UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

Tesi di laurea triennale

Sintesi e purificazione del peptide “CP-2” derivato dalla sequenza di una cerato-platanina con potenziale attività erbicida

Relatore: Prof.ssa Marta De Zotti

Laureando: Cesare Ottavio Marzari
Matricola: 2080840

Anno Accademico 2025/2026

Indice

Abstract.....2

1. Introduzione: peptidi utilizzabili come erbicidi.....2

1.1 Modi di azione degli erbicidi odierni.....2

1.2 Proteine cerato-platanine.....3

1.2.1 Caratteristiche strutturali……..……4

1.2.2 Azione biologica……4

1.3 Peptide CP-2.....5

***2.* Sintesi e purificazione del peptide "CP-2".....7**

2.1 Reagenti e strumenti.....7

2.1.1 Strumenti……7

2.1.2 Reagenti……...8

2.2 Sintesi in fase solida del peptide CP-2.....8

2.2.1 Swelling e deprotezione.....9

2.2.2 Coupling.....10

2.2.3 Sblocco in piccolo.....12

2.2.4 Sblocco in grande.....12

2.3 Purificazione.....14

2.3.1 Prove di solubilità del CP-2 in acqua e metanolo.....14

2.3.2 Separazione in frazioni tramite strumento Biotage.....15

2.3.3 Analisi HPLC delle frazioni.....18

3. Conclusioni.....19

Bibliografia.....20

Abstract

Il *Green Deal* Europeo punta al dimezzamento dell'uso di pesticidi ed erbicidi pericolosi per la salute entro il 2030; affinché ciò sia possibile è necessario sostituirli con pesticidi ed erbicidi a basso impatto ambientale. In questa Tesi, verrà discussa la possibilità di sviluppare degli erbicidi sostenibili a base peptidica, che vadano ad agire direttamente sull'attivazione del sistema immunitario delle piante bersaglio. Lo studio di questo nuovo modo d'azione erbicida parte dalle cerato-platanine (CP), una famiglia di proteine PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) prodotta dai funghi parassitari con azione di elicitore della risposta immunitaria. I peptidi candidati a potenziali nuovi erbicidi sono segmenti di una CP, lunghi 10-12 amminoacidi che verranno sintetizzati e testati per verificarne l'effetto. In questa Tesi verrà descritto il procedimento di sintesi e di purificazione di uno di questi segmenti, il peptide CP-2.

1. Introduzione: peptidi utilizzabili come erbicidi

1.1 Modi d'azione degli erbicidi odierni

Secondo l'Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura FAO i parassiti agricoli, ovvero erbacce, insetti e malattie, possono arrivare a distruggere fino al 40% delle colture globali [1,2]. Il massiccio quantitativo di pesticidi ed erbicidi che viene annualmente impiegato per prevenire queste perdite ha causato il potenziamento del fenomeno della resistenza nelle specie dannose. Le piante spontanee hanno evoluto una resistenza a sempre più modi di azione erbicida; persino il glifosato, ossia il principale erbicida utilizzato globalmente, può risultare inefficace [2,3]. I vincoli normativi e l'opinione pubblica inoltre imporrebbero un uso moderato di erbicidi e pesticidi pericolosi, a tutela dell'ambiente e dell'uomo; l'utilizzo a lungo termine dei comuni erbicidi odierni è perciò insostenibile.

Per questo motivo è stata proposta l'idea di produrre dei peptidi capaci di stimolare selettivamente la resistenza innata del sistema immunitario delle piante bersaglio, inducendo in esse delle risposte immunitarie che andrebbero a causare una riduzione della crescita ed una riduzione della produzione di semi, con la possibilità di necrosi delle foglie e morte della pianta. Il sistema immunitario delle piante è infatti composto da sistemi di sorveglianza che tramite dei recettori presenti sulle membrane cellulari sono in grado di

percepire la presenza degli elicitori microbici generali; ciò consente alle piante di modificare il proprio metabolismo facendolo passare dalla modalità di crescita e sviluppo a quella di difesa in caso di attacco da un microorganismo fitopatogeno [4]. Gli elicitori della risposta di difesa primaria abbreviati in PAMP ossia *pathogen-associated molecular pattern* sono strutture essenziali per la sopravvivenza dei patogeni, questi avviano una cascata di segnalazioni che portano all'attivazione della difesa immunitaria della pianta, con un conseguente indebolimento delle altre funzioni vitali della stessa [5]. L'obbiettivo è quello di sviluppare un erbicida a base peptidica in grado indurre necrosi cellulare nelle piante nocive alle colture facendo credere a queste di essere infette, stimolando una risposta immunitaria verso un'infezione non realmente presente. Un erbicida peptidico di questo genere presenterebbe numerose caratteristiche di sostenibilità, poiché questo avrebbe natura non volatile, sarebbe facilmente degradabile ad amminoacidi e per questo motivo non presenterebbe rischi per la salute né dell'uomo né dell'ambiente. Al momento, non esistono erbicidi che utilizzino peptidi come principi attivi e non sono stati ancora sviluppati meccanismi che sfruttino in questo modo il sistema immunitario delle piante dannose [6].

1.2 Proteine cerato-platanine

I funghi fitopatogeni secernono una grande quantità di proteine complici in vari aspetti dello sviluppo delle malattie vegetali. Le funzioni di queste proteine sono molteplici, passano dall'adesione alla superficie degli organi vegetali, all'espressione dei sintomi, fino all'elicitazione delle risposte di difesa [7–9]. Tra queste famiglie di proteine noi tratteremo quella delle cerato-platanine (CP), nome derivante da *Ceratocytis platani* ossia un fungo neurotrofico che infetta i platani. Le proteine di questa famiglia si trovano nei funghi filamentosi e la maggior parte di esse è stato dimostrato agire come fattori di virulenza e come elicitori in grado di indurre risposte immunitarie nelle piante infette [7,8]. Le proteine CP si trovano espresse in una grande varietà di organismi, dai patogeni ai funghi nematofagi. Ciò suggerirebbe un ruolo più ampio di queste proteine nello sviluppo fungino e la ricerca ha dimostrato che esse possiedono ruoli biologici diversificati e che non condividono necessariamente sempre le stesse proprietà [7,8].

1.2.1 Caratteristiche strutturali

Strutturalmente, le proteine CP costituiscono una famiglia con un'identità di sequenza del 13% e una similarità di sequenza circa del 40% [7]. Le proteine mature sono lunghe dai 120 ai 134 amminoacidi, inoltre possiedono tutte un peptide segnale costituito dai 16 ai 19 residui. Una quantità notevole degli amminoacidi di cui sono formate ha carattere idrofobico, ed è stato osservato che tutte queste contengono quattro cisteine utilizzate per la formazione di due ponti disolfuro. È stata evidenziata una sequenza firma amminoacidica "CSD" presente nel 63% delle proteine CP, mentre un altro 19% contiene la firma "CSN" [7,10]. La maggior parte delle CP non sembra presentare modifiche post-traduzionali, anche se altre proteine di altre famiglie simili presentano glicosilazione [7]. La glicosilazione previene la formazione dei dimeri di queste proteine, che in questa forma risulterebbero meno attive. Le CP non glicosilate mostrano una maggiore attività biologica se in forma polimerica aggregata, pertanto si ipotizza che la presenza o meno di glicosilazione nelle CP potrebbe causare un cambiamento nel loro meccanismo d'azione specifico.

1.2.2 Azione biologica

Le piante sono in grado di percepire tramite recettori la presenza nel proprio organismo di epitopi specifici delle proteine CP, come dimostrato dalle prove in vivo degli amminoacidi di sintesi derivati dalla proteina BcSpl1 [11]. Questa è una delle più abbondanti nel secretoma del fungo *Botrytis cinerea*, ed è in grado di provocare una risposta ipersensibile nell'ospite, causando una rapida morte cellulare programmata nel sito di infezione [7,9]. La capacità di indurre una morte cellulare così rapida è probabilmente causata dalla produzione massiva di ROS (*Reactive Oxygen Species*) stimolata da queste proteine. Si è dimostrato che la maggioranza delle CP causa nella pianta un'attivazione della produzione dell'acido salicilico [10]. Come risultato della loro attività elicitoria queste proteine sono paradossalmente in grado di indurre negli ospiti una resistenza ai patogeni scatenando queste forti risposte immunitarie. Di fatto non sono stati ottenuti risultati che ne dimostrassero una diretta tossicità nei confronti delle piante. Dunque, la necrosi cellulare non deriva dall'infezione in sé ma dalla stimolazione di una violenta risposta immunitaria che queste proteine provocano [10]. Le proteine della famiglia CP risultano essere solubili in acqua e non tossiche per i microbi [10].

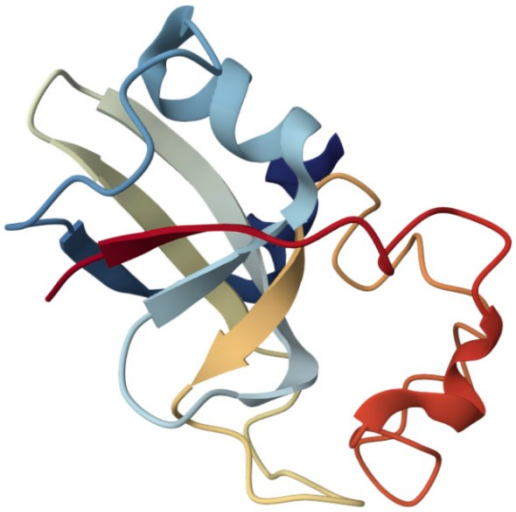


Figura 1 - *Polymer cartoon structure* della proteina CP di codice 2KQA, considerata in questa Tesi, dalla Protein Data Bank.

1.3 Peptide CP-2

I peptidi designati a candidati erbicidi sono derivati da porzioni della specifica proteina CP di codice 2KQA (Figura 1). Risultati preliminari hanno dimostrato che essa è in grado di ridurre del 70% la crescita dei germogli di loglio. Dovrebbe pertanto essere possibile sviluppare un erbicida peptidico suo derivato. Questo dovrebbe essere composto idealmente da una o più corte sequenze peptidiche, producibili e modificabili per via chimica, derivate dalle diverse componenti dei loop della proteina.
Secondo letteratura [11,12], i loop coinvolti nel legare i recettori sono due:

Loop A – VSISYDPIYAADLSMGSVACSNGDHGLMAQYPTLGEVP Figura 2
Loop B – GFPNVGGIP**DIAGWDSPSC**GTCWKVTIPNGNSIFIRGVDSG Figura 3

Questi loop poiché responsabili dei legami della proteina con i recettori sono causa dell'effetto sulle piante. Questi sono stati divisi in otto sequenze peptidiche.
Il peptide denominato CP-2 consiste nella sequenza del loop B:

Asp - Ile - Ala - Gly - Trp - Asp - Ser - Pro - Ser - Cys

Poiché si trova all'interno di una proteina, nella sintesi gli estremi N- e C-terminali della sequenza sono stati bloccati come acetile e ammide, rispettivamente.

La sua struttura è osservabile in Figura 4 e Figura 5.

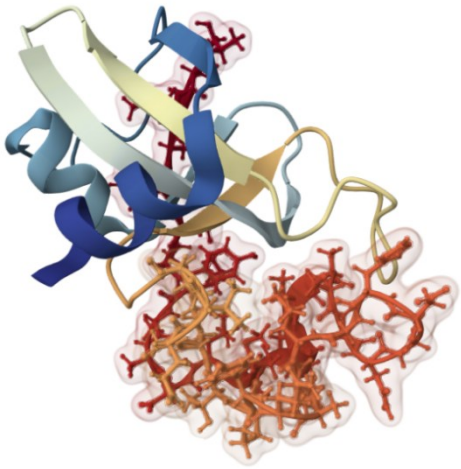


Figura 2 - Loop A evidenziato all'interno della struttura 3D della proteina CP dalla Protein Data Bank.

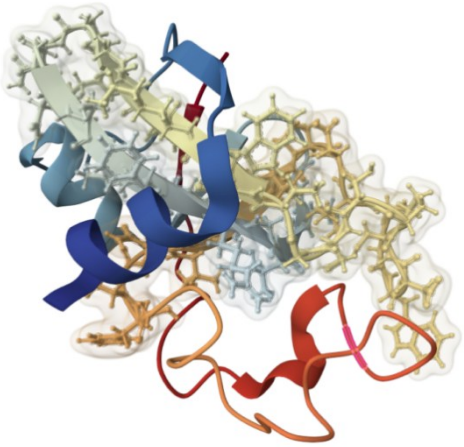


Figura 3 - Loop B evidenziato all'interno della struttura 3D della proteina CP della Protein Data Bank.

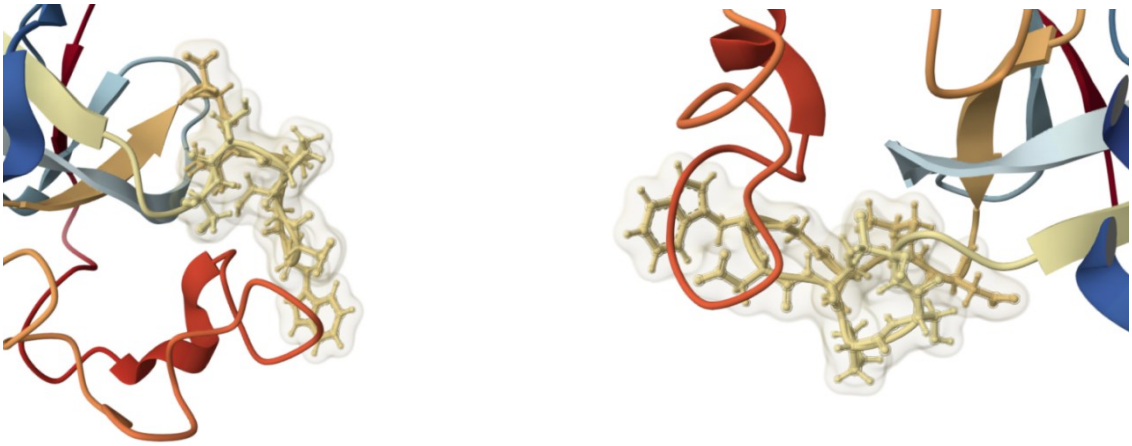


Figura 4 - Sequenza del peptide CP-2 evidenziata nella struttura semplice della proteina CP osservata da due angolazioni diverse.

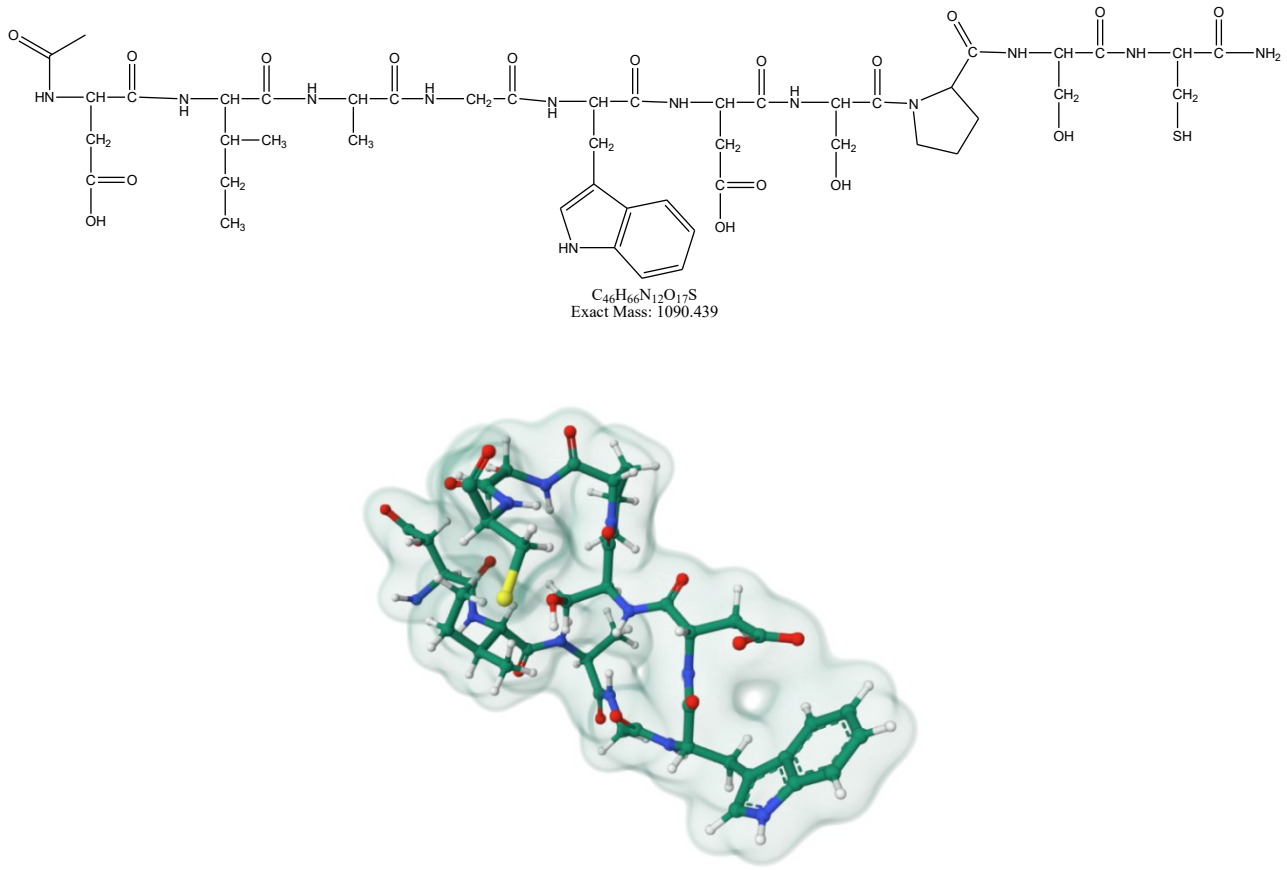


Figura 5 – Formula di struttura e struttura tridimensionale del peptide CP-2 sintetizzato in questo lavoro di Tesi.

Il lavoro di Tesi sperimentale svolto consiste nella sintesi, purificazione e caratterizzazione del peptide CP2 (Figura 5) in modo da poterne poi testare l'attività come erbicida, in collaborazione con l'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP) del CNR di Sesto Fiorentino (FI).

2. Sintesi e purificazione del peptide "CP-2"

2.1 Reagenti e strumenti

2.1.1 Strumenti

HPLC a fase inversa Pharmacia Biotech con rivelatore UV Diode Array Detector
Biotage Isolera Prime con rilevatore UV
ESI-HRMS Xevo Waters: Electron Spray Ionization High-Resolution Mass Spectroscopy

2.1.2 Reagenti

I reagenti utilizzati della marca Sigma-Aldrich sono i seguenti:
Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Anidride acetica, Piperidina, N,N'-diisopropilcarbodiimmide (DIC), Oxyma pure, N,N-dimetilformammide (DMF), diclorometano (DCM), acetonitrile (ACN), acido trifluoroacetico (TFA), 3,6-diosso-1,8-ottanditiolo (DODT), N-etil-diisopropilammina (DIEA), triisopropilsilano (TIS). Gli amminoacidi si intendono a configurazione L se non specificato diversamente.

2.2 Sintesi in fase solida del peptide CP-2

La sintesi del peptide CP-2 è stata eseguita in fase solida (SPPS). Questa consiste nel legare l'amminoacido C-terminale, tramite opportuno *linker*, ad un supporto solido insolubile nei solventi utilizzati durante la sintesi, procedendo al *coupling* degli amminoacidi dal C-terminale all'N-terminale. La resina rimane all'interno del reattore di reazione, munito di setto, per tutto il processo sintetico, mentre le miscele di *coupling* vengono introdotte e poi filtrate via a reazione completa. Al termine della sintesi della sequenza peptidica si procede allo sblocco di questa dal supporto solido tramite l'utilizzo di reagenti appositi in grado di rompere il legame del peptide con il *linker*. La scelta della resina dipende dalla funzione C-terminale voluta (ammide, acido carbossilico libero o altra funzionalità) ed influenza le condizioni di sblocco del peptide. Nel nostro caso è stata usata la resina a base polistirenica Fmoc-Rink-Amide (Figura 6), dalla quale il peptide si sblocca in condizioni acide. La scelta del gruppo protettore della funzione α-amminica deriva di conseguenza, poiché le condizioni di deprotezione devono essere ortogonali a quelle di rimozione del peptide dalla resina.
Il peptide viene rimosso per trattamento con una soluzione concentrata di acido trifluoroacetico (TFA), in presenza di opportuni *scavengers* per limitare la presenza di sottoprodotti dovuti alle specie radicaliche e carbocationiche derivanti dalla rimozione delle protezioni in catena laterale, come si vedrà in seguito.

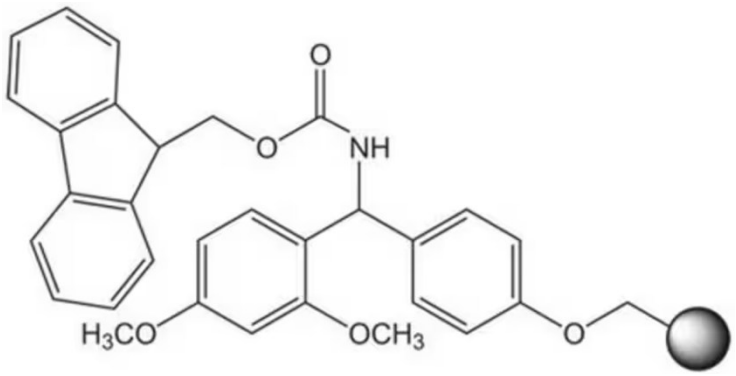


Figura 6 - Linker della resina Fmoc-Rink-Amide.

La resina è stata posta all'interno di una siringa che fungerà da reattore di reazione. Sul fondo della siringa è presente un setto poroso in grado di permettere il passaggio dei liquidi ma non dei solidi. Ogni resina possiede un determinato *loading*, cioè il numero di siti attivi per grammo di resina, corrispondenti ai *linker* legati. Il *loading* è di solito espresso come millimoli di siti attivi per grammo di resina. Una volta moltiplicato il *loading* per la massa di resina effettivamente pesata, si ottiene la quantità di millimoli di peptide che verranno teoricamente prodotte dalla sintesi.
Nel nostro caso sono stati pesati: 272,2 mg di resina con un *loading* di 0,65 mmol/g.
La resa teorica corrisponde quindi a 0,176 mmol di peptide CP-2.

2.2.1 Swelling e deprotezione

La prima fase è lo "swelling" della resina, ovvero il rigonfiamento di questa tramite DMF, ossia il solvente che verrà utilizzato durante tutta la sintesi per i *coupling* e per i lavaggi. Questo primo passaggio è necessario per attivare la resina, che una volta rigonfiata renderà disponibili agli amminoacidi i siti di legame durante fase di coupling. La fase di *swelling* prevede due lavaggi della resina con DMF da 45 minuti ciascuno, nella siringa di reazione. Dopo lo *swelling* è necessario deproteggere la resina dal gruppo protettore Fmoc. Per fare ciò è stata aggiunta al reattore di reazione una soluzione di piperidina al 20% in DMF. La resina sospesa in soluzione viene lasciata sotto agitazione per cinque minuti, al termine dei quali la siringa viene svuotata della fase liquida. Questo procedimento viene ripetuto una seconda volta facendo durare l'agitazione 10 minuti anziché 5. A questo punto la resina viene lavata per diverse volte con delle aliquote di DMF.

2.2.2 Coupling

Il procedimento per effettuare il *coupling* del primo amminoacido sarà analogo per tutti gli altri a seguire. Viene preparata la miscela di reazione in DMF anidra, contenente l'amminoacido protetto al gruppo amminico dal gruppo protettore Fmoc (Figura 7) ed eventualmente anche sulla catena laterale da un gruppo protettore variabile a seconda dell'amminoacido, ma sempre rimuovibile in ambiente acido, così da essere rimosso contemporaneamente allo sblocco del peptide dalla resina e ortogonale alla rimozione dello Fmoc. Oltre all'amminoacido, la miscela conterrà gli attivatori della funzione carbossilica dell'amminoacido Oxyma pure ovvero etil-cianoidrossimminoacetato e DIC diisopropilcarbodiimmide (Figure 8 e 9) al fine di formare la specie attivata per l'attacco nucleofilo da parte del gruppo amminico legato alla resina.

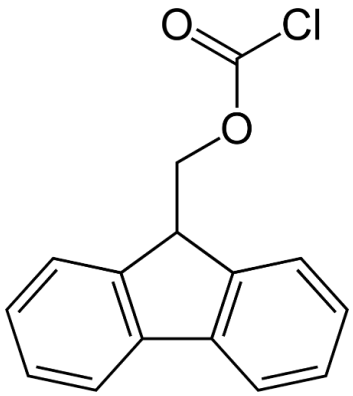


Figura 7 – Gruppo protettore Fmoc-Cl.

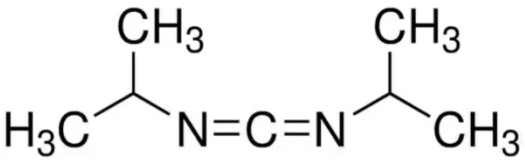


Figura 8 - N,N'-diisopropilcarbodiimmide.

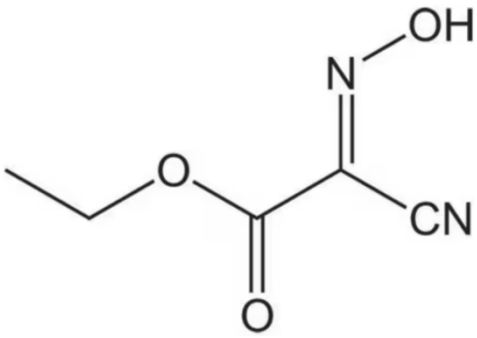


Figura 9 - Oxyma Pure.

La sintesi in fase solida permette di utilizzare larghi eccessi della specie attivata, così da spingere la reazione verso una resa quantitativa. Per questa sintesi abbiamo usato un

eccesso di tre equivalenti rispetto ai siti di legame. La miscela, preparata a parte per consentire la formazione dell'estere attivo, viene aggiunta alla resina all'interno della siringa che viene subito posta sotto agitazione per 50 minuti, al termine dei quali la miscela di *coupling* viene rimossa. Vengono eseguiti a questo punto dai tre ai cinque lavaggi con DMF analoghi a quelli descritti dopo lo sblocco dello Fmoc dalla resina. A questo punto si ricomincia deproteggendo l'amminoacido appena aggiunto alla sequenza con miscela al 20% di piperidina in DMF; anche questo passaggio viene eseguito analogamente alla deprotezione iniziale della resina. Nella Tabella 1 è possibile leggere le masse pesate dei reagenti utilizzati per la reazione di *coupling* di ogni amminoacido.

	Fmoc-AA-OH	**Oxyma Pure**	**DIC**
Cisteina	0,3175 g	0,0758 g	0,0082 ml
Serina	0,2048 g	0,0756 g	0,0082 ml
Prolina	0,1982 g	0,0754 g	0,0082 ml
Serina	0,2043 g	0,0775 g	0,0082 ml
Acido Aspartico	0,2224 g	0,0755 g	0,0082 ml
Triptofano	0,2813 g	0,0754 g	0,0082 ml
Glicina	0,1603 g	0,0757 g	0,0082 ml
Alanina	0,1700 g	0,0754 g	0,0082 ml
Isoleucina	0,1940 g	0,0755 g	0,0082 ml
Acido Aspartico	0,2211 g	0,0754 g	0,0082 ml

Tabella 1 - Quantità pesata per ogni coupling di ogni amminoacido.

È possibile, nel caso di amminoacidi ingombrati o poco reattivi o per segmenti peptidici particolarmente proni all'aggregazione e quindi meno efficienti come nucleofili, eseguire un *coupling* doppio; tuttavia, in questa sintesi sono stati effettuati tutti *coupling* singoli, ossia la reazione di *coupling* per ogni amminoacido è stata fatta solo una volta. Arrivati al termine della sintesi della catena peptidica si procede con l'acetilazione dell'ultimo (il primo) residuo N-terminale. Per l'acetilazione è stata preparata una soluzione composta da 0,475 ml di anidride acetica e 0,225 ml di DIEA in 10 ml di DMF. La reazione di acetilazione è durata 45 minuti ed è stata ripetuta due volte, in modo da favorire una resa quantitativa.

2.2.3 Sblocco in piccolo

Al termine del processo di *coupling*, pochi granelli di resina sono stati prelevati dalla siringa di reazione principale venendo inseriti in una siringa più piccola al fine di effettuare uno sblocco in piccolo. La miscela di sblocco utilizzata è composta da: 94% TFA, 2.5% H_2O, 2.5% DODT e 1% TIS. I granelli di resina prelevati sono stati lasciati reagire con la miscela di sblocco per due ore. La miscela contenente il peptide rimosso dalla resina è stata lasciata defluire in una provetta falcon posta sotto flusso d'azoto al fine di rimuovere il TFA solvente. È stata osservata la precipitazione di un solido bianco, che è stato ridisciolto in una miscela di acqua e metanolo. Una provetta eppendorf è stata riempita con questa nuova soluzione ottenuta dallo sblocco in piccolo, che è stata analizzata tramite spettrometro di massa ad alta risoluzione. Il peptide completo ha peso molecolare pari a 1090.4 dalton, e nello spettro è chiaramente visibile il suo picco a 1091.4 m/z (Figura 10). Non sono presenti altri picchi intensi attribuibili a sequenze delete o ad altre impurezze note, ed è quindi possibile affermare che la sintesi sia avvenuta con successo.

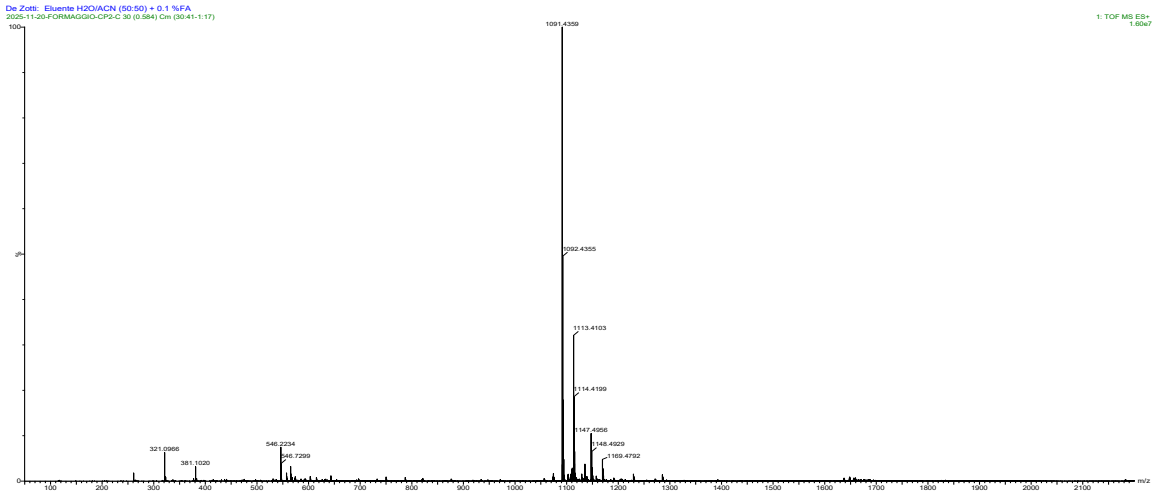


Figura 10 - Spettro di massa dello sblocco in piccolo per la sintesi di CP2.

2.2.4 Sblocco in grande

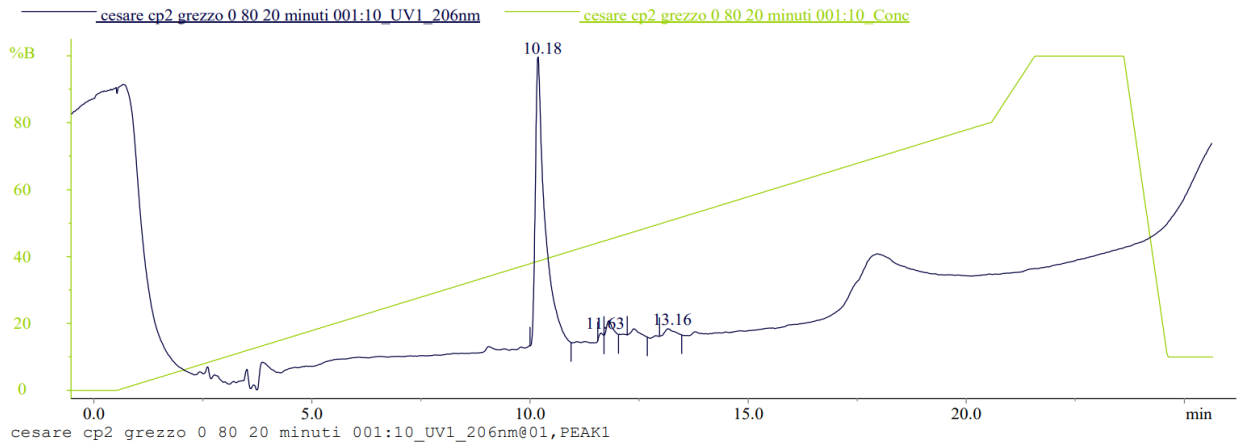
Dopo lo sblocco in piccolo sono stati eseguiti due sblocchi in grande, uno per il peptide CP-2 prodotto con singolo *coupling*, la cui sintesi è stata descritta in questa Tesi, e uno per lo stesso peptide CP-2 precedentemente sintetizzato con doppio *coupling*. Li chiameremo rispettivamente CP2-C e CP2-A. Entrambe le resine sono state prima lavate con diclorometano, per rimuovere il DMF e tenute in essiccatore. Per entrambe le resine è stata

preparata una miscela di sblocco analoga a quella utilizzata per lo sblocco in piccolo: 94% TFA, 2.5% H_2O, 2.5% DODT, 1% TIS. La miscela è stata introdotta nella siringa di reazione del CP2-A e del CP2-C, queste sono state successivamente lasciate in agitazione per 2 ore. Terminata la reazione le due miscele contenenti il peptide sbloccato sono state rimosse dai reattori di reazione. Le provette falcon da 50 ml contenenti le miscele di sblocco sono state lasciate sotto flusso di azoto per numerose ore al fine di far evaporare il TFA, ottenendo così un precipitato bianco, contenente il peptide grezzo. Entrambe sono state riprese con etere etilico e centrifugate. L'etere etilico surnatante è stato decantato e il processo ripetuto per altre due volte, al fine di eliminare impurezze derivanti dalla rimozione delle porzioni alle catene laterali e dal trattamento acido sulla resina. I peptidi grezzi CP2-A e CP2-C, sciolti in acqua, sono stati quindi liofilizzati e successivamente pesati per il calcolo della resa.

La massa pesata del peptide CP2-A grezzo corrisponde a 49 mg, con una resa sulla massa di resina pesata del 46 %.

La massa pesata del peptide CP2-C grezzo corrisponde a 124 mg, con una resa sulla massa di resina pesata del 64,6%.

La purificazione del prodotto di CP2-A grezzo sarà descritta nel capitolo successivo. Il prodotto CP2-C non è stato purificato, ma è comunque stato fatto uno spettro del grezzo su HPLC, osservabile in Figura 11.



cesare cp2 grezzo 0 80 20 minuti 001:10_UV1_206nm@01,PEAK1

No	Ret min	Area mAU*min	Height mAU
1	10.18	13.9389	55.005
2	11.63	0.1488	1.377
3	11.81	0.6977	3.628
4	12.39	0.4213	1.751
5	13.16	0.3175	1.354

Figura 11 - Spettro HPLC del prodotto grezzo CP2-C. Purezza: 90%. Gradiente 0-80% B in 20 minuti. Eluente A: H_2O/ACN 9:1 + 0.05% TFA; eluente B: ACN/H_2O + 0.05% TFA.

2.3 Purificazione

2.3.1 Prove di solubilità del CP-2 in acqua e metanolo

Al fine di capire in che solvente sarebbe stato preferibile sciogliere il peptide durante la purificazione è stato necessario testare se il peptide fosse meglio solubile in solvente più o meno polare; ne è stata sciolta una piccola quantità in metanolo e in acqua. Sono state fatte delle analisi con spettrometro di massa di entrambe le soluzioni e dai risultati è stato possibile confermare che il peptide si solubilizza meglio in ambiente acquoso. Negli spettri ottenuti, osservabili in Figura 12 e 13, è possibile osservare il picco corrispondente al peptide a 1091 m/z di intensità rilevante unicamente nello spettro corrispondente all'ambiente acquoso.

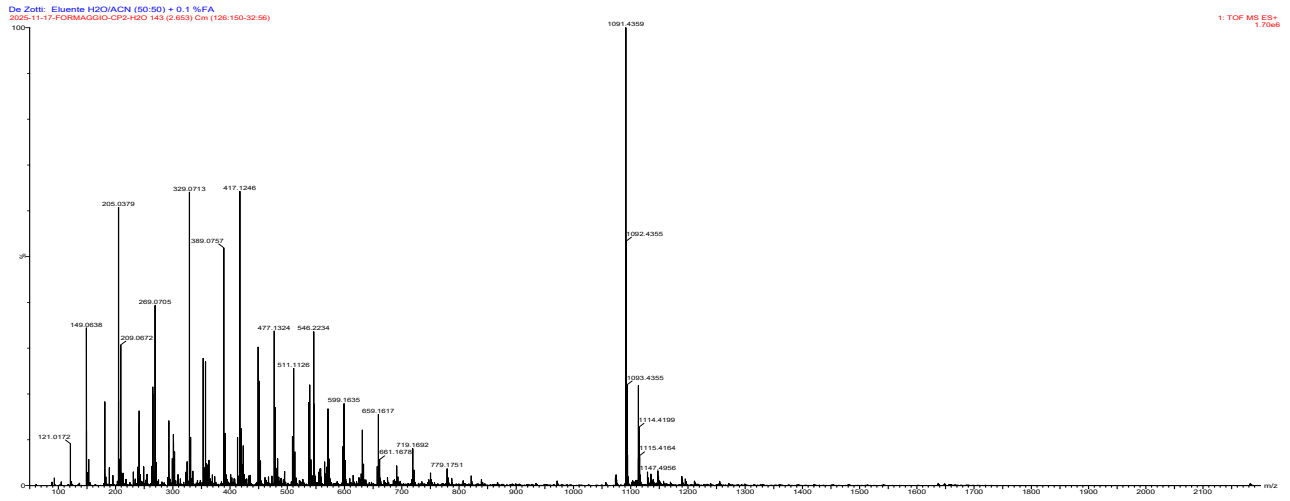


Figura 12 - Spettro di massa del peptide grezzo disciolto in ambiente acquoso.

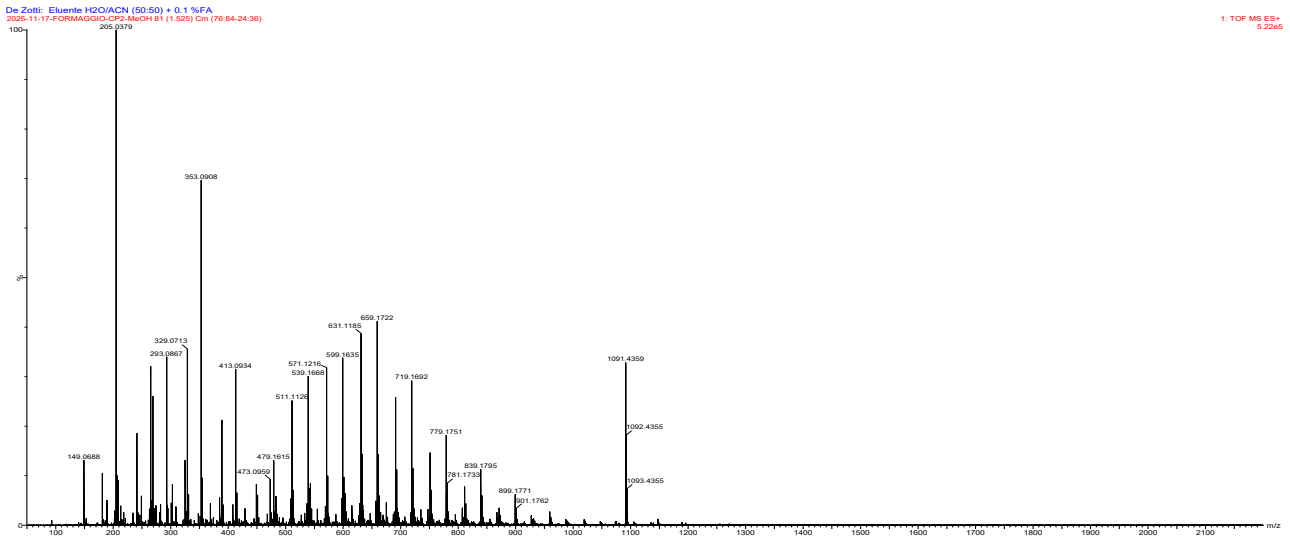


Figura 13 - Spettro di massa del peptide grezzo disciolto in metanolo.

2.3.2 Separazione in frazioni tramite purificazione a media pressione su strumento Biotage

Il peptide grezzo sbloccato dalla resina CP2-A in seguito alla liofilizzazione è stato sciolto in acqua. Successivamente questo è stato purificato tramite cromatografia a fase inversa a media pressione sullo strumento Biotage Isolera Prime. Il rilevatore UV dello strumento è stato impostato a 206 e 260 nm. La rampa di eluizione è stata impostata da 0% a 100% dell'eluente acetonitrile:H_2O 9:1, in presenza di HCl 0.1 M. È stata utilizzata una colonna C18.

Le frazioni che hanno evidenziato la presenza di molecole di nostro interesse sono quelle che vanno dalla 21 alla 26 (Figura 14). Lo spettro UV ha evidenziato la presenza di 3 picchi principali, il primo in corrispondenza alla provetta numero 21, il secondo alla provetta numero 23 e il terzo alla provetta numero 25. Il contenuto di queste è stato analizzato tramite spettrometro di massa. Gli spettri sono osservabili in Figura 15, 16 e 17.

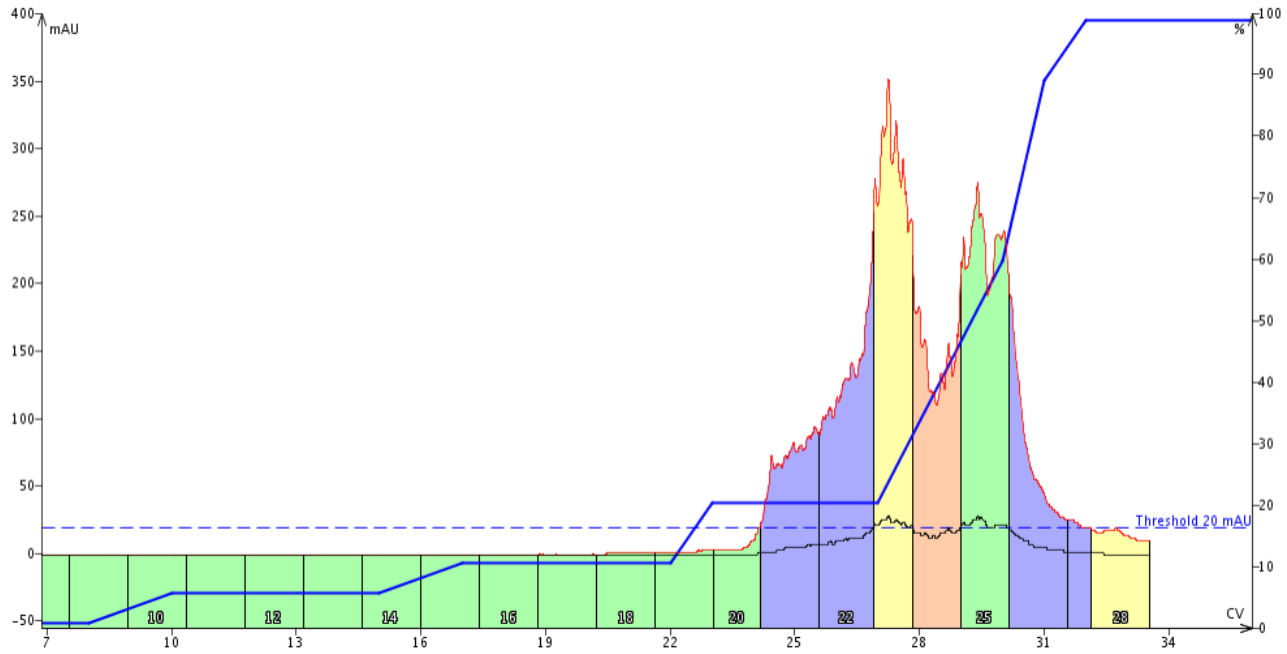


Figura 14 – Spettro UV della separazione tramite strumento Biotage del peptide grezzo CP2-A.

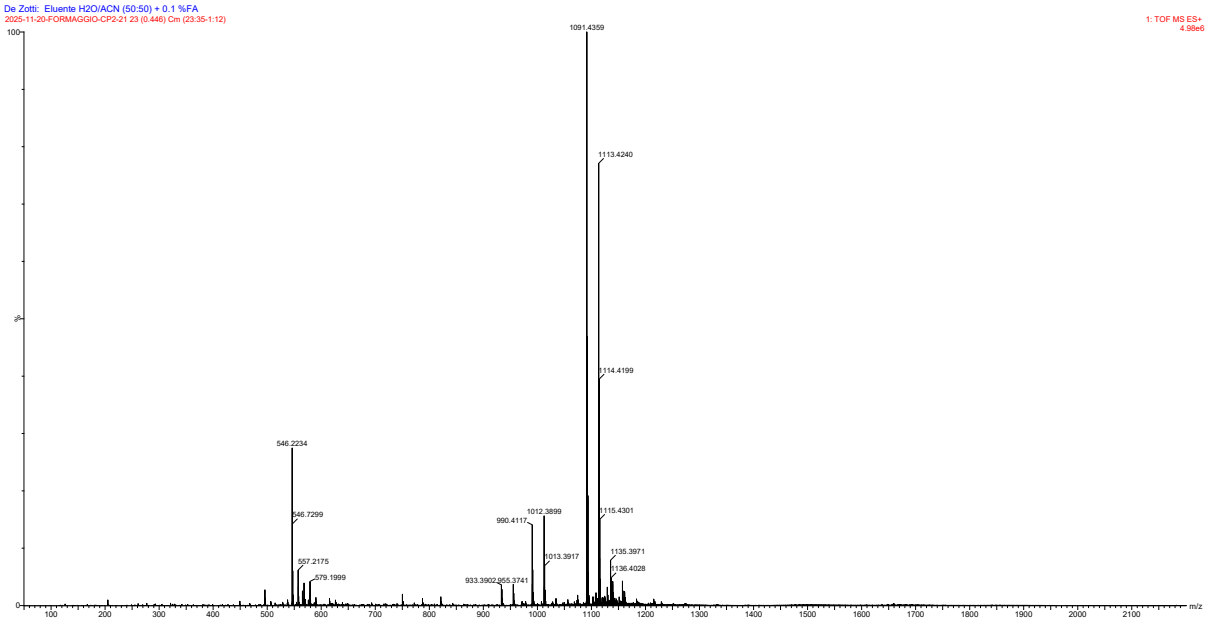


Figura 15 - Spettro di massa del campione proveniente dalla provetta 21.

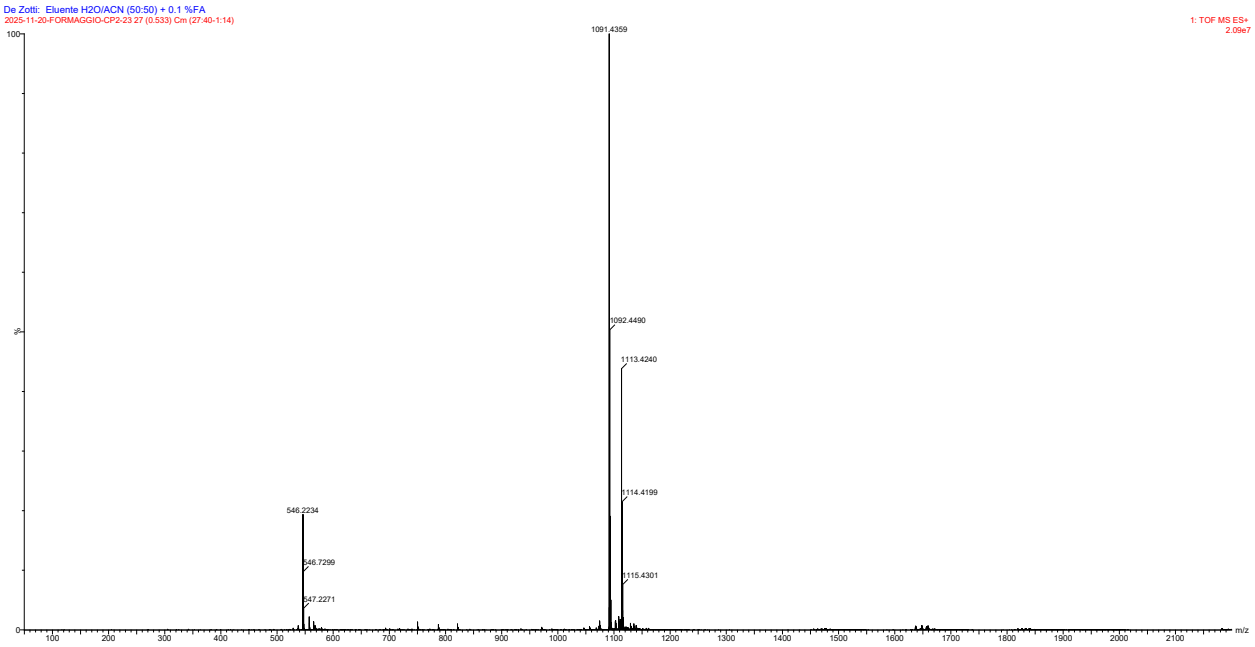


Figura 16 - Spettro di massa del campione proveniente dalla provetta 23.

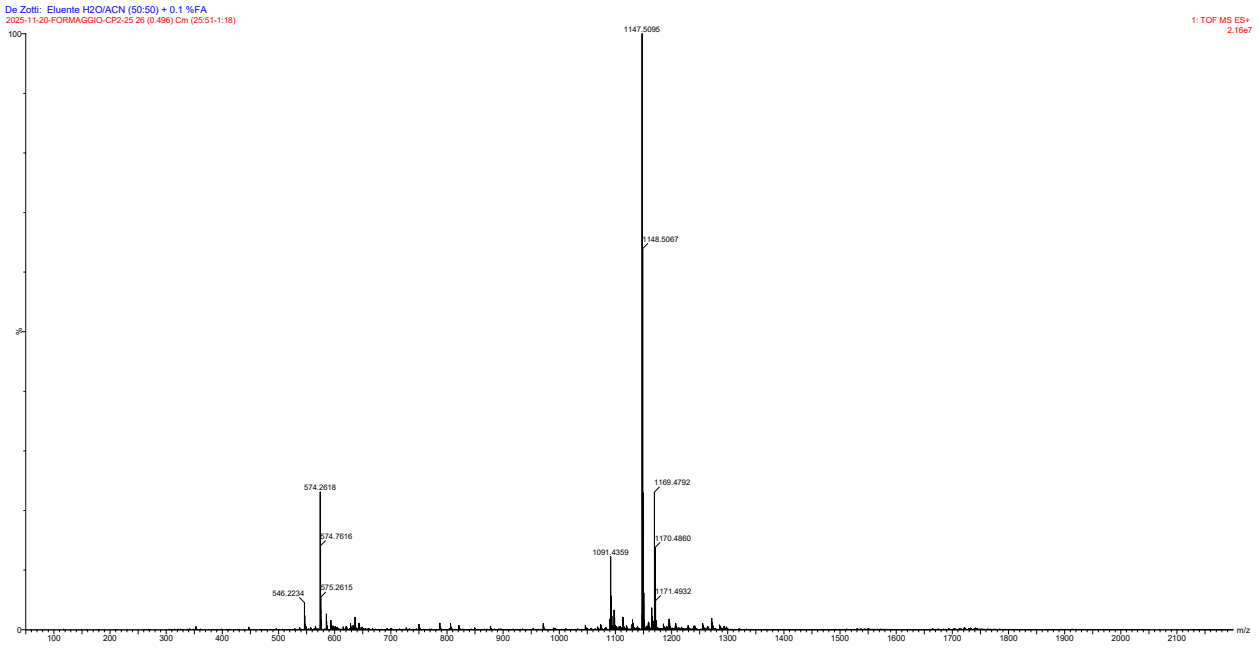


Figura 17 - Spettro di massa del campione proveniente dalla provetta 25.

Lo spettro di massa della provetta 23 presenta un picco principale a 1091.4 m/z attribuibile al peptide CP-2, e un picco minore a 546 m/z, la cui distribuzione isotopica lo identifica come un picco a doppia carica, sempre attribuibile al peptide.

Lo spettro della provetta 25 presenta un picco principale a 1147 m/z e uno secondario a 574 m/z; questi sono entrambi attribuibili ad una specie peptidica corrispondente a CP2 + circa 56 dalton, probabilmente dovuto a un gruppo *tert*-butilico rimasto legato al peptide a causa di una deprotezione incompleta in catena laterale, o ad un'inefficiente neutralizzazione del catione *tert*-butilico ad opera degli *scavenger*. Questo tipo di reazione secondaria è comune in presenza di cisteina (Figura 18).

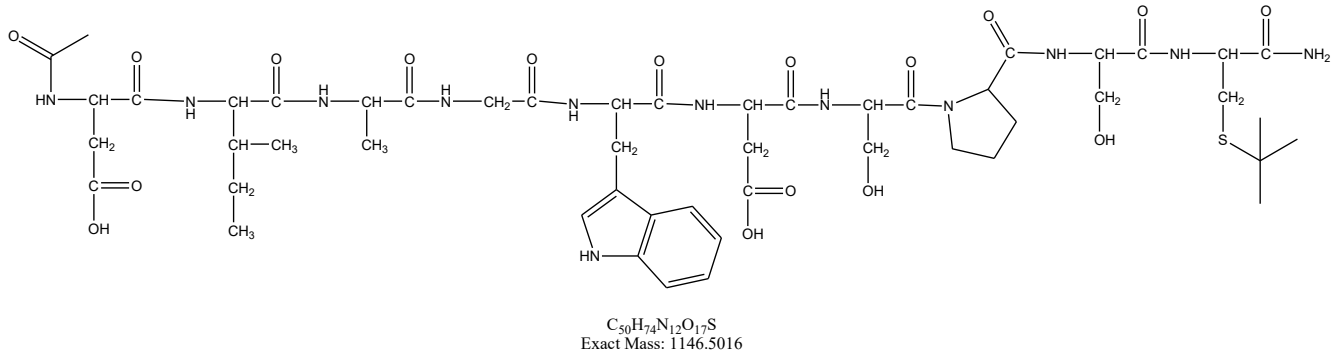
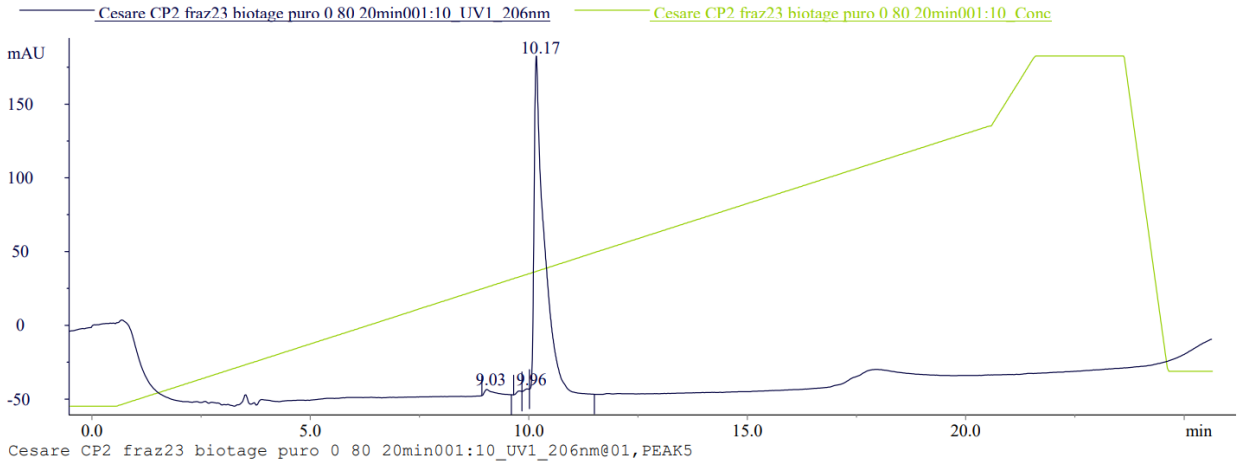


Figura 18 - Formula di struttura del peptide CP2 con *tert*-butile legato alla Cisteina.

Lo spettro della provetta 21 presenta entrambi i picchi principali del peptide a 1091.4 m/z e a 546 m/z, con l'aggiunta di picchi dovuti a prodotti secondari come quello a circa a 1012 m/z, attribuibili a sottoprodotti della sintesi.

2.3.3 Analisi HPLC delle frazioni

Le provette contenenti le frazioni rilevanti, ovvero quelle dalla 21 alle 25, sono state esaminate tramite lo strumento HPLC a fase inversa con rivelatore UV. La rampa di gradiente è stata impostata da 0% ad 80% di eluente B (ACN/H_2O 9:1 + 0.05 % TFA) in 20 minuti, l'eluente A utilizzato è H_2O/ACN 9:1 + 0.05 % TFA. Tra gli spettri delle frazioni 21 - 25, quelli delle frazioni 22 e 23 hanno mostrato la minore quantità di impurezze, in particolare sembra che la frazione più pura tra le due e di conseguenza anche tra le altre frazioni, sia la 23, il cui spettro è osservabile in Figura 19.
Le frazioni 22 e 23 sono state isolate in due palloni, l'acetonitrile è stato rimosso mediante evaporatore rotante, e le frazioni liofilizzate. Dalla frazione 23 sono stati ottenuti 9.85 mg di peptide puro al 97%.



Cesare CP2 fraz23 biotage puro 0 80 20min001:10_UV1_206nm@01,PEAK5

No	Ret min	Area mAU*min	Height mAU
1	9.03	1.0615	4.153
2	9.78	0.3434	2.728
3	9.96	0.5937	4.015
4	10.17	61.4725	229.726

Figura 19 - Spettro HPLC della frazione numero 23. Purezza: 97%.

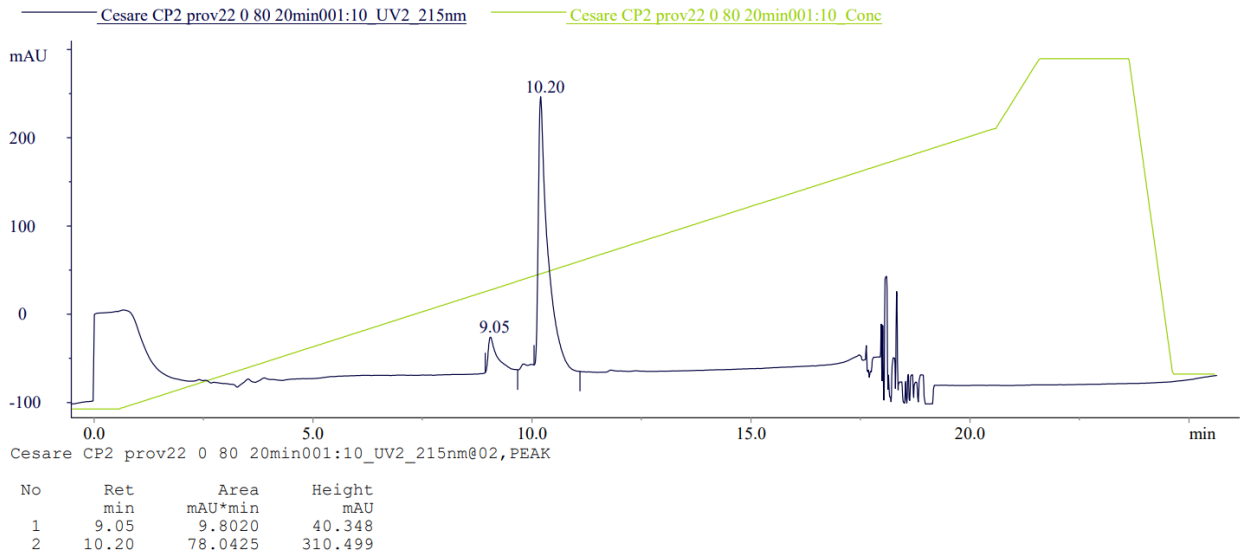


Figura 20 - Spettro HPLC della frazione numero 22.

3. Conclusione

In questo lavoro di tesi sperimentale è stata discussa la possibilità di utilizzare dei peptidi derivati dalle proteine CP dei funghi parassitoidi come erbicidi *green* sfruttando la loro capacità di indurre forti risposte immunitarie nelle piante bersaglio. Nella parte sperimentale è stato provato che il peptide CP-2 è sintetizzabile in fase solida senza la necessità del doppio *coupling*, portando potenzialmente ad una resa maggiore e dimezzando la quantità di reagenti utilizzati. La sintesi è avvenuta con successo e senza presentare una quantità problematica di impurezze nel prodotto finale, come dimostrato dalla corsa HPLC del grezzo CP2-C di Figura 11, dalla quale è possibile stimare una resa del prodotto grezzo del 90%. Il peptide ha dimostrato buona solubilità in acqua, e una bassa solubilità in solventi organici, anche polari, quali il metanolo. La purificazione del peptide è avvenuta senza difficoltà particolari. La resa grezza del peptide CP2-C è pari al 64,6%. Il peptide CP2-A avrebbe potuto essere purificato in modo migliore tramite colonna a media pressione Biotage scegliendo una rampa di gradiente diversa, incrementando più gradualmente la percentuale di eluente B, in modo da far uscire il peptide più lentamente. Non è argomento di questa Tesi valutare l'attività biologica del peptide, ma la sua sintesi è un passaggio indispensabile per poter fare ulteriore ricerca sull'argomento. Sarà ora compito di un gruppo di ricerca dell'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP) del CNR occuparsi di saggiare l'efficacia ed eventualmente studiare il meccanismo d'azione del peptide CP-2.

Bibliografia

1 E.-C. Oerke, *J. Agric. Sci.*, 2006, **144**, 31–43.
2 Md. M. Islam, R. Llewellyn and M. Monjardino, *Agricultural Systems*, 2026, **233**, 104602.
3 F. E. Dayan and S. O. Duke, *Engineering*, 2020, **6**, 509–514.
4 J. D. G. Jones and J. L. Dangl, *Nature*, 2006, **444**, 323–329.
5 B. Huot, J. Yao, B. L. Montgomery and S. Y. He, *Molecular Plant*, 2014, **7**, 1267–1287.
6 F. E. Dayan, *Plants*, 2019, **8**, 341.
7 L. Pazzagli, V. Seidl-Seiboth, M. Barsottini, W. A. Vargas, A. Scala and P. K. Mukherjee, *Plant Science*, 2014, **228**, 79–87.
8 R. Gaderer, K. Bonazza and V. Seidl-Seiboth, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, **98**, 4795–4803.
9 Y. Zhang, Y. Liang, D. Qiu, J. Yuan and X. Yang, *Protein Expression and Purification*, 2017, **136**, 20–26.
10 S. Luti, L. Sella, A. Quarantin, L. Pazzagli and I. Baccelli, *Fungal Biology Reviews*, 2020, **34**, 13–24.
11 M. Frías, N. Brito, M. González and C. González, *Molecular Plant Pathology*, 2014, **15**, 342–351.
12 M. Frías, C. González and N. Brito, *New Phytologist*, 2011, **192**, 483–495.