

Ciclótidos de la especie *Guettarda crispiflora* (Rubiaceae)

Cyclotides from the specie *Guettarda crispiflora* (Rubiaceae)

Lina María González Cadavid, Oscar Marino Mosquera Martínez, Jaime Niño Osorio

Escuela de Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia

lmgc0909@gmail.com

omosquer@utp.edu.co

Resumen— En este estudio se obtuvieron los extractos de diclorometano e hidrometanólico de *G. crispiflora*. El extracto hidrometanólico fue purificado con poliamida DPA 6S y posteriormente por sílica gel en fase reversa (C₁₈). La purificación final se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) preparativa y la presencia de los péptidos fue evidenciada en cromatografía de capa delgada en sílica gel y por electroforesis en geles de poli(acrilamida) desnaturizante. Los ciclótidos obtenidos fueron parcialmente caracterizados por espectrometría de masas (LC-MS).

Adicionalmente, los extractos crudos y las fracciones cromatográficas obtenidas de *G. crispiflora* fueron evaluadas contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, por el método de difusión en agar, pero no presentaron actividad antimicrobiana a las concentraciones evaluadas.

Palabras clave— Actividad antimicrobiana, HPLC, Péptidos cíclicos, tricina-SDS-PAGE.

Abstract— In this study were obtained the methanolic and dichloromethane extracts from *Guettarda crispiflora*. The methanolic extract was purified with polyamide DPA 6S and by reversed-phase silica gel C₁₈. The cyclotides final purification was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and the presence of peptides was showed by electrophoresis on denaturing polyacrilamide gels (Tricine-SDS-PAGE). The peptides obtained were partially characterized by LC-MS.

In addition, the crude extracts and fractions of *G. crispiflora* were assayed against microbial strains *Bacillus subtilis* (ATCC 21556), *Escherichia coli* (ATCC 9637), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), by the agar well diffusion method, in this study the extracts not showed antimicrobial activity whit the concentrations used.

Key Word — Antimicrobial activity, HPLC, Cyclic peptides, Tricine-SDS-PAGE.

I. INTRODUCCIÓN

Los ciclótidos son péptidos con 28 a 37 residuos de aminoácidos, con esqueleto cíclico continuo de uniones

peptídicas que contienen seis residuos de cisteína que forman 3 puentes disulfuros los cuales estabilizan la molécula, dos enlazan extremos opuestos de los segmentos peptídicos del anillo, los cuales a su vez son atravesados por un tercer puente disulfuro. Esta característica conocida como el nudo cíclico de cisteína (NCC) le proporciona a los ciclótidos alta estabilidad a la degradación térmica, enzimática y química [1]. Debido a su estructura bien definida, su gran estabilidad y por su origen biosintético estas moléculas pueden ser consideradas como miniproteínas [2].

Los ciclótidos se encuentran en dos grandes familias de plantas: Rubiaceae y Violaceae, pero en la primera han sido poco estudiados [3], lo cual los convirtió en un foco de investigación interesante para el aislamiento de estas miniproteínas bioactivas. Los ciclótidos por su estructura se han dividido en dos subfamilias, Möbius y Brazalete; la primera, está caracterizada por la presencia de *cis*-prolina en la vuelta cinco; mientras, que en la segunda este aminoácido está ausente. Las subfamilias también se diferencian por el tamaño y el contenido de aminoácidos, los ciclótidos del tipo brazalete son los más diversos estructuralmente [4].

Los ciclótidos tienen un amplio rango de bioactividades incluyendo, insecticida, antimicrobiana, anti-VIH, citotóxica, hemolítica, antagonista de neurotensina, uterotónica e inhibidora de la tripsina. Por lo cual, se constituyen en un conjunto de péptidos con propiedades farmacológicas muy futuristas [5]. Con base en la alta distribución de la familia Rubiaceae en Colombia [6] y debido a que aún no se han realizado estudios de ciclótidos con especies colombianas, se seleccionó la especie *Guettarda crispiflora* para analizar este tipo de compuestos en el género *Guettarda* [7].

II. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Material vegetal

Ramas de *G. crispiflora* (Rubiaceae) fueron recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU) (Risardala, Colombia) en julio de 2006 y clasificada por el profesor Francisco Javier Roldán. Un voucher (FJR 4023) de la planta

recolectada fue depositado en el Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA, Medellín, Colombia).

B. Extracción

El material vegetal recolectado fue extraído según el procedimiento descrito por Niño et al. [8]. En resumen, la parte aérea de la planta se secó a 50 °C, se molió y se extrajo durante 48 h tres veces con *n*-hexanos a temperatura ambiente para así obtener el extracto de hexano. Luego, de manera similar a la del hexano, el marco se extrajo secuencialmente con diclorometano (DCM) y metanol-agua (MeOH-H₂O, 6:4) obteniéndose los extractos de DCM y MeOH-H₂O. Posteriormente, los diversos extractos fueron concentrados a sequedad a presión reducida y almacenados a -10 °C hasta su utilización en la identificación y determinación de la actividad biológica.

C. Separación de los ciclótidos.

Se utilizó el protocolo descrito por Claeson et al. [9], con algunas modificaciones. Alícuotas del extracto hidrometanólico fueron aciduladas con ácido acético al 2% antes de la aplicación en la columna de poliamida DPA 6S (45 x 2 cm). Los péptidos se eluyeron con ácido acético al 2%, luego con etanol 50% / ácido acético al 2% (1:1) obteniéndose las fracciones PF-1 y PF-2, respectivamente. Posteriormente, estas fracciones fueron analizadas por cromatografía de columna flash utilizando como soporte octadecilsilano (C₁₈) (45 x 4.5 cm) a través de un gradiente lineal con ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% / CH₃CN (0:100%). De esta manera, se obtuvieron 4 fracciones enriquecidas en estas miniproteínas.

D. Aislamiento y caracterización de los ciclótidos.

Para la separación y purificación de los ciclótidos se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) a nivel analítica y preparativa.

E. Condiciones del HPLC analítico

Se utilizó un equipo HPLC Agilent 1100. Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes: Columna Hypersil ODS (5 µm, 250 x 4 mm), el eluyente fue un gradiente de 10%-90% CH₃CN en 0.05% TFA por 50 min con un flujo de 1 mL/min, se utilizó un detector de arreglo de diodos (DAD) a 215, 254 y 280 nm. Se inyectaron 20 µL de cada muestra, a una concentración de 10000 mg/L.

F. Condiciones del HPLC preparativo

Para la separación y purificación de los ciclótidos se utilizó un equipo preparativo de HPLC Agilent 1100, utilizando las siguientes condiciones cromatográficas: Columna Zorbax SB – C18 (7 µm, 250 x 21.2 mm), el eluyente fue

CH₃CN en 0.05% TFA 80%-20% por 20 min con un flujo de 10 mL/min, las muestras se detectaron a 220 y 280 nm. Se inyectó 1 mL de cada muestra.

G. Detección de ciclótidos por cromatografía en capa delgada (CCD)

Las fracciones purificadas por HPLC se evaluaron por CCD siguiendo el protocolo de Yan et al. [10]. Las muestras fueron sembradas en cinco placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (6x5 cm); el sistema de elución empleado fue *n*-butanol-ácido acético-agua (3:1:1). La primera placa se reveló con yodo, la segunda con el reactivo de Dragendorff, la tercera con ninhidrina y la cuarta con azul de Coomassie G-250. En el revelado con ninhidrina se utilizaron dos placas, una hidrolizada y la otra sin hidrolizar. La placa hidrolizada fue depositada en un vial con HCl (37%) y se llevó a una estufa a 110 °C por 2 h para permitir la hidrólisis de los ciclótidos presentes en las muestras; luego fue revelada con el reactivo de ninhidrina.

H. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodesilsulfato de sodio y tricina (Tricina-SDS-PAGE).

Las fracciones obtenidas se sometieron a análisis de Tricina-SDS-PAGE según el protocolo de Schagger [11]. Se utilizó una cámara de electroforesis vertical Protean II (Bio-Rad). Las condiciones de la corrida fueron las siguientes: voltaje inicial 30 V, luego se incrementó a 200 V y una Corriente de 80 mA. Para la visualización de las proteínas se utilizó la tinción con azul de Coomassie 0.025% en 10% de ácido acético y nitrato de plata 0.1%.

I. Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (LC-MS)

Para la identificación de los ciclótidos se utilizó un equipo LC-EM Agilent 1100 con trampa de iones, en modo ion positivo. Con una fuente nanoESI, temperatura de volatilización del solvente 235 °C y con adquisición de datos desde 200 hasta 4000 m/z. El eluyente fue un gradiente de 10-60% CH₃CN en 0.1% HCO₂H por 80 min, con un flujo de 0.3 µL/min. El volumen de inyección fue de 2 µL.

J. Bioensayo de actividad antibacteriana

1. Microorganismos.

Se emplearon las bacterias Gram-positivas *Bacillus subtilis* (ATCC 21556) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Así como las Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 9637) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Las bacterias se encontraban en el laboratorio del GB-PN conservadas en agar BHI a temperatura ambiente. Una porción de ellas se resuspendió en caldo BHI estéril durante 24 horas para activar su crecimiento; posteriormente, el microorganismo correspondiente se diluyó con una solución salina al 0.85% hasta obtener una tramitancia del 25% a 300, 420, 300 y 420 nm,

respectivamente, la cual fue utilizada como inóculo en el bioensayo.

2. Preparación de las muestras evaluadas y de los respectivos controles.

Tanto los extractos crudos de DCM y MeOH-H₂O como las fracciones obtenidas de las columnas de poliamida y C₁₈, fueron evaluadas a concentraciones de 4000, 2000, 1000, 500 y 250 mg/L, preparadas a partir de un patrón de 10000 mg/L utilizando como disolvente DMSO-EtOH (40:60) y EtOH-H₂O (12:88), respectivamente; estas proporciones correspondieron a la concentración de los solventes de las soluciones evaluadas a mayor concentración (4000 mg/L) y por lo tanto constituyeron los controles negativos para cada tipo de extracto. Como control positivo se utilizó cefotaxima a 250 mg/L para *S. aureus* y *E. coli*, 500 mg/L para *B. subtilis* y 4000 mg/L con *P. aeruginosa*.

3. Realización del bioensayo.

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó mediante el método de difusión en pozo en agar descrito por Ríos et al. [12], para lo cual se adicionó 1 mL del inóculo a una caja de petri, sobre la cual se virtieron posteriormente veinte (20) mL de agar Müeller Hinton II entre 30-40°C (esterilizado previamente en autoclave durante 20 min a 121°C y 15 psi). Una vez solidificado el agar, se realizaron 7 pozos de 6.0 mm de diámetro, en los cuales secuencialmente se depositaron veinte (20) µL de las soluciones de los extractos y fracciones a evaluar, así como de los respectivos controles positivo y negativo. Las cajas de Petri fueron incubadas a 37° C por 24 h y finalmente los halos de inhibición presentes en cada caja se midieron. El bioensayo fue realizado por triplicado con 2 repeticiones en fechas diferentes.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Obtención y fraccionamiento de extractos de *G. crispiflora* (Rubiaceae)

En la tabla 1 se presenta la masa de los extractos de diclorometano y metanol-agua (6:4) obtenidos de *G. crispiflora* después de la extracción de 500 g del material vegetal como se describió en 2.2.

Extracto	Masa (g)
DCM	9,0936
MeOH-H ₂ O (6:4)	42,5544

Tabla 1. Masa de los extractos obtenidos de *G. crispiflora*.

Posteriormente, 20 g del extracto MeOH-H₂O (6:4) de *G. crispiflora* fueron sometidos a separaciones por cromatografía de columna (CC) con poliamida DPA 6S.

Los péptidos se eluyeron con ácido acético al 2% y con etanol 50% / ácido acético al 2% (1:1, v/v), obteniéndose las fracciones PF-1 (15.2157g) y PF-2 (1.1319 g), respectivamente. Luego, cada una de las fracciones fueron sometidas a CC flash con octadesilsilano (C₁₈) a través de un gradiente lineal de ácido trifluoroacético (TFA) 0.1%-CH₃CN (0:100%), recolectándose las fracciones ODS-PF-1-1, ODS-PF-1-2, ODS-PF-1-3 y ODS-PF-2-2 como se presenta en la figura 1.

Las fracciones fueron analizadas por HPLC analítico y el sistema desarrollado por esta técnica se utilizó para encontrar las condiciones para purificarlas a través del HPLC preparativo.

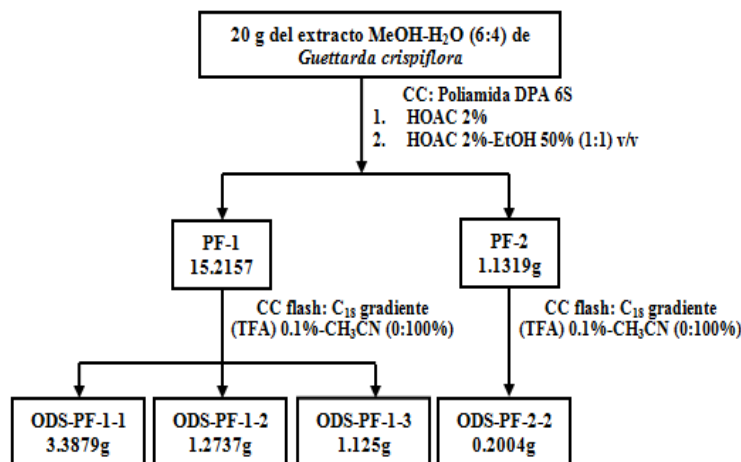


Figura 1. Diagrama de fraccionamiento del extracto hidrometanólico de *G. crispiflora*

B. Evaluación antimicrobiana de extractos crudos y de fracciones cromatográficas.

Los extractos crudos de DCM y MeOH-H₂O (6:4) de *G. crispiflora* al igual que las fracciones obtenidas de la columna de poliamida DPA 6S y C₁₈ no presentaron actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, ni contra las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* a las concentraciones evaluadas.

Tam et al. [13], evaluaron la actividad antibacteriana de varios ciclótidos sintéticos (reportados en algunas especies de la familia Rubiaceae) y determinaron que Kalata B1, aislado de *Oldenlandia affinis* (Rubiaceae) y circulina A de *Chassalia parvifolia* (Rubiaceae), presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 29213) a una concentración mínima de 752 mg/L y 598 mg/L, respectivamente; mientras que fueron inactivos frente a *E. coli* (ATCC 25922) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Al comparar dichos resultados con los obtenidos en esta investigación se infiere que los ciclótidos presentes en *G. crispiflora* pueden presentar características similares a los de Kalata B1 y circulina A, puesto que ninguno presentó actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Las diferencias encontradas entre ambas investigaciones podrían atribuirse al uso de cepas bacterianas diferentes a las empleadas en este trabajo; además, los ciclótidos presentes en los extractos crudos y fracciones evaluadas se podrían encontrar en bajas concentraciones, lo cual podría repercutir en la actividad antibacteriana.

Adicionalmente, investigaciones realizadas por Tang et al. [14] indicaron que los ciclótidos aislados de la especie *Viola labridorica* (Violaceae) son inactivos frente a *S. aureus* a 10 mg/L, lo cual concuerda con lo encontrado en este trabajo.

C. Evaluación de las fracciones por HPLC analítico

Las fracciones de la CC flash C₁₈ (Figura 1) se evaluaron por HPLC analítico con el sistema de elución de 10%-90% CH₃CN en 0.05% TFA por 50 min con un flujo de 1 mL/min y se obtuvieron las fracciones con los tiempos de retención (t_R) de la tabla 2, a las cuales se les midió la absorbancia a 220 y 280 nm, debido a que en estas longitudes de onda absorben los enlaces peptídicos [15].

Fracción	t _R (min)	A (220 nm)	A (280 nm)
ODS-PF-1-1	11-15	0,61	0,125
ODS-PF-1-1	26-32	0,329	0,084
ODS-PF-1-2	23-26	0,442	0,092
ODS-PF-1-2	41-44	0,765	0,047
ODS-PF-1-3	28-32	0,243	0,069
ODS-PF-1-3	33-36	0,239	0,074
ODS-PF-2-2	22-28	0,859	0,198
ODS-PF-2-2	37-42	0,247	0,039

Tabla 2. Tiempos de retención (t_R) y absorbancia de las fracciones obtenidas de *G. crispiflora* evaluadas por el HPLC analítico

D. Purificación de las fracciones por HPLC preparativo

Las fracciones ODS-PF-1-1, ODS-PF-1-2 y ODS-PF-2-2 obtenidas del HPLC analítico fueron seleccionadas para ser evaluadas por HPLC preparativo al determinar que estas absorbían a las longitudes de onda de 220 y 280 nm como se presentó anteriormente en la tabla 2 y las cuales podrían potencialmente contener ciclótidos. Estas muestras se analizaron en una columna Zorbax SB – C₁₈ utilizando como sistema de elución CH₃CN-TFA (0,05%) (80:20 v/v) a un flujo de 10 mL/min y con detección a las longitudes de onda de 220 nm y 280 nm. En la figura 2, se presenta el perfil cromatográfico de los péptidos obtenidos de la fracción ODS-PF-1-1. En este se observa 3 picos (C1, C2, C3) con tiempos de retención de 4.405, 6.244 y 6.718 min, respectivamente; de estos picos se pudo inferir la presencia

de ciclopéptidos, de acuerdo a la absorbancia presentada a las longitudes de onda mencionadas.

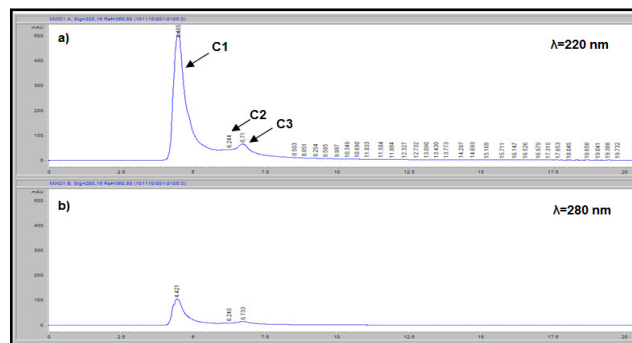


Figura 2. Perfil cromatográfico de HPLC preparativo de la fracción ODS-PF-1-1. Sistema de elución CH₃CN en TFA (0,05%) (80:20) a un flujo de 10 mL/min.

De manera similar a la fracción ODS-PF-1-1 se realizó la purificación de la fracción ODS-PF-1-2 y la fracción ODS-PF-2-2, respectivamente. En las cuales también hubo evidencia de ciclopéptidos.

E. Detección de ciclótidos por cromatografía en capa delgada (CCD)

Las muestras ODS-PF-1-2-C1, ODS-PF-1-2-C3, ODS-PF-1-1-C1 y ODS-PF-2-2-C1 fueron caracterizadas por CCD en las cuales se observó que las muestras ODS-PF-1-2-C1 y ODS-PF-1-2-C3 presentaron coloraciones con cada uno de los reactivos utilizados al ser reveladas, lo cual evidencia la presencia de ciclótidos de acuerdo a lo especificado por Yan et al. [10]. Con este método se evidenció la presencia de ciclótidos en *Viola tricolor*, *V. hamiltoniana*, *V. labridorica* [14] de la familia Violaceae; así como de *Momordica charantia* y *M. cochinchinensis* [10].

F. Detección de ciclótidos por Tricina SDS-PAGE.

En este estudio las fracciones de ODS-PF-1-2-C1 (carril 2) y ODS-PF-1-2-C3 (carril 3) fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 16% (Figura 3) siguiendo el protocolo de Schägger [11]. El marcador de peso molecular migró de acuerdo con el tamaño de los péptidos y fue bien definido como se muestra en (carril 1) y se evidenció la presencia de péptidos en las fracciones ODS-PF-1-2-C1 y ODS-PF-1-2-C3.

Masas encontradas en la muestra ODS-PF-1-2-C3		Ciclótidos reportados en CyBase (Wang et al., 2008)	
Numero del compuesto	m/z	Ciclótidos	m/z
1	3124.5	Cicloviolacin O13	3124.74
		Vpl-1	3124.66
		CO ₃₀	3123.75
4	3169.2	Viba 5	3168.79
		Hyfl p	3167.76
5	3101.5	Circulina c	3101.70
		Viba 1	3104.66
16	3086.7	Kalata B3	3082.48
		Cicloviolacin O18	3087.72
20	3153.0	Vitri A	3154.77
		Cicloviolacin O3	3154.77
30	3224.9	Cicloviolacin O17	3228.84
		Glopa E	3228.90
31	3160.9	Hyfl L	3164.75
32	3215.3	Hyfl D	3215.76
		Mram1	3218.85
33	3076.0	Mram9	3076.65
		Cicloviolacin H13	3077.55
34	3192.3	Hcf-1	3194.72
		Viba 13	3197.83
35	3213.0	Cicloviolacin O11	3211.86
		Cicloviolacin A	3211.86
		Globa B	3212.89

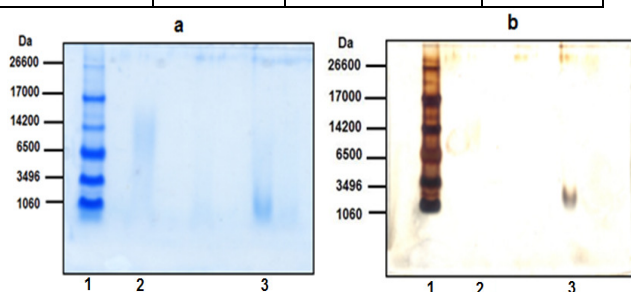


Figura 3. Tricina-SDS-PAGE. Análisis de ciclótidos de *G. crispiflora*. Quince (15) μ L de las muestras fueron diluidos con 5 μ L del buffer de muestra. Las muestras fueron fraccionadas en geles de poliacrilamida al 16%. Las bandas de los péptidos fueron visualizadas por la tinción con azul de Coomassie G-250 (0.025% en ácido acético al 10%) (Figura 5a); y con plata (0.1%) (Figura 5b). Carril 1 (Marcador molecular 1,060-26,600 Da (Sigma)), carril 2 (ODS-PF-1-2-C1), carril 3 (ODS-PF-1-2-C3).

G. HPLC-ESI/MS

La fracción ODS-PF-1-2-C3 fue analizada por HPLC-ESI/MS, el TIC obtenido de esta muestra se presenta en la figura 4, en el cual se evidenció la presencia de once ciclótidos. En la tabla 3 se presentan los once ciclótidos detectados de la fracción ODS-PF-1-2-C3 entre los cuales se destacan por su abundancia los compuestos 1, 5, 16 y 20 (Figuras 5, 6, 7 y 8) con las masas de 3124.4, 3101.5, 3086.7 y 3153.0 Da, respectivamente.

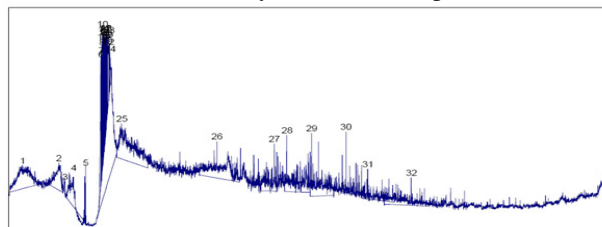


Figura 4. TIC del análisis por HPLC-ESI/MS de la fracción ODS-PF-1-2-C3. Sistema de elución gradiente de 10-60% CH₃CN en 0.1% HCO₂H por 80 min, con un flujo de 0.3 μ L/min.

Es de destacar, que estos péptidos son ciclótidos que se encuentran reportados en la base de datos de estos compuestos www.cybase.org.au descubiertos hasta la fecha [16] como se ilustra en la tabla 3.

Tabla 3. Ciclótidos detectados en la fracción ODS-PF-1-2-C3

Estos resultados concuerdan con los de Gerlach et al. [17] para ciclótidos aislados de *Psychotria leptothyrsa* (Rubiaceae), al igual que Yeshak et al. [18] para ciclótidos aislados de *Viola abyssinica* (Violaceae); así mismo, con los reportados por Poth et al. [19] para ciclótidos aislados de *Clitoria ternatea* (Fabaceae) los cuales tienen un rango de masas de 2800 a 4000 Da características de los ciclótidos.

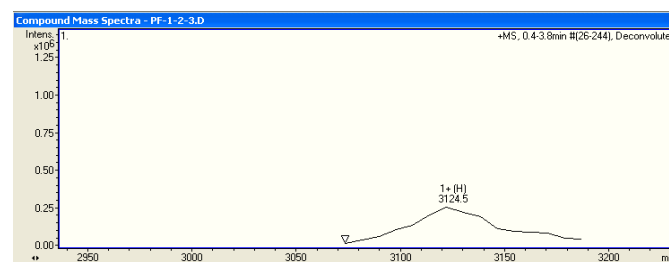


Figura 5. Espectros de masa por HPLC-ESI/MS del ciclopéptido número 1 detectado en la muestra ODS-PF-1-2-C3.

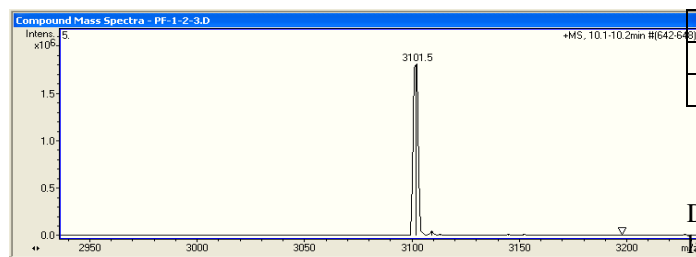


Figura 6. Espectros de masa por HPLC-ESI/MS del ciclopeptido número 5 detectado en la muestra ODS-PF-1-2-C3.

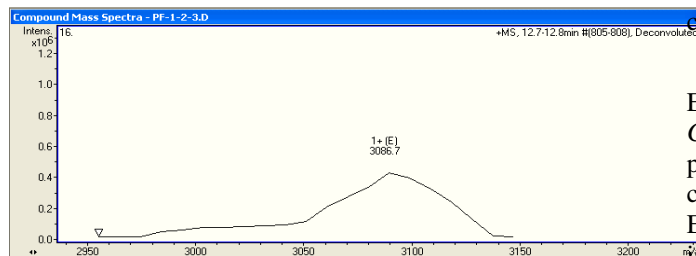


Figura 7. Espectros de masa por HPLC-ESI/MS del ciclopeptido número 16 detectado en la muestra ODS-PF-1-2-C3.

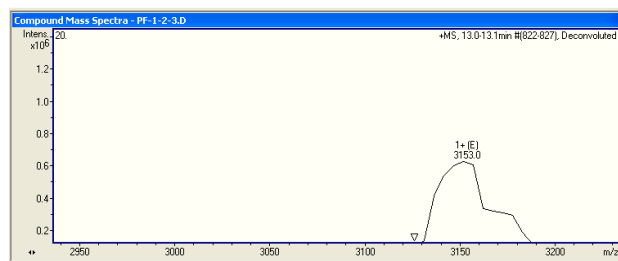


Figura 8. Espectros de masa por HPLC-ESI/MS del ciclopeptido número 20 detectado en la muestra ODS-PF-1-2-C3.

La fracción ODS-PF-1-2-C3 fue sometida a purificaciones cromatográficas sucesivas de la cual se obtuvo la fracción GC-1-2 la cual fue analizada por HPLC-ESI/MS, el TIC obtenido de esta muestra se presenta en la figura 9, en el cual se evidenció la presencia de cinco compuestos dentro de los cuales se destacó el compuesto número 5 por ser el más abundante, con una masa de 3247.9 Da, el cual podría corresponder a un ciclótido.

En la tabla 4 se presentan los cinco compuestos detectados de la fracción GC-1-2 y en la Figura 12 se presenta su espectro de masas.

Compuesto	T _R (min)	m/z
1	1.5	3707.3
2	1.7	3721.4

3	1.9	3480.8
4	5.6	3888.0
5	10.3	3247.9

Tabla 4. Compuestos detectados en la fracción GC-1-2

Dado que en este trabajo se aisló una mezcla de 11 ciclótidos de la especie *Guettarda crispiflora* y teniendo en cuenta que de la familia Rubiaceae solo se han aislado ciclótidos de seis especies (*Oldenlandia affinis*, *Phychotria vellosiana*, *Phychotria suturella*, *Chassalia parvifolia*, *Chassalia discolor* y *Palicourea condensata*) según Gerlach et al. [17], se hace necesario más investigaciones que permitan caracterizar e identificar los ciclótidos presentes en la especie estudiada en este trabajo.

El ciclótido circulina C, el cual ha sido reportado en la especie *Chassalia parvifolia* [17], cuya masa es 3101.70 Da, también podría estar presente en *Guettarda crispiflora* porque fue el compuesto más abundante que se encontró en el análisis HPLC-ESI/MS con una masa de 3101.5 Da (Figura 6) de esta investigación, siendo este el primer reporte de la existencia de ciclótidos en dicha especie de la flora Colombiana.

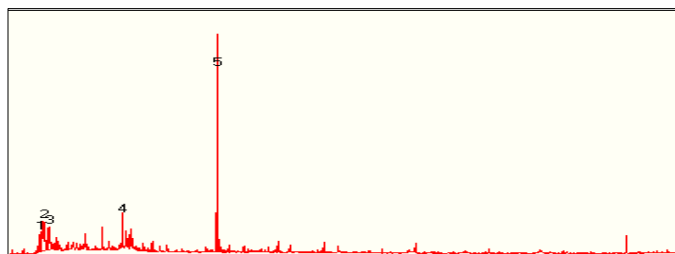


Figura 9. TIC del análisis por HPLC-ESI/MS de la fracción GC-1-2. Sistema de elución gradiente de 10-60% CH₃CN en 0.1% HCO₂H por 80 min, con un flujo de 0.3 μL/min.

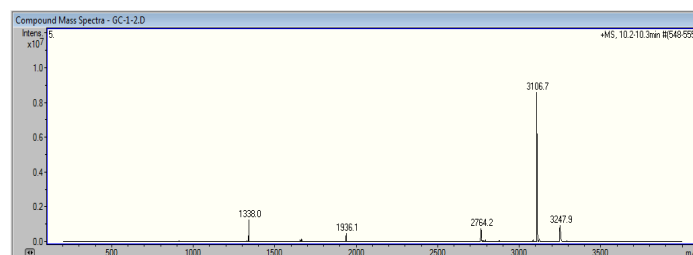


Figura 10. Espectro de masa por HPLC-ESI/MS del ciclopeptido número 5 detectado en la muestra GC-1-2.

CONCLUSIONES

Se aisló una fracción que contiene 11 péptidos de la especie *Guettarda crispiflora* (Rubiaceae) con masas promedio de 3000 Da, las cuales pueden ser ciclótidos. Estos datos concuerdan con lo reportado por Poth et al. [19] y por Yeshak et al. [18] quienes aislaron ciclótidos con masas promedios entre 2800 y 4000 Da.

Para determinar con certeza la existencia de este tipo de miniproteínas, es necesario realizar la purificación final de cada ciclótido; posteriormente, proceder a la reducción, seguida por el análisis por HPLC-EM continuando con la digestión enzimática y para finalmente realizar el análisis por RMN para elucidar completamente la estructura, como lo han realizado Poth et al. [19] y Yeshak et al. [18].

Se determinó por medio de SDS-PAGE la presencia de ciclótidos en la fracción ODS-PF-1-2-C-3 de la especie *Guettarda crispiflora* (Rubiaceae) con una masa aproximada de 1819.8 Da. Lo cual se pudo comprobar por espectroscopía de masas hallando masas promedio alrededor de los 3000 Da, rango dentro del cual se encuentran los ciclótidos descubiertos hasta la fecha.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Tecnológica de Pereira a través de la Vicerrectoría de Investigaciones, Innovación y Extensión por la financiación parcial recibida para realizar este proyecto.

REFERENCIAS

- [1] N. Daly, R. Clark, D. Craik, "Disulfide folding Pathways of Cystine Knot Proteins". *Journal of Biological Chemistry*. 278, 6314-6322 (2003).
- [2] E. Felezmenio-Quimio, N. Daly, D. Craik, "Circular proteins in plants. Solution structure of a novel macrocyclic trypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis*". *Journal Biological Chemistry*. 276, 22875-22882 (2001).
- [3] R. Burman, C. Gruber, K. Rizzardi, A. Hermann, D. Craik, M. Gupta, U. Göransson, "Cyclotide proteins and precursors from the genus *Gloeospermum*: filling a blank spot in the cyclotide map of Violaceae". *Phytochemistry*. 71, 13-20 (2010).
- [4] D. Ireland, M. Colgrave, D. Craik, "A novel suite of cyclotides from *Viola odorata*: sequence variation and the implications for structure, function and stability". *Biochemistry*. 400, 1-12 (2006).
- [5] J. Zhang, B. Liao, D. Craik, J. Li, M. Hu, W. Shu, "Identification of two suites of cyclotide precursor genes from metallophyte *Viola baoshanensis*: cDNA sequence variation, alternative RNA splicing and potential cyclotide diversity". *Gene*. 431, 23-32 (2009).
- [6] H. Mendoza, B. Ramírez, L. Jimenéz, "Rubiaceae de Colombia". Guía ilustrada de géneros. Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. 351p. (2004).
- [7] S. Gerlach, R. Burman, L. Bohlin, D. Mondal, U. Göransson, "Isolation, characterization, and bioactivity of cyclotides from the micronesian plant *Psychotria leptothyrsa*". *Journal of natural Products*. 73, 1207-1213 (2010).
- [8] J. Niño, Y.M. Correa, O.M. Mosquera, "Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities from eleven Solanaceae plants from Colombian flora". *Pharmaceutical Biology*. 44, 14-18 (2006).
- [9] P. Claeson, U. Göransson, S. Johansson, T. Luijendijk, L. Bohlin, "Fractionation Protocol for the Isolation of Polypeptides from Plant Biomass". *Journal of Natural Products*. 61, 77-81 (1998).
- [10] X. Yan, T. Jun, J. Jiu, T. Hua, "Application of a TLC chemical method to detection of cyclotides in plants". *Chinese Science Bulletin*. 53, 1671-1674 (2008).
- [11] H. Schägger, "Tricine-SDS-PAGE". *Nature Protocols*. 1, 16-22 (2006).
- [12] J. Ríos, M. Recio, A. Villar, "Screening methods for natural products with antimicrobial activity. A review of the literature". *Journal Ethnopharmacology*. 23, 127-149 (1988).
- [13] J. Tam, Y. Lu, J. Yang, K. Chiu, "An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:8913-8918. (1999).
- [14] J. Tang, C. Wang, X. Pan, H. Yan, G. Zeng, W. Xu, W. He, N. Daly, D. Craik, N. Tan, "Isolation and characterization of bioactive cyclotides from *Viola labridorica*". *Helvetica Chimica Acta*. 93, 2287-2295 (2010).
- [15] M. Colgrave, A. Poth, Q. Kass, D. Craik, "A new "era" for cyclotide sequencing". *Peptide Science*. 94: 592-601 (2010).

- [16] C. Wang, Q. Kaas, L. Chiche, D. Craik CyBase: “a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering”. *Nucleic Acids Res.* D206-10 (2008).
- [17] S. Gerlach, R. Burman, L. Bohlin, D. Mondal, U. Göransson, “Isolation, characterization, and bioactivity of cyclotides from the micronesian plant *Psychotria leptothyrsa*”. *Journal of natural Products.* 73, 1207-1213 (2010).
- [18] M. Yeshak, R. Burman, K. Asres, U. Göransson, “Cyclotides from an extreme habitat: characterization of cyclic peptides from *Viola abyssinica* of the Ethiopian highlands”. *Journal of Natural Products.* 74, 727-731 (2011).
- [19] A. Poth, M. Colgrave, R. Philip, B. Kerenga, N. Daly, M. Anderson, D. Craik, “Discovery of cyclotydes in the Fabaceae plant family provides new insights into the cyclization, evolution, and distribution of circular proteins”. *ACS chemical biology* 6, 345-355 (2010).