

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/09/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Química

MILENA NOVAIS DA COSTA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE BIOCONJUGADOS ANTITUMORAIS COM
ESTABILIDADE E SELETIVIDADE MELHORADAS**

ARARAQUARA/SP
2017

MILENA NOVAIS DA COSTA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE BIOCONJUGADOS ANTITUMORAIS COM
ESTABILIDADE E SELETIVIDADE MELHORADAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Química - Câmpus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista - UNESP, como requisito para a obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

**ARARAQUARA
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

C837s Costa, Milena Novais da
Síntese e avaliação de bioconjugados antitumorais com
estabilidade e seletividade melhoradas / Milena Novais da
Costa. – Araraquara : [s.n.], 2017
70 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Eduardo Maffud Cilli

Coorientador: Esteban Nicolás Lorenzón

1. Peptídeos-Síntese. 2. Dicroísmo circular.
3. Câncer-Mama. 4. Estabilidade. 5. Enzimas proteolíticas.
I. Título.

MILENA NOVAIS DA COSTA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 13 de setembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Profa. Dra. Patricia Soares Santiago
Campus Experimental de Registro - UNESP, Registro – SP



Prof. Dr. Ederlan de Souza Ferreira
Universidade Federal da Bahia - UFB, Salvador – BA

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Marlene e Orlando, pelo incondicional apoio em todos os momentos da minha vida, por serem meu porto seguro e fonte de amor, sabedoria e fé.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar, iluminar e ter me dado tranquilidade para seguir em frente com meus objetivos e não desanimar com as dificuldades encontradas ao longo do caminho.

Aos meus amados pais pelo apoio incondicional e suporte que sempre me ofereceram para enfrentar os desafios que escolhi em minha vida.

Ao meu querido irmão e amigo que sempre me alertou sobre a importância dos estudos.

À minha avó Carol, uma pessoa de muita bondade e infinito amor.

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, pela orientação, pela confiança para realização do meu trabalho, compreensão, pelo apoio, pelas discussões e broncas que com certeza foram para meu crescimento profissional e principalmente por sua paciência.

Ao Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (UNESP) pela oportunidade.

Aos meus queridos amigos, Bruna, Laize, Leonice, Marcela presentes que a graduação me deu, os quais permanecem e permanecerão sempre comigo.

Aos companheiros de laboratório Júlia, Norival, Matheus, Paulo, Natália, Matheus e Jaff pelas experiências trocadas, companhia, amizade e incentivo durante todo esse período.

Em especial, quero agradecer minha amiga Júlia que esteve presente na minha vida em todos os momentos, tanto pessoal quanto profissional, trazendo palavras de incentivo, apoio, paciência, confiança, esclarecimento e companhia.

Às lindas meninas Caroline e Jesseleine, pela disposição em sempre estar ajudando no desenvolvimento deste projeto e pelos momentos de alegria e pela parceria nos treinos na academia.

Aos meus amigos de Jales que mesmo distantes sempre me deram coragem para chegar até aqui.

À banca examinadora de Qualificação, pelas sugestões.

E a todos aqueles não citados, mas que acreditaram, verdadeiramente, na minha capacidade e àqueles que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.

*Que sei eu do que serei
eu que não sei o que sou?
Ser o que penso? Mas penso tanta coisa!
E há tantos que pensam ser a mesma coisa
que não pode haver tantos!*
(Fernando Pessoa)

RESUMO

Devido ao avanço científico e tecnológico, notável sucesso tem sido alcançado na identificação de novos compostos antitumorais. Entretanto, problemas associados à baixa estabilidade e seletividade tem limitado o sucesso da grande maioria destes compostos. Dentre as estratégias para aumentar a estabilidade de moléculas bioativas, a bioconjugação em domínios de ligação a albumina (DLA) tem se mostrado promissor para ampliar o tempo de vida médio de moléculas susceptíveis à degradação proteolítica. Neste trabalho, a estrutura e a atividade de um composto contendo um peptídeo citotóxico, um DLA e um sítio de clivagem específico foram avaliadas. Motivado pela perspectiva do peptídeo melitina apresentar atividade antitumoral, o nosso grupo de pesquisa avaliou a síntese e atividade biológica deste composto com o peptídeo RQKRSLGG-WQRPSSW. O peptídeo obtido foi testado contra tipos de células tumorais e não tumorais (linhagem MCF-7 e HaCaT, respectivamente), mostrando-se potente, porém tóxico. Nos estudos de dicroísmo circular, os peptídeos não apresentaram estrutura secundária em solução aquosa. Em presença de miméticos de membrana, os peptídeos adquiriram uma estrutura em α -hélice exceto o peptídeo sítio de clivagem-DLA. Estudos de vazamento de carboxifluoresceína em LUVs (POPC:POPS), através da técnica de espectroscopia de fluorescência, mostraram que o peptídeo completo tem capacidade de permeabilização similar ao da melitina e que é dependente da concentração. Os resultados de fluorescência confirmaram a interação do peptídeo com a proteína HSA. A intensidade da fluorescência do Trp presente nos peptídeos aumenta após a ligação com a HSA e o comprimento de onda de emissão é deslocado para o azul (blue-shift), indicando a mudança de ambiente do Trp para um meio mais hidrofóbico. A ligação dos peptídeos com a HSA não foi suficiente para proteger os compostos antitumorais das enzimas proteolíticas presente no plasma sanguíneo, mostrando baixa estabilidade do peptídeo. Os dados obtidos mostraram que, a estratégia utilizada para o aumento da seletividade e estabilidade da melitina não é adequada.

Palavras-chave: Síntese de Peptídeos. Câncer-Mama. Enzimas proteolíticas. Dicroísmo Circular. Estabilidade.

ABSTRACT

Due to the scientific and technological advanced permitted remarkable successful in the field of identification of new antitumour compounds. However, problems associated with low stability and selectivity have been a restriction in the successful of majority of this compounds. Inside the strategic for increase the stability of bioactive molecules, bioconjugation with albumin-binding domain (ABD) have been promising for increasing the lifetime of molecules susceptible for the proteolytic degradation. Herein, structure and activity of a compound containing a cytotoxic peptide, ABD, and cleavage site were evaluated. The ABD (WQRPSSW) can give more stability for molecules, while the cleavage site RQKRSLGG can give more selectivity to the peptide. This sequence is degraded for the protease Kallikrein 4 (KLK4), which occurs in elevated quantity in the tumours cells, releasing the cytotoxic compound, especially in the microenvironments of these cells, promoting the higher selectivity. Inspired for the perspective of Melittin peptide holds a promising antitumour activity, our research group evaluated the synthesis and biological activity with this peptide containing the sequence RQKRSLGG-WQRPSSW. The peptide was evaluated against diversity of tumours and no tumours cells (MCF-7 and HaCaT respectively), presenting effective activity but toxic. In circular dichroism studies the peptides did not show second structure in aqueous solution. In the presence of membrane mimetic, the peptides acquired an α -helix structure, excluding the peptide cleavage site-ABD. Studies of carboxyfluorescein release in LUVS (POPC:POPS), by fluorescence spectroscopy, showed that the complete peptide has a similar capacity of Melittin for permeability, also, the Melittin and the complete peptide activities were concentration-dependent. Nevertheless, for the complete peptide this effect was less manifested, which means that the electrostatic interaction between the positive charges of peptides and the negative charges of membranes play a key role in the process. The fluorescence assays confirmed the peptide interaction with HSA protein. The Trp fluorescence quantum yield of the peptides increased after the HSA attachment, while, Trp emission wavelength resulted in blue-shift. Indicating that the Trp activity change between a polar solvent for a hydrophobic environment. Probably, conformational changes occurred in the molecule, which not enough were for protect the antitumour compounds from proteolytic enzymes current in blood serum, endorsing the fewer stability of the antitumour peptides.

Keywords: Peptides Synthesis. Breast Cancer. Proteolytic enzymes. Circular Dichroism. Stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de ação propostos para PATs que agem sobre a membrana plasmática. a) “barrel-stave”, b) “carpet-like”. c) “poro toroidal”	19
Figura 2 - Estrutura secundária da melitina.....	21
Figura 3 - Estrutura tridimensional da albumina sérica humana (HSA).	23
Figura 4 - Protocolo utilizado neste trabalho na Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.	30
Figura 5 - Perfil cromatográfico do peptídeo – DLA bruto.	38
Figura 6 - Espectro de massas referente ao peptídeo bruto – DLA	38
Figura 7 - Perfil cromatográfico do peptídeo Sítio de Clivagem-DLA bruto.	40
Figura 8 - Perfil cromatográfico do peptídeo Sítio de Clivagem-DLA puro.	40
Figura 9 - Espectro de massas referente ao peptídeo bruto Sítio de Clivagem-DLA.	41
Figura 10 - Perfil cromatográfico da síntese do conjugado de Melitina.	42
Figura 11 - Espectro de massas referente ao material bruto obtido na síntese do peptídeo contendo a melitina.	42
Figura 12 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto referente ao sítio de clivagem-DLA.	44
Figura 13 - Espectro de massas referente ao peptídeo Sítio de clivagem-DLA.	44
Figura 14 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto melitina acoplado ao Sítio de clivagem-DLA, com tempo de retenção de 16,0 min.	46
Figura 15 - Espectro de massas referente ao peptídeo puro referente à melitina- sítio de clivagem e DLA.	46
Figura 16 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro melitina acoplado ao Sítio de clivagem-DLA, com tempo de retenção de 16,3 min.	47
Figura 17 - Perfil cromatográfico do peptídeo melitina.	48
Figura 18 - Perfil cromatográfico do peptídeo melitina puro, com tempo de retenção de 19,0 minutos.	49
Figura 19 - Espectro de massas referente à melitina.	49
Figura 20 - Espectros de CD dos peptídeos sítio de clivagem-DLA, melitina, melitina-sítio de clivagem-DLA em solução tampão de PBS e em vesículas lipídicas de POPC/POPS.	51
Figura 21 - Projeção helicoidal dos peptídeos melitina e sítio de Clivagem-DLA. Resíduos hidrofóbicos são os losangos verdes, resíduos polares não carregados juntamente com a Gly são representados pelos círculos e os resíduos catiônicos os pentágonos.	52
Figura 22 - Perfis de vazamento de carboxifluoresceína em LUVs (POPC:POPS) em diferentes concentrações de peptídeos, os quais foram adicionados após 2 min. Os níveis de fluorescência máximos possíveis foram determinados por adição do Triton X-100 (9 min).	54
Figura 23 - Atividade citotóxica dos compostos sobre células da linhagem MCF-7 e Hacat (queratinócitos não tumorais humanos) com diferentes concentrações dos peptídeos.	56
Figura 24 - Espectros obtidos em função da intensidade e comprimento de onda de máxima emissão.	57
Figura 25 - Tratamento do peptídeo [$6,0 \times 10^{-9}$ mol] sem HSA e com HSA na proporção (1:4) após 30 min de interação.	59

Figura 26 - Perfis cromatográficos dos peptídeos incubados em soro. a) melitina; b) peptídeo completo.....	61
Figura 27 - Estabilidade dos peptídeos melitina e peptídeo completo diluídos no plasma humano em função do tempo.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana e citolítica da melitina (IC50) e seus respectivos mecanismos de ação.....	21
Tabela 2 - Condições cromatográficas empregadas na purificação dos peptídeos obtidos.....	31
Tabela 3 - Condições utilizadas para a síntese do peptídeo WQRPSSW.....	37
Tabela 4 - Condições utilizadas para a síntese do peptídeo WQRPSSW.....	39
Tabela 5 - Condições utilizadas para a síntese do peptídeo GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ–Sítio de Clivagem–DLA.	41
Tabela 6 - Condições utilizadas para a síntese do peptídeo (RQKRSLGG-WQRPSSW).....	43
Tabela 7 - Condições utilizadas para a síntese do peptídeo GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ–Sítio de Clivagem–DLA	45
Tabela 8 - Condições utilizadas para a síntese do peptídeo (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ).....	47
Tabela 9 - Porcentagem de α -hélice dos peptídeos obtidos em POPC:POPS (9:1).	50
Tabela 10 - Variação dos λ máxima emissão dos peptídeos antes e após interagir com HSA no pH = 7,4; $\lambda_{exc.}$ = 280 nm.	59

Lista de Abreviaturas e símbolos

1. Aminoácidos

Ala (A) Alanina

Arg (R) Arginina

Asn (N) Asparagina

Gln (Q) Glutamina

Gly (G) Glicina

Ile (I) Isoleucina

Leu (L) Leucina

Lys (K) Lisina

Pro (P) Prolina

Gln (Q) Glutamina

Ser (S) Serina

Thr (T) Treonina

Trp (W) Triptofano

Val (V) Valina

Outras terminologias

ACN Acetonitrila

Boc t-butiloxycarbonila

CD Dicroísmo Circular

CF carboxifluoresceína

DCM diclorometano

DIC diisopropilcarbodiimida

DMF dimetilformamida

ESI electrospray ionization

Fmoc 9-fluorenilmetiloxycarboxila

HBTU o-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônico

IC50 é a concentração de um composto que promove 50% de inibição

HOBt N-hidroxibenzotriazol

CLAE High Performance Liquid Chromatography

HSA Soro albumina humana

LUV Large unilamellar vesicles, vesículas unilamelares grandes

MLV Multilamellar vesicles, Vesículas multilamelares

MS mass spectrometry (espectrometria de massas)

NMM n-metilmorfolina

PAMs Peptídeos antimicrobianos

PATs Peptídeos antitumorais

PBS Solução tampão fostato

POPC 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

POPS 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilserina

TFA ácido trifluoracético

TFE 2,2,2-trifluoroetanol

TIS triisopropilsilano

UV-Vis Luz ultravioleta-visível

2. Símbolo

θ elipticidade molar

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
3 OBJETIVO	28
3.1 Objetivos específicos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Sínteses de Peptídeos	29
4.2 Purificação dos Peptídeos por CLAE	31
4.3 Caracterização dos Peptídeos	32
4.4 Estrutura dos Peptídeos	32
4.5 Interação com Membranas e Possível Mecanismo de Ação	33
4.6 Ensaio Biológicos	35
4.6.1 <i>Cultura Celular</i>	35
4.6.2 <i>Viabilidade Celular</i>	35
4.7 Interação do Soro Albumina Humana	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Síntese de Peptídeo	37
5.1.1 <i>Peptídeo WQRPSSW (DLA)</i>	37
5.1.2 <i>Peptídeo RQKRSLGG-WQRPSSW</i>	39
5.1.3 <i>Peptídeo melitina-sítio de clivagem-DLA</i>	41
5.1.4 <i>Segunda síntese do peptídeo RQKRSLGG-WQRPSSW (SCL-DLA)</i>	43
5.1.5 <i>Melitina-sítio de clivagem-DLA</i>	45
5.1.6 <i>Peptídeo melitina</i>	47
5.2 Dicroísmo Circular	49
5.4 Ensaio Biológicos	55
5.4.1 <i>Viabilidade Celular</i>	55
5.5 Interação peptídeo/HSA por meio da Fluorescência	57
5.6 Estudos de estabilidade	60

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais doenças que afetam a humanidade e provocam mortes no mundo. Um relatório recente da Agência Internacional do Câncer indica que em 2030 haverá 22,2 milhões de casos. Somado a isto, as mortes provocadas por esta doença são projetadas para mais de 11 milhões ao ano (BRAY et al., 2012).

O desenvolvimento e o progresso do câncer são processos multifatoriais (FERLAY, 2015). Fatores externos como tabaco, exposição a organismos infecciosos, poluentes ambientais e uma dieta não saudável ou fatores internos, tais como mutações genéticas hereditárias, hormônios e condições imunológicas podem causar o início desta doença (SIEGEL, 2016). Uma vez que o câncer está associado a uma alta morbidade e mortalidade, existe uma necessidade urgente de determinar formas de prevenção e tratamento dessa doença.

Os cânceres de próstata e mama são considerados como os maiores desafios para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais, pois são os mais incidentes e com alta taxa de mortalidade (WELCH, 2010).

As estratégias mais utilizadas no combate do câncer baseiam-se em tratamentos convencionais como a radioterapia e quimioterapia, no entanto, essas formas de terapia possuem amplo espectro de efeitos colaterais graves (MALLICK et al., 2013). Um problema que limita o sucesso da quimioterapia é o mecanismo de resistência desenvolvido pelas células, que pode ser intrínseca ou adquirida. Os medicamentos perdem sua eficiência por meio de vários mecanismos, tais como, alteração na estrutura molecular da droga, mudança na conformação dos alvos, diminuição da permeabilidade da membrana plasmática, diminuição da concentração da droga no interior da célula por meio da degradação, alteração do ciclo celular e bloqueio de fatores apoptóticos (KARTAL-YANDIM, 2015).

As características que diferenciam os tipos de câncer são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos (invasivo) ou distantes (metástase) – (FUTAKUCHI et al., 2016). A medida que o tumor cresce, os tecidos saudáveis próximos são prejudicados, o que eventualmente leva à morte do paciente. Consequentemente, privar e/ou diminuir a divisão das células tumorais é crucial para o tratamento do câncer (EKLUND, 2016).

Neste contexto, as moléculas isoladas de diferentes fontes naturais tem sido introduzidas como terapias naturais contra o câncer ou mesmo para diminuir os efeitos adversos sobre células sadias (ORSOLIC, 2012).

1.1 Peptídeos Antitumorais (PATs)

Nos últimos anos, as biotoxinas, principalmente os peptídeos, ganharam importância como agentes terapêuticos contra o câncer (FOX; SERRANO, 2007). Essas biotoxinas são produzidas por organismos vivos como mecanismo de defesa contra predadores e são conhecidas por terem efeitos toxicológicos e farmacológicos (ZHANG, 2015).

Os peptídeos antitumorais (PATs) apresentam-se como novas moléculas promissoras contra o câncer. Muitas destas moléculas têm como alvo a membrana plasmática, e causam mais danos às células tumorais do que às normais, pois as membranas das células tumorais são carregadas negativamente, ou seja, possuem alta expressão de moléculas aniônicas, tais como a fosfatidilserina (PS), gangliosídeos sializados e sulfatos de heparano, entre outros (DOBRZYNSKA et al., 2005). Em contraposição, a superfície das membranas das células normais é composta essencialmente de fosfolípidios neutros e zwitteriônicos (RIEDL et al., 2011), tendo desse modo, menor atração pelos peptídeos catiônicos.

O fato do mecanismo de ação ter como alvo a membrana celular, proporciona uma baixa probabilidade do desenvolvimento de resistência (SCHWEIZER, 2009; CHEN et al., 2012; LABELLE et al., 2012). No entanto, alguns peptídeos também agem em outros alvos intracelulares, como as enzimas que participam no metabolismo de ácidos nucleicos e de proteínas, entre outros. Desta forma, a indução de apoptose é atualmente considerada como outro possível mecanismo de ação de alguns PATs (GASPAR et al., 2013). Os peptídeos que agem em membranas celulares são em sua grande maioria denominados peptídeos líticos.

1.2 Peptídeos Líticos e Mecanismo de Ação

Peptídeos líticos catiônicos são constituídos normalmente por 12 a 50 resíduos de aminoácidos e têm como características a anfipaticidade e a carga líquida positiva em pH fisiológico (CHEN et al., 2012; BARUA et al., 2010). Este

caráter catiônico acontece devido à presença de resíduos de aminoácidos básicos como arginina, lisina e histidina (CHAN; PRENNER; VOGEL, 2006).

Esses peptídeos vêm sendo apresentados como importantes no tratamento anticancerígeno (SCHWEIZER, 2009). A característica catiônica é determinante para a atração inicial à superfície das membranas das células, uma vez que as células tumorais possuem um potencial de membrana mais negativo em comparação com as células normais, e os peptídeos são normalmente carregados positivamente.

Os peptídeos catiônicos têm sido estudados a fim de compreender os aspectos gerais relacionados às interações peptídeo/lipídeo, assim como a relação dessas interações com a função biológica. Esses polipeptídeos variam consideravelmente em relação ao comprimento de cadeia, hidrofobicidade e distribuição de cargas, mas compartilham estruturas comuns de α -hélice anfipáticas quando associadas com membranas fosfolipídicas, sendo que em solução aquosa não apresentam estrutura secundária definida (SEGREST et al., 1990). Mediante interações eletrostáticas as cargas positivas dos aminoácidos presentes na estrutura do peptídeo interagem inicialmente com as cabeças polares dos fosfolipídios carregadas negativamente (CHEN, 2007).

A anfipaticidade é caracterizada pela separação da estrutura da α -hélice em uma face hidrofóbica e outra hidrofílica. O caráter anfipático é formado por uma sequência periódica de resíduos polares e apolares em um intervalo entre três a quatro resíduos de aminoácidos. Dessa forma, as cadeias laterais polares e apolares dos resíduos de aminoácidos posicionam-se adequadamente para uma separação em faces opostas da estrutura (WANG, 2013). Os peptídeos que preservam a anfipaticidade e a estrutura de α -hélice possuem o pré-requisito para serem ativos em membranas (YEAMAN; YOUNT, 2013).

Muitos peptídeos antitumorais (PATs) foram estudados, porém, o mecanismo de ação destas moléculas ainda não é totalmente claro. Vários mecanismos têm sido propostos, principalmente o envolvendo a desestabilização da membrana plasmática. Estudos evidenciaram que as interações do peptídeo-lipídeo que conduzem a permeação da membrana desempenham um papel importante na sua atividade. A ação dos peptídeos anfipáticos com estrutura em α -hélice pode ocorrer através de três mecanismos gerais:

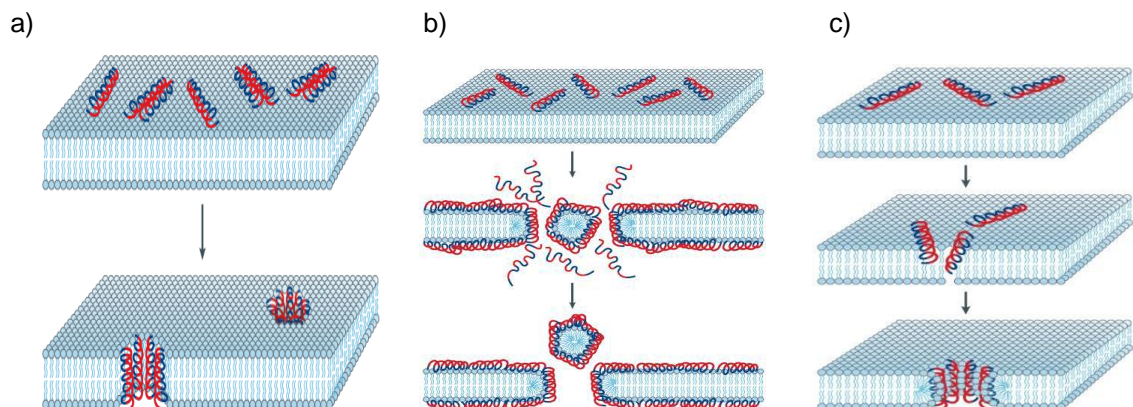
(I) O modelo conhecido como “barrel-stave” (figura 1a) descreve a formação de poros ou canais intramembranares na forma de barril. Nesse modelo, a

face hidrofóbica do peptídeo interage com as caudas apolares dos fosfolipídios da membrana, enquanto a face hidrofílica permanece voltada para o interior do poro, formando um poro orientado perpendicularmente à cadeia hidrocarbonada dos fosfolipídios (SHAI, 1999);

(II) Destruição da membrana/solubilização por meio de um mecanismo denominado “carpet-like” (figura 1b), que propõe a permeabilização da membrana similar a ação de surfactantes. Neste modelo, a partir de uma determinada concentração de peptídeos na superfície da membrana (sugerindo a forma de carpete) ocorre a formação de micelas, iniciando o processo de solubilização (LORENZON et al., 2013).

(III) No terceiro modelo proposto, os peptídeos formam poros por meio de um mecanismo nomeado como “poro toroidal” (figura 1c). Neste processo, em uma primeira etapa, mediante interações eletrostáticas, os PATs interagem com as cabeças polares dos fosfolipídios da membrana plasmática. Posteriormente, os peptídeos, ainda associados com as cabeças dos fosfolipídios, induzem uma curvatura na bicamada lipídica, formando o poro (CASTRO et al., 2009).

Figura 1 - Mecanismos de ação propostos para PATs que agem sobre a membrana plasmática. a) “barrel-stave”, b) “carpet-like”. c) “poro toroidal”.



Fonte: Representação esquemática do Modelo Barril-Stave. Regiões hidrofóbicas do peptídeo estão representadas em azul e as regiões hidrofílicas em vermelho. Modificado de Brogden, 2005.

A maior parte dos peptídeos líticos, incluindo os peptídeos isolados a partir do veneno da abelha, tem capacidade de perturbar a integridade da bicamada da

membrana celular, contornando os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células tumorais. A abertura resultante na bicamada lipídica leva ao colapso de gradientes eletroquímicos transmembranares (JAMASBI et al., 2016).

Além da atividade em membranas plasmáticas, outros alvos intracelulares também devem ser levados em conta. Os peptídeos podem atravessar a membrana plasmática e interferir em uma variedade de processos biológicos, como a parada do ciclo celular, a inibição do crescimento, necrose e apoptose em várias células de câncer (GAJSKI; GARAJ-VRHOVAC, 2013).

Apesar da grande atividade, a utilização dos peptídeos apresenta ainda apresenta desafios significativos. A maioria dos PATs é facilmente degradada por proteases e sua atividade lítica celular não é totalmente específica (GASPAR et al., 2013). Este é o caso do peptídeo denominado Melitina, isolado do veneno da abelha *Apis mellifera*, possui massa molar 2846,46 (g/mol), é ativo contra diversos tipos de câncer, incluindo leucemia, câncer de rins, pulmões, fígado, próstata, mamas e bexiga (SON et al., 2007). Esse é um peptídeo composto por 26 aminoácidos (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ), com grande incidência de resíduos carregados positivamente (carga +6) em pH fisiológico e, devido ao arranjo específico dos aminoácidos na cadeia, possui grande tendência de formação de hélices anfipáticas, estrutura importante para a atividade biológica de peptídeos catiônicos (HANSEL et al., 2007). Estas características vêm chamando muito a atenção dos pesquisadores para esta molécula. Algumas de suas propriedades biológicas relatadas são: amplo espectro de atividade antimicrobiano, efeito anti-inflamatório, antifúngico, anestésico e anticâncer (ATTIA et al., 2008; LIU et al., 2008). No entanto, o grande desafio continua sendo a diminuição da toxicidade do peptídeo frente a células saudáveis e o aumento da sua estabilidade (GAJSKI; GARAJ-VRHOVAC, 2013). Por isso a necessidade de empregar um sistema específico de entrega desta molécula em seu alvo molecular é importante.

A melitina é um peptídeo formador de poros e atua principalmente por meio de um mecanismo lítico. No entanto, após a ligação dos peptídeos as membranas por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e por formação de ligações de hidrogênio, muitos tipos de perturbações podem ocorrer, incluindo a permeabilização da membrana. Uma vez dentro da célula o peptídeo pode interferir em diversas funções biológicas bem como nas membranas internas (WIMLEY, 2010).

A estrutura secundária do peptídeo melitina pode ser observada na figura 2, respectivamente.

Figura 2 - Estrutura secundária da melitina



Fonte: Protein Data Bank in Europe and Rady et al., 2017.

A toxicidade da melitina é conhecida na literatura devido a sua propriedade hemolítica, uma vez que a mesma promove ruptura dos eritrócitos logo após o contato com essas células (HOSKIN E RAMAMOORTHY, 2008).

De acordo com a tabela 1, podemos observar que a concentração inibitória mínima (CIM) da melitina (antimicrobiana, antiviral e citolítica) varia em uma faixa de 0,6 a 3,5 μM .

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana e citolítica da melitina (IC50) e seus respectivos mecanismos de ação.

μM^*	ALVO	MECANISMO DE AÇÃO	Fonte
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	Formação de canais e poros, morte celular	Conlon, J. M. et al.
4	<i>Escherichia coli</i>	Formação de canais e poros, morte celular	Conlon, J. M. et al.
3,5	<i>Candida albicans</i>	Formação de canais e poros, morte celular	Conlon, J. M. et al.
0,6	Eritrócitos humanos	Rompe lipossomas, indução de apoptose	Soman, N. R. et al.
4	L929 fibroblastos	Morte celular	Jo, M. et al.
3,5	EL4-T-Linfoblasto de rato	Inibe a metástase de cel. Tumorais, indução de apoptose	Jo, M. et al.
0,75	Células cancerígenas	Desestabiliza o tumor, induz apoptose	Jo, M. et al.

Os dados (μM) mostram valores de MIC contra microorganismos e IC_{50} contra células de mamíferos.

Fonte: Autora do trabalho

Frente ao amplo espectro de atividades biológicas do peptídeo melitina, a utilização de um transportador de fármacos, em especial a proteína HSA, poderia prolongar a meia vida do respectivo composto e alterar as propriedades farmacocinéticas, resultando em melhorias terapêuticas (TOLMACHEV et al., 2007).

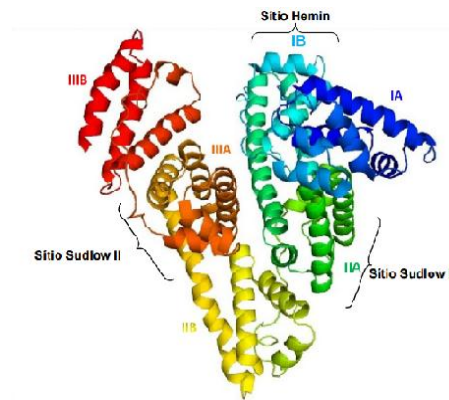
1.3 HSA (Soro Albumina Humana)

A albumina é uma das proteínas mais estudadas e a mais abundante no plasma sanguíneo, estando presente entre concentrações de 3,5 g/dL e 5,0 g/dL e contribui para a manutenção da pressão osmótica e do pH do sangue (XU et al., 2012). A meia vida da albumina varia entre 17 e 19 dias na corrente sanguínea (KRATZ, 2008).

Como a albumina é sintetizada no fígado, a diminuição de sua quantidade no plasma pode ser produto de uma doença hepática, mas também pode ser o resultado de uma doença renal que permita que a albumina seja eliminada pela urina. Sua diminuição pode também estar relacionada à desnutrição ou uma dieta pobre em proteínas (BHATTACHARYA, GRUNE, CURRY, 2000).

Esta proteína possui estrutura globular monomérica de 66 KDa e contém 585 resíduos de aminoácidos com poucos resíduos de triptofano ou metionina, mas uma abundância de resíduos carregados como a lisina e ácido aspártico. A soro albumina humana (HSA) é disposta em três domínios homólogos. Cada domínio é constituído por dois subdomínios designados como A e B com três domínios estruturalmente semelhantes (I, II, III). A sequência de aminoácidos de HSA contém um total de 17 ligações de dissulfeto (as quais contribuem para a estrutura terciária), um tiol livre na Cys 34 e apenas um resíduo de triptofano (Trp) na posição 214 (LEMIEZTRYNDA et al., 2000). A albumina possui uma estrutura terciária em forma de coração, é constituída principalmente por α -hélices, não apresentando folha beta (Figura 3) (FANALI et al., 2012 e SARMANTA et al., 2014).

Figura 3 - Estrutura tridimensional da albumina sérica humana (HSA).



Fonte: Sugio et al., Ilustração obtida do banco de dados de RCSB protein data bank PDB ID:1AO6 Crystal structure of human serum albumin. DOI: 10.2210/pdb1ao6/pdb. Adaptado de Sugio et al., 1999.

Os domínios I e II são responsáveis pela ligação da maioria dos produtos farmacêuticos que interagem com a proteína. Esses domínios (I e II) exibem afinidades diferenciais, mas nem sempre exclusivas (ANGUIZOLA et al., 2013). O domínio I tende a ligar compostos heterocíclicos relativamente grandes como a bilirrubina, em contraste, o domínio II é menor porque a ligação é mais estereoespecífica (DOCKAL et al., 2000).

A albumina possui capacidade de ligação com vários ligantes, incluindo aminoácidos (Trp e Cys), ácidos graxos, produtos farmacêuticos, íons metálicos, tiroxina e bilirrubina. Esta proteína também é importante no comportamento farmacocinético de muitas drogas (FASANO et al., 2005). A afinidade das drogas pela HSA é um dos fatores que afetam a distribuição e a livre concentração de muitos medicamentos administrados, pois essa interação prolonga a meia vida, ou seja, protege o composto das substâncias existentes no sangue (WARNECKE et al., 2007). Desta forma, o papel da albumina no sistema circulatório é auxiliar no transporte, na diminuição da toxicidade e/ou proteção contra oxidação, no metabolismo e na distribuição de ligantes exógenos e endógenos (KRAGH-HANSEN; CHUANG; OTAGIRI, 2002).

A utilização da HSA, como transportador de compostos ativos pode ser considerada um benefício no tratamento do câncer, pois pode propiciar uma melhor

eficácia terapêutica contra doenças, entregando o fármaco em seu alvo específico (JEONG, 2016; CHEN, 2015).

O nosso estudo avaliou a ligação de peptídeos à HSA como mecanismo para a circulação prolongada na corrente sanguínea, aumentando a estabilidade.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O peptídeo melitina (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ) e o peptídeo completo (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-RQKRSLGG-WQRPSSW) foram sintetizados satisfatoriamente por meio da técnica de síntese em fase sólida; bem como o peptídeo que corresponde ao sítio de clivagem enzimática mais a sequência DLA (RQKRSLGG-WQRPSSW) usado como molécula controle.

Os peptídeos melitina e melitina-sítio de clivagem-DLA apresentaram alta atividade citotóxica contra células de câncer de mama, causando 90% de morte nas concentrações de 100-1,75 μM . Desta forma, os dois peptídeos contendo a sequência melitina foram ativos nas células tumorais (MCF-7), porém tóxicos nas células não tumorais (HaCat). Estes dados de viabilidade celular mostraram que o potencial tumoral e tóxico da melitina não foi prejudicado pela ligação ao sítio de clivagem-DLA.

Os dados de permeabilização de vesículas indicam que a formação de poros ou o rompimento da bicamada lipídica são possíveis mecanismos de ação desses compostos sobre os eritrócitos.

De acordo com os dados de fluorescência todos os peptídeos (sítio de clivagem-DLA; melitina e peptídeo completo) interagiram com HSA. Isso foi concluído a partir do aumento da intensidade de fluorescência e um deslocamento no azul no comprimento de onda máximo de emissão.

Através dos ensaios de estabilidade dos peptídeos no plasma sanguíneo foi possível comparar os diferentes perfis de degradação. Nestes estudos o peptídeo melitina apresentou maior estabilidade, ao contrário do esperado.

Os dados obtidos mostraram que, a estratégia utilizada para o aumento da estabilidade da melitina não é adequada.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, J. T. et al. Extending half-life by indirect targeting of the neonatal Fc receptor (FcRn) using a minimal albumin binding domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 7, p. 5234-5241, 2011.
- ANGUIZOLA, J. et al. Review: glycation of human serum albumin. **Clinica Chimica Acta**, v. 425, p. 64-76, 2013.
- ARMSTRONG, D.; ZIDOVETZKI, R. **Helical wheel projections**. Version: Id.wheel.pl, v1.4.[S.I.], 2009. Disponível em: <<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>>. Acesso em: 17 fev. 2017.
- ATTIA, W. Y. et al. The anti-tumor effect of bee honey in Ehrlich ascite tumor model of mice is coincided with stimulation of the immune cells. **Egypt Journal Immunology**, v. 15, n. 2, p. 169-183, 2008.
- AVITABILE, C.; D'ANDREA, L. D.; ROMANELLI, A. Circular dichroism studies on the interactions of antimicrobial peptides with bacterial cells. **Scientific Reports**, v. 4, 2014. doi:10.1038/srep04293.
- BARUA, S. et al. Lytic peptide mediated sensitization of TRIL-resistant prostate cancer cells to death receptor agonists. **Cancer Letters**, v. 293, n. 2, p. 240-253, July 2010.
- BHATTACHARYA, A. A; GRUNE T.; CURRY, S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. **Journal of Molecular Biology**, v. 303, p. 721-732, 2000.
- BRAY, F. et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. **Lancet Oncology**, v. 13, n. 8, p. 790-801, 2012.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.
- CARPINO, L. A.; HAN, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. **Jornal of Organic Chemistry**, v. 37, n. 22, p. 3404-3409, 1972.
- CASTRO, M. S. et al. Combinatorial synthesis and directed evolution applied to the production of α -helix forming antimicrobial peptides analogues. **Current Protein and Peptide Science**, v. 7, n. 6, p. 473-478, Dec. 2009.
- CASALLANOVO, F. et al. Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin Sticholysin II. **Biopolymers**, v. 84, n. 2, p. 169-180, Sept. 2006.

CESPEDES, G. F. et al. Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. **Protein Peptide Letters**, v. 19, p. 596-603, 2012.

CHAKRABORTY, T.; LEDWANI, L. **Research methodology in chemical sciences: experimental and theoretical approach**. Oakville: Apple Academic Press, 2016.

CHAN, D. I.; PRENNER, E. J.; VOGEL, H. J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1758, p. 1184-1202, 2006.

CHEN, L. et al. Lytic peptides with improved stability and selectivity designed for cancer treatment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 4, p. 1508-1517, 2012.

CHEN, X. et al. Multiple orientation of melittin inside a single lipid bilayer determined by combined vibrational spectroscopic studies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 1420-1427, 2007.

CHEN, Y. H. et al. Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. **Biochemistry**, v. 13, n. 16, p. 3350-3359, 1974.

CHEN, Z.; ZHANG, S.; ZHANG, J. Affinity of a mononuclear monofunctional anticancer Pt(II) complex to human serum albumin: a spectroscopic approach. **Biometals**, v. 28, p. 1031-1041, 2015.

CHOI, K. Y. et al. Protease-activated drug development. **Theranostics**, v. 2, n. 2, p. 156-178, 2012.

CHENG, Z.; JIANG, X.; LIU, R. Spectroscopic studies on the interaction between tetrandrine and two serum albumins by chemometrics methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 92-105, 2013.

CILLI, E. M. et al. Correlation between solvation of peptide-resins and solvent properties. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 8992-9000, 1996.

CILLI, E. M. et al. Correlation between the mobility of spin-labeled peptide chains and resin solvation: an approach to optimize the synthesis of aggregating sequences. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 64, p. 9118-9123, 1999.

CONLON, J. M. et al. A melittin-related peptide from the skin of the Japanese frog, *Rana tagoi*, with antimicrobial and cytolytic properties. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 306, p. 496-500, 2003.

COWGILL, R. W. Fluorescence and the structure of proteins. II. Fluorescence of peptides containing tryptophan or tyrosine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 75, p. 272-273, 1963.

CRAIK, D. J. et al. Future of peptide-based drugs. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 81, p. 136-147, 2013.

CRUSCA JUNIOR, E. **Síntese, estudos estruturais e biológicos do peptídeo hilina a1 e análogos**. 2010. 78 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

DOBZYNSKA, J. et al. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 276, p. 113-119, 2005.

DOCKAL, M. et al. Five recombinant fragments of human serum albumin-tools for the characterization of the warfarin binding site. **Protein Science**, v. 9, p. 1455-1465, 2000.

EKLUND, G. **The role of gamma-tubulin in cell division and câncer**. 2016. 71 p. Thesis (Doctoral) - Faculty of Medicine, Lund University, Lund, 2016. Disponível em: <<https://lup.lub.lu.se/search/publication/8506155>>. Acesso em: 12 jul. 2017.

ESCRIBÁ, P. V. et al. Membrane lipid therapy: modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. **Progress in Lipid Research**, v. 59, p. 38-53, May 2015.

FANALI, G. et al. Human serum albumin: from bench to bedside. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, p. 209-290, 2012.

FASANO, M. The extraordinary ligand binding properties of human serumalbumin. **IUBMB Life**, v. 57, p. 787-796, 2005.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136 p. 359-386, 2015.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2927-2934, 2007.

FREIRE, J. M. et al. Shifting gear in antimicrobial and anticancer peptides biophysical studies: from vesicles to cells. **Journal of Peptide Science**, v. 21, n. 3, p. 178-185, 2015.

FUTAKUCHI, M.; FUKAMACHI, K.; SUZURI, M. Heterogeneity of tumor cells in the bone metastasis of prostate or breast cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 99, p. 206-211, 2016.

GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVAC, V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 697-705, 2013.

GASPAR, D.; VEIGA, A. S.; CASTANHO, M. A. From antimicrobial to anticancer peptides. **A Review Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013. doi:10.3389/fmicb.2013.00294.

HANSEL, W. et al. Destruction of breast cancers and their metastases by lytic peptide conjugates in vitro and in vivo. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 260, p. 183-189, Dec. 2005.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1778, n. 2, p. 357-375, 2008.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

JEONG, K. et al. Development of highly efficient nanocarrier-mediated delivery approaches for cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 374, p. 31-43, 2016.

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KARTAL-YANDIM, M.; ADAN-GOKBULUT, A.; BARAN, Y. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, p. 716-726, 2016.

KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V. T. G.; OTAGIRI, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 695-704, 2002.

KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 132, p. 171-183, 2008.

LABELLE, J. L. et al. A stapled BIM peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 6, p. 2018-2031, 2012.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum Press, 1983.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York : Springer, c2006.

LEMIESZ-TRYNDA, L. et al. Studies on the interactions between human serum albumin and trans-indazolium (bisindazole) tetrachlororuthenate (III). **Journal Inorganic Biochemical**, v. 78, p. 341-346, 2000.

LEUSCHNER, C.; HANSEL, W. Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 2299-2310, 2004.

LIU, S. J. et al. Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway. **Hepatology**, v. 47, n. 6, p. 1964-1973, 2008.

LIU, X. et al. Amphipathicity determines different cytotoxic mechanisms of lysine- or arginine-rich cationic hydrophobic peptides in cancer cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 5238-5247, 2016.

LOPEZ-OTIN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 30433-30437, 2008.

LOPEZ-OTIN, C.; MATRISIAN, L. M. Emerging roles of proteases in tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 800-808, 2007.

LORENZON, E. N. et al. Dimerization of aurein 1.2: effects in structure, antimicrobial activity and aggregation of *Candida albicans* cells. **Amino Acids**, v. 44, n. 6, p. 1521-1528, 2013.

MA, Y. et al. A recombinant slow-release PACAP-derived peptide alleviates diabetes by promoting both insulin secretion and actions. **Biomaterials**, v. 51, p. 80-90, 2015.

MALAVOLTA, L. et al. Solvation of polymers as model for solvent effect investigation: proposition of a novel polarity scale. **Tetrahedron**, v. 58, n.22, p. 4383-4394, 2002.

MALLICK, I. et al. Predictors of weight loss during conformal radiotherapy for head and neck cancers - how important are planning target volumes? **Clinical Oncology**, v. 25, n. 9, p. 557-563, 2013.

NGUYEN, L. T. et al. Serum stabilities of short tryptophan and arginine rich antimicrobial peptide analogs. **Plos One**, v. 5, n. 9, 2010.
doi:0.1371/journal.pone.0012684.

OBIEZU, C. V et al. Human kallikrein 4: enzymatic activity, inhibition, and degradation of extracellular matrix proteins. **Biological Chemistry**, v. 387, p. 749-759, 2006.

ORSOLIC, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 31, p. 173-194, 2012.

POLOZOV, I. V. et al. Role of lipids in the permeabilization of membranes by class L amphipathic helical peptides Papel dos lipídios na permeabilização das membranas por classe L amphiphiles helicoidal peptídeos. **Biochemistry**, v. 36, n. 30, p. 9237-9245, 1997.

RAN, S.; DOWNES, A.; THORPE P. E. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. **Câncer Research**, v. 62, p. 6132-6140, 2002.

RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 227-233, 2010. Suppl. 1.

REX, S. Pore formation induced by the peptide melittin in different lipid vesicle membranes. **Biophysical Chemistry**, v. 58 p. 75-85, 1996.

RIEDL, S.; ZWEYTICK, D.; LOHNER, K. Membrane-active host defense peptides-challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 164, n. 8, p. 766-781, 2011.

ROUSER, G.; FKEISCHER, S.; YAMAMOTO, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. **Lipids**, v. 5, n. 5, p. 494-496, 1970.

SARMANTA, A. et al. Short chain polyethylene glycols unusually assist thermal unfolding of human serum albumin. **Biochimie**, v. 104, p. 81-89, 2014.

SCHMITT, M. et al. Emerging clinical importance of the cancer biomarkers kallikrein-related peptidases (KLK) in female and male reproductive organ malignancies. **Radiology and Oncology**, v. 47, n. 4, p. 319-329, 2013.

SCHWEIZER, F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 190-194, 2009.

SEGREST, J. P. et al. Amphipathic helix motif: classes and properties. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 8, p. 103-117, 1990.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion, and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p. 55-70, 1999.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66 p. 7-30, 2016.

SLEEP, D.; CAMERON, J.; EVANS, L. R. Albumin as a versatile platform for drug half-life extension. **Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects**, v. 1830, n. 12, p. 5526-5534, 2013.

SOMAN, N. R. et al. Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 2830- 2842, 2009.

SON, D. J. et al. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 115, n. 2, p. 246-270, 2007.

SUGIO, S. et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. **Protein Engineering**, v. 12, n. 6, p. 439-446, 1999.

SZAKÁCS, G. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 219-234, 2006.

TAYLOR, E. M. et al. Designing stable blood-brain barrier-permeable proaptide peptides for treatment of central nervous system neurodegeneration. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 293, n. 2, p. 403-409, 2000.

TOLMACHEV, V. et al. Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a ^{177}Lu -Labeled HER2-specific affibody molecule. **Cancer Research**, v. 67, p. 2773 - 2782, 2007.

VIVIAN, J. T.; CALLIS, P. R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. **Biophysical Journal**, v. 80, p. 2093-2109, 2001.

WANG, G. Database-guided discovery of potent peptides to combat HIV-1 or superbugs. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 6, p. 728-758, 2013.

WARNECKE, et al. Synthesis, cleavage profile, and antitumor efficacy of an albumin-binding prodrug of methotrexate that is cleaved by plasmin and cathepsin B. **Archiv der Pharmazie: Chemistry in Life Sciences**, v. 340, p. 389-395, 2007.

WELCH, H. G.; BLACK, W. C. Overdiagnosis in cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, p. 605-613, 2010.

WIMLEY, W. C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 10, p. 905-917, 2010.

XU, T. et al. Multiple spectroscopic studies on the interaction between olaquinox, a feed additive, and bovine serum albumin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2540-2546, 2012.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. **Antimicrobial Therapeutics Reviews**, v. 1277, p. 127-138, 2013.

ZHANG, Y. Why do we study animal toxins? **Dongwuxue Yanjiu**, v. 36, p.183-222, 2015.