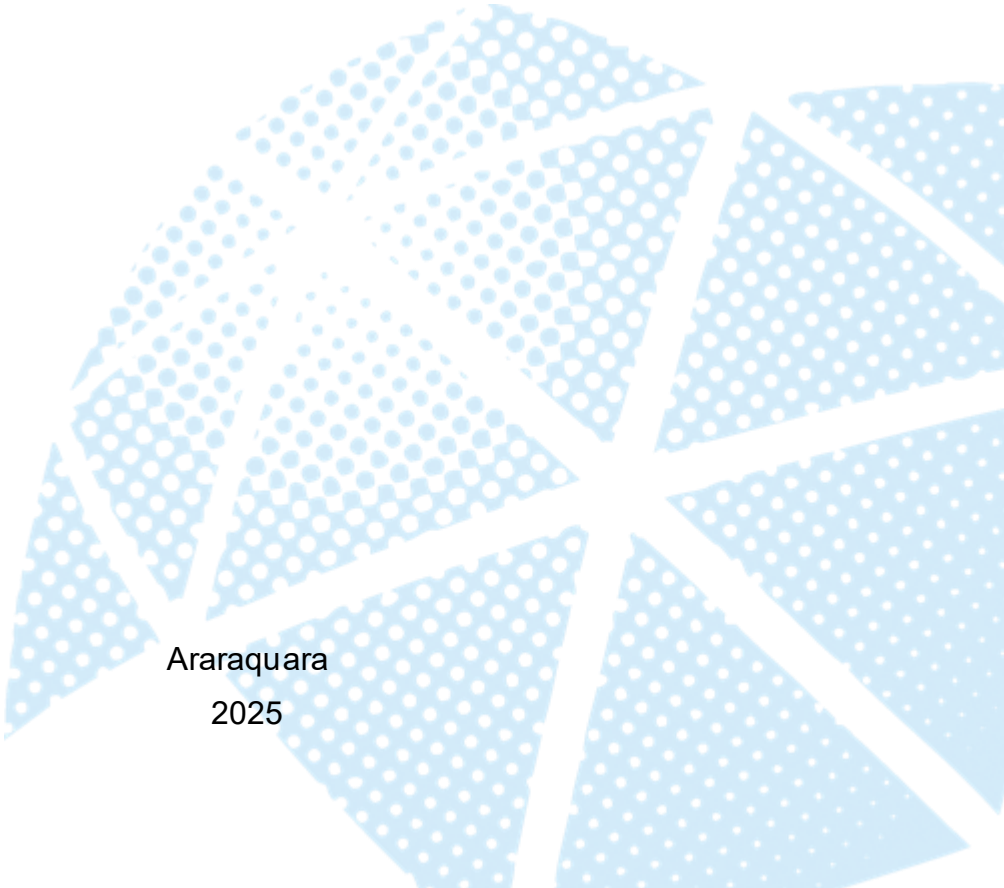


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

ARIANI RODRIGUES ARAGÃO

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DA AÇÃO ANTITUMORAL DE PEPTÍDEOS
SINTÉTICOS ANÁLOGOS À MELITINA**

Araraquara
2025



ARIANI RODRIGUES ARAGÃO

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DA AÇÃO ANTITUMORAL DE PEPTÍDEOS
SINTÉTICOS ANÁLOGOS À MELITINA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho

Araraquara

2025

A659c

Aragão, Ariani Rodrigues

Caracterização e estudos da ação antitumoral de peptídeos sintéticos análogos à Melitina / Ariani Rodrigues Aragão. -- Araraquara, 2025
51 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Norival Alves Santos Filho

1. Peptídeos. 2. Peptídeos Síntese. 3. Agentes antineoplásicos. 4.
Células cancerosas. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Espera-se que este trabalho contribua com impacto científico a partir dos resultados obtidos, auxiliando em novas pesquisas com o objetivo de se desenvolver novos agentes mais efetivos no tratamento de câncer, que é uma das maiores causas de morte no mundo e que dessa forma, futuramente, possa gerar impacto social, visando melhorar a qualidade de vida de pacientes oncológicos, que muitas vezes é afetada devido aos tratamentos pouco seletivos. Além disso, ao abordar a síntese e estudos de moléculas que futuramente possam contribuir para a produção de fármacos, o trabalho tem potencial impacto econômico. O impacto esperado para este trabalho se relaciona com o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 ONU, número 3, Saúde e Bem-Estar e número 9, Indústria, Inovação e Infraestrutura.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Based on the obtained results, this work is expected to make a scientific contribution by supporting future research aimed at developing more effective agents for the treatment of cancer, which remains a leading cause of death worldwide. Consequently, it aims to generate future social impact by improving the quality of life of cancer patients, which is often compromised by the low selectivity of current treatments. Furthermore, by addressing the synthesis and study of molecules that could contribute to pharmaceutical production, this work holds potential economic impact. The potential impact of this study aligns with the UN Agenda 2030 Sustainable Development Goals (SDGs), specifically Goal 3 (Good Health and Well-being) and Goal 9 (Industry, Innovation, and Infrastructure).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Caracterização e estudos da ação antitumoral de peptídeos sintéticos análogos à Melitina

AUTORA: ARIANI RODRIGUES ARAGÃO

ORIENTADOR: NORIVAL ALVES SANTOS FILHO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **NORIVAL ALVES SANTOS FILHO**
Data: 06/01/2026 17:35:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. NORIVAL ALVES SANTOS FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / UNESP / Câmpus de Araraquara - IQAr

Prof. Dr. RENATO JOSÉ DA SILVA OLIVEIRA (Participação Virtual)
Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular / Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

Profa. Dra. MARIANA BARROS DE CERQUEIRA E SILVA (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Araraquara, 19 de dezembro de 2025.

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	ARIANI RODRIGUES ARAGÃO 17/08/2001
Nacionalidade	brasileira
Nome em citações bibliográficas:	Aragão, Ariani Rodrigues Aragão, A.R. Aragão, Ariani R.
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Departamento de Bioquímica e Química Orgânica Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900 Telefone: (16) 3301-9539
Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/0801791288098834
ORCID	https://orcid.org/0000-0002-3055-0447
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
2019/2023	Bacharelado em Química Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	
DE ABREU FERNANDES, PAULA; DE LIMA FONTES, MARINA; NUNES, LETÍCIA OLIVEIRA CATARIN; ARAGÃO, ARIANI RODRIGUES; SALVADOR, LARA CERAZI; BRANDÃO, SARAH TOLENTINO ROCHA; FILHO, NORIVAL ALVES SANTOS; DA SILVA BARUD, HERNANE. New updates on peptides and peptide-based biopolymeric materials: medical, pharmaceutical and sensors applications. JOURNAL OF MOLECULAR LIQUIDS, v. 436, p. 128177, 2025. SANTOS, ISABELA C. DOS; ROMANAZZI, MARCELA; MALACHIAS-PIRES, GEOVANNA M.; ARAGÃO, ARIANI R.; FILARDI, ELOISE T. M.; MELO-DOS-SANTOS, GUILHERME; SALVADOR, LARA C.; CERVEJA, MARCOS F.; ROCHA, ANDERSON M.; MAGALHÃES, ANANDA; DE OLIVEIRA, ISADORA S.; ALMEIDA, JOSÉ R.; SANTOS-FILHO, NORIVAL A.; PUCCA, MANUELA B. Phospholipases A2 (PLA2s) and Related Peptides from Bothrops Snake Venoms: History, Structure, Pharmacology, and Inhibitors. BIOMOLECULES, v. 15, p. 1583, 2025.	
PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS	

48TH ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN BIOPHYSICAL SOCIETY, (São Paulo). Synthesis and characterization of the antitumor potential of peptides analogs to Melittin. 2024. (Congresso).

XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOLOGIA CELULAR, (São Paulo). Characterization of the antitumor potential of peptides analogs to peptide (p-BthTX-I)₂. 2024. (Congresso).

AGRADECIMENTOS

A parte mais importante deste trabalho são as pessoas. Não se faz nada sozinho, inclusive ciência. Por isso, agradeço a todos que fizeram e fazem parte da minha jornada acadêmica.

Aos meus pais, Arlete e César, por sempre me apoiarem e respeitarem minhas decisões.

À minha família, em especial ao meu parceiro Luiz, aos meus avós Jonas e Noêmia, ao meu irmão Mateus, à minha cunhada Karen e ao meu sobrinho Otávio, por serem uma válvula de escape nos momentos ruins e por me motivarem sempre.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Norival, que me deu a oportunidade de participar do LEPepBio e, mais do que isso, me orientou e incentivou por diversas vezes durante esses anos de parceria.

Às minhas amigas do grupo de pesquisa LEPepBio, por toda a ajuda de sempre. Vocês contribuem para que o laboratório seja, para além de um espaço de produção científica, um lugar para desabafar e escapar da correria que é a vida na pós-graduação.

Ao Labiocel, grupo da Prof.^a Dra. Valéria Valente, pela oportunidade de testar as moléculas na prática e, acima de tudo, por me fazer sentir acolhida em um novo espaço. Agradeço também ao Oncofly, do Prof. Dr. Carlos Couto Lima, grandes parceiros que se tornaram amigos.

Aos meus queridos amigos Gabriela, Junior, Gabriel, Guilherme e Luiz Eduardo, por serem pessoas com quem posso sempre contar para desabafar, me divertir, desacelerar e voltar ao trabalho renovada.

Aos funcionários do Instituto de Química e do Departamento de Análises Clínicas.

Todos contribuíram de alguma forma para este trabalho, alguns cientificamente, outros humanamente; o fato é que, se não fosse por cada um de vocês, nada disso seria possível!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Depois do medo, vem o mundo.”

(Clarice Lispector)

RESUMO

O câncer é uma das maiores causas de morte no mundo atualmente e um grande desafio, visto que as terapias tradicionais como quimioterapia e radioterapia causam diversos efeitos colaterais, além do desenvolvimento de resistência celular. Dessa forma, a busca por agentes antitumorais mais efetivos é crescente e os peptídeos antitumorais surgem como alternativas interessantes, sendo ferramentas promissoras na pesquisa. Um peptídeo bem descrito na literatura, derivado do veneno da abelha europeia *Apis mellifera*, chamado Melitina, possui ação antitumoral, porém, não é seletivo, ou seja, apresenta toxicidade tanto para células normais como tumorais, bem como capacidade hemolítica em baixas concentrações, o que impede a sua implementação clínica. Por essa razão, o desenho de peptídeos análogos com o intuito de se obter moléculas mais seletivas e com atividades comparáveis é uma alternativa de pesquisa. Dessa forma, o presente trabalho avaliou a ação antitumoral e a toxicidade da Melitina e dos análogos MCF, MCFA e TT-1, bem como, de novos análogos desenhados a partir de desenho racional de moléculas, com o intuito de se obter um agente anticâncer seletivo, com menor toxicidade contra os eritrócitos e células normais. Para tanto, os peptídeos Melitina, MCF, MCFA, TT-1, FKW e WKW foram sintetizados por síntese de peptídeos em fase sólida, purificados por cromatografia líquida de alta eficiência, caracterizados por espectrometria de massas e analisados em relação a viabilidade celular pela técnica MTT e sobrevivência clonogênica. Os peptídeos foram sintetizados e caracterizados com eficiência, e a partir dos resultados obtidos nos ensaios de atividade hemolítica e viabilidade celular, demonstraram menor toxicidade em linhagem não tumoral em comparação à Melitina, pelo ensaio clonogênico, foi observado que o tratamento com os peptídeos não altera de forma significativa a formação de colônias das linhagens testadas. Dessa forma, as modificações realizadas resultaram em peptídeos expressivamente menos tóxicos para células saudáveis que a molécula original e os peptídeos FKW e WKW apresentaram o melhor potencial. Espera-se que os resultados possam contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos mais efetivos para o tratamento de câncer.

Palavras-chave: peptídeos; peptídeos-síntese; agentes antineoplásicos; células cancerosas.

ABSTRACT

Cancer is currently one of the leading causes of death worldwide and represents a major challenge, as traditional therapies such as chemotherapy and radiotherapy cause severe side effects and lead to the development of cellular resistance. Therefore, the search for more effective antitumor agents is increasing, and anticancer peptides have emerged as interesting alternatives, representing promising tools in research. Melittin, a well-described peptide, derived from the venom of the European honeybee *Apis mellifera*, possesses antitumor activity. However, it lacks selectivity, exhibiting toxicity toward both normal and tumor cells, as well as hemolytic capacity at low concentrations, which prevents its clinical implementation. For this reason, the design of peptide analogues aimed at obtaining more selective molecules with comparable activities represents a viable research strategy. Thus, the present study evaluated the antitumor activity and toxicity of Melittin and the analogues MCF, MCFA, and TT-1, as well as new analogues developed through rational molecular design, aiming to obtain a selective anticancer agent with reduced toxicity against erythrocytes and normal cells. To this end, the peptides Melittin, MCF, MCFA, TT-1, FKW, and WKW were synthesized using solid-phase peptide synthesis, purified by high-performance liquid chromatography, characterized by mass spectrometry, and analyzed for cell viability using the MTT assay and clonogenic survival. The peptides were efficiently synthesized and characterized. Results from hemolytic activity and cell viability assays demonstrated lower toxicity in non-tumor cell lines compared to Melittin; however, the clonogenic assay indicated that treatment with the peptides did not significantly alter colony formation in the tested cell lines. In conclusion, the structural modifications resulted in peptides that were significantly less toxic to healthy cells than the original molecule, with the FKW and WKW peptides exhibiting the greatest potential. These results are expected to contribute to the development of new, more effective drugs for cancer treatment.

Keywords: peptides; peptides-synthesis; antitumor agents; cancer cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de síntese por síntese de peptídeos em fase sólida.....	21
Figura 2: <i>Helical wheel</i> dos peptídeos gerados utilizando HeliQuest, resíduos hidrofóbicos em amarelo, serina e treonina em roxo, resíduos básicos em azul e glutamina em rosa. As setas representam a direção e a magnitude do momento hidrofóbico. O resíduo marcado com 'N' indica o final do N-terminal e o marcado com 'C' indica o final do C-terminal. Abaixo, predição das estruturas geradas utilizando PEP-FOLD4. As regiões helicoidais estão indicadas em vermelho e as regiões de potencial desordem em verde.....	28
Figura 3: Modificações realizadas nas sequências de aminoácidos. Em vermelho estão destacadas as substituições dos resíduos de aminoácidos.	29
Figura 4: Perfis cromatográficos dos peptídeos brutos Melitina, TT-1, FKW, WKW, MCF e MCFA em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solução B em 30 minutos.	32
Figura 5: Perfis cromatográficos dos peptídeos puros Melitina, TT-1, FKW, WKW, MCF e MCFA em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solução B em 30 minutos.	34
Figura 6: Espectros de massas dos peptídeos Melitina, TT-1, FKW, WKW, MCF e MCFA.....	37
Figura 7: Ensaio de atividade hemolítica, nas concentrações de peptídeo de 1 a 512 µg/mL.	38
Figura 8: Números absolutos de incidência e mortalidade de cânceres no mundo em 2022.	40
Figura 9: Avaliação da viabilidade celular das linhagens MRC-5, A549, MCF-7 e MDA-MB-231 em 24h de tratamento com os peptídeos, nas concentrações de 1 a 128 µg/mL.	43
Figura 10: Ensaio clonogênico para as linhagens celulares MRC-5, A549, MCF-7 e MDA-MB-231, nas concentrações de IC50 da Melitina.....	46

LISTA DE SÍMBOLOS

Aminoácidos

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Cys	Cisteína
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS	20
3.2 DESENHO DE NOVOS PEPTÍDEOS	21
3.3 PURIFICAÇÃO	22
3.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	22
3.5 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	22
3.6 CULTURA CELULAR	23
3.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	23
3.8 ENSAIO CLONOGÊNICO	24
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	26
4.1 SÍNTESE, DESENHO E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	26
4.2 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	34
4.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	37
4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	39
4.5 ENSAIO CLONOGÊNICO	44
5 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O câncer pode ser compreendido através de fatores genéticos e epigenéticos, além de fatores ambientais, que afetam o desenvolvimento normal das células, ocasionando mutações e proliferação desordenadas. As neoplasias podem ocorrer em qualquer tecido do corpo, existindo diversos tipos diferentes (Almeida *et al.*, 2005, Hanahan, 2022).

As causas de morte envolvendo o câncer estão associadas à metástase, que é o crescimento desordenado de células anormais de um tecido, apresentando capacidade de invasão de outros tecidos e órgãos por meios de vasos sanguíneos e linfáticos (Kalita; Saviola; Mukherjee, 2021).

As neoplasias são consideradas um dos maiores problemas de saúde pública do mundo no século XXI, sendo a segunda maior causa de morte (Wu; Xia; Lin, 2024). Nesse sentido, em 2022 ocorreram cerca de 20 milhões de novos casos de câncer, além de 9.7 milhões de mortes, considerando os casos de câncer de pele não melanoma. Mundialmente, em 2022, o câncer de pulmão foi o mais incidente, sendo responsável por 2.5 milhões de casos, seguido dos cânceres de mama feminino, colorretal, próstata e estômago. O câncer de pulmão também foi o de maior mortalidade, estimando 1.8 milhões de mortes, seguido dos cânceres colorretal, fígado, mama feminino e estômago (Bray *et al.*, 2024).

No Brasil, as estimativas indicam cerca de 704 mil novos casos de câncer por ano, para o triênio de 2023 a 2025, considerando os casos de câncer de pele não melanoma, o tipo estimado como mais incidente, com 220 mil novos casos, configurando 31,3% de todos os casos estimados, seguido pelos cânceres de mama, próstata, colorretal, pulmão e estômago (INCA, 2023).

As estimativas mostram que, mundialmente, uma em cada cinco pessoas vão desenvolver câncer ao longo de sua vida, enquanto um em cada nove homens e uma em cada doze mulheres morrerão por esse motivo (Bray *et al.*, 2024). As previsões apresentadas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) em 2024, indicam que até 2050 a incidência de novos casos alcançará 35 milhões, representando um aumento de 77% nos novos casos, quando comparado ao registrado no ano de 2022.

Essa estimativa aumenta a necessidade por ferramentas e métodos de controle da propagação do câncer, como investimentos em prevenção, detecção precoce da

doença, tratamentos eficazes e cuidados paliativos, incluindo maior atenção aos principais fatores de risco como o envelhecimento, tabagismo, uso de álcool e alimentação pouco saudável (Instituto Nacional de Câncer, 2023).

A definição dos tratamentos contra os diversos tipos de neoplasias está associada a um diagnóstico correto e rápido. As terapias mais usuais são a quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e cirurgia, podendo haver combinação de duas ou mais (Offor; Piater, 2023).

Na quimioterapia, utiliza-se compostos químicos que acometem as células cancerígenas. Porém, este tratamento possui baixa seletividade, ou seja, atinge também as células normais, gerando diversos efeitos colaterais que podem comprometer a qualidade de vida do paciente, além da possibilidade de induzir quimiorresistência (Aljabery, *et al.*, 2018).

A radioterapia, apesar de menos invasiva, também pode resultar em efeitos colaterais sérios, como deficiências hormonais. A imunoterapia, por outro lado, é um tratamento mais seletivo e com menos efeitos colaterais quando comparado à quimioterapia e radioterapia, porém, pode ocasionar alterações no sistema imune (Kalita; Saviola; Mukherjee, 2021).

Um dos maiores desafios e limitações do tratamento de câncer é o desenvolvimento de células cancerígenas resistentes às drogas utilizadas e efeitos adversos, que tornam a vida do paciente ainda mais complicada (Ghadiri *et al.*, 2024). Dessa forma, é crescente a pesquisa de novos agentes anticâncer mais efetivos, como por exemplo a utilização de peptídeos bioativos, que surgem como uma alternativa aos tratamentos tradicionais contra o câncer.

Peptídeos bioativos

Os peptídeos bioativos são moléculas que podem ser encontradas em diversos organismos, como animais, plantas, bactérias, além de estarem presentes na composição de venenos de animais como aranhas, serpentes, escorpiões e abelhas (Majc *et al.*, 2022), possuindo uma variedade de atividades de interesse farmacológico, como atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral, entre outros (Kordi *et al.*, 2023). O primeiro peptídeo terapêutico, a Insulina, foi introduzido em 1922 para o tratamento de diabetes tipo 1, desde então, existem mais de 80 fármacos peptídicos utilizados no tratamento de inúmeras doenças (Muttenthaler *et*

al., 2021). Um outro exemplo de fármaco derivado de peptídeos é o anti-hipertensivo Captopril, produto de um peptídeo potencializador da bradicinina (BPP) derivado do veneno da *Bothrops jararaca*, uma serpente brasileira (Cushman; Ondetti, 1991; Ferreira, 1965). O Captopril é o primeiro medicamento à base de toxinas animais a ser aprovado pela FDA (*Food and Drugs Administration*) em 1981, sendo a molécula mais utilizada no mundo para o tratamento de hipertensão.

Nessa classe de peptídeos bioativos, existem os peptídeos antitumorais (ACPs, do inglês, *anticancer peptides*) moléculas pequenas, que possuem caráter catiônico e anfipático (Kordi *et al.*, 2023; Qu *et al.*, 2024).

As células normais diferem das células cancerígenas em relação a constituição da membrana celular. As células normais possuem maior quantidade de fosfolipídios em forma zwitteriônica, como a fosfatidilcolina, na camada externa, além disso, possuem fosfatidilserina em forma aniônica na camada interna. Já as células cancerígenas, possuem maior quantidade de fosfolipídios carregados negativamente, como a fosfatidilserina, que é de 3 a 7 vezes maior que em células normais. Ademais, também possuem outras moléculas aniônicas como mucinas O-glicosiladas, gangliosídeos sialilados e sulfato de heparana, que são superexpressas em células tumorais e estão associadas à ocorrência e progressão de tumores, também são responsáveis por aumentar a carga negativa (Qu *et al.*, 2024). Como os ACPs são moléculas catiônicas, no geral, possuem mais seletividade às células cancerígenas, visto que a atração inicial ocorre através da interação eletrostática com os fosfolipídios negativamente carregados presentes na membrana celular (Ghadiri *et al.*, 2024; Kordi *et al.*, 2023).

Como citado anteriormente, peptídeos bioativos, bem como antitumorais, podem ser encontrados em venenos animais. Entre estes, podemos citar o veneno da abelha europeia *Apis mellifera*, o qual é uma mistura complexa de diversos componentes, como peptídeos, proteínas, fosfolipídios, entre outros (Pucca *et al.*, 2019). A Melitina, principal componente desse veneno, é bem descrita na literatura como um peptídeo composto por 26 resíduos de aminoácidos, de sequência GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-CONH₂, com caráter catiônico, anfipático, solúvel em água, e estrutura α -helicoidal (Rady *et al.*, 2017).

Estudos anteriores descrevem a Melitina como uma molécula com atividade antibacteriana, antiparasitária, antiviral, anticancerígena, antifúngica, anti-biofilme, anti-inflamatória, dentre outras ações (Adade, 2013; Lee, Bae, 2016; Picoli *et al.*, 2017;

Sattayawat *et al.*, 2025; Skalickova, 2015; Zhang *et al.*, 2024). Em relação à ação anticancerígena, a Melitina já demonstrou efeitos inibitórios em diversas linhagens celulares de cânceres, como leucemia, de ovário, pulmão, próstata, renal, entre outros (Ghadiri *et al.*, 2024).

O principal mecanismo de ação proposto para essa molécula está associado à sua capacidade de se ligar à superfície da membrana celular carregada negativamente, através de uma ligação eletrostática, consequentemente afetando a integridade da bicamada fosfolipídica através da formação de poros em concentrações micromolares, acompanhada pelo extravasamento de íons e pelo aumento da permeabilidade que desencadeia a lise celular (Rady *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2024).

Além disso, alguns estudos observaram que Melitina é capaz de levar células tumorais a morte através de mecanismos por apoptose, sendo observado que a Melitina é capaz de ativar caspases, enzimas importantes na regulação da apoptose, em linhagens celulares tumorais humanas de diferentes partes do corpo (Rady *et al.*, 2017).

Apesar do seu potencial efeito biológico, a Melitina também apresenta efeitos citolíticos inespecíficos. A molécula possui bons resultados de toxicidade em células tumorais, porém, também é tóxica para células normais, visto que interage com os dois tipos de membrana celular, o que a torna um peptídeo não específico e não seletivo, com toxicidade em eritrócitos mesmo em baixas concentrações, demonstrando a alta atividade hemolítica, o que limita sua implementação na clínica médica (Papo; Shai, 2003, Askari *et al.*, 2021).

Desenho de novos peptídeos

As desvantagens citadas podem ser superadas a partir de modificações estruturais, como o desenho racional de moléculas, explorando características bioquímicas desejáveis, por meio da síntese de análogos utilizando a estrutura da Melitina como base, buscando melhor eficiência terapêutica, com alterações em sua cadeia peptídica, alterando a sequência de aminoácidos e sua dimensão.

Anteriormente, peptídeos análogos à Melitina foram estudados para atividade antibacteriana e antitumoral (Subbalakshmi *et al.*, 1999; Wan *et al.*, 2018).

O peptídeo MCF é um análogo da região C-terminal da Melitina, dos resíduos 12-26, com sequência GLPALISWIKRKRRQQG-CONH₂. Essa molécula não apresenta nenhuma substituição na cadeia original, apenas o encurtamento e a adição de um resíduo de glicina no C-terminal. O peptídeo MCF foi analisado quanto a ação antibacteriana e apresentou atividade hemolítica 300 vezes menor que a Melitina, demonstrando ser expressivamente menos tóxico, porém com concentração inibitória mínima de 5-7 vezes maior quando comparado a molécula original (Subbalakshmi *et al.*, 1999).

O peptídeo MCFA, análogo do MCF, (GLKKLISWIKRAAQQG-CONH₂), foi desenhado com substituições estratégicas na cadeia, o que favoreceu para a melhora da atividade, com uma concentração inibitória mínima comparável à da Melitina, porém apresentou atividade hemolítica apenas 100 vezes menor (Subbalakshmi *et al.*, 1999). É interessante apontar que, apesar dessas moléculas apresentarem atividade antimicrobiana, a atividade antitumoral delas não foi estudada até o momento.

Em 2018, Wan e colaboradores avaliaram a ação antitumoral do peptídeo TT-1, análogo da região N-terminal da Melitina, composto por 11 resíduos de aminoácidos, contando com a substituição dos resíduos de glicina do N-terminal por lisina (KIKAVLKVLTT-CONH₂). Essa molécula foi testada em células de câncer de tireoide humano e apresentou resultados promissores, que indicaram seletividade nos ensaios *in vitro*, visto que inibiu a viabilidade das células tumorais e não foi citotóxico para as células não tumorais. No ensaio *in vivo*, TT-1 inibiu a viabilidade das células de câncer de tireoide e o tratamento com o peptídeo não diminuiu o peso dos ratos, indicando o potencial da molécula para agente antitumoral (Wan *et al.*, 2018).

Assim, o presente trabalho avaliou a atividade antitumoral e toxicidade da Melitina e seus análogos MCF, MCFA e TT-1 sobre linhagens tumorais de mama e pulmão, bem como, partindo desses peptídeos, desenvolveu modificações em moléculas através do desenho racional, que possam contribuir para a utilização desses análogos, buscando agentes antitumorais com uma maior seletividade e menor citotoxicidade para células não tumorais.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos principais: Sintetizar o peptídeo antitumoral Melitina e os peptídeos análogos TT-1, MCF e MCFA, além disso, sintetizar novos peptídeos análogos, a partir do desenho racional de moléculas, com o intuito de se obter moléculas com proeminentes atividades antitumorais, com menores atividades citotóxicas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar os peptídeos:
 - Melitina: GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-CONH₂
 - TT-1: KIKAVLKVLTT-CONH₂
 - FKW: FIKAVLKVLKW-CONH₂
 - WKW: WIKAVLKVLKW-CONH₂
 - MCF: GLPALISWIKRKRQQG-CONH₂
 - MCFA: GLKKLISWIKRAAQQG-CONH₂
- Purificar os peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Caracterizar os peptídeos sintetizados por espectrometria de massas;
- Determinar a IC₅₀ dos peptídeos em linhagens celulares não tumorais e tumorais;
- Avaliar a atividade hemolítica dos peptídeos;
- Avaliar a capacidade de inibição da formação de colônias pelo ensaio clonogênico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a obtenção e avaliação do potencial tóxico do peptídeo Melitina e seus análogos foram realizados síntese de peptídeos em fase sólida, purificação por cromatografia líquida de alta eficiência, caracterização por espectrometria de massas e ensaios de toxicidade, como atividade hemolítica e viabilidade celular pela técnica de MTT. Além disso, foi avaliada a ação dos peptídeos frente a formação de colônias em linhagens celulares tumorais e não tumorais.

3.1 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

Para a obtenção dos peptídeos realizou-se a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) (Merrifield, 1963), um método baseado no crescimento da cadeia peptídica, um resíduo por vez, partindo de sua região C-terminal que se encontra ligada covalentemente a resina, um suporte polimérico inerte as reações de síntese.

Na SPFS foi utilizado o protocolo da química Fluorenilmetiloxicarboxil (Fmoc), baseado na proteção do grupo alfa-amino pelo Fmoc e as cadeias laterais dos resíduos são protegidas por grupos terc-butil, tritil e terc-butiloxycarbonil. O grupamento Fmoc é base lábil, sendo assim, a sua retirada do grupo amino (desproteção) ligado à resina é realizada em um meio básico, com solução de 20% 4-metilpiperidina/dimetilformamida (DMF). Após cada etapa de desproteção foi efetuado um teste de ninidrina (Kaiser *et al.*, 1970), reagente que em altas temperaturas reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul (maioria dos aminoácidos) ou castanho (prolina), permitindo confirmar se a desproteção foi efetuada com eficiência.

A etapa de acoplamento foi realizada pela ativação dos grupos carboxila do Fmoc-aminoácido a ser inserido com os agentes acoplantes N,N-diisopropilcarbodiimida (Dic) e N-Hidroxibenzotriazol (HOBt). Nesta reação foram utilizadas duas vezes de excesso em relação à quantidade de aminoácido existente na resina, durante duas horas de agitação. Após cada etapa de acoplamento também foi efetuado um teste de ninidrina, mas dessa vez para confirmar se o acoplamento foi efetuado com eficiência, sendo uma solução amarela com grãos de resina transparentes, já que não há presença de amina livre para que ocorra a reação. Entre

cada passo foram efetuadas lavagens com DMF para eliminação do excesso de reagentes e subprodutos.

Após o acoplamento de todos os resíduos de aminoácidos, a etapa de clivagem, que corresponde ao rompimento da ligação do peptídeo com a resina, foi realizada utilizando um coquetel de clivagem contendo água ultrapura, triisopropilsilano (TIS) e ácido trifluoracético (TFA) nas proporções de 2,5; 2,5; 95% respectivamente; v,v,v, sob agitação branda por 2 horas. O volume a ser utilizado foi calculado na proporção de 1 mL de solução para cada 100 mg de resina.

Após a clivagem, o peptídeo foi precipitado com éter etílico gelado. Ao final, o peptídeo foi extraído com 70% de solução contendo 0,045% de TFA em água ultrapura e 30% 0,036% de TFA em acetonitrila. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo bruto foi liofilizado e armazenado para posterior purificação e caracterização.

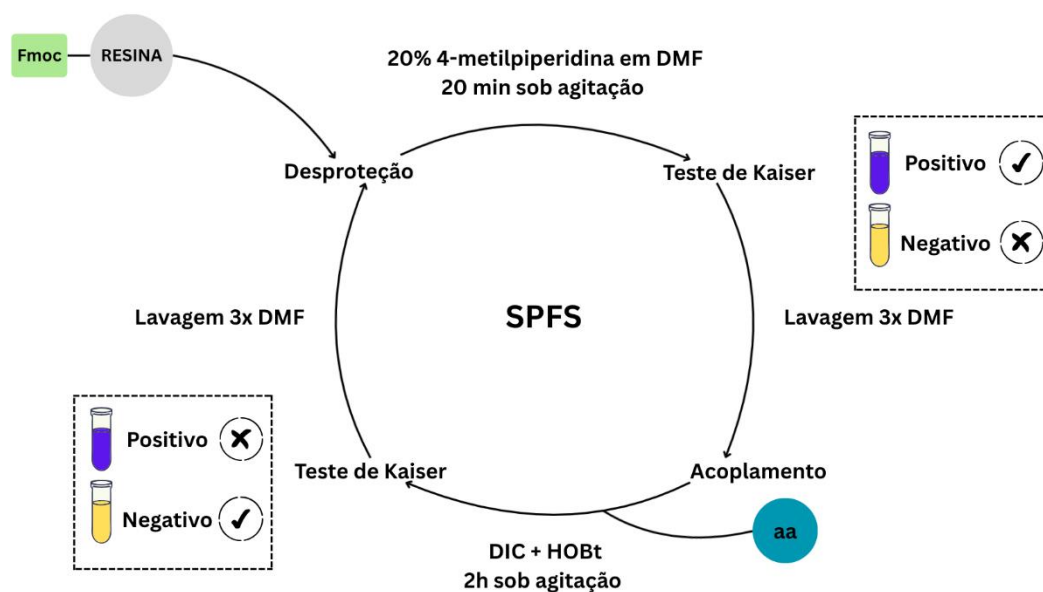


Figura 1: Esquema de síntese por síntese de peptídeos em fase sólida.

Fonte: elaborada pela própria autora.

3.2 DESENHO DE NOVOS PEPTÍDEOS

Com base na sequência de aminoácidos do peptídeo TT-1, novos peptídeos foram desenhados utilizando o servidor CAMPR4 (*Collection of Anti-Microbial Peptides*). As sequências com melhores valores de *score* foram selecionadas para posterior caracterização. As propriedades físico-químicas do peptídeo parental e dos derivados foram avaliadas a partir da ferramenta protparam do servidor ExPASy

(<https://web.expasy.org/protparam/>). Posteriormente, a projeção da *Helical wheel* dos peptídeos foi gerada utilizando o HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>). Além disso, a predição estrutural foi realizada utilizando o servidor PEP-FOLD 4 (*de novo peptide structure prediction*).

3.3 PURIFICAÇÃO

A purificação dos peptídeos sintetizados foi realizada em modo semi-preparativo utilizando um CLAE Shimadzu, em coluna de fase reversa C18 (Phenomenex 2,1 x 25cm). O grau de pureza das frações foi determinado em um cromatógrafo Shimadzu, em uma coluna analítica (0,46 x 25cm) de fase reversa C18 (Sepax). As soluções utilizadas para a purificação e verificação do teor de pureza do peptídeo foram 0,045% de TFA em água ultrapura (Solução A) e 0,036 % de TFA em acetonitrila (Solução B).

3.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os espectros de massas dos peptídeos foram obtidos em um espectrômetro de massas LCQ FLEET ThermoScientific, com injeção direta, em modo de detecção positiva, localizado no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, no Departamento de Bioquímica e Química Orgânica.

3.5 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para avaliar a toxicidade dos peptídeos em eritrócitos humanos foi realizado o ensaio de atividade hemolítica. Dessa maneira, 1 mL de sangue foi transferido para um microtubo de 2 mL e o volume foi completado com tampão PBS pH 7,4, centrifugando a 500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o processo de centrifugação foi realizado mais duas vezes, com o intuito de remover qualquer resquício de soro. Os eritrócitos foram diluídos 25 vezes em tampão PBS, representando a solução de eritrócitos utilizada nos testes. Foram preparadas soluções estoques dos peptídeos Melitina, MCFA, MCF, FKW e WKW, contendo 1 mg em 2 mL. Foram consideradas diluições seriadas a partir de 512 µg/mL até 1 µg/mL, preparadas em microtubos. Para o controle negativo (considerando 0% de hemólise)

utilizou-se 100 µL de tampão PBS, e o controle positivo (considerando 100% de hemólise) utilizou-se 100 µL de uma solução de Triton 1%. Foi adicionado 100 µL da solução de eritrócito em todos os tubos contendo as diluições, e nos controles. Os tubos foram incubados em estufa a 37 °C por 1 hora. Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 500 g durante 5 minutos. Foi coletado 100 µL do sobrenadante de cada condição, sendo transferido para os poços em uma placa de 96 poços. Os ensaios foram realizados em duplicata e a leitura foi realizada em leitor de placas em comprimento de onda de 540 nm. A porcentagem de hemólise foi calculada através da equação abaixo:

$$Hemólise (\%) = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{PBS})}{(Abs_{Triton} - Abs_{PBS})} \times 100$$

3.6 CULTURA CELULAR

A cultura celular foi realizada utilizando linhagens de câncer de adenocarcinoma de mama (MCF-7 ATCC HTB-22 e MDA-MB-231 ATCC HTB-26), adenocarcinoma de pulmão (A549 ATCC CCL-185) e fibroblasto pulmonar (MRC-5 ATCC CCL-171). As células foram cultivadas em garrafas para cultura celular, em meio de cultura DMEM High Glicose, suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, Life Technologies - 12657029) e antibiótico e antimicótico (Sigma Aldrich – A5955). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Com o objetivo de avaliar a toxicidade dos peptídeos em células tumorais e não tumorais, utilizou-se a técnica de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio), que avalia a concentração de células viáveis após incubação com elemento citotóxico, a partir da quantificação da atividade mitocondrial.

Para tanto, as linhagens celulares MRC-5, A549, MCF-7 e MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços com meio DMEM High Glicose, na concentração de 1×10^6 células por placa, sendo deixadas em estufa de CO₂ 5% por 24 horas para que as células pudessem aderir à placa.

Depois de 24 horas de cultivo, o meio foi removido e as placas contendo as linhagens foram tratadas com os peptídeos identificados como Melitina, MCFA, MCF, FKW e WKW, em diferentes concentrações, partindo de 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL até 1 µg/mL. Foram utilizados como controle positivo e negativo, DMSO 10% e meio de cultura suplementado, respectivamente, poços sem célula foram considerados como branco.

As placas foram novamente incubadas por 24 h, tempo estipulado de tratamento com os peptídeos. Após este período, as placas foram tratadas com solução de MTT em meio sem suplementação e incubadas por mais 3 horas para que as células viáveis incorporassem o tetrazólio. Em seguida, o meio com peptídeo contendo a solução de MTT foi retirado e as células foram solubilizadas em 100 µL de DMSO.

A leitura da intensidade da cor da solução foi realizada em leitor de placas no comprimento de onda de 570 nm. Após a leitura, foram realizados os cálculos conforme a equação abaixo, e a análise estatística dos dados obtidos para a plotagem dos gráficos referentes a viabilidade celular e citotoxicidade das linhagens testadas.

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{(Média_{amostra} - Branco)}{(Média_{Controle\ positivo} - Branco)} \times 100$$

3.8 ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico avalia a viabilidade reprodutiva das células, ou seja, a capacidade de uma única célula gerar uma colônia composta por 50 células ou mais, mediante tratamento com elemento citotóxico (Franken *et al.*, 2006).

Para esse ensaio, as linhagens MRC-5, MCF7, A549 e MDA-MB-231 foram descongeladas em garrafas pequenas para cultivo celular e deixadas em estufa de CO₂ 5% por 24 horas para aderência dessas células. Em seguida, foi realizado o repique das linhagens com solução de tripsina 10% em tampão PBS estéril e as linhagens foram transferidas para garrafas grandes de cultivo celular, voltando para a estufa por mais 48 horas. Novamente as linhagens foram repicadas e foram transferidos 6x10⁵ células para 5 garrafas, considerando as condições de trabalho, peptídeos (Melitina, MCFA, FKW e WKW) e controle negativo (células sem tratamento), mantidas por 24 horas em estufa de CO₂ 5% para aderência. Em seguida,

foram realizados os tratamentos com os peptídeos baseados na IC50 da Melitina para cada linhagem obtido no ensaio de MTT, e novamente as células foram deixadas na estufa. Após 24 horas do tratamento, foi realizado o repique de cada garrafa separadamente, e foram transferidos 5×10^3 células para dois poços na placa de 6, para cada condição. As placas foram mantidas em estufa de CO₂ 5 % por 8 dias para o crescimento das colônias. Após esse período, as colônias foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com solução de violeta cristal, a partir disso, foi realizada a contagem das colônias em microscópio, de modo que uma colônia é composta por 50 células ou mais. Os resultados foram avaliados através da equação:

$$\text{Fração sobrevivente} = \frac{\text{média das colônias de cada condição}}{\text{média do controle negativo}} \times 100$$

O ensaio foi realizado em triplicata.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão divididos em três etapas. A primeira diz respeito ao desenho, síntese e caracterização das moléculas. A segunda avalia a toxicidade dos peptídeos frente a eritrócitos, células não tumorais e tumorais e a terceira avalia o efeito do tratamento com os peptídeos selecionados na formação de colônias.

4.1 SÍNTESE, DESENHO E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

A Melitina (sequência GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-CONH₂) de massa molar 2847,49 g/mol, é um peptídeo composto por 26 resíduos de aminoácidos (Rady *et al.*, 2017), muito bem descrito na literatura por possuir diversos efeitos biológicos, inclusive antitumoral, porém, apesar de muito ativo, é também não específico e altamente tóxico (Askari *et al.*, 2021). Por essa razão, peptídeos análogos foram sintetizados com o objetivo de se obter moléculas ativas e com menor toxicidade contra eritrócitos e células normais.

O primeiro análogo sintetizado foi o peptídeo MCF (sequência GLPALISWIKRAAQQG-CONH₂), de massa molar 1850,23 g/mol, composto por 16 resíduos de aminoácidos, correspondentes à região C-terminal da Melitina, resíduos 12-26 (Subbalakshmi *et al.*, 1999). O análogo MCFA (sequência GLKKLISWIKRAAQQG-CONH₂), de massa molar 1797,15 g/mol, é composto por 16 resíduos de aminoácidos, possuindo modificações estratégicas em relação à região C-terminal da Melitina. Pro¹⁴ e Ala¹⁵ foram substituídas por Lys e Arg²⁴ e Lys²³ foram substituídas por Ala (Subbalakshmi *et al.*, 1999). Ambos os análogos foram descritos como menos hemolíticos que a Melitina, porém também obtiveram menores atividades. Como até o presente momento a ação antitumoral dessas moléculas não foi avaliada, tais análogos também foram selecionados para este trabalho.

Posteriormente, foi sintetizado o peptídeo TT-1 (sequência KIKAVLKVLTT-CONH₂) de massa molar 1212,57 g/mol, composto por 11 resíduos de aminoácidos, sendo um encurtamento da sequência de aminoácidos original, com a substituição dos resíduos de glicina por lisina (Wan *et al.*, 2018). Essa molécula foi descrita anteriormente como menos hemolítica que a Melitina e com atividades promissoras para câncer de tireóide (Wan *et al.*, 2018)

A partir da sequência do peptídeo TT-1, os análogos FKW e WKW foram desenhados, com foco inicial para atividade antibacteriana. Para tanto, o servidor CAMPR4 (*Collection of Anti-Microbial Peptides*) foi utilizado para prever quais regiões do peptídeo TT-1 poderiam ser modificadas para aumentar sua atividade e as modificações com os melhores valores de *score* foram escolhidas. Partindo das modificações sugeridas pelo servidor, as sequências candidatas tiveram suas propriedades físico-químicas analisadas (Figura 2, Tabela 1) e as que obtiveram uma estrutura α -helicoidal e anfipática mais bem definidas, com faces polares e apolares distintas, além de maiores índices de hidrofobicidade (H) e momento hidrofóbico (μ H), foram selecionadas para síntese e posterior análise da atividade. Uma vez que, frequentemente, peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) também apresentam potencial antitumoral (Qu *et al.*, 2024), as moléculas selecionadas também foram testadas para avaliação da atividade em células não tumorais e tumorais neste trabalho.

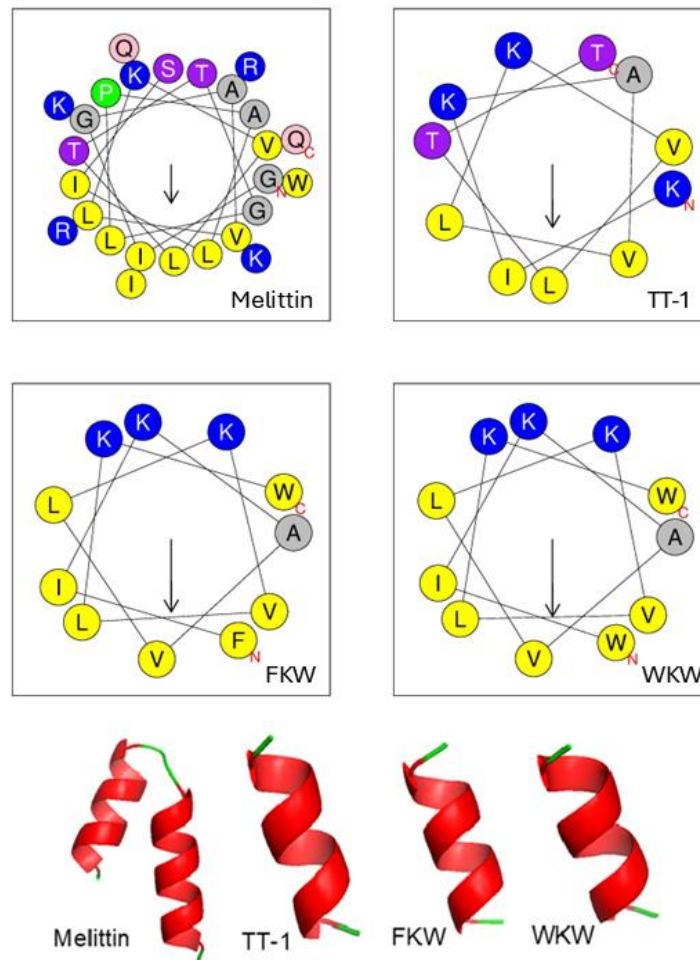


Figura 2: *Helical wheel* dos peptídeos gerados utilizando HeliQuest, resíduos hidrofóbicos em amarelo, serina e treonina em roxo, resíduos básicos em azul e glutamina em rosa. As setas representam a direção e a magnitude do momento hidrofóbico. O resíduo marcado com 'N' indica o final do N-terminal e o marcado com 'C' indica o final do C-terminal. Abaixo, predição das estruturas geradas utilizando PEP-FOLD4. As regiões helicoidais estão indicadas em vermelho e as regiões de potencial desordem em verde.

Fonte: elaborado pela própria autora.

O peptídeo FKW (sequência FIKAVLKVLKW-CONH₂), de massa molar 1343,74 g/mol, é composto por 11 resíduos de aminoácidos, apresentando a modificação de 3 aminoácidos em relação ao TT-1, já o análogo WKW (sequência WIKAVLKVLKW-CONH₂) de massa molar 1382,79 g/mol, é composto por 11 resíduos de aminoácidos, apresentando a modificação de um aminoácido em relação ao FKW.

As modificações dos peptídeos FKW e WKW visaram investigar o impacto de alterações na sequência, carga e hidrofobicidade sobre sua estrutura e atividade biológica. No peptídeo precursor TT-1, resíduos de glicina, que tendem a desestabilizar a conformação α -helicoidal, foram substituídos por lisinas, aminoácidos catiônicos que favorecem a estabilidade e aumentam a interação com membranas. A

partir dessa sequência, o peptídeo FKW foi obtido por substituições estratégicas de lisina por fenilalanina (posição 1), treonina por lisina (posição 10) e treonina por triptofano (posição 11), resultando em um maior caráter anfipático. O peptídeo WKW, derivado do FKW, apresenta substituição de fenilalanina por triptofano na posição 1, o que aumenta a hidrofobicidade e a capacidade de interação com a bicamada lipídica, propriedades cruciais para o aumento da atividade biológica. Em relação à ação antibacteriana, os análogos FKW e WKW apresentaram atividade significativa, comparada a Melitina, molécula parental.

As modificações realizadas na sequência de aminoácidos original podem ser observadas na Figura 3.

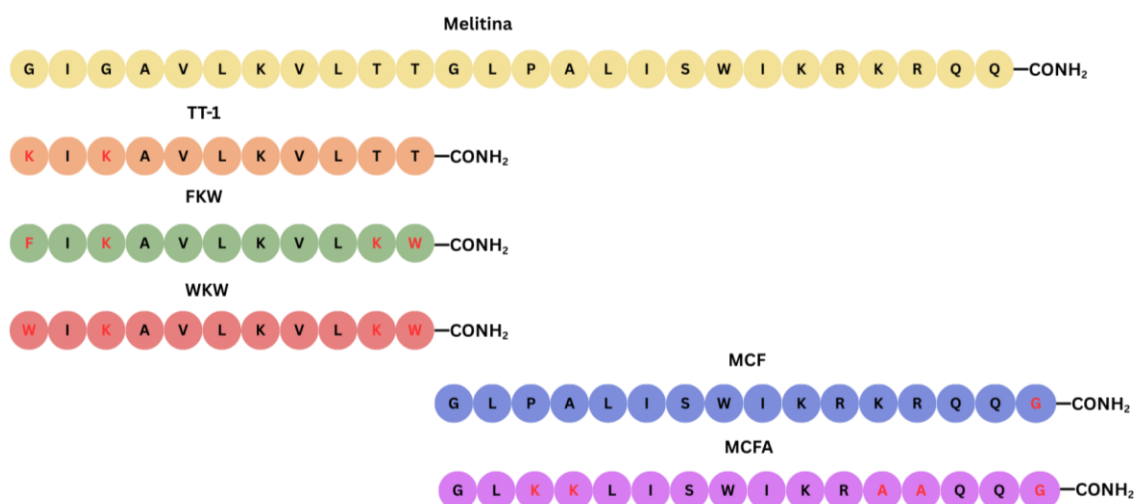


Figura 3: Modificações realizadas nas sequências de aminoácidos. Em vermelho estão destacadas as substituições dos resíduos de aminoácidos.

Fonte: elaborada pela própria autora.

As propriedades físico-químicas das moléculas, como hidrofobicidade, momento hidrofóbico, carga líquida e pl teórico foram avaliadas para os peptídeos, visto que são características importantes para ACPs (Tabela 1). Um valor maior de hidrofobicidade indica um aumento na possibilidade de interação com a bicamada lipídica, o que consequentemente pode melhorar a atividade da molécula, já um valor maior de momento hidrofóbico, demonstra que o peptídeo possui faces hidrofóbicas e hidrofílicas distintas e bem definidas, indicando a anfipacidade da molécula, o que também favorece a uma melhor interação com membranas celulares. A carga líquida

dos peptídeos também é um fator que pode influenciar na atividade. Em geral, AMPs e ACPs possuem carga líquida entre +2 e +9 em pH fisiológico, quanto maior a carga, melhora possibilidade de interação eletrostática com as membranas celulares, porém, maior a probabilidade de se obter um peptídeo não específico e não seletivo (Magana *et al.*, 2020).

Apesar de aumentarem a interação e a atividade, peptídeos com valores maiores de hidrofobicidade, momento hidrofóbico e cargas positivas também podem possuir um aumento na atividade hemolítica, o que diminui a especificidade dos peptídeos (Magana *et al.*, 2020).

Em relação a diminuição da cadeia peptídica original e as substituições dos resíduos de glicina do N-terminal no peptídeo TT-1, geraram um valor de hidrofobicidade comparável ao da Melitina (0,500 e 0,511, respectivamente) e um momento hidrofóbico maior.

Os análogos do TT-1, FKW e WKW, possuem maior hidrofobicidade e momento hidrofóbico quando comparados aos seus precursores. Nota-se que as substituições dos 3 resíduos de aminoácidos, Lys¹→Phe¹, Thr¹¹→Trp¹¹ e Thr¹⁰→Lys¹⁰, sendo Phe e Trp resíduos apolares, aumentaram a hidrofobicidade do peptídeo FKW. Para o peptídeo WKW, observa-se que a substituição do resíduo de Phe¹→Trp¹, gera um aumento na hidrofobicidade, comparado ao peptídeo precursor.

O observado para os análogos do C-terminal foi um aumento na hidrofobicidade para o MCF e uma diminuição para o MCFA, em relação ao momento hidrofóbico, ambos os peptídeos apresentam valores maiores que o da Melitina, demonstrando que o encurtamento da sequência e as substituições Pro¹⁴→Lys¹⁴, Ala¹⁵→Lys¹⁵, Arg²⁴→Ala²⁴ e Lys²³→Ala²³, diminuíram a hidrofobicidade do peptídeo MCFA em relação aos seus precursores.

No geral, os análogos apresentam maior hidrofobicidade quando comparados a molécula parental, com exceção do TT-1 e MCFA, e maior momento hidrofóbico.

Em relação às cargas dos peptídeos, a Melitina possui uma carga líquida maior que a observada para os seus análogos (+6), o TT-1 apresenta carga de +4 e os seus análogos FKW e WKW também. O peptídeo MCF possui a menor carga entre os peptídeos testados (+2), com as mudanças na sequência de aminoácidos, passa a apresentar carga +4 (MCFA).

Com base em estudos anteriores, entende-se que a presença de aminoácidos hidrofóbicos como Ala, Leu, Pro e Gly, um ou mais resíduos específicos como Arg,

Lys, Tyr, Thr, Glu e Ser, estão envolvidos na seletividade para células cancerosas e alta atividade citotóxica, pois aumentam a interação entre o peptídeo e a membrana das células cancerígenas com alta concentração de fosfolípidios carregados negativamente (Pan *et al.*, 2007, Ghadiri *et al.*, 2024).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos peptídeos Melitina, TT-1, FKW, WKW, MCF e MCFA.

Peptídeo	Hidrofobicidade (H)	Momento hidrofóbico (μH)	Carga líquida	PI teórico
Melitina	0,511	0,394	+6	12,02
TT-1	0,500	0,518	+4	10,30
FKW	0,820	0,599	+4	10,30
WKW	0,862	0,635	+4	10,30
MCF	0,526	0,412	+2	11,00
MCFA	0,338	0,534	+4	11,26

Fonte: HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/index.html>) e Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Conforme citado anteriormente, todas as moléculas foram sintetizadas através de SPFS (Merrifield, 1963), utilizando a resina Rink amida, com grau de substituição 0,678 mmol/g, em escala de 0,2 mmol com 2x de excesso. A resina Rink amida foi escolhida por fornecer moléculas com a extremidade C-terminal amidada. Após a clivagem, o sobrenadante contendo os peptídeos foram liofilizados e identificados como amostras brutas.

As amostras brutas foram analisadas em cromatógrafo Shimadzu em coluna analítica, em gradiente de 5-95% de Solução B em 30 minutos, com fluxo de 1mL/min, para a análise do grau de pureza e estabelecer a porcentagem necessária de Solução B durante a purificação em coluna de fase reversa, considerando o tempo decorrido após a injeção e o pico de interesse. Os perfis cromatográficos obtidos para as amostras brutas podem ser observados abaixo.

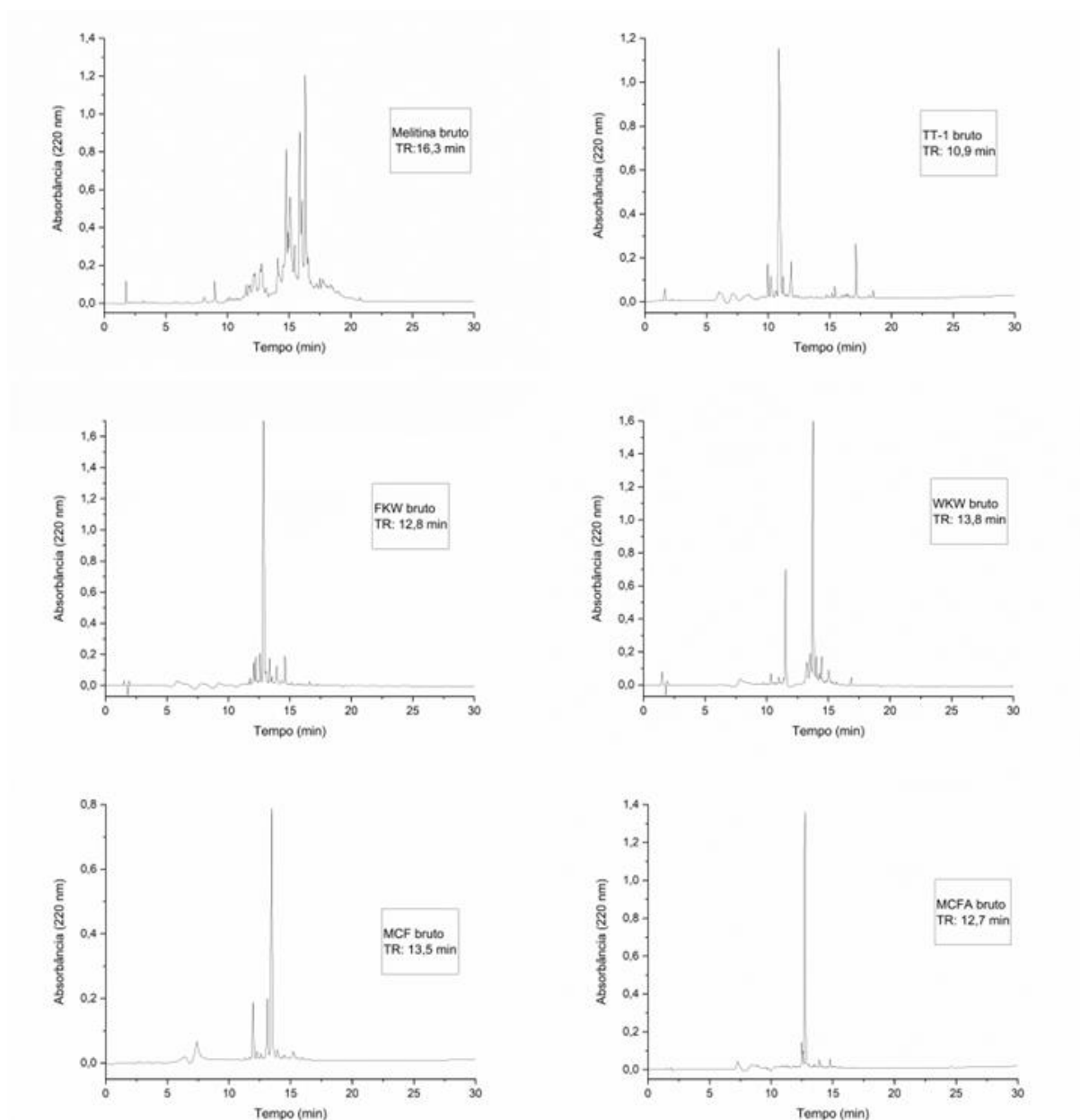


Figura 4: Perfis cromatográficos dos peptídeos brutos Melitina, TT-1, FKW, WKW, MCF e MCFA em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solução B em 30 minutos.

Fonte: elaborada pela própria autora.

A partir da análise dos perfis cromatográficos, foi possível observar o pico de interesse, relativo a cada peptídeo, com um tempo de retenção específico. Considerando o gradiente linear de 5-95% de Solução B em 30 minutos, com uma variação de 3% de Solução B por minuto, pode-se inferir que a porcentagem de Solução B em que o peptídeo possui eluição, assim, foi determinado um gradiente de purificação para cada amostra.

A purificação dos peptídeos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, no modo semipreparativo, utilizando coluna C18 (Phenomenex 2,1 x 25 cm), utilizando os métodos de purificação descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Métodos de purificação de cada peptídeo considerando o seu tempo de retenção (TR) e porcentagem de pureza.

Peptídeo	TR (min)	Método de purificação	Grau de pureza (%)
Melitina	16,3	20-70% de Solução B em 120 min	97,5
TT-1	10,9	10-55% de Solução B em 120 min	98,4
FKW	12,8	15-60% de Solução B em 120 min	99,8
WKW	13,8	20-65% de Solução B em 120 min	99,9
MCF	13,5	20-65% de Solução B em 120 min	99,9
MCFA	12,7	15-60% de Solução B em 120 min	99,7

Fonte: elaborado pela própria autora.

Após a purificação dos peptídeos, as frações de interesse foram acompanhadas em cromatógrafo analítico. Como pode-se observar, para todas as moléculas, o tempo de retenção do pico majoritário de cada perfil está muito próximo aos obtidos para as amostras brutas, indicando que os peptídeos foram purificados com sucesso, com grau de pureza >95% (Figura 5, Tabela 2).

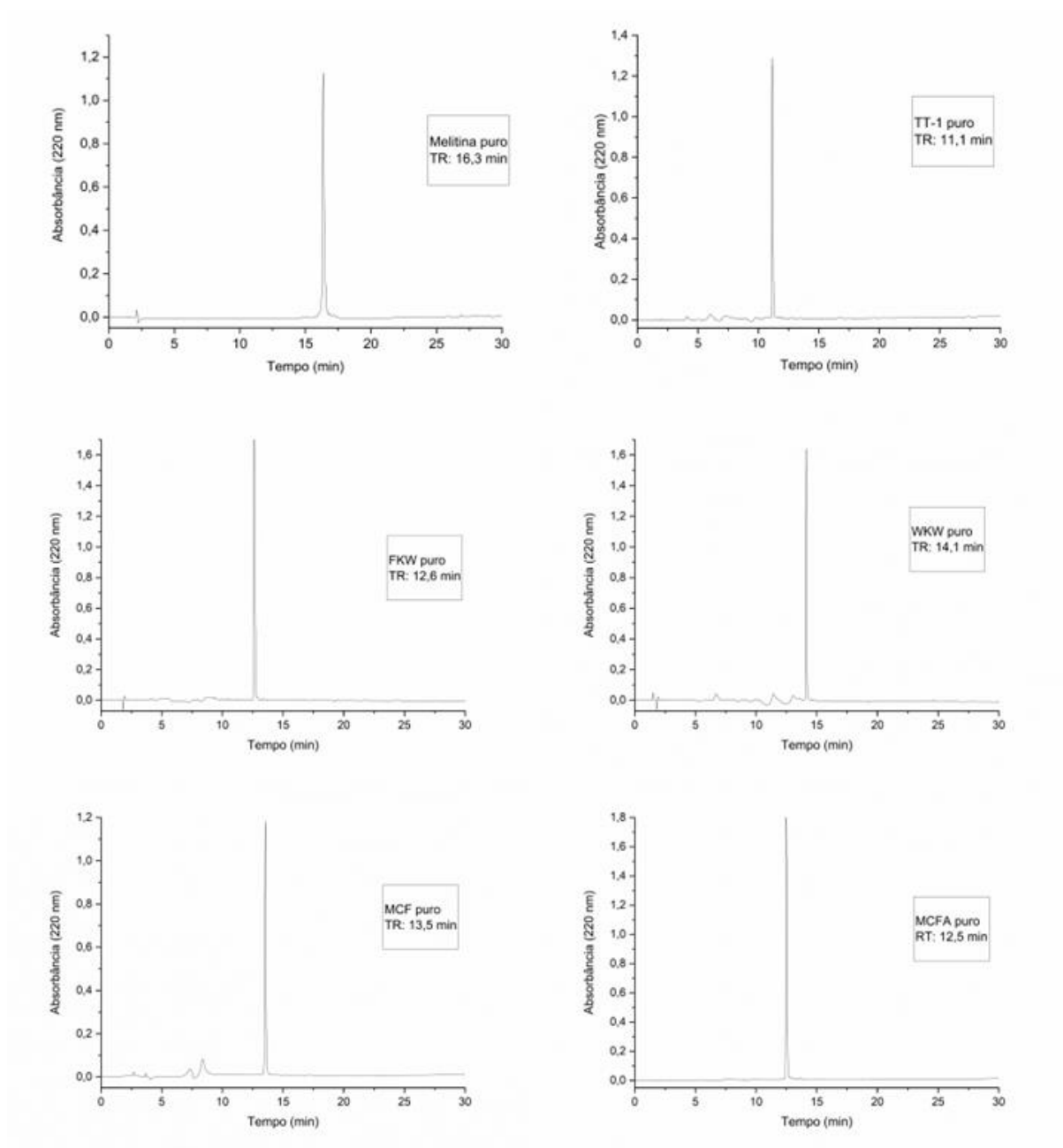


Figura 5: Perfis cromatográficos dos peptídeos puros Melitina, TT-1, FKW, WKW, MCF e MCFA em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solução B em 30 minutos.

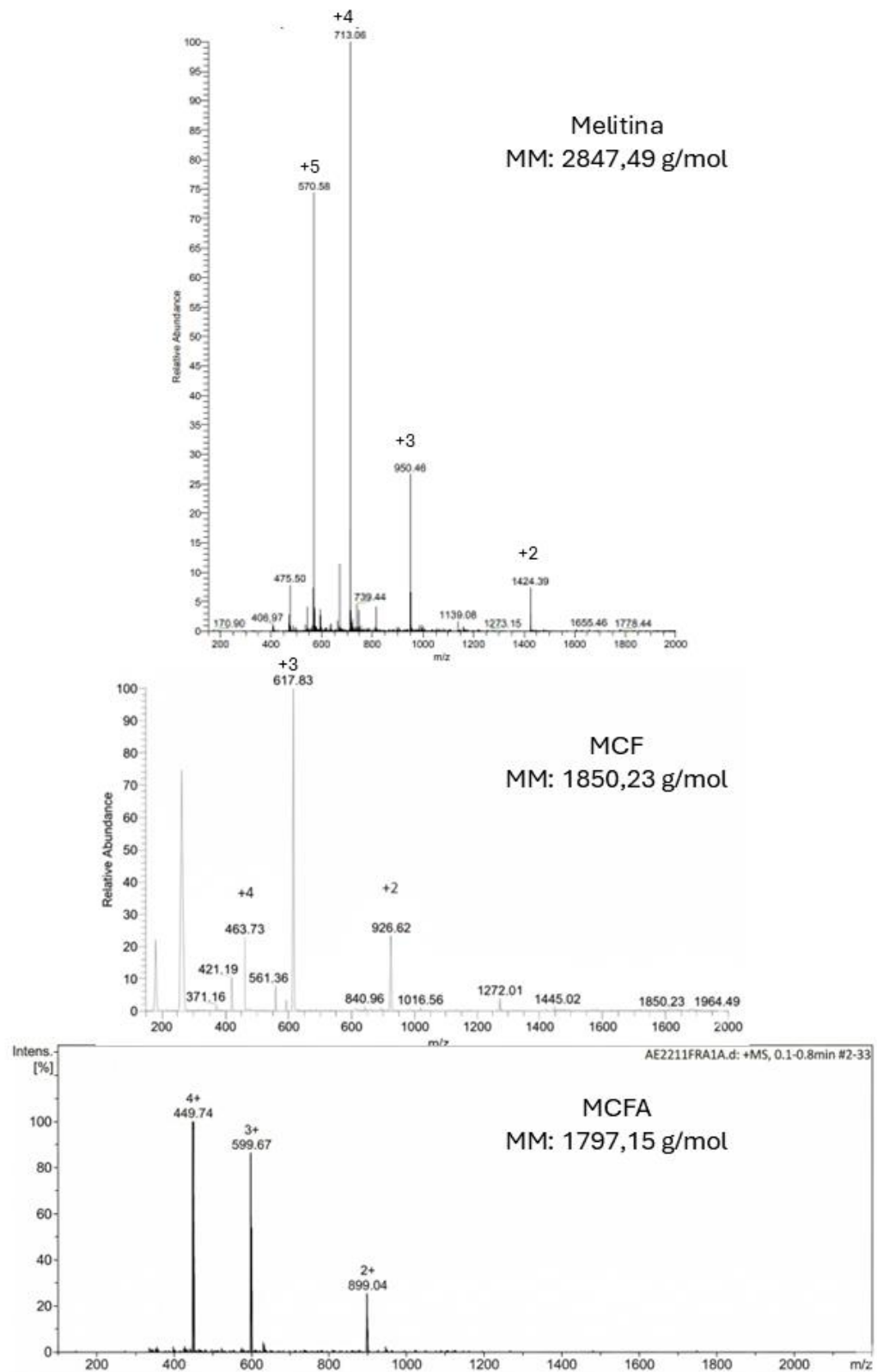
Fonte: elaborada pela própria autora.

4.2 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Posteriormente, para analisar as massas molares dos peptídeos puros e confirmar a obtenção das moléculas de interesse, realizou-se a espectrometria de massas com ionização por *electrospray*.

Analisando os espectros de massas obtidos para todos os peptídeos (Figura 6), é possível avaliar as razões massa/carga (m/z) dos íons para cada uma das moléculas. O peptídeo Melitina, de massa molar 2847,49 g/mol, apresenta razões m/z 950,46 Da, 713,06 Da e 570,58 Da, correspondentes aos picos +3, +4 e +5. O espectro do peptídeo TT-1, de massa molar 1212,57 g/mol, possui as razões m/z 404,93 Da (3+) e 606,90 Da (2+). Para o peptídeo FKW, de massa 1343,74 g/mol, temos as razões m/z 448,59 Da (3+), 336,67 Da (4+) e 672,41 Da (2+). O espectro do peptídeo WKW, de massa 1382,79 g/mol, apresenta as razões m/z 462,05 Da (3+), 692,15 Da (2+) e 346,80 Da (4+). Pelo espectro de massas do peptídeo MCF, de massa 1850,23 g/mol, é possível observar os picos com razão m/z 617,83 Da, 926,62 Da e 463,73 Da, correspondentes aos picos 3+, 2+ e 4+. O peptídeo MCFA, de massa 1797,15 g/mol, apresentou razões m/z 449,74 Da, 599,67 Da e 899,04 Da, correspondentes aos picos 4+, 3+ e 2+.

Portanto, foi possível confirmar a obtenção de todas as moléculas de interesse através dos seus respectivos espectros de massas.



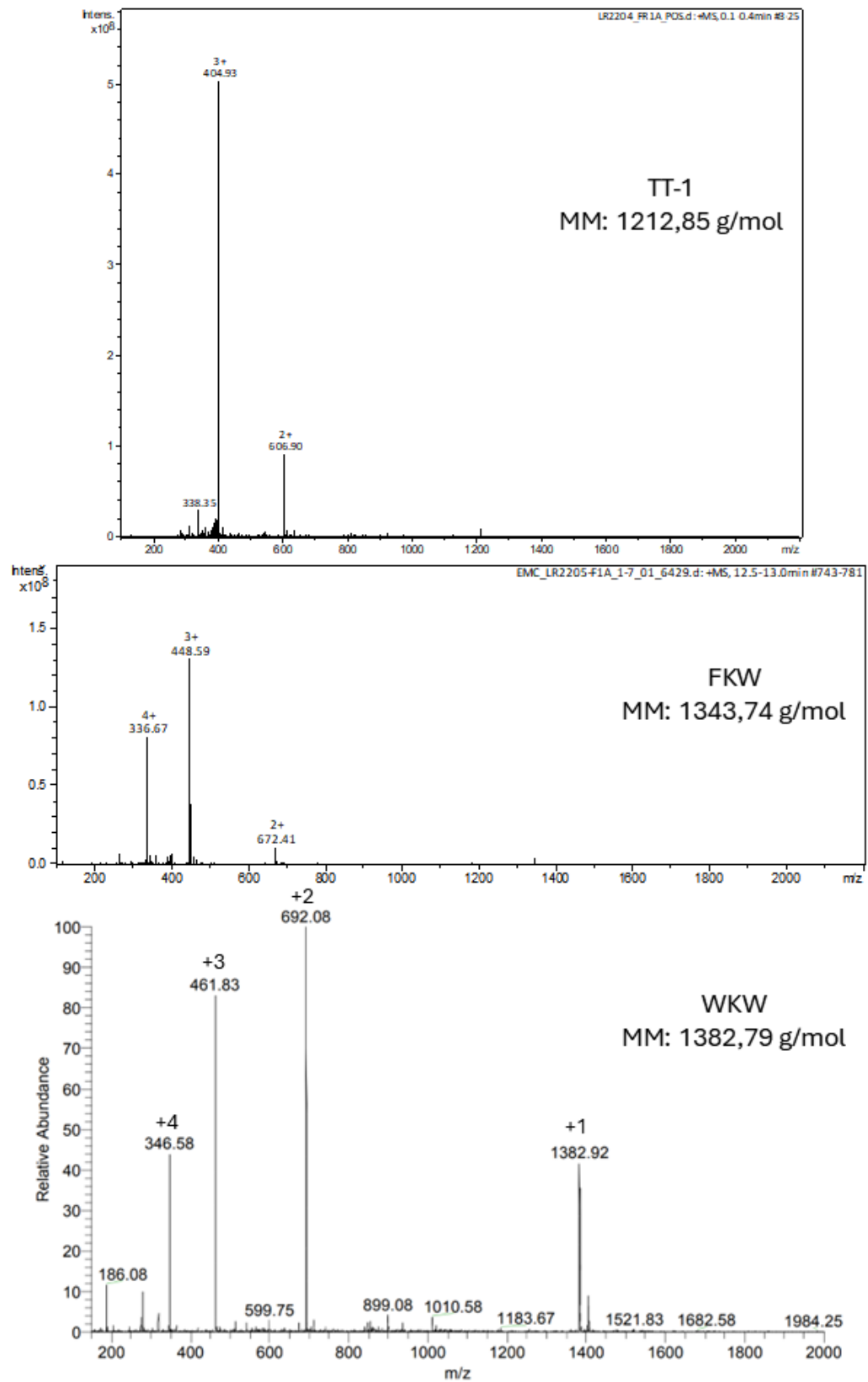


Figura 6: Espectros de massas dos peptídeos Melitina, TT-1, FKW, WKW, MCF e MCFA.
Fonte: elaborada pela própria autora.

4.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para avaliar a toxicidade dos peptídeos contra eritrócitos humanos, o ensaio de atividade hemolítica foi realizado nas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$ até 512 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados demonstram que a Melitina é um peptídeo citolítico, apresentando hemólise acima de 90% a partir de 16 $\mu\text{g/mL}$. Os análogos FKW e WKW apresentaram resultados semelhantes na maior concentração, porém, demonstraram menor toxicidade quando comparados a Melitina. Os peptídeos TT-1, MCFA e MCF não apresentaram perfil hemolítico (Figura 7).

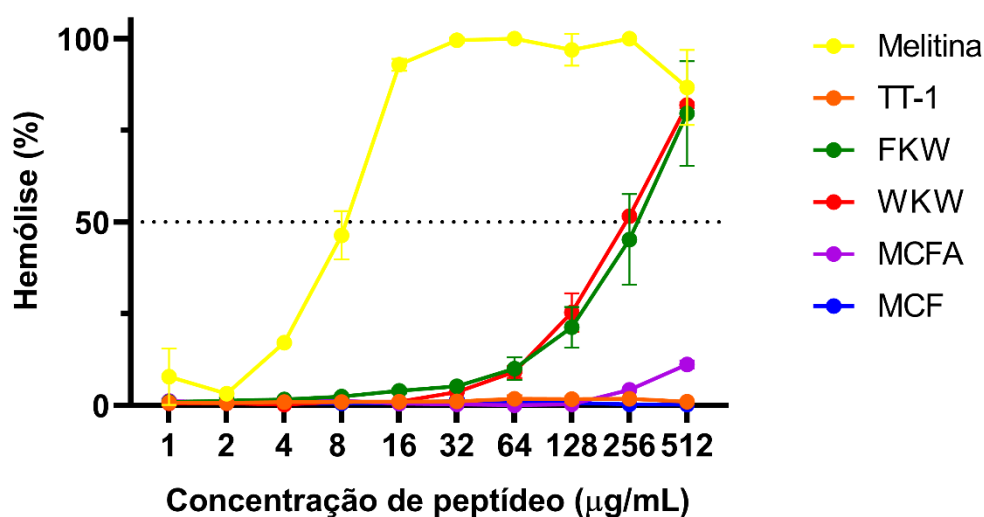


Figura 7: Ensaio de atividade hemolítica, nas concentrações de peptídeo de 1 a 512 $\mu\text{g/mL}$.
Fonte: elaborada pela própria autora.

Os valores de HC_{50} , concentração necessária capaz de ocasionar 50% de hemólise, foram calculados para os peptídeos Melitina, TT-1, FKW, WKW, MCF e MCFA, listados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de HC_{50} para os peptídeos Melitina, FKW, WKW, TT-1, MCF e MCFA.

Peptídeos	HC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Melitina	8,9
FKW	311,7
WKW	295,6
TT-1	>512
MCFA	>512
MCF	>512

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Os resultados para o ensaio de atividade hemolítica confirmam o que é descrito em literatura para Melitina, um peptídeo de ações citolíticas inespecíficas (Papo; Shai, 2003, Askari *et al.*, 2021). Além disso, todos os análogos estudados se demonstraram menos tóxicos que a Melitina, molécula original.

4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A viabilidade celular das linhagens MRC-5, fibroblasto de pulmão, A549, adenocarcinoma de pulmão, MCF-7, adenocarcinoma de mama e MDA-MB-231, adenocarcinoma de mama, todas linhagens derivadas de humanos, foram avaliadas para os peptídeos: Melitina, MCFA, MCF, TT-1, FKW e WKW, nas concentrações de 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL e 1 µg/mL. As placas foram tratadas com os peptídeos por 24 horas para avaliar a atividade citotóxica através da técnica MTT.

Essas linhagens celulares foram escolhidas para este trabalho considerando as estatísticas de câncer no mundo nos últimos anos, os cânceres de pulmão e mama estão entre os mais incidentes e com maior mortalidade, como pode ser observado na Figura 8. Em 2022, o câncer de pulmão foi o mais incidente, gerando 2.5 milhões de casos, além de ocasionar 1.8 milhões de mortes, configurando o câncer com maior mortalidade. O câncer de mama feminino foi o segundo mais incidente, com 2.3 milhões de casos e o quarto com maior mortalidade, com 666 mil mortes (Bray *et al.*, 2024).

Absolute numbers, Incidence and Mortality, Both sexes, in 2022

World
(Top 15 cancer sites)

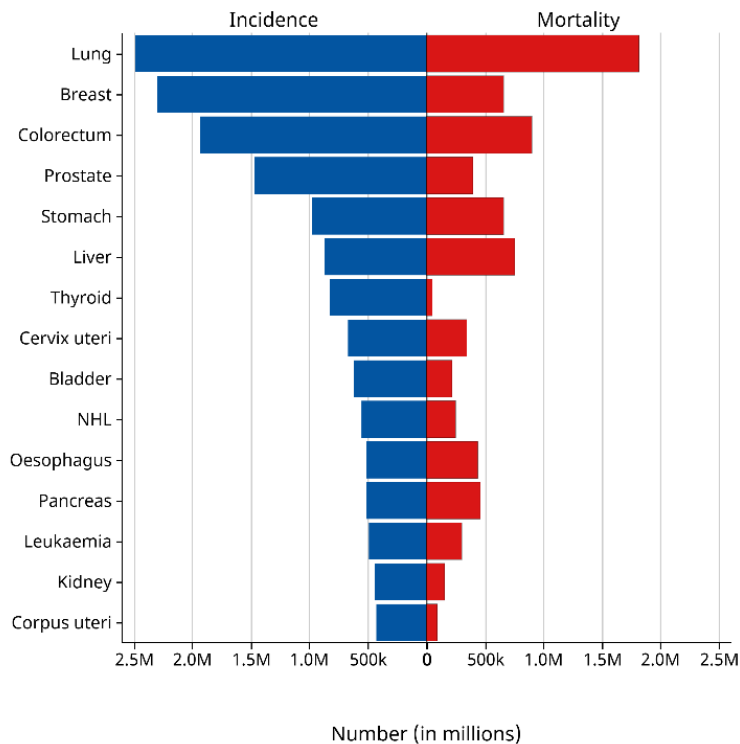


Figura 8: Números absolutos de incidência e mortalidade de cânceres no mundo em 2022.

Fonte: Cancer TODAY – IARC - <https://gco.iarc.who.int>

A linhagem MRC-5, fibroblasto do tecido pulmonar humano, é frequentemente utilizada no estudo de novas terapias, devido às suas propriedades imunossupressoras (Lekovic *et al.*, 2020). A linhagem A549, adenocarcinoma de pulmão humano, é amplamente utilizada em pesquisas em câncer, avaliando fatores como proliferação celular, invasão celular e respostas a diferentes terapias (Wang *et al.*, 2021).

As linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 são células de adenocarcinoma de mama humano, muito utilizadas em estudos de mecanismos regulatórios e terapias para câncer de mama. Estas diferem em relação à agressividade, a MDA-MB-231 apresenta um perfil mais agressivo que a MCF-7, além de exibir alto potencial metastático (Wang *et al.*, 2015; San-Millan *et al.*, 2023).

Em relação à atividade dos peptídeos, avaliou-se inicialmente a linhagem de fibroblasto de pulmão humano não tumoral (MRC-5). Nas concentrações mais baixas, nenhum dos peptídeos testados apresentou toxicidade significativa. A Melitina,

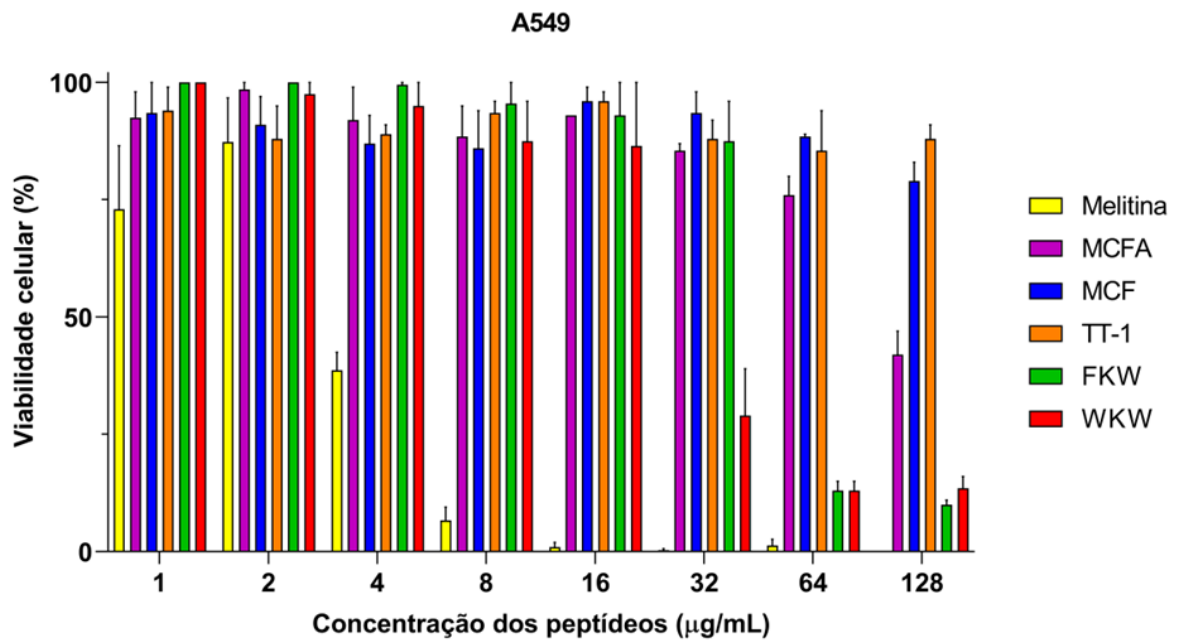
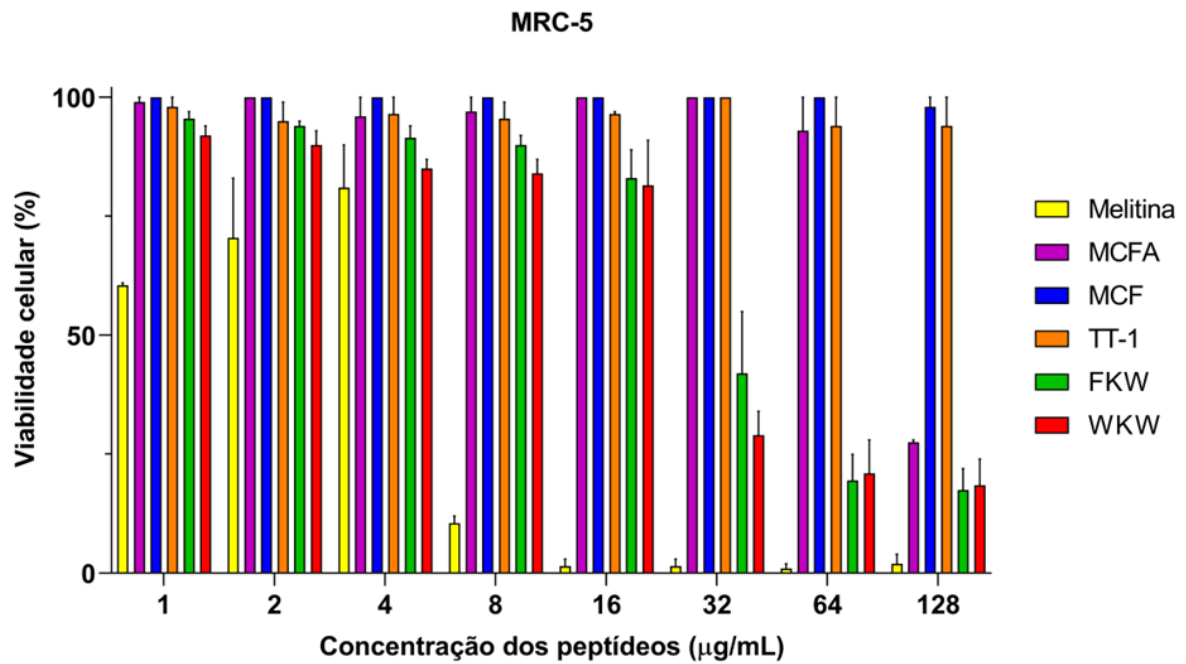
entretanto, demonstrou efeito citotóxico a partir de 8 µg/mL, reduzindo a viabilidade celular para 10,5%, com uma IC₅₀ de 5,8 µg/mL. Os análogos FKW e WKW exibiram toxicidade a partir de 32 µg/mL, resultando em viabilidades celulares de 42% e 29%, e valores de IC₅₀ de 30,5 µg/mL e 25,8 µg/mL, respectivamente.

Para a linhagem de adenocarcinoma de pulmão (A549), a Melitina demonstrou toxicidade a partir de 4 µg/mL (IC₅₀ de 3,8 µg/mL), revelando-se mais potente do que na linhagem não tumoral. Em contrapartida, os peptídeos WKW e FKW apresentaram perfil tóxico apenas a partir de 32 µg/mL e 64 µg/mL, respectivamente. Observou-se que os valores de IC₅₀ para estes análogos (45,5 e 25,5 µg/mL) foram maiores ou próximos aos obtidos na linhagem MRC-5, indicando ausência de seletividade para esta linhagem tumoral.

Resultados distintos foram observados na linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7). Conforme a Figura 9 e Tabela 4, a Melitina apresentou toxicidade a partir de 8 µg/mL (viabilidade de 34%), tornando-se completamente tóxica a partir de 16 µg/mL. Sua IC₅₀ (7,0 µg/mL) foi maior que o observado nas linhagens de pulmão. Destaca-se, contudo, o desempenho dos análogos FKW e WKW: ambos apresentaram toxicidade a partir de 16 µg/mL e, na concentração de 32 µg/mL, reduziram a viabilidade para 5,5% e 8,5%, respectivamente. Os valores de IC₅₀ obtidos (12,2 µg/mL para o FKW e 13,6 µg/mL para o WKW) foram inferiores aos observados na linhagem não tumoral MRC-5. Isso indica que, ao contrário da Melitina, estes análogos apresentaram maior seletividade para a linhagem tumoral MCF-7.

Por fim, para a linhagem de mama triplo-negativo (MDA-MB-231), a Melitina passou a apresentar potencial tóxico a partir de 8 µg/mL (de 7,7 µg/mL). Já o FKW e o WKW exibiram toxicidade a partir de 32 µg/mL, com valores de IC₅₀ de 30,4 e 22,9 µg/mL, respectivamente. Diferentemente do observado na linhagem MCF-7, a diferença entre estes valores e os obtidos na linhagem não tumoral foi mínima, sugerindo menor seletividade para este subtipo celular mais agressivo.

De maneira geral, os peptídeos TT-1 e MCF não demonstraram potencial tóxico nas concentrações de trabalho para nenhuma das linhagens testadas, tanto as tumorais, quanto a não tumoral. E o peptídeo MCFA seguiu o mesmo padrão em todas as linhagens, sendo citotóxico apenas na maior concentração testada, 128 µg/mL (Figura 9, Tabela 4).



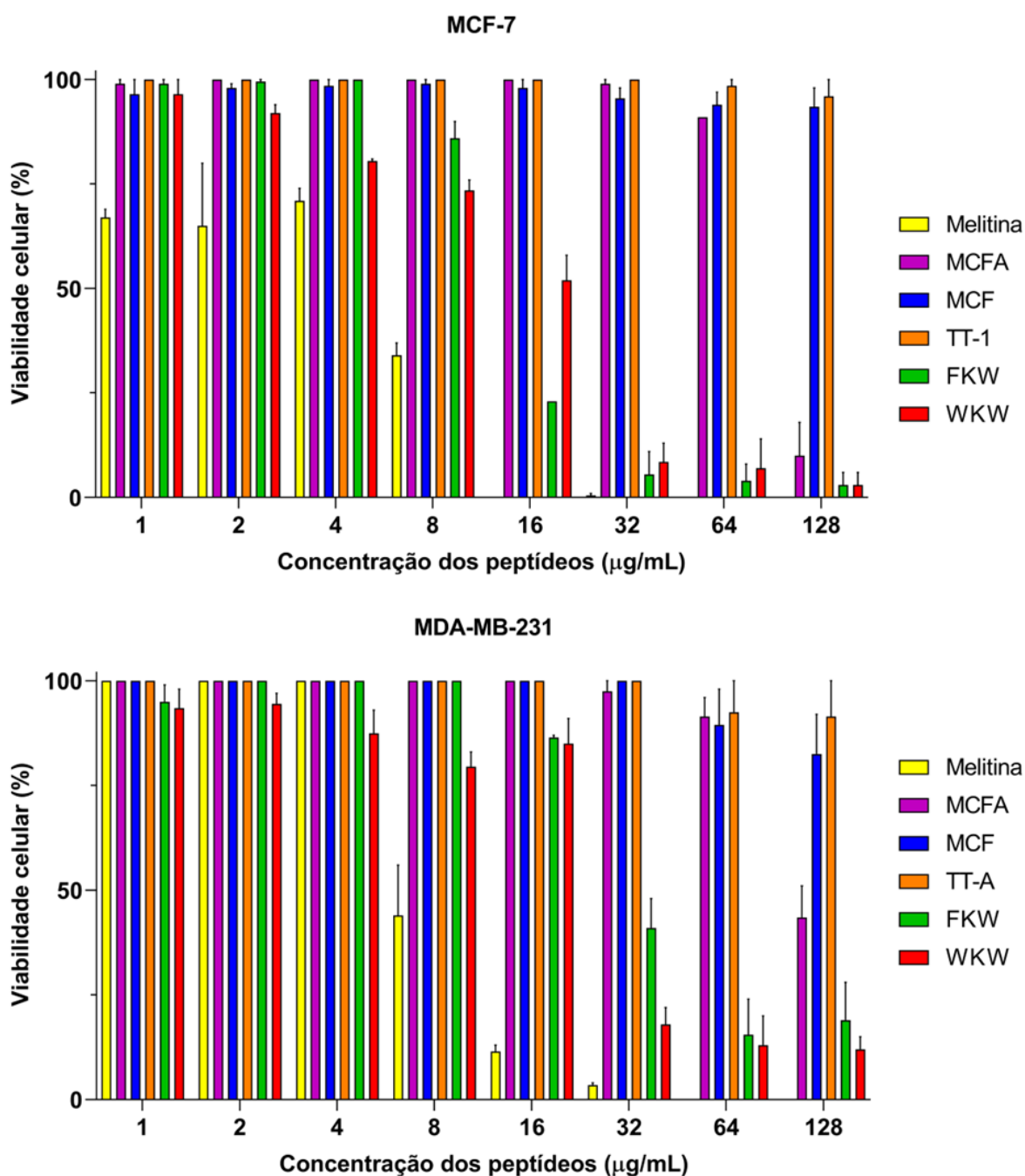


Figura 9: Avaliação da viabilidade celular das linhagens MRC-5, A549, MCF-7 e MDA-MB-231 em 24h de tratamento com os peptídeos, nas concentrações de 1 a 128 µg/mL.

Fonte: elaborado pela própria autora.

A partir dos dados obtidos no ensaio de viabilidade celular, foram calculados os valores de IC_{50} , concentração necessária para que ocorre redução de 50% da viabilidade celular, e o índice de seletividade (I.S), dado pela razão entre a IC_{50} da célula não tumoral e a IC_{50} da célula tumoral, dos peptídeos Melitina, TT-1, FKW, WKW, MCF e MCFA, listados na tabela abaixo.

Tabela 4: Valores de IC₅₀ e I.S. para os peptídeos Melitina, MCFA, MCF, TT-1, FKW e WKW testados nas linhagens MRC-5, A549, MCF-7 e MDA-MB-231.

Peptídeos	IC ₅₀				I.S		
	MRC-5	A549	MCF-7	MDA-MB-231	A549	MCF-7	MDA-MB-231
Melitina	5.8 ± 0.9	3.8 ± 0.31	7.0 ± 0.7	7.7 ± 0.3	1.5	0.8	0.7
MCFA	105.9 ± 3.1	115.3 ± 15.4	91.3 ± 2.5	119.4 ± 3.1	0.9	1.2	0.9
FKW	30.5 ± 3.0	45.5 ± 2.4	12.2 ± 0.4	30.4 ± 2.6	0.7	2.5	1.0
WKW	25.8 ± 3.6	25.5 ± 2.4	13.6 ± 1.2	22.9 ± 1.2	1.0	1.9	1.1
MCF	>128	>128	>128	>128	-	-	-
TT-1	>128	>128	>128	>128	-	-	-

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Os valores de I.S observados na Tabela 4 demonstram que os peptídeos FKW e WKW apresentam maior seletividade que a Melitina em relação a linhagem MCF-7.

4.5 ENSAIO CLONOGÊNICO

Com o intuito de avaliar a viabilidade reprodutiva das células, ou seja, a capacidade de gerar uma colônia de 50 ou mais células mediante tratamento com os peptídeos, foi realizado o ensaio clonogênico (Franken, 2006). As células foram tratadas com os peptídeos na concentração da IC₅₀ da Melitina para as linhagens MRC-5, A549 e MCF-7, plaqueadas em placas de 6, mantidas em estufa a 37°C por 8 dias. Após isso, foram fixadas com paraformaldeído 14% e coradas com solução de violeta cristal.

Para a linhagem celular MRC-5, não tumoral de pulmão, na IC₅₀ da Melitina, pode-se observar que mesmo após o tratamento com os peptídeos MCFA e FKW, a célula manteve a capacidade de se regenerar, formando aproximadamente 100% de colônias compostas por 50 células ou mais. Para o peptídeo WKW, é possível notar que há uma formação de 77,5% de colônias em relação ao controle. O tratamento com Melitina, por sua vez, possibilitou a formação de 70% de colônias em sua IC₅₀.

Na linhagem celular tumoral de pulmão, A549, temos que o tratamento na IC₅₀ da Melitina com os peptídeos MCFA e FKW não afetou a formação de colônias, a porcentagem manteve-se próxima do controle. O peptídeo WKW levou a uma formação de 63,7% de colônias, quando comparado ao controle. Para a Melitina, é

possível observar que o tratamento não afetou a formação de colônias de maneira significativa, com um valor em torno de 85%.

Para a MCF-7, linhagem tumoral de mama, observa-se que o tratamento com o peptídeo MCFA apresentou uma porcentagem de colônias de 81%, não afetando de forma significativa a reprodutibilidade da célula. Para o peptídeo FKW, temos um resultado diferente quando comparado a outras linhagens, com um valor de 65,5% de colônias. O tratamento com WKW afetou a formação de colônias de forma que a porcentagem foi de 71,6%. Para a Melitina, a formação de colônias não foi afetada de forma significativa, de modo que a porcentagem foi de 87,5%, mesmo em sua IC_{50} .

Já para a MDA-MB-231, linhagem tumoral de mama, nota-se que o tratamento com a Melitina não afetou a formação de colônias de maneira significativa, apresentando 82,6% de colônias relativas ao controle. Os análogos FKW e WKW se comportaram de maneira semelhante, já o tratamento com o peptídeo MCFA não provocou diminuição na formação de colônias.

Os resultados estão exibidos na Figura 10.

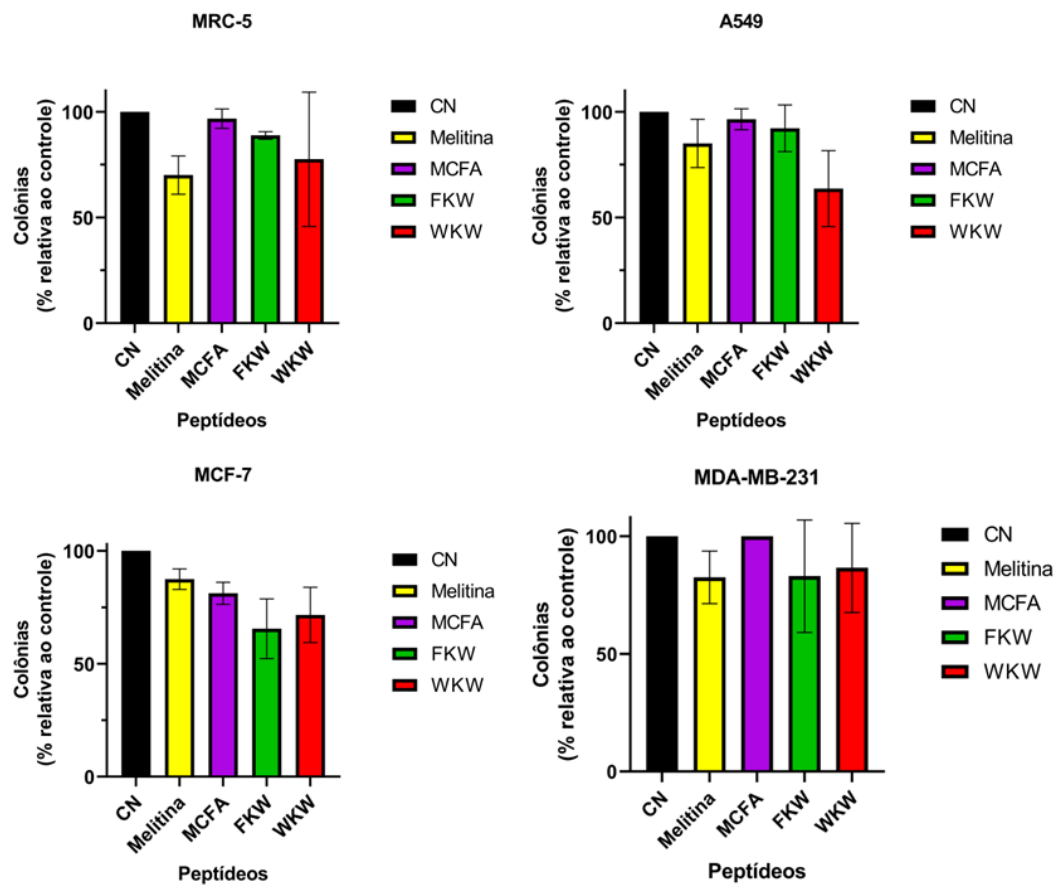


Figura 10: Ensaio clonogênico para as linhagens celulares MRC-5, A549, MCF-7 e MDA-MB-231, nas concentrações de IC50 da Melitina.

Fonte: elaborada pela própria autora.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o encurtamento e modificações específicas da estrutura da Melitina geram peptídeos com características físico-químicas interessantes, como maior hidrofobicidade e momento hidrofóbico. Além disso, todos os análogos foram expressivamente menos tóxicos, com menores valores de atividade hemolítica e citotoxicidade para as linhagens não tumorais humanas, características que diferem da Melitina, visto que sua alta toxicidade para células normais impede a sua implementação na clínica médica. Em relação ao ensaio clonogênico, nota-se que o tratamento com os peptídeos não altera de forma significativa a formação de colônias das linhagens testadas.

Entre os análogos estudados, é possível notar que os peptídeos FKW e WKW, que são modificações estratégicas da sequência do TT-1, possuem os melhores resultados em relação a Melitina e aos demais análogos testados, principalmente para a linhagem celular MCF-7, tumoral de mama.

Apesar dos peptídeos FKW e WKW apresentarem os melhores resultados e possuírem maior seletividade que a Melitina, esse potencial ainda pode ser aprimorado através de outras modificações em suas sequências, tais como dimerização, dendrimerização e bioconjugação, alterações conhecidas por aumentarem a atividade de AMPs e ACPs.

Assim, espera-se que este trabalho contribua para os estudos de peptídeos bioativos com potencial antitumoral, a partir de novas modificações nas moléculas mais promissoras, visto que o câncer ainda é uma das principais causas de morte no mundo.

REFERÊNCIAS

- ADADE, C. M. *et al.* Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v. 69, p. 227-239, 2013.
- ALJABERY, F. *et al.* The expression profile of p14, p53 and p21 in tumour cells is associated with disease-specific survival and the outcome of postoperative chemotherapy treatment in muscle-invasive bladder cancer. *In: Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier, 2018. p. 530.e7-530.e18.
- ALMEIDA, V. L. de *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- ASKARI, P. *et al.* In vitro and in vivo toxicity and antibacterial efficacy of melittin against clinical extensively drug-resistant bacteria. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 42, 2021.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024.
- CUERVO-RODRÍGUEZ, R. *et al.* Hemolytic and antimicrobial activities of a series of cationic amphiphilic copolymers comprised of same centered comonomers with thiazole moieties and polyethylene glycol derivatives. **Polymers**, v. 12, n. 4, p. 972, 2020.
- CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v. 17, n. 4, p. 589-592, 1991.
- FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 163, 1965.
- FRANKEN, N. A. P. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2315-2319, 2006.
- GASTEIGER, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *In: WALKER, J. M. (ed). The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa: Humana Press, 2005. p. 571-607.
- GAUTIER, R. *et al.* HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. **Bioinformatics**, v. 24, n. 18, p. 2101-2102, 2008.
- GAWDE, U. *et al.* CAMPR4: a database of natural and synthetic antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D377-D383, 2023.

GHADIRI, N. *et al.* Bioactive peptides: an alternative therapeutic approach for cancer management. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1310443, 2024.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HELMERHORST, E. J. *et al.* A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. **FEBS Letters**, v. 449, n. 2-3, p. 105-110, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2023**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

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.

KALITA, B.; SAVIOLA, A. J.; MUKHERJEE, A. K. From venom to drugs: A review and critical analysis of Indian snake venom toxins envisaged as anticancer drug prototypes. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 4, p. 993-1005, 2021.

KORDI, M. *et al.* Antimicrobial peptides with anticancer activity: Today status, trends and their computational design. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 733, p. 109484, 2023.

LEE, G.; BAE, H. Anti-inflammatory applications of melittin, a major component of bee venom: Detailed mechanism of action and adverse effects. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 616, 2016.

LEKOVIC, M. H. *et al.* Extremely low-frequency electromagnetic field induces a change in proliferative capacity and redox homeostasis of human lung fibroblast cell line MRC-5. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 39466-39473, 2020.

MAGANA, M. *et al.* The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. e216-e230, 2020.

MAJC, B. *et al.* Bioactive peptides from venoms against glioma progression. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 965882, 2022.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MOHAMED ABD EL-AZIZ, T.; SOARES, A. G.; STOCKAND, J. D. Snake venoms in drug discovery: valuable therapeutic tools for life saving. **Toxins**, v. 11, n. 10, p. 564, 2019.

MUTTENTHALER, M. *et al.* Trends in peptide drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 4, p. 309-325, 2021.

OFFOR, B. C.; PIATER, L. A. Snake venom toxins: Potential anticancer therapeutics. **Journal of Applied Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 666-685, 2024.

PAN, X. *et al.* Anticancer activity of a hexapeptide from skate (*Raja porosa*) cartilage protein hydrolysate in HeLa cells. **Marine Drugs**, v. 14, n. 8, p. 153, 2016.

PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1693-1703, 2003.

PICOLI, T. *et al.* Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk. **Microbial Pathogenesis**, v. 112, p. 57-62, 2017.

PUCCA, M. B. *et al.* Bee updated: current knowledge on bee venom and bee envenoming therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2090, 2019.

QU, B. *et al.* Anticancer activities of natural antimicrobial peptides from animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1321386, 2024.

RADY, I. *et al.* Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 402, p. 16-31, 2017.

SAN-MILLAN, I. *et al.* Role of lactate in the regulation of transcriptional activity of breast cancer-related genes and epithelial-to-mesenchymal transition proteins: a comparison of MCF7 and MDA-MB-231 cancer cell lines. **bioRxiv**, 2023.

SARKAR, T.; CHETIA, M.; CHATTERJEE, S. Antimicrobial peptides and proteins: from nature's reservoir to the laboratory and beyond. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 691532, 2021.

SATTAYAWAT, P. *et al.* A Comparative Study of Melittins from *Apis florea* and *Apis mellifera* as Cytotoxic Agents Against Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cells and Their Combination with Gefitinib. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 6, p. 2498, 2025.

SKALICKOVA, S. *et al.* Perspective of use of antiviral peptides against influenza virus. **Viruses**, v. 7, n. 10, p. 5428-5442, 2015.

SUBBALAKSHMI, C.; NAGARAJ, R.; SITARAM, N. Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. **FEBS Letters**, v. 448, n. 1, p. 62-66, 1999.

TORRES, M. D. T. *et al.* Peptide design principles for antimicrobial applications. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3547-3567, 2019.

WAN, L. *et al.* TT-1, an analog of melittin, triggers apoptosis in human thyroid cancer TT cells via regulating caspase, Bcl-2 and Bax. **Oncology Letters**, v. 15, n. 1, p. 1271-1278, 2018.

WANG, C. H. *et al.* Transcriptome analysis of human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-435 by RNA-Seq. **Molecular Biology**, v. 49, p. 244-252, 2015.

WANG, X.-C. *et al.* The Adaptive Responses in Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cell Lines Induced by Low-Dose Ionizing Radiation and the Variations of miRNA Expression. **Dose-Response**, v. 19, n. 4, p. 15593258211039931, 2021.

WU, Z.; XIA, F.; LIN, R. Global burden of cancer and associated risk factors in 204 countries and territories, 1980–2021: a systematic analysis for the GBD 2021. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 17, n. 1, p. 119, 2024.

ZHANG, H.-Q. *et al.* The current landscape of the antimicrobial peptide melittin and its therapeutic potential. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1326033, 2024.