



Influência do sítio de ligação do peptídeo Lunatina-1 com nanopartículas de alumina na atividade antibacteriana e interação com membranas fosfolipídicas

Carolina S. Ferreira (PG)^{1*}; Giovanna P. Araújo (PG)¹; Kelton R. De Souza (PG)²; Rodrigo M. Verly (PQ)¹

¹ Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Química, Diamantina, Minas Gerais, 39100-000, Brasil.

² Institute of Chimie, Université of Strasbourg/ CNRS, URM7177, 67000, Strasbourg, France.

*ferreira.carolina@ufvjm.edu.br

RESUMO

Com o aumento da resistência microbiana aos antibióticos convencionais, peptídeos antimicrobianos e nanopartículas de alumina surgem como alternativas promissoras. Este trabalho apresenta a síntese de nanobioestruturas formadas pela conjugação do peptídeo Lunatina-1 com nanopartículas de alumina, explorando diferentes estratégias de ligação (nas regiões *N*- e *C*-terminais). Os resultados mostram que a ligação pela região *C*-terminal favorece a atividade antimicrobiana e a interação com membranas. As estruturas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e ressonância magnética nuclear em fase sólida (RMNss), avaliadas quanto à atividade antibacteriana, testes de degradação enzimática e parâmetros de ordem de deutério de fosfolípido marcados, obtidos por RMNss.

Palavras-chave: peptídeos, nanopartículas, nanobioestruturas, lunatina-1, alumina.

Introdução

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm despertado grande interesse como alternativas promissoras aos antibióticos tradicionais, especialmente frente à crescente ameaça da resistência bacteriana¹. O peptídeo Lunatina1 (FIGLLKLTLSFF-NH₂) é um PAM que demonstra ampla atividade contra diversas cepas bacterianas, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Apesar de seu potencial terapêutico, a aplicação dos peptídeos é limitada por fatores como baixa estabilidade em meios biológicos e rápida degradação por enzimas proteolíticas². Com o objetivo de contornar essas limitações, este estudo propôs a ligação covalente do peptídeo Lunatina1 a nanopartículas de óxido de alumínio (γ -Al₂O₃), formando nanobioestruturas híbridas com propriedades físico-químicas e biológicas otimizadas³. O trabalho se promove uma comparação entre dois modos distintos de conjugação: a ligação do peptídeo pela extremidade *C*-terminal, originando o composto NP-Lun-EC (FIGLLKLTLSFFAAAE-NH₂), e a ligação pela extremidade *N*-terminal, originando o composto NP-Lun-EN (EAAAFIGLLKLTLSFF-NH₂). Para viabilizar a conjugação, um resíduo adicional de ácido glutâmico foi inserido na posição correspondente (*C* ou *N*-terminal), permitindo a ativação carboxílica e a formação de uma ligação amida estável com grupos amino presentes na superfície da nanopartícula. Também foram acrescentados à sequência primária três resíduos de alanina, que servem como espaçador do peptídeo com a nanopartícula, para manter sua estrutura secundária quando em contato com a membrana. A proposta é investigar como a posição de ligação do peptídeo à nanopartícula afeta suas propriedades, como a atividade antimicrobiana, a estabilidade frente à degradação enzimática e sua interação com membranas lipídicas. A hipótese é que a variação na extremidade de ancoragem pode influenciar diretamente a acessibilidade da sequência ativa do peptídeo, modificando seu

desempenho funcional. Dessa forma, o estudo busca contribuir para o desenvolvimento de plataformas nanoterapêuticas mais eficientes, duráveis e seletivas no combate a infecções bacterianas.

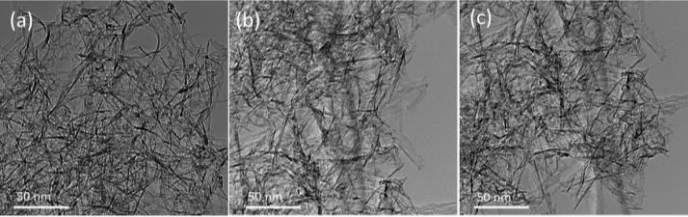
Experimental

A síntese dos peptídeos foi realizada por síntese em fase sólida (SPPS), via estratégia Fmoc. Após síntese, os peptídeos foram purificados por HPLC, e as massas confirmadas por espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS). As nanopartículas de γ -Al₂O₃ foram funcionalizadas com 3-aminopropiltriethoxissilano (APTES) para introdução de grupos amino livres. A conjugação com os peptídeos ativados com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) permitiu formar ligações amida entre os grupos carboxílicos dos peptídeos e os grupos amino das nanopartículas. A confirmação foi feita por RMN de ¹³C no estado sólido. A morfologia foi analisada por MET, operando a 200 kV. A interação com membranas foi investigada por RMN de deutério (²H NMRs), utilizando vesículas de POPC:POPGd₃₁ como sistema modelo. Os ensaios antimicrobianos foram conduzidos contra cinco cepas bacterianas: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada após as cepas serem cultivadas em meio Mueller-Hinton e inoculadas em placas de 96 poços contendo diferentes concentrações dos peptídeos livres e conjugados. A estabilidade enzimática frente à tripsina foi avaliada por HPLC em diferentes tempos de incubação, comparando peptídeos livres e conjugados.

Resultados e Discussão

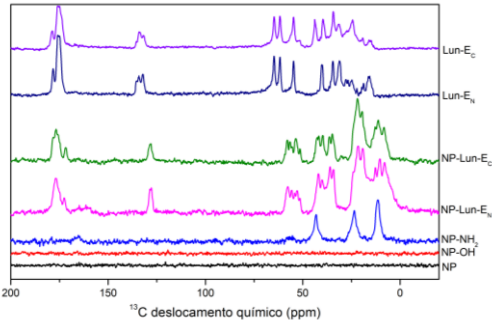
As imagens obtidas por MET mostraram que a morfologia das nanopartículas de alumina foi preservada após conjugação com os peptídeos, mantendo a estrutura de nanofilamentos.

Figura 1: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão, em diferentes resoluções, de: A) NP (50 nm); B) NP-Lun-EN (50 nm); C) NP-Lun EC (50 nm).



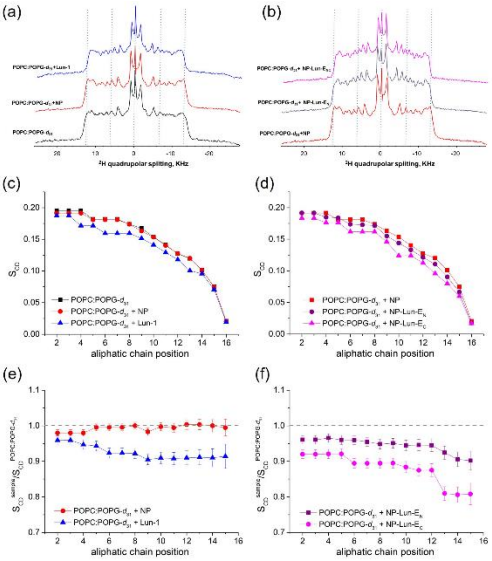
A espectroscopia de ¹³C ssNMR evidenciou deslocamentos químicos compatíveis com a formação de ligações amida. Observou-se a mudança do sinal da carbonila livre (~183 ppm) para um sinal mais baixo (~176 ppm), típico de ligações amida, confirmando a conjugação covalente.

Figura 2: Espectros de Ressonância Magnética Nuclear 13C em fase sólida para NP, NP-OH, NP NH₂, NP-Lun-EN, NP-Lun-EC, Lun-EN e Lun-EC.



Nos experimentos de ²H ssNMR com lipossomos, verificou-se que NP-Lun-EC induziu maior desordem nas bicamadas lipídicas do que NP-Lun-EN, com redução mais pronunciada dos parâmetros de ordem. Isso sugere que a orientação do peptídeo influencia diretamente sua capacidade de inserção e perturbação da membrana.

Figura 3: Acoplamento quadrupolar de e parâmetros de ordem para cada carbono da cadeia alifática.



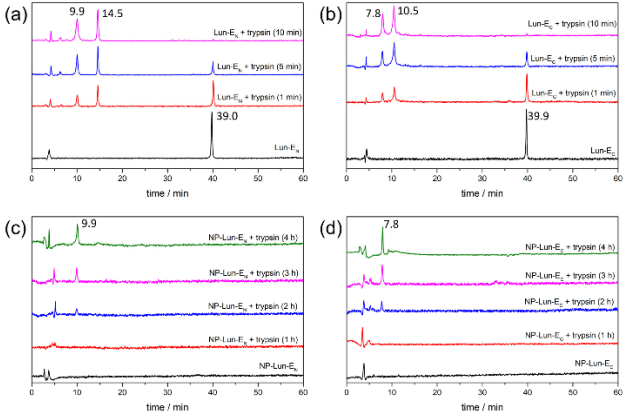
Nos testes antimicrobianos, o peptídeo Lun-1 mostrou boa atividade contra diversas cepas, incluindo *S. Aureus*, *E. Coli*, *P. Aeruginosa* e *Acinetobacéria*. A conjugação na forma NP-Lun-EC manteve a atividade em níveis similares ou levemente superiores em algumas cepas, enquanto NP-Lun-EN apresentou perda de eficácia em várias delas.

Tabela 1: Valores da concentração inibitória mínima (μmol.L⁻¹) obtidos para diferentes cepas bacterianas para Lun-1, NP-E-Lun e Lun-E-NP.

Microorganismo	MIC (μmol.L ⁻¹)		
	Lun-1	NP-E-Lun	Lun-E-NP
<i>Acinetobacteria</i> (ATCC17978)	32,1	ND	40,0
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	64,2	128,5	48,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	32,1	ND	32,1
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC29213)	8,0	64,2	16,0

No estudo de degradação, os peptídeos livres foram rapidamente degradados por tripsina em menos de 10 minutos. Por outro lado, os peptídeos conjugados às nanopartículas apresentaram início de degradação apenas após cerca de 2 horas de incubação, demonstrando que a funcionalização com γ-Al₂O₃ confere proteção contra ação enzimática, prolongando a estabilidade estrutural do peptídeo em ambiente fisiológico.

Figura 4: Degradação proteolítica de peptídeos livres e conjugados analisada por HPLC na presença de tripsina.



Conclusões

A conjugação covalente de peptídeos antimicrobianos a nanopartículas de óxido de alumínio é uma estratégia eficaz para aumentar sua estabilidade e preservar sua atividade biológica. A variante NP-Lun-EC apresentou desempenho superior à NP-Lun-EN, tanto na indução de desordem em membranas quanto na atividade bactericida e resistência à degradação enzimática. A posição de conjugação do peptídeo na nanopartícula revelou-se fator determinante no comportamento biofísico e funcional da nanobioestrutura.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e Universidade de Strasbourg, França, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-COFECUB program 88881.879071/2023-01), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Rede Mineira de Peptídeos Bioativos (Rede-PEPBio).

Referências

- HANCOCK, R.E.W. and SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, 2006.
- GUO, R.-C et al. Recent progress of therapeutic peptide based nanomaterials: from synthesis and self-assembly to cancer treatment. *Biomater. Sci.* 8 (22), 6175–6189, 2020.
- ROY, A. et al. Biomedical exploitation of self-assembled peptide based nano-structures. *Current Protein Peptide Science*, v.14, p.580-587, 2013.