

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

DADOS CURRICULARES

MILENA NOVAIS DA COSTA

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 12/07/1987

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Jales/SP

Filiação: Orlando Gomes da Costa e Marlene Teixeira Novais da Costa

Estado Civil: Solteira

Profissão: Química

Endereço: Rua Marechal Rondon, 423

Jales/SP

15700-258

e-mail: miuli_nc@hotmail.com

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Licenciada em Química pela Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara/SP, concluído em julho de 2013.

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Não se aplica

3.1 Apresentações de trabalhos em congressos científicos

Não se aplica

3.2 Resumos publicados em anais de congressos científicos

Não se aplica

3.3 Participações em eventos

Formação complementar

Milena Novais da Costa. “Cromatografia Líquida de alta eficiência: desenvolvimento de métodos”. FCF – UNESP, Araraquara – SP, 2016.

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-butiloxicarbonila

CD Dicroísmo Circular

CF carboxifluoresceína

DCM diclorometano

DIC diisopropilcarbodiimida

DMF dimetilformamida

ESI electrospray ionization

Fmoc 9-fluorenilmetiloxicarboxila

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 Ensaios 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 Ensaios 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:

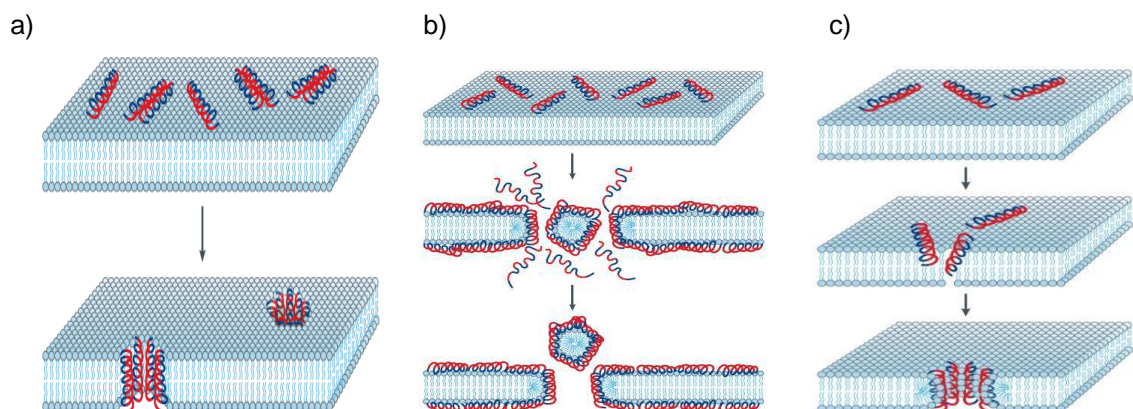
(I) O modelo conhecido como “barrel-stave” (figura 1a) descreve a formação de poros ou canais intramembranares na forma de barril. Nesse modelo, a

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).

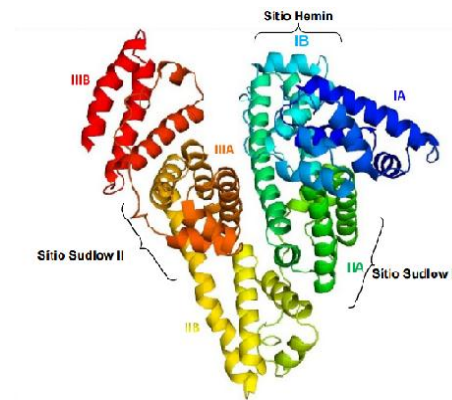
1.3 HSA (Soro Albumina Humana)

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.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A problemática

O processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo. Entre os principais problemas associados à administração sistêmica de fármacos estão a falta de especificidade e de afinidade para sítios patológicos, a toxicidade, a biodistribuição e outros efeitos secundários resultantes de altas doses (SZAKÁCS et al., 2006).

O desenvolvimento de agentes terapêuticos antitumorais de natureza peptídica tem seu sucesso limitado pela baixa estabilidade metabólica (CRAIK, 2013) e em alguns casos a toxicidade. A eficiência terapêutica destes compostos está limitada ao tempo de meia vida, que vai desde alguns segundos até alguns minutos, podendo em casos raros chegar a algumas horas. A principal causa da baixa estabilidade dos peptídeos é a sua susceptibilidade às proteases presentes no sangue, fígado e rim (ANDERSEN et al., 2011).

Para evitar a degradação dos peptídeos, uma estratégia seria “esconder” o composto das proteases solúveis no sangue (TAYLOR et al., 2000). Recentemente, a ligação de moléculas bioativas a domínios de ligação a albumina (DLA) tem mostrado ser uma estratégia muito interessante devido ao fato da albumina ser a proteína mais abundante no soro e pelo seu grande tempo de meia vida (2-3 semanas no homem) (ANDERSEN et al., 2011). Desta forma, a conjugação de moléculas bioativas aos DLA pode promover um aumento da estabilidade destas moléculas mediante sua associação com albumina endógena (SLEEP et al., 2013).

Os DLA são tipicamente sequências peptídicas pequenas que se ligam de forma não covalente à albumina. Estes domínios podem ser encontrados em algumas proteínas bacterianas como a proteína G de *Streptococcus sp.* O DLA com a sequência WQRPSSW foi identificado por meio da tecnologia de “Phage display” e utilizado recentemente para conferir maior tempo de vida a um pró-fármaco para o tratamento da diabetes, obtendo resultados muito satisfatórios (MA et al., 2015).

Como mencionado anteriormente, um dos maiores problemas da quimioterapia está associado aos efeitos colaterais indesejados, normalmente atribuídos à baixa seletividade dos compostos utilizados (GAJSKI; GARAJ-

VRHOVAC, 2013). Para diminuir este problema, sequências que são hidrolisadas por proteases extracelulares expressas em grande quantidade por células tumorais (CHOI et al., 2012) estão sendo avaliadas devido suas propriedades antitumorais (LOPES-OTIN; MATRISIAN, 2007).

As proteases desempenham um papel fundamental e essencial em muitos processos biológicos e patológicos, desempenhando papéis influentes na replicação e transcrição do DNA, proliferação e diferenciação celular, angiogênese, neurogênese, ovulação, fertilização, reparação tecidual, mobilização de células-tronco, hemostasia, coagulação sanguínea, inflamação, imunidade, necrose e apoptose (LOPEZ-OTIN; BOND, 2008). Outra aplicação do uso das proteases é a de biomarcadores para diagnóstico ou prognóstico de tumores, sendo que a alteração da homeostase pode significar a progressão de algumas doenças como câncer, distúrbios neurodegenerativos, pulmonares e cardiovasculares.

Entre as proteases, as catepsinas são proteínas bem conhecidas encontradas em vários tecidos tumorais. As catepsinas são consideradas biomarcadores importantes para o câncer e podem servir como alvos importantes para os pró-fármacos, por meio da indução de liberação de fármacos anticancerígenos na proximidade dos tecidos tumorais ou ainda dentro das células tumorais (CHOI et al., 2012). A ideia por trás desta estratégia é a liberação do composto citotóxico de um pró-fármaco no microambiente do tumor. Assim, um pró-fármaco contendo um sítio de clivagem específico para uma determinada protease, pode conferir seletividade, já que o agente antitumoral somente é liberado quando a protease (altamente expressas nos tecidos malignos) encontra o seu substrato (sítio de clivagem).

Particular atenção merece a calicreína 4 (KLK4) que possui atividade proteolítica fortemente ligada ao desenvolvimento e progressão do câncer. É altamente expressa por células tumorais, porém ausente ou com baixos níveis de expressão em células sadias (SCHMITT et al., 2013). A enzima KLK4 cliva substratos de peptídeos próximos aos resíduos de arginina ou lisina. Desta forma, a clivagem da ligação peptídica promovida pela KLK4, constitui uma grande oportunidade no desenho de novos bioconjugados antitumorais com alta seletividade (OBIEZU et al., 2006).

O sítio de clivagem RQKRSLGG foi obtido da base de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) uma biblioteca de informações sobre proteases, substratos, inibidores e estruturas (RAWLINGS et al., 2010), o qual será utilizado

neste trabalho como ligante, atuando como uma ponte molecular entre o composto ativo e a soro albumina. É um substrato sensível à protease KLK4, sendo utilizado para monitorar a atividade dessa enzima.

Desta forma, esperamos que a molécula obtida seja estável no plasma, pois o DLA de sequência WQRPSSW ligará a molécula toda a HSA, conferindo maior estabilidade às moléculas. Neste caso a HSA servirá como uma “capa protetora”, garantindo a integridade da molécula até o tecido alvo, onde o composto ativo será liberado após a clivagem pelas enzimas KLK4 (WARNECKE et al., 2007; GAJSKI; GARAJ-VRHOVAC, 2013).

3 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo a síntese e avaliação de novos compostos com estabilidade e seletividade melhoradas para células cancerígenas.

3.1 Objetivos específicos

- Sintetizar o peptídeo WQRPSSW (DLA), o peptídeo contendo o DLA e o sítio de clivagem (RQKRSLGG-WQRPSSW) e o peptídeo melitina (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ) como uso controle;
- Sintetizar o peptídeo completo contendo a melitina como agente citotóxico (melitina-RQKRSLGG-WQRPSSW);
- Estudar a conformação das moléculas por meio da técnica de dicroísmo circular;
- Determinar a atividade citotóxica sobre células tumorais e normais;
- Avaliar a estabilidade das moléculas sintetizadas em soro humano;
- Estudar da interação peptídeo-HSA por espectroscopia de fluorescência

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sínteses de Peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados manualmente de acordo com a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) (CARPINO; HAN, 1972). Este método é baseado no crescimento da cadeia peptídica, um resíduo por vez, a partir de sua região carboxiterminal, a qual se encontra ligada covalentemente a uma resina.

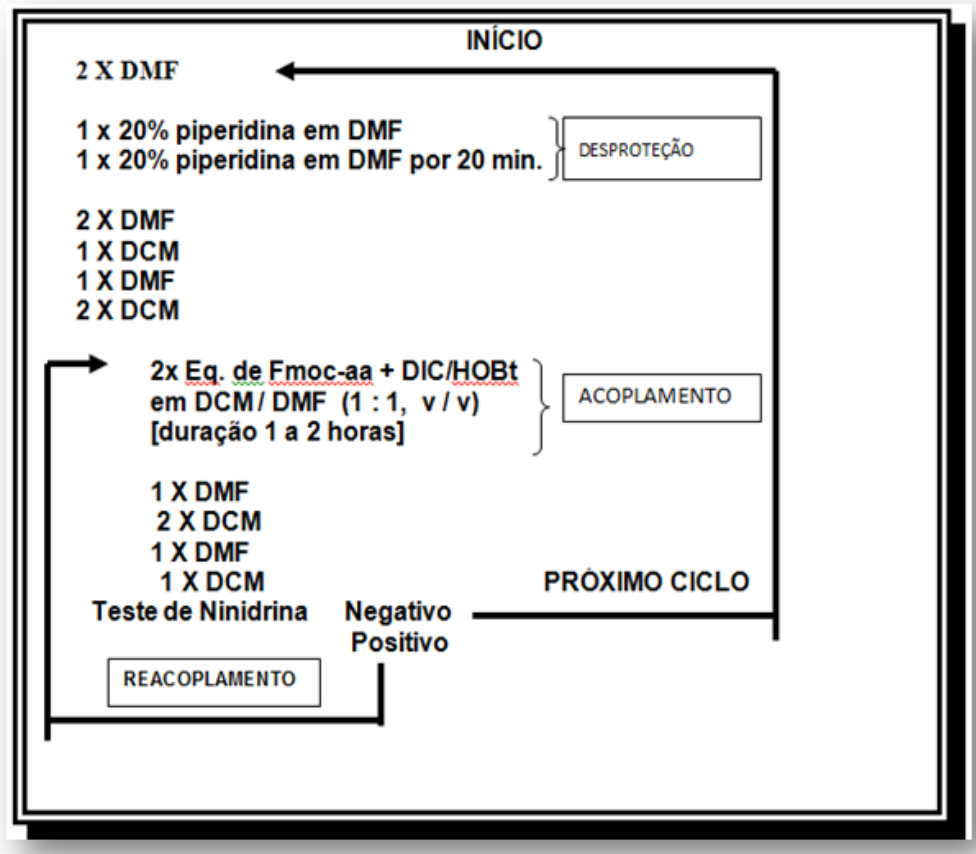
A resina Rink Amida-MBHA foi o suporte utilizado na síntese em fase sólida, conjuntamente com a estratégia de proteção do grupo amino pelo grupo Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonila), a qual impede reações indesejadas no grupo α -amino do resíduo.

A síntese química procede a partir da região carboxiterminal que se encontra ligada covalentemente à resina por meio de uma ligação éster para obtenção de peptídeos com carboxilatos livres (resina Wang), ou de uma ligação amida para a obtenção de peptídeos com extremidade alfa carboxiamida (resina Rink amida).

Os acoplamentos dos Fmoc-aminoácidos foram realizados pela ativação dos grupos carboxilas com a combinação: O-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofosfato (HBTU)/ N-metil-morfolina (NMM) e diisopropilcarbodiimida (Dic)/N-Hidroxibenzotriazol (HOBt) durante duas horas em agitação, utilizando como solventes 50% de dimetilformamida (DMF) e 50% diclorometano (DCM). A desproteção do grupo amino após acoplamento foi realizada em meio básico com uma solução 20% de 4-metilpiperidina em DMF durante 20 min. Foram efetuadas lavagens em cada passo com DMF e DCM para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos.

O protocolo utilizado está resumido na figura 4.

Figura 4 - Protocolo utilizado neste trabalho na Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.



A confirmação do acoplamento/desproteção foi monitorada mediante o teste da ninidrina (KAISER et al., 1970). Este composto, em altas temperaturas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul, permitindo saber se o acoplamento foi efetuado com 100% eficiência.

A clivagem do peptídeo, ou seja, o rompimento da ligação do peptídeo com a resina, foi realizada utilizando uma solução contendo ácido trifluoracético (TFA), triisopropilsilano (TIS) e água deionizada na porcentagem de 95%, 2,5%, 2,5% respectivamente; em um frasco de vidro sob agitação branda por 2 h. O volume utilizado foi na proporção de 1 mL de solução para cada 100 mg de resina.

Após as 2 h executou-se a precipitação do peptídeo com éter etílico gelado. Secou-se o precipitado utilizando uma bomba a vácuo durante 30 min, e o peptídeo foi extraído da resina com 50% de água ultrapura e 50% acetonitrila contendo

0,045% de TFA (ácido trifluoracético), após centrifugação para se separar a resina. O sobrenadante resultante foi liofilizado para obter-se o peptídeo bruto.

4.2 Purificação dos Peptídeos por CLAE

A purificação dos produtos das sínteses foi realizada em modo semipreparativo utilizando um cromatógrafo Shimadzu, equipado com coluna de Marca Phenomenex e tamanho 250 x 10 mm, nas condições mostradas na tabela 2. Durante a purificação foram recolhidos vários tubos contendo o material de eluição. Os tubos contendo os materiais desejados foram liofilizados obtendo-se as frações puras que foram analisadas por CLAE analítico em um cromatógrafo Shimadzu, com coluna C18. As condições cromatográficas utilizadas estão colocadas abaixo:

Tabela 2 - Condições cromatográficas empregadas na purificação dos peptídeos obtidos.

SITIO DE CLIVAGEM + DLA		
MODO	SEMIPREPARATIVO	ANALÍTICO
SOLVENTES	A: 0,045% TFA em H ₂ O B: 0,036% TFA em ACN	A: 0,045% TFA em H ₂ O B: 0,036% TFA em ACN
GRADIENTE	10-40% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min.
FLUXO	5 mL/min	1 mL/min
COMPRIMENTO DE ONDA	220 nm	220 nm

MELITINA		
MODO	SEMIPREPARATIVO	ANALÍTICO
SOLVENTES	A: 0,045% TFA em H ₂ O B: 0,036% TFA em ACN	A: 0,045% TFA em H ₂ O B: 0,036% TFA em ACN
GRADIENTE	30-70% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min
FLUXO	5 mL/min	1 mL/min
COMPRIMENTO DE ONDA	220 nm	220 nm

MELITINA + SÍTIO DE CLIVAGEM + DLA

MODO	SEMI-REPREPARATIVO	ANALÍTICO
SOLVENTES	A: 0,045% TFA em H ₂ O B: 0,036% TFA em ACN	A: 0,045% TFA em H ₂ O B: 0,036% TFA em ACN
GRADIENTE	20-60% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min
FLUXO	5 mL/min.	1 mL/min
COMPRIMENTO DE ONDA	220 nm	220 nm

Fonte: Autora do trabalho

4.3 Caracterização dos Peptídeos

Na caracterização dos materiais obtidos foi utilizado um espectrômetro de massa da marca Brucker operando no modo ESI (“electrospray ionization”) positivo, localizado no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química.

A espectrometria de massas é uma ferramenta muito útil na caracterização dos peptídeos, pois permite determinar a razão massa molar/carga (MM/z) das amostras analisadas. A técnica baseia-se em um analisador “ion trap” que ioniza a amostra utilizando um electrospray, obtendo-se ao final um espectro com picos na qual é possível determinar a razão massa molecular/carga (m/z) na faixa de 200-2000 g/mol.

4.4 Estrutura dos Peptídeos

As análises de dicroísmo circular foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-715, em celas de 1,0 mm de caminho óptico com 6 varreduras por espectro com tempo de integração de 3 s por ponto. Para todos os experimentos a leitura foi feita a cada 0,5 nm. Neste estudo foram preparadas soluções estoques dos diferentes compostos em água, para posterior diluição a 10 µmol/L em tampão PBS, pH 7,2. Os experimentos foram realizados em solução PBS e em vesículas contendo POPC:POPS (9:1; m:m).

O cálculo da helipticidade molar $[\Theta]$, utilizado para converter os dados coletados inicialmente em *milidegree*, foi realizado utilizando a seguinte fórmula (CASALLANOVO et al., 2006).

$$[\Theta] = \frac{\text{valor (em milidegree)}}{10 \times \ell \times [\text{peptídeo}] \times n^\circ \text{ de aa}}$$

Onde no numerador é inserido o valor obtido em *milidegree* pelo equipamento, ℓ é o caminho óptico utilizado na cubeta (0,1 cm), $[\text{peptídeo}]$ é a concentração de peptídeo usada no experimento em mol.L⁻¹ e n° é a quantidade de resíduos de aminoácidos presentes na molécula.

A porcentagem de α -hélice (f_H) presente nos peptídeos foi estimada de acordo com Chen et al., (1974), utilizando-se a equação:

$$[\theta]_{222} = \left(f_H - \frac{ik}{n} \right) \cdot [\theta]_\infty$$

Onde $[\Theta]_{222}$ é a elipticidade observada no comprimento de onda de 222 nm, i é o número de segmentos helicoidais (considerando 1 para esse peptídeo), k é uma constante dependente do comprimento de onda (2,57), n é o número total de resíduos e $[\Theta]_\infty$ a elipticidade residual máxima para uma hélice de tamanho infinito (-39.500 deg.cm².dmol⁻¹) (CHEN et al., 1974).

4.5 Interação com Membranas e Possível Mecanismo de Ação

Uma das metodologias experimentais mais utilizadas para estudar interação de peptídeos com membranas é a espectrometria de fluorescência (LAKOWICZ, 1983). A fluorescência ocorre quando há emissão de energia na forma de luz após absorção pelos fluoróforos. A emissão de radiação eletromagnética ocorre a partir das transições eletrônicas entre os estados excitados e estado fundamental, ou seja, quando o estado excitado singleto (S_1) decai para o estado singleto fundamental (S_0) (CRUSCA, 2010).

Os fluoróforos podem ser do tipo intrínsecos (contidos nas macromoléculas) e/ou extrínsecos (adicionados ao sistema). Geralmente para este tipo de estudo com macromoléculas são utilizados os fluoróforos intrínsecos, triptofano e tirosina. A fenilalanina quase não é utilizada, pois possui baixo rendimento quântico. A interação das moléculas com o meio pode alterar a energia do estado excitado e, como resultado a frequência de emissão, pois a fluorescência do resíduo é sensível à polaridade do ambiente.

Visando obter informações a respeito da interação dos peptídeos com miméticos de membrana e seu mecanismo de ação, LUVs de POPS/POPC (9/1; m/m) foram confeccionadas contendo carboxifluoresceína (CF) em seu interior.

Os lipídeos 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilserina (POPS) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) foram pesados na proporção POPS/POPC (9/1; m/m) e dissolvidos em uma solução de clorofórmio-metanol (4:1,v:v). Posteriormente, a solução foi evaporada em N₂ até formar um filme fino aderido na parede do tubo. Esse filme foi mantido sob vácuo durante 12 h para eliminação total dos solventes. Posteriormente, o filme foi hidratado com uma solução de carboxifluoresceína (CF) 50 mM em tampão PBS 0,1 M, pH 7,2 formando vesículas multilamelares (MLVs). Durante uma hora, o filme foi submetido repetidamente a banho de 60°C, vortex e ultrassom, para que as camadas fossem quebradas e o tamanho das vesículas diminuídas. Para obter as vesículas unilamelares grandes (LUVs), as MLVs foram passadas por um extrusor contendo um filtro de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro (Avanti Polar Lipids). Para a homogeneização do tamanho das vesículas foram realizados 20 ciclos de extrusão. A solução obtida foi posteriormente aplicada em uma coluna de exclusão molecular com resina Sephadex G20 para separação da CF não encapsulada. A ação dos compostos sobre estas vesículas foi acompanhada pela liberação do fluoróforo em um espectrofluorímetro Cary Eclipse VARIAN, com comprimentos de onda ajustados em 492 nm e 517 nm, para a excitação e emissão, respectivamente.

O valor de 100% de permeabilização foi obtido pela adição do Triton X-100, o qual provoca a dissolução total das vesículas e a liberação da CF. As análises foram realizadas em triplicada a temperatura ambiente. Devido à instabilidade das vesículas, a suspensão de LUVs foi usada no mesmo dia (ROUSER et al., 1970).

4.6 Ensaios Biológicos

4.6.1 Cultura Celular

As análises foram realizadas no Laboratório de Estudos Genômicos da UNESP (IBILCE) de S.J. do Rio Preto sob responsabilidade da Profa. Paula Rahal.

Células de carcinoma de mama humano (MCF-7) e queratinócitos não tumorais imortalizados (HaCat) foram mantidos em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1x de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em garrafas de culturas plásticas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

4.6.2 Viabilidade Celular

As linhagens celulares MCF-7 e HaCat (5×10^3 células/poço) foram adicionadas em placas de 96-poços e incubadas por 24 h antes do tratamento com os compostos: sítio de clivagem-DLA, melitina e peptídeo completo. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram substituídos por 100 µL de meio de cultura DEMEM suplementado com peptídeos em concentrações de 0,100 mg/mL – 0,003125 mg/mL. Os efeitos dos compostos nas células foram determinados após 24 h, 48 h e 72h de incubação. Após o tempo determinado, os sobrenadantes foram removidos e uma solução de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; 100,0 µL) foi adicionada em cada poço e a placa incubada durante 30 min a 37°C. Após incubação com MTT os cristais formados foram solubilizados com 100 µL de DMSO (Dimetil sulfóxido) e a absorbância medida a 570 nm (Batista et al 2014).

4.7 Interação do Soro Albumina Humana

Os espectros de fluorescência do estudo de interação dos peptídeos com a proteína HSA foram registrados no equipamento Espectrofluorímetro Fluorolog-3 FL3-122 da Horiba Jobin Yvon. Os espectros de emissão foram obtidos entre 320 e 500 nm, utilizando 295 nm como comprimento de onda de excitação (triptofano) na temperatura de 25 °C. Pelos espectros de fluorescência são obtidas informações a

respeito das interações peptídeos-proteína, os quais foram testados na quantidade de $6,0 \times 10^{-9}$ mol interagindo com HSA (Sigma-Aldrich) na proporção 1:4 em um volume final de 600 μL durante 30 min.

4.7 Experimentos de Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE)/ ou Estudo de Degradação dos Peptídeos no Plasma Sanguíneo.

Para avaliar a estabilidade dos peptídeos, esses foram incubados em plasma humano e a solução final avaliada por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (CLAE) com coluna C18. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min em um programa 5-95 % solvente B (0,045% de TFA em acetonitrila) em 20 minutos.

As amostras contendo os peptídeos na concentração de 25 μM foram diluídas em uma solução (1500 μL) contendo 25 % de plasma sanguíneo heparinizado diluído em tampão PBS (pH 7,2) e incubadas a 37 °C (NGUYEN et al., 2010). Alíquotas de 200 μL foram coletadas nos seguintes tempos: 0; 0,5; 1; 3; 6 e 24 h. Para avaliar a degradação das moléculas testadas, foi feita uma comparação entre as áreas dos picos correspondentes a cada peptídeo incubado em plasma sanguíneo no tempo 0, em relação à área dos picos dos peptídeos incubados com o plasma sanguíneo nos diferentes intervalos de tempo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese de Peptídeo

5.1.1 Peptídeo WQRPSSW (DLA)

A síntese foi realizada em fase sólida utilizando a resina Rink Amida. A tabela 3 mostra as condições que foram utilizadas na síntese. A quantidade de resina pesada inicialmente foi determinada pelo seguinte cálculo: escala adotada (0,8 mmol)/grau de substituição (0,52 mmol/g).

Os reagentes de acoplamento utilizados foram HOBT/DIC. Para determinar a quantidade de HOBT necessária multiplicou-se sua massa molar pela escala e pelo excesso da síntese (153,13 g/mol x 0,8 mmol x 2 vezes) resultando em 245 mg. Para o DIC, a massa obtida foi transformada em volume.

Tabela 3 - Condições utilizadas para a síntese do peptídeo WQRPSSW.

Massa Molar = 945 g/mol	Massa Inicial = 1560 mg
Escala = 0,8 mmol	Massa Final = 3920 mg
Excesso = 2	Ganho de Massa = 2360 mg
M_{HOBT} = 245 mg	V _{DIC} = 250 µL

Fonte: Autora do trabalho

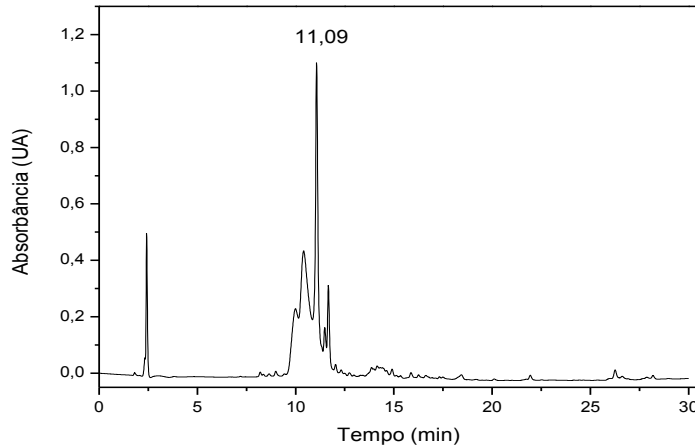
Ao final da primeira síntese, obteve-se uma massa de 3920 mg de resina, sendo assim, houve um ganho de massa de 2360 mg.

Foi realizada uma microclivagem para avaliar que o peptídeo havia sido sintetizado com sucesso. Para isso 2 mL de solução de clivagem contendo 95% de TFA; 2,5% de água; 2,5% de TIS, foi colocada em uma pequena quantidade de resina e deixou-se em agitação por duas horas. Foi adicionado éter gelado para que o peptídeo fosse precipitado e o sobrenadante foi guardado como precaução. Ao final, o peptídeo foi dissolvido com uma solução 50% A (0,045% de TFA em água ultrapura) e 50% B (0,036% de TFA em acetonitrila) e centrifugado para separar a resina.

Obteve-se uma massa de 26 mg do peptídeo bruto. O perfil cromatográfico do material obtido está apresentado na figura 5. A espectrometria de massas confirmou

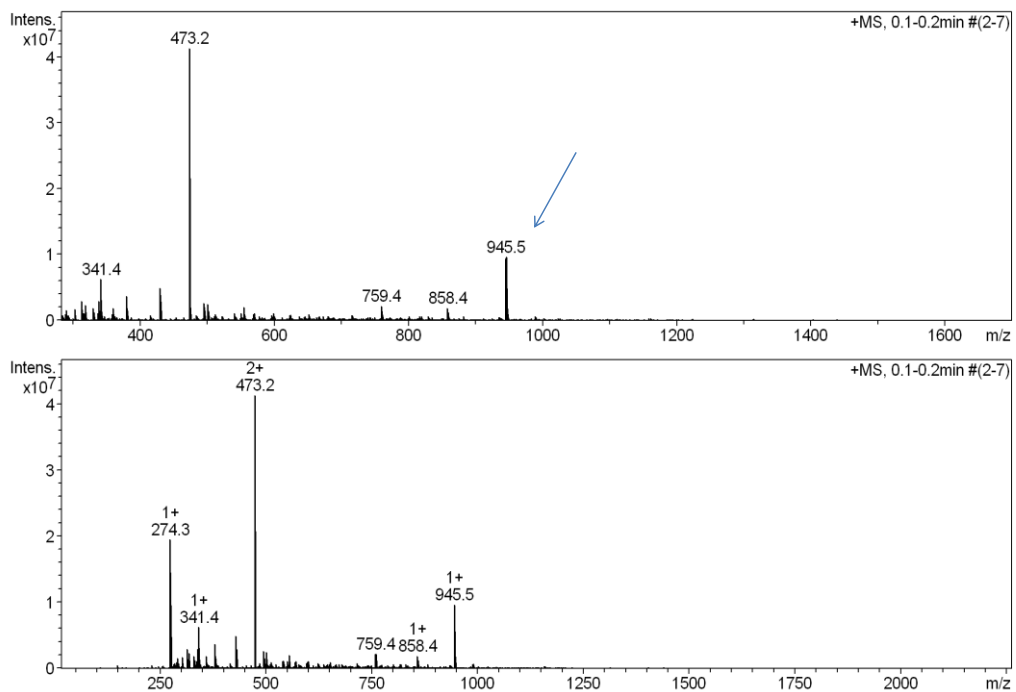
a obtenção do material esperado com massa molar 945 g/mol ($MM/z = 945$ para $Z = 1$ e 473,2 para $Z=2$), como mostra a figura 6.

Figura 5 - Perfil cromatográfico do peptídeo – DLA bruto.



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 6 - Espectro de massas referente ao peptídeo bruto – DLA



Fonte: Autora do trabalho.

5.1.2 Peptídeo RQKRSLGG-WQRPSSW

Após a caracterização do peptídeo acima, continuou-se a síntese para a obtenção do peptídeo contendo a sequência correspondente ao DLA e o sítio de clivagem enzimático (RQKRSLGG-WQRPSSW). A tabela 4 mostra as condições experimentais que foram utilizadas nesta síntese.

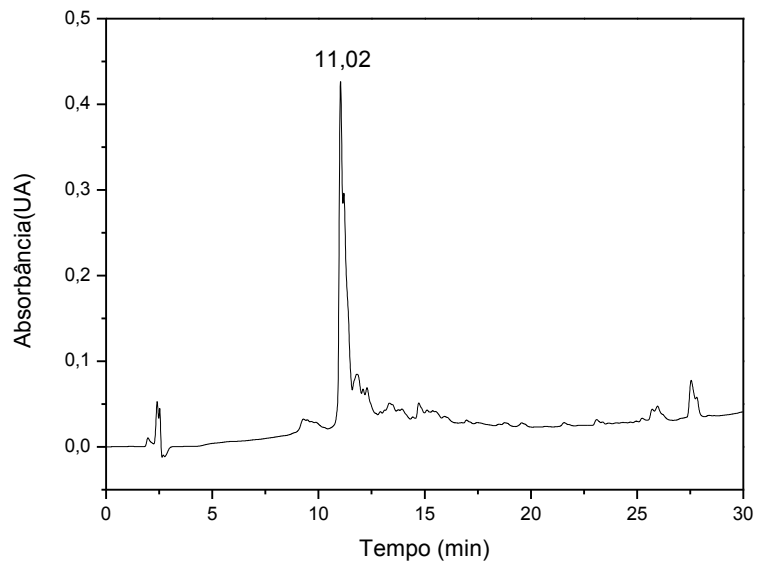
Tabela 4 - Condições utilizadas para a síntese do peptídeo WQRPSSW.

Massa Molar = 1828,05 g/mol	Massa Inicial = 882 mg
Escala = 0,4 mmol	Massa Final = 1650 mg
Excesso = 3	Ganho de Massa = 770 mg
M_{HOB}T = 183,7 mg	V _{DIC} = 190 µL

Fonte: Autora do trabalho.

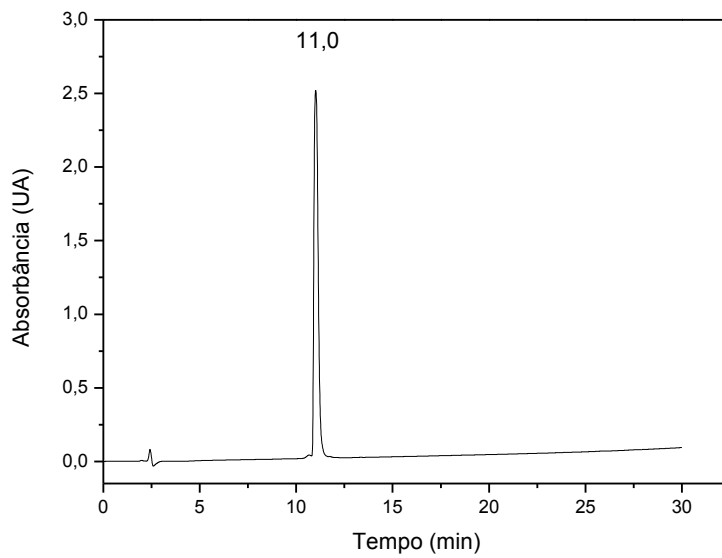
Após a síntese, uma pequena alíquota da peptidil-resina utilizada foi clivada e a massa do peptídeo bruto obtido foi de 34 mg. O perfil cromatográfico do peptídeo bruto obtido está apresentado na figura 7, sendo que o peptídeo de interesse possui tempo de retenção de 11,0 min. Após a purificação, obteve-se uma massa de 6,5 mg de peptídeo, com grau de pureza de 99,7%, de acordo com o perfil cromatográfico mostrado na figura 8. A análise por LC-MS (cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas) apresentou a massa molar do peptídeo esperado de 1828,05 g/mol (MM/z = 610,7 para Z = 3) como mostra a figura 9.

Figura 7 - Perfil cromatográfico do peptídeo Sítio de Clivagem-DLA bruto.



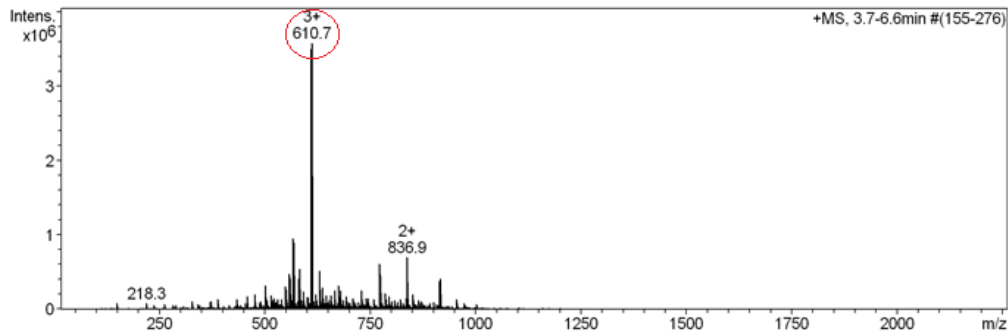
Fonte: Autora do trabalho.

Figura 8 - Perfil cromatográfico do peptídeo Sítio de Clivagem-DLA puro.



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 9 - Espectro de massas referente ao peptídeo bruto Sítio de Clivagem-DLA.



Fonte: Autora do trabalho.

5.1.3 Peptídeo melitina-sítio de clivagem-DLA

A síntese do peptídeo contendo o composto ativo foi desenvolvida por meio da síntese da Melitina (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ) na peptidil-resina obtida acima, seguindo os protocolos básicos da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS).

Nessa etapa foi utilizado inicialmente um excesso de Fmoc-aminoácidos e agentes de acoplamento de 4 vezes em relação ao número teórico de sítios reativos existentes na resina (Tabela 5).

Tabela 5 - Condições utilizadas para a síntese do peptídeo GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-Sítio de Clivagem-DLA.

Massa Molar = 4657,5 g/mol	Massa Inicial = 700 mg
Escala = 0,2 mmol	Massa Final = 895 mg
Excesso = 4	Ganho de Massa = 195 mg
M_{HOB}T = 61 e 122 mg	V_{DIC} = 70 e 140 µL

Fonte: Autora do trabalho

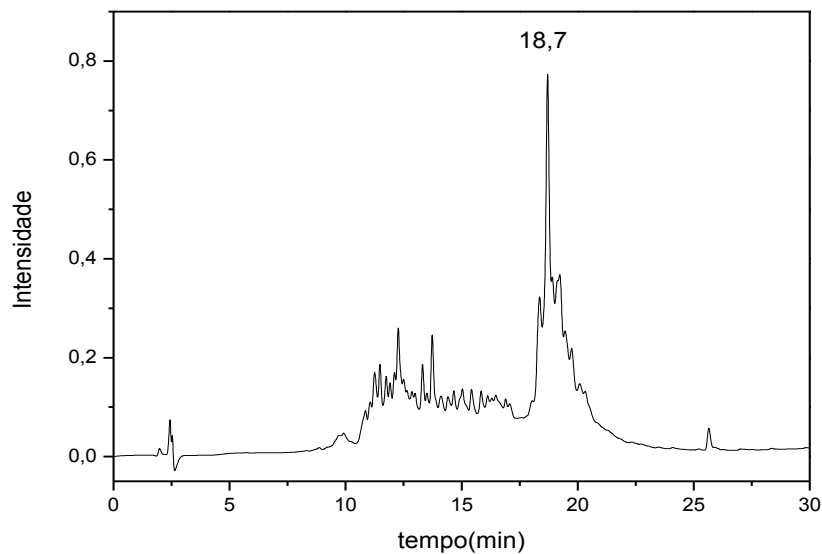
Após a clivagem de 446 mg de resina, obteve-se 137,1 mg do peptídeo bruto. A figura 10 mostra o perfil cromatográfico do peptídeo obtido.

Esta síntese não apresentou um bom resultado, pois a massa molar teórica (4674,51 g/mol) não foi observada no espectro de massas (Figura 11). O material

obtido mostrou massa molar de 4376 g/mol ($MM/z = 876,2$ para $Z = 5$), conforme indicado na figura 11.

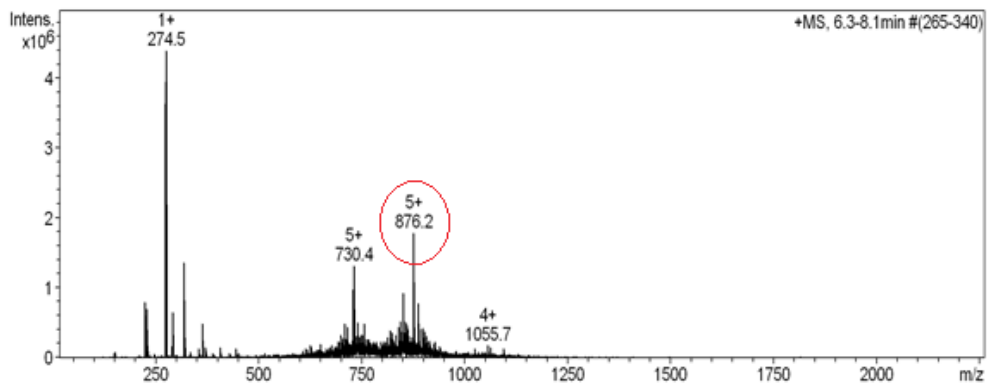
O alto grau de substituição e a baixa solvatação da resina (Rink Amida) foram, provavelmente, os motivos dos baixos rendimentos nos sucessivos acoplamentos e desproteções, impedindo assim a obtenção do peptídeo desejado.

Figura 10 - Perfil cromatográfico da síntese do conjugado de Melitina.



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 11 - Espectro de massas referente ao material bruto obtido na síntese do peptídeo contendo a melitina.



Fonte: Autora do trabalho.

5.1.4 Segunda síntese do peptídeo RQKRSLGG-WQRPSSW (SCL-DLA)

Os acoplamentos dos Fmoc-aminoácidos durante a primeira síntese descrita acima (Sítio de Clivagem-DLA) na resina Rink Amida foram dificultosos depois dos primeiros resíduos; sendo necessárias várias etapas de acoplamento. Para tentar resolver este problema, buscou-se encontrar uma resina que permitisse uma melhor solvatação dos grãos de resina e conseqüentemente favorecesse a reação de acoplamento.

Dessa forma, sintetizou-se o DLA e o sítio de Clivagem (RQKRSLGG-WQRPSSW) na resina PEG de grau de substituição de 0,23 mmol/g, menor que a resina Rink Amida anteriormente utilizada (0,52 mmol), na tentativa de contornar os problemas de síntese. O menor grau de substituição da resina PEG em relação a Rink-amida aumenta a distância entre as cadeias peptídicas, o que dificulta a agregação entre as cadeias peptídicas no interior do grão de resina (CILLI et al., 1996; CILLI et al., 1999; MALAVOLTA et al., 2002). A PEG resina também apresenta maior solvatação, promovendo o mesmo efeito acima.

Para otimizar ainda mais o rendimento, a síntese foi feita na escala 0,2 mmol e utilizou-se excesso de quatro vezes em relação à escala inicial (2 vezes anteriormente) com os agentes de acoplamento HBTU e NMM (n-metilmorfolina) em DMF (método mais eficiente que o DIC/HOBt utilizado na primeira síntese), conforme indicado na tabela 6.

Tabela 6 - Condições utilizadas para a síntese do peptídeo (RQKRSLGG-WQRPSSW).

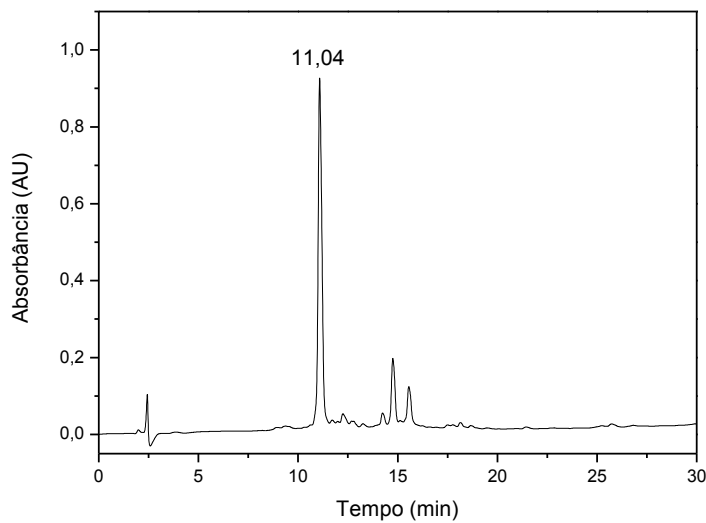
Massa Molar = 1828,05 g/mol	Massa Inicial = 900 mg
Escala = 0,2 mmol	Massa Final = 1970 mg
Excesso = 4	Ganho de Massa = 1070 mg
M_{HBTU} = 303,4 mg	NMM = 0,4 molar

Fonte: Autora do trabalho

Após a obtenção do peptídeo Sítio de Clivagem-DLA, fez-se uma microclivagem da peptidil-resina obtida para avaliação do seu perfil cromatográfico, figura 12, e de sua massa molar. O espectro de massas correspondeu a massa

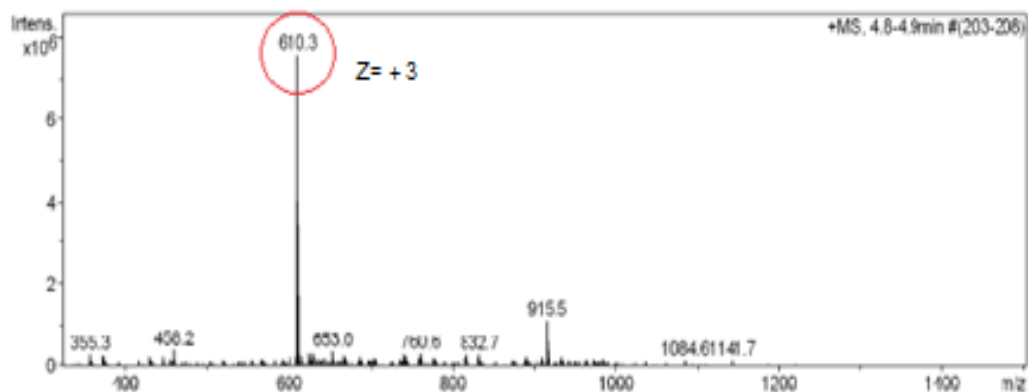
molar desejada de 1828,05 g/mol ($MM/z = 610,3$ para $Z = 3$), conforme indicado na figura 13. Podemos destacar que o perfil cromatográfico obtido apresentou o material desejado com maior grau de pureza que o da primeira síntese. Este dado mostrou que, a síntese utilizando a resina PEG foi mais eficiente.

Figura 12 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto referente ao sítio de clivagem-DLA.



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 13 - Espectro de massas referente ao peptídeo Sítio de clivagem-DLA.



Fonte: Autora do trabalho.

5.1.5 Melitina-sítio de clivagem-DLA

A síntese do peptídeo contendo a melitina foi desenvolvida novamente a partir da peptidil resina contendo o sítio de clivagem-DLA. A síntese foi realizada utilizando-se excesso de cinco vezes com os agentes de acoplamento HBTU e NMM (n-metilmorfolina) em DMF, conforme indicado na tabela 7.

Tabela 7 - Condições utilizadas para a síntese do peptídeo GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ–Sítio de Clivagem–DLA

Massa Molar = 4657,5 g/mol	Massa Inicial = 555 mg
Escala = 0,1 mmol	Massa Final = 950 mg
Excesso = 5	Ganho de Massa = 395 mg
M_{HBTU} = 189,6 mg	

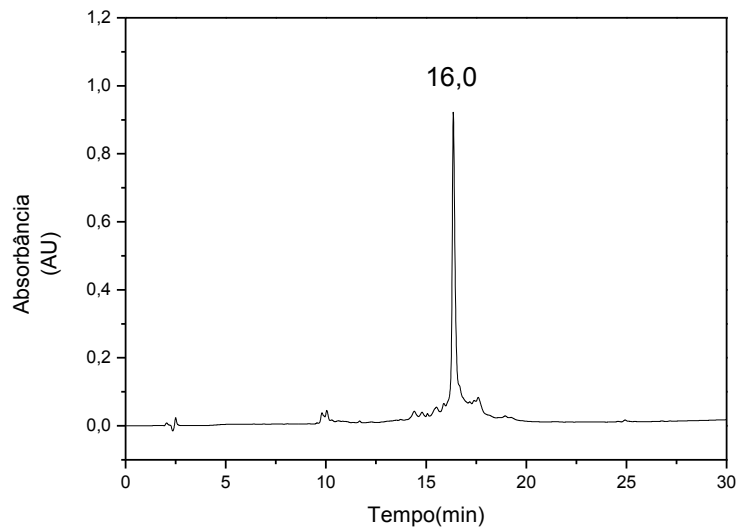
Fonte: Autora do trabalho

Após a clivagem de 475 mg de resina, obteve-se 49 mg do peptídeo bruto. A figura 14 corresponde ao perfil cromatográfico do peptídeo completo contendo melitina. Podemos observar a presença de um pico principal, mostrando a alta homogeneidade da amostra.

A massa molar obtida no espectro de massas do pico majoritário foi igual a teórica de 4657,5 g/mol ($MM/z = 777,2$ para $Z = 6$), conforme mostrado na figura 15.

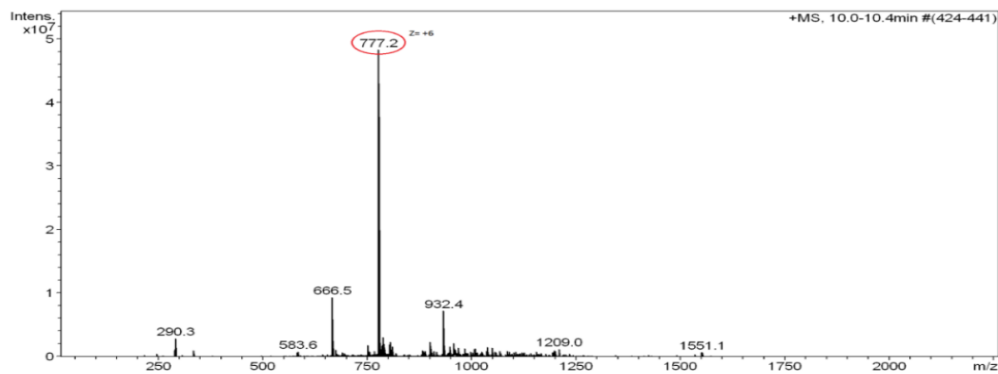
Atribuímos a diminuição do grau de substituição e a alta solvatação da resina PEG os motivos para obtenção do peptídeo desejado.

Figura 14 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto melitina acoplado ao Sítio de clivagem-DLA, com tempo de retenção de 16,0 min.



Fonte: Autora do trabalho.

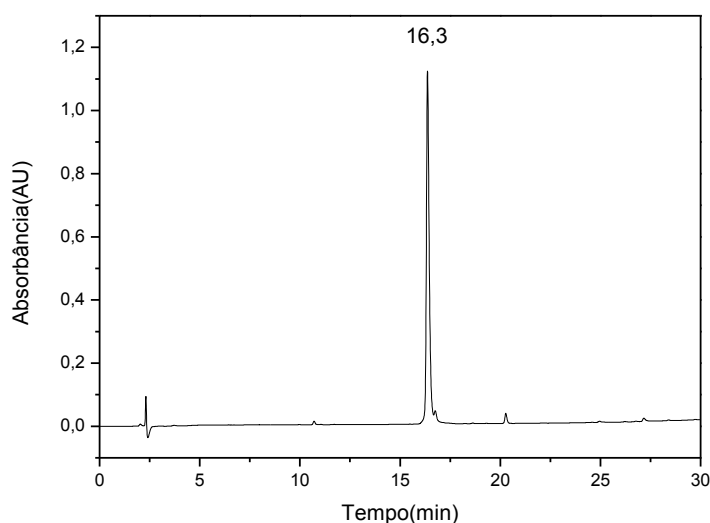
Figura 15 - Espectro de massas referente ao peptídeo puro referente à melitina- sítio de clivagem e DLA.



Fonte: Autora do trabalho.

O peptídeo bruto foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência, obtendo-se o peptídeo com alto teor de pureza (Figura 16).

Figura 16 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro melitina acoplado ao Sítio de clivagem-DLA, com tempo de retenção de 16,3 min.



Fonte: Autora do trabalho.

Desta forma, através da síntese de peptídeos em fase sólida foi possível sintetizar satisfatoriamente o peptídeo melitina-sítio de clivagem-DLA.

5.1.6 Peptídeo melitina

Para avaliar a influência do sítio de clivagem-DLA na atividade da melitina, o peptídeo melitina foi sintetizado. A síntese da melitina foi desenvolvida manualmente com a resina Rink Amida utilizando as condições descritas na tabela 8.

Tabela 8 - Condições utilizadas para a síntese do peptídeo (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ).

Massa Molar = 2846,46 g/mol	Massa Inicial = 380 mg
Escala = 0,2 mmol	Massa Final = 930 mg
Excesso = 3	Ganho de Massa = 550 mg
M_{HOBt} = 91,8 mg	V _{DIC} = 94µL

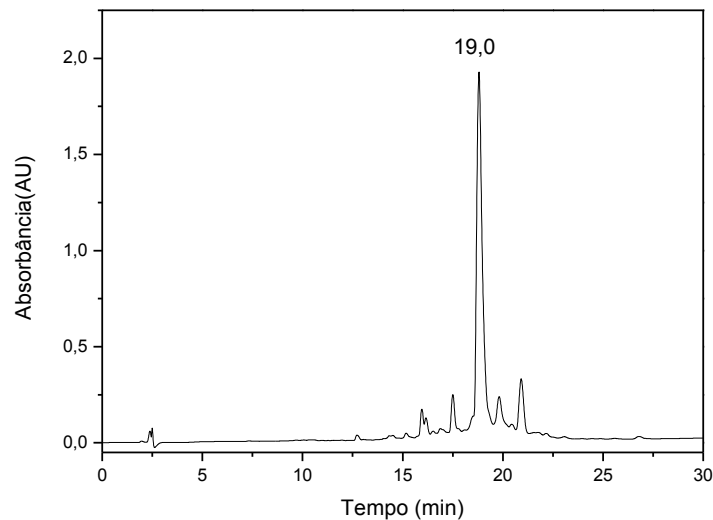
Fonte: Autora do trabalho

Ao final da síntese, obteve-se uma massa de 930 mg de peptidil resina, houve um ganho de massa de 550 mg. Uma clivagem de 500 mg foi realizada. Para isso

utilizou-se uma solução de 5 mL de solução: TFA/H₂O/TIS (4,5 mL: 0,25 mL: 0,25 mL). A massa do peptídeo bruto obtida após a clivagem foi de 182 mg.

O perfil cromatográfico do peptídeo bruto está apresentado na figura 17, sendo que o peptídeo de interesse possui tempo de retenção de 19,0 min.

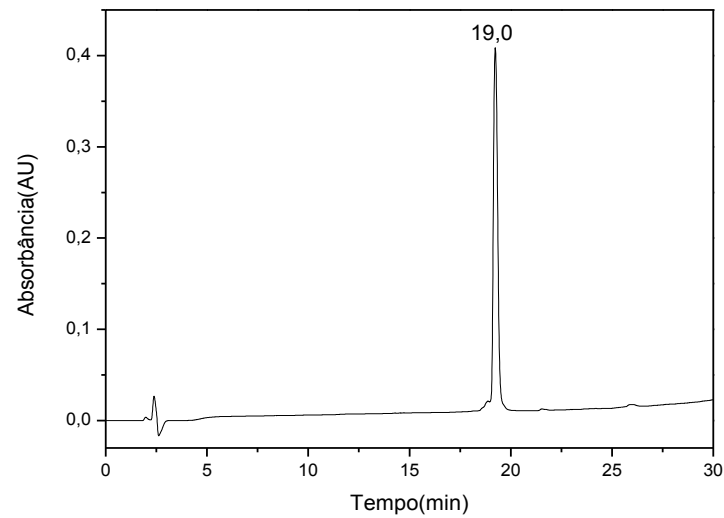
Figura 17 - Perfil cromatográfico do peptídeo melitina.



Fonte: Autora do trabalho.

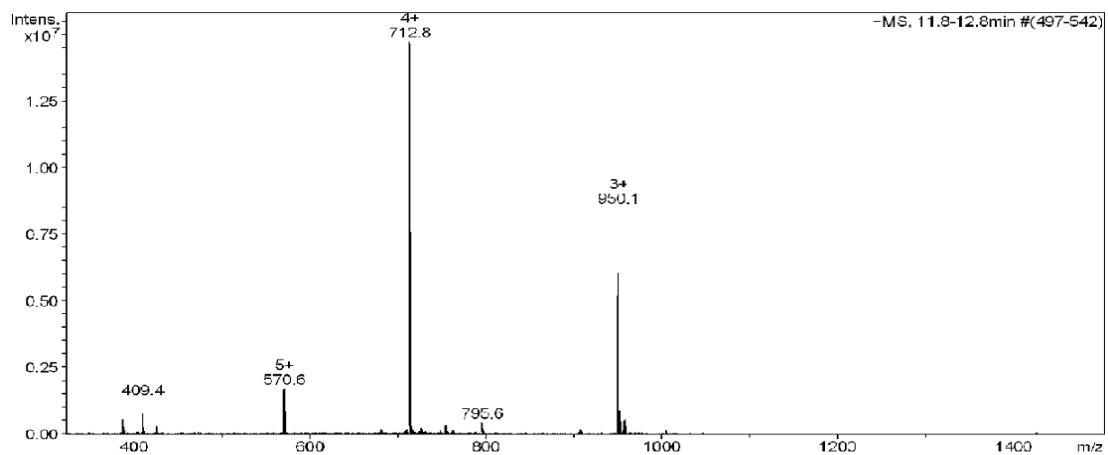
Apenas 60 mg do peptídeo bruto foram purificadas em CLAE utilizando uma coluna semipreparativa com um programa de 30 a 70% de solvente B em 120 min. As frações obtidas foram analisadas em um CLAE analítico, programa de 5 a 95% de B em 90 minutos (Figura 18). Após análise foram obtidos 25,1 mg do peptídeo de interesse com uma pureza de 99,4%, como pode ser visto na figura 18. A espectrometria de massas confirmou a massa molar do peptídeo de interesse, que é de 2846,46 g/mol ($MM/z = 712,8$ para $Z = 4$), conforme indicado na figura 19.

Figura 18 - Perfil cromatográfico do peptídeo melitina puro, com tempo de retenção de 19,0 minutos.



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 19 - Espectro de massas referente à melitina.



Fonte: Autora do trabalho.

5.2 Dicroísmo Circular

Entre os diferentes mecanismos de ação dos PATs que agem sobre a membrana das células eucarióticas, há um ponto em comum à grande parte deles: a

formação de uma estrutura tipo α -hélice anfipática quando em contato com membranas biológicas ou miméticas (FREIRE et al., 2015). Assim, a análise por dicroísmo circular (CD) contribui com informações importantes a respeito da estrutura dessas moléculas.

O CD é uma técnica espectroscópica que possibilita classificar e quantificar os tipos de estruturas secundárias presentes em moléculas opticamente ativas, como proteínas e peptídeos (AVITABILE et al., 2014).

Para avaliar a influência da ligação do sítio de clivagem-DLA na estrutura da melitina, a avaliação estrutural por dicroísmo circular foi realizada.

Os resultados, apresentados na figura 20, revelaram que em solução tampão e em vesículas de POPS/POPC o peptídeo sítio de clivagem-DLA não apresenta estrutura, possuindo um pico em torno de 200 nm característico de “random coil”. Esta composição lipídica foi utilizada para mimetizar a membrana plasmática de células normais e tumorais, sendo que POPS apresenta carga negativa. Os peptídeos melitina e o peptídeo completo apresentaram uma estrutura praticamente desorganizada, mas com um pequeno componente de α -hélice em solução tampão.

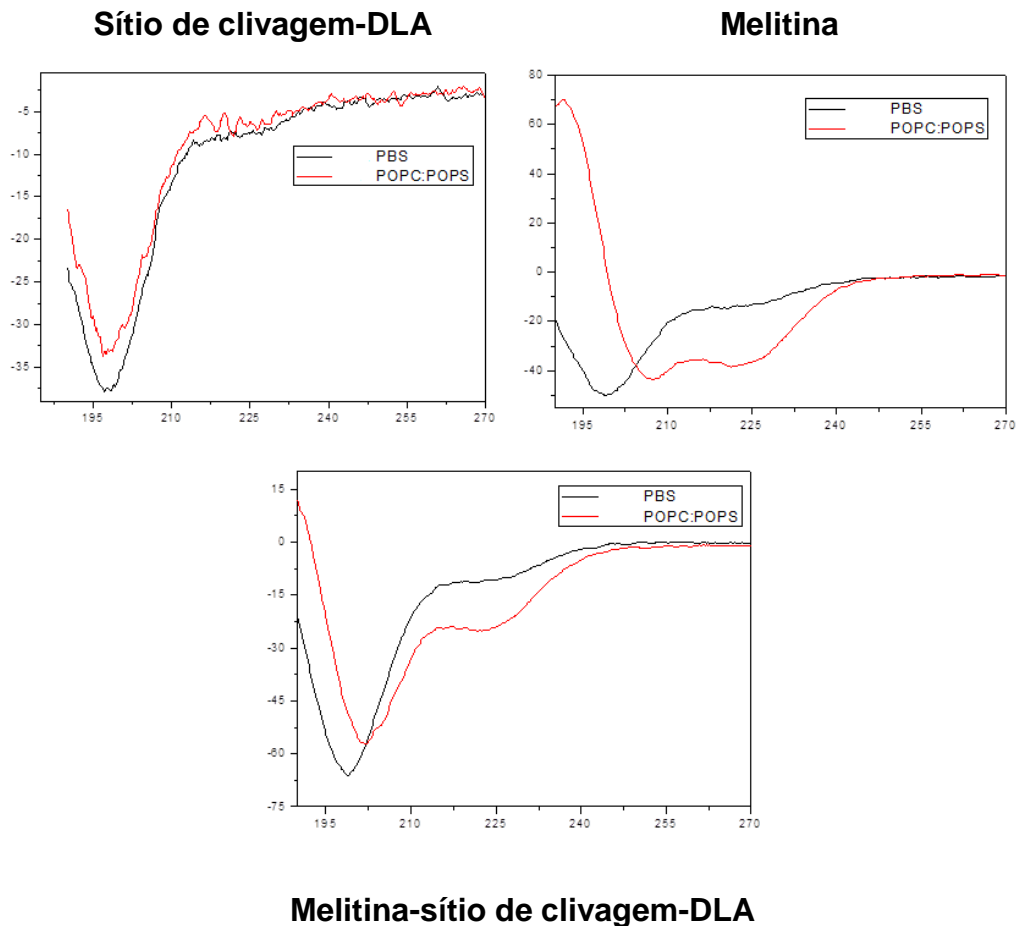
Em presença de vesículas contendo POPC:POPS os dois compostos contendo a melitina se estruturaram. No entanto, o peptídeo melitina apresentou uma estrutura praticamente em α -hélice, com bandas negativas em 208 e 222 nm e positiva em torno de 195 nm. O peptídeo completo apresentou uma mistura de componentes, principalmente em α -hélice, como pode ser evidenciado pela banda em 222 nm.

Os teores de alfa hélice calculados foram 99% e 69%, respectivamente para a melitina e para o peptídeo completo (Tabela 9). No entanto, o número de resíduos de aminoácidos nesta estrutura para a melitina ($0,99 \times 26 = 26$) é igual ao do peptídeo completo ($0,69 \times 41 = 28$), nos levando a supor que a região com a estrutura em alfa hélice é a mesma para os dois peptídeos.

Tabela 9 - Porcentagem de α -hélice dos peptídeos obtidos em POPC:POPS (9:1).

	MELITINA	MELITINA- SCL-DLA
POPC:POPS	99%	69%

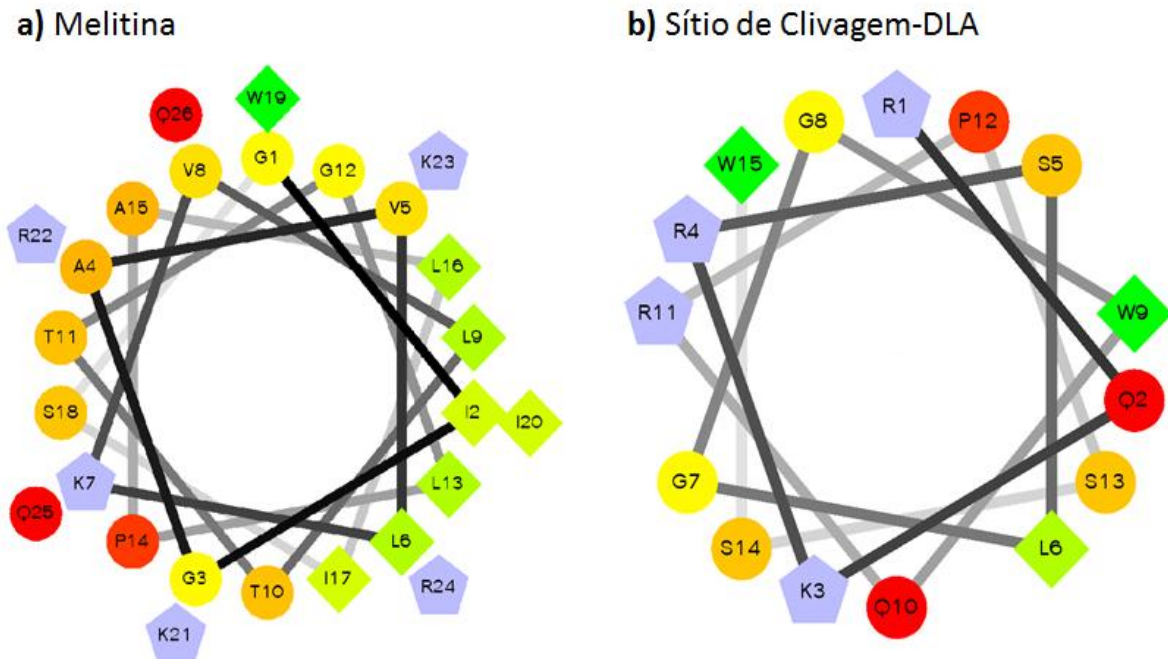
Figura 20 - Espectros de CD dos peptídeos sítio de clivagem-DLA, melitina, melitina- sítio de clivagem-DLA em solução tampão de PBS e em vesículas lipídicas de POPC/POPS.



Fonte: Autora do trabalho.

Através da análise da sequência dos peptídeos no diagrama de projeção (ARMSTRONG; ZIDOVETZKI, 2017) utilizado para ilustrar a conformação em alfa hélice, foi possível comparar a natureza anfipática das conformações secundárias dos peptídeos melitina e sítio de clivagem-DLA (figura 21). A estrutura da melitina (figura 21a) apresenta uma anfipaticidade bem definida, com exceção da região C-terminal, visto que, de um lado concentraram-se mais resíduos hidrofóbicos e de outro, resíduos hidrofílicos. O peptídeo sítio de clivagem-DLA não apresenta uma anfipaticidade bem definida, dificultando a estruturação.

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.



Fonte: Autora do trabalho.

5.3 Ensaio de Permeabilização

LUVs (vesículas unilamelares grandes) contendo um fluoróforo (carboxifluoresceína) têm sido utilizadas para estudar a seletividade e o mecanismo de ação de PATs.

A capacidade de um determinado peptídeo formar poros ou solubilizar a membrana pode ser estudada utilizando LUVs que possuem os principais lipídeos que constituem as membranas eucarióticas e de células tumorais (ESCRIBÁ et al., 2015). Um aumento gradual da permeabilização conforme o incremento da concentração de peptídeo pode significar que o mecanismo encontrado é o de formação de poros.

A formação de poros ou a ação detergente dos peptídeos pode ser determinada se ocorrer a fuga do conteúdo fluorescente das vesículas (POLOZOV et al., 1997). A liberação da carboxifluoresceína com o crescente aumento da

fluorescência do meio indica a ação dos peptídeos sobre as membranas (CESPEDE et al., 2012).

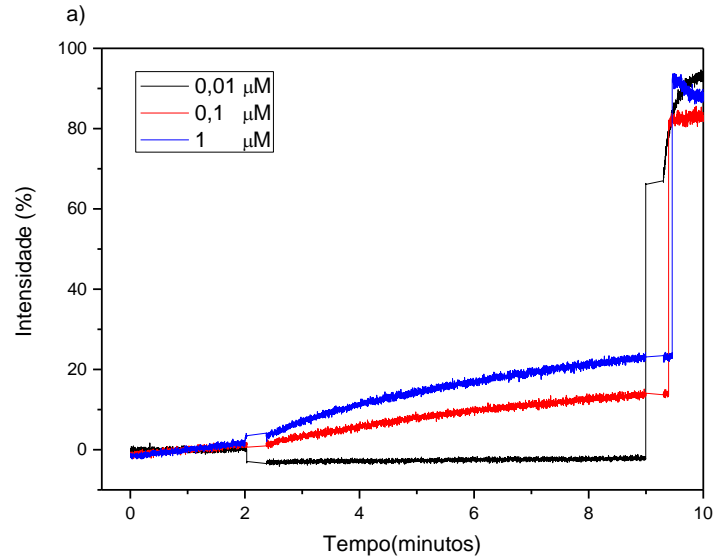
Assim, esse teste pode possibilitar informações sobre a interação peptídeo-lipídeo, especificamente no que se refere à seletividade e ao mecanismo de ação dos PATs.

Nos ensaios (Figura 22), os três peptídeos foram capazes de permeabilizar as vesículas lipídicas, no entanto, o peptídeo sítio de clivagem-DLA (figura 22a) apresentou 0%, 13% e 23% de liberação de CF, respectivamente, nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 μM . A análise desses dados indica uma baixa capacidade de permeabilização desse peptídeo sobre a membrana. O peptídeo melitina (figura 22b) exibiu porcentagens de 45%, 90%, 90%; e o peptídeo completo (figura 22c) apresentou porcentagens de 35%, 86% e 92%, respectivamente nas concentrações 0,01, 0,1 e 1 μM . Assim, os peptídeos contendo a sequência melitina tiveram comportamentos parecidos indicando que a ligação do peptídeo ao sítio de clivagem-DLA não afetou a ação da melitina e que esses atuam nas vesículas lipídicas (LEUSCHNER; HANSEL, 2004).

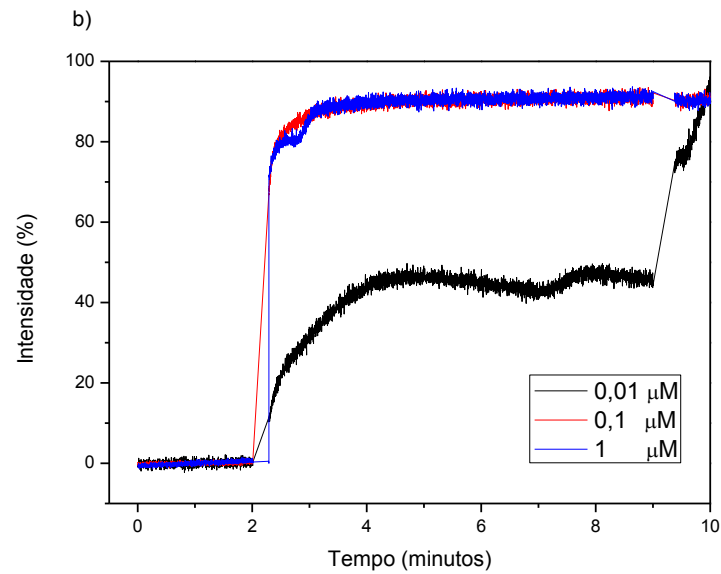
De acordo com Rex (1996) a melitina, em baixas concentrações, como 0,5 μM , foi responsável pela formação de poros em vesículas constituídas por POPC. Fato esse, que pode ser comparado com o resultado aqui obtido, onde o peptídeo melitina em pequena concentração (0,01 μM) já apresentou uma porcentagem de liberação de 45% de carboxifluoresceína, demonstrando assim, um potencial de formação de poros. Estudos indicam que interações hidrofóbicas, e também eletrostáticas, estão envolvidas na ligação peptídeo-lipídeo (LIU et al., 2016).

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).

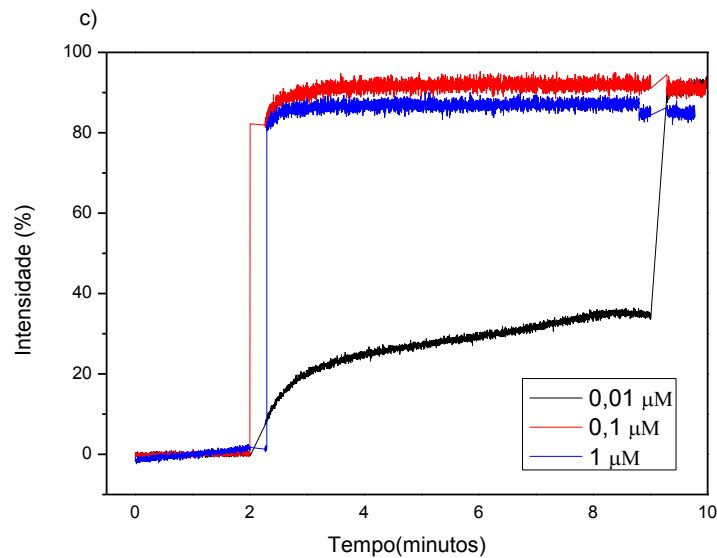
Sítio de clivagem-DLA



Melitina



Melitina-sítio de clivagem-DLA



Fonte: Autora do trabalho.

5.4 Ensaios Biológicos

5.4.1 Viabilidade Celular

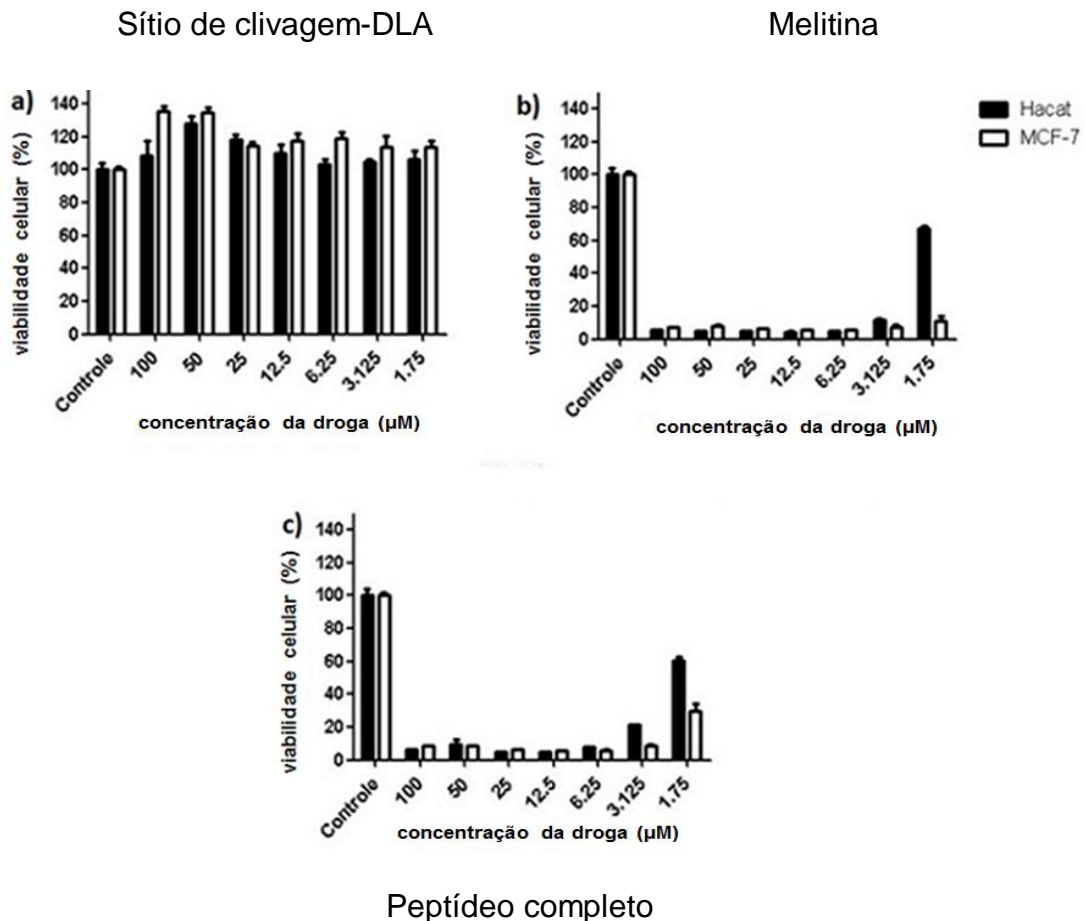
Para avaliar a atividade biológica dos peptídeos obtidos, os compostos contendo o sítio de clivagem-DLA, o peptídeo completo e somente a melitina tiveram suas atividades avaliadas contra células de câncer de mama (MCF-7) e células não tumorais de queratinócitos (HaCaT). O sítio de clivagem-DLA não mostrou atividade antitumoral, ao contrário, proporcionou um aumento na viabilidade celular (figura 23a) dos dois tipos de células. O peptídeo lítico melitina reduziu a viabilidade celular das células tumorais a 10% após 48 h de incubação (figura 23b) nas concentrações de 100 µM a 3,1 µM. A atividade antitumoral do peptídeo melitina-sítio de clivagem-DLA foi similar ao peptídeo melitina, com diminuição de 90% na viabilidade celular nas concentrações de 100 µM a 6,2 µM.

A atividade citotóxica do peptídeo completo (figura 23c) em relação à melitina (figura 23b) também foi semelhante contra as células de queratinócitos, porém o peptídeo melitina (figura 23c) mostrou uma redução da atividade na concentração 3,1 µM.

Desta forma, podemos concluir que, a avaliação da atividade antitumoral citotóxica contra células tumorais (MCF-7) e não tumorais (HaCat) indicou que

ambos os peptídeos (figura 23b e c) são ativos e similares, com diferença nas atividades em 3,1 e 1,7 μM .

Figura 23 - Atividade citotóxica dos compostos sobre células da linhagem MCF-7 e Hacet (queratinócitos não tumorais humanos) com diferentes concentrações dos peptídeos.



Fonte: Autora do trabalho.

Essa alteração na atividade dos dois peptídeos pode ser explicada pela diferença na composição lipídica entre as membranas das células tumorais e não tumorais, visto que na concentração de 1,75 μM os peptídeos apresentaram uma alta atividade contra células tumorais e uma baixa atividade contra as células normais. Enquanto os eritrócitos contêm em sua maioria fosfolipídios dipolares (zwitteriônico) na face externa, as células tumorais apresentam maior quantidade de fosfatidilserina (lipídeo negativo) (RIEDL et al., 2011), desse modo uma maior atração pelos peptídeos catiônicos.

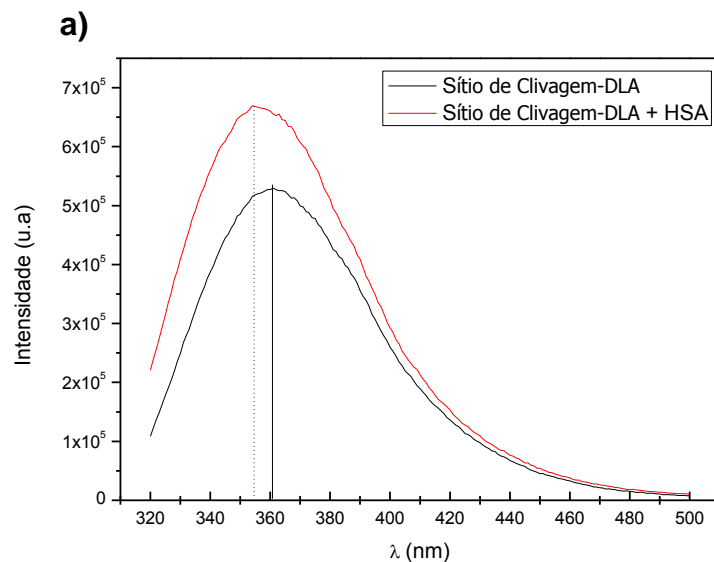
A literatura mostra uma correlação direta entre o conteúdo de α -hélice, a hidrofobicidade e a natureza anfipática, com a atividade antitumoral (RAN et al., 2002; CESPEDES et al., 2012). Os dados obtidos neste trabalho mostraram que, esta relação é mantida, os peptídeos apresentaram teor de estrutura helicoidal e atividade similares.

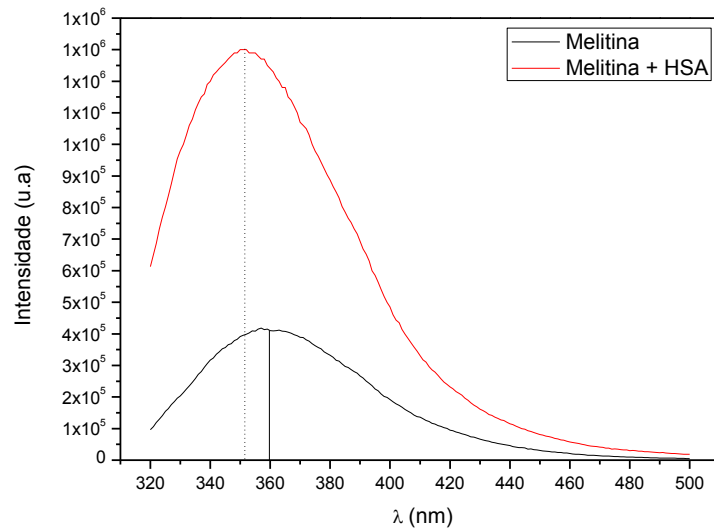
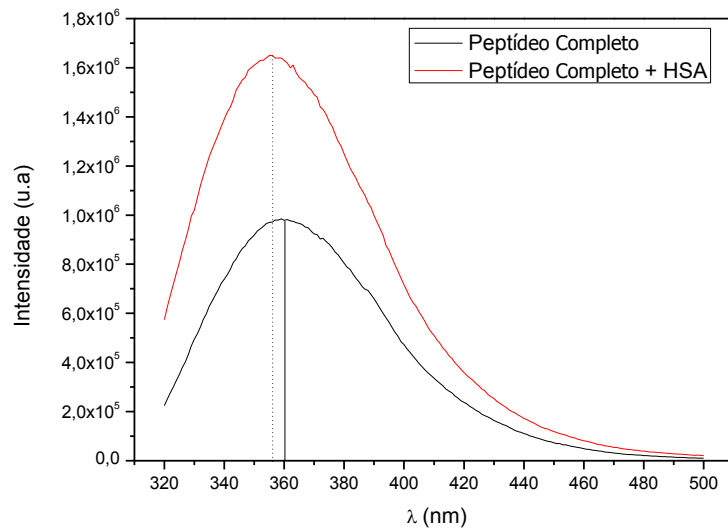
5.5 Interação peptídeo/HSA por meio da Fluorescência

Para avaliar a interação dos peptídeos com a HSA estudos de fluorescência foram realizados. Neste estudo, $6,0 \times 10^{-9}$ mol de cada um dos peptídeos foram dissolvidos em 600 μ L de tampão e incubados com 24×10^{-9} mol de HSA (1:4) durante 30 min.

Os espectros obtidos (figura 24) foram tratados e os analisados em função da intensidade e do comprimento de onda de máxima emissão.

Figura 24 - Espectros obtidos em função da intensidade e comprimento de onda de máxima emissão.



b)**c)**

Fonte: Autora do trabalho.

Como pode ser visto na Figura 24, a adição de HSA causou um aumento na intensidade de fluorescência, acompanhada por um deslocamento para o azul (blueshift) na emissão da fluorescência (redução do λ máx de emissão nos espectros de albumina), indicando uma menor exposição dos resíduos de triptofano

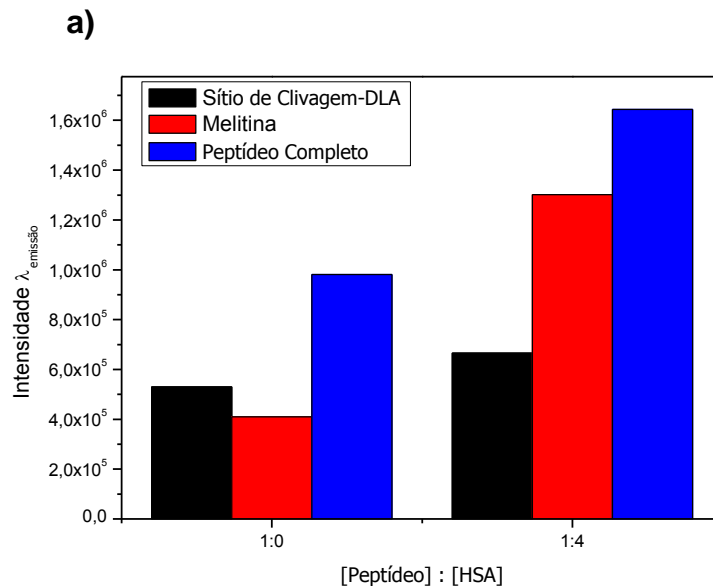
ao solvente e conseqüentemente, um aumento da hidrofobicidade devido a mudanças conformacionais durante o processo de interação (CHAKRABORTY; LEDWANI, 2016). A variação dos comprimentos de onda de máxima emissão dos peptídeos está evidenciada na tabela 10.

Tabela 10 - Variação dos λ máxima emissão dos peptídeos antes e após interagir com HSA no pH = 7,4; $\lambda_{exc.} = 280$ nm.

	Sítio de Clivagem-DLA	Melitina	Peptídeo Completo
λ máxima emissão sem HSA	362 nm	360 nm	361 nm
λ máxima emissão com HSA	354 nm	351 nm	356 nm

Fonte: Autora do trabalho.

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.



Na figura a: intensidade de emissão dos peptídeos antes e após interagir com HSA (na proporção 1:0 e 1:4) no pH = 7,4; $\lambda_{exc.} = 280$ nm.

Fonte: Autora do trabalho

Os espectros de emissão de proteínas são muitas vezes sensíveis à estrutura protéica assim como os fluoróforos são sensíveis ao ambiente que circundam,

podendo haver mudanças nos comprimentos de máxima de emissão do triptofano (VIVIAN; CALLIS, 2001).

Em nosso estudo, após a adição da macromolécula HSA, a anisotropia dos peptídeos aumentou e este efeito deve-se a uma menor difusão rotacional do complexo peptídeo-HSA em comparação com a melitina sozinha. Os espectros de emissão dos compostos estudados mostram que os resíduos de triptofano foram protegidos contra o solvente aquoso devido à ligação com a HSA. Os resíduos de triptofano são provavelmente localizado na interface entre as duas moléculas.

Interessante notar que, além da variação dos parâmetros de fluorescência, isto é interação, com os peptídeos contendo o sítio de ligação (DLA), como esperado, a melitina também apresentou interação com a HSA. Outras técnicas podem ser adotadas para avaliar as mudanças ocorridas devido ao processo de interação, tais como: ressonância magnética nuclear (RMN), anisotropia de fluorescência, espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS), química computacional e entre outras (LAKOWICZ, 2006 e CHENG; JIANG; LIU, 2013). Estas ferramentas são úteis para se estudar a estrutura, cinética de transformações estruturais e interações de macromoléculas biológicas em solução, e também caracterizar variações conformacionais associadas, por exemplo, com rotações de domínios de proteínas.

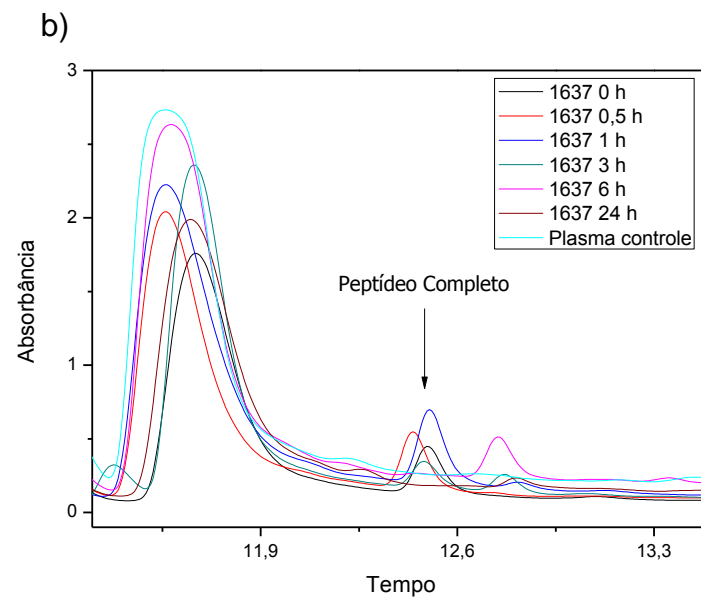
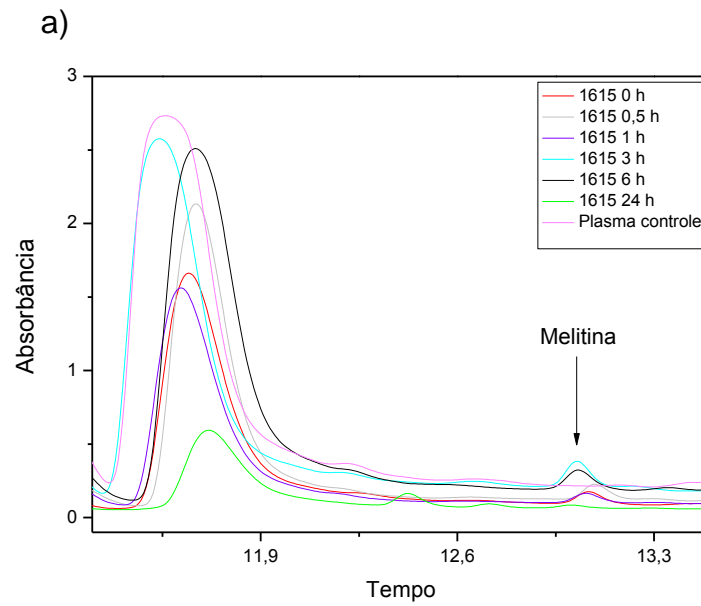
5.6 Estudos de estabilidade

Para investigar os efeitos da suscetibilidade proteolítica dos peptídeos e do efeito protetor que eventualmente a HSA estaria promovendo, os peptídeos nas concentrações de 25 μ M foram incubados em plasma humano a 37 °C e a solução obtida foi analisada por CLAE em diferentes tempos.

Os cromatogramas obtidos na incubação da melitina e do peptídeo completo são mostrados na figura 26, mostrando o desaparecimento dos picos dos peptídeos com o tempo.

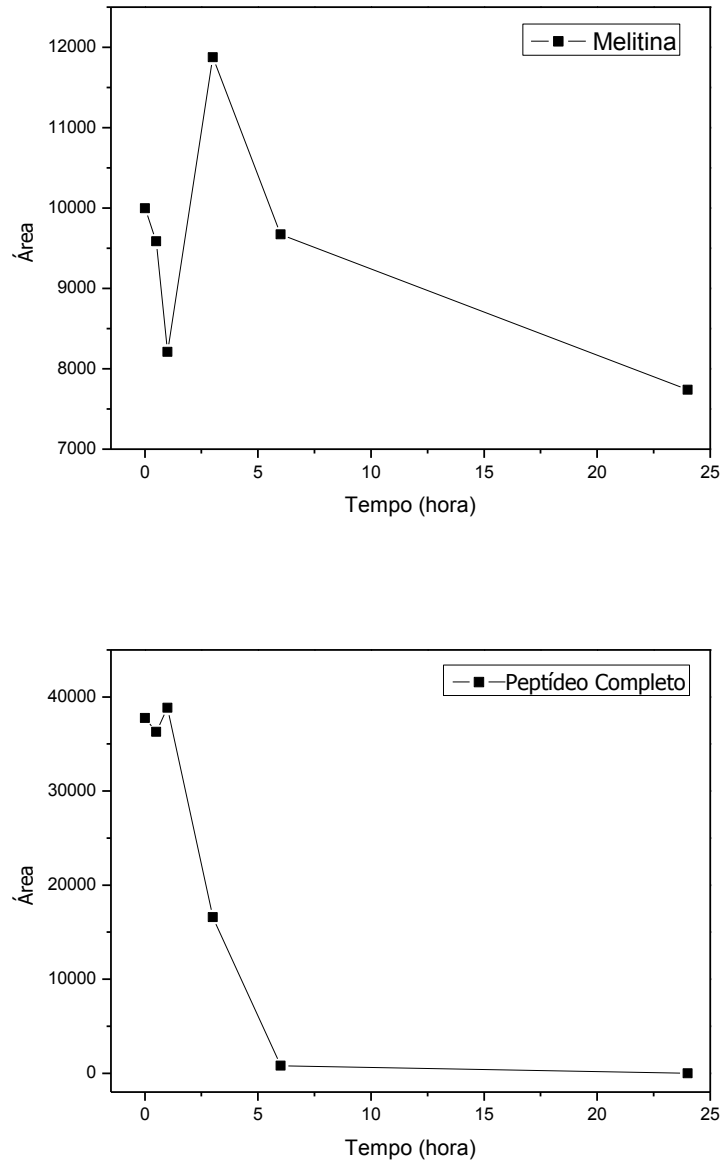
A figura 27 exhibe a variação das áreas dos picos dos dois peptídeos avaliados em função do tempo: melitina e peptídeo completo. Diferentemente do esperado, o composto melitina mostrou uma maior estabilidade.

Figura 26 - Perfis cromatográficos dos peptídeos incubados em soro. a) melitina; b) peptídeo completo.



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 27 - Estabilidade dos peptídeos melitina e peptídeo completo diluídos no plasma humano em função do tempo.



Fonte: Autora do trabalho.

A hipótese inicial era que a pequena sequência peptídica DLA se ligasse à albumina conferindo maior tempo de vida à melitina. No entanto, atribuímos a degradação do peptídeo completo, ao espaçador colocado entre esta sequência e a melitina, o que impede o efeito protetor da HSA. A estabilidade maior da melitina pode ser explicado pela interação dessa com a HSA observada anteriormente nos estudos de fluorescência.

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 μ M. 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.

DOBRYNSKA, 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**. 3 rd 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.