

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Beatriz Lika Yamada Mano

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS COM POTENCIAL
ANTITUMORAL**

Belo Horizonte

2026

BEATRIZ LIKA YAMADA MANO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS COM POTENCIAL
ANTITUMORAL

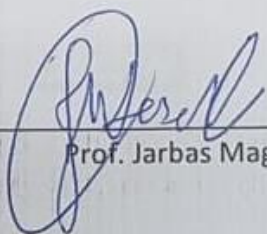
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências
Exatas, da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito para a
obtenção do título de Bacharel em
Química.

Orientador: Jarbas Magalhães
Resende

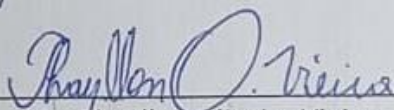
Coorientador: Thayllon Oliveira Vieira

Ata da sessão de avaliação do Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal de Minas Gerais, da aluna Beatriz Lika Yamada Mano, nº de registro 2022423237.

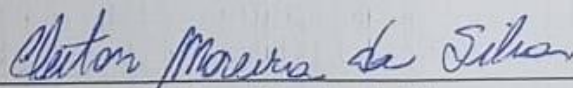
O Trabalho de Conclusão de Curso da aluna Beatriz Lika Yamada Mano, intitulado "Síntese e caracterização de peptídeos com potencial antitumoral", foi avaliado e aprovado pela Banca Examinadora constituída por Prof. Cleiton Moreira da Silva (DQ - UFMG), Ma. Jaqueline Leal dos Santos (FUNED), Me. Thayllon Oliveira Vieira (ICB - UFMG), coorientador do trabalho de conclusão de curso, e Prof. Jarbas Magalhães Resende (DQ - UFMG), orientador do trabalho de conclusão de curso, no dia 18 de junho de 2026.



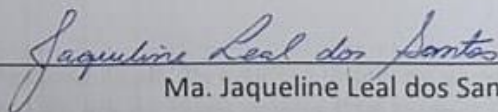
Prof. Jarbas Magalhães Resende



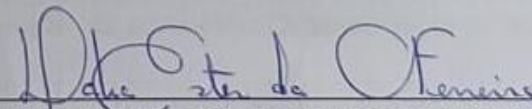
Me. Thayllon Oliveira Vieira



Prof. Cleiton Moreira da Silva



Ma. Jaqueline Leal dos Santos



Prof. Dario Windmöller / Profa. Dalva Ester da Costa Ferreira
Coordenador dos Cursos de Graduação em Química e Química Tecnológica
ICEx - UFMG

Belo Horizonte
2026

Dedico este trabalho ao meu pai, quem sempre esteve ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família pelo apoio por todos esses anos, mesmo distantes, que me permitiu trilhar meus primeiros passos na química e não desistir. Sou grata pelo carinho e força que sempre me deram nesta vida.

Agradeço imensamente ao Professor Jarbas Magalhães Resende pela orientação neste trabalho, paciência e compreensão. Sou também muito grata ao Thayllon Oliveira Vieira pela coorientação, pelas conversas, *insights* e apoio nas atividades realizadas para o trabalho.

Agradeço aos parceiros da FUNED Júlio César Moreira Brito, do Serviço de Recursos Vegetais e Opoterápicos, pela disponibilização do laboratório e pelos ensinamentos no HPLC, e à Márcia Helena Borges, do Serviço de Proteômica e Aracnídeos, pela realização dos ensaios no MALDI-TOF.

Agradeço aos colegas do LASEP Daniel, Lucas e Larissa pelas conversas, ensinamentos, dicas e companhia nesse tempo no laboratório.

Agradeço às agências de fomento FAPEMIG, CNPq, CAPES e CAPES-COFECUB pelo apoio financeiro.

Agradeço ao NEPS, ao LAREMAR, à UFMG, e FUNED pelo apoio prestado ao trabalho e projetos do grupo de pesquisa.

Agradeço aos meus amigos Ana Olívia e Samuel pela amizade ao longo dessa jornada na UFMG e em Belo Horizonte.

Por último, agradeço imensamente ao Angelo por todo o carinho, inspiração, força e apoio nesses últimos anos e principalmente para a conclusão deste trabalho.

“A química cria seu objeto. Essa faculdade criativa, semelhante àquela da própria arte, distingue-a essencialmente das ciências naturais e históricas” – Berthelot

RESUMO

Os peptídeos antitumorais têm se mostrado promissores em estudos com células cancerígenas, como ativos principais ou aliados a terapias tradicionais. Estudos com a LyeTx I-b, peptídeo derivado da peçonha da aranha *Lycosa erythrognatha*, mostraram atividade contra o glioblastoma e células derivadas do câncer de mama triplo negativo. Entretanto, há de se considerar a inviabilidade da obtenção do peptídeo nativo apenas por purificação da peçonha animal (baixo rendimento e morosidade do processo de purificação). Nesse contexto, a estratégia de síntese proporciona a obtenção de maiores quantidades de peptídeo. Contudo, devido ao incremento de complexidade e de custos associado ao aumento do número de aminoácidos e das respectivas etapas de acoplamento, este trabalho propõe a síntese, purificação e caracterização de duas novas sequências peptídicas menores, baseadas na LyeTx I-b e que apresentaram capacidade de atividade tumoral a partir de preditores. O estudo sucedeu-se via estratégia Fmoc de síntese em fase sólida dos peptídeos, que foram então purificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e caracterizados por espectrometria de massas, obtendo-se ao final as sequências desejadas.

Palavras-chave: Peptídeos antitumorais, LyeTx I-b, Síntese em fase sólida, Estratégia Fmoc.

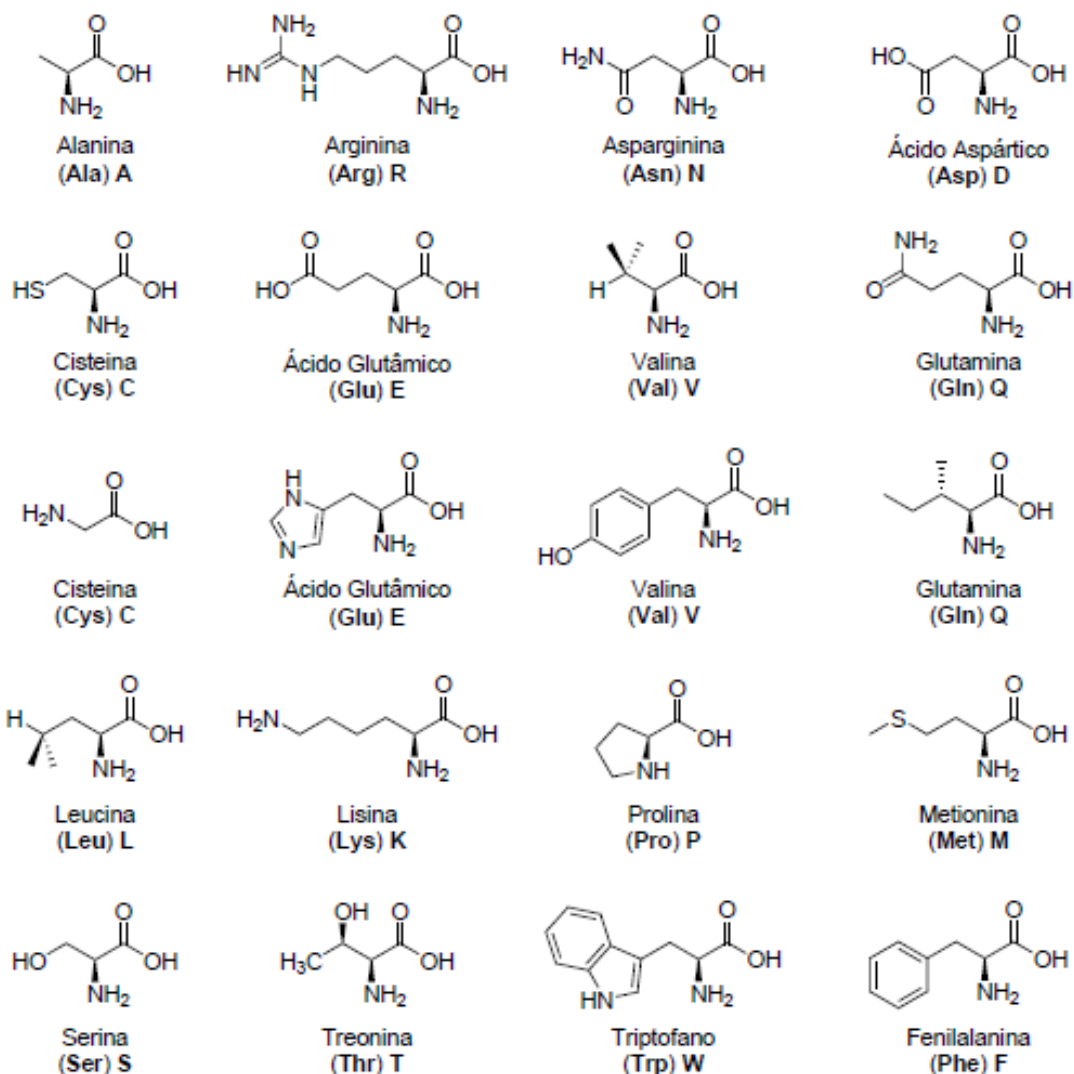
SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	CÂNCER NO BRASIL	12
1.2	MÉTODOS ALTERNATIVOS DE TRATAMENTO.....	12
2	OBJETIVO.....	14
2.1	OBJETIVOS GERAIS	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REFERENCIAIS TEÓRICOS.....	15
3.1	PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS.....	15
3.2	SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA.....	16
3.3	ESTRATÉGIA FMOC.....	16
4	PARTE EXPERIMENTAL	19
4.1	PROSPECÇÃO DOS NOVOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	19
4.2	SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS.....	19
4.2.1	PREPARAÇÃO DA RESINA PARA O ACOPLAMENTO DO PRIMEIRO ANIMOÁCIDO	20
4.2.2	ACOPLAMENTO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS	20
4.2.3	CLIVAGEM	21
4.3	PURIFICAÇÃO POR CLAE E ANÁLISE POR EM	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS	24
5.2	SÍNTESES	24
5.3	PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.....	33
6	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS	42

**TABELA DE SÍMBOLOS E MASSAS MOLARES DOS AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS
COM O GRUPO FMOC**

Resíduo de aminoácido	Símbolo	Símbolo de três letras	Massa Molar AA + Fmoc (mg/mmol)
Ácido Aspártico	D	Asp	411,5
Ácido Glutâmico	E	Glu	443,5
Alanina	A	Ala	311,3
Arginina	R	Arg	648,8
Asparagina	N	Asp	596,7
Cisteína	C	Cys	585,7
Fenilalanina	F	Phe	387,4
Glicina	G	Gly	297,3
Glutamina	Q	Gln	610,7
Histidina	H	His	619,7
Isoleucina	I	Ile	353,4
Leucina	L	Leu	353,4
Lisina	K	Lys	468,5
Metionina	M	Met	371,5
Prolina	P	Pro	337,4
Serina	S	Ser	383,4
Tirosina	Y	Tyr	459,6
Treonina	T	Thr	397,5
Triptofano	W	Trp	526,6
Valina	V	Val	339,4

ESTRUTURA DOS VINTE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS



LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	acetonitrila
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DCM	diclorometano
DIC	<i>N,N'</i> - diisopropilcarbodiimida
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
EM	espectrometria de massas
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonila
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
IPA	Álcool isopropílico, nome usual propan-2-ol
MALDI	dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
m/z	razão entre a massa e a carga
PAT	Peptídeo antitumoral
PEP1	Peptídeo 1
PEP2	Peptídeo 2
PIPE	4-metil-piperidina
SPFS	síntese de peptídeos em fase sólida
TFA	ácido trifluoroacético
TIS	tri-isopropilsilano
TOF	tempo de voo, do inglês <i>time of flight</i>
<i>LyeTx I-b</i>	<i>Lycosa erythrogatha</i> Toxina I-b
CMTN	Cancêr de mama triplo negativo

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER NO BRASIL

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima, para o triênio de 2026 a 2028, cerca de 781 mil novos casos de câncer por ano no país, consolidando-se como uma das principais causas de morbidade no Brasil. Entre homens, estima-se que os tumores mais incidentes serão os de próstata (30,5%), cólon e reto (10,3%), pulmão (7,3%), estômago (5,4%) e cavidade oral (4,8%), enquanto, entre as mulheres, destacam-se os de mama (30,0%), cólon e reto (10,5%), colo do útero (7,4%), pulmão (6,4%) e glândula tireoide (5,1%). O câncer de pele não melanoma permanece como o mais frequente em ambos os sexos, mas é divulgado separadamente, em razão de sua elevada incidência e baixa letalidade (INCA, 2026).

As terapias convencionais se baseiam em cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal, embora tenham sido observados avanços no desenvolvimento de outros tipos de tratamentos como imunoterapia e terapia gênica. Ainda assim, as terapias clássicas são as mais usadas dada à maior acessibilidade de custos para a maior parte da população. Não obstante, essas apresentam limitações como complicações pós-tratamento, maior risco de metástase pós cirurgia, risco de resíduos de células cancerígenas, danos ao DNA, resistência aos tratamentos e medicamentos, o que tem levado à procura por métodos alternativos de tratamentos, que podem inclusive ser usados em conjunto com os métodos tradicionais (Zafar, 2025).

1.2 MÉTODOS ALTERNATIVOS DE TRATAMENTO

Na procura por métodos alternativos de tratamentos para o câncer, ABDEL-SALAM et al (2019) e AVELAR JUNIOR et al (2022) demonstraram a utilização do peptídeo LyeTx I-b (sequência: $\text{CH}_3\text{CO-IWLTALKFLGKNLGKLAQQLAKL-NH}_2$), primeiramente apresentado em estudo de REIS et al (2018) e derivado do peptídeo LyeTx I da peçonha da *Lycosa erythrogna*, contra as células de glioblastomas e contra o câncer de mama triplo negativo (CMTN), em testes *in vitro*. Os testes demonstraram que o peptídeo isolado induziu a necroptose em células derivadas do

glioblastoma e, em combinação com a cisplatina, houve a indução da autofagia em células derivadas do CMTN. Também, nos estudos com células derivadas do glioblastoma, o peptídeo apresentou interação forte com a membrana das células, formando estruturas que se parecem poros.

Os peptídeos de cadeia longa e derivados de sequências isoladas de animais, como a LyeTX I-b apresentam, entretanto, dificuldades na síntese, representando inclusive incremento de custos associados ao aumento no número de aminoácidos e etapas de acoplamento, além da maior dificuldade de acoplamento para certos resíduos de aminoácidos. Em algumas outras situações, como no caso e sequências contendo resíduos de cisteína, a possibilidade de formação de ligações dissulfeto trazem complicações como reprodução fiel da estrutura tridimensional. Ademais, cadeias longas e volumosas apresentam baixa permeabilidade nas membranas celulares, limitando a capacidade de interação com o interior das células tumorais, onde muitos alvos terapêuticos se encontram. Assim, é de interesse a busca por peptídeos pequenos, derivados de toxinas animais, e que possuam a capacidade de penetrar em células tumorais e agir de forma seletiva (Yang et al, 2025).

Em razão das dificuldades e dos altos custos associados ao aumento do número de aminoácidos e das etapas de acoplamento, foram propostas duas sequências peptídicas de cadeia curta, com o intuito de avaliar suas atividades antitumorais e contribuir com estudos biológicos.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Obter dois peptídeos sintéticos de cadeia curta com potencial antitumoral para o uso em estudos biológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a síntese química dos peptídeos por meio da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) via estratégia Fmoc;
- Purificar os peptídeos propostos via cromatografia líquida de alta eficiência;
- Validar as sequências por meio de caracterização por espectrometria de massa MALDI-TOF.

3 REFERENCIAIS TEÓRICOS

3.1 PEPTÍDEOS ANTITUMORAIS

Os peptídeos antitumorais (PAT) são peptídeos curtos, compostos por 10 a 60 aminoácidos, geralmente catiônicos e ricos em K (lisina) e R (arginina), característica importante para a seletividade e atividade biológica contra células tumorais (normalmente mais aniônicas que as células não tumorais, em virtude da maior quantidade de glicoproteínas e fosfatidilserina expostas), e que conseguem inibir a proliferação, migração de células tumorais e a formação de vasos sanguíneos tumorais, e que possuem menor probabilidade de causar resistência a medicamentos. Além disso, com a estratégia de síntese em fase sólida de peptídeos, os PATs possuem um menor custo de produção e podem ser facilmente modificados (Xie et al, 2020).

Os PATs possuem diferentes mecanismos de ação, podendo causar a fragmentação da membrana celular ou apoptose pela despolarização da membrana, afetando a pressão osmótica da célula tumoral. Pode ocorrer a morte celular pela ocorrência de danos à membrana celular e vazamento do citoplasma, denominado necroptose. Há também estudos que já identificaram peptídeos capazes de inibir a angiogênese tumoral, isso é, o crescimento de novos vasos sanguíneos, que promovem o crescimento de tumores e a metástase. Ademais, foram identificados peptídeos capazes de regular a imunidade do sistema, aumentando o número de linfócitos capazes de penetrar nas células cancerígenas e impedir seu crescimento (Xie et al, 2020).

Estudos com PATs têm se mostrado muito promissores, com variados peptídeos já em fase de testes clínicos, com diferentes tipos de tumores como alvo, como a Aplidina (Figura 3-1), que já foi testada em testes clínicos de fase II contra carcinoma medular de tireoide avançado, melanoma maligno avançado, câncer de pulmão de pequenas células e carcinoma de células renais avançado, como demonstrado por Kitagaki et al em 2014, além de já existirem no mercado substâncias

em uso para tratamentos, como o carfilzomibe (comercialmente Kyprolis) (Figura 3-1) (Xie et al, 2020). Isso demonstra um futuro promissor nos estudos dos peptídeos antitumorais.

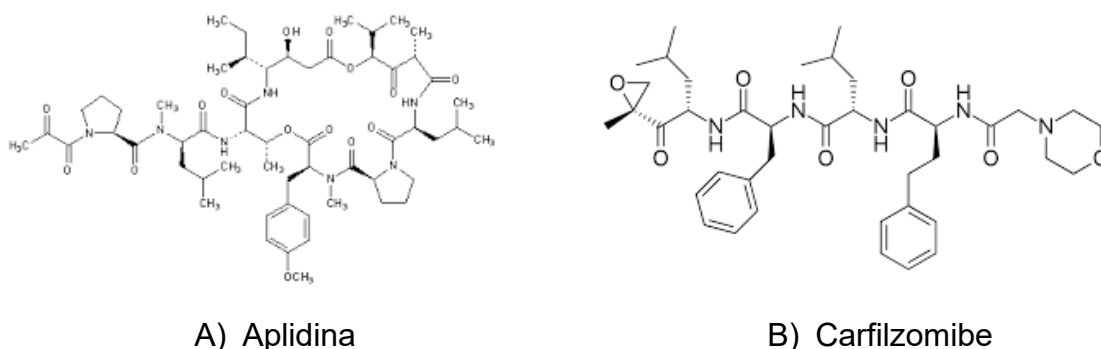


Figura 3-1: Fórmulas moleculares da aplidina (A) e do carfilzomibe (B), fármacos antitumorais

3.2 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) foi apresentada por Merrifield em um trabalho publicado em 1963 (Chan & White, 2000). Ele foi capaz de demonstrar a síntese por meio da ligação de aminoácidos em um suporte sólido, seguido do acoplamento de novos resíduos de aminoácidos até chegar à sequência desejada. Seus trabalhos apresentaram sínteses com boa eficiência, gerando poucas impurezas e permitindo a síntese de peptídeos longos. Atualmente, há duas estratégias mais comumente empregadas para SPFS: a estratégia Boc e a Fmoc. Neste trabalho, será utilizada a estratégia Fmoc, conforme descrito no trabalho de Gusmão, 2016. Esse método é um dos mais utilizados para a reprodução e criação sintética de peptídeos e proteínas, em que ocorre a lavagem e filtração da peptil-resina ao final de cada etapa do processo, removendo o excesso de reagentes, solventes e qualquer componente não ligada à resina (Chan & White, 2000).

3.3 ESTRATÉGIA FMOC

O esquema geral da síntese por esta estratégia é apresentado na Figura 3-2. O grupo Fmoc (em vermelho) é utilizado como protetor do grupo amino de forma temporária. Sua utilização é vantajosa uma vez que é facilmente removido em meio básico após cada etapa de acoplamento, sendo preservada a ligação do peptídeo à

resina, bem como a grupos protetores laterais, uma vez que esses são estáveis em meios básicos e neutro, sendo lábeis apenas em meio ácido (Resende, 2008). O processo de síntese se inicia com a remoção do grupo Fmoc da resina por meio de tratamento com solução básica, seguindo-se etapa de lavagem da resina e então a ativação do aminoácido para a obtenção de um grupo mais reativo que a carboxila presente. Após isso, é possível realizar o acoplamento a partir de agitação mecânica, obtendo-se o aminoácido protegido ligado à resina (Resende, 2008). Sucedem-se então repetidas etapas alternadas de desproteção a partir da remoção do grupo Fmoc e de acoplamento pela ativação do respectivo Fmoc-aminoácido e reação com o grupo amino da peptidil-resina por meio de agitação mecânica. Ao se obter a sequência completa, é realizada uma última desproteção, que após lavagem, e seguida da etapa final de clivagem por meio de tratamento da peptil-resina com solução ácida, que remove os grupos protetores das cadeias laterais e libera o peptídeo do suporte sólido (Resende, 2008).

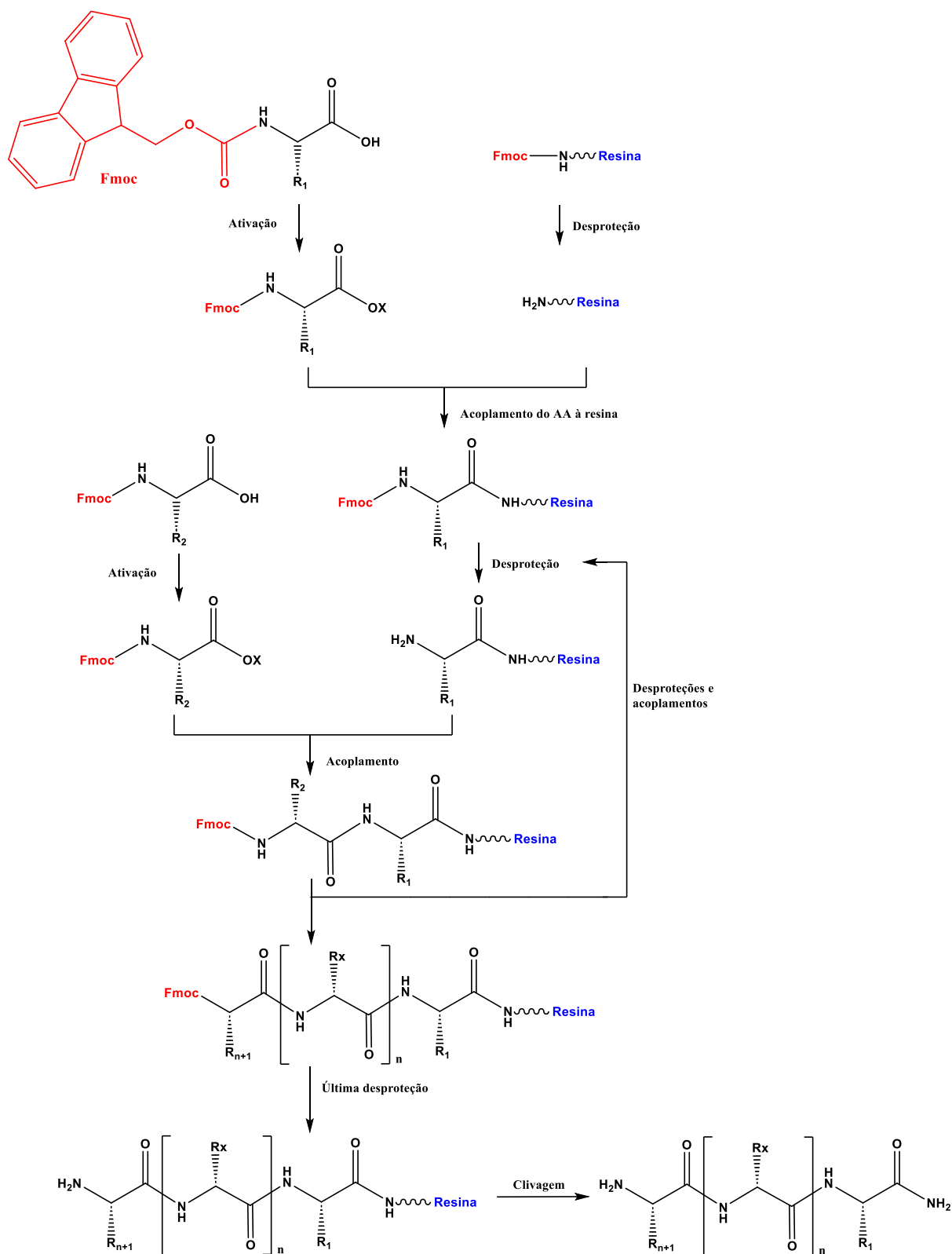


Figura 3-2: Esquema geral da síntese em fase sólida e estratégia Fmoc (Fonte: autora. Adaptado de Resende, 2008).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 PROSPECÇÃO DOS NOVOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

A prospecção dos peptídeos apresentados neste estudo foi realizada previamente pelo coorientador Thayllon Oliveira Vieira, Mestre em Ciências da Saúde – Biomedicina e Doutorando em Bioinformática pela Universidade Federal de Minas Gerais.

As sequências foram baseadas na LyeTx I-b e em um grande banco de dados de peptídeos antitumorais com atividade já comprovada, de forma que foram mapeados os principais resíduos relacionados entre eles. Assim, propôs-se as sequências para o PEP1 (ALKLKLKALAKL-NH₂), com doze aminoácidos, e PEP2 (ILLKFLNLLAK-NH₂), com onze aminoácidos, ambos com a porção C-terminal amidada.

As propriedades físico-químicas das sequências foram avaliadas a partir do servidor *PepCalc.com* - *Peptide property calculator* (disponível em: <https://pepcalc.com/>. Acesso em: 03 de out. 2025) e *PeptideSynthetics* (disponível em: <https://peptidesynthetics.co.uk/tools/>. Acesso em: 03 de out. 2025).

Para avaliar o potencial de atividade antitumoral, foi utilizado o servidor AI4AXP (disponível em: <https://axp.iis.sinica.edu.tw/>. Acesso em: 03 de out. 2025), o qual é um preditor baseado em *Machine Learning*, e que avalia a sequência e propriedades físico-químicas dos aminoácidos, pontuando a sequência entre 0,0 e 1,0. Para valores maiores do que 0,472, o modelo é um potencial peptídeo antitumoral. Para valores menores que 0,472, o modelo provavelmente não é um PAT.

4.2 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

Para cada peptídeo (PEP1: ALKLKLKALAKL-NH₂, e PEP2: ILLKFLNLLAK-NH₂), planejou-se a síntese com rendimento máximo de 0,100 g. O suporte escolhido para as sínteses foi a resina amídica *Fmoc Rink amide PEG AM* da Iris Biotech GmbH, com grau de substituição de 0,57 mmol/g. Os aminoácidos utilizados, protegidos com o

grupo Fmoc e na configuração L, foram também adquiridos pela Iris Biotech GmbH. Os peptídeos foram sintetizados manualmente e as reações ocorreram dentro de seringas descartáveis de 5,0 mL.

4.2.1 PREPARAÇÃO DA RESINA PARA O ACOPLAMENTO DO PRIMEIRO ANIMOÁCIDO

Inicialmente, realizou-se a pesagem das respectivas massas de resina para cada peptídeo (*i.e.*, 0,1341 g para PEP1 e 0,1366 g para PEP2), que então foram transferidos para os frascos de síntese, as seringas previamente preparadas com filtro poroso e lavados com água e diclorometano (DCM). Sucedeu-se para a dilatação das resinas, com a adição de cerca de 2,5 mL de DCM e agitação por 15 minutos. O DCM foi removido por filtração e o processo repetido três vezes.

Em seguida, foi feita a desproteção da resina (a remoção do grupo Fmoc), por meio da adição de cerca de 2,5 mL de solução de 4-metil-piperidina (PIPE) a 25% (v/v) em DMF, submetendo a agitação em mesa agitadora a 300 rpm por 15 minutos. A solução é removida por filtração e o processo é repetido mais uma vez. Então, foi realizada a lavagem da resina, de forma manual, em três ciclos alternados de adição de DMF, agitação e descarte, e adição de AIP (álcool isopropílico), agitação e descarte (aproximadamente 3 mL de cada), e, por fim, uma lavagem DCM (aproximadamente 3 mL).

A fim de se verificar a desproteção da resina, foi realizado o teste de Kaiser, que consistiu na remoção de uma pequena alíquota da resina para um tubo de ensaio, onde foi adicionado 1 gota de solução de piridina a 2% (v/v) em solução aquosa de KCN a 0,1 mol/L, 2 gotas de solução de fenol a 80 % (m/v) em etanol e 1 gota de solução de ninidrina a 5 % (m/v) em piridina. O tubo foi aquecido por 5 minutos a 100 °C e foi realizado uma avaliação qualitativa da coloração dos grãos. Após a confirmação da desproteção, procedeu-se para os acoplamentos.

4.2.2 ACOPLAMENTO DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS

Para o acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido, pesou-se a massa calculada de HOBt (1-hidróxi-benzotriazol) e do respectivo Fmoc-aminoácido com

excesso estequiométrico de quatro vezes e adicionou-se em um tubo Falcon, ao qual foi acrescido 2 mL de DMF e o volume calculado de DIC com excesso estequiométrico de quatro vezes. A mistura foi homogeneizada sob agitação em vórtex e então transferida para o frasco de síntese com a resina desprotegida. O sistema foi deixado em agitação por 3 h, em mesa agitadora a 300 rpm, para o acoplamento. Após o tempo, a solução foi removida da seringa por meio de filtração e a peptil-resina foi lavada em três ciclos alternando 3 mL de DMF e 3 mL de AIP, seguindo-se uma lavagem com 3 mL de DCM.

O teste de Kaiser foi aplicado para a verificação de acoplamento do aminoácido e, em caso positivo (resina transparente), sucedeu-se com a desproteção da peptidil-resina mediante uso de 2,5 mL de solução de PIPE com agitação por 15 minutos por duas vezes, seguindo-se lavagem com DCM. Um novo teste de Kaiser foi aplicado para verificar se houve a remoção do grupo Fmoc do novo resíduo de aminoácido incorporado à peptídil-resina.

Para o acoplamento dos demais resíduos de aminoácidos, foi realizada a pesagem de HOBT e do respectivo Fmoc-aminoácido com excesso estequiométrico de três vezes, adição de 2,0 mL de DMF e do volume de DIC com três vezes em excesso, homogeneização com vórtex e adição ao frasco com a resina. A agitação foi de 2 h para esses demais acoplamentos.

Após cada acoplamento, seguiu-se com lavagem e teste de Kaiser. Em caso positivo de acoplamento, prosseguiu-se com a desproteção, lavagem e acoplamento, e em caso negativo, realizou-se um novo acoplamento, mas com excesso estequiométrico de quatro vezes e agitação por 3h.

4.2.3 CLIVAGEM

Após o acoplamento de toda a sequência de aminoácidos dos peptídeos, uma última desproteção com PIPE foi realizada, removendo o grupo Fmoc do último aminoácido da sequência, seguido de lavagem e teste de Kaiser.

Para a clivagem, foi adicionada às peptil-resinas, previamente secas com nitrogênio gasoso, uma solução de TFA:TIS:água (ácido trifluoroacético:triisopropilsilano:água), na proporção 95,0:2,5:2,5 (v/v/v). As misturas foram submetidas à agitação mecânica por 1h30 e 2h, para o PEP1 e PEP2, respectivamente. Em seguida, as soluções de clivagem foram transferidas para tubos Falcon limpos. Os frascos de síntese foram lavados com cerca de 0,5 mL de TFA, agitados manualmente para lavar a resina, e os líquidos foram colocados nos respectivos tubos.

O TFA dos tubos Falcon foram secos com nitrogênio gasoso até adquirirem aspecto de coloide. Seguiu-se com a lavagem dos peptídeos pela adição de 5 mL de éter gelado e posterior centrifugação em rotação de 500 rpm durante 5 minutos, após o qual se observou um precipitado e o sobrenadante foi removido com pipeta. Repetiu-se por mais três vezes a adição de éter, centrifugação e remoção do sobrenadante.

O resíduo de éter foi guardado e o peptídeo obtido foi seco com o auxílio de gás nitrogênio. Por fim, o peptídeo foi liofilizado e o peptídeo bruto pesado.

4.3 PURIFICAÇÃO POR CLAE E ANÁLISE POR EM

A purificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). Os experimentos foram executados em um cromatógrafo *Shimadzu LC20AD/SPDM20A/RID20 (Kyoto, Japan)*, no Laboratório de Serviço de Recursos Vegetais e Opoterápicos na Fundação Ezequiel Dias (FUNED), em Belo Horizonte. Empregou-se uma coluna C18 em escala semi-preparativa *Pursuit 5 C18 250 x 10,0 mm*.

Foram utilizados como eluentes da fase móvel soluções desgaseificadas de água ultrapura mili-Q, acidificada com TFA grau UV/HPLC (0,1% TFA/água ultrapura, fase A) e acetonitrila (ACN) grau UV/HPLC da em TFA (ACN/TFA 0,1%, fase B). Para o monitoramento dos experimentos, foi utilizado o detector de ultravioleta (UV) na faixa do comprimento de onda de 280 nm e 214 nm.

A coluna foi equilibrada em água acidulada com TFA 0,1%, e a eluição do peptídeo ocorreu em um gradiente linear quanto à fase B, com fluxo de 2 mL/min, nas seguintes condições: 20% até os 7 min iniciais; dos 7 aos 30 min chegando aos 75%; dos 30 a 32 min chegando aos 100%, permanecendo em 100% até os 33 min, seguindo decaimento até 20% até os 35 min e se mantendo estável até 45min. Foi injetado 1,0 mL de uma solução do peptídeo em água na concentração de 10 mg/mL.

A fração cromatográfica de cada peptídeo foi coletada e a massa molecular foi avaliada por espectrometria de massas MALDI-TOF, realizada no Laboratório de Proteômica da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Os experimentos foram realizados em equipamento *Bruker Autoflex III SmartBeam* (MALDI TOF/TOF) e foi utilizado o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz e modo refletido positivo do analisador TOF, obtendo-se espectros do tipo MS1, pelo qual é possível determinar a massa molecular dos peptídeos. Então, realizou-se a fragmentação dos peptídeos em matriz com ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e modo de execução LIFT, obtendo-se espectros do tipo MS2 (MS/MS), permitindo o sequenciamento das amostras .

Os espectros foram processados por meio do software *ProteoWizard* e as sequências foram validadas com o apoio da ferramenta ChemCalc (disponível em <https://www.chemcalc.org/>. Acesso em: 18 de maio de 2026).

Por fim, realizou-se uma cromatografia em escala analítica dos peptídeos purificados para avaliar o grau de pureza, o que ocorreu em equipamento *Shimadzu LC-10ATVP/SPD-M10AVP/SCL-10AVP/CTO-10AVP*, no Laboratório de Serviço de Recursos Vegetais e Opoterápicos na FUNED. Utilizou-se uma coluna analítica *ZORBAX Eclipse Plus C18* 4,6 x 150 mm, eluindo-se alíquotas dos peptídeos (30 μ L de solução a 2,1 mg/mL), com fluxo de 1 mL/min, com gradiente de ACN/TFA 01% nas seguintes condições: 10% até os 4 minutos iniciais, 100% até 15 minutos, mantendo-se até 17 minutos, seguindo decaimento até 0% até 20 minutos. Para o monitoramento dos experimentos, foi utilizado o detector de ultravioleta (UV) na faixa do comprimento de onda de 220 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS

A partir dos servidores *PepCalc* e *PeptideSynthetics*, obteve-se as seguintes informações sobre as propriedades físico-químicas dos peptídeos: para Pep1, massa molar média igual a 1.308,74 g/mol, massa monoisotópica igual a 1.307,93 g/mol, carga elétrica em pH 7 de 5 e boa solubilidade em água; para o Pep2, massa molar média igual a 1.284,68 g/mol, massa monoisotópica igual a 1.283,86 g/mol, carga elétrica em pH 7 de 3 e baixa solubilidade em água. Além disso, a partir do servidor *AI4AXP*, verificou-se para ambas as sequências uma pontuação de 0,999, indicando alto potencial de atividade antitumoral.

5.2 SÍNTESES

Seringas plásticas foram utilizadas como recipientes para todo o processo de síntese (acoplamento, desproteção, lavagens e clivagem). Escolheu-se seringas de 5 mL com tampa, ilustradas na Figura 5-1, as quais foram adicionados filtro poroso e lavadas com água ultrapura e DCM. Esse tipo de recipiente permite a adição das soluções com os resíduos de aminoácidos, a fácil remoção por filtração dos solventes e reagentes solúveis em excesso e a fácil lavagem dos produtos acoplados ao suporte sólido, evitando perdas. Além disso, permite a síntese em quantidades pequenas de peptídeos.



Figura 5-1: Seringas onde ocorreram as sínteses dos peptídeos PEP1 e PEP2 (Fonte: autora).

Em relação a suporte sólido, fez-se a escolha da resina *Fmoc Rink Amide PEG AM*, cuja estrutura é apresentada na Figura 5-2. A resina é constituída por aminometil-poliestireno com polietilenoglicol (PEG) e o ligante *Rink Amide* cujo grupo amino é protegido pelo grupamento Fmoc. O ligante é lábil em meio ácido, liberando ao final de todas as etapas de acoplamento, levando à sequência peptídica de interesse com a porção C-terminal amidada, o que é almejado no presente estudo. (Chan & White, 2000).

É interessante que a porção C-terminal seja amidada, uma vez que a atividade biológica de peptídeos é associada a esta característica, de forma que estudos já mostraram uma diminuição na atividade de peptídeos quando a amidação C-terminal é removida e que a inclusão da amida C-terminal de forma sintética a análogos de peptídeos não amidados aumenta essa atividade. Além disso, a baixa atividade de peptídeos não amidados é geralmente associada a uma redução da carga positiva da estrutura ou à diminuição da estrutura helicoidal (Sforça et al, 2004).

A síntese é então iniciada pelo acoplamento do último resíduo de aminoácido da sequência de cada peptídeo, logo, leucina (L) para o PEP 1 e lisina (K) para o PEP2.

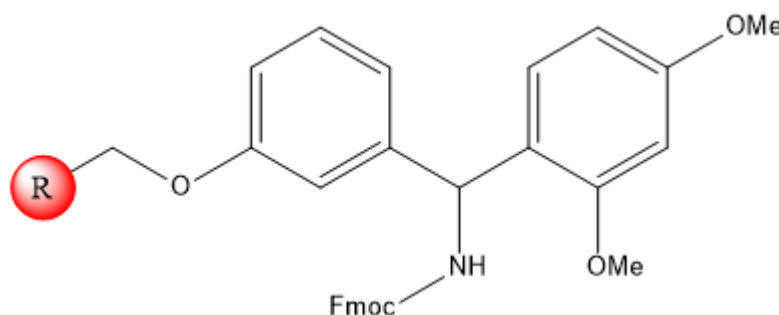


Figura 5-2: Estrutura da resina *Fmoc Rink Amide PEG AM* (Fonte: autora).

Para o manuseio da resina, é importante que ela seja primeiramente expandida com o solvente apropriado, como o DCM (diclorometano), permitindo a maior difusão dos reagentes para o seu interior, o que confere acessibilidade aos sítios reativos (Chan & White, 2000).

Anteriormente ao acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido, é necessário remover o grupo Fmoc da resina, que ocorre por meio da reação com 4-metil-piperidina a 25 % (v/v) em DMF, consistindo em um mecanismo de eliminação de duas etapas, como proposto na Figura 5-3. Na primeira etapa, ocorre a remoção do próton do fluoreno pela base (*i.e.*, PIPE), seguido da clivagem do grupo Fmoc, regenerando a PIPE e liberando gás carbônico e a peptil-resina com seu grupo amino terminal desprotegido (Chan & White, 2000). Essa etapa de desproteção deve ser realizada previamente ao acoplamento dos resíduos de aminoácidos subsequentes à peptidil-resina.

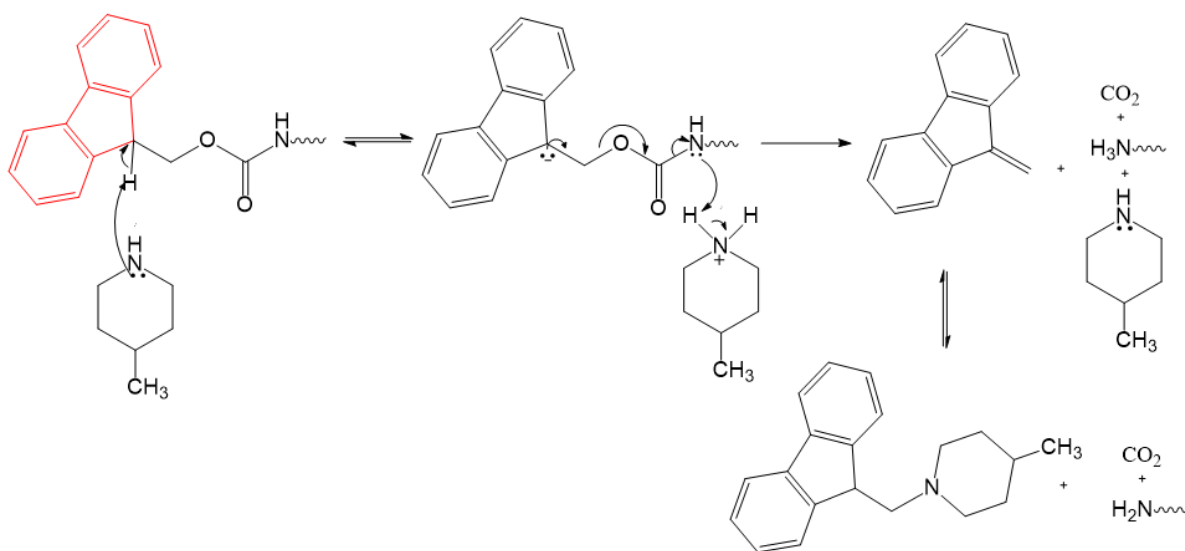


Figura 5-3: Mecanismo proposto para a desproteção do grupo Fmoc com 4-metil-piperidina (Fonte: autora. Adaptado de Resende, 2008).

Após a etapa de desproteção, foi realizada uma lavagem da peptidil-resina: três ciclos alternados de adição de DMF, agitação e descarte, e adição de AIP (álcool isopropílico), agitação e descarte (aproximadamente 3 mL de cada), e, por fim, uma lavagem DCM (aproximadamente 3 mL). Esse processo permite a remoção de solventes em excesso, dessa forma, removendo toda a PIPE da etapa de desproteção da peptidil-resina, garantindo que a base não interfira na etapa de acoplamento subsequente (Collins, 2023). Por fim, o DCM expande novamente a resina para o acoplamento que se seguirá.

Para verificar o sucesso da desproteção (remoção do grupo Fmoc), foi realizado o **teste de Kaiser**, ou teste da ninidrina, que permite a identificação de aminas primárias. O teste é aplicado também para verificar o sucesso das etapas de acoplamento. Ao passo que a coloração violeta indica a remoção do grupo Fmoc, sua ausência indica a presença do grupo na peptidil-resina. O mecanismo proposto para a reação é apresentado na Figura 5-4 e se baseia, primeiramente, no ataque nucleofílico do par de elétrons não ligantes do nitrogênio do resíduo de aminoácido a uma carbonila da ninidrina, liberando água e formando uma imina, a qual sofre rearranjo e então, a partir de uma hidrólise, é formada uma amina primária. Esta amina, ao reagir com outra molécula de ninidrina e perder água leva à formação de uma imina conhecida como púrpura de Ruhemann, que possui forte coloração violeta, indicando, assim, a presença de grupo amino livre no meio (Resende, 2008; Verly, 2010).

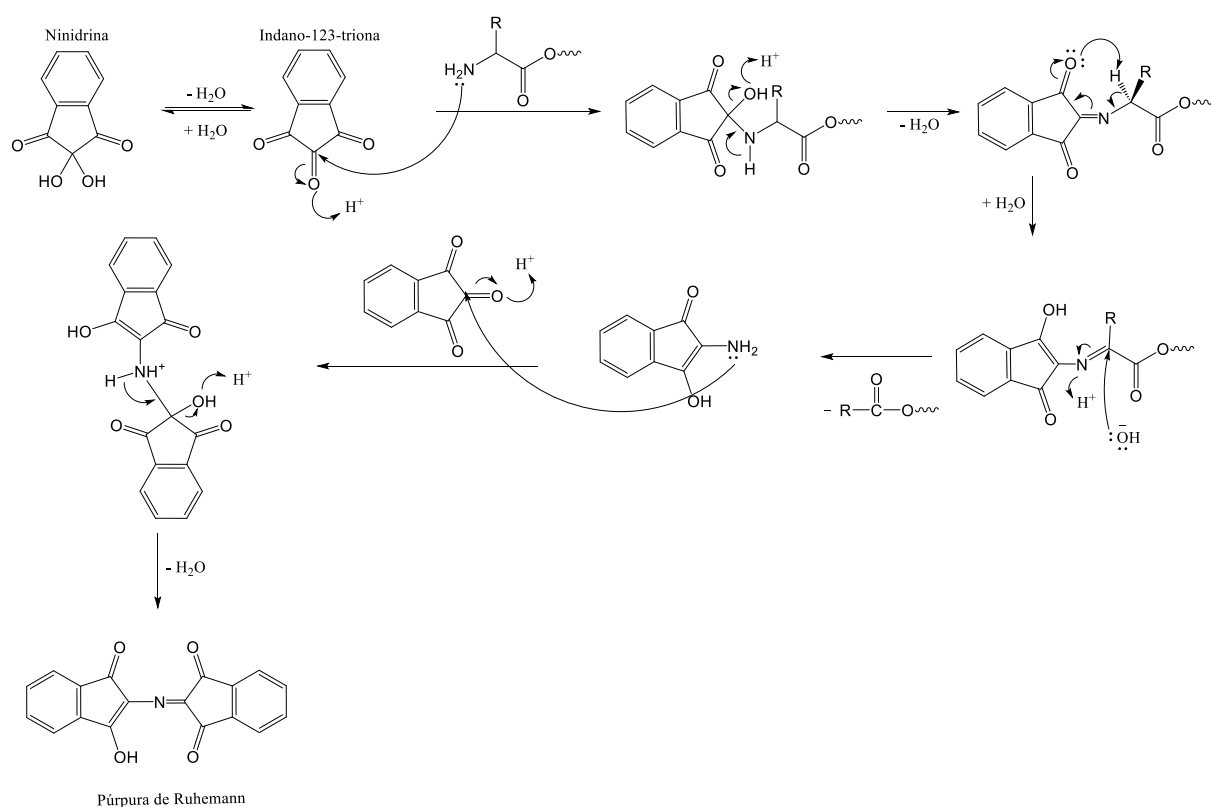


Figura 5-4: Mecanismo proposto para o teste de Kaiser (Fonte: autora. Adaptado de Verly, 2010).

Na Figura 5-5, podem ser observados dois resultados do teste de Kaiser realizados em laboratório, em que no painel (A) é apresentado o resultado de um teste positivo para reação de desproteção (remoção do grupo Fmoc), observando-se forte

coloração violeta da alíquota testada. Por sua vez, no painel (B), observa-se um resultado negativo do teste, obtido após o acoplamento de um Fmoc-resíduo de aminoácido, o que é evidenciado pela ausência de coloração, e que confirma a presença do referido grupo amino-protetor na peptidil-resina.

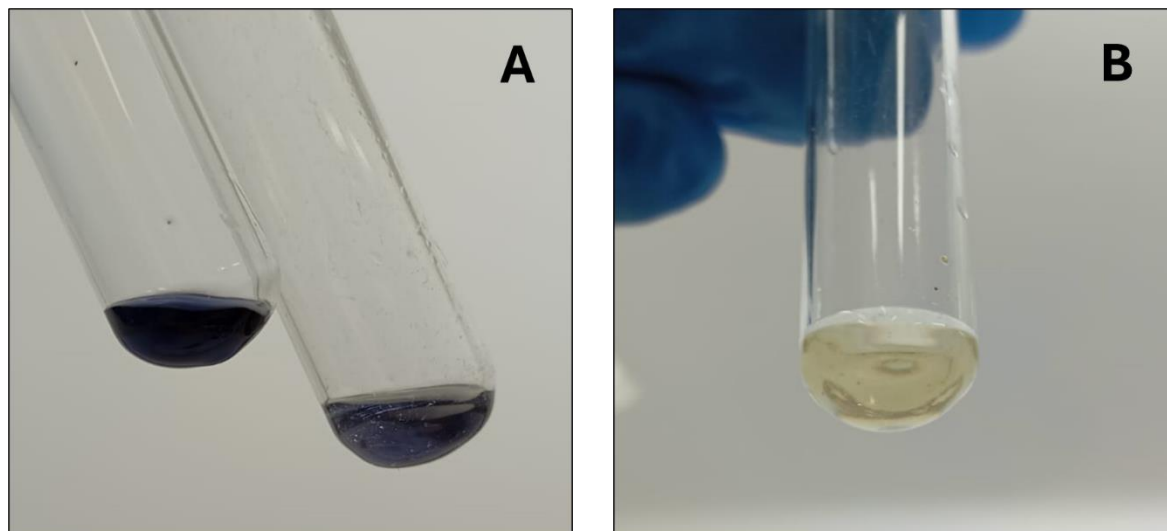


Figura 5-5: Resultados do teste de Kaiser. (A): resultado positivo, caracterizado por coloração azul-violeta, indicam ou a desproteção da resina após tratamento com 4-metil-piperidina ou etapa de acoplamento mal-sucedido. (B) A solução e grãos incolores indicam ou ineficácia da etapa de desproteção ou reação de acoplamento bem sucedida. (Fonte: autora).

Confirmado o sucesso da desproteção da resina, sucedeu-se com o acoplamento dos primeiros resíduos de aminoácidos para início da síntese de cada peptídeo. Esse processo requer a ativação do Fmoc-aminoácido, a fim de se obter uma carboxila mais reativa, um agente acilante (Chan & White, 2000). Neste estudo, utilizou-se o método que emprega DIC/HOBt, resultando na formação de um éster OBt. As estruturas do HOBt (1-hidróxi-benzotriazol) e da DIC (1,3-di-isopropil-carbo-di-imida) são apresentadas na Figura 5-6, bem como o mecanismo proposto da ativação do Fmoc-aminoácido, seguindo-se o acoplamento à peptidil-resina.

Inicialmente, ocorre uma reação entre o Fmoc-aminoácido e o DIC, seguindo-se do acoplamento com o HOBt na carbonila, que leva à liberação de uma di-amida similar à ureia e solúvel em DMF e HOBt, formando o éster ativo OBt. Ocorre, então, o ataque da peptidil-resina à carbonila do éster ativo, obtendo-se finalmente o

acoplamento e a Fmoc-peptidil-resina resultante, bem como a simultânea liberação de HOBt (Resende, 2008).

Para que ocorra a formação do éster OBt, deve-se deixar o sistema Fmoc-aminoácido/DIC/HOBt dissolvido em DMF em processo de ativação por pelo menos dez minutos, antes da reação com a peptidil resina (RESENDE, 2008).

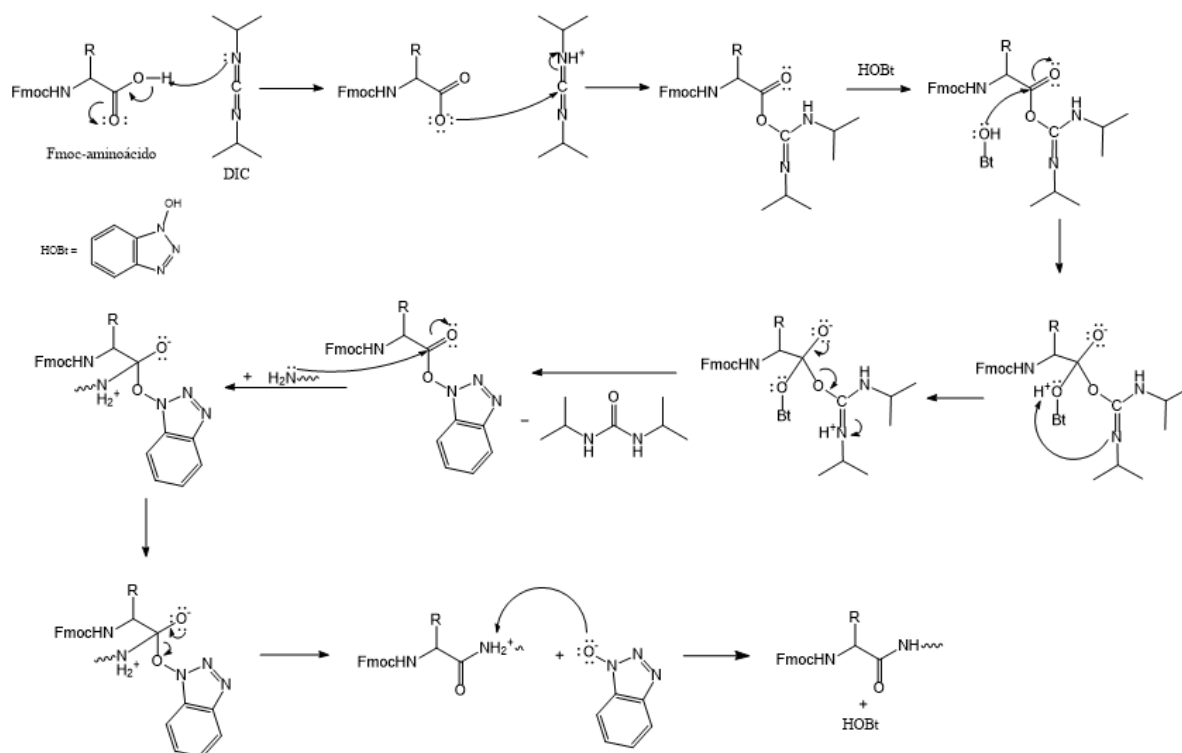


Figura 5-6: Mecanismo proposto para a reação de acoplamento entre o Fmoc-aminoácido e a peptidil-resina, via formação de éster ativado (Fonte: autora. Adaptado de Resende, 2008).

Após a adição da solução com o Fmoc-aminoácido, DIC, HOBt e DMF à seringa contendo a peptidil-resina, deixou-se o sistema agitando por três horas para o primeiro acoplamento. Para acoplamentos subsequentes, as reações foram realizadas por duas horas. Em caso de necessidade de reacoplamento, aumentou-se o tempo de reação para três horas.

Após cada acoplamento, realizou-se a lavagem com DMF, álcool isopropílico e DCM, seguiu-se com o teste de Kaiser. Em caso de resultado negativo, seguiu-se reação de desproteção e então novo teste de Kaiser. Esse processo foi repetido até o final da sequência de cada peptídeo.

A Tabela 5-1 apresenta as informações das etapas de acoplamentos durante as sínteses dos peptídeos PEP1 e PEP2. A partir dela, é possível observar que as reações de acoplamento foram bem-sucedidas, com a única exceção para o 11º acoplamento do PEP1, que necessitou de reacoplamento, com maior excesso de reagentes e maior tempo de reação. Além disso, para evitar a possibilidade de dificuldades no acoplamento do último aminoácido no PEP1, optou-se também pela utilização de excesso de equivalentes de quatro vezes e 3h de reação.

Tabela 5-1: Dados de acompanhamento da síntese dos peptídeos PEP1 e PEP2.

Número	PEP1				PEP2			
	AA	Excesso reagente	Tempo reação (h)	Condições de reacoplamento (tempo/excesso reagentes)	AA	Excesso reagente	Tempo reação (h)	Condições de reacoplamento (tempo/excesso reagentes)
1	L	4	3	-	K	4	3	-
2	K	3	2	-	A	3	2	-
3	A	3	2	-	L	3	2	-
4	L	3	2	-	L	3	2	-
5	A	3	2	-	N	3	2	-
6	K	3	2	-	L	3	2	-
7	L	3	2	-	F	3	2	-
8	K	3	2	-	K	3	2	-
9	L	3	2	-	L	3	2	-
10	K	3	2	-	L	3	2	-
11	L	3	2	3h / 4	I	3	2	-
12	A	4	3	-	-	-	-	-

Ao fim das sínteses, os peptídeos foram clivados do suporte sólido (Figura 5-7). O desligamento dos peptídeos das peptidil-resinas foi realizado a partir do uso de solução em ácido trifluoroacético (TFA) que, por um mecanismo S_N1 , promove a clivagem tanto dos peptídeos das resinas quanto dos grupos protetores das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Durante o processo, são geradas espécies catiônicas altamente reativas, provenientes dos grupos protetores e da resina, e que podem sofrer ataque dos grupos funcionais ricos em elétrons. Por esse motivo, reagentes nucleofílicos conhecidos como *scavengers* (sequestradores de carbocátion) são utilizados juntamente ao TFA. O mais utilizado é a água, que é moderadamente efetiva na neutralização da ação de cátions *t*-butila. O tri-isopropilsilano (TIS) é um reagente muito efetivo na neutralização da ação de grupos Trt e Boc, grupos protetores dos resíduos Asparagina (N) e Lisina (K), respectivamente, bem como de alguns grupos liberados da resina. Nas sínteses realizadas neste trabalho, empregou-se uma solução de clivagem TFA:TIS:água na proporção de 95,0:2,5:2,5 (v/v) (Resende, 2008).

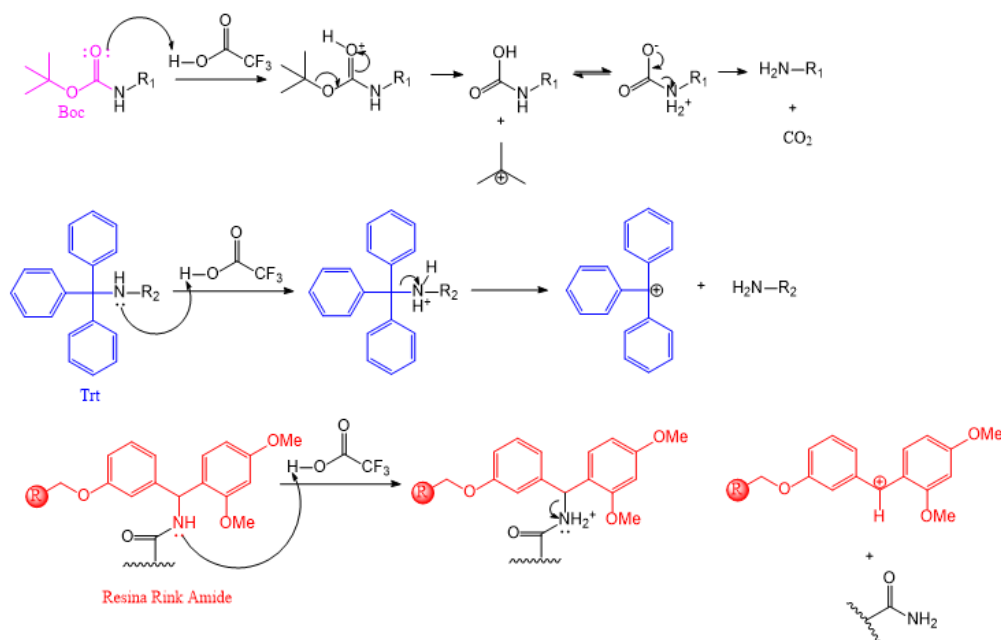


Figura 5-7: Mecanismos propostos para as reações de clivagem dos grupos protetores Boc e Trt e da resina Rink Amide, gerando carbocátions, e liberando os grupos aminos das cadeias laterais e do suporte sólido. (Fonte: autora).

Em seguida, realizou-se a etapa de liofilização, obtendo-se 129 mg do PEP1 e 110 mg do PEP2 brutos. Observa-se que essas massas são superiores ao que foi planejado (*i.e.*, 100 mg), o que é incomum, podendo ser um indicativo de presença de umidade nas amostras.

5.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

A purificação dos peptídeos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa. O peptídeo PEP1 foi sintetizado com a sequência alvo **ALKLKLKALAKL-NH₂**. Múltiplos picos são observados no cromatograma apresentado na Figura 5-8, de forma que as frações correspondentes às bandas mais intensas foram coletadas e avaliadas por EM (Figura 5-10), confirmando que o pico mais intenso foi correspondente ao peptídeo de interesse. A banda referente ao peptídeo de interesse foi pesada, obtendo-se uma massa de 40,02 mg, o que representa 40% de rendimento em relação ao planejado. Conforme avaliado por espectrometria de massas (dados não apresentados), os demais picos apresentados na purificação referem-se a sequências com deleção de alguns resíduos de aminoácidos, possivelmente por falhas no acoplamento e desproteções incompletas, o que é comum para a síntese manual de peptídeos. Por exemplo, para a banda que apresentou tempo de retenção entre 20,5 e 21,0 minutos, a sequência sugerida após avaliação por EM foi de AKLKLKALAKL-NH₂, uma sequência de 11 resíduos, apresentando deleção da leucina na segunda posição em relação à sequência de interesse.

Já o peptídeo PEP2 foi sintetizado com a sequência alvo **ILLKFLNLLAK-NH₂**, e, de forma similar ao PEP1, múltiplos picos são observados no cromatograma apresentado na Figura 5-11. As bandas mais intensas foram coletadas e avaliadas por EM, confirmando que o pico mais intenso foi correspondente ao peptídeo de interesse, como apresentado na Figura 5-13. A massa obtida a partir da coleta do pico de interesse foi de 51,7 mg, representando 51,7% de rendimento em relação ao planejado.

A técnica de EM por meio do MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) como fonte de ionização, com detector do tipo TOF (*time-of-flight*), gera predominantemente íons monocarregados $(M+H)^+$ e a massa é determinada pelo tempo de voo do íon até o detector (Lewis et al, 2000). Uma vez que a energia usada para levar à fragmentação dos peptídeos é insuficiente para romper ligações entre o carbono-alfa e o carbono da carbonila, bem como entre o nitrogênio e o carbono-alfa adjacente, são observados em grande maioria a quebra da ligação peptídica, que é menos energética (Cantú et al, 2008). Por convenção, os fragmentos gerados pelo rompimento da ligação peptídica são chamados de “b”, caso a fragmentação seja considerada a partir da região N-terminal, ou de “y”, caso os fragmentos aparentem se estender a partir da região C-terminal (IonSource, 2016), e são complementares entre si. Assim, os fragmentos compatíveis, obtidos pelo servidor ChemCalc, são mostrados nas Tabela 5-2 e Tabela 5-5.

Dessa forma, a fragmentação ocorre por amino ácido e a diferença dos picos gerados é aproximadamente a massa do resíduo de aminoácido clivado, permitindo a determinação da sequência peptídica.

Nota-se, nos espectros dos ensaios de MS (Figura 5-10A e Figura 5-13A), a presença de sinais de m/z extras à direita e esquerda do sinal principal correspondentes aos íons moleculares dos peptídeos de interesse. Os sinais à direita dos sinais principais podem ser atribuídos à presença de íons potássio e sódio nas amostras, em associação aos peptídeos $([M + Na]^+)$ e $([M + K]^+)$, e que estão presentes em solventes e em plásticos usados na preparação de amostras e armazenamento (Zhu, 2003). Isso é comprovado pela diferença entre os valores de cada sinal ao principal, por exemplo, para o PEP1, que apresentou picos de m/z com valores de 1.330,76 e 1.346,72, apresentando uma diferença de 22,02 e 37,98 em relação ao sinal principal de 1.308,74, correspondentes aos íons de sódio e ao potássio, respectivamente. Já para o PEP2, os sinais apresentaram valores de 1.306,87 e 1.322,84, com diferença de 22,04 e 38,01 em relação ao sinal principal de 1.284,83, correspondentes aos íons de sódio e ao potássio, respectivamente. Já os sinais identificados à esquerda dos íons moleculares principais podem ser referentes à

formação de *clusters* (agrupamentos) da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em conjunto com íons de sódio e potássio, que apresentam ser relativamente estáveis e aparecem em sinais discretos em regiões de até ~ 2.000 m/z (Keller, 2000).

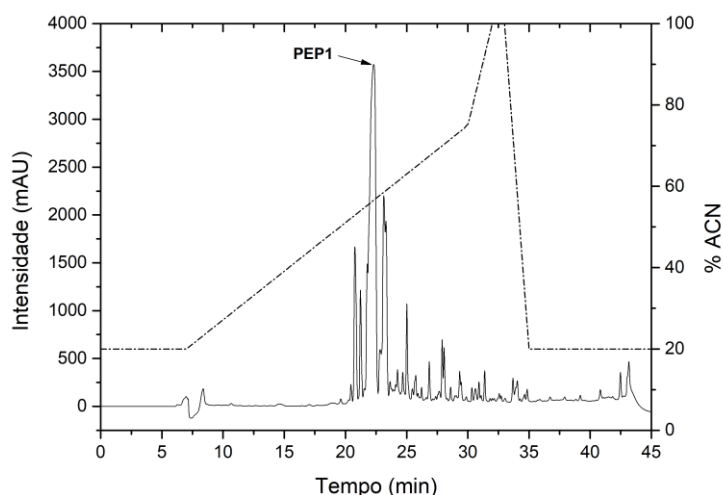


Figura 5-8: Perfil de CLAE do produto bruto da síntese do PEP1. Amostras injetadas (1 mL de uma solução a 10 mg.mL^{-1}) em coluna C18 *Pursuit 5* (250 mm x 10 mm) equilibrada com TFA a 0,2%. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 2 mL.min^{-1} . A linha tracejada retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorvância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}} = 280$ nm.

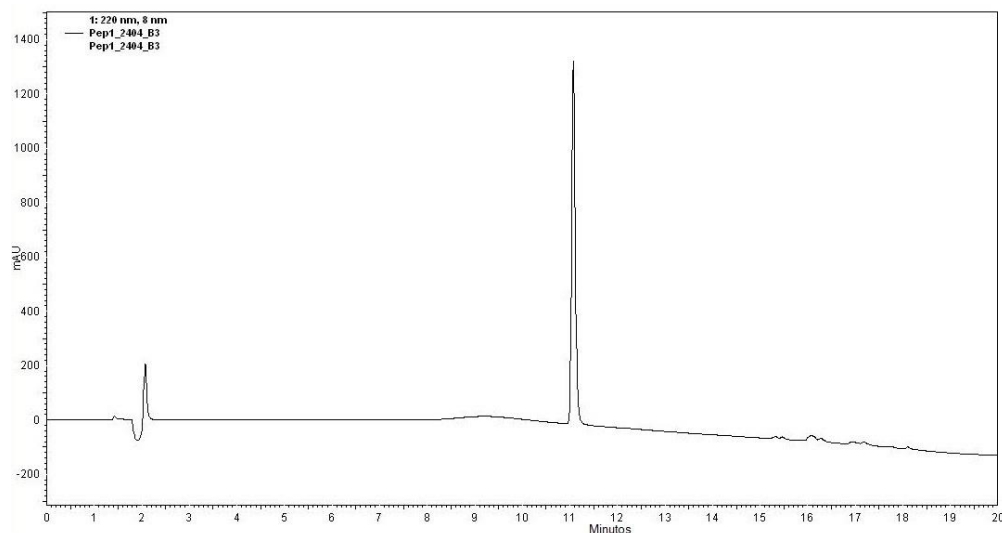


Figura 5-9: Perfil de CLAE do produto purificado da síntese do PEP1. Amostras injetadas ($30 \mu\text{L}$ de uma solução a $2,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) em coluna C18 *ZORBAX Eclipse Plus* (4,6 x 150 mm) equilibrada com TFA a 0,1%. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 1 mL.min^{-1} . Gradiente de ACN/TFA 0,1%: 10% até os 4 minutos iniciais, 100% até 15 minutos, mantendo-se até 17 minutos, seguindo decaimento até 0% até 20 minutos. A absorvância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}} = 220$ nm.

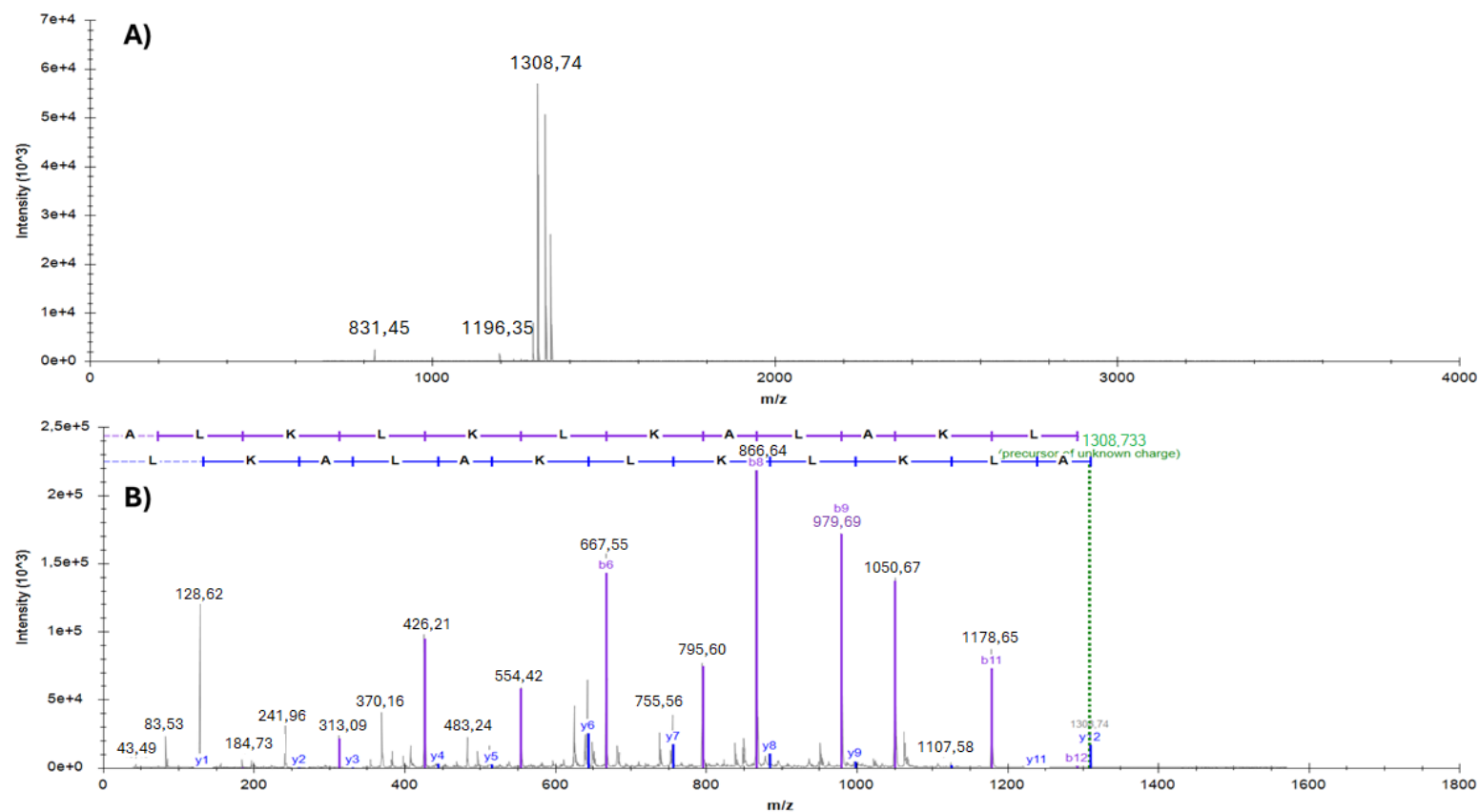


Figura 5-10: Interpretação do espectro de massas referente ao PEP1, obtido por MALDI-TOF, com matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, modo de execução refletido positivo para o ensaio de MS, e modo de execução LIFT para o ensaio de MS/MS. A) Espectro de MS. B) Sequenciamento do peptídeo, por meio do espectro de MS/MS.

Tabela 5-2: Valores da massa monoisotópica, razão m/z e fórmula molecular para cada fragmento da desassociação das ligações peptídicas do PEP1, em relação ao fragmento y.

#	Fragmento	Tipo	Massa monoisotópica	Ionização	Fórmula Molecular	m/z
1	H2(+1)Leu(NH ₂)	y1	131,1184	H+	C ₆ H ₁₅ N ₂ O(+1)	66,0626
2	H2(+1)LysLeu(NH ₂)	y2	259,2134	H+	C ₁₂ H ₂₇ N ₄ O ₂ (+1)	130,1101
3	H2(+1)AlaLysLeu(NH ₂)	y3	330,2505	H+	C ₁₅ H ₃₂ N ₅ O ₃ (+1)	165,6286
4	H2(+1)LeuAlaLysLeu(NH ₂)	y4	443,3346	H+	C ₂₁ H ₄₃ N ₆ O ₄ (+1)	222,1707
5	H2(+1)AlaLeuAlaLysLeu(NH ₂)	y5	514,3717	H+	C ₂₄ H ₄₈ N ₇ O ₅ (+1)	257,6892
6	H2(+1)LysAlaLeuAlaLysLeu(NH ₂)	y6	642,4667	H+	C ₃₀ H ₆₀ N ₉ O ₆ (+1)	321,7367
7	H2(+1)LeuLysAlaLeuAlaLysLeu(NH ₂)	y7	755,5507	H+	C ₃₆ H ₇₁ N ₁₀ O ₇ (+1)	378,2787
8	H2(+1)LysLeuLysAlaLeuAlaLysLeu(NH ₂)	y8	883,6457	H+	C ₄₂ H ₈₃ N ₁₂ O ₈ (+1)	442,3262
9	H2(+1)LeuLysLeuLysAlaLeuAlaLysLeu(NH ₂)	y9	996,7297	H+	C ₄₈ H ₉₄ N ₁₃ O ₉ (+1)	498,8682
10	H2(+1)LysLeuLysLeuLysAlaLeuAlaLysLeu(NH ₂)	y10	1124,8247	H+	C ₅₄ H ₁₀₆ N ₁₅ O ₁₀ (+1)	562,9157
11	H2(+1)LeuLysLeuLysLeuLysAlaLeuAlaLysLeu(NH ₂)	y11	1237,9088	H+	C ₆₀ H ₁₁₇ N ₁₆ O ₁₁ (+1)	619,4578
12	HAlaLeuLysLeuLysLeuLysAlaLeuAlaLysLeu(NH ₂)		1307,9381	H+	C ₆₃ H ₁₂₁ N ₁₇ O ₁₂	1308,9453

Tabela 5-3: Valores da massa monoisotópica, razão m/z e fórmula molecular para cada fragmento da desassociação das ligações peptídicas do PEP1, em relação ao fragmento b.

#	Fragmento	Tipo	Massa monoisotópica	Ionização	Fórmula Molecular	m/z
1	HAla(+1)	b1	72,0449	H+	C ₃ H ₆ NO(+1)	36,5258
2	HAlaLeu(+1)	b2	185,1290	H+	C ₉ H ₁₇ N ₂ O ₂ (+1)	93,0679
3	HAlaLeuLys(+1)	b3	313,2240	H+	C ₁₅ H ₂₉ N ₄ O ₃ (+1)	157,1153
4	HAlaLeuLysLeu(+1)	b4	426,3080	H+	C ₂₁ H ₄₀ N ₅ O ₄ (+1)	213,6574
5	HAlaLeuLysLeuLys(+1)	b5	554,4030	H+	C ₂₇ H ₅₂ N ₇ O ₅ (+1)	277,7049
6	HAlaLeuLysLeuLysLeu(+1)	b6	667,4871	H+	C ₃₃ H ₆₃ N ₈ O ₆ (+1)	334,2469
7	HAlaLeuLysLeuLysLeuLys(+1)	b7	795,5820	H+	C ₃₉ H ₇₅ N ₁₀ O ₇ (+1)	398,2944
8	HAlaLeuLysLeuLysLeuLysAla(+1)	b8	866,6191	H+	C ₄₂ H ₈₀ N ₁₁ O ₈ (+1)	433,8129
9	HAlaLeuLysLeuLysLeuLysAlaLeu(+1)	b9	979,7032	H+	C ₄₈ H ₉₁ N ₁₂ O ₉ (+1)	490,3550
10	HAlaLeuLysLeuLysLeuLysAlaLeuAla(+1)	b10	1050,7403	H+	C ₅₁ H ₉₆ N ₁₃ O ₁₀ (+1)	525,8735
11	HAlaLeuLysLeuLysLeuLysAlaLeuAlaLys(+1)	b11	1178,8353	H+	C ₅₇ H ₁₀₈ N ₁₅ O ₁₁ (+1)	589,9210
12	HAlaLeuLysLeuLysLeuLysAlaLeuAlaLysLeu(NH ₂)		1307,9381	H+	C ₆₃ H ₁₂₁ N ₁₇ O ₁₂	1308,9453

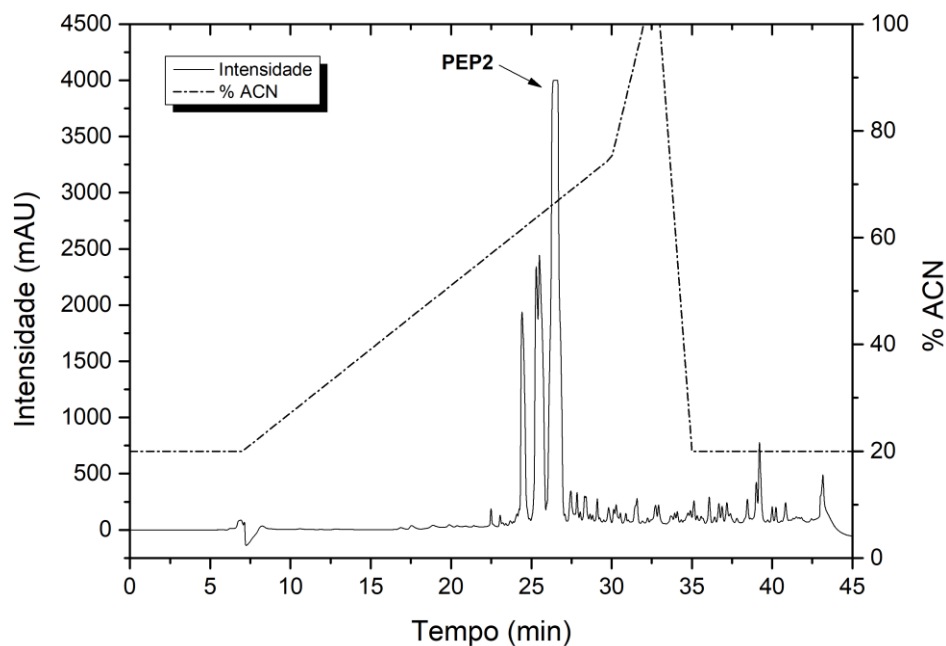


Figura 5-11: Perfil de CLAE do produto bruto da síntese do PEP2. Amostras injetadas (1 mL de uma solução a 10 mg.mL^{-1}) em coluna C18 *Pursuit 5* (250 mm x 10 mm) equilibrada com TFA a 0,2%. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 2 mL.min^{-1} . A linha tracejada retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorvância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}} = 280 \text{ nm}$.

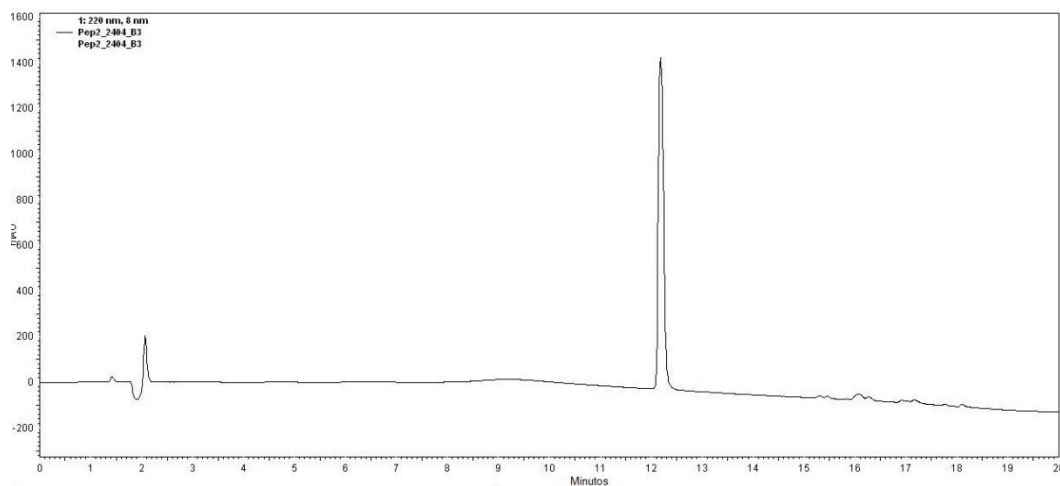


Figura 5-12: Perfil de CLAE da amostra de PEP2 purificado. Amostras injetadas ($30 \mu\text{L}$ de uma solução a $2,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) em coluna C18 *ZORBAX Eclipse Plus* (4,6 x 150 mm) equilibrada com TFA a 0,1%. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 1 mL.min^{-1} . Gradiente de ACN/TFA 0,1%: 10% até os 4 minutos iniciais, 100% até 15 minutos, mantendo-se até 17 minutos, seguindo decaimento até 0% até 20 minutos. A absorvância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}} = 220 \text{ nm}$.

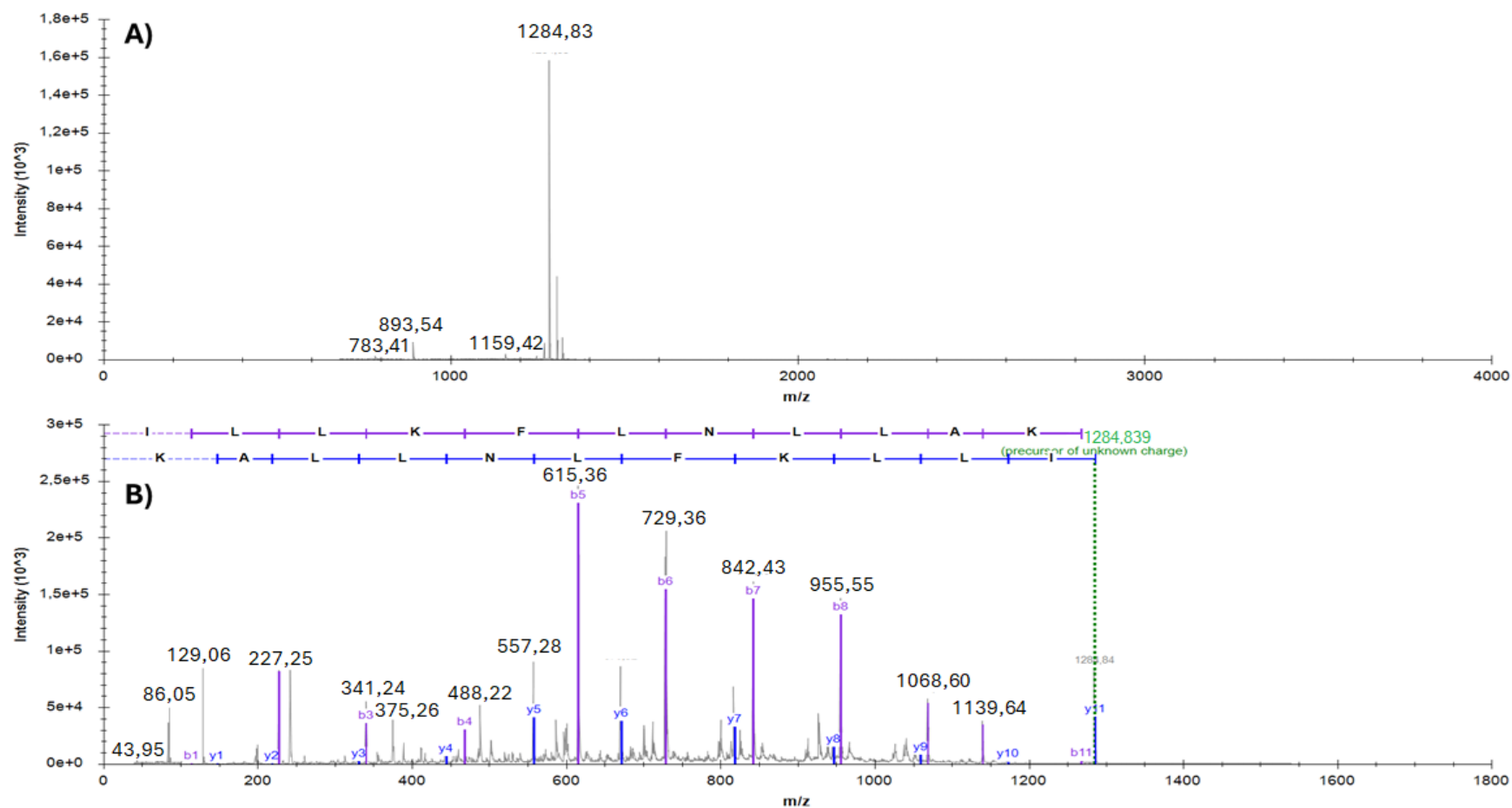


Figura 5-13: Interpretação do espectro de massas referente ao PEP2, obtido por MALDI-TOF, com matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, modo de execução refletido positivo para o ensaio de MS, e modo de execução LIFT para o ensaio de MS/MS. A) Espectro de massas. B) Sequenciamento do peptídeo, por meio do espectro de massas MS/MS.

Tabela 5-4: Valores da massa monoisotópica, razão m/z e fórmula molecular para cada fragmento da desassociação das ligações peptídicas do PEP2, em relação ao fragmento y.

#	Fragmento	Tipo	Massa monoisotópica	Ionização	Fórmula Molecular	m/z
1	H2(+1)Lys(NH ₂)	y1	146,1293	H+	C ₆ H ₁₆ N ₃ O(+1)	73,5680
2	H2(+1)AlaLys(NH ₂)	y2	217,1665	H+	C ₉ H ₂₁ N ₄ O ₂ (+1)	109,0866
3	H2(+1)LeuAlaLys(NH ₂)	y3	330,2505	H+	C ₁₅ H ₃₂ N ₅ O ₃ (+1)	165,6286
4	H2(+1)LeuLeuAlaLys(NH ₂)	y4	443,3346	H+	C ₂₁ H ₄₃ N ₆ O ₄ (+1)	222,1707
5	H2(+1)AsnLeuLeuAlaLys(NH ₂)	y5	557,3775	H+	C ₂₅ H ₄₉ N ₈ O ₆ (+1)	279,1921
6	H2(+1)LeuAsnLeuLeuAlaLys(NH ₂)	y6	670,4616	H+	C ₃₁ H ₆₀ N ₉ O ₇ (+1)	335,7341
7	H2(+1)PheLeuAsnLeuLeuAlaLys(NH ₂)	y7	817,5300	H+	C ₄₀ H ₆₉ N ₁₀ O ₈ (+1)	409,2684
8	H2(+1)LysPheLeuAsnLeuLeuAlaLys(NH ₂)	y8	945,6249	H+	C ₄₆ H ₈₁ N ₁₂ O ₉ (+1)	473,3158
9	H2(+1)LeuLysPheLeuAsnLeuLeuAlaLys(NH ₂)	y9	1058,7090	H+	C ₅₂ H ₉₂ N ₁₃ O ₁₀ (+1)	529,8579
10	H2(+1)LeuLeuLysPheLeuAsnLeuLeuAlaLys(NH ₂)	y10	1171,7931	H+	C ₅₈ H ₁₀₃ N ₁₄ O ₁₁ (+1)	586,3999
11	HlleLeuLeuLysPheLeuAsnLeuLeuAlaLys(NH ₂)		1283,8693	H+	C ₆₄ H ₁₁₃ N ₁₅ O ₁₂	1284,8766

Tabela 5-5: Valores da massa monoisotópica, razão m/z e fórmula molecular para cada fragmento da desassociação das ligações peptídicas do PEP2, em relação ao fragmento b.

#	Fragmento	Tipo	Massa monoisotópica	Ionização	Fórmula Molecular	m/z
1	Hlle(+1)	b1	114,0919	H+	C ₆ H ₁₂ NO(+1)	57,5493
2	HlleLeu(+1)	b2	227,1760	H+	C ₁₂ H ₂₃ N ₂ O ₂ (+1)	114,0913
3	HlleLeuLeu(+1)	b3	340,2600	H+	C ₁₈ H ₃₄ N ₃ O ₃ (+1)	170,6334
4	HlleLeuLeuLys(+1)	b4	468,3550	H+	C ₂₄ H ₄₆ N ₅ O ₄ (+1)	234,6809
5	HlleLeuLeuLysPhe(+1)	b5	615,4234	H+	C ₃₃ H ₅₅ N ₆ O ₅ (+1)	308,2151
6	HlleLeuLeuLysPheLeu(+1)	b6	728,5075	H+	C ₃₉ H ₆₆ N ₇ O ₆ (+1)	364,7571
7	HlleLeuLeuLysPheLeuAsn(+1)	b7	842,5504	H+	C ₄₃ H ₇₂ N ₉ O ₈ (+1)	421,7786
8	HlleLeuLeuLysPheLeuAsnLeu(+1)	b8	955,6344	H+	C ₄₉ H ₈₃ N ₁₀ O ₉ (+1)	478,3206
9	HlleLeuLeuLysPheLeuAsnLeuLeu(+1)	b9	1068,7185	H+	C ₅₅ H ₉₄ N ₁₁ O ₁₀ (+1)	534,8626
10	HlleLeuLeuLysPheLeuAsnLeuLeuAla(+1)	b10	1139,7556	H+	C ₅₈ H ₉₉ N ₁₂ O ₁₁ (+1)	570,3812
11	HlleLeuLeuLysPheLeuAsnLeuLeuAlaLys(NH ₂)		1283,8693	H+	C ₆₄ H ₁₁₃ N ₁₅ O ₁₂	1284,8766

6 CONCLUSÃO

Realizaram-se, no presente trabalho, as sínteses bem-sucedidas das sequências peptídicas propostas. Os peptídeos foram obtidos através da estratégia Fmoc de síntese em fase sólida, tendo sido purificados por cromatografia líquida de alta eficiência e a confirmação da obtenção das substâncias de interesse foi realizada por análise de espectrometria de massas.

A síntese procedeu-se como almejado, com necessidade de reacoplamento apenas para o PEP1 para o penúltimo resíduo de aminoácido, para o qual se aumentou o excesso de reagente e o tempo de reação, sucedendo-se com a síntese.

Foi possível realizar a purificação dos peptídeos por meio da CLAE. A partir dos cromatogramas, foi possível observar a separação dos peptídeos desejados e subprodutos de reações secundárias, oriundas de acoplamentos indeficientes, gerando outras sequências peptídicas. Após a purificação, foram obtidas massas compatíveis com rendimentos de 40% e de 51,7% para PEP1 e PEP2, respectivamente.

Por fim, por meio da espectrometria de massas, foi possível confirmar a sequência dos peptídeos alvos, de forma que os picos mais intensos obtidos nos experimentos de cromatografia líquida foram referentes aos peptídeos desejados.

Os resultados obtidos indicam que os peptídeos apresentaram características de pureza e sequência adequadas para uso nos estudos de atividade antitumoral, objetivo para os quais foram planejadas as sínteses aqui descritas.

Tem-se como perspectivas a realização de ensaios biológicos, visando determinar a eficácia antitumoral em linhagens celulares neoplásicas, o mecanismo de ação biofísico e avaliação de sinergia dos peptídeos com quimioterápicos já utilizados nos tratamentos convencionais.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, M. A. L., CARVALHO-TAVARES, J., GOMES, K. S., TEIXEIRA-CARVALHO, A., KITTEN, G. T., NYFFELER, J., DIAS, F. F., DOS REIS, P. V. M., PIMENTA, A. M. C., LEIST, M., DE LIMA, M. E., & DE SOUZA-FAGUNDES, E. M. (2019). The synthetic peptide LyeTxI-b derived from *Lycosa erythrognatha* spider venom is cytotoxic to U-87 MG glioblastoma cells. *Amino Acids*, 51(3). <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2678-4>.
- AVELAR JÚNIOR, J. T., MARQUES, E., CASTRO JUNIOR, C. J., DE CASTRO PIMENTA, A. M., DOS SANTOS, R. G., SOUZA-FAGUNDES, E. M., & DE LIMA, M. E. (2020). Synergistic effect between the peptide LYETX1-B and cisplatin to kill triple negative breast cancer cells, MDA-MB-231. *Toxicon*, 177. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.12.119>.
- CANTÚ, M. D. *et al.* Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669–675, 2008.
- CHAN, W. C.; WHITE, P. D. – *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis – A Practical Approach*. Editora Oxford University Press, 2000
- COLLINS, J. M. *et al.* Total wash elimination for solid phase peptide synthesis. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 8168, 9 dez. 2023.
- De Novo Peptide Sequencing. Disponível em: https://www.ionsource.com/tutorial/DeNovo/b_and_y.htm. Acesso em: 27 maio. 2026.
- GUSMÃO, K.A.G. **Sequenciamento, síntese, atividade biológica, estudos biofísicos e estudos estruturais por RMN de três peptídeos isolados da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus***. 2016. 163 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal De Minas Gerais, 2016.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2026 : incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2026. 170 p. ISBN 978-65-88517-52-9 (versão eletrônica). Disponível em: <https://www.inca.gov.br/>. Acesso em: 05 mai 2026.
- KELLER, Bernd O.; LI, Liang. Discerning matrix-cluster peaks in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectra of dilute peptide mixtures. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 11, n. 1, p. 88–93, 1 jan. 2000.
- KITAGAKI, Jirouta *et al.* Cyclic depsipeptides as potential cancer therapeutics. **Anti-Cancer Drugs**, v. 26, n. 3, p. 259–271, mar. 2015.
- LEWIS, J. K.; WEI, J.; SIUZDAK, G. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. *In*: MEYERS, Robert A. (Org.). **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. 1. ed. [S.l.]: Wiley, 2000.
- ProteoWizard: Open Source Software for Rapid Proteomics Tools Development Darren Kessner; Matt Chambers; Robert Burke; David Agus; Parag Mallick Bioinformatics 2008; doi: 10.1093/bioinformatics/btn323(Cantú et al., 2008, 2008, 2008)

Patiny, L.; Borel, A. [ChemCalc: A Building Block for Tomorrow's Chemical Infrastructure](#). *J. Chem. Inf. Model.* 2013, 53(5), 1223–1228.

REIS, PABLO V. M. *ET AL.* LyeTxI-b, a Synthetic Peptide Derived From *Lycosa erythrognatha* Spider Venom, Shows Potent Antibiotic Activity in Vitro and in Vivo. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 667, 6 abr. 2018.

RESENDE, J. M. **Estudos estruturais e das interações com membranas de peptídeos antimicrobianos por RMN em solução e em fase sólida. Análise conformacional e cálculos *ab-initio* de tensores de blindagem.** 2008. 192 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal De Minas Gerais, 2008.

SFORÇA, M. L. *et al.* How C-Terminal Carboxyamidation Alters the Biological Activity of Peptides from the Venom of the Eumenine Solitary Wasp. **Biochemistry**, v. 43, n. 19, p. 5608–5617, 1 maio 2004.

VERLY, R.M. **Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos.** 2010. 206 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal De Minas Gerais, 2010.

XIE, M; LIU, D; YANG, Y. Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification. **Open Biology**, China, 10:200004, Jun 2020. Doi: 10.1098/rsob.200004.

YANG, D.; LIU, B.; SHA, H. Advances and prospects of cell-penetrating peptides in tumor immunotherapy. **Nature**, 15:3392, 2025. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-86130-8>

ZAFAR, A. *et al.* Advancements and limitations in traditional anti-cancer therapies: a comprehensive review of surgery, chemotherapy, radiation therapy, and hormonal therapy. **Discover Oncology**, v. 16, n. 1, p. 607, 24 abr. 2025.

ZHU, X.; PAPAYANNOPOULOS, I. A. Improvement in the Detection of Low Concentration Protein Digests on a MALDI TOF/TOF Workstation by Reducing -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid Adduct Ions. *[S.d.]*.