhoso e complexo, além de requerer excelentes espectros de fragmentação e um bom conhecimento na interpretação destes espectros (LUBECK *et al.*, 2002). No intuito de superar estas dificuldades típicas do sequenciamento *de novo*, novos algoritmos que computam eficientemente as melhores sequências peptídicas, baseados unicamente nos íons oriundos dos espectros de fragmentação, têm emergido como uma ótima alternativa. Nesse contexto, podem-se destacar o PepNovo, o DeNovo Explorer e o Peaks (HORN *et al.*, 2000), sendo este último, o programa utilizado no presente trabalho.

Por outro lado, a clivagem sequência-específica, por proteases, seguida da análise por espectrometria de massas tem sido a abordagem mais rotineira e de maior sucesso empregada no estudo, caracterização e na descoberta de novos peptídeos, principalmente quando existe a disponibilidade de sequências genômicas da espécie em estudo (COTTRELL, 2011).

Estes resultados mostraram que a baixa complexidade e a ausência de macromoléculas na fração 1, evidenciadas nas técnicas cromatográficas (Figura 2), foram suficientes para abrir mão de uma etapa de digestão enzimática, o que inclusive, de acordo com MANN (2004), facilita a ionização e o sequenciamento de peptídeos. Mesmo assim, as estratégias combinadas de interpretação manual e automática de espectros de MS/MS se mostraram complementares na dedução das sequências primárias dos peptídeos.



**Tabela 3-** Sequências primárias oriundas do sequenciamento *de novo* de peptídeos de sementes de *J. curcas*

Sequências	ions (m/z)	Número de acesso no genoma	Valor-E	Acesso NCBI	Descrição
APTLSGGASVPRDAD APTLSGGSVPRD APTLSGGSVPR PTLSGGSVPRDAD	671,79 (+2) 578,77 (+2) 521,28 (+2) 636,61 (+2)	>Jcr4U28965.20	1E-36	XP_002533168.1	Conserved hypothetical protein [ <i>Ricinus communis</i> ]
TRTRPSGLPGDTTGHNPR RTRPSGLPGDTTGHNPR PSGLPGDTTGHNPR GLPGDTTGHNPRV PGDTTGHNPR GGHVQYTTAGPGAQGTTE TAGPGAQGTTEYTHS	480,74 (+4) 455,48 (+4) 469,21 (+3) 660,83 (+2) 526,25 (+2) 866,40 (+2) 789,85 (+2)	>Jcr4S16138.20	5E-38	AAG37438.1	Seed maturation protein LEA 4 [ <i>Glycine canescens</i> ]
ITDTGGHNP	455,72 (+2)	>Jcr4S00211.110	0.0	XP_002272876.2	translation initiation factor eIF-2B subunit beta-like [ <i>Vitis vinifera</i> ]
NPLPNHGVN	480,74 (+2)	>Jcr4S10771.30	5E-164	BAJ53214.1	JHL23C09.13 [ <i>Jatropha curcas</i> ]
SEREQQVGGSGAGGPY GNPEDEFRQLYE	789,96 (+2) 748,33 (+2)	>Jcr4S01636.60	2E-17	BAJ53257.1	JHL25P11.12 [ <i>Jatropha curcas</i> ]
SPGHSPRQLSSP	625,29 (+2)	>Jcr4S00011.10	0.0	XP_002533868.1	Protein with unknown function [ <i>Ricinus communis</i> ]
IIGQDKPSAGYEEH	772,37 (+2)	>Jcr4S01102.20	2E-102	XP_002525126.1	Conserved hypothetical protein [ <i>Ricinus communis</i> ]
VGRLDDEGVTHL	713,35(+2)	>Jcr4S00300.40	1E-111	XP_002528631.1	Late embryogenesis abundant, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]
IDVPDTGL	829,43 (+1)	>Jcr4S00349.40	1E-123	ADT65200.1	Dehydrin [ <i>Jatropha curcas</i> ]
LFSPGTRPSS	524,78 (+2)	>Jcr4S00279.60	2E-28	BAJ53257.1	JHL25P11.12 [ <i>Jatropha curcas</i> ]
CMGGV	466,20 (+1)	>Jcr4S15842.20	1E-99	BAJ53214.1	JHL23C09.13 [ <i>Jatropha curcas</i> ]
GPALPK	583,26 (+1)	>Jcr4S00661.30	-	-	No significant similarity found

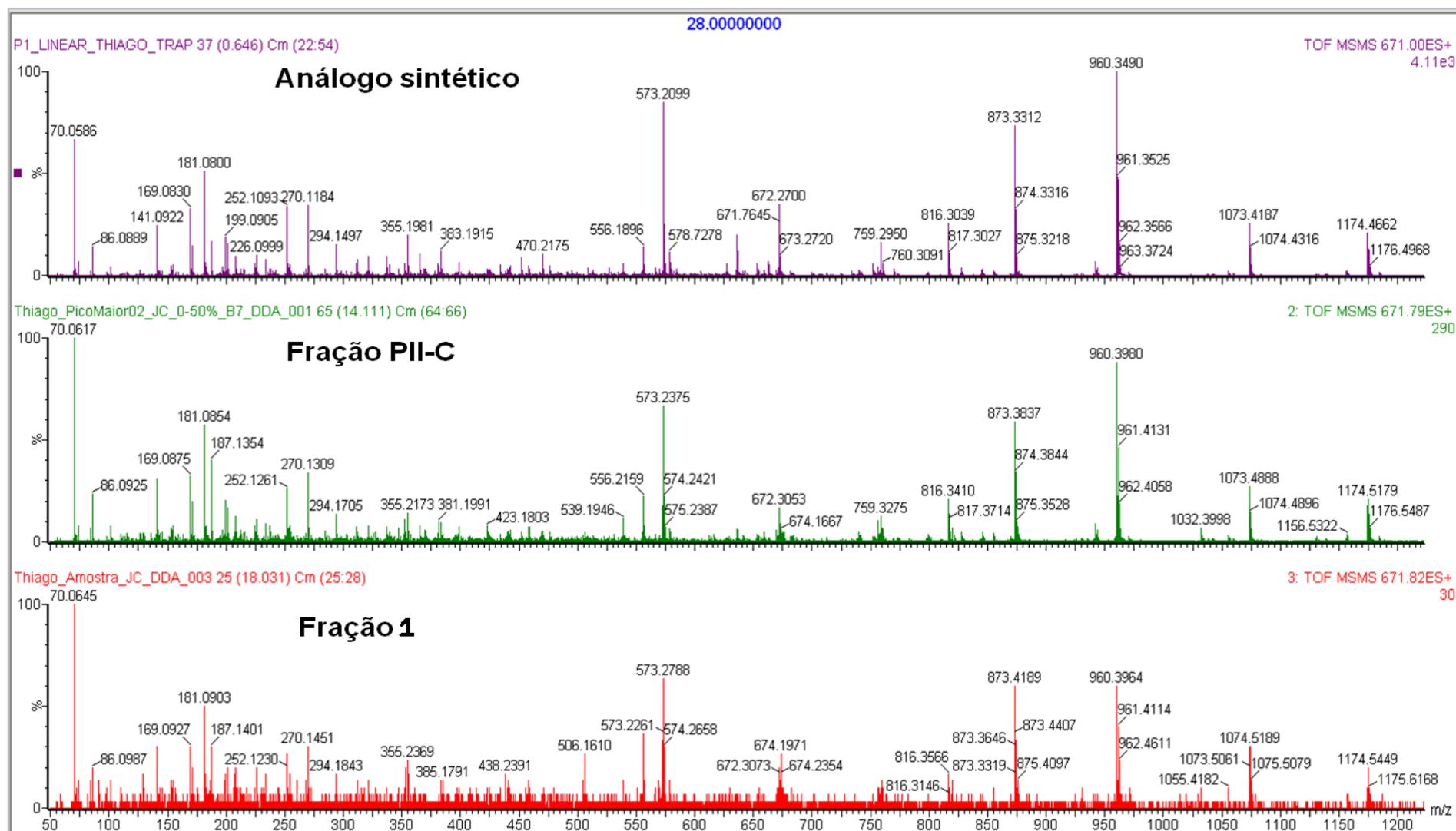
### 4.3 Comparação entre frações através dos padrões de fragmentação por MS/MS

Os íons gerados nos espectros de fragmentação da fração 1 (oriundos da extração em fase sólida), PII-C (recromatografia do PII) e de um peptídeo sintético (análogo do íon de  $m/z$  671,79), bem como as respectivas intensidades dos seus sinais, foram usados como parâmetro para avaliar a necessidade e a importância de múltiplos passos cromatográficos no fracionamento e no sequenciamento dos peptídeos.

O íon 671,79 ( $M + 2H$ )<sup>+</sup>, pelos mesmos motivos já acima citados (ver Tópico 4.2), foi escolhido como íon de referência, a ser comparado nas duas frações testadas. Assim, o mesmo também foi escolhido para ser sintetizado e utilizado como padrão, uma vez que além da sua pureza (> 92%), todos os seus fragmentos eram esperados.

O íon 671,79 ( $M + 2H$ )<sup>+</sup> apresentou os mesmos íons fragmentos nos três espectros de fragmentação, porém a intensidade do sinal diminuiu do íon mais puro (peptídeo sintético) para o mais impuro (fração 1), como esperado (Figura 4). Apesar disto, este dado é muito relevante uma vez que mostra que a estratégia experimental adotada até aqui é simples, rápida e eficiente, não requerendo passos cromatográficos adicionais para a descoberta e sequenciamento de novos peptídeos, o que é na verdade uma área de pesquisa desafiadora (CRAIK, 2010).

Como descrito por ROMANIK e colaboradores (2007), nos estudos de fracionamento e isolamento, os procedimentos para o preparo da amostra são essenciais e requerem pelo menos três passos. Neste trabalho, foram utilizados com este fim: a remoção de contaminantes (extração com diclorometano e PVPP), o emprego de solvente adequado (etanol 50%) e o enriquecimento dos analitos de interesse da amostra (extração em fase sólida).



**Figura 4** – Comparação do padrão de fragmentação MS/MS e da intensidade do sinal do íon 671,79 ( $M + 2H$ )<sup>+</sup> na fração 1 (A), fração PII-C (B) e peptídeo sintético (C).

#### 4.4 Busca, identificação e similaridades em bancos de dados

Através de buscas no banco de dados de sequências genômicas de *Jatropha curcas* foi possível confirmar, sem ambiguidades, a presença de todas as sequências primárias, dos vinte e um peptídeos, descritas neste trabalho. Ainda nestas buscas foi possível localizar as sequências codificantes completas, nas quais os peptídeos estavam inseridos, o que abriu perspectivas para suas possíveis funções biológicas (Tabela 4).

No caso do íon 671,79 (M + 2H)<sup>+</sup>, por exemplo, seus quatorze resíduos de aminoácidos (APTLSSGGSVPRDAD) estão inseridos em uma sequência de oitenta e oito resíduos de aminoácidos, representada pelo número de acesso Jcr4U28965.20 (Figura 5A). Uma análise, através de uma ferramenta que prediz *in silico* os possíveis sítios de clivagem por proteases e/ou reagentes químicos de uma sequência proteica, localizado no domínio do ExPASy (Fonte: [http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/)), revelou que, assim como para o peptídeo referente ao íon 671,79 (M + 2H)<sup>+</sup> (Figura 5B), as demais sequências originaram-se a partir de um extenso processamento proteolítico (Dados não mostrados). Não se sabe ao certo se este perfil verificado é decorrente de processamento pós-traducional ou de degradação de proteínas, em especial as de reserva, as quais se acumulam em grandes quantidades nas sementes maduras (BUCHANAN e GRUISSEM, 2000).

Esta sequência codificante (Jcr4U28965.20), assim como as demais, foi usada como entrada na ferramenta de busca Blastp, no intuito de buscar por sequências homólogas no banco de sequências protéicas não redundantes (nr) do NCBI. Esta busca permitiu identificar quase 100% destas sequências, as quais têm identidade quase que exclusivamente associadas a proteínas de reserva (Tabela 3).



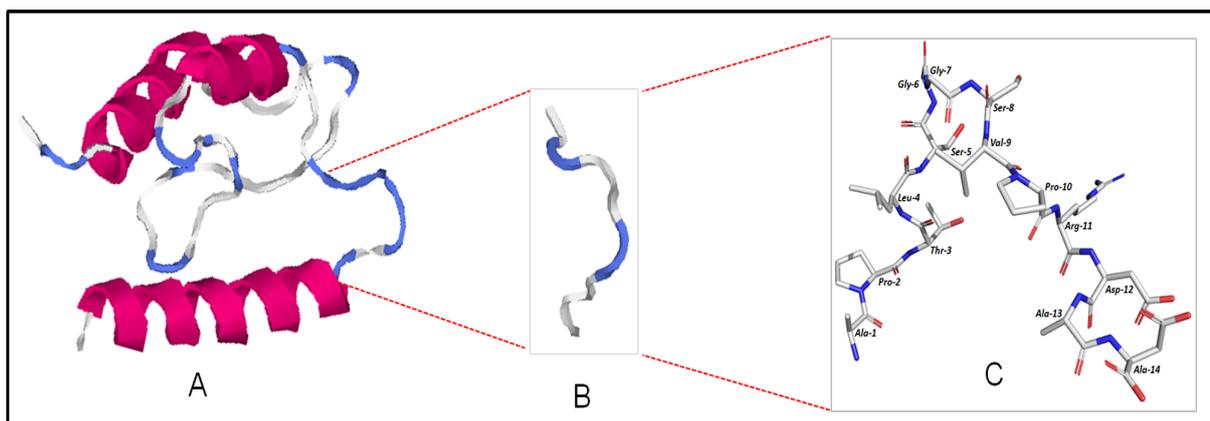
**Tabela 4** – Distribuição das sequências primárias dos peptídeos ao longo das sequências proteicas das sementes de *J. curcas*.

N° de acesso	Localização do peptídeo	Massa molecular		N° de aminoácidos	
		Peptídeo (Da)	Proteína (kDa)	Peptídeo	Proteína
>Jcr4U28965.20	... <b>54</b> RGAGATD <u>AP</u> TL <u>SGGS</u> VPRDADVSTIDAITSRPKKP <b>88</b>	1342,4	9,609	14	88
>Jcr4S16138.20	... <b>73</b> AKAGGHVQYTTAGPGAQGTETETHSTTGT <b>102</b> ...	2321,4	15,891	23	150
>Jcr4S16138.20	<b>121</b> GQPYGGEVPTGL <u>TR</u> TRPSGLPGDTTGHNP <b>150</b>	1920	42,452	18	391
>Jcr4S00211.110	... <b>346</b> DYVPPKLVSLF <u>IT</u> DTGGHNPSYMYRLIADY <b>375</b> ...	910,9	42,452	9	391
>Jcr4S10771.30	... <b>433</b> IPRSKPNIST <u>NPL</u> PNHGVNAIVSDQELIDP <b>462</b> ...	1062,1	58,480	10	521
>Jcr4S01636.60	... <b>186</b> PRHFYLAG <u>NP</u> EDEFRQLYEGRREPGSGRHE <b>215</b> ...	1496,5	64,636	12	576
>Jcr4S01636.60	<b>276</b> RPARTQ <u>SERE</u> QQVGGSGAGGPYLGGGGCNG <b>305</b> ...	1578,6	64,636	16	576
>Jcr4S00011.10	<b>1</b> MLL <u>SPGH</u> SPRQLSSPSPSHNPENSLQTSNK <b>30</b> ...	1249,3	63,554	12	568
>Jcr4S01102.20	... <b>378</b> ETIAEIAQTTKEL <u>IIGQDKPSAGYEE</u> HERK <b>407</b> ...	1543,6	43,348	14	407
>Jcr4S00300.40	... <b>327</b> QISAQTFNDVGRLDDEGVTHL <u>KVV</u> HRS DNK <b>356</b>	1310,4	39,192	12	356
>Jcr4S00349.40	... <b>37</b> LATSKPATIANVLQ <u>IDVP</u> DTGLLASTEPPKG <b>68</b> ...	828,9	19,189	8	175
>Jcr4S15842.20	... <b>298</b> LCPMVWQMEDMG <u>CMGGV</u> VLAETIRSLDRAA <b>685</b> ...	465,5	96,301	5	848
>Jcr4S00661.30	... <b>13</b> EDRETSPGIFFG <u>GPALPK</u> KPPERDLVKPPG <b>42</b> ...	581,7	10,968	6	102
>Jcr4S00279.60	... <b>479</b> QVSREDARRLKENRQEVT <u>LF</u> SPGTRPSSRN <b>508</b>	1205,3	57,130	11	508



Por fim, a ferramenta de predição de estruturas protéicas, I-TASSER, a qual se baseia no paradigma “sequência para estrutura e função”, evidenciou que a sequência codificante de 88 resíduos de *J. curcas* (Jcr4U28965.20) e o seu respectivo peptídeo (APTLSGGSVPRDAD) possuem estruturas desordenadas, com três pequenos segmentos de hélice presentes na primeira estrutura (Figura 7A). Segundo CHAKRABORTEE e colaboradores (2010), quase todas as proteínas de embriogênese tardia (LEA) também são proteínas intrinsecamente desordenadas (PID), ou seja, elas são totalmente ou em grande parte desestruturadas em seu estado nativo. Essas proteínas (LEA) representam, na verdade, um grupo de proteínas altamente hidrofílicas, as quais se acumulam durante os estágios tardios de maturação da semente (BATTAGLIA *et al.*, 2008).

As similaridades entre sequências, alcançadas pelo uso da espectrometria de massas, sequenciamento *de novo* e uso de bancos de dados refletem o direcionamento correto das estratégias empregadas neste estudo, tanto para buscar e sequenciar peptídeos com propriedades desconhecidas, como evidenciar aspectos evolutivos e estruturais relacionados ao papel fisiológico destas moléculas nas sementes (FRANCO, 2011; MIERNYK e HAJDUCH, 2011).



**Figura 7** – Representação esquemática da localização do peptídeo de sequência APTLSGGSVPRDAD na sequência codificante de nº de acesso Jcr4U28965.20 de *J. curcas* **(A)** Predição estrutural a partir da sequência Jcr4U28965.20 **(B)** **(C)** e do peptídeo APTLSGGSVPRDAD.

## 5. CONCLUSÃO

A extração e o fracionamento de peptídeos das sementes de *J. curcas* possibilitou a obtenção de uma fração enriquecida, a qual do ponto de vista cromatográfico não se mostrou ser muito complexa. Esta fração pode ser analisada por espectrometria de massas sem a necessidade de procedimentos analíticos adicionais de separação, o que permitiu a obtenção de vinte e uma sequências primárias de aminoácidos que foram deduzidas por sequencianamento *de novo* manual e automático. Este fato também pode ser constatado pela análise do íon de  $m/z$  671,79 da fração 1, o qual apresentou os mesmos íons fragmentos, embora com intensidade de sinal diferentes nos três espectros de fragmentação analisados.

As sequências peptídicas foram confirmadas, sem ambiguidades, através de buscas no banco de sequências codificantes do genoma de *Jatropha*. Uma destas sequências peptídicas (APTLSGGSVPRDAD) foi utilizada para estudos de homologia e predição estrutural e, ainda, forneceu indícios do possível papel fisiológico daquela sequência na semente.

As sequências aqui descritas abrem perspectivas para a descoberta de novos peptídeos na espécie em estudo, bem como para a síntese química de moléculas com aplicações biotecnológicas. Além disso, faz-se necessário destacar que as propriedades biológicas de tais sequências representam um novo desafio no estudo e caracterização dos peptídeos de *J. curcas*.

# **Capítulo III**

**Estudos estruturais e biológicos  
de dois peptídeos sintéticos  
análogos**

# 1. Introdução

## 1.1 Estudos com peptídeos sintéticos

Os peptídeos são biomoléculas unidas covalentemente por, pelo menos, dois resíduos de aminoácidos, mas podem ser formados por até dezenas de resíduos, através de uma ligação amida substituída, chamada também de ligação peptídica (LEHNINGER, 2007).

Segundo MACHADO e colaboradores (2004), se comparados a outras biomoléculas, os peptídeos são quimicamente (amidados, fosfatados, esterificados, fosforilados, sulfatados, lineares, parcialmente ciclizados, cíclicos, com a presença de D-aminoácidos, ácido piroglutâmico e aminoácidos não usuais) e funcionalmente muito diversificados. Os peptídeos podem atuar como fitohormônios na defesa vegetal, como substratos de proteases, inibidores enzimáticos, nos processos de sinalização e muito mais. Já SEWALD e JAKUBKE (2002) destacam como principais diferenças entre peptídeos e proteínas, que os primeiros são mais solúveis em meio aquoso, flexíveis e estáveis, além do que, de maneira geral, não possuem estrutura terciária bem definida em meio aquoso.

Todo esse conhecimento sobre peptídeos começou a ser acumulado ainda na década de 50, quando vários peptídeos ativos foram descobertos e tiveram suas estruturas químicas determinadas, como o ciclolinopeptídeo A da espécie vegetal *Linum usitatissimum* (Linaceae) que apresenta atividade imunossupressiva (TAN e ZHOU, 2006). Ainda segundo MACHADO e colaboradores (2004), daí surgiu o grande interesse pelo isolamento, purificação, identificação e quantificação dos peptídeos, mas ao mesmo tempo deparou-se com a necessidade de sintetizar estas moléculas e seus análogos (derivados com modificações pontuais), pois as quantidades presentes em fontes naturais eram muito pequenas ( $10^{-6}$  a  $10^{-2}\%$  dependendo da fonte vegetal e do método de isolamento), o que dificultava e dificulta até hoje o acúmulo de material para a realização de estudos posteriores, mesmo com toda a sofisticação dos métodos analíticos disponíveis (LY e WASINGER, 2011).

Com o advento da síntese de peptídeos, os papéis biológicos e as estruturas químicas destas moléculas puderam ser amplamente estudados e este conhecimento, pode e está sendo aplicado principalmente no desenvolvimento de novas drogas (THORSTHOLM e CRAIK, 2011). Atualmente as três principais estratégias para a síntese de peptídeos são: síntese via tecnologia do DNA recombinante, síntese enzimática e a síntese química (RUIZ, 2003). Essas três estratégias estão sucintamente descritas na Figura 1.

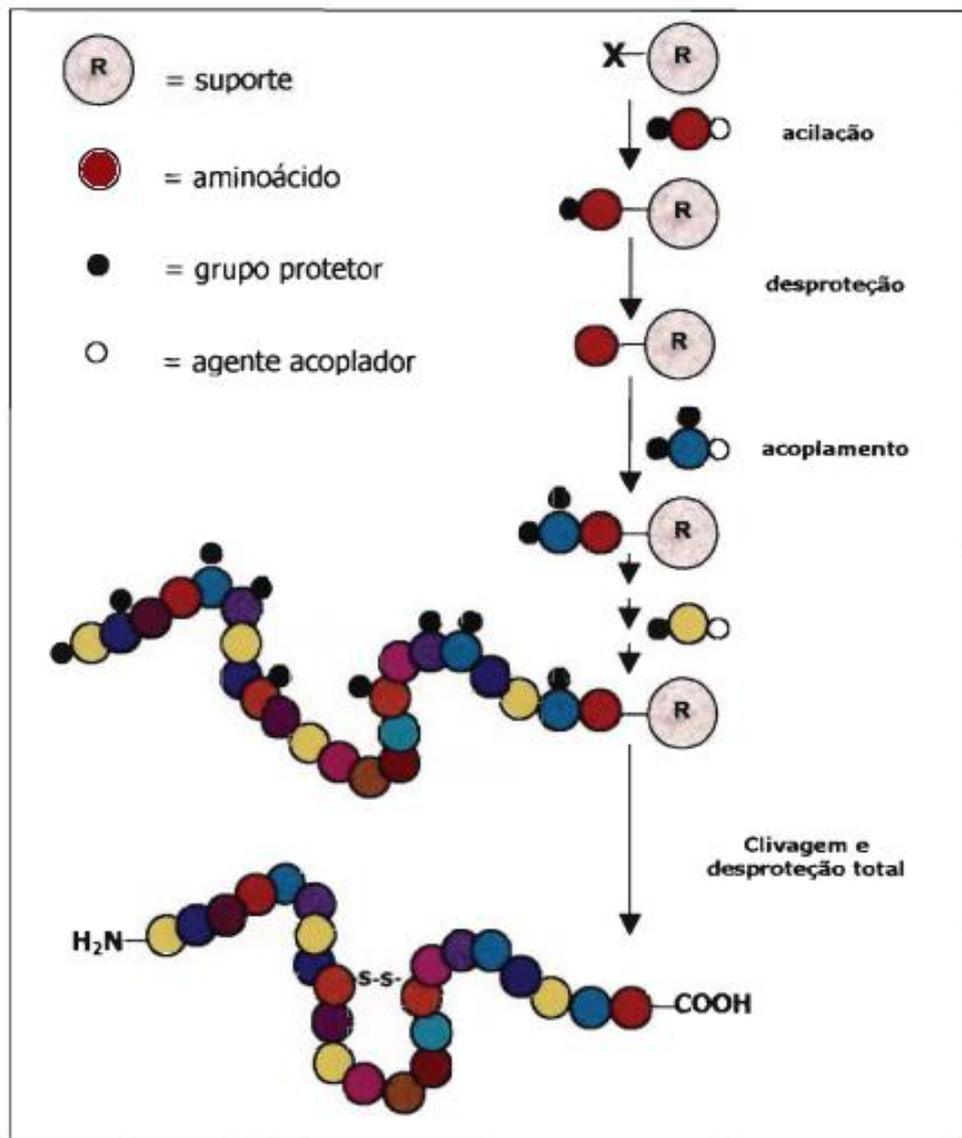
Nome específico do tipo de tecnologia	Isolamento de peptídeos de um organismo	Tecnologia I		Tecnologia II	
		Síntese química		Síntese biológica	
		Ia	Ib	IIa	IIb
		Síntese de peptídeos em fase sólida	Síntese químico-enzimática	Expressão recombinante em plantas	Expressão recombinante em bactérias
Vantagens	Um organismo produz vários tipos de peptídeos	Fácil para fazer modificações químicas	Cadeia pode ser montada com a química Fmoc	Produção em larga escala	Possibilidade de fazer bibliotecas de peptídeos
	Obtenção de várias sequências nativas	Fácil para incorporar aminoácidos não usuais	Fácil para fazer modificações químicas	Peptídeos geneticamente modificados	Possível marcar com <sup>15</sup> N e <sup>13</sup> C
Desvantagens	Somente sequências nativas produzidas	Restrita a química Boc	Requer um sítio de ligação à enzima	Tecnologia ainda a ser bastante desenvolvida	Requerem resíduos de cisteína N-terminal e grupos α-tioéster no C-terminal
	Purificação complexa e difícil	Pode ser um desafio obter conformações nativas	Dois passos no processo de ligação		

**Figura 1** – Vantagens e desvantagens das três principais estratégias utilizadas para a obtenção de peptídeos. Fonte: THORSTHOLM e CRAIK, 2011.

A síntese química é o método mais utilizado e desde que a primeira síntese química da molécula de insulina ocorreu, ainda no início da década 60, o que demorou mais de dois anos para ser concluída (SEWALD e JAKUBKE, 2002), esta técnica foi muito aperfeiçoada. A praticidade da técnica atualmente deve-se à velocidade de síntese, rendimentos de quase 100% (dependendo do tamanho da cadeia), à síntese de moléculas cada vez maiores, alto grau de pureza e ao custo, pois tem se tornado extremamente acessível (MACHADO *et al.*, 2004). Atualmente o custo de 1 mg de um resíduo de aminoácido, com mais de 92% de pureza custa, em

média, três reais produzido, por exemplo, pela GenOne Biotechnologies, Rio de Janeiro, Brasil.

A síntese química é caracterizada pelo uso de reagentes químicos para ativar a carboxila do aminoácido que funcionará como o doador de grupo acila para a formação da ligação peptídica. Esta sofrerá o ataque nucleofílico do grupo amino de outro aminoácido (RUIZ, 2003).



**Figura 2** – Esquema geral da síntese química em fase sólida de peptídeos. Fonte: RUIZ, 2003.

Uma vantagem desta metodologia é a possibilidade de uso de aminoácidos, usuais, não usuais e modificados (TAN e ZHOU, 2006). Uma desvantagem é que ela requer a proteção total das cadeias laterais reativas dos aminoácidos, o que mesmo assim, não impede que reações secundárias ocorram durante as etapas do processo. Na síntese química em fase sólida (SQFS), o alongamento do peptídeo é realizado sobre um suporte polimérico que é insolúvel nos meios reacionais, o que é diferente da síntese em solução (síntese clássica), onde reagentes e produtos se misturam com o meio reacional (SEWALD e JAKUBKE, 2002).

Um aspecto interessante da SQFS é a possibilidade de estudos estruturais entre diferentes arranjos peptídicos. Os peptídeos lineares, por exemplo, são de maneira geral muito flexíveis, o que gera muita heterogeneidade conformacional em solução, a não ser que esteja presente um arranjo secundário particularmente estável, como hélices e folhas betas (ALTEI, 2010). Assim, estudos conformacionais são frequentemente conduzidos com moléculas cíclicas, que apresentam uma grande homogeneidade conformacional, especificidade de interação além de estabilidade (PICCHI *et al.*, 2009).

Um exemplo disso é que, recentemente, CHATTERJEE e colaboradores (2012) descreveram um protocolo de SQFS de peptídeos cíclicos N-metilados para tais propósitos. Esses autores mostraram que essa é uma técnica poderosa para modular propriedades físico-químicas dos peptídeos, através da qual um ou mais grupos metilas são introduzidos nas ligações peptídicas. Juntamente com a ciclização, essa técnica confere propriedades farmacocinéticas especiais, como estabilidade metabólica, permeabilidade a membranas e biodisponibilidade para a ingestão oral. Por outro lado, as diferenças na função biológica desempenhadas pelos arranjos cíclicos e lineares têm sido alvo de estudos. MONROC e colaboradores (2006a), por exemplo, através de SQFS mostraram que peptídeos catiônicos lineares foram inativos frente a três cepas bacterianas que atacam plantas de interesse econômico (*Erwinia amylovora*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Pseudomonas syringae*). Já os análogos cíclicos foram muito ativos contra duas cepas (*X. vesicatoria* e *P. syringae*) e em concentrações baixas, 6,25 e 12,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Esse mesmos autores (MONROC *et al.*, 2006b) construíram duas “bibliotecas” de decapeptídeos, com mais de 56 análogos, através de SQFS,

baseados nas sequências c(LysLeuLysLeuLysPheLysLeuLysGln) e c(X<sup>1</sup>X<sup>2</sup>X<sup>3</sup>X<sup>4</sup>LysPheLysLysLeuGln), sendo X Lisina e/ou leucina. Esses análogos foram usados para fazer um *screening* frente às mesmas cepas bacterianas utilizadas no estudo anterior. Os autores puderam observar inúmeros peptídeos com atividade antibacteriana frente às três cepas com concentrações variando de 1,6 a 25 µM.

BARBOSA e colaboradores (2011), estudando a labaditina, um peptídeo cíclico encontrado no gênero *Jatropa*, também mostraram resultados similares utilizando análogos sintéticos (linear e sintético). O análogo cíclico foi capaz de reduzir em 25% a viabilidade celular de cepas gram-positivas de *Streptococcus mutans* (concentração de 5 µM), enquanto a molécula linear não mostrou efeito algum.

Atualmente, existem três trabalhos descrevendo estudos com peptídeos sintéticos oriundos do gênero *Jatropa*, o primeiro deles é com um peptídeo cíclico, com oito resíduos, só que proveniente da espécie *J. curcas* (ALTEI *et al.*, 2008). O segundo é com a labaditina, um peptídeo cíclico de dez resíduos de aminoácidos, citado no parágrafo anterior (BARBOSA *et al.*, 2011). E o terceiro e último estudo é com um peptídeo cíclico de oito resíduos de aminoácidos da espécie *J. ribifolia* (FERREIRA *et al.*, 2012)

Todos os estudos descritos acima mostram que as plantas podem contribuir com um número quase imensurável de novas sequências peptídicas, que podem ser usadas como protótipos para diversos estudos, principalmente na indústria farmacêutica. Essa grande disponibilidade e variedade de alvos a serem estudados, bem como nossa rica flora e a imensidão de combinações que podem ser obtidas por SQFS podem ser utilizadas para a construção de “bibliotecas” contendo sequências peptídicas como o Cybase (Fonte: <http://www.cybase.org.au/>).

No presente trabalho, a sequência APTLSGGSVPRDAD, referente ao íon de m/z 671,79, a qual está inserida dentro de um domínio conservado tipo LEA, foi utilizada como base para a síntese, por meio de SQFS, de dois análogos sintéticos, um linear e outro cíclico. De posse destes peptídeos, e através de estudos de caracterização estrutural e biológica, seria possível estabelecer diferenças entre estas duas moléculas a ponto de justificar a síntese de ambas?

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente capítulo foi comparar as propriedades físico-químicas, estruturais e biológicas de dois peptídeos sintéticos análogos.

### 2.1 Objetivos específicos:

1. Comparar propriedades como o estado de carga sob diversos valores de pH;
2. Comparar propriedades como tempo de retenção e padrão de fragmentação por espectrometria de massas;
3. Comparar a mobilidade iônica;
4. Avaliar as estruturas secundárias por dicroísmo circular sob condições nativas, efeito da variação de temperatura e presença de TFE;
5. Avaliar as diferenças quanto aos deslocamentos químicos entre os hidrogênios e carbonos;
6. Avaliar a atividade hemolítica frente a hemácias humanas;
7. Avaliar a citotoxicidade frente a linhagens celulares tumorais *in vitro*;
8. Avaliar a atividade frente a germinação de esporos e ao crescimento de fungos fitopatogênicos em meio líquido;
9. Avaliar a capacidade de inibição proteolítica frente a proteases serínicas e cisteínicas;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### *3.1.1 Reagentes*

Todos os solventes orgânicos usados foram de grau analítico. Acetonitrila (grau HPLC) e ácido trifluoroacético (TFA) foram obtidos da SIGMA Aldrich Co. (São Paulo, Brazil). Os meios de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e Yeast Peptone Dextrose (YPD) foram obtidos da DIFCO e Himedia, respectivamente. Tetrametilsilano (TMS) e água deuterada foram obtidos da TEDIA Brasil (Rio de Janeiro, Brazil).

##### *3.1.2 Obtenção dos peptídeos sintéticos*

Os dois análogos sintéticos utilizados neste trabalho, um linear (1342,44 g/mol) e outro cíclico (1324,44 g/mol), foram projetados com base na sequência APTLSGGSVPRDAD do íon de m/z de 671,79. Foram obtidos 40 mg de cada peptídeo, com mais de 90% de pureza, e os mesmos foram adquiridos da empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brazil).

#### 3.2 Métodos

##### *3.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa*

Esta metodologia seguiu rigorosamente os mesmos procedimentos descritos no subitem 3.2.4 (Capítulo 2), sendo que os peptídeos foram dissolvidos na razão de 1:4 (m/v).

### 3.2.2 *Análise por espectrometria de massas*

Esta metodologia seguiu rigorosamente os mesmos procedimentos descritos no subitem 3.2.6 (Capítulo 2), sendo que os peptídeos foram dissolvidos na razão de 1:500 (m/v).

### 3.2.3 *Mobilidade iônica*

Os peptídeos foram dissolvidos para uma concentração final de 5 µg/mL, utilizando uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%. O espectrômetro de massas Synapt HDMS foi utilizado para analisar as formas e conformações dos peptídeos utilizando um fluxo de 10 µL/min para ESI(+)-MS com as seguintes condições: capilar 4,0 kV, pressão do gás 0,3 psi, cone 50 V, extrator 4 V. O gás para IMS foi o nitrogênio a um fluxo de 24 mL/min, a velocidade e a altura da onda foram operadas a 300 m/s e 8 V, respectivamente. O controle do instrumento e a análise dos dados dos experimentos usando Q-TOF e Synapt HDMS foram realizados utilizando o software MassLynx V3,5 e V4,1 software (Waters Corp., Manchester, UK), respectivamente (ABDELNUR, 2010).

### 3.2.4 *Dicroísmo circular*

Os espectros de DC dos peptídeos linear e cíclicos (7 mM), em solução aquosa, foram obtidos no Instituto de Luz Síncronon (ISA Síncronon), da Universidade de Aarhus, na Dinamarca. As medições foram obtidas na faixa de comprimento de onda de 280-175 nm, em intervalos de 1 nm e tempo de parada de 2 s (25 °C), utilizando uma célula de quartzo desmontável suprasil de caminho óptico de 0,0016 cm (Hellma Ltda, Reino Unido).

Os espectros foram processados usando o software CDTools, fazendo a média das três verificações realizadas, subtraindo a linha de base (linha de base

consistindo de água pura), suavizando com o filtro Savitsky-Golay e calibrando com um espectro padrão de ácido sulfônico feito no início da coleta dos dados. Os espectros processados finais de SRCD foram expressos em unidades de épsilon delta usando um peso médio de resíduo de 112.

#### *Efeito da temperatura e do trifluoretanol (TFE)*

O dicroísmo circular convencional foi utilizado para avaliar o efeito da temperatura e do trifluoretanol (TFE) na conformação dos peptídeos (150 µM) em solução aquosa. Os espectros de CD foram obtidos em um espectropolarímetro J-815 (JASCO, Tóquio, Japão), ao longo dos comprimentos de onda de 280-185 nm, com um intervalo de 1 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de 0,1 cm retangular.

As análises sob efeito da temperatura foram realizadas na faixa de temperatura de 15 a 85 °C, em intervalos de 10 °C, com um tempo de equilíbrio de 5 minutos, a cada passo, recolhendo três verificações repetidas a cada temperatura. Após o aquecimento, um espectro adicional a 25 °C foi recolhido para verificar se o processo de desnaturação térmica foi reversível. As magnitudes dos picos a 198 e 222 nm foram representadas graficamente em função da temperatura, e um ajuste linear foi produzido no programa Origin 8.5. Além disso, ambas as versões (linear e cíclica) do peptídeo (150 µM) foram incubadas com 50% e 100% de TFE (v/v) a 25 °C. Os respectivos espectros de CD foram tratados como descrito anteriormente.

#### *3.2.5 Ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C*

Esta metodologia seguiu rigorosamente os mesmos procedimentos descritos no subitem 3.4.2 (Capítulo 1), sendo que os peptídeos foram dissolvidos em água deuterada.

### 3.3 Ensaio biológicos

#### 3.3.1 *Atividade hemolítica*

Os peptídeos sintéticos foram dissolvidos em água ultrapura na concentração de 1mM. Uma alíquota de 100  $\mu$ L de cada fração foi adicionada a 100  $\mu$ L de PBS, e uma diluição seriada usada para determinar a concentração final que variou de 200 a 0,7  $\mu$ M. O restante da metodologia seguiu rigorosamente os mesmos procedimentos descritos no subitem 3.6.1 (Capítulo 1)

#### 3.3.2 Ensaio de citotoxicidade frente a linhagens Celulares

Esta metodologia seguiu rigorosamente os mesmos procedimentos descritos no subitem 3.6.2 (Capítulo 1), tanto para a conservação e manutenção das células, como para a realização do ensaio. Entretanto, as linhagens celulares utilizadas foram as seguintes: HCT-116 (colón humano), Ovc8-8 (ovário humano) e HL-60 (leucemia humana).

#### 3.3.3 *Atividade de inibição proteolítica*

##### Atividade inibitória de papaína

30  $\mu$ L de papaína (dissolvida em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6) foi incubada com 40  $\mu$ L de uma solução contendo DTT 3 mM e EDTA 2 mM, no tampão citado acima, por 10 min. Em seguida foram adicionados 100  $\mu$ L das soluções de PL e PC (1 mg/mL) diluídas em água destilada sobre a solução por 30 min a 37 °C, totalizando um volume final de 500  $\mu$ L. Após o tempo de incubação foram

adicionados 200  $\mu\text{L}$  de Azocaseína 1% por 60 min a 37 °C. A reação foi parada ao adicionar 300  $\mu\text{L}$  de TCA 20%. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 10.000 x *g* a 4 °C. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  foi retirada e adicionada a 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 M para a visualização do resultado do ensaio colorimétrico. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 440 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que incrementa a absorbância em 0,01. Os ensaios foram realizados em triplicatas e o inibidor específico de protease cisteínica E-64 0,18 mM foi usado como controle positivo. \**p* < 0,05 indica diferença estatística quando comparado ao grupo controle PAP (n=3, ANOVA teste Dunnett's).

#### Atividade inibitória de tripsina

Tripsina (20  $\mu\text{L}$ ) foi incubada com 40  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo DTT 3 mM e EDTA 2 mM por 10 min. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  das soluções de PL e PC (1 mg/mL) diluídas em água destilada sobre a solução por 30 min a 37 °C, totalizando um volume final de 500  $\mu\text{L}$ . Após o tempo de incubação foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de azocaseína 1% por 60 min a 37 °C. A reação foi parada ao adicionar 300  $\mu\text{L}$  de TCA 20%. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 10.000 x *g* a 4 °C. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  foi retirada e adicionada a 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 M para a visualização do resultado do ensaio colorimétrico. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 440 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que incrementa a absorbância em 0,01. Os ensaios foram realizados em triplicatas e o inibidor específico de protease serínica PMSF 5 mM foi usado como controle positivo. \**p* < 0,05 indica diferença estatística quando comparado ao grupo controle TRIP (n=3, ANOVA teste Dunnett's).

### 3.3.4 Ensaios antifúngicos

#### Fungos e cultivo de fungos

Os fungos fitopatogênicos, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*, foram obtidos da micoteca mantida pelo Laboratório de Proteínas laticíferas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Brasil.

O cultivo dos fungos foi realizado em 25 mL de Sabouraud Dextrose Agar (SDA) estéril, distribuídos em placas de Petri (100 x 15 mm), mantidas em câmara de germinação do tipo B.O.D., a  $27 \pm 2$  °C, umidade de 70% e fotoperíodo de 12 horas (luz/escuro). Os fungos foram renovados mensalmente, em câmara de fluxo laminar contendo chama de fogo, através da transferência de *pellets* de uma placa contendo os fungos para outra placa contendo apenas meio de cultura SDA, como descrito por Freitas e colaboradores (2011).

#### Obtenção da Suspensão de Esporos

A obtenção das suspensões de esporos foi realizada segundo Melo e colaboradores (2005). Após os fungos terem tomado todo o diâmetro da placa de Petri, após 15 dias do repique da cultura fresca, essas foram abertas em câmara de fluxo laminar e 10 mL de água destilada estéril foram adicionados aos meios de culturas contendo os respectivos fungos. Após a liberação dos esporos com o auxílio de uma alça de Drigalski, as suspensões obtidas foram filtradas em malhas finas de nylon estéreis. Para a realização dos ensaios de inibição de crescimento e da germinação de esporos, as suspensões (filtrado final) contendo os esporos foram ajustadas para uma concentração final de  $2 \times 10^5$  esporos/mL. Os esporos foram contados com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio de luz (Olympus System Microscope BX 60).

### *Ensaio de inibição do crescimento fúngico em meio líquido*

Os ensaios de inibição do crescimento foram realizados conforme a metodologia descrita por FREITAS e colaboradores (2011). Os ensaios foram desenvolvidos em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato (estéreis) de 96 poços. Cada poço continha 10  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de esporos ( $2 \times 10^5$  esporos/mL) e 90  $\mu\text{L}$  de meio YPD (Yeast Peptone Dextrose). Após 16 horas na ausência de luz, a 27 °C, 100  $\mu\text{L}$  dos peptídeos (1 mg/mL) foram adicionados. Os controles negativos e positivos para inibição do crescimento foram tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, e peróxido de hidrogênio 200 mM, respectivamente. O crescimento fúngico foi monitorado através de leituras de absorbância a 620 nm, em intervalos de 12 ou 24 horas, até um total de 48 ou 72 horas, em leitora de microplacas para teste de ELISA (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences).

### *Ensaio de inibição da germinação de esporos*

O efeito dos peptídeos sobre a germinação dos esporos foi avaliado de acordo com o método descrito por Freitas e colaboradores (2011), adaptado para uso em placas de polietileno reticuladas. Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de esporos ( $2,0 \times 10^5$  esporos/mL) foi incubada com 10  $\mu\text{L}$  dos peptídeos (1 mg/mL). Como controles, foram utilizados tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 estéril e peróxido de hidrogênio 200 mM. As placas de germinação foram mantidas a 27 °C, por 24 horas, na ausência de luz, conservando a umidade do local por meio de um papel de filtro embebido de água. Decorrido o tempo de germinação, o material foi visualizado em microscópio de luz (Olympus System Microscope BX 60). Foram considerados germinados os esporos que apresentaram tubo germinativo de, ao menos, duas vezes o seu comprimento.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese química de análogos sintéticos lineares e cíclicos a partir de um peptídeo de sementes de *J. curcas*.

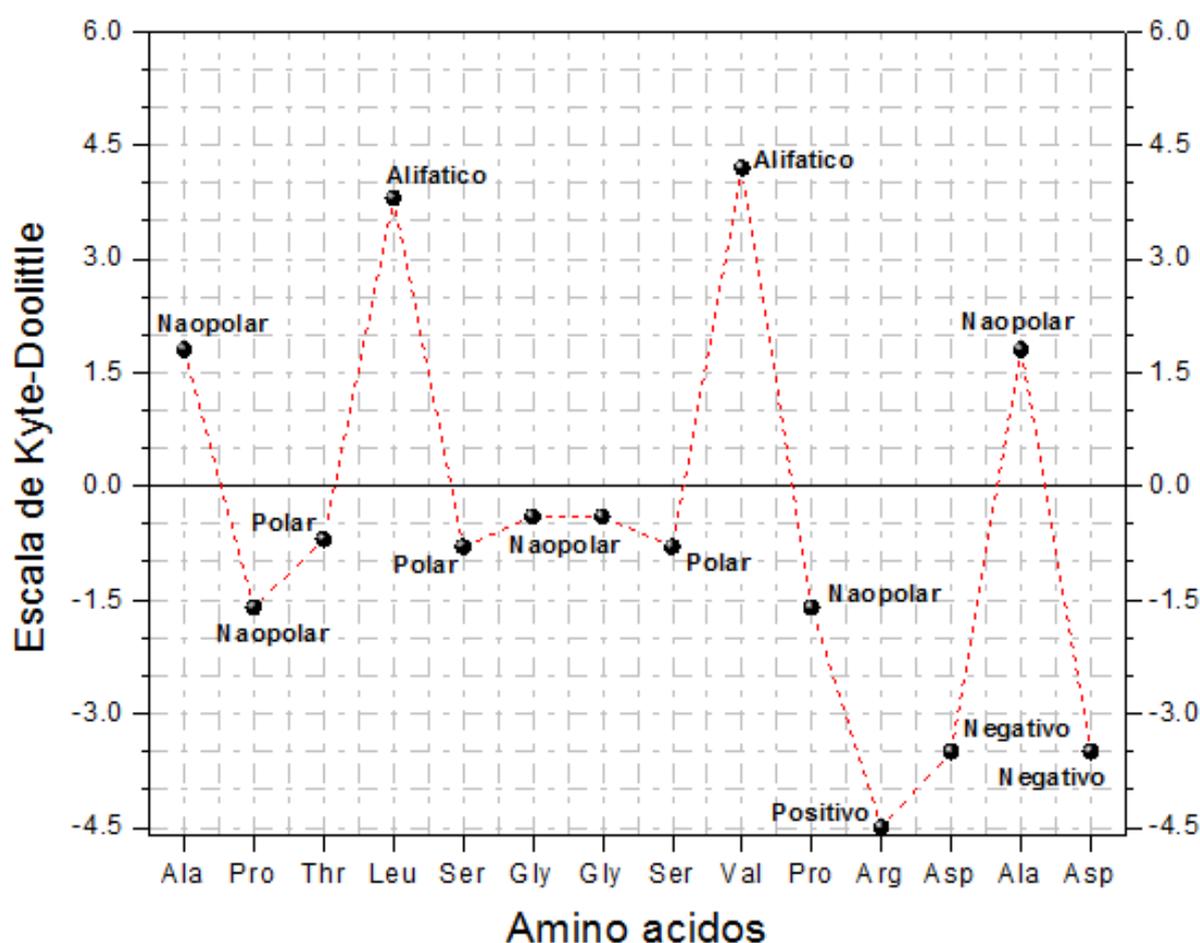
Através de uma análise *in silico* da sequência APTLSGGSVPRDAD, referente ao íon de m/z 671,79, obtido a partir de sementes de *Jatropha curcas*, foi possível obter informações a respeito das propriedades físico-químicas desta sequência, tais como estado de carga, solubilidade em água e ponto isoelétrico (Tabela 1). As propriedades *in silico* da sequência APTLSGGSVPRDAD são referentes à cadeia peptídica na sua forma aberta (linear). Já para a cadeia peptídica fechada (cíclico), o mesmo tipo de análise não pôde ser feita, pois as ferramentas de bioinformática de predição de propriedades físico-químicas, geralmente, não levam em consideração esse tipo de arranjo (cíclico).

**Tabela 1** – Propriedades físico-químicas da sequência APTLSGGSVPRDAD referente ao íon de m/z 671,79, obtida a partir de sementes de *J. curcas*.

Propriedades físico-químicas	
Número de resíduos	14
Massa molecular	1342,44 g/mol
Ponto isoelétrico	pH 3,88
Carga líquida pH 7	-1
Solubilidade estimada	Boa solubilidade em água

A ferramenta de busca localiza-se no sítio da web da innovagen (peptide-property-calculator.asp)

Este peptídeo é formado por quatorze resíduos de aminoácidos e apresenta: aminoácidos com carga negativa (*dois ácidos aspárticos*) e positiva (*uma arginina*); cadeia lateral apolar (*alanina, glicina, valina, prolina e leucina*); além de dois aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas (*serina e treonina*). A presença e distribuição destes aminoácidos se refletem na natureza hidrofílica da molécula, apesar da mesma possuir mais de 50% de resíduos hidrofóbicos (Figura 3). Como resultado, esse peptídeo de massa molecular de 1342,44 g/mol, apresenta uma carga líquida em pH 7 de -1, além de boa solubilidade em água (Tabela 1).



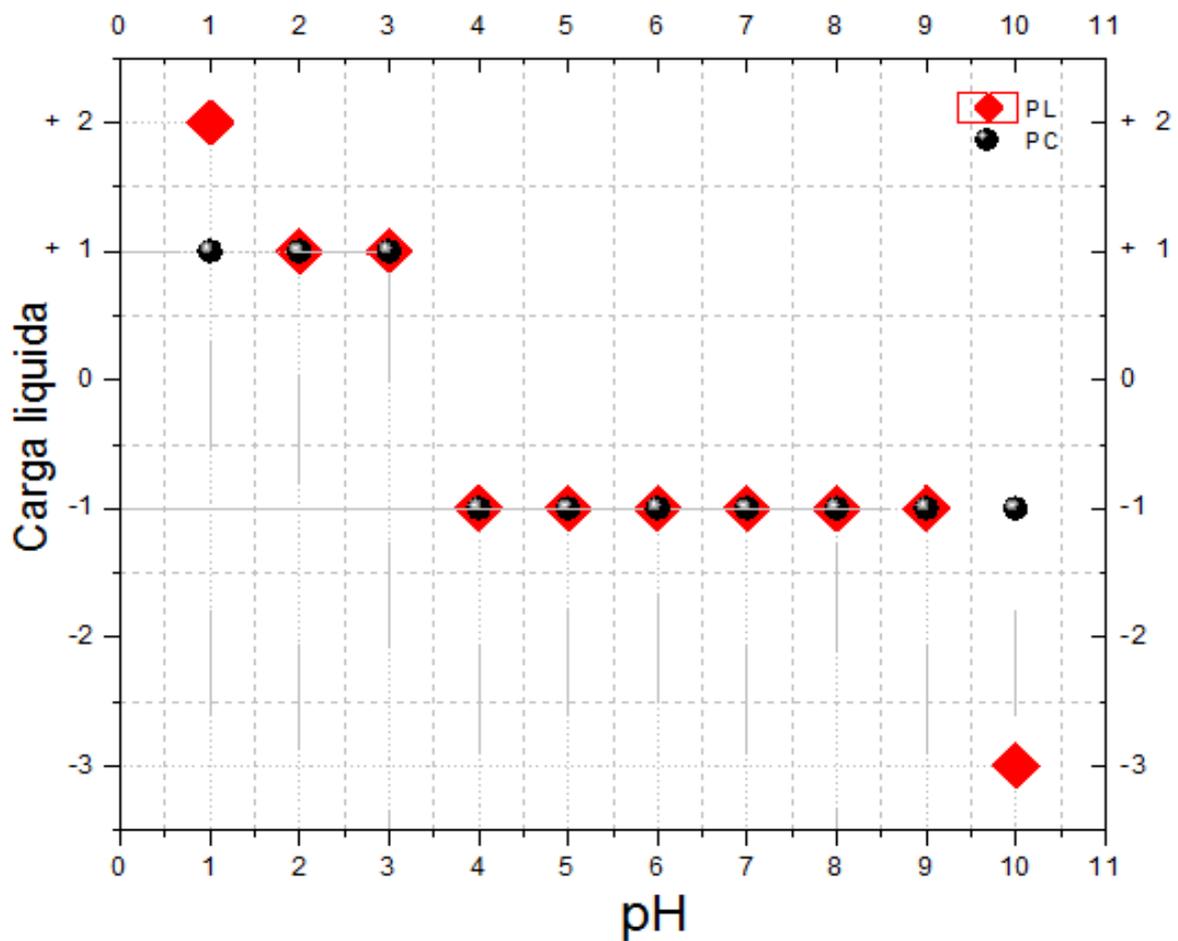
**Figura 3** - Escala de hidrofobicidade baseada nas propriedades das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da sequência APTLSGGSVPRDAD.



## 4.2 Análise do estado de carga dos peptídeos sintéticos em função do pH

A análise da variação do estado de carga líquida do peptídeo linear (PL) e do peptídeo cíclico (PC) frente a diferentes valores de pH, revelou que as duas moléculas apresentam o mesmo estado de carga (-1) nas faixas de pH de 4 a 9, sendo que o peptídeo cíclico ainda permanece com esse valor de carga em pH 10 (Figura 5). Esse valor de carga -1 se deve, no PL, ao somatório das contribuições de cargas dos dois resíduos de ácido aspártico (cadeias lateral e grupamento carboxiterminal) que apresentam carga negativa, além da cadeia lateral da arginina e do grupamento aminoterminal de alanina que apresentam cargas positivas. No caso do PC, a contribuição se deve ao somatório das cargas negativas das cadeias laterais de ácido aspártico que são contrabalanceadas pela carga positiva da cadeia lateral de arginina.

Esses dados mostram que, ainda que a molécula linear tenha sido mais suscetível a uma variação de carga líquida do que a molécula cíclica, uma vez que a primeira variou seu estado de carga de + 2 (pH 1) a - 3 (pH 10), do ponto de vista biológico, ambas se mostram iguais, pois é difícil encontrar variações fisiológicas de pH fora dessa faixa de 4 a 9, a qual já é muito ampla. Esses dois peptídeos apresentam intervalo de tamanho (12-100 resíduos de aminoácidos) e o conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos (50%) semelhantes a vários peptídeos antimicrobianos, porém diferem drasticamente destes, ditos geralmente catiônicos, uma vez que eles apresentam carga total entre +2 e +9 (CASTRO e FONTES, 2005). A presença de carga positiva nos peptídeos catiônicos é uma propriedade importante, uma vez que favorece o reconhecimento e a interação com a face externa das membranas biológicas que são carregadas negativamente, já o efeito contrário é o esperado, e normalmente o observado em peptídeos com carga líquida negativa (ALTEI *et al.*, 2008).



**Figura 5** – Variação da carga líquida de PL e PC em função do pH.

### 4.3 Análise por HPLC, espectrometria de massas e de mobilidade iônica de PL e PC

A análise por cromatografia de fase reversa, utilizando um gradiente variando de 100% de água até 95% de acetonitrila (ACN), revelou que a interação hidrofóbica de PL e PC com a coluna de C-18 é apenas levemente diferente, uma vez que PL e PC foram eluídos com um percentual de ACN, 27,1 e 28,2%, e tempos de retenção de 11,68 e 11,89 minutos, respectivamente (Figura 6A). Essa observação experimental mostra que o PC, por apresentar uma estrutura fechada e estar em meio aquoso, consegue expor bem menos seus resíduos hidrofílicos, o que acentua o efeito dos seus resíduos hidrofóbicos (que são maioria), uma vez que o número de conformações e a restrição estrutural dessa molécula é bem menor que do PL. Já o PL, por sua vez, além de poder expor mais seus resíduos hidrofílicos, possui as extremidades amino e carboxi terminal livre, o que também favorece uma maior polaridade da cadeia e conseqüentemente uma diminuição no número de interações hidrofóbicas com a coluna.

Já a análise por espectrometria de massas dos peptídeos intactos mostrou uma diferença de massa de 18 Da, exatamente referente à perda de uma molécula de água, a qual acontece durante a formação de uma ligação peptídica entre o resíduo amino terminal (alanina) e o carbóxi terminal (ácido aspártico) durante a ciclização via “cabeça-cauda” da molécula. O espectro de massa intacta do PL mostra a presença de dois íons,  $m/z$  de 671,75 e 1342,52, com uma e duas cargas respectivamente (Figura 6B). Já o PC, apresenta apenas o íon de  $m/z$  de 1324,54 que é referente ao estado monocarregado (Figura 6C). Apesar dos íons dos peptídeos cíclicos, via cabeça-cauda, serem comumente formados pela associação com adutores, como os metais sódio e potássio, formando os chamados íons adutores (TAN e ZHOU, 2006), não se observou a presença deste tipo de associação com o íon referente ao PC. Pode-se concluir que, levando em consideração esses dois últimos parâmetros que foram avaliados, como o tempo de retenção e a massa intacta de PL e PC, as diferenças existem, mas são bastante sutis (Figura 6D).



Por outro lado, na análise por MS/MS de PL e PC foram observadas consideráveis diferenças entre os dois padrões de fragmentação e que os peptídeos (PL e PC) não compartilharam semelhança entre si (Figura 7). No caso do PL, observa-se a presença do íon precursor, mas nota-se que este não está tão intenso quanto o íon precursor do PC. Em contrapartida, o mesmo não se pode dizer dos íons fragmentos, os quais são muito mais intensos no PL do que no PC. A fragmentação vai ocorrer sempre da mesma forma em uma molécula linear, ou seja, enquanto estiver havendo fragmentação, o íon precursor ( $m/z$  1342,5206) vai sendo clivado, gerando mais e mais fragmentos, os quais vão acumulando, enquanto sua intensidade vai diminuindo (STEEN e MANN, 2004). Evento semelhante foi observado em nossos experimentos (Figura 7A). Por outro lado, no caso de moléculas cíclicas, a fragmentação não segue um padrão bem definido como na molécula linear (Figura 6B), uma vez que a molécula não possui uma extremidade amino e nem carbóxi terminal. Após a abertura da cadeia, através da qual todas as ligações peptídicas são passíveis de ser o ponto de início da fragmentação, ocorre que é gerado o mesmo íon precursor (Figura 8). A partir desse instante a fragmentação acontece de maneira idêntica àquela observada num peptídeo linear, porém, padrões de fragmentação totalmente distintos serão observados, uma vez que as sequências são distintas, muito embora sejam formados pelos mesmos resíduos de aminoácidos (LIU *et al.*, 2009).

Isso justifica a maior intensidade do íon precursor no PC (que será sempre o mesmo) e a baixa intensidade dos íons fragmentos, os quais serão diferentes para cada sequência (Figura 7). Na verdade, o que se observa no espectro de fragmentação de um peptídeo cíclico é uma série de padrões de fragmentação superpostos, o que torna muito complexa a tarefa de se distinguir cada uma das séries b e y (MOHIMANI *et al.*, 2011).

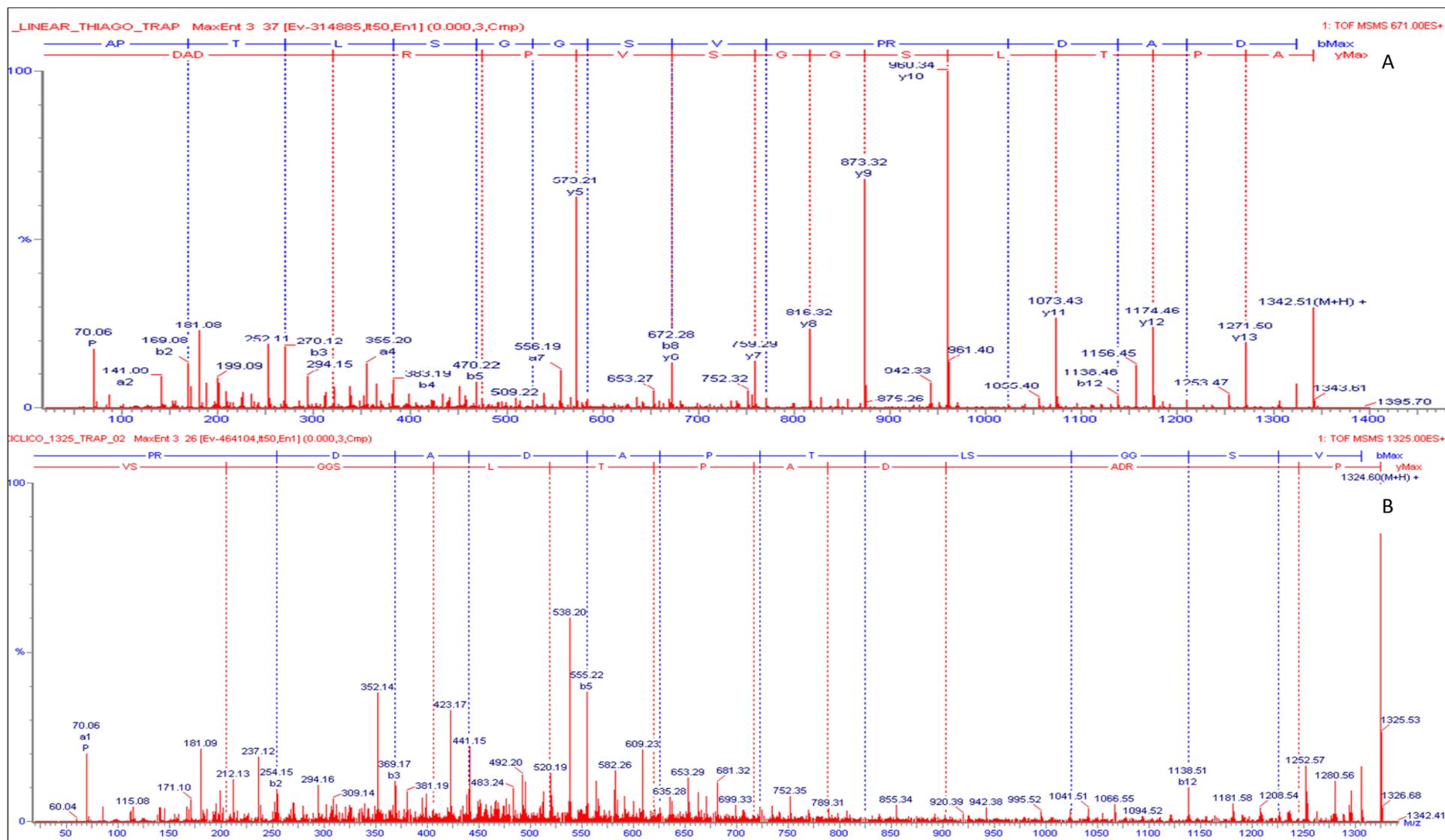


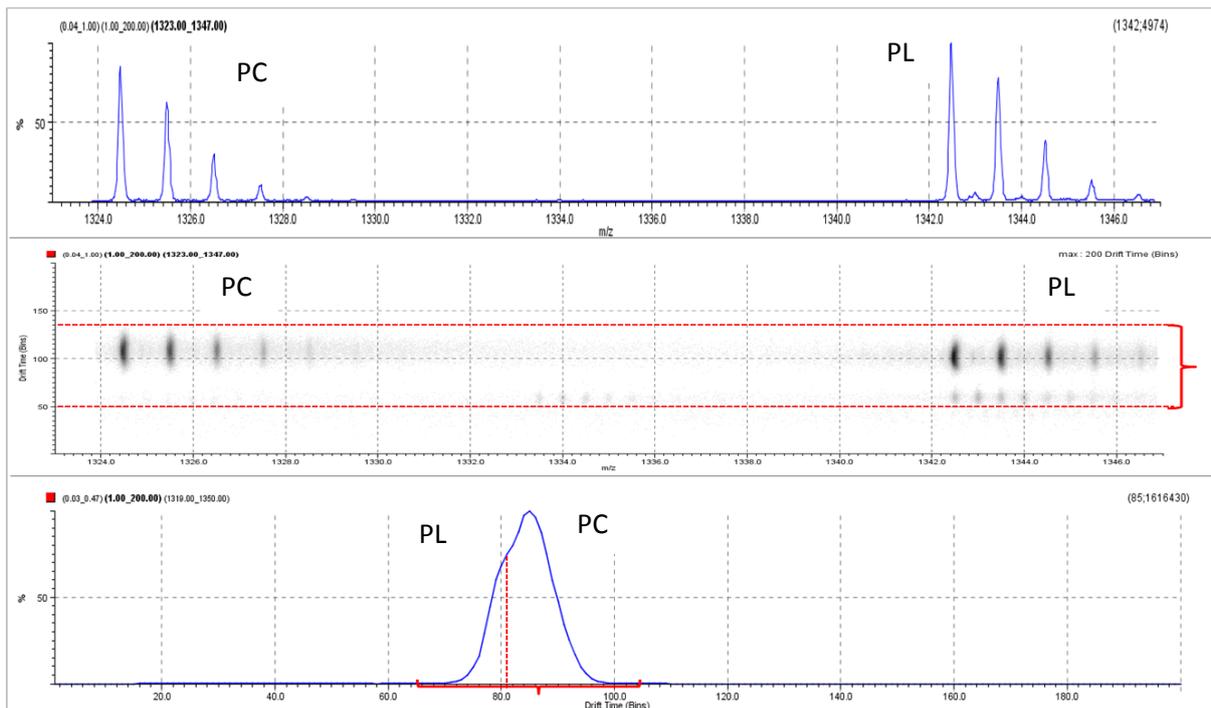
Figura 7 – Espectro de fragmentação por MS/MS. (A) íon de m/z 671,75 (PL) (B) íon de m/z 1324,54 (PC).



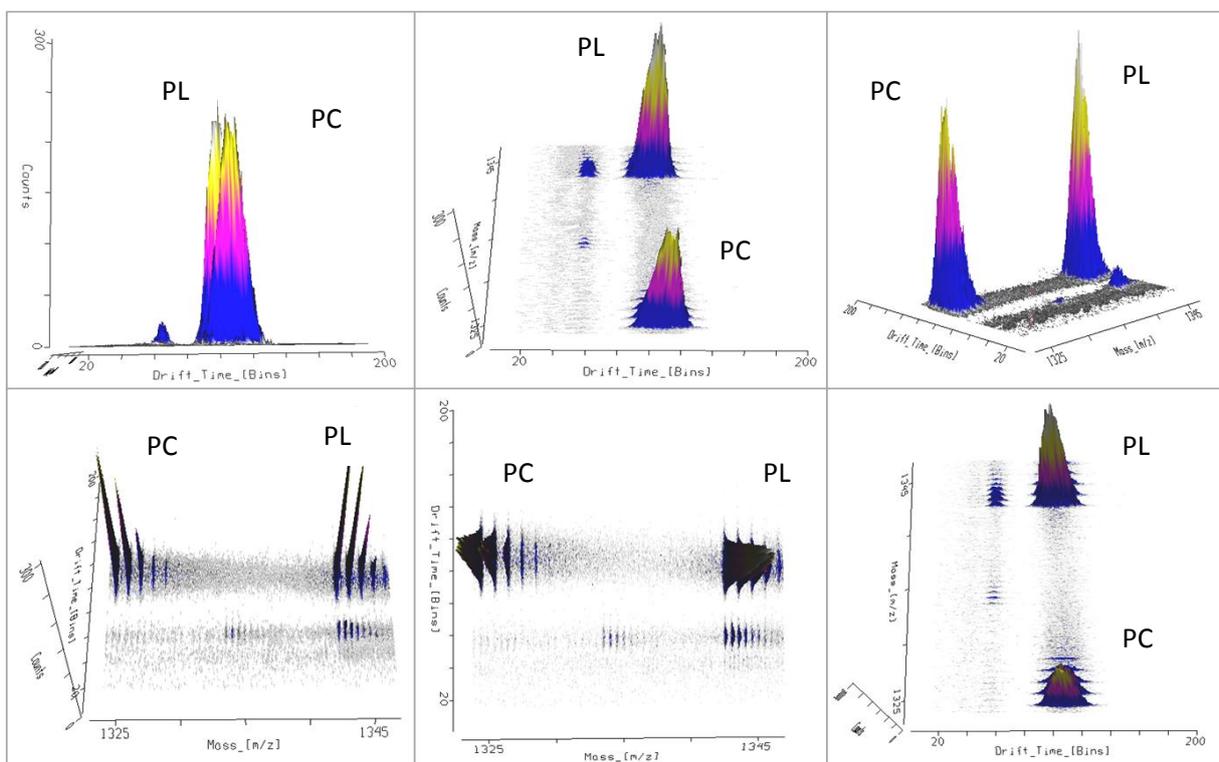
A espectrometria de mobilidade iônica (EMI), ferramenta analítica muito valiosa para os estudos estruturais e conformacionais de biomoléculas de amostras complexas (KARPAS, 2013), mostrou que PC apresenta um tempo de separação (*Drift time*) ligeiramente inferior ao tempo de PL. Essa diferença é tão sutil que não se observa uma separação bem definida dos picos referentes aos seus respectivos íons ( $m/z$  de 1324,54 e 1342,52). Na verdade, o que se observa é um pico maior ( $m/z$  de 1324,54) com um “ombro”, referente ao íon de  $m/z$  1342,52 (Figura 9).

A mobilidade iônica é peculiar para cada íon e se relaciona diretamente a fatores como carga, massa, formato e interação do íon com o gás inerte (PRINGLE *et al.*, 2007). No entanto, a grande importância da técnica reside na capacidade de separar íons do mesmo tamanho e  $m/z$ , mas que apresentam geometrias espaciais diferentes (FERNANDEZ-LIMA *et al.*, 2010). Assim, os íons com menor resistência ao fluxo de gás e, conseqüentemente, maior mobilidade, como foi PC, possuem uma velocidade de fluxo maior e chegam mais rapidamente ao analisador. Isso se reflete no aparecimento de picos no espectro de mobilidade, referente aos íons separados que chegam ao analisador de massas em tempos diferentes (Figura 10).

Levando em consideração que não existe um método universal para distinguir se um peptídeo é cíclico ou linear, RUOTOLO e colaboradores (2004) usaram a técnica de EMI para distinguir, através de pequenas diferenças conformacionais, o peptídeo natural gramidicina de seus análogos sintéticos (linear e cíclico). Já BAYKUT e colaboradores (2009) mostraram através de EMI que as diferenças de mobilidade iônica entre os peptídeos sintéticos da vasopressina (cíclico e linear) devem-se a diferenças de interação entre as secções transversais dos íons com o gás neutro, o que está diretamente relacionado com o formato da molécula. Esses estudos confirmaram que, no caso de PC, o qual apresenta uma estrutura mais compacta, a sua conformação lhe permitiu uma maior mobilidade. Já o PL, mesmo tendo uma massa maior, cuja diferença de 18 Da é quase indistinguível na EMI, possui mais de um estado de carga, o que ocasiona a formação de agregados iônicos que, por sua vez, contribui para uma menor mobilidade iônica.



**Figura 9-** Espectros de mobilidade iônica dos peptídeos PL e PC.



**Figura 10 –** Representação em 3D da relação entre o “Drift time” e a relação m/z de PL e PC sob vários ângulos.

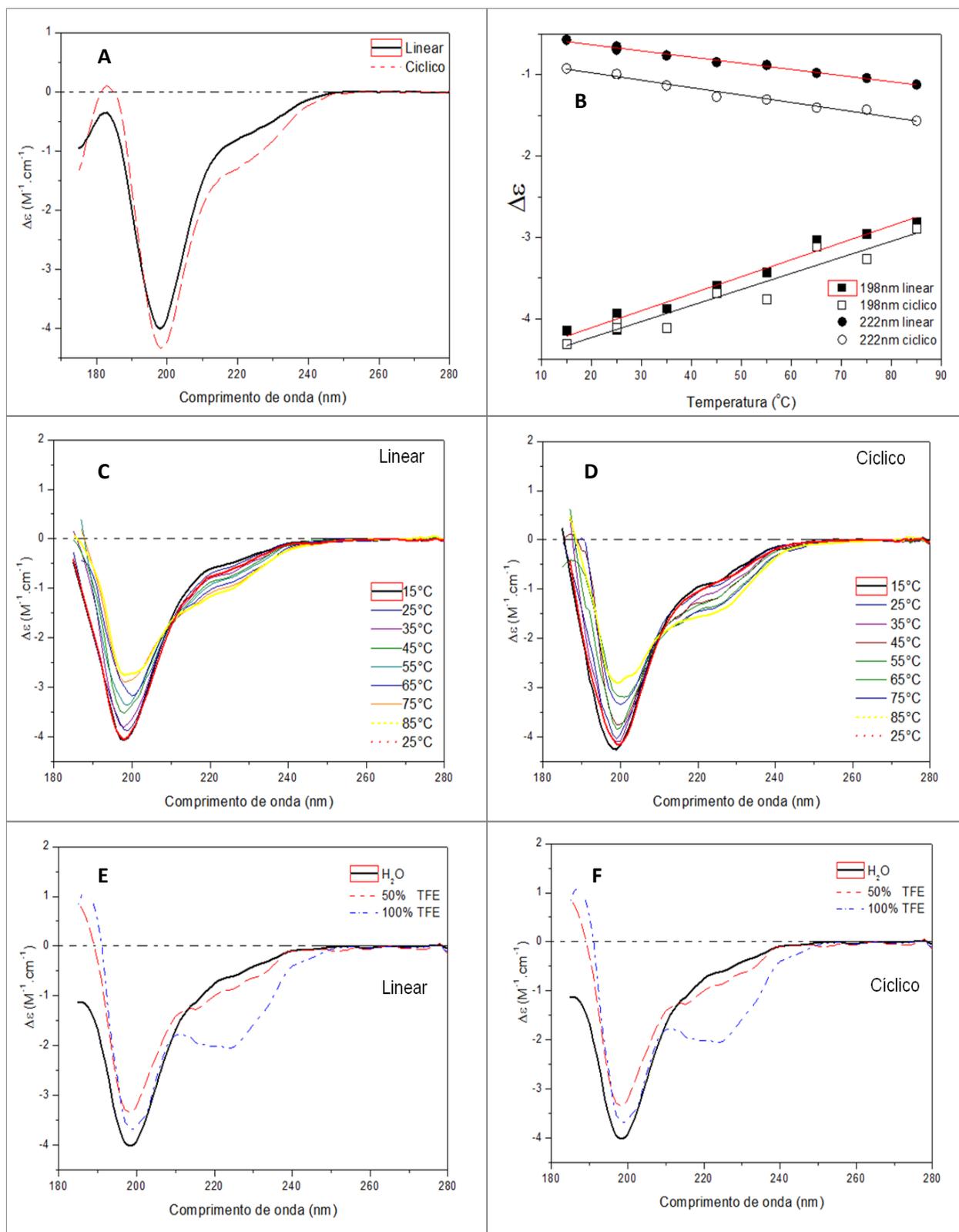
#### 4.4 Análise estrutural de PL e PC por dicroísmo circular e RMN unidimensional de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

O espectro de dicroísmo circular (DC) do peptídeo linear em solução aquosa apresentou um pico negativo intenso na região de 198 nm (Figura 11A). Esse tipo de configuração é comumente atribuído ao conteúdo estrutural desordenado (LEES *et al.*, 2004). Adicionalmente é possível observar um pequeno pico positivo na região de 184 nm, ressaltado nos espectros de DC de proteínas pertencentes ao grupo das proteínas intrinsecamente desordenadas (PIDs), tal como a MEG-14 (LOPES *et al.*, 2013) e  $\beta$ -sinucleína (UVERSKY *et al.*, 2000).

O espectro de DC do peptídeo cíclico também apresenta picos na região de 198 e 184 nm, sugerindo seu baixo conteúdo de estrutura ordenada em solução aquosa, porém o pico negativo observado em 222 nm sugere que o peptídeo cíclico não é tão desordenado quanto o peptídeo linear devido a sua maior rigidez estrutural (Figura 11A).

Mudanças conformacionais foram observadas em ambos os peptídeos, à medida que a temperatura foi elevada, indicando transições de estruturas desordenadas para ordenadas, o que são atribuídos à redução da intensidade do pico a 198 nm e uma ligeira redução do pico a 202 nm, seguido por um aumento na amplitude do pico a 222 nm (Figura 11C e 11D). Este comportamento tem sido observado para PIDs quando submetidas a análises de fusão térmica, tais como  $\alpha$ -sinucleína (UVERSKY *et al.*, 2003), MEG14 (LOPES *et al.*, 2013) e  $\beta$ -sinucleína (UVERSKY *et al.*, 2000). Este efeito de ordenamento é uma consequência das interações hidrofóbicas que são acentuadas em altas temperaturas.

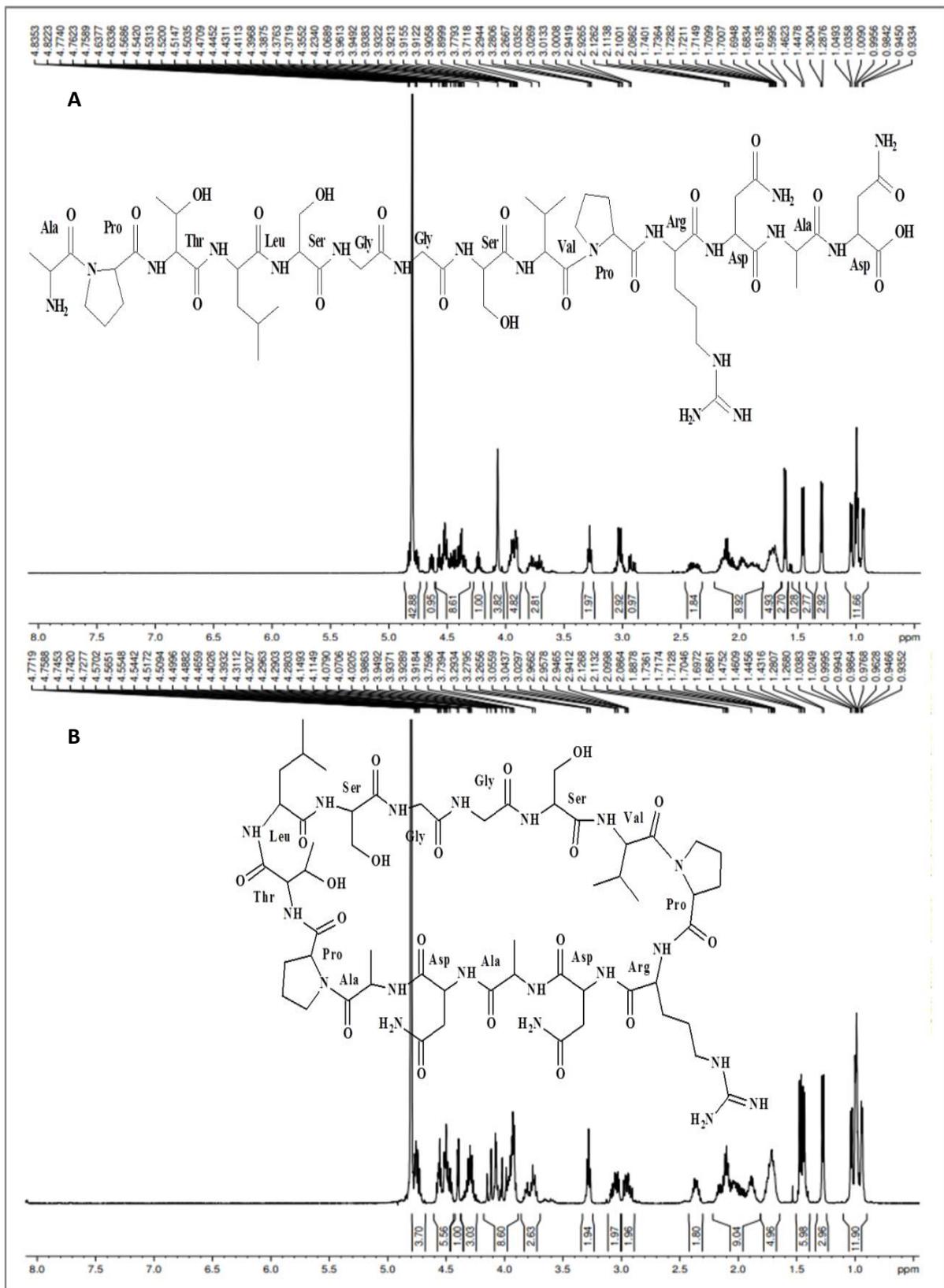
O ajuste nos picos das regiões de 198 e 222 nm indicam que ambos os peptídeos, linear e cíclico, foram submetidos a um pequeno enovelamento, através de uma dependência quase linear em função do aumento de temperatura. O espectro observado a 25 °C, após o processo de aquecimento, é muito semelhante ao espectro observado a 25 °C durante a fusão térmica. Portanto, as alterações conformacionais promovidas pelo efeito da temperatura são bastante reversíveis para ambos os peptídeos (Figura 11B).



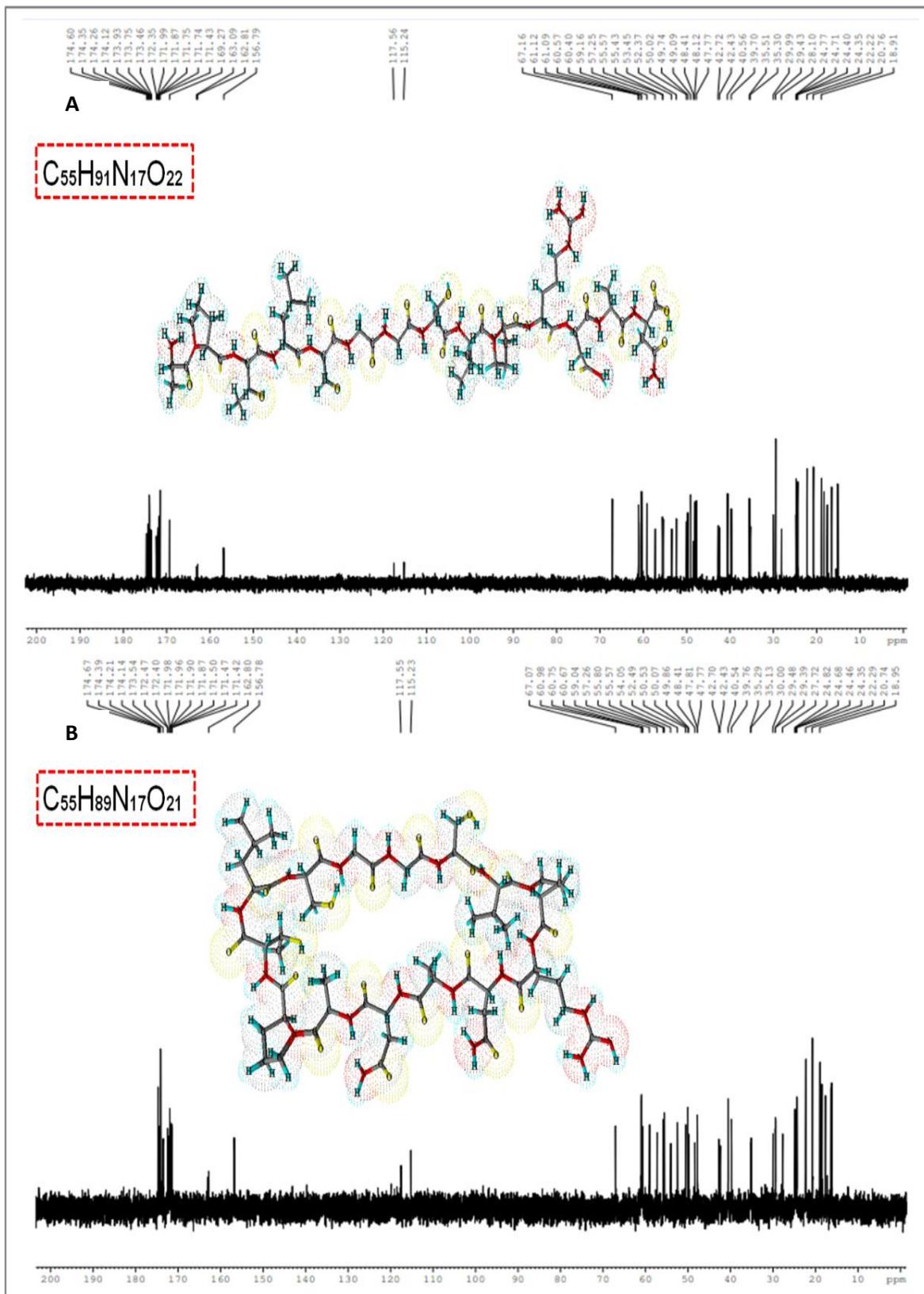
**Figura 11-** Espectros de dicroísmo circular. **(A)** Espectro de DC de PL e PC na região do UV distante **(B)** Efeito de transição da temperatura sobre PL e PC **(C)** e **(D)** Efeito da variação de temperatura na estrutura secundária de PL e PC **(E)** e **(F)** Efeito do TFE sobre o enovelamento de PL e PC

Efeito similar de ordenamento da conformação dos peptídeos também foi observado na presença de trifluoretanol (TFE). O espectro de ambos os peptídeos na presença de 50% de TFE é bastante semelhante ao espectro observado a 85 °C. Entretanto, as mudanças conformacionais foram muito mais acentuadas quando a concentração de TFE mudou de 50 para 100% (Figura 11E e 11F). O solvente TFE é conhecido por promover o deslocamento de moléculas de água do ambiente do peptídeo e promover o revestimento do peptídeo com suas moléculas, o que torna mais favorável a formação de ligações de hidrogênio intrapeptídeo, permitindo assim, o enovelamento do esqueleto peptídico neste solvente (GOOMAGHTIGH, *et al.*, 2009).

Após a confirmação, por dicroísmo circular, da presença de estrutura desordenada para PL e PC, apesar do maior ordenamento deste último, os estudos por RMN unidimensional mostraram as regiões dos deslocamentos químicos dos núcleos dos átomos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para os grupamentos NH, H $\alpha$ , H $\beta$ , C $\alpha$  e C $\beta$ . Na região entre 4 e 4,7 ppm nos espectros de  $^1\text{H}$  podem ser observados deslocamentos de H $\alpha$  marcadamente distintos, como resultado da ciclização da cadeia (no PC), envolvendo os resíduos de Ala (4,35) e Asp (4,76), além da influência dos resíduos adjacentes como Val (4,18), Arg (4,38), Pro (4,44) e Ser (4,50) (Figura 12A). Pode-se observar também, no PC, deslocamentos de H $\beta$  significativamente diferentes entre os resíduos de Ala (1,39) e Asp (1,84; 1,75), por conta da ciclização da cadeia (Figura 12B). Levando em conta que a interpretação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  é simplificada, quando comparado aos espectros de  $^1\text{H}$ , produzindo apenas um pico (singleto) e, ainda, sabendo previamente a sequência das moléculas de interesse, foi possível assinalar cada um dos 55 carbonos de PL e PC (Figura 13). Complementarmente aos dados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi possível obter a fórmula molecular e fazer uma representação tridimensional das duas moléculas nos seus estados de mais baixa energia (Figura 13A e B).



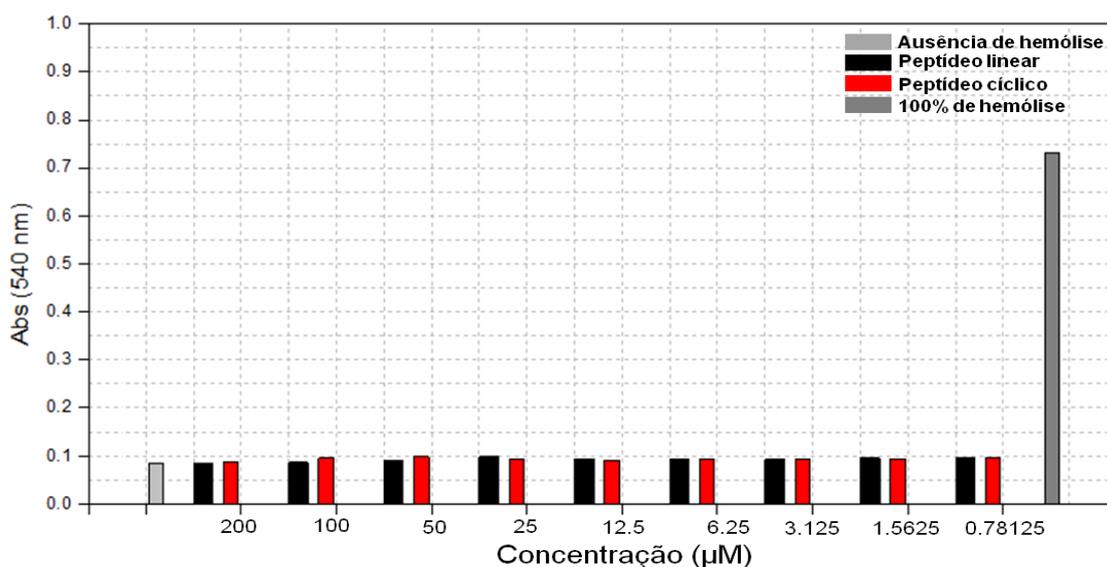
**Figura 12-** Espectros unidimensionais referentes aos deslocamentos químicos dos núcleos de  $^1\text{H}$ . **(A)** PL e **(B)** PC.



**Figura 13-** Espectros unidimensionais referentes aos deslocamentos químicos dos núcleos de  $^{13}C$  (A) Representação tridimensional e fórmula molecular de PL e (B) PC.

## 4.5 Ensaios biológicos

Os peptídeos vegetais têm chamado a atenção pela potente ação citotóxica frente a diversas linhagens celulares (MA *et al.*, 2007), propriedade atribuída majoritariamente a moléculas com o arranjo cíclico (TAN e ZHOU, 2006). Tais descobertas têm colocado essas moléculas como alvos em diversos estudos de desenvolvimento de novas drogas, principalmente no combate ao câncer (THORSTHOLM e CRAIK, 2011). Sabendo disso, os peptídeos PL e PC foram inicialmente avaliados quanto a um possível efeito hemolítico, atividade descrita em diversos ciclotídeos e que, normalmente, precede os estudos de citotoxicidade *in vitro* (BARRY *et al.*, 2003). CRAIK (2010), por exemplo, destaca que peptídeos sintéticos análogos aos ciclotídeos perdem a atividade hemolítica quando ocorre a abertura da sua cadeia. Apesar disso, nossos estudos, mostraram que PL e PC, avaliados em diferentes concentrações, não apresentaram qualquer atividade hemolítica (Figura 14). Adicionalmente, os estudos com células cancerosas de cólon (HCT-116), leucemia (HL-60) e ovário (Ovcar-8), mostraram que essas moléculas não apresentam qualquer efeito citotóxico para essas linhagens (Tabela 2).



**Figura 14** – Avaliação do efeito hemolítico dos peptídeos linear e cíclico sobre hemácias humanas.

**Tabela 2** - Atividade citotóxica em células tumorais após 72h de incubação.

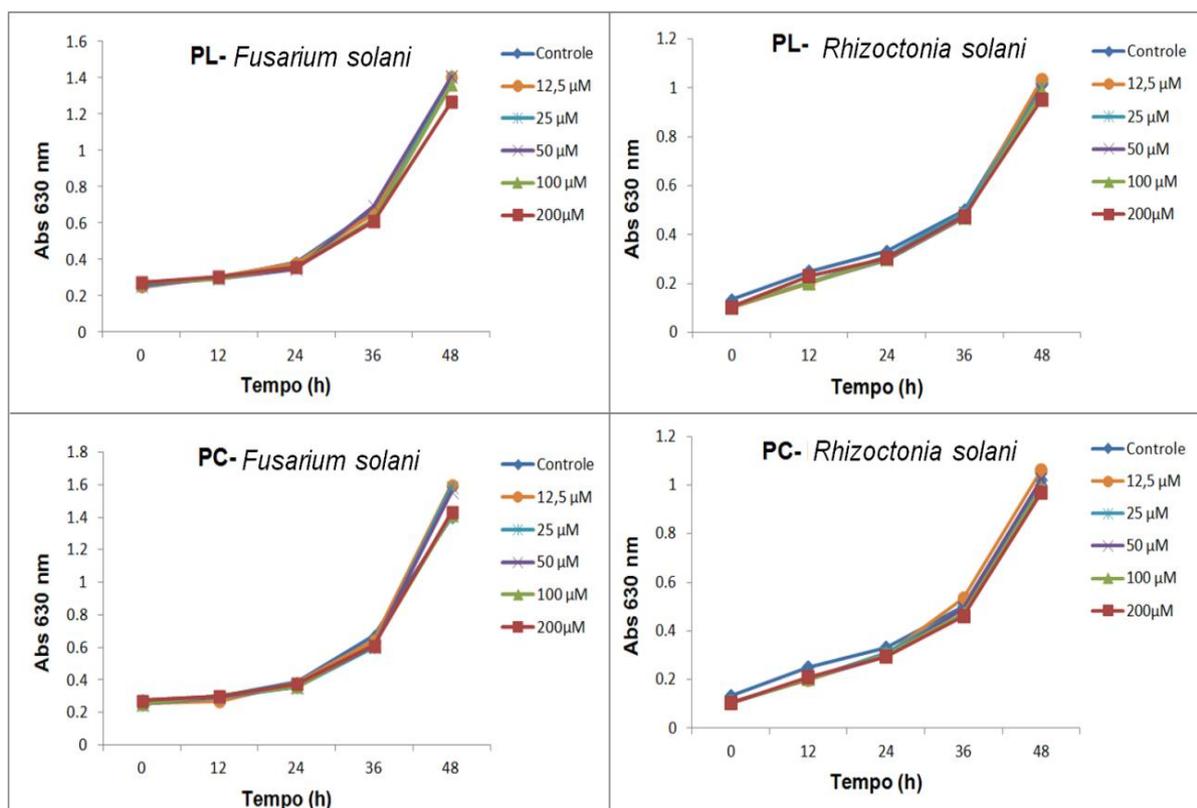
Amostra	Células tumorais		
	HL-60	OVCAR-8	HCT-116
PC	> 25µg/ml	> 25µg/ml	> 25µg/ml
PL	> 25µg/ml	> 25µg/ml	> 25µg/ml

Dados são apresentados como valores de  $CI_{50}$  e 95% de intervalo de confiança para células tumorais de colon (HCT-116), leucemia (HL-60), ovário (Ovcar-8).

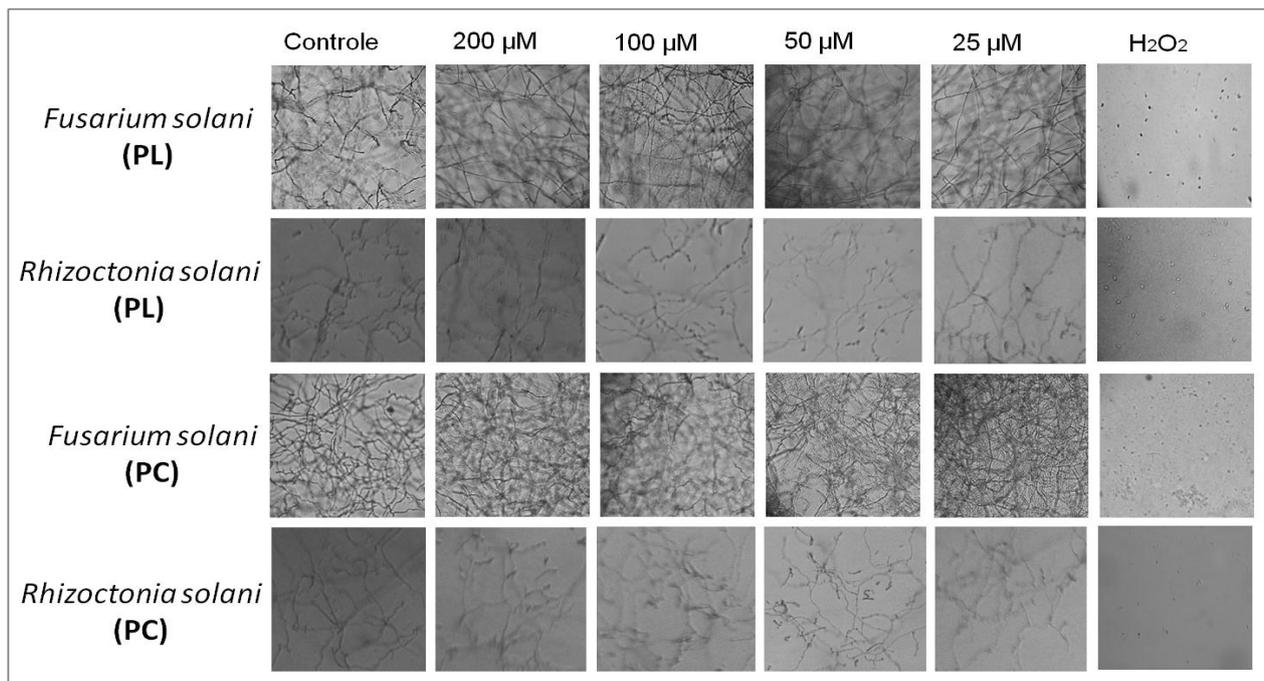
Outra atividade comumente atribuída aos peptídeos vegetais, na qual se destacam os peptídeos catiônicos, é a atividade antifúngica (GAO *et al.*, 2001). Ao mesmo tempo em que as plantas estão expostas a um grande número de fungos fitopatogênicos, um grande número de substâncias de baixa massa molecular, como os peptídeos, têm sido produzidos para atuar na resistência constitutiva ou induzida (LOBO *et al.*, 2007). Os peptídeos PL e PC foram avaliados quanto à presença de atividade antifúngica e a capacidade de inibir a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*. Os resultados dos dois ensaios mostram que os peptídeos não apresentaram qualquer atividade antifúngica, seja sobre o crescimento micelial (Figura 15) ou sobre a germinação de esporos (Figura 16).

Por fim, considerando a extensa atividade proteolítica a que as sementes estão submetidas, principalmente no processamento de proteínas de reserva (GRUIS *et al.*, 2004; ROJO *et al.*, 2003) e, sabendo que os peptídeos sintéticos tiveram sua síntese baseada em um peptídeo originário da semente, avaliou-se a capacidade de PL e PC de inibir a atividade proteolítica de duas proteases, uma cisteínica (papaína) e outra serínica (tripsina). Os peptídeos estudados não foram capazes de inibir a atividade proteolítica desempenhada pelas enzimas purificadas papaína e tripsina (Figura 17). O peptídeo PL não alterou o padrão de proteólise verificado para estas enzimas, já o peptídeo PC aumentou a atividade proteolítica da papaína de forma estatisticamente

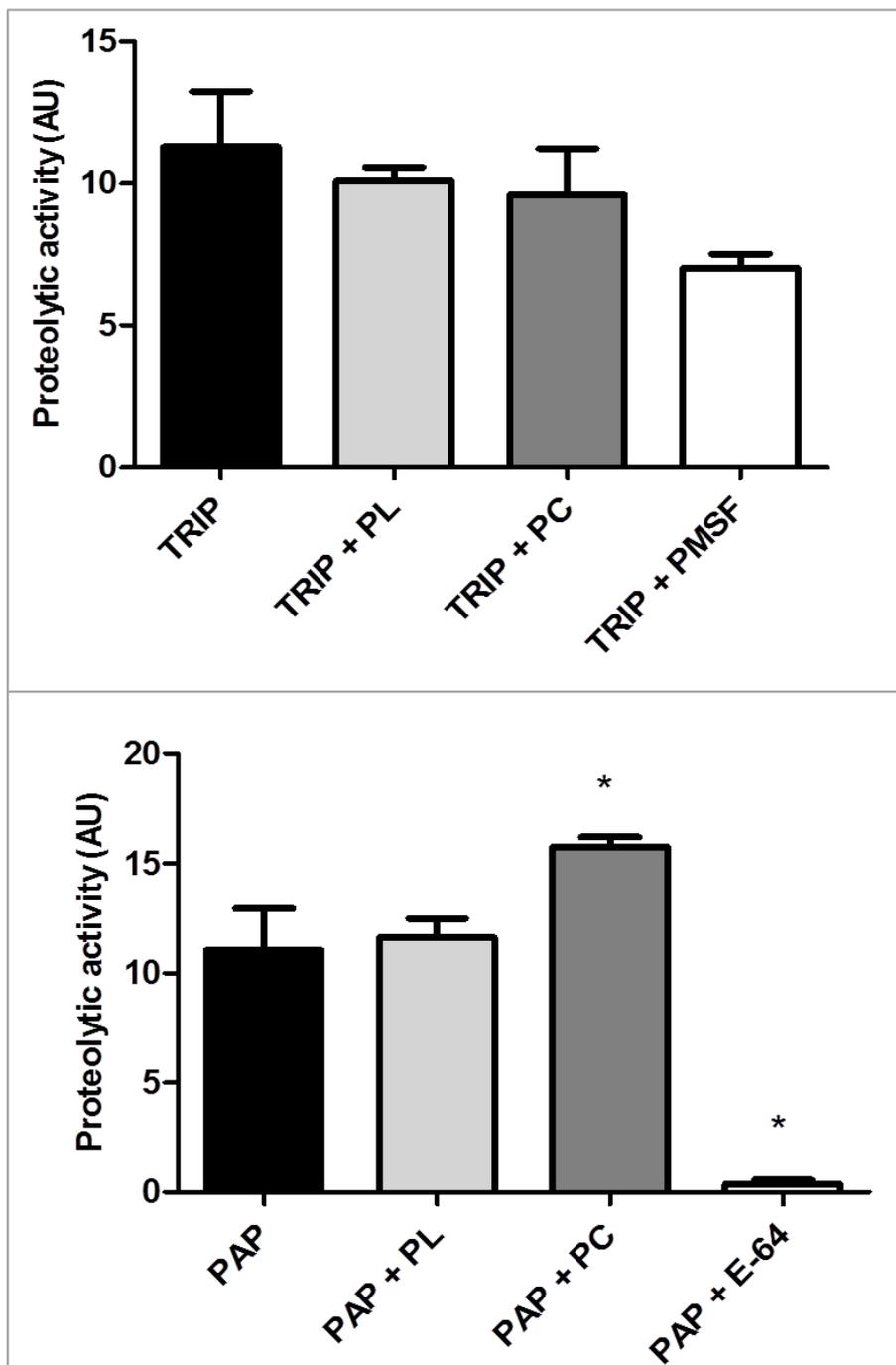
significativa e não causou nenhuma alteração na atividade da tripsina. Os dados sugerem que provavelmente os peptídeos em estudo não apresentam atividade inibitória sobre tais enzimas.



**Figura 15** - Efeito dos peptídeos linear e cíclico sobre o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*. Os controles negativos e positivos para inibição do crescimento foram o tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, e o peróxido de hidrogênio 100 mM, respectivamente



**Figura 16** – Efeito dos peptídeos linear e cíclico sobre a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*. Os ensaios foram realizados a 27 °C por 24 horas e 70% de umidade relativa. A inibição da germinação foi observada por microscopia de luz em um microscópio Olympus BX60.



**Figura 17** - Atividade de inibição proteolítica dos peptídeos linear e cíclico frente à protease cisteínica papaína **(A)** e serínica tripsina **(B)**. \* $p < 0,05$  indica diferença estatística quando comparado ao grupo controle PAP (n=3, ANOVA teste Dunnett's).

## 5. CONCLUSÃO

Dois peptídeos, um linear e outro cíclico, foram sintetizados a partir de uma sequência de aminoácidos obtida de peptídeos isolados de sementes de *J. curcas*. As moléculas foram caracterizadas e comparadas quanto a diversas propriedades físico-químicas, estruturais e biológicas. Parâmetros como estado de carga e tempo de retenção mostraram que esses dois peptídeos têm propriedades muito similares, do ponto de vista físico-químico.

Os aspectos que foram estudados por meio da espectrometria de massas, tais como padrão de fragmentação por MS/MS e mobilidade iônica mostraram diferenças significativas entre os peptídeos estudados, as quais podem ser perfeitamente usadas como parâmetros para distinguir o peptídeo linear do cíclico.

Os estudos de dicroísmo circular revelaram: a prevalência de um estado desordenado para ambas as moléculas, aspectos estruturais importantes como estabilidade e comportamento em meio que simula um ambiente hidrofóbico. Já os estudos de ressonância magnética nuclear unidimensionais mostraram as particularidades químicas dos átomos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de cada molécula.

Todos os parâmetros que foram estudados em cada molécula e comparados ao seu análogo correspondente são imprescindíveis para a compreensão das possíveis funções biológicas e dos mecanismos de ação responsáveis por essas atividades. Mesmo que os ensaios realizados com essas moléculas não tenham mostrado nenhum sinal aparente de atividade biológica (atividade hemolítica, citotóxica, antifúngica e inibitória de proteases), estudos subsequentes devem ser conduzidos, uma vez que se dispõe de moléculas sintéticas com alto grau de pureza, parcialmente caracterizadas e que podem ter aplicações biotecnológicas promissoras.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Esta tese tratou do estudo de peptídeos vegetais no látex da espécie *Calotropis procera* e na semente de *Jatropha curcas*. O foco inicial foi o isolamento de peptídeos, em especial os cíclicos, em ambas as espécies. Apesar de nenhuma molécula desta natureza ter sido isolada de *C. procera*, o estudo das frações do látex desta planta não só permitiu a caracterização fitoquímica e biológica, bem como mostrou que os peptídeos de natureza cíclica estão presentes em algumas destas frações, como na de acetato de etila.

Em se tratando do pinhão-mansão, pode-se concluir que, através de abordagens analíticas relativamente simples, foi possível a obtenção de uma fração rica em peptídeos, a partir da qual cada um dos peptídeos pode ser isolado e purificado. Visto que não houve necessidade de passos adicionais de fracionamento para obtenção das sequências primárias destas moléculas, foi possível, a partir desta fração rica em peptídeos, o sequenciamento de várias sequências peptídicas, confirmadas através da sua presença no genoma de *J. curcas*.

De posse de várias dessas sequências de *J. curcas*, uma delas foi escolhida como alvo e, através de síntese química, peptídeos sintéticos análogos, com alto grau de pureza, foram obtidos e puderam ser caracterizados estrutural e biologicamente.

Os estudos aqui apresentados geram novas perspectivas e servem de base para estudos subsequentes que tratem do isolamento e caracterização de peptídeos nas espécies *C. procera* e *J. curcas*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDELNUR, P. V. **A espectrometria de massas e as biomoléculas: Relação estrutura/reatividade de peptídeos por reações íon/molécula e mobilidade de íons e busca de novos biomarcadores em clínica médica por imageamento químioseletivo de tecidos.** 180f. Tese de doutorado (Doutorado em química orgânica), UNICAMP, 2010.

AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology and evolution plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40: 311-331, 2009.

ALENCAR, N. M. N.; FIGUEREDO, I. S. T.; VALE, M. R.; BITENCURT, F. S.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R. A.; RAMOS M. V. Anti-inflammatory effect of the látex from *Calotropis procera* in three different experimental models: Peritonitis, Paw edema and Hemorrhagic cystitis. **Planta Medica**, v. 70, p.1144-1149, 2004.

ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, J. S.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; VALE, M. R.; ETCHELLS, J. P.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V. Pro- and anti-inflammatory activities of the látex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflammation Research**, v. 55, p. 559-564, 2006.

ALTEI, W. F. **Estudo químico de *Jatropha curcas* e de *Jatropha gossypifolia* nativas e cultivadas: Avaliação de ciclopeptídeos em função de habitat e hábito: prospecção e atividade biológica.** 125f. Dissertação de mostrado (Mestrado em química orgânica), UNESP, 2009.

ALTEI, W.; PICCHI, D. G.; BARBOSA, S. C.; CILLI, E. M.; GIANNINI, M. J.; CARDOSO-LOPES, E. M.; YOUNG, M. C. M.; TORRES, L. B.; GIESEL, G. M.; VERLI, H.; BOLZANI, V. S. NMR studies, solid phase synthesis and MD/SA simulation as a tool for structural elucidation of new bioactive peptides from the latex of *Jatropha curcas*. **Planta Medica**, v. 74, 2008.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. (4), 228–232, 2005.

ASTAFIEVA, A. A.; ROGOZHIN, E. A.; ODINTSOVA, T. I.; KHADEEVA, N. V.; GRISHIN, E. V.; EGOROV, T. A. Discovery of novel antimicrobial peptides with unusual cysteine motifs in dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. Flowers. **Peptides**, v. 36, 266–271, 2012.

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

B. N.; MEYER, FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, J. B.; NICHOLSAND, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p.31-34, 1982.

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

BARBOSA S. C.; CILLI E. M.; DIAS, L. G.; STABELI, R. G.; CIANCAGLINI. Labaditin, a cyclic peptide with rich biotechnological potential: preliminary toxicological studies and structural changes in water and lipid membrane environment. **Amino Acids**, 240:135–144, 2011.

BARRY, D. G.; DALY, N. L.; CLARK, R. J.; SANDO, L.; CRAIK, D. J. Linearization of a naturally occurring circular protein maintains structure but eliminates hemolytic activity. **Biochemistry**, v. 42, 6688–6695, 2003.

BATTAGLIA, M.; OLVERA-CARRILLO, Y.; GARCIARRUBIO, A.; CAMPOS, F.; COVARRUBIAS, A. A. The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. **Plant Physiology**, v. 148, p. 6–24, 2008.

BAYKUT, G.; HALEM, O. V.; RAETHER, O. Applying a dynamic method to the measurement of ion mobility. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, 2070 –2081, 2009.

BOORANASRISAK, T.; PHAONAKROP, N.; JARESITTHIKUNCHAI, J.; VIRUNANON, C.; ROYTRAKUL, S.; CHULALAKSANANUKUL, W. Proteomic evaluation of free fatty acid biosynthesis in *Jatropha curcas* L. (physic nut) kernel development. **African Journal of Biotechnology**, v. 12(21), p. 3132-3142, 2013.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. p. 1-1367, 2000.

CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; AGUIAR, L. M. B. A.; MATOS, F. J. A. Avaliação da Toxicidade de Extratos de Plantas Medicinais através de Bioensaio com *Artemia salina*. **Leach. Ciências Cultura**, v. 40: 1109-1111, 1988.

CASTRO, M. S.; FONTES, W. Plant Defense and Antimicrobial Peptides. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, 11-16, 2005.

CHAIWUTA, P., RAWDKUENB, S., BENJAKULC, S. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol–salts biphasic system. **Process Biochemistry**, 45,1148–1155, 2010.

CHATTERJEE, J.; LAUFER, B.; KESSLER, H. Synthesis of N-methylated cyclic peptides. **Nature Protocols**, v.7, n. 3, p.432-444, 2012.

CHIU, C. W.; CHANG, C. L.; CHEN, S. F. Evaluation of peptide fractionation strategies used in proteome analysis. **Journal of Separation Science**, v. 35, 3293–3301, 2012.

CHOEDON, T., MATHAN, G., ARYA, S., KUMAR V.L., KUMAR, L. Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse of hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, p. 2517-2522, 2006.

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

CHUNDATTU, S. J.; AGRAWAL, K. V.; GANESH N. Phytochemical investigation of *Calotropis procera*. **Arabian Journal of Chemistry**, 2011.

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

COTTRELL, J. S. Tutorial: Protein identification using MS/MS data. **Journal of Proteomics**, v. 74, 1842–1851, 2011.

COZZOLINO, R.; PALLADINO, P.; ROSSI, F.; CALI, G.; BENEDETTI, E.; LACCETTI, P. Antineoplastic cyclic astin analogues kill tumour cells via caspase-mediated induction of apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 733-739, 2005.

CRAIK, D. J. Discovery and applications of the plant cyclotides. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p.1092-11021–11, 2010.

CRAIK, D. J.; MALIK, U. Cyclotide biosynthesis. **Current opinion in chemical Biology**, 17:546 – 554, 2013.

CRAIK, D. J. Plant cyclotides: circular, knotted peptides toxins. **Toxicon**, v. 39, p. 1809-1813, 2001.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutritional, biochemical and pharmaceutical potential of proteins and peptides from *Jatropha*: review. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 58, 6543–6555, 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products. A biosynthetic approach**, 2nd ed. West Sussex: Jonh Wiley & Sons Ltd. p. 507, 2002.

DOMSALLA, A., MELZIG, M.F. Occurrence and properties of proteases in plant laticiferes. **Planta Medica**, v. 74, n. 7, p.699-711, 2008.

DOSHI, H.; SATODIYA, H.; THAKUR, M. C.; PARABIA, F.; KHAN, A. Phytochemical screening and biological activity of *Calotropis Procera* (Ait).

R.Br. (Asclepiadaceae) against selected bacteria and *Anopheles stephansi* Larvae. **International Journal of Plant Research**, v. 1, n. 1, p. 29-33, 2011.

EGOROV, T. A.; ODINTSOVA, T. I.; PUKHALSKY, V. A.; GRISHIN, E. V. Diversity of wheat anti-microbial peptides. **Peptides**, v. 26, 2064–2073, 2005.

FERREIRA, M. E. P.; CILLI, E. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; BOLZANI, V. S. A cyclopeptide isolated from *Jatropha Ribifolia* (Pohl) Baill and its solid phase synthesis. **Pharmaceutical Biology**, 50(2): 537–610, 2012.

FRANCO, O. L. Peptide promiscuity: An evolutionary concept for plant defense. **FEBS Letters**, v. 585, 995–1000, 2011.

FRANSEN, H. J.; BISSELING, T. Peptide signaling in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, No. 23, 2001.

FREITAS, D. T. C.; NOGUEIRA, F. C. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; DOMONT, G. B.; RAMOS, M. V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, 49, 738-743, 2011.

GALLEGOS-OLEA, R. S.; OLIVEIRA, A. V.; SILVEIRA, L. M. S.; SILVEIRA, E. R. Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves. **Fitoterapia**, v. 73, p.263-265, 2002.

GAO, G. H.; LIU, W.; DAI, J. X.; WANG, J. F.; HU, Z.; ZHANG, Y.; WANG, C. Solution structure of PAFP-S: a new knottin-type antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*. **Biochemistry**, 40:10973–8, 2001.

GERLACH, S. L.; GORANSSON, U.; KAAS, Q.; CRAIK, D. J.; MONDAL, D.; GRUBER, C. W. A Systematic approach to document cyclotide distribution in plant species from Genomic, transcriptomic, and peptidomic analysis. **Peptide Science**, v. 100, N. 5, p.433-437.

GOOMAGHTIGH, E.; RÉGIS, G.; AUDREY, B.; ANDRÉA, G.; VINCENT, R. Protein secondary structure content in solution, films and tissues: Redundancy and complementary of the information content in circular dichroism, transmission and ATR FTIR spectra. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p.1332-1343, 2009.

GRUIS, D.; SCHULZE, J.; JUNG, R. Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. **Plant Cell**, 6(1):270-90, 2009.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E.C.; FACCHINI, P.J. Got milk? The secret of life of laticifers. **Trends in Plant Sciences**, v. 12, p.631-639, 2008.

HAN, C.; SHEN, Y.; CHEN, J.; LEE, F. S. C.; WANG, X. HPLC fingerprinting and LC–TOF-MS analysis of the extract of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax root. **Journal of Chromatography B**, v. 862, 125–131, 2008.

HSIEH, P. W.; CHANG, F. R.; WU, C. C.; LI, C. M.; WU, K. Y.; CHEN, S. L.; YEN, H. F.; WU, Y. C. Longicalycinin A, a new cytotoxic cyclic peptide from *Dianthus superbis* var. longicalycinus (Maxim.) will. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 336-338, 2005.

HSIEH, P. W.; CHANG, F. R.; WU, K. Y.; LI, C. M.; CHEN, S. L.; WU, Y. C. New cytotoxic cyclic peptides and dianthramide from *Dianthus superbis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1522-1527, 2004.

HUSSEIN, H. T.; KAMEL, A.; ABOUT-ZEID, M.; EL-SEBAE, A. K. H.; SALEH, M. A. Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snail. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n.1, p.135-140, 1994.

JUNCKER, T.; SCHUMACHER, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p.1–10, 2009.

KALITA, D.; SAIKIA, C. N. Chemical constituents and energy content of some látex bearing plants. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 219-227, 2004.

KEKWICK, R.G.O.; Latex and Laticifers. Encyclopedia of Life Science. **Nature Publishing Group**. p.1-6, 2001.

KINGHORN, A. D.; CHIN, Y. W.; SWANSON, S. M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, 12(2): 189–196, 2009.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, 72(13):1510-30, 2011.

KUMAR, S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n.1, p.115-118, 2001.

KUMAR, V. L.; ARYA, S. Medicinal uses and pharmacological properties of *Calotropis procera*. Em: Govil J.N. eds. **Recent Progress in Medicinal Plants**. Texas Studium Press, v. 11, p. 373-388, 2006.

KUMAR, V. L.; CHAUDHARY, P.; RAMOS, M. V.; MOHAN, M.; MATOS, M. P. V. Protective effect of proteins derived from the latex of *Calotropis procera* against inflammatory hyperalgesia in monoarthritic rats. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1336-1341, 2011.

KUMAR, V. L.; ROY, S. *Calotropis procera* latex extract affords protection against Inflammation and oxidative stress in freund's complete adjuvant-induced monoarthritis in rats. **Mediators of Inflammation**, v. 47523, 2007.

KUMAR, V. L.; ROY, S. Protective effect of latex of *Calotropis procera* in Freund's complete adjuvant induced Monoarthritis. **Phytotherapy Research**, v. 23, p.1–5, 2009.

LARHSINI, M.; MARKOUK, M.; JAOUHARI, J.T.; BEKKOUCHE, K.; LAZREK, H. B.; JANA, M. The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. S97-S98, 2002.

LEES, J. G.; SMITH, B.; WIEN, F.; MILES, A.; WALLACE, B. A. CDtool-an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. **Analytical Biochemistry**, v. 15;332(2):285-9, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**, 4a. Edição, Editora Sarvier, 2007.

LIMA-FILHO, J. V. M.; PATRIOTA, J. M.; SILVA, A. F.; FILHO, N. T.; OLIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N. M. N.; RAMOS, M. V. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129: 327-334, 2010.

LIU, H.; LIU, Y. J.; YANG, M. F.; SHEN, S. H. A comparative analysis of embryo and endosperm proteome from seeds of *Jatropha curcas*, **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 51, 850–857, 2009.

LIU, H.; WANG, C.; KOMATSU, S.; HE, M.; LIU, G.; SHEN, S. Proteomic analysis of the seed development in *Jatropha curcas* : From carbon flux to the lipid accumulation. **Journal of Proteomics**, v. 91, 23 – 40, 2013.

LIU, H.; YANG, Z.; YANG, M.; SHEN, S. The differential proteome of endosperm and embryo from mature seed of *Jatropha curcas*. **Plant Science**, v. 181, 660–666, 2011.

LIU, W. T.; NG, J.; MELUZZI, D.; BANDEIRA, N.; GUTIERREZ, M.; SIMMONS, T. L.; SCHULTZ, A. W.; LININGTON, R. G.; MOORE, B. S.; GERWICK, W. H.; PEVZNER, P. A.; DORRESTEIN, P. C. Interpretation of tandem mass spectra obtained from cyclic nonribosomal peptides. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 11, 2009.

LOBO, D. S.; PEREIRA, I. B.; FRAGEL-MADEIRA, L.; MEDEIROS L. N.; CABRAL L. M.; FARIA, J. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. **Biochemistry**, 46 (4), 987-96, 2007.

LOPES J. L. J.; ORCIA, D.; ARAUJO A. P. U.; DEMARCO, R.; WALLACE, B. A. Folding Factors and Partners for the Intrinsically Disordered Protein Micro-Exon Gene 14 (MEG-14). **Biophysical Journal**, 104(11):2512-20, 2013.

LY, L.; WASINGER, V. C. Protein and peptide fractionation, enrichment and depletion: Tools for the complex proteome. **Proteomics**, v. 11, 513–534, 2011.

MA, B.; ZHANG, K.; HENDRIE, C.; LIANG, C.; LI, M.; DOHERTY-KIRBY, A.; LAJOIE, G. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by MS/MS. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, 2337-2342, 2003.

MA, X.; WU, C.; WANG, W.; LI, X. Peptides from Plants: A New Source for Antitumor Drug Research. **Asian Journal of Traditional Medicines**, p. 1-6, 2007.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 781-789, 2004.

MACIEL, F. M.; LABERTY, M. A.; OLIVEIRA, N. D.; FELIX, S. P.; SOARES, A. M. S.; VERICIMO, M. A.; MACHADO, O. L. T. A new 2S albumin from *Jatropha curcas* L. seeds and assessment of its allergenic properties. **Peptides**, 30: 2103–2107, 2009.

MAGALHÃES, H. I. F.; FERREIRA, P. M. P.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. In vitro and in vivo antiproliferative activity of *Calotropis procera* stems extract. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 407-416, 2010.

MAGHULY, F.; LAIMER, M. *Jatropha curcas*, a biofuel crop: Functional genomics for understanding metabolic pathways and genetic improvement. Review. **Biotechnology Journal**, v. 8, 1172–1182, 2013.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza; Edições UFC, p. 141, 1997.

MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Peptide Hormones in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, 57:649–74, 2006.

MEENA, A. K.; YADAV, U. S.; NIRANJAN, B.; SINGH, A. K.; NAGARIYA, K.; SHARMA, A.; GAURAV, S.; SHARMA, M.; RAO, M. A review on *Calotropis procera* Linn and its ethnobotany, phytochemical, pharmacological profile”, **Drug Invention Today**, v. 2, n. 2, p.185-190, 2010.

MELO, V. M. M.; VASCONCELOS, I. M.; GOMES, V. M.; CUNHA, M.; SOARES, A. A.; OLIVEIRA, J. T. A. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science**, v.169: 629-639, 2005.

MIERNYK, J. A.; HAJDUCH, M. Seed proteomics. Review. **Journal of Proteomics**, v. 74, 389–400, 2011.

MISHRA, A.; GAURI, S. S.; MUKHOPADHYAY, S. K.; CHATTERJEE, S.; DAS, S. S.; MANDAL, S. M.; DEY, S. Identification and structural characterization of a new pro-apoptotic cyclic octapeptide cyclosaplin from somatic seedlings of *Santalum album* L. **Peptides**, xxx, xxx–xxx, 2014.

MOHIMANI, H.; LIU, W. T.; MYLNE, J. S.; POTH, A. G.; COLGRAVE, M. L.; DATTRAN, SELSTED, M. E.; DORRESTEIN, P. C.; PEVZNER, P. A. Cycloquest: Identification of cyclopeptides via database search of their mass spectra against genome databases. **Journal of Proteome Research**, v.10, 4505–4512, 2011.

MONGKOLVISUT, W.; SUTTHIVAIYAKIT, S.; LEUTBECHER, H.; MIKA, S.; KLAIBER, I.; MÖLLER, W.; RÖSNER, H.; BEIFUSS, U.; CONRAD, J. Integerrimides A and B, cyclic heptapeptides from the latex of *Jatropha integerrima*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1435-1441, 2006.

MONROC, S.; BADOSA, E.; BESALU, E.; PLANAS, M.; BARDAJI, E.; MONTESINOS E.; FELIU, L. Improvement of cyclic decapeptides against plant pathogenic bacteria using a combinatorial chemistry approach. **Peptides**, v. 27, 2575–2584, 2006a.

MONROC, S.; BADOSA, E.; FELIU, L.; PLANAS, M.; MONTESINOS, E.; BARDAJI, E. De novo designed cyclic cationic peptides as inhibitors of plant pathogenic bacteria. **Peptides**, v. 27, 2567–2574, 2006b.

MORITA, H.; IIZUKA, T.; CHOO, C. Y.; CHAN, K. L.; ITOKAWA, H.; TAKEYA, K. Dichotomins J and K, Vasodilator Cyclic Peptides from *Stellaria dichotoma*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1686-1688, 2005.

MORITA, H.; KAYASHITA, T.; SHISHIDO, A.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SHIRO, M. Dichotomins A - E, new cyclic peptides from *Stelluriu dichotomu* L. var. lanceolata Bge. **Tetrahedron**, v. 52, p. 1165-1176, 1996.

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

MORITA, H.; YUN, Y. S.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Segetalins B, C and D, three new cyclic peptides from *Vaccaria segetalis*. **Tetrahedron**, v. 51, p. 6003-6014, 1995.

MORSLED, M. A.; UDDIN, A.; RAHMAN, A.; HASAN, T.; AL AMIN, S. R. A.; AHSAN, R.; ISLAM, R. In vitro antimicrobial and cytotoxicity screening of *Terminalia arjuna* ethanol extract. **International Journal of Biosciences**. v. 1, n. 2, p.31-38, 2011.

MOSHI, M. J.; COSAM, J. C.; MBWAMBO, Z. H.; KAPINGU, M. N.; NKUNYA, M. H. H. Testing beyond ethnomedical claims: brine shrimp lethality of some Tanzanian plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 547–551, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.16, p.55-63, 1983.

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

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

NEWMAN, J. D.; GRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.79, p.461 – 477, 2007.

OLIVEIRA, J. S.; BEZERRA, D. P.; FREITAS, D. T. C.; MARINHO-FILHO, J. D.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; RAMOS, M. V. *In vitro* cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p.1563–1573, 2007.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M.; MARINHO-FILHO, J. D.; FIGUEIREDO, I. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. P.; RAMOS, M. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 382, n. 2, p.139-49, 2010.

PICCHI, D. G.; ALTEI, W. F.; SAITO, M. S.; BOLZANI, V. S.; CILLI, E. M. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: Características, diversidade, biossíntese, e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 5, 1262-1277, 2009.

PICKARD, W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytologist**, 177(4):877-888, 2008.

PINHEIRO, C. B.; SHAH, M.; SOARES, E. L.; NOGUEIRA, F. C. S.; CARVALHO, P. C.; JUNQUEIRA, M.; ARAUJO, G. D. T.; SOARES, A. A.; DOMONT, G. B.; CAMPOS, F. A. P. Proteome Analysis of Plastids from Developing Seeds of *Jatropha curcas* L. **Journal of Proteome Research**, v.12, 5137– 5145, 2013.

PRASAD, D. M. R.; IZAM, A.; KHAN, M. M. R. *Jatropha curcas*: Plant of medical benefits. Review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6(14), p. 2691-2699, 2012.

QUAQUEBEKE, E. V.; SIMON, G.; ANDRÉ, A.; DEWELLE, J.; YAZIDI, M. E.; BRUYNEEL, F.; TUTI, J.; NACOULMA, O.; GUISSOU, P.; DECAESTECKER, C.; BRAEKMAN, J. C.; KISS, R.; DARRO, F. Identification of a novel cardenolide (2"-Oxovoroscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses. **Journal of Medical Chemistry**, v. 48, p.849-856, 2005.

QUINTERO, V. P.; LOPEZ, J. L. A.; COLMENERO, A. Z.; COLIN, C. A. N.; GARCIA, N. M.; BONILLA, J. L. S.; BECERRIL, M. F. J. Genetic structure of *Jatropha curcas* L. in Mexico and probable centre of origin. **Biomass and Bioenergy**, v. 60, 147-155, 2014.

RAMOS, M. V.; AGUIAR, V. C.; MELO, V. M. M.; MESQUITA, R. O.; SILVESTRE, P. P.; OLIVEIRA, J. S.; OLIVEIRA, R. S. B.; MACEDO, N. M. R.; ALENCAR, N. M. N. Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **Plant Science**, v.173, n. 3, p.349-357, 2007.

RAMOS, M. V.; ARAÚJO, E. S.; JUCÁ, T. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; VASCONCELOS, I. M.; MOREIRA, R. A.; VIANA, C. A.; BELTRAMINI, L. M.; PEREIRA, D. A.; F. B.; MORENO New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 58, 211– 219, 2013.

RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; FREIRE, E. A.; SALES, M. P.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D. T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Anthropod-plant interactions**, v. 4, p. 57-67, 2010.

RASIK, A.M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M.P.; SRIVASTAVAR, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potencial of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 261-266, 1999.

RAWDKUENA, S.; PINTATHONGB, P.; CHAIWUTB, P.; BENJAKULC, S. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. **Food and Bioproducts Processing**, 8(9), 73–80, 2011.

RIBEIRO, S. M.; PORTO, W. F.; SILVA, O. N.; SANTOS, M. O.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Plant Antifungal Peptides. **Handbook of Biologically Active Peptides** (Second Edition), ISBN: 978-0-12-385095-9, 2013.

RIESER, M. J.; GU, Z. M.; FANG, X. P.; ZENG, L.; WOOD, K. V.; MCLAUGHLIN, J. L. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 100-108, 1996.

ROJO, E.; ZOUHAR J.; CARTER C.; KOVALEVA V.; RAIKHEL N. V. A unique mechanism for protein processing and degradation in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 12, 7389–7394, 2003.

ROMANIK, G.; GILGENAST, E.; PRZYJAZNY, A.; KAMIŃSKI, M. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. Review. **Journal of Biochemical and Biophysical methods**, v. 70, 253–261, 2007.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, 5: 725–738, 2010.

RUIZ, C. M. R. **Estudo da síntese convergente de peptídeos em fase sólida: Abordagem clássica e uso de temperatura alta**. 124f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Química), USP, 2003.

RUOTOLO, B. T.; TATE, C. C.; RUSSELL, D. H. Ion mobility-mass spectrometry applied to cyclic peptide analysis: conformational preferences of gramicidin S and linear analogs in the gas phase. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, 870–878, 2004.

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

SAWADOGO, W. R.; SCHUMACHER, M.; TEITEN, M. H.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. Review. **Biochemical Pharmacology**, 84, 1225–1240, 2012.

SEDDEK, A. L. S.; MAHMOUD, M. E.; SHIINA, T.; HIRAYAMA, H.; IWAMI, M.; MIYAZAWA, S.; NIKAMI, H.; TAKEWAKI, T.; SHIMIZU, Y. Extract from *Calotropis procera* latex activates murine macrophages. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, p. 297–303, 2009.

SEGURA-CAMPOS, M. R.; PERALTA-GONZÁLEZ, F.; CASTELLANOS-RUELAS, A.; CHEL-GUERRERO, L. A.; BETANCUR-ANCONA, D. A. Effect of *Jatropha curcas* Peptide Fractions on the Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity. **BioMed Research International**. v. 2013, p. 8, 2013.

SEHGAL, R.; ARYA, S.; KUMAR, V. L. Inhibitory effect of extracts of latex of *Calotropis procera* against *Candida albicans*: A preliminary study. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 37, n. 5, p. 334–335, 2005.

SEWALD, N.; JAKUBKE, H. D. **Peptides: Chemistry and Biology**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002.

SHARMA, P.; SHARMA, J.D. In-vitro schizonticidal screening of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v.71, p.77-79, 2000.

SHARMA, S. K.; SINGH, H. A Review on Pharmacological Significance of Genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). **Chinese Journal of Integrative Medicine**. 18(11):868-880, 2012.

SHIVKAR Y.M.; KUMAR V.L. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. **Mediator of Inflammation**, v.12, n. 5, p. 299-302, 2003.

SILVA, O. N.; PORTO, W. F.; MIGLIOLO, L.; MANDAL, S. M.; GOMES, D. G.; HOLANDA, H. H. S.; SILVA, R. S. P.; DIAS, S. C.; COSTA, M. P.; COSTA, C. R.; SILVA, M. R.; REZENDE, T. M. B.; FRANCO, O. L. CN-AMP1: A new promiscuous peptide with potential for microbial infections treatment. **Peptide Science**, v. 98, n. 4, 2012.

SINGH, A. N.; SHUKLA, A. K.; JAGANNADHAMB, M.V.; DUBEY, V. K. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 399-406, 2010.

SOARES, P. M.; LIMA, S. R.; MATOS, S. G.; ANDRADE, M. M.; PATROCÍNIO, M. C. A.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; CRIDDLE, D. N.; CARDI, B. A.; CARVALHO, K. M.; ASSREUY, A. M. S.; VASCONCELOS, S. M. M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p.125-129. 2005.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. "Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity", **Agents Actions**, v. 17, p. 1-5, 1985.

STEEN, H.; MANN, M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. **Nature Reviews | Molecular Cell Biology**, v. 5, 699, 2004.

TAN, N. H.; ZHOU, J. Plant cyclopeptides. **Chemical Reviews**, 106, 840-895, 2006.

THORSTHOLM, L.; CRAIK, D. J. Discovery and applications of naturally occurring cyclic peptides. **Drug Discovery Today: Technologies**, v.9 (1), p.13–21, 2011.

TOUR, N.; TALELE, G. Anti-inflammatory and gastromucosal protective effects of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) stem bark. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, p. 598–605, 2011.

UVERSKY, V. N. A protein-chameleon: conformational plasticity of  $\alpha$ -synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v. 21:211–234, 2003.

VAN DEN BERG, A. J.; HORSTEN, S. F.; KETTENES-VAN DEN BOSCH, J. J.; KROES, B. H.; BEUKELMAN, C. J.; LOEFLANG, B. R.; LABADIE, R. P. Curcacycline A: a novel cyclic octapeptide isolated from the latex of *Jatropha curcas* Linn. **FEBS Letters**, v. 358, 215–218, 1995.

VLADIMIR N.; UVERSKY, JOEL, R. G.; ANTHONY, L. F. Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 41, (3), p. 415-427, 2000.

WARRIER, P. K.; NAMBIAR, V. P. K.; RAMANHUTTY, C. *Calotropis gigantea* In: **Indian Medicinal Plants**, Orient Longman, Delhi, India, v. 1, p. 341–345, 1994.

WÉLÉ, A.; NDOYE, I.; ZHANG, Y.; BROUARD, J. P. Cherimolacyclopeptide D, a novel cycloheptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 693–6, 2005a.

WÉLÉ, A.; NDOYE, I.; ZHANG, Y.; BROUARD, J. P.; POUSSET, J. L.; BODO, B. Glaucacyclopeptide A from the seeds of *Annona glauca*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1154-7, 2005b.

WÉLÉ, Y.; ZHANG, I.; NDOYE, J. P.; BROUARD, J. L.; POUSSET, B. A. Cytotoxic cyclic heptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1577-1579, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer (WHO). Quick cancer facts. January 1 St, 2013. [homepage on the internet]. Geneva: World Health Organization; available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

XIAO, J.; ZHANG, H.; NIU, L.; WANG, X. Efficient Screening of a Novel Antimicrobial Peptide from *Jatropha curcas* by Cell Membrane Affinity Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 1145–1151, 2011.

YAN, X. W.; JUN, T.; JIU, J. C.; JUN, H. W.; HUA, T. N. Application of a TLC chemical method to detection of cyclotides in plants. **Chinese Science Bulletin**, v. 53, n. 11, 1671-1674, 2008.

YANG, M. F.; LIU, Y. J.; LIU, Y.; CHEN, H.; CHEN, F.; SHEN, S. H. Proteomic analysis of oil mobilization in seed germination and postgermination development of *Jatropha curcas*, **Journal of Proteome Research**, v. 8, 2009.

YOSHIKAWA, K.; TAO, S.; ARIHARA, S. J. Stephanotic Acid, a Novel Cyclic Pentapeptide from the Stem of *Stephanotis floribunda*. **Journal of Natural Products**, 63 (4), p. 540–542, 2000.

YUN, Y. S.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cyclic peptides from higher plants. 34.1 segetalins G and H, structures and estrogen-like activity of

cyclic pentapeptides from *Vaccaria segetalis*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 216-218, 1997.

ZHANG, X.; ZHANG, M.; SU, X.; HOU, C.; GU, Y.; SHI, Q. Chemical constituents of the plants from Genus *Jatropha*. Review. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 2166-2183, 2009.

# **ANEXOS**

## Produção científica decorrente desta tese de doutorado

### Artigo completo publicado em periódico:

**JUCÁ, T. L.;** RAMOS, M. V.; MORENO, F. B. M. B.; MATOS, M. P. V.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. Insights on the Phytochemical Profile (Cyclopeptides) and Biological Activities of *Calotropis procera* Latex Organic Fractions. *The Scientific World Journal*, v. 2013, p. 1-9, 2013.

### Resumos publicados em anais de congressos:

**JUCÁ, T. L.;** RAMOS, M. V.; SOUZA, F. D.; MOREIRA, R. A.; MOREIRA, A. C. O.; MORENO, F. B. B. M. A new peptide from *Jatropha curcas* seeds: insights through sequencing and ionic mobility. In: XLII Annual Meeting of SBBq, 2013, Foz do Iguaçu.

**JUCÁ, T. L.;** RAMOS, M. V.; MORENO, F. B. B. M.; MOREIRA, R. A.; Souza, T. M.; MATOS, M. P. V.; MOREIRA, A. C. O. Insights on the phytochemical profile (cyclopeptides) and biological activities of *Calotropis procera* latex. In: XLI Annual Meeting of SBBq, 2012, Foz do Iguaçu.

### Trabalho completo publicado em anais de congresso:

**JUCÁ, T. L.;** Souza, T. M.; Almeida, V. O.; RAMOS, M. V.; MOREIRA, R. A.; MOREIRA, A. C. O. Partição, Caracterização e Prospecção de Peptídeos Bioativos do Látex de *Calotropis procera*. In: XI Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da UNIFOR, 2011, Fortaleza. Mundo Unifor, 2011.

### Apresentação de Trabalho

**JUCÁ, T. L.** Peptídeos cíclicos de plantas: Aplicações biotecnológicas. 2011. (Apresentação/Simpósio de Botânica aplicada a agricultura e saúde).

---

### Artigo completo publicado em periódico durante o doutorado, mas que não faz parte da tese:

RAMOS, M. V.; ARAÚJO, E. S.; **JUCÁ, T. L.;** MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; VASCONCELOS, I. M.; MOREIRA, R. A.; VIANA, C. A.; BELTRAMINI, L. M.; PEREIRA, D. A.; MORENO, F. B. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 58, p. 211-219, 2013.

## Research Article

# Insights on the Phytochemical Profile (Cyclopeptides) and Biological Activities of *Calotropis procera* Latex Organic Fractions

Thiago Lustosa Jucá,<sup>1</sup> Márcio Viana Ramos,<sup>1</sup> Frederico Bruno Mendes Batista Moreno,<sup>1</sup> Mayara Patrícia Viana de Matos,<sup>1</sup> José Delano Barreto Marinho-Filho,<sup>2</sup> Renato Azevedo Moreira,<sup>3</sup> and Ana Cristina de Oliveira Monteiro-Moreira<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte, Campus do Pici, 60451-970 Fortaleza, CE, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Avenue Coronel Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil

<sup>3</sup> Curso de Farmácia, Universidade de Fortaleza, Avenue Washington Soares, 1321, Bloco F, Edson Queiroz, 60811-905 Fortaleza, CE, Brazil

Correspondence should be addressed to Marcio Viana Ramos; vramos@ufc.br

Received 16 August 2013; Accepted 27 September 2013

Academic Editors: A. K. Kiemer and J. Shiea

Copyright © 2013 Thiago Lustosa Juca et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Calotropis procera* is a medicinal plant whose pharmacological properties are associated with its latex. Here, the *Calotropis procera* latex fractions were investigated in an attempt to trace its phytochemical profile and measure its anti-inflammatory and toxicity activity. The crude latex was partitioned, yielding five fractions (49.4% hexane, 5.2% dichloromethane, 2.0% ethyl acetate, 2.1% n-butanol and 41.1% aqueous). Phytochemical screening and spectroscopy analysis revealed that dichloromethane is the most chemically diverse fraction. Triterpenes were detected in both the hexane and dichloromethane fractions, while flavonoids were detected in the dichloromethane and ethyl acetate fractions. These fractions were cytotoxic to cancer cell lines (LD<sub>50</sub> 0.05 to 3.9 µg/mL) and lethal to brine shrimp (LD<sub>50</sub> 10.9 to 65.7 µg/mL). Reduced neutrophil migration in rats was observed in carrageenan-induced peritonitis for the dichloromethane (67%), ethyl acetate (56%) and aqueous (72%) fractions. A positive reaction with toluidine and ninhydrin suggested that cyclopeptides are in the ethyl acetate fraction. It is therefore concluded that *Calotropis procera* latex dichloromethane and ethyl acetate fractions exhibit both in vitro and in vivo activities as well as anti-inflammatory properties. Cyclopeptide detection is especially interesting because previous attempts to investigate these low molecular cyclic amino acid sequences in *C. procera* have failed.

## 1. Introduction

*Calotropis procera* is a medicinal plant and many pharmacological properties are associated with its latex, which is a rich source of biologically active compounds [1]. The efficacy of *C. procera* latex for treating inflammation-related disorders, pain, and other ailments, including neoplasia, in folk medicine has garnered scientific support [2–4]. However, the chemical composition of this latex remains under investigation.

Latex is produced by plants in unrelated taxonomic groups, but it is most commonly found in Euphorbiaceae and Apocynaceae plants. *C. procera* is included in the later taxon. Latex is chemically diverse and the chemical and biochemical differences are considerable for different plants fluids. For instance, *Hevea brasiliensis* latex is a rich source of (poly) isoprenes and an antifungal protein (hevein) is a “fingerprint” of this latex [5, 6]. Cardenolides in the *C. procera* latex are associated with toxic effects in mammals [7]. In addition,

insecticidal and antifungal proteins have been reported and their enzymatic profiles have been characterized [8, 9].

A series of studies support latex proteins involvement in the pharmacological properties. Although secondary metabolites have been reported in *C. procera* vegetative tissues and latex, to a lesser extent [10], limited information is available on the pharmacological properties. Fractionated latex has not been extensively investigated for phytochemical or pharmacological properties. However, the literature has demonstrated its outstanding potential for studies [1, 11]. Therefore, this study was aimed at contributing to new insights on the phytochemical profile (cyclopeptides) and biological activities of the *C. procera* latex organic fractions.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Reagents.** Organic solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and n-butanol) were of analytical grade. Carageenan, Doxorubicin, glycine, potassium dichromate, and papain (E.C. 3.4.22.2) were from SIGMA Chemical Co. (São Paulo, Brazil). Tolidine and ninhydrin were from VETEC fine chemicals (Rio de Janeiro, Brazil). Trimethylsilane (TMS), deuterated chloroform, and methanol were from Tedia Brazil (Rio de Janeiro, Brazil).

**2.2. Plant Material.** The latex was collected from the aerial portions of wild plants located at Fortaleza beaches, Ceara, Brazil. A voucher specimen (n. 32663) was deposited at the Prisco Bezerra Herbarium at the local University (Universidade Federal do Ceará).

**2.3. Extraction Method.** To 200 mL of crude latex, 400 mL of distilled water was added, and the mixture was extracted successively with 600 mL of each of the following solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and n-butanol. The extraction was repeated three times for each solvent and the resulting fractions were pooled. Each fraction was removed from the remaining mixture under reduced pressure at 40°C using an evaporator until obtaining dried fractions.

**2.4. Qualitative Phytochemical Screening.** Phytochemical tests were used to detect secondary metabolites, such as phenols, tannins, flavonoids, steroids, triterpens, saponins, and alkaloids, for each fraction in accordance with the method proposed by Matos [12]. Latex samples (25 mg/mL) were prepared in 95% ethanol and treated in an ultrasonic apparatus (30 min) prior to the measurements. The results were analyzed based on a visual observation of color modification or precipitate formation after adding specific reagents.

Tannins and phenols were investigated by adding 60  $\mu$ L of 2% FeCl<sub>3</sub> in ethanol to 3 mL of the latex sample. A blue-red soluble phase indicated phenols, a blue precipitated material indicated soluble tannins and a green color indicated condensed or cachectic tannins.

Three independent samples (3 mL) were prepared in tubes to test for flavonoids. Anthocyanins and antocyanidines were indicated by a red color after adding 0.1 M HCl to pH

3.0 or by a purple color by adding 0.1 M NaOH to pH 8.5 or blue-purple to pH 11.0. Flavones, flavonols, and xanthenes were indicated by a yellow color at pH 11.0, while flavanonols were indicated by orange-red. Chalcones and aurones were indicated by a red color at pH 3.0 and red-purple at pH 11.0, respectively.

Sterols and triterpens were investigated by dissolving 250 mg of each sample into 5 mL of chloroform. The samples were filtered and the insoluble material was used to identify saponins. Acetic anhydride (1 mL) and 60  $\mu$ L sulfuric acid (Liebermann-Burchard solution) were added to the soluble phase. A green color indicated free sterols, while a brown-red color indicated triterpens. To investigate saponins, 5 mL of distilled water was added to the precipitate and agitated for 3 min. Saponins were indicated by a persistent foam ring.

Alkaloids were indicated as follows: ammonium hydroxide was added to 3 mL of latex fractions to pH 11.0 and ether-chloroform (3 + 1) was successively added (at 30, 20 and 10 mL) using a fractionator. The ether-chloroform phase was eliminated and the extracted alkaloids were filtered in 0.1 M HCl. The resulting material was divided in three parts and an equal volume of the alkaloid precipitation solutions (Hager, Mayer and Dragendorff) was added. Flocculated material indicated a positive reaction.

**2.5. Infrared and <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy.** Infrared analyses were performed using a Perkin Elmer spectrometer (model FT-IR Spectrum 1000). Potassium bromide (KBr) was used to prepare pastilles for the samples. Prior to <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, the samples (25 mg/mL) were dissolved in deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>) and methanol (CD<sub>3</sub>OD). <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded using a Bruker Spectrometer (model Advance DPX 500) at 500 MHz. Trimethyl silane (TMS) was added as an internal standard.

**2.6. Chemical Detection of Cyclopeptides Using Tolidine and Ninhydrin.** The fractions (10 mg/mL) were dissolved in methanol and applied to a thin layer chromatography (TLC) plate with silica gel 60 F254 (Merck). The peptide-containing fractions were detected with a Cl<sub>2</sub>/o-tolidine reagent, which indicates amide groups that are typically found in peptide bonds [13]. The ninhydrin reagent was used to indicate amino groups released by HCl hydrolysis in accordance with the methodology described by Tan and Zhou [14].

### 2.7. Biological Assays

**2.7.1. Animals.** Adult male Wistar rats (180–200 g) were obtained from the Central Animal House of Universidade Federal do Ceará. The animals were maintained in a room with free access to water and commercial feed (Purina, Paulínia, SP, Brazil) at 25 (±3)°C and 70 (±5)% humidity until they were used for experiments. The animals were handled and experiments were performed in accordance with the standards described in the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” of the National Research Council and submitted for approval by the local animal ethics committee (protocol number 24/09).

Table 1: Preliminary phytochemical screening of fractions of *C. procerca latex*.

Fractions	Yield (%)	Phytochemicals						
		Phenols	Tannins	Flavonoids	Steroids	Triterpens	Saponins	Alkaloids
Hexane	49.4	-	-	-	+	+	-	-
Dichloromethane	5.2	-	-	+	+	+	-	-
Ethyl acetate	2.0	-	-	+	+	-	-	-
Butanol	2.1	-	-	-	+	-	-	-
Aqueous	41.1	-	-	-	+	-	-	-

Positive (+) sign indicates positive reaction of the compound tested while negative sign (-) indicates the absence.

Table 2: Evaluation of toxicity potential of fractions of *C. procerca latex* against cell lines and Brine shrimp nauplii.

Fractions	Sample (LC <sub>50</sub> $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )				Brine shrimp assay
	MTT assay				
	HL-60	Ovcar-8	HCT-116	SF-295	
Hexane	2.9	6.5	3.8	3.2	781.5 $\pm$ 31.2
	(2.4–3.4)	(5.6–7.6)	(3.5–4.1)	(2.7–3.8)	(721.2–843.3)
Dichloromethane	0.05	0.17	0.11	0.12	10.9 $\pm$ 0.9
	(0.04–0.06)	(0.14–0.2)	(0.1–0.13)	(0.1–0.14)	(9.3–12.7)
Ethyl acetate	1.8	3.9	1.7	1.8	65.7 $\pm$ 4.6
	(1.5–2.1)	(3.4–4.4)	(1.6–1.8)	(1.6–1.9)	(57.3–75.3)
Butanol	>100	>100	>100	>100	237.3 $\pm$ 22.3
					(195.2–284.7)
Aqueous	>100	>100	>100	>100	712.5 $\pm$ 39.9
					(636.2–792.6)
Doxorubicin	0.02	1.36	0.01	0.24	—
	(0.01–0.02)	(0.98–1.89)	(0.01–0.02)	(0.17–0.36)	
Potassium dichromate	—	—	—	—	20

\* Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Values in parenthesis represent  $\square < 0.05$ .

**2.7.2. MTT Assay.** The latex fraction cytotoxicities were evaluated for four human tumor cell lines: HL-60 (human leukemia), Ovcar-8 (human ovarian adenocarcinoma), HCT-116 (human colon cancer), and SF-295 (human glioblastoma). The cultured cell viabilities were determined by reducing the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to a blue formazan product, as previously described by Mosmann [15]. The cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin and maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. For the assay, cells were plated in 96-well plates (0.1  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL for adherent cells and 0.3  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL for suspended cells) and incubated to facilitate cell adhesion. Twenty-four hours later, fractions (100  $\mu\text{L}$ ) were added to each well (0.39–25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The mixtures were incubated for 72 hours, and thus the supernatant was replaced by fresh media with 10% MTT. The formazan product formed was dissolved in DMSO and the absorbance was measured at 595 nm (DTX-880, Beckman Coulter). Doxorubicin (0.009–5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used as a positive control.

**2.7.3. Brine Shrimp Lethality Assay.** Latex fraction toxic-

ity was further evaluated for an aquatic nontarget species (*Artemia* sp.) following the methodology described by Carvalho et al. [16]. Groups of ten *Artemia* sp. nauplii (24 hours old) received different concentrations (10–1,000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) of the extracts (100  $\mu\text{L}$ ) in triplicate. After 24 hours, the number of living animals was recorded. A standard potassium dichromate solution (LD<sub>50</sub> = 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was used as a positive control.

**2.7.4. Anti-Inflammatory Assay.** The fractions were dissolved in 5% DMSO and the insoluble materials were removed through centrifugation (10 min; 10°C; and 10,000 g). Clean samples were intravenously injected into rats ( $n = 6$ , per group) at different doses (1.0; 5.0 or 10.0 mg/kg; and 0.2 mL) 30 minutes before the carrageenan stimulus (700  $\mu\text{g}/\text{cavity}$  and i.p.). The control animals received sterile saline. Four hours later, animals were sacrificed through Halothane inhalation, and the peritoneal cavities were washed with 10 mL of sterile saline with 5 UI/mL of heparin. The fluids were recovered for a total and differential cell count using light microscopy in accordance with Souza and Ferreira [17].

**2.7.5. Hemolytic Activity.** Human erythrocytes (50 mL) were obtained from the Centre of Hematology and Hemotherapy of the State of Cear'a (Cear'a, Brazil). After three wash cycles

Table 3: Inhibitory effect of fractions of *C. procera latex* on carrageenan-induced peritonitis model.

Fractions	Neutrophils $\times 10^3$ /mL (control group)	Neutrophils $\times 10^3$ /mL (10 mg/kg)	Inhibition (%)
Hexane	2191 $\pm$ 332.0	1422 $\pm$ 265.9	—
Dichloromethane	2191 $\pm$ 332.0	720.4 $\pm$ 150.3	67
Ethyl acetate	7599 $\pm$ 383.5	3369 $\pm$ 585.6	56
Butanol	2869.25 $\pm$ 239.5	1409 $\pm$ 557.7	—
Aqueous	7515.8 $\pm$ 423.3	2118 $\pm$ 151.2	72

\* Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M ( $n = 5$ ;  $p < 0.05$ ; ANOVA followed by Bonferroni's test).

in 150 mM NaCl, erythrocytes were suspended in a washing solution at 4%.

The latex fractions were dissolved in 5% DMSO at a final concentration of 4 mg/mL. A 100  $\mu$ L aliquot of each fraction was added to 100  $\mu$ L of PBS, and serial dilution was used to determine the final concentration range from 1 to 0.07 mg/mL. Finally, 100  $\mu$ L of erythrocytes (4%) were incubated in MicroAmp 96-well plates for 30 min at 37°C. The plate was then centrifuged (700 g for 10 min at 4°C) to remove the lysed cells. Hemoglobin content was determined using the supernatant through spectrophotometry at 540 nm and correlated with the erythrocyte lysate. The cells' maximum lysate values (100%) were determined by incubating an erythrocyte suspension with 0.1% (v/v) of Triton X-100. The experiments were performed in triplicate. The percentage of hemolysis (H) was calculated using the following equation:  $H = 100 \times [(Op - Ob)/(Ot - Ob)]$ , where Op is the density for a given fraction concentration, Ob is the PBS buffer density, and Ot is the triton X-100 positive control density.

**2.8. Statistical Analyses.** All results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. The data were analyzed by one-way ANOVA for multiple comparisons, followed by Bonferroni's test in anti-inflammatory assays.  $p < 0.05$  was considered statistically significant in all analyses.

### 3. Results and Discussion

**3.1. Phytochemical Profile.** Latex from *C. procera* has been described as an important source of secondary metabolites [10]. In this study, the latex was fractionated and qualitatively evaluated. Phenols, tannins, saponins, and alkaloids were not detected through phytochemical screening. Nevertheless, compounds in these groups were reported for nonlatex organs and tissues in *C. procera* [1, 11, 18, 19]. However, compounds with such chemical characteristics were reported in latex for Euphorbiaceae, Convolvulaceae, Anacardiaceae, and Papaveraceae plants [20]. Therefore, *C. procera* (Apocynaceae) latex is chemically distinct. Steroids, flavonoids, and triterpens were detected in at least two distinct latex fractions (Table 1). Such a profile was previously reported for *C. procera* latex and other fractions [10, 21]. Triterpens (isoprene derivatives) are the most abundant and common molecules in natural rubbers [22].

Further analyses on the chemical diversity of latex fraction were performed using FT-IR and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopic techniques (Figure 1). The most hydrophobic fractions, hexane and dichloromethane, produced different FT-IR spectra which in turn were distinct from the ethyl acetate, butanol, and aqueous fractions, which produced almost identical spectra.

Hydroxyl groups (OH) with peaks at  $\sim 3400$   $\text{cm}^{-1}$  were in all of the fractions. The infrared spectra for hexane and dichloromethane presented peaks at 2961–2854  $\text{cm}^{-1}$ , which confirmed C–H stretching in methyl or methylene groups. The peaks at 1723  $\text{cm}^{-1}$  showed C=O stretching or methyl group asymmetrical deformations/vibrations. Additional peaks at 1450  $\text{cm}^{-1}$  (C–H deformation) and 1350  $\text{cm}^{-1}$  (C–H deformation in CH<sub>3</sub>) were also observed. These prominent peak signals were decreased in the dichloromethane fraction.

Poly-isoprene, which is the precursor for rubber polymers, was detected in abundance for the hydrocarbon fractions as first described by Kalita and Saikia [22]. According to the hexane and dichloromethane IR spectra (Figure 1), *C. procera* (poly) isoprene is likely common to both hydrophobic fractions. This is consistent with the data in Table 1.

The ethyl acetate, butanol, and aqueous infrared fraction peaks were detected at  $\sim 1645$   $\text{cm}^{-1}$ . Thus, they were assigned to the double bond (C=C) and 1100–1080  $\text{cm}^{-1}$  for C–O stretching. The infrared spectrum for the aqueous fraction produced signals at 1093  $\text{cm}^{-1}$  (C–O stretching). This peak was stronger than in both the ethyl acetate and butanol fractions, which is expected given the higher polarity of the sample. These data are also supported by the data in Table 1, which is suggestive of steroids.

<sup>1</sup>H-NMR spectra in the high field region showed remarkably high proton levels (hexane and dichloromethane) assigned to aliphatic chain CH<sub>3</sub> and CH<sub>2</sub> groups. Residual protons that were similar were also observed in the ethyl acetate, butanol and aqueous spectra (Figure 1). <sup>1</sup>H-NMR spectra for the dichloromethane fraction showed peaks at the middle-field region assigned to olefinic-like protons commonly observed in natural rubbers [22]. In the aqueous fraction, the peaks were primarily assigned to protons bound to oxygenated carbons. Peaks in the low-field region were observed both for hexane as well as dichloromethane and were likely aromatic molecules. The <sup>1</sup>H-NMR results showed that dichloromethane was the most complex fraction with hydrogen chemical shifts in the low, middle and high fields. These findings are consistent with phytochemical screening

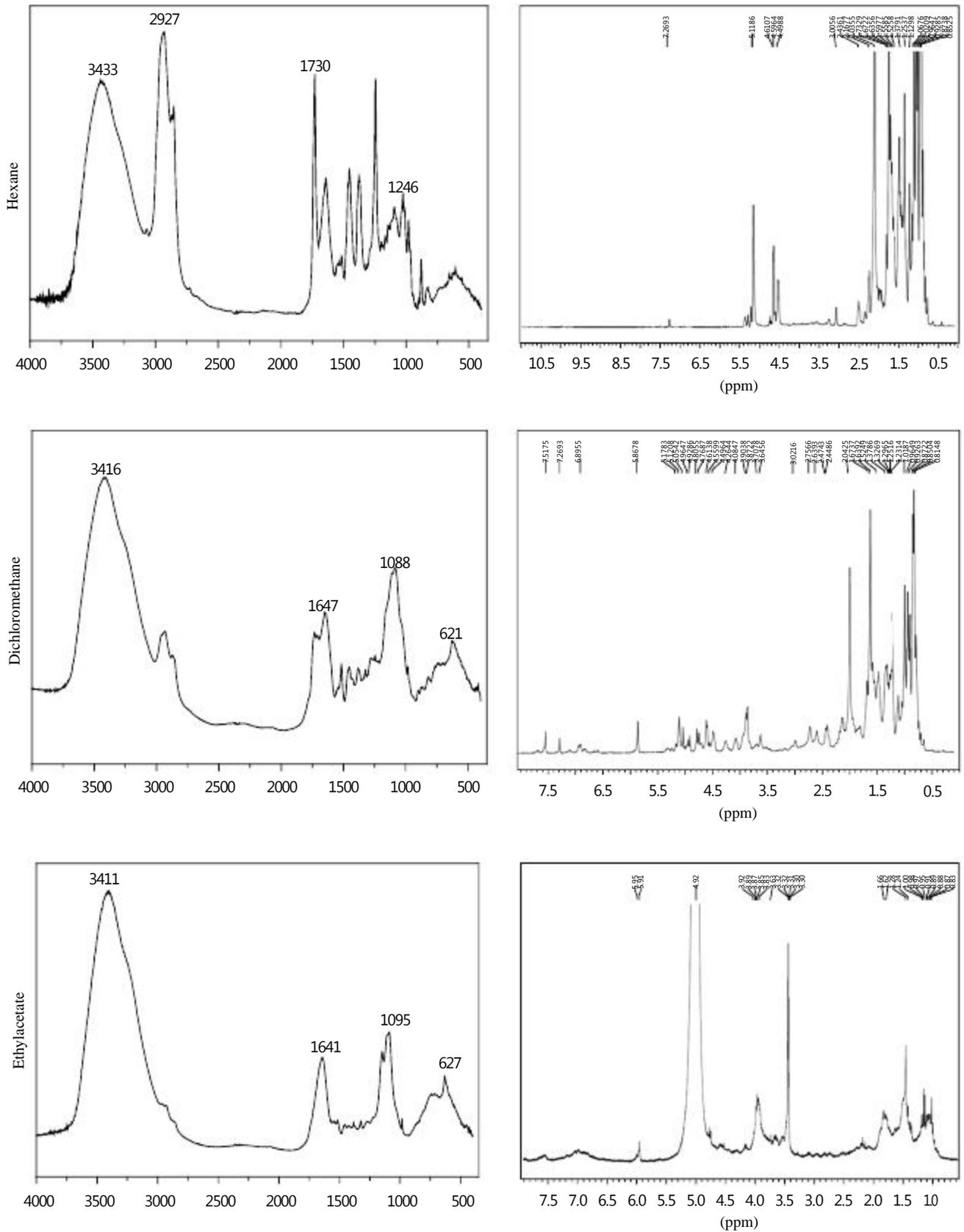


Figure 1: Continued.

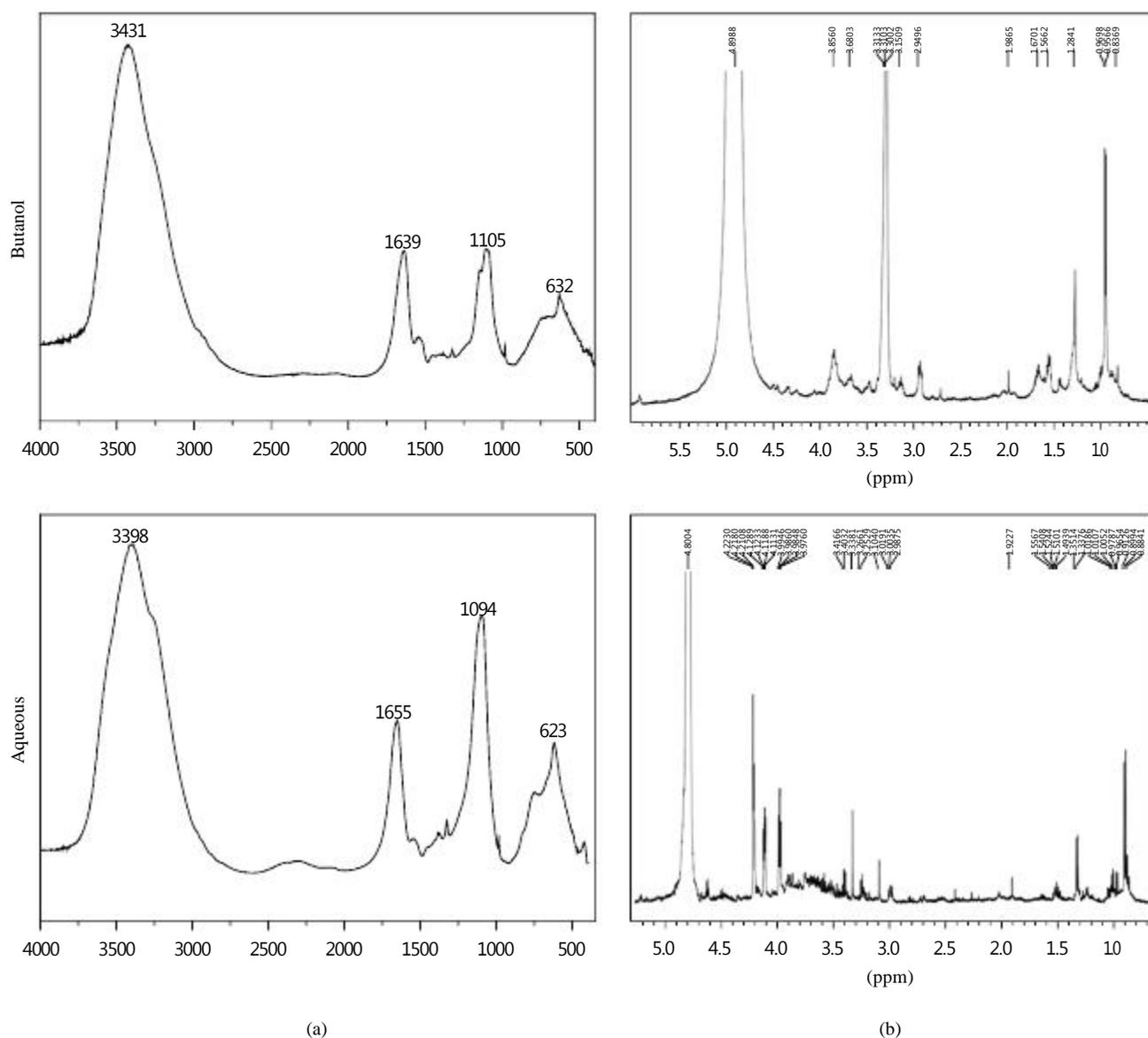


Figure 1: Fingerprinting analysis for *C. procera* latex fractions through infrared spectroscopy (left panel) and <sup>1</sup>H-RMN (right panel).

(Table 1) showing triterpens, steroids, and flavonoids in the latex, which is also supported by the literature [10].

#### 4. Toxicity

The cytotoxicity of *C. procera* latex fractions was investigated using the MTT assay in four tumor cell lines (HL-60, Ovarcar-8, HCT-116 and SF-295). The more hydrophobic fractions (hexane, dichloromethane, and ethyl acetate) were cytotoxic to the tumor cells tested with LD<sub>50</sub> values that ranged from 0.05 to 6.5 μg/mL (Table 2). The hydrophilic fractions (butanol and aqueous) were not cytotoxic. Sawadogo et al. [23] reviewed West African plants with anticancer properties. Three anticancer cardenolides (2<sup>nd</sup>-Oxovoruscharin, uscharin and voruscharin) isolated from *C. procera* were reported as highly antiproliferative to different cancer cell lines (Hs683,

U373, HCT-15, LoVo and A549); the latter two are in latex [10]. *C. procera* methanolic extract is cytotoxic to cancer cell lines and exhibits chemopreventive activity in vitro and in vivo in hepatocellular carcinoma [4]. More recently, studies by Juncker et al. [24] showed potential for UB450, which is a hemisynthetic cardenolide, to repress cancer cell proliferation and induce cell death.

Finally, Magalhães et al. [25] showed that ethyl acetate, acetone, and methanol stem extract from *C. procera* are promising due to in vitro antiproliferative activity on cancer cell lines. It should also be noted that selective cytotoxicity and in vivo anticancer properties have been reported in the latex protein fractions [26, 27]. The five fractions tested were not hemolytic for human erythrocytes at concentrations up to 1 mg/mL.

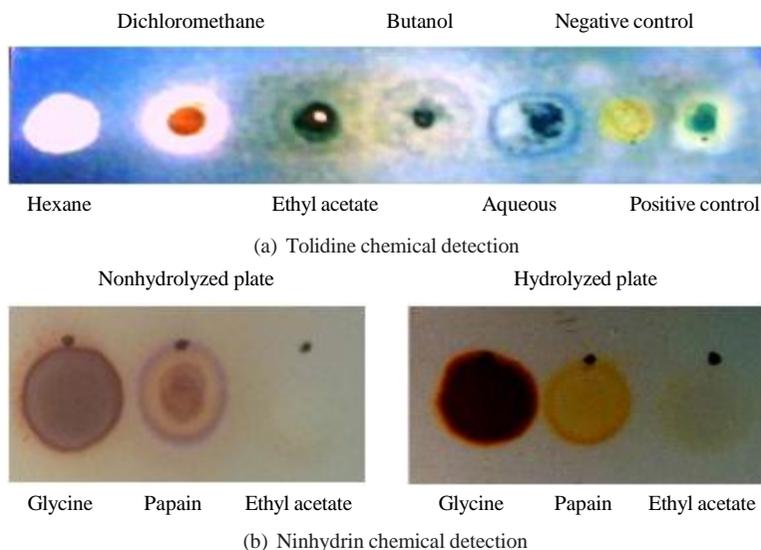


Figure 2: Cyclopeptides in ethyl acetate fraction from *C. procera* are confirmed by tolidine (a) and ninhydrin chemical detection (b).

*C. procera* latex fraction toxicity was further examined using the brine shrimp lethality bioassay. As shown in Table 2, the LD<sub>50</sub> values determined for dichloromethane and ethyl acetate suggested that these fractions were cytotoxic. These data are supported by in vivo studies that correlated bioactive plants constituents and toxicity [28]. Certain consistent reports in the literature also show that plant extracts with LD<sub>50</sub> values lower than 250 µg/mL are significantly toxic [29, 30]. The dichloromethane LD<sub>50</sub> value was lower than cyclophosphamide (LD<sub>50</sub> 16.3 µg/mL), which was used as positive control in the study by Moshi et al. [31]. The LD<sub>50</sub> values determined for the other fractions were higher and suggested no acute toxicity for such fractions.

## 5. Folk Use and Anti-Inflammation

Anti-inflammatory activity is among different uses for *C. procera* in folk medicine. In fact, numerous scientific reports have confirmed and extensively characterized its anti-inflammatory activity in different models [3, 32]. Dichloromethane, ethyl acetate, and aqueous fractions inhibited carrageenan-induced neutrophil migration in rats at the ratios 67%, 56%, and 72%, respectively (Table 3).

Both the hexane and butanol fractions did not inhibit neutrophil migration. Kumar and colleagues have extensively demonstrated and characterized anti-inflammatory activity in aqueous and alcoholic *C. procera* latex extracts [33, 34]. Seddek et al. [35] studied water-soluble *C. procera* latex extract and demonstrated that it enhances iNOS gene expression as well as NO production in murine macrophages, which facilitate inflammatory and immune response effector cell activation. More recently, Tour and Talele [36] reported that both the chloroform and hydroalcoholic extracts from *C. procera* stem bark at 200 and 400 mg/kg exhibited anti-inflammatory activity, respectively. In addition, chloroform

extract at 400 mg/kg exhibited a significant gastromucosal protective effect.

## 6. Cyclopeptides in Latex

Ethyl acetate, butanol, and aqueous fractions reacted positively with the Cl<sub>2</sub>/o-tolidine reagent (Figure 2), which indicates amide groups that are typically in peptide bonds according to Van Den Berg et al. [37].

Plants in different angiosperm families are notorious for accumulating peptides, primarily cyclic peptides (Annonaceae, Caryophyllaceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, and Violaceae) [38, 39]. Likewise, peptides/cyclopeptides have been described for laticiferous plants in the *Jatropha* genus, for which many isolated peptides were characterized (Integerrimides, curcacyclines, jatrophidin, pohlianin, podacycline, cyclogossines, chevalierins, and mahafacyclin) [40]. The cyclic peptide purified from the *Stephanotis floribunda* stem is the only report for such molecules in Asclepiadaceae members [41]. Thus, we examined the most promising ethyl acetate fraction for cyclopeptides.

Many reports in the literature have shown that cyclopeptides from laticiferous plants have been isolated from the ethyl acetate fraction [40, 42, 43]. Thus, considering that this *C. procera* fraction was cytotoxic and anti-inflammatory and reacted positively for amide groups, it was reexamined using ninhydrin. Ninhydrin reacts with free amino groups (typically in proteins). As shown in Figure 2, ninhydrin reacted positively with papain (protein) and glycine (free amino acid), which were the positive controls, and did not react with the ethyl acetate fraction, which suggests no free/accessible amino groups in the latter sample. However, after chemical hydrolysis by 6M HCl, the ethyl acetate fraction reacted positively with ninhydrin, which suggests free amino groups. Therefore, it was concluded that cyclopeptides are in this latex fraction.

Cyclopeptides with cytotoxicity and anticancer properties were reported in the roots and other tissues for different plants [44–47]. The study by Mongkolvisut et al. [48] is the only manuscript that has reported latex cyclopeptides (Integerrimides A and B) with a proliferative effect on human IPC-298 melanoma cells and a migration effect on human Capan II pancreatic carcinoma cells. More recently, studies have reported three new cyclopeptides that exhibited anti-inflammatory activity in vitro using the J774.1 macrophage model [49]. These results imply that cyclopeptides from *C. procera* latex are involved in the ethyl acetate fraction pharmacological properties. Cyclopeptide detection is especially relevant because, until now, attempts to investigate these low molecular cyclic amino acid sequences in *C. procera* have failed. Purification and structural analyses for such molecules are currently the greatest challenge in the field.

## 7. Conclusions

The work herein shows that the *C. procera* latex dichloromethane and ethyl acetate fractions exhibit potential toxicity both in vitro and in vivo as well as anti-inflammatory properties. *C. procera* latex cyclopeptides will be the next materials used in the investigations for compounds involved in the latex pharmacological properties.

## Abbreviations

FT-IR: fourier transform infrared spectroscopy  
NO: nitric oxide.

## Acknowledgement

The authors are thankful to Dr. Edilberto Rocha Silveira from CENAUREN (Northeastern Center of Application and Use of Nuclear Magnetic Resonance, Fortaleza-CE, Brazil) for providing experimental facilities to conduct the work herein, primarily the spectroscopy analyses.

## References

- [1] S. J. Chundattu, V. K. Agrawal, and N. Ganesh, "Phytochemical investigation of *Calotropis procera*," *Arabian Journal of Chemistry*, 2011.
- [2] N. M. N. Alencar, J. S. Oliveira, R. O. Mesquita et al., "Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis," *Inflammation Research*, vol. 55, no. 12, pp. 559–564, 2006.
- [3] V. L. Kumar and S. Arya, "Medicinal uses and pharmacological properties of *Calotropis procera*," in *Recent Progress in Medicinal Planta*, J. N. Govil, Ed., vol. 11, pp. 373–388, Texas Studium Press, 2006.
- [4] T. Choedon, G. Mathan, S. Arya, V. L. Kumar, and V. Kumar, "Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 12, no. 16, pp. 2517–2522, 2006.
- [5] S. K. Oh, H. Kang, D. H. Shin, J. Yang, and K. H. Han, "Molecular cloning and characterization of a functional cDNA clone encoding isopentenyl diphosphate isomerase from *Hevea brasiliensis*," *Journal of Plant Physiology*, vol. 157, no. 5, pp. 549–557, 2000.
- [6] J. V. Parijs, W. F. Broekaert, I. J. Goldstein, and W. J. Peumans, "Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex," *Planta*, vol. 183, no. 2, pp. 258–264, 1991.
- [7] M. H. A. Elgamal, A. G. Hanna, N. A. M. Morsy et al., "Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C signal assignments of 5β-cardenolides isolated from *Calotropis procera* R. Br.," *Journal of Molecular Structure*, vol. 477, no. 1–3, pp. 201–208, 1999.
- [8] D. T. C. Freitas, F. C. S. Nogueira, I. M. Vasconcelos, J. T. A. Oliveira, G. B. Domont, and M. V. Ramos, "Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: biochemical characterization, biological activity and role in plant defense," *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 49, no. 7, pp. 738–743, 2011.
- [9] M. V. Ramos, T. B. Grangeiro, E. A. Freire et al., "The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects," *Arthropod-Plant Interactions*, vol. 4, no. 1, pp. 57–67, 2010.
- [10] A. K. Meena, A. K. Yadav, U. S. Niranjana et al., "A review on *Calotropis procera* Linn and its ethnobotany, phytochemical, pharmacological profile," *Drug Invention Today*, vol. 2, no. 2, pp. 185–190, 2010.
- [11] Y. Murti and B. Yogi D, "Pathak Pharmacognostic standartization of leaves of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Asclepiadaceae)," *International Journal of Ayurveda Research*, vol. 1, no. 1, 2010.
- [12] F. J. A. Matos, *Introdução A Fitoquímica Experimental*, Edições UFC, Fortaleza, Brazil, 1997.
- [13] S. F. A. J. Horsten, *Cyclic Peptides in the Genus Jatropha (Euphorbiaceae)*, Docteur Faculteit Pharmacie, Universiteit Utrecht, Utrecht, 1995.
- [14] N. H. Tan and J. Zhou, "Application of a new TLC chemical method for detection of cyclopeptides in plants," *Chinese Science Bulletin*, vol. 45, no. 20, 2000.
- [15] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55–63, 1983.
- [16] A. F. U. Carvalho, V. M. Melo, L. M. B. A. Aguiar, and F. J. A. Matos, "Avaliação da toxicidade de extratos de plantas medicinais através de bioensaio com *Artemia salina*," *Leach Ciência E Cultura*, vol. 40, pp. 1109–1111, 1998.
- [17] G. E. P. Souza and S. H. Ferreira, "Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity," *Agents Actions*, vol. 17, pp. 1–5, 1985.
- [18] M. M. Mainasara, B. L. Aliero, A. A. Aliero, and S. S. Dahiru, "Phytochemical and antibacterial properties of *Calotropis Procera* (Ait.) R. Br. (Sodom Apple) fruit and bark extracts," *International Journal of Modern Botany*, vol. 1, no. 1, pp. 8–11, 2011.
- [19] H. Doshi, H. Satodiya, M. C. Thakur, F. Parabia, and A. Khan, "Phytochemical screening and biological activity of *Calotropis Procera* (Ait.) R.Br. (Asclepiadaceae) against selected bacteria and *Anopheles stephansi* Larvae," *International Journal of Plant Research*, vol. 1, no. 1, pp. 29–33, 2011.
- [20] K. Konno, "Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein," *Phytochemistry*, vol. 72, no. 13, pp. 1510–1530, 2011.
- [21] K. H. Shaker, N. Morsy, H. Zinecker, J. F. Imhoff, and B. Schneider, "Secondary metabolites from *Calotropis procera* (Aiton)," *Phytochemistry Letters*, vol. 3, no. 4, pp. 212–216, 2010.

- [22] D. Kalita and C. N. Saikia, "Chemical constituents and energy content of some latex bearing plants," *Bioresource Technology*, vol. 92, no. 3, pp. 219–227, 2004.
- [23] W. R. Sawadogo, M. Schumacher, M. H. Teiten, M. Dicato, and M. Diederich, "Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy," *Biochemical Pharmacology*, vol. 84, pp. 1225–1240, 2013.
- [24] T. Juncker, M. Schumacher, M. Dicato, and M. Diederich, "UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death," *Biochemical Pharmacology*, vol. 78, no. 1, pp. 1–10, 2009.
- [25] H. I. F. Magalhães, P. M. P. Ferreira, E. S. Moura et al., "In vitro and in vivo antiproliferative activity of *calotropis procera* stem extracts," *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, vol. 82, no. 2, pp. 407–416, 2010.
- [26] J. S. Oliveira, L. V. Costa-Lotufo, D. P. Bezerra et al., "In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*," *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, vol. 382, no. 2, pp. 139–149, 2010.
- [27] J. Soares de Oliveira, D. Pereira Bezerra, C. D. Teixeira de Freitas et al., "In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.," *Toxicology in Vitro*, vol. 21, no. 8, pp. 1563–1573, 2007.
- [28] M. A. Morshed, A. Uddin, A. Rahman et al., "In vitro antimicrobial and cytotoxicity screening of *Terminalia arjuna* ethanol extract," *International Journal of Biosciences*, vol. 1, no. 2, pp. 31–38, 2011.
- [29] M. J. Rieser, Z.-M. Gu, X.-P. Fang, L. Zeng, K. V. Wood, and J. L. McLaughlin, "Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*," *Journal of Natural Products*, vol. 59, no. 2, pp. 100–108, 1996.
- [30] B. N. Meyer, N. R. Ferrigni, and J. E. Putnam, "Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents," *Planta Medica*, vol. 45, no. 1, pp. 31–34, 1982.
- [31] M. J. Moshi, J. C. Cosam, Z. H. Mbwambo, M. Kapingu, and M. H. H. Nkunya, "Testing beyond ethnomedical claims: brine shrimp lethality of some Tanzanian plants," *Pharmaceutical Biology*, vol. 42, no. 7, pp. 547–551, 2004.
- [32] V. L. Kumar and S. Roy, "Calotropis procera latex extract affords protection against inflammation and oxidative stress in Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis in rats," *Mediators of Inflammation*, vol. 2007, Article ID 47523, 7 pages, 2007.
- [33] V. L. Kumar and S. Roy, "Protective effect of latex of *Calotropis procera* in Freund's Complete Adjuvant induced monoarthritis," *Phytotherapy Research*, vol. 23, no. 1, pp. 1–5, 2009.
- [34] V. L. Kumar, P. Chaudhary, M. V. Ramos, M. Mohan, and M. P. V. Matos, "Protective effect of proteins derived from the Latex of *Calotropis procera* against inflammatory hyperalgesia in monoarthritic rats," *Phytotherapy Research*, vol. 25, no. 9, pp. 1336–1341, 2011.
- [35] A. L. S. Seddek, M. E. Mahmoud, T. Shiina et al., "Extract from *Calotropis procera* latex activates murine macrophages," *Journal of Natural Medicines*, vol. 63, no. 3, pp. 297–303, 2009.
- [36] N. Tour and G. Talele, "Anti-inflammatory and gastromucosal protective effects of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) stem bark," *Journal of Natural Medicines*, vol. 65, no. 3–4, pp. 598–605, 2011.
- [37] A. J. J. Van Den Berg, S. F. A. J. Horsten, J. J. Kettenes-Van Den Bosch et al., "Curcacycline A—a novel cyclic octapeptide isolated from the latex of *Jatropha curcas* L.," *FEBS Letters*, vol. 358, no. 3, pp. 215–218, 1995.
- [38] N.-H. Tan and J. Zhou, "Plant cyclopeptides," *Chemical Reviews*, vol. 106, no. 3, pp. 840–895, 2006.
- [39] D. G. Picchi, W. F. Altei, M. S. Saito, V. S. Bolzani, and E. M. Cilli, "Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese, e atividades biológicas," *Química Nova*, vol. 32, no. 5, pp. 1262–1277, 2009.
- [40] X.-P. Zhang, M.-L. Zhang, X.-H. Su, C.-H. Huo, Y.-C. Gu, and Q.-W. Shi, "Chemical constituents of the plants from genus *Jatropha*," *Chemistry and Biodiversity*, vol. 6, no. 12, pp. 2166–2183, 2009.
- [41] K. Yoshikawa, S. Tao, and S. Arihara, "Stephanotic acid, a novel cyclic pentapeptide from the stem of *Stephanotis floribunda*," *Journal of Natural Products*, vol. 63, no. 4, pp. 540–542, 2000.
- [42] C. Baraguey, C. Auvin-Guette, A. Blond et al., "Isolation, structure and synthesis of chevalierins A, B and C, cyclic peptides from the latex of *Jatropha chevalieri*," *Journal of Chemical Society Perkins*, vol. 1, no. 1, pp. 3033–3039, 1998.
- [43] A. J. J. Van Den Berg, S. F. A. J. Horsten, J. J. Kettenes-Van Den Bosch et al., "Podacycline A and B, two cyclic peptides in the latex of *Jatropha podagrica*," *Phytochemistry*, vol. 42, no. 1, pp. 129–133, 1996.
- [44] R. Cozzolino, P. Palladino, F. Rossi, G. Cal'i, E. Benedetti, and P. Laccetti, "Antineoplastic cyclic astin analogues kill tumour cells via caspase-mediated induction of apoptosis," *Carcinogenesis*, vol. 26, no. 4, pp. 733–739, 2005.
- [45] A. W'e'è, Y. Zhang, I. Ndoye, J.-P. Brouard, J.-L. Pousset, and B. Bodo, "A cytotoxic cyclic heptapeptide from the seeds of *Annona cherimola*," *Journal of Natural Products*, vol. 67, no. 9, pp. 1577–1579, 2004.
- [46] P.-W. Hsieh, F.-R. Chang, C.-C. Wu et al., "New cytotoxic cyclic peptides and dianthramide from *Dianthus superbus*," *Journal of Natural Products*, vol. 67, no. 9, pp. 1522–1527, 2004.
- [47] A. Napolitano, M. Rodriguez, I. Bruno et al., "Synthesis, structural aspects and cytotoxicity of the natural cyclopeptides yunnanins A, C and phakellistatins 1, 10," *Tetrahedron*, vol. 59, no. 51, pp. 10203–10211, 2003.
- [48] W. Mongkolvisut, S. Sutthivaiyakit, H. Leutbecher et al., "Integerrimides A and B, cyclic heptapeptides from the latex of *Jatropha integerrima*," *Journal of Natural Products*, vol. 69, pp. 1435–1144, 2006.
- [49] P.-H. Chuang, P.-W. Hsieh, Y.-L. Yang et al., "Cyclopeptides with anti-inflammatory activity from seeds of *Annona montana*," *Journal of Natural Products*, vol. 71, no. 8, pp. 1365–1370, 2008.