

Síntese em fase sólida e caracterização da Distinctina, peptídeo antimicrobiano isolado de *Phyllomedusa distincta*.

Victor Hugo de O. Munhoz^{1*} (PG), Rodrigo M. Verly¹ (PG) Marcelo Bemquerer² (PQ), Dorila Piló-Veloso¹ (PQ)

1-Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

2- Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Pq. Estação Biológica, Final W5 Norte, P.O. Box 70770-900, Brasília-DF, Brasil.

Palavras Chave: *Distinctina*, síntese em fase sólida, peptídeos antimicrobianos, *Phyllomedusa distincta*.

Introdução

A distinctina (**1**, Figura 1) é um peptídeo isolado das glândulas da pele de *Phyllomedusa distincta*, anuro natural da Mata Atlântica Brasileira e apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas. Sua estrutura heterodimérica é constituída por cadeias de 22 e 25 resíduos de aminoácidos, com ligação dissulfídica entre seus resíduos de cisteína.¹

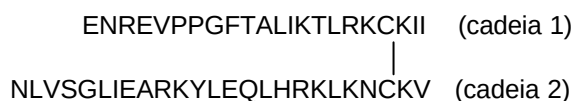


Figura 1. Estrutura primária da distinctina (**1**), com indicação da ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína da Cadeia 1 e Cadeia 2.

Entretanto, a pequena quantidade em que **1** é encontrada na natureza dificulta estudos estruturais com o peptídeo natural. Portanto, é importante sintetizá-lo para analisar sua estrutura e atividade.

Neste trabalho, foram realizadas: a síntese total da distinctina em fase sólida, utilizando-se a estratégia Fmoc², e sua caracterização por espectrometria de massas (EM).

Resultados e Discussão

A obtenção de **1** envolveu, inicialmente, a síntese das cadeias 1 e 2 em fase sólida, tendo como produtos os peptídeos amidados nas extremidades C-terminal. Em seguida, procedeu-se à dimerização, via oxidação dos grupos tiol dos resíduos de cisteína, ao ar livre, dissolvendo-se os monômeros em uma solução tamponada de NH₄HCO₃ de pH 8,0. Para a formação do dímero fez-se o estudo dos parâmetros tempo e concentração dos monômeros reunidos. O processo foi seguido por CLAE pelo aparecimento do pico em *tr*= 22,7 min e o desaparecimento dos picos em *tr*= 19,8 min e em *tr*= 20,4 min, respectivamente devidos às cadeias 2 e 1 (Fig. 2). A purificação de **1** também foi feita por CLAE, fase móvel TFA em H₂O, 0,1% v/v e TFA em acetonitrila, 0,08% v/v,

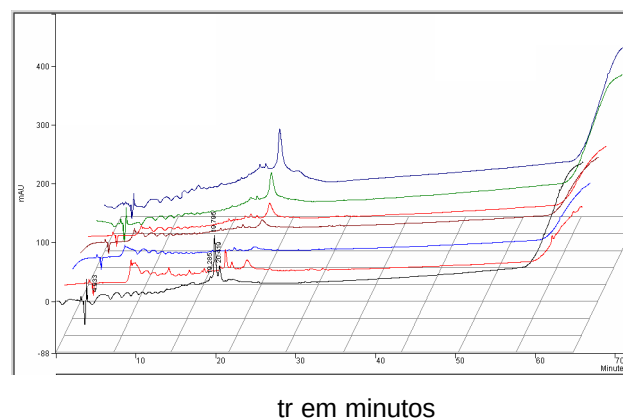


Figura 2. Cromatogramas do acompanhamento da dimerização para síntese da distinctina: preto-sistema antes do início da reação *t*=0; laranja – *t*= 30 min; azul-claro- *t*= 1h30 min; vermelho-escuro- *t*= 2h50min; vermelho- *t*= 4h; verde-escuro *t*= 6h; azul-escuro *t*=24h.

usando uma coluna semipreparativa em fase reversa C18. O rendimento da síntese dos monômeros foi de 95% para a cadeia 1 e de 92% para a cadeia 2. O rendimento da síntese de **1** foi de 96%. Tanto os monômeros quanto o dímero foram caracterizados por espectrometria de massas MALDI-TOF, que forneceu resultados condizentes com a massa dos peptídeos.

Conclusões

Os rendimentos das sínteses dos monômeros cadeia 1 e 2, em fase sólida, foram bastante altos. O estudo da dimerização dessas cadeias 1 e 2, permitiu estabelecer o tempo de 24h para obtenção do heterodímero distinctina **1** com alto rendimento, demonstrando que a oxidação dos resíduos cisteína dos dois monômeros foi eficiente pelo oxigênio do ar.

Agradecimentos

CAPES, CNPq, FAPEMIG.

¹ Batista, C.V.F., et al. *FEBS Letter* **2001**, 494, 85.

² Chan, W. C.; White, P. D.; *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. **2000**, Oxford: Oxford University Press.