

## **SÍNTESE DE BIOCONJUGADOS PEPTÍDEO-ÁCIDO JASMÔNICO POTENCIALMENTE BIOATIVOS**

**ATANAZIO**, João Vitor.<sup>1</sup>  
**PASCHOAL**, Luiz Roberto.<sup>2</sup>  
**LOPES**, José Emilio Fehr Pereira.<sup>3</sup>  
**NASCIMENTO**, Nailton Monteiro.<sup>4</sup>  
**CILLI**, Eduardo Maffud.<sup>5</sup>  
**SANCHES**, Paulo Ricardo da Silva.<sup>6</sup>

**RESUMO:** Os jasmonatos são um grupo de substâncias reguladoras do crescimento vegetal e considerado um novo tipo de hormônio que apresenta importante função nas etapas de crescimento, desenvolvimento e resposta a diferentes condições de estresse ambiental da planta. O objetivo foi aprimorar técnicas de síntese de peptídeos em fase sólida, acoplar o ácido jasmônico na região N-terminal do peptídeo Apoica Pallens e identificar produtos pela degradação dos peptídeos através da espectrometria de massa. O peptídeo INWLKIAKKVAGML-NH<sub>2</sub> foi sintetizado pela síntese de peptídeos em fase sólida. Os acoplamentos dos Fmoc-aminoácidos foram realizados pela ativação dos grupos carboxilas. A purificação foi realizada em CLAE. A análise da massa molar foi realizada por espectrometria de massas. O grau de pureza foi determinado em coluna analítica com gradiente linear de 5% a 95% de solvente por 30 min. A degradação dos peptídeos foi através da análise de espectrometria de massa confirmando a massa molar do peptídeo JA1802AJ como 1777,3 g/mol. Aprimoraram-se técnicas de síntese de peptídeos em fase sólida. Observou-se acoplamento covalentemente com hormônio vegetal ácido jasmônico na região N-terminal do peptídeo Apoica Pallens e identificaram-se produtos obtidos na degradação através de espectrometria de massa, confirmada a massa molar do peptídeo JA1802AJ.

**PALAVRAS-CHAVE:** Jasmonatos; Apoica Pallens; peptídeos; acoplamento.

---

<sup>1</sup>Centro Universitário Central Paulista- UNICEP, Rua Miguel Petroni 5111, 13563-470 - São Carlos, São Paulo, Brasil. E-mail: atanazio.jva@gmail.com

<sup>2</sup>Centro Universitário Central Paulista- UNICEP, Rua Miguel Petroni 5111, 13563-470 - São Carlos, São Paulo, Brasil. E-mail: lr\_paschoal@yahoo.com

<sup>3</sup>Universidade de São Paulo – USP, Av dos trabalhadores São Carlense 13566-590 - São Carlos, São Paulo, Brasil. E-mail: milofehrman@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Rua Prof. Francisco Degni 14800900 – Araraquara, São Paulo, Brasil. E-mail: nailtonjr@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Rua Prof. Francisco Degni 14800900 – Araraquara, São Paulo, Brasil. E-mail: eduardocilli@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Rua Prof. Francisco Degni 14800900 – Araraquara, São Paulo, Brasil. E-mail: lqsanches@gmail.com

## Introdução

As plantas sofrem constantemente situações de estresse como oscilações drásticas de temperatura, umidade, radiação solar, ataque de pragas ou patógenos, dessa forma arranjam modulações de respostas de defesa superando esses estresses e assim podendo retornar ao seu metabolismo normal. Quando a planta é agravada, mobiliza seu sistema de defesa reparando danos nos tecidos e evita uma invasão imediata pelo agente agressor (ZHANG *et al.*, 2004). Um dos fatores fundamentais para a obtenção do melhoramento genético dessas plantas são o conhecimento do comportamento de defesa e de proteção, do qual arranja mais resistência a tipos distintos de estresse, podendo aumentar a qualidade e produção das plantas (SOARES E MACHADO, 2007).

A constituição de compostos moleculares modificados como um mecanismo de resposta obtidos das plantas produz tais alterações que podem estar inteiramente relacionadas com a defesa e proteção das mesmas (DE WIT, 2007). A cascata de sinalização abrange outras moléculas como o ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA), o ácido jasmônico (AJ) e seu metil ester, metil jasmonato (MeJa), segundo compostos capazes de induzir a expressão de muitos genes relacionados à defesa por meio de rotas diferentes (PERVIEUX *et al.*, 2004; CAO *et al.*, 2011).

Com um papel importante na cascata de eventos, o ácido jasmônico, ocasiona processos de indução da qual ocorre direta ou indiretamente no acúmulo de metabólitos secundários (GUNDLACH, H, 1992). Em tecidos de plantas tratadas com jasmonato, efeitos distintos são apresentados por expressão das proteínas induzidas por jasmonatos (PIJs), que incluem as tioninas e as proteinases (EPPEL, E.E, 1995; PIETERSE, C.M.J.; *et al.*, 1998; WIERSTRA, I, 2000). Uma importante rota metabólica de defesa vegetal da qual atua na defesa contra estresses bióticos, domina-se como octadecanoide, da qual finaliza a produção do ácido jasmônico, esse um fitohormônio que está relacionado ao estresse vegetal que ativa várias respostas de defesa (SOARES e MACHADO, 2007).

O ácido jasmônico atua como hormônio de crescimento, desenvolvimento e de resposta a diferentes condições de estresse da planta. Estudos dessa natureza devem ser desenvolvidos para a representação de toxinas e outras manifestações de um caráter genético, comparando as plantas mutantes e não mutantes. A indução ou a aplicação de ácido jasmônico proporciona resistência nas plantas contra o ataque de insetos-pragas e situações de estresse, resultando em melhor desenvolvimento e produção dessas culturas. A atividade deste hormônio é específica, variando em função do tecido, do tipo

de célula e da fase de desenvolvimento. A aplicação deste, causa mudanças na maioria das células das plantas antes de atingir um equilíbrio no tecido entre o ácido jasmônico exógeno e o endógeno, preparando-as para defesa (DEUNER, 2015).

Os efeitos anticâncer do jasmonato são diferentes da ação causada no vegetal em termos de mecanismos, visto que é interessante uma checagem na possibilidade de haver semelhanças de mecanismos em células vegetais e animais. Além da grande relevância para a biologia fundamental, a identificação destas semelhanças poderia abrir potenciais caminhos para a criação de novas entidades químicas fundamentadas em jasmonato com eficácia quimioterapêutica. O primeiro relato sobre atividades anticâncer através de jasmonato mostrou-se capacidade de causar tanto a morte celular quanto a supressão da proliferação celular (FLESCHER, 2006).

Compreendendo a utilização dessas moléculas através de estudos agrônômicos como fisiologia vegetal, entomologia e bioquímica, essas atividades mostram-se com interessante potencial na utilização em agricultura ou como fármaco, visando sua atividade anticâncer frente a linhagens celulares tumorais unindo-as à formação de um novo bioconjugado podendo trazer resultados promissores para a ciência. Neste trabalho, foi feito um aprimoramento das técnicas de síntese de peptídeos em fase sólida juntamente com o acoplamento do hormônio vegetal ácido jasmônico na região N terminal do peptídeo Apoica Pallens e identificado os produtos obtidos pela degradação dos peptídeos através da análise de espectrometria de massas.

### **Ácido jasmonato**

Os jasmonatos estão vinculados a uma lista de compostos de derivados vegetal que apresentam atividade anticâncer por possuírem hormônios de estresse vegetal afetando seres *in vitro* e *in vivo* (FLESCHER, 2006). Derivados do ácido linolênico, os jamonatos, passam por um processo dependente de lipoxigenase que estão envolvidas na biossíntese do mesmo, da qual interfere na resposta de defesa da planta ao patógeno ou aumento da capacidade de sintetizar outros compostos derivados de lipídeos, usados na defesa da planta (GUNDLACH *et al.*, 1992).

O ácido jasmônico e seu éster metil jasmonato são moléculas que sinalizam derivados do ácido linolênico, sendo essas envolvidas nas respostas ao estresse e desenvolvimento das plantas, já o metil jasmonato, pode estar implicado no aumento da expressão de genes que respondem por estresses (ROSA Jr. *et al.*, 2005).

A prevenção primária à saúde populacional essencialmente diante do desempenho que compostos vegetais apresentam, ocorre em 80% da população mundial, visto que na forma preventiva e/ou terapêutica na presença de 250.000 espécies de plantas, mil possuem uma ação anticâncer significativa. A citotoxicidade pode causar efeitos adversos como refletir-se na inibição do processo carcinogênico, bem como na destruição de um neoplasma existente, quando estas categorias de atividade estão interligadas. Alguns agentes quimiopreventivos derivados dessas plantas incluem inibidores da formação de carcinogênicos, bloqueadores da interação carcinogênica em células-alvo e supressores da progressão do tumor(FLESCHER,2006).

Segundo Meyer et al (1984), os jasmonatos são um grupo de substâncias reguladoras do crescimento vegetal, identificadas em uma variedade de espécies vegetais tais como *Jasminun grandiflorum*, *Rosmarinus officinalis* *Arthemisia absinthium L* e sementes imaturas de *Phaseolus vulgaris L*. Considerado um novo tipo de hormônio do qual apresenta importante função nas etapas de crescimento, desenvolvimento e resposta à diferentes condições de estresse ambiental da planta (CORTÊS, 2000). Estudos constataram que além de possui papel importante na regulação da expressão de genes da defesa da planta, a exposição a esse ácido aumenta rapidamente ao dano causado por herbívoros, ocasionando uma resposta com diferentes tipos de defesa vegetal, como os inibidores de proteases, terpenos e alcalóides (DROGE, 2002).

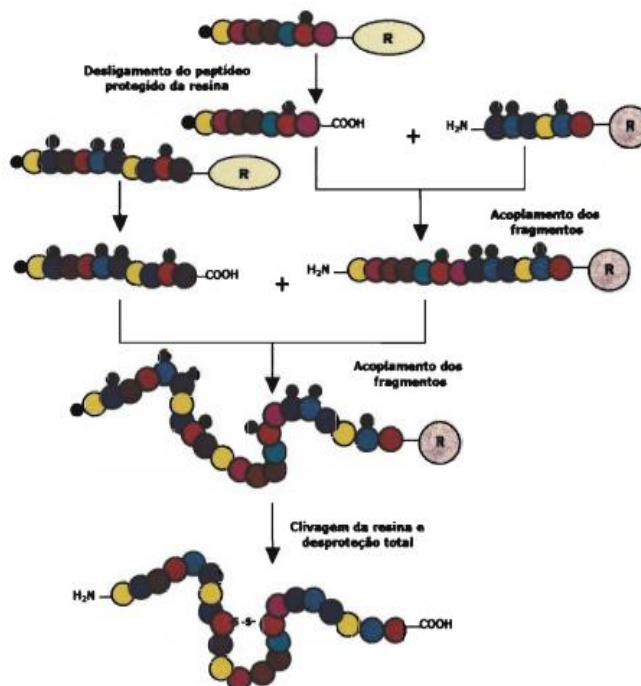
A defesa acontece através de compostos químicos induzidos pelo jasmonato, que interagindo diretamente com o invasor da planta para combatê-lo, sua percepção em insetos pode permitir que estes se defendam contra a toxicidade induzida, sugerindo que as vias de sinalização do composto podem ser conservadas entre os reinos vegetal e animal (FLESCHER,2006).

### **Síntese e clivagem do peptídeo**

Os peptídeos podem ser moléculas constituintes de grandes proteínas, responsáveis pelo reconhecimento molecular e pelas atividades biológicas, ou eles podem ser sintetizados isoladamente desempenhando papéis importantes em processos fisiológicos atuando como neurotransmissores, hormônios, toxinas, antibióticos e defensas (NAKAJIMA *et al*, 1986).



que pertencem à sequência de um peptídeo longo acompanhada do acoplamento posterior entre eles.



**Figura 2:** Síntese convergente de peptídeos em fase sólida (SCPFS) (BORGIA e FIELDS, 2000).

Na síntese convergente é indispensável avaliar vários aspectos como a estratégia química e grupos protetores (Boc ou Fmoc), o tamanho dos diferentes fragmentos protegidos e os seus resíduos N e C-terminal e o suporte a ser usado (ALBERICIO, LLOYD-WILLIAMS, GIRALT, 1997). A estratégia Fmoc tem se tornado constantemente usada devido a algumas vantagens que ela oferece. Em contrapartida, também tem se compreendido a síntese de peptídeos longos com a química Boc, onde os fragmentos peptídicos protegidos são sintetizados sobre suportes poliméricos com funcionalidade baseada no ácido  $\alpha$ -hidroximetil acrílico e a ligação peptídeo-resina podendo ser clivada em meio básico (EGGENWEILER, CLAUSEN, BAYER, 1998).

Estudos demonstraram que moléculas tóxicas quando acopladas a um peptídeo podem emitir uma diminuição em sua toxicidade de tal forma que a especificidade é aumentada para as moléculas de câncer atenuando assim sua interação com células saudáveis (SANCHES, 2015).

Levando em consideração que muitos peptídeos com atividade anticâncer também são tóxicos em relação a células normais, eventualmente peptídeos de veneno

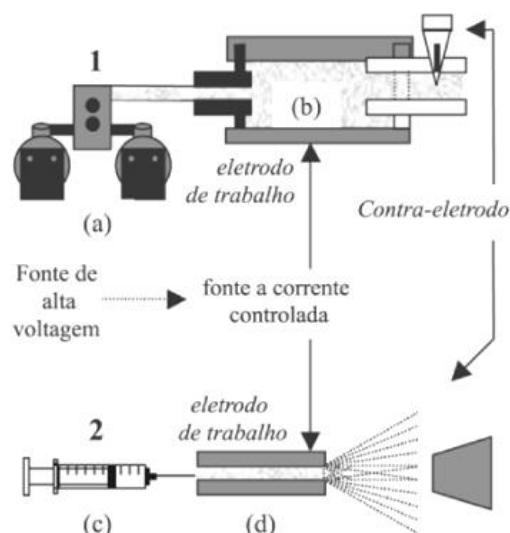
de vespas mostraram-se possuir seletividade de células saudas e potencial em atingir células cancerígenas (HILCHIE, 2016).

### **Espectrometria de massas**

A espectrometria de massas (MS) surge como uma tecnologia imprescindível para a interpretação da informação compilada pelos genes, chamada como proteoma e o que a impulsiona é a capacidade de usar dados de espectrometria de massas essenciais a peptídeos para a identificação de proteínas em bancos de dados (CARRILHO; WULFF; PALMA, 2008).

Usualmente, a MS é uma técnica que se apropria a determinação da relação entre massa e carga ( $m/z$ ) de espécies ionizadas em fase gasosa (AEBERSOLD e MANN, 2003). Um espectrômetro de massas é um instrumento formado por uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de obtenção de dados. As fontes de ionização utilizadas em MS aplicada à análise proteômica são Electrospray (ESI) e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) (KARAS e HILLENKAMP, 1988).

Segundo Steen e Mann (2004), possuindo a função de ionizar de maneira suave, preservando assim a estrutura polipeptídica e transferindo as classes a serem analisadas para a fase gasosa, os analisadores de massas, tais como, quadrupolos, *ion-traps* (tridimensionais e lineares), *time-of-flight* (TOF), *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR), *orbitrap*, entre outros, são comercialmente disponíveis e cada um possui aspectos positivos e negativos, de acordo com o experimento planejado e o resultado experimental requerido. Estes analisadores podem ser usados exclusivamente e de modo independente ou acoplados entre si, dando origem a equipamentos classificados como híbridos, os quais fazem uso das vantagens inerentes a cada analisador.



**Figura 3:** Analogia entre célula eletrolítica (1) fonte de ionização linear por “electrospray” (2) (a) bomba injetora de fluxo; (b) célula-fluxo; (c) bomba de infusão; (d) capilar IES e (e) região entre cone extrator e “skimmer” (RUIZ, 2003).

Os peptídeos são primeiramente introduzidos em uma região de vácuo do espectrômetro de massas por meio dos processos de electrospray ou MALDI. (DONGRE, JONES, SOMOGYI e WYSOCKI, 1996).

O modelo da mobilidade do próton descreve como a energia interna adquirida induz a transferência intramo-lecular dos prótons em cada peptídeo, atingindo a desestabilização das ligações do esqueleto polipeptídico e, por conseqüência, induzindo a formação de dois íon-fragmentos, que são classificados como íons que retêm a carga residual (próton) no lado N-terminal (gerando fragmentos -a, -b e -c, dependendo da ligação que é fragmentada); íons que retêm a carga residual (próton) na região C-terminal gerando os fragmentos -x, -y -z, dependendo da ligação que é fragmentada (MANN, MENG e FENN, 1989).

É considerável a ênfase dos pares de íons a/x, b/y e c/z que serão sempre íons correlativos aos fragmentos opostos e complementares entre si. Considerando-se que as ligações peptídicas são aquelas menos energéticas, é esperado que a formação do par de fragmentos -b/-y seja mais habitual que os demais pares de fragmentos, facilitando extremamente a interpretação dos espectros (ROEPSTORFF e FOHLMAN, 1984).

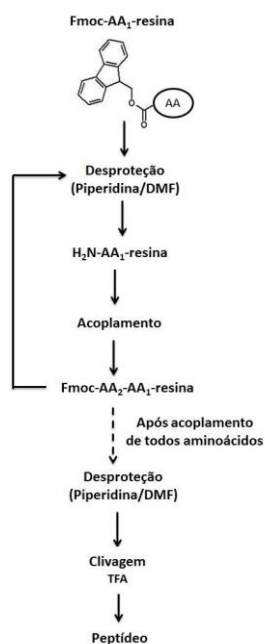
## Materiais e Métodos

### Síntese do peptídeo

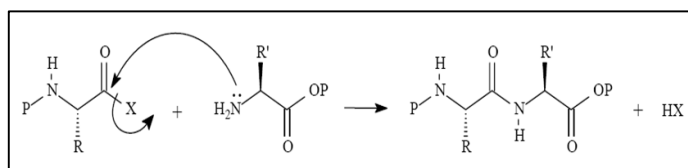
O peptídeo de sequência INWLKIAKKVAGML-NH<sub>2</sub> foi sintetizado utilizando a técnica denominada de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), conforme protocolo da figura 4. O método empregado é fundamentado pelo crescimento, resíduo por resíduo, da cadeia peptídica presa covalentemente pelo seu aminoácido C-terminal aos sítios reativos existentes em um suporte sólido (resina) por meio de seu grupo carboxila (MERRIFIELD, 1963).

Na síntese peptídica em fase sólida, o aminoácido C-terminal é ligado covalentemente à resina Rink Amida, com grau de substituição 0,50 mmol g<sup>-1</sup>, por meio de uma ligação amida para a obtenção de peptídeos com extremidade  $\alpha$ -carboxamida (figura 5).

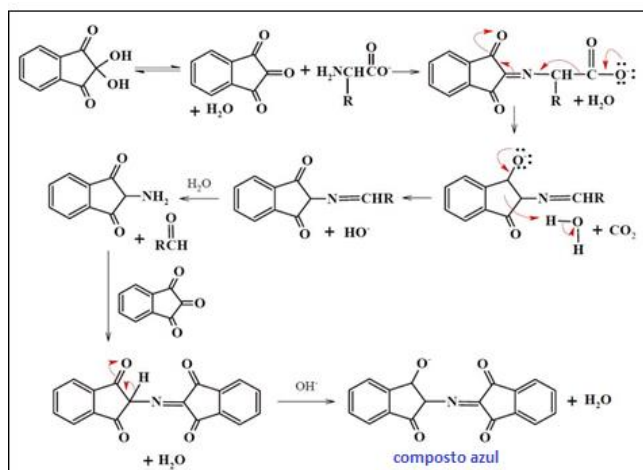
Os acoplamentos dos Fmoc-aminoácidos foram realizados pela ativação dos grupos carboxilas com diisopropilcarbodiimida (Dic)/*N*-Hidroxibenzotriazol (HOBt) ou hexafluorofosfato de *O*-(Benzotriazo-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU)/(DIEA) – *N,N,N*-diisopropiletilamina. Todos os Fmoc-aminoácidos e reagentes foram utilizados com duas vezes de excesso em relação à quantidade de grupos reativos na resina inicial. A retirada do grupo Fmoc base-lábil foi efetivada pela lavagem em 20% 4-metilpiperidina/DMF durante 1 hora e 20 min. Após cada etapa de acoplamento e desproteção foram efetuadas lavagens com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM), para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos. Após cada etapa de acoplamento e desproteção as lavagens e teste de ninidrina foram efetuados (KAISER *et al.*, 1970). Este reagente, a altas temperaturas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul (figura 6). Este teste é, portanto, adequado para indicar a presença de grupos aminos livres e indicativo da eficiência dos passos de acoplamento e desproteção.



**Figura 4:** Esquema do protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Modificado de: Cilli et al, 2017.



**Figura 5:** Ilustração da reação que ocorre durante o acoplamento do aminoácido.



**Figura 6:** Reação que ocorre durante o teste de ninidrina.

Na formação do conjugado ácido jasmônico-peptídeo, foi utilizado um equivalente do ácido jasmônico (peso molecular: 210, 27 g/mol) para cada equivalente

de peptidil-resina (INWLKIAKKVAGML-NH<sub>2</sub>) existente, em DCM e DMF (1/1; v/v), utilizando HATU (Hexafluorofosfato de 2-(7-Aza-1*H*-benzotriazo-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio) como agente de acoplamento e TMP (2,4,6 trimetilpiridina) como base. O TMP foi adicionado até chegar ao pH=8 na solução. Após 3 horas de acoplamento, um teste de ninidrina foi realizado, resultando em uma coloração amarela, evidenciando que o acoplamento foi realizado com sucesso.

### **Reação de clivagem**

A clivagem do peptídeo da resina ao final da síntese foi realizada pela adição de diferentes soluções as quais continham o ácido trifluoracético - TFA (Merck®), responsável pela clivagem e os supressores de reações colaterais: triisopropilsilano (TIS) (Acros Organics®), e água ultrapura, em frasco de cintilação sob agitação branda por 2 horas. Depois foi executada a precipitação do peptídeo com éter dietílico gelado e o sobrenadante foi descartado, obtendo-se um precipitado contendo o peptídeo e a resina. O peptídeo foi então dissolvido com uma solução contendo 0,045% de TFA em água ultrapura e 0,036% de TFA em acetonitrila (50:50), e a solução centrifugada, para separar a resina do peptídeo. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo foi liofilizado.

### **Purificação e caracterização do peptídeo**

A purificação do produto obtido foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) - Shimadzu modelo SPD-20A, em modo semi-preparativo, com solvente A (0,045% de TFA em H<sub>2</sub>O) e solvente B (0,036% de TFA em ACN), fluxo de 5 mL min<sup>-1</sup>, comprimento de onda de detecção de 220 nm, e uma coluna C18 da marca Phenomenex (tamanho 250 mm x 10 mm, 300 Å, partícula de 5 µm). Após a separação e liofilização dos materiais obtidos, a análise de pureza de cada fração foi realizada por meio de CLAE em um aparelho analítico Shimadzu, com coluna 4,6 mm x 150 mm, de fase reversa C18 Ultrasphere Phenomenex, 300 Å, tamanho da partícula de 5 µm, detecção em 220 nm, utilizando um programa gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>.

## **Espectrometria de massas**

A análise da massa molar do peptídeo foi realizada por espectrometria de massas com aparelho Bruker sob injeção ion trap, para a confirmação da obtenção do material desejado, modo eletrospray positivo (MS+) faixa de 200-1000 g mol<sup>-1</sup>.

## **Resultados e Discussão**

### **Síntese do peptídeo**

O peptídeo *Apoica Pallens*, que possui a sequência de aminoácidos INWLKIAKKVAGML, foi sintetizado e ao final da síntese acoplado covalentemente na região N terminal do peptídeo, o hormônio vegetal ácido jasmonico.

Esse acoplamento ocorre diante o teste de ninidrina sendo que as cores são comparadas com a referência e o acoplamento completo transcorre na presença da coloração azul fraca ou incolor, assim a síntese é permanecida (CHAN, W. C.; WHITE, P. D, 2004 e WENG, C.; PETER, W, 2000).

A síntese de peptídeos cíclicos possui numerosas abordagens novas em relação ao seu surgimento, porém a ciclização cabeça-cauda em solução sendo como síntese do peptídeo linear na presença de reagentes de acoplamento, permanece como sendo a estratégia mais utilizada. Pela conformação seguida pelo precursor linear na solução, o resultado da ciclização é majoritariamente influenciada. Conseqüentemente, a escolha racional dos grupos de proteção e dos reagentes de acoplamento tem essencialmente o planejamento retrossintético e desenho da síntese em solução, igualmente do ponto de desconexão do anel (JIANG, S. et al, 2008).

De Souza et al. (2004) isolaram dois novos mastoparanos do veneno da vespa social *Polybia paulista* (INWLKLGKMVIDAL-NH<sub>2</sub>; IDWLKLGKMVMDVL-NH<sub>2</sub>), do qual ambos apresentaram uma forte atividade hemolítica, degranuladora de mastócitos e quimiotática. Além disso, Mendes et al. (2004), reconheceram outro mastoparano isolado do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*, o *Agelaia-MP* com atividades degranuladora de mastócitos e hemolítica marcantes, baixa atividade antibiótica e nenhuma atividade quimiotática.

Além de provocar colapso cardiovascular devido a uma excessiva liberação de íons potássio eritrocitária, induzida pela toxina, o Mastoparano B, presente no veneno

de *Vespa basalis*, participa das atividades hemolítica e de formação de edema, (Ho et al., 1994).

O jasmonato se mostrou, tanto na literatura assim como neste trabalho, que possui diferentes mecanismos em relação à ação causada no vegetal por possuir uma eficácia quimioterapêutica, visto que considerando muitos peptídeos com atividade anticâncer eventualmente mostraram-se possuir seletividade de células sadias e potencial em atingir células cancerígenas.

### **Reação de clivagem e purificação e caracterização do peptídeo**

Após a síntese, os peptídeos foram purificados em sistema semipreparativo em CLAE e o grau de pureza das frações foi determinado em coluna analítica com gradiente linear de 5% a 95% de solvente B em 30 min. Os tubos contendo o material com grau de pureza maior que 98% foram reunidos e liofilizados para posterior utilização.

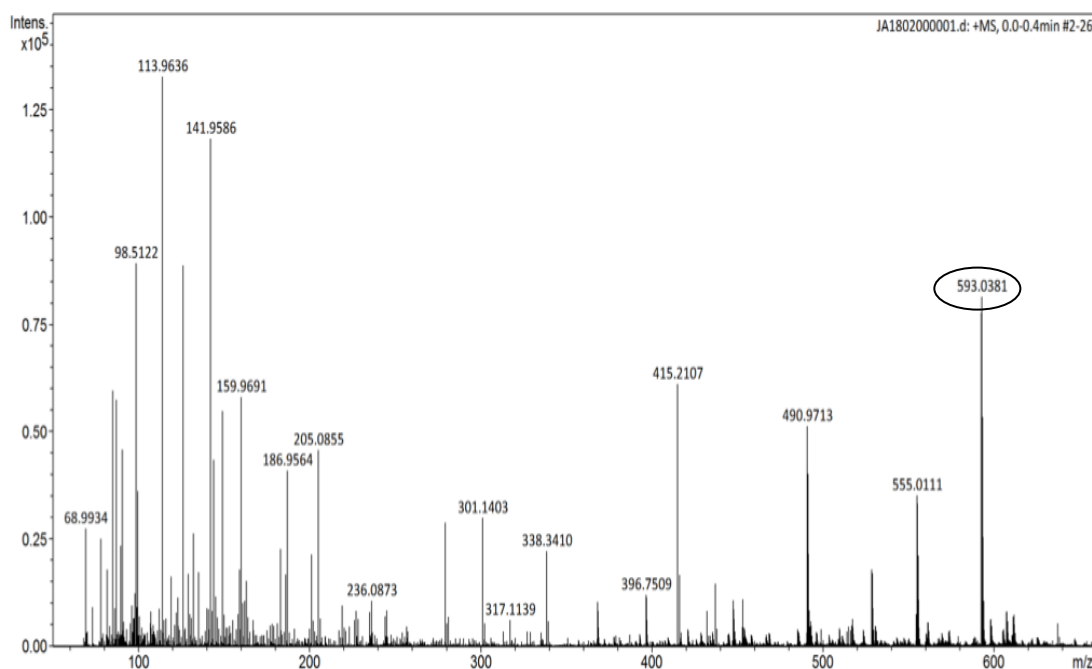
Em relação aos valores a serem tolerados estão diagnosticados entre 75% e 85%, portanto não devendo ser inferiores a 95%. Após ser sintetizado e purificado, comparado ao seu grau de pureza, a análise diante de sua conformidade química ocorre através de uma antecipação em relação estrutural que dependente do seu tipo de uso desejável (SÍNTESES QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE PEPTÍDEOS: PRINCÍPIOS BÁSICOS E APLICAÇÕES, 2004).

Em comparação com o atual estudo, Souza (2006), realizou a purificação dos mastoparanos *Apoica-MP* e *Asn2-Polybia-MP I*, sob condições isocráticas com acetonitrila 60% (v/v) [contendo TFA 0,1% (v/v)], sendo o fluxo do solvente de 2 mL/min. O peptídeo sintético *Apoica-MP* apresentou tempo de retenção de 14,29 min.

Visto que após a purificação da síntese dos peptídeos, o gradiente linear foi observado de 5% a 95% de solvente B em 30 min, contendo material com grau de pureza maior que 98%, confirmando a aplicação de tolerância que não devem ser inferiores a 95%. O tempo de retenção não se assemelha ao trabalho citado anteriormente supostamente por ter um desempenho distinto em relação a condições isocráticas com acetonitrila e seu fluxo do solvente, contudo o comportamento é aceito diante seus valores analisados serem incorporados ao grau de tolerância da pureza.

## Espectrometria de massas

Com o objetivo de identificar os produtos obtidos na degradação dos peptídeos, realizou-se análise de espectrometria de massa. Nesta análise, foi confirmada a massa molar do peptídeo JA1802AJ como 1777,3 g/mol. Abaixo são apresentados os espectros do peptídeo, com a seguinte relação massa carga.



**Figura 7:** Espectro de massas do peptídeo JA1802AJ (*Apoica Pallens* com AJ)

Essa massa carga foi obtida através de equações das quais diante do resultado do espectro pôde-se confirmar o peptídeo:

- (1)  $1777,3 + 1/1 = 1778,8$
- (2)  $1777,3 + 2/2 = 889,65$
- (3)  $1777,3 + 3/3 = 593,43 *$

A espectrometria de massas tem se tornado cada vez mais indispensável na caracterização estrutural de biomoléculas. Devido à sua alta sensibilidade e rápida análise, ela é a técnica de primeira escolha nos processos analíticos. Suas aplicações são ilimitadas, podendo ser utilizadas na caracterização de proteínas e peptídeos, carboidratos como oligossacarídeos e glicoconjugados, lipídeos, produtos do metabolismo secundário, entre outras aplicações (SOUZA, 2008).

As principais razões para a utilização da espectrometria de massas é produzir o deslocamento de massa no espectro de massas ou a modificação na fragmentação, para permitir análise de grupos funcionais ou a elucidação estrutural de determinado composto desconhecido. Essa técnica de CLAE/EM é extremamente importante e complementar à cromatografia gasosa tornando-se possível analisar diversos compostos sem a necessidade de derivatização e em muitos casos obter-se limites de detecção menores que os de outras técnicas disponíveis (BOTELHO, 2011).

Em comparação com o atual estudo, segundo Silva (2009), o espectro ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH<sub>2</sub>), observam-se três picos de m/z 1582.53, 791,79 e 528,25, correspondentes às formas  $[M + H]^+$ ,  $[M + 2H]^{+2}$  e  $[M + 3H]^{+3}$ , respectivamente; enquanto que o espectro obtido para o peptídeo Protonectarina-MP (-OH), também com três picos de m/z 1583.50, 792,60 e 528,60, correspondentes às formas  $[M + H]^+$ ,  $[M + 2H]^{+2}$  e  $[M + 3H]^{+3}$ , respectivamente. Estes resultados confirmam a elevada pureza e a massa teórica 1581.55 Da e 1582.50 Da esperada para a Protonectarina-MP (-NH<sub>2</sub>) e Protonectarina-MP(-OH), respectivamente.

A partir do espectro deste estudo, podemos concluir que todos os peptídeos foram corretamente sintetizados, pois as massas moleculares das amostras sintetizadas são correspondentes às massas moleculares das sequências de aminoácidos.

## **Conclusão**

Neste trabalho, foi possível aprimorar as técnicas de síntese de peptídeos em fase sólida, podendo observar cada etapa de crescimento da cadeia peptídica. Observou-se o acoplamento de maneira covalente com o hormônio vegetal ácido jasmônico na região N terminal do peptídeo Apoica Pallens e identificar os produtos obtidos na degradação dos peptídeos realizando a análise de espectrometria de massa, da qual foi confirmada a massa molar do peptídeo JA1802AJ.

Não foi possível iniciar os testes em células tumorais, porém como mencionado na literatura, ambas as moléculas demonstram potencial no combate ao câncer, futuramente podendo ser testados em animais e seres humanos e descobrir o potencial do peptídeo JA1802AJ.

**ABSTRACT:** Jasmonates are a group of plant growth regulating substances and considered a new type of hormone that plays an important role in the stages of growth, development and response to different environmental stress conditions of the plant. The objective was to improve solid phase peptide synthesis techniques, coupling jasmonic acid to the N-terminal region of the Apoica Pallens peptide and to identify products by peptide degradation through mass spectrometry. INWLKIAKKVAGML-NH<sub>2</sub> peptide was synthesized by solid phase peptide synthesis. Fmoc-amino acid couplings were performed by activation of the carboxyl groups. Purification was performed on HPLC. Molar mass analysis was performed by mass spectrometry. The purity was determined on a linear gradient analytical column of 5% to 95% solvent for 30 min. The degradation of the peptides was by mass spectrometric analysis confirming the molar mass of the JA1802AJ peptide as 1777.3 g / mol. Solid phase peptide synthesis techniques have been improved. Covalently coupling with jasmonic acid plant hormone was observed in the N-terminal region of Apoica Pallens peptide and degradation products were identified by mass spectrometry, confirming the molar mass of peptide JA1802AJ.

**KEYWORDS:** Jasmonates; Apoica Pallens; peptides; coupling.

### **Referências Bibliográficas**

AEBERSOLD, R.; MANN, M.; **Nature**, 422, 198, 2003.

ALBERICIO, F, LLOYD-WILLIAMS, P., GIRALT, E. Convergent solid phase peptide synthesis. **Method. Enzymol.**, 289, 313-336. 1997.

BODANSZKY, M.; Peptide Chemistry: A Practical Textbook, 2nd ed., **SpringerVerlag Berlin: Heidelberg**, 1993.

BORGIA, J.A.; FIELDS, G.B. Chemical synthesis of proteins. **TIBTECH**, 18, 243-251. 2000.

BOTELHO, E. D. **Desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para identificação e quantificação truxilinas em amostras de cocaína baseada em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)**. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2011. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/33541468.pdf>>. Acesso em: 07 fev. 2019.

CILLI, E. M. et al. Reações de clivagem ácida de aminoácidos e peptídeos ligados a polímeros: relevância para a metodologia de síntese de peptídeo, p. 175 -196. In:**Biotechnology Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. São Paulo: Blucher, 2017.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis**. United States, New York: Oxford University Press, 2004.

CARRILHO, M. D. C. E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p.669-675, 19 mar. 2008.

CORTÊS HP. 2000. Introdução aos hormônios Vegetais; **EMBRAPA**, p.131-157.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 287-292, Apr. 2006. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422006000200020&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000200020&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 14 out. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000200020>.

DE SOUZA, B. M.; et al. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. New Jersey, **Rap. Commun. Mass Spectrom.**, v.18, p.1095-1102, 2004.

DONGRE, A. R.; JONES, J. L.; SOMOGYI, A.; WYSOCKI, V. H.; J. Am. Chem. Soc., 118, 8365. 1996.

DROGE, W. (2002) - Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, vol. 82, v. 1, p. 47- 95.

EGGENWEILER, H. M., CLAUSEN, N., BAYER, E. A new base-labile linker for Boc solid phase peptide synthesis. *Em: Peptides 1996, Proceedings of the 24<sup>th</sup> European Peptide Symposium*, Ramage, R. and Epton, R. (Eds.), Mayflower Scientific Ltd, Kingswinford, West, PP. 359-360. 1998.

FLESCHER, E. Jasmonates in cancer therapy. **Cancer letters**, [S. l.], p. 1-10, 1 mar. 2006.

GUNDLACH, H., M.J. MULLER, T.M. KUTCHAN &M.H. ZENK. 1992. Jasmonic acid in a signal transducerin elicitor induced plant cell cultures. **Plant Biology**,89: 2389-2393.

GUTTE, B.; Peptides: Synthesis, Structure, and Applications, **Academic Press: New York**, 1995.

HILCHE, A. et al. Mastoparan is a membranolytic anti-cancer peptide that works synergistically with gemcitabine in a mouse model of mammary carcinoma. **Biochimica et biophysica acta**, vancouver, p. 3195-3204, 26 set. 2016.

HO, C. L.; et al. Cardiovascular effects of mastoparan B and its structural requirements. Amsterdam, **Eur. J. Pharmacol.**, v.259, p.259-64, 1994.

JIANG, S. et al. Recent Progresso f Synthetic Studies to Peptide and Peptidomimetic Cyclization. **Current Organic Chemistry**, v. 12, n. 17, p. 1502-1542, 2008.

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Anal Biochem**, v. 34, n. 2, p. 595–8, abr. 1970.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. *Anal. Chem.*, 60, 2299, 1988.

LLOYD-WILLIAMS, P., ALBERICIO, F., GIRALT, E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. **CRC Press, Florida, USA**. 278 pp. 1997.

MANN, M.; MENG, C. K.; FENN, J. B.; *Anal. Chem.*, 61, 1702, 1989.

MENDES, M.A.; et al. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. Elmsford, **Toxicon**, v.44, n.1, p.67-74, 2004.

MERRIFIELD, B. Concept and Early Development of solid-phase peptide synthesis. **Method. Enzymol.**, 289, 3-13. 1997.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, 1963.

MEYER A *et al.* 1984. Occurrence of the plant growth regulators jasmonic acid in plants. *Journal of Plant Growth Regulator* 3: 1-8.

NAKAJIMA, T. et al. Amphiphilic peptides in wasp venom. **Biopolymers**, New York, 25:115-21, 1986.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J.; *J. Biomed. Mass Spectrom.*, 11, 601, 1984.

RUIZ, C. M. R. **Estudo da síntese convergente de peptídeos em fase sólida: abordagem clássica e uso de temperatura alta**. 2003. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SANCHES, P. R. S. et al. A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical cancer, and toxicity. **Amino Acids**. Wien: Springer Wien, v. 47, n. 7, p. 1433-1443, 2015.

SILVA, A. V. R. **Prospecção das interações mastoparanomembrana em proteolipossomos como modelo para o desenvolvimento racional de novos agentes antimicrobianos**. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2009.

**SÍNTESES QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE PEPTÍDEOS: PRINCÍPIOS BÁSICOS E APLICAÇÕES**. São Paulo: Quim. Nova, v. 27, n. 5, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/qn/v27n5/a18v27n5.pdf>>. Acesso em: 12 Jun. 2019.

SOUZA, B. M. **Estrutura e Função de Mastoparanos dos Venenos de Vespas**. 2006. 135 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2006.

**SOUZA, L. M. Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular.** 2008. 162 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

STEEN, H.; MANN, M.; **Nature Reviews** 2004, 5, 699.

WENG, C.; PETER, W. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach.** New York: Oxford University Press: 371 p. 2000.