

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACEUTICAS

Manuela de la Rosa Arbeláez

Peptídeo derivado da lactoferricina bovina: síntese, caracterização, avaliação da atividade frente a linhagens celulares de câncer de mama e desenvolvimento preliminar de formulação lipossomal

JUIZ DE FORA
2024

Manuela de la Rosa Arbeláez

Peptídeo derivado da lactoferricina bovina: síntese, caracterização, avaliação da atividade frente a linhagens celulares de câncer de mama e desenvolvimento preliminar de formulação lipossomal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

**JUIZ DE FORA
2024**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Arbeláez, Manuela de la Rosa.

Peptídeo derivado da lactoferricina bovina: síntese, caracterização, avaliação da atividade frente a linhagens celulares de câncer de mama e desenvolvimento preliminar de formulação lipossomal. / Manuela de la Rosa Arbeláez. -- 2024.

89 p.

Orientador: Guilherme Diniz Tavares

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Câncer de mama. 2. Peptídeo. 3. Lactoferricina bovina. 4. Lipossoma. I. Tavares, Guilherme Diniz, orient. II. Título.

Manuela de la Rosa Arbeláez

Peptídeo derivado da lactoferricina bovina: síntese, caracterização, avaliação da atividade frente a linhagens celulares de câncer de mama e desenvolvimento preliminar de formulação lipossomal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 31 de janeiro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Dr. Guilherme Diniz Tavares – Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Rodrigo Moreira Verly

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Dr. Frederico Pittella Silva

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 03/01/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Diniz Tavares, Professor(a)**, em 31/01/2024, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Moreira Verly, Usuário Externo**, em 31/01/2024, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Pittella Silva, Professor(a)**, em 31/01/2024, às 18:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.ufff.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1649694** e o código CRC **A1797635**.

Agradeço a oportunidade que a Universidade de Juiz de Fora, Brasil, me deu de realizar esse trabalho junto com toda a motivação que me deram meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração ao meu orientador Guilherme Diniz Tavares, pois sem o apoio, confiança e motivação que ele me deu este trabalho não teria sido possível, além de estar aberto a realizar um projeto em colaboração com um grupo de pesquisa da Colômbia e por me dar a oportunidade de ter uma experiência no exterior que ficará para sempre no meu coração.

Agradeço também a toda minha família, principalmente aos meus pais, pois sem o apoio e motivação que me deram, a minha experiência no estrangeiro teria sido diferente. Aos professores Zuly Rivera e Javier García do grupo de pesquisa SAMP por me orientarem e ensinarem desde 2019, além de confiar e me apoiar neste projeto sem pedir nada em troca. Ademais, agradeço o apoio do David Ramirez, Mateo, Karen, Diego, Hector, Natalia e a Andrea do grupo SAMP, que, apesar da distância, estão comigo há muito tempo no meu processo de aprendizagem em peptídeos e sempre estiveram dispostos a ajudar.

Para minha família brasileira, o LDNano, tenho muito por agradecer, pois foram muitos os conselhos, as judas, as trocas de palavras e as risadas que compartilhamos juntos. Sou grata por ter conhecido pessoas tão lindas que caminharam comigo nesse projeto, pessoas como Natalia e Rafael, Davi, o Prof. Frederico, Mariana Leite, Andrea e Chico, a Profa. Juliana, Ana Claudia e Thais, Bia, Milena, Dominique, Thiago, Flavia, Gui, João, Kézia, Lais, Livia Silva, Maria Fernanda, Wilson, Mirsi, Fernanda e Wanderleya. Todos foram fundamentais no meu processo, pois aprendi muito com eles e me ajudaram quando mais precisei no meu projeto e como amigos. Agradeço também ao Prof. Diego da UFMG e a Juliana por me abrir as portas do seu laboratório e desenvolver os lipossomas comigo, além de me mostrar a cidade de Belo Horizonte.

Quero também agradecer pela motivação, momentos, viagens, amizade e suportes emocionais que pessoas como Laura Villarraga, Natalia Casas, Carlos Muñoz, Erika Echeverry, Nicolas Menendez, Daryan Alejandra, Juan David Caicedo, Laura Cancino, Natalia Alves, Daniel Velandia, David Benavides, Daniela Mayorga, Camila Raigoso, Daniel Vega, Carol Estrela, Laura Carolina, Mariana

Arbeláez, Sebastian e muitos mais, me deram desde a distância. São pessoas que caminham comigo há muito tempo e sei que conto com seu apoio sempre.

À CAPES pela bolsa de mestrado, à *Universidad Nacional de Colombia* e à Universidade Federal de Juiz de Fora, por me derem a oportunidade de ter uma educação de qualidade e aprender de mãos dadas com excelentes profissionais como os professores e técnicos de cada uma dessas instituições.

RESUMO

A proposta deste trabalho foi sintetizar e caracterizar dois peptídeos derivados da lactoferricina bovina ($^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ e $^{26}\text{[1-NAL] LfcinB (20 - 30)}_2$), avaliar a atividade *in vitro* frente a linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MD-231) e posteriormente desenvolver uma formulação lipossomal para a encapsulação do peptídeo considerado mais promissor. Os peptídeos foram obtidos por síntese em fase sólida (SPPS) utilizando a metodologia 9-fluorenilmetiloxicarbonilo/terc-butila (Fmoc/tBu), purificados por cromatografia SPE e as frações coletadas foram analisadas por CLAE-FR, ESI-Q-TOF e MALDI-TOF. O grau de pureza foi maior que 80% para ambos os peptídeos. Os resultados de CLAE-FR evidenciaram que os tempos de retenção obtidos foram semelhantes aos reportados na literatura. Os espectros de massa ESI-MS apresentaram sinais de $[\text{M}+\text{H}]^+$ muito próximos das razões m/z esperadas, o que pôde confirmar a identidade química dos peptídeos. Ademais, a identificação molecular foi confirmada por MALDI-TOF/MS. Os peptídeos foram também avaliados com relação à influência na viabilidade de células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) e célula normal (CCD1059 SK) por meio do método de redução do sal de tetrazólio. Nesse caso, o peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ apresentou maior seletividade frente às células tumorais, especialmente para a linhagem MDA-MB-231, considerada altamente invasiva e com elevado potencial metastático. Por isso, foi escolhido para a continuidade do estudo. Na avaliação do efeito anti-migratório (*scracth assay*) frente às linhagens tumorais, esse peptídeo mostrou efeito dose-dependente com atividade inibitória mais pronunciada, também, para a linhagem MDA-MB-231. Finalmente, lipossomas (Lip) convencionais foram desenvolvidos por meio da técnica de nanoprecipitação para a encapsulação do peptídeo (Lip-Pep), os quais foram caracterizados em relação ao diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade, potencial Zeta (PZ), eficiência de encapsulação (EE) e perfil de liberação *in vitro*. As vesículas desenvolvidas apresentaram característica monodispersa ($\text{Pdl} < 0,3$). O DHm dos Lip-Pep ($102,6 \pm 9,91$ nm) foi maior que o observado para os Lip “brancos” (sem a adição do peptídeo; Lip-B = $74,99 \pm 1,32$ nm), o que constituiu o primeiro indício da ocorrência da encapsulação. A EE do

peptídeo nos lipossomas foi de aproximadamente 100%. O PZ dos Lip-Pep ($-22,3 \pm 3,54$ mV) apresentou-se menos negativo do que o obtido para os Lip-B ($-32,0 \pm 1,82$ mV), provavelmente devido a interações eletrostáticas entre o peptídeo catiônico e o fosfolípídeo aniônico utilizado para o preparo dos lipossomas. Essa hipótese pode explicar o resultado obtido no ensaio de liberação *in vitro*, o qual demonstrou não haver liberação do peptídeo durante as 24 horas do experimento. Esse comportamento inviabilizou avaliações adicionais da formulação. Assim, apesar de constatar uma promissora atividade do peptídeo frente à linhagem MDA-MB-231, para a continuidade do estudo será necessário desenvolver nova formulação lipossomal, possivelmente com fosfolípídeo não-inônico.

Palavras-chave: câncer de mama; peptídeo; lactoferricina bovina; lipossoma.

ABSTRACT

The purpose of this work was to synthesize and characterize two peptides derived from bovine lactoferricin ($^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ and $^{26}\text{[1-NAL] LfcinB (20 - 30)}_2$), to evaluate the *in vitro* activity against breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MD-231) and subsequently develop a liposomal formulation for the encapsulation of the peptide considered most promising. The peptides were obtained by solid phase synthesis (SPPS) using the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl/tert-butyl (Fmoc/tBu) methodology, purified by SPE chromatography and the collected fractions were analyzed by HPLC-FR, ESI-Q-TOF and MALDI-TOF. The purity was greater than 80% for both peptides. The HPLC-FR results showed that the retention times obtained were similar to those reported in the literature. The ESI-MS mass spectra showed $[\text{M}+\text{H}]^+$ signals very close to the expected m/z ratios, which confirmed the chemical identity of the peptides. Furthermore, molecular identification was confirmed by MALDI-TOF/MS. The peptides were also evaluated for their influence on the viability of tumor cells (MCF-7 and MDA-MB-231) and normal cells (CCD1059 SK) using the tetrazolium salt reduction method. In this case, the peptide $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ showed greater selectivity against tumor cells, especially for the MDA-MB-231 cell line, considered highly invasive and with high metastatic potential. Therefore, it was chosen to continue the study. When it was evaluated the anti-migratory effect (*scratch assay*) against tumor cell lines, this peptide showed a dose-dependent effect with more pronounced inhibitory activity, also for the MDA-MB-231 cell line. Finally, conventional liposomes (Lip) were developed using a nanoprecipitation technique for peptide encapsulation (Lip-Pep), which were characterized by means of hydrodynamic diameter (DHm), polydispersity index, Zeta potential (PZ), encapsulation efficiency (EE) and *in vitro* release profile. The developed vesicles showed a monodisperse characteristic ($\text{Pdl} < 0.3$). The DHm of Lip-Pep (102.6 ± 9.91 nm) was higher than that observed for "empty" Lips (without the addition of the peptide; Lip-B = 74.99 ± 1.32 nm), which constituted the first indication of the occurrence of encapsulation. The EE of the peptide in the liposomes was approximately 100%. The PZ of Lip-Pep (-22.3 ± 3.54 mV) was less negative than that obtained for Lip-B (-32.0 ± 1.82 mV), probably due to electrostatic

interactions between the cationic peptide and the anionic phospholipid used to prepare liposomes. This hypothesis may explain the result obtained in the *in vitro* release assay, which demonstrated that there was no release of the peptide during the 24 hours of the experiment. This behavior made further evaluation of the formulation unfeasible. Thus, although we found promising activity of the peptide against the MDA-MB-231 cell line, in order to continue the study it will be necessary to develop a new liposomal formulation, possibly with a non-ionic phospholipid.

Keywords: breast cancer; peptide; bovine lactoferricin; liposome.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenocarcinoma
ACN	Acetonitrila
Ahx	Ácido 6-aminohexanóico
Ala	Alanina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	Active Pharmaceutical Ingredients em inglês
ATPasa	Adenosinatrifosfatases
CDIS	Carcinoma ductal in situ
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CL	Carcinoma lobular
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Resolução em Fase Reversa
CLIS	Carcinoma lobular in situ
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
DPPC	Lípides dipalmitoilfosfatidilcolina
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPR	Efeito de permeação e retenção aumentados (Inglês: enhanced permeability and retention)
ER	Receptores hormonais de estrogênio (Inglês: Estrogen hormone receptors)
ERBB2 ou HER2	Fator de crescimento epidérmico humano 2 (Inglês: Human epidermal growth factor)
ERBB2+/HR+ ou HR-	Fator de crescimento epidérmico humano 2 positivo / Receptor hormonal positivo ou negativo
FDA	Food and Drug Administration dos Estados Unidos
Fmoc	Grupo protetor fluorenilmetiloxicarbonil

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Fmoc/tBu	Técnica de síntese orgânica de peptídeos através da desproteção de um grupo protetor do grupo amino dos aminoácidos denominado Fmoc e posterior acoplamento. E um grupo protetor terc-butil para as cadeias laterais.
Fmoc-Arg-OH	Como exemplo para os mecanismos de reação das Figura 5 e 6 usamos o aminoácido arginina com seu grupo protetor, chamado comercialmente de Fmoc-Arg-OH.
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH	Precursor de lisina para peptídeo dimérico e tetramérico
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HDPs	Peptídeos de defesa do hospedeiro (Inglês: Host Defense Peptides)
HR	Receptor hormonal (Inglês: Hormonal receptor)
HR+/ERBB2-	Receptor hormonal positivo / Fator de crescimento epidérmico humano 2 negativo
IDC	Carcinoma ductal invasivo
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IV	Administração de medicamentos ou fluidos através de uma agulha ou tubo inserido em uma veia.
LfcinB	Lactoferricina bovina: peptídeo derivado da Lactoferrina bovina.
LfcinB (17 – 41)	Sequência do aminoácido 17 até o 41 da Lactoferrina bovina ¹⁷ FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF ⁴¹ .
LfcinB (20 – 25)	Sequência do aminoácido 20 até o 25 derivado da lactoferricina bovina ²⁰ RRWQWR ²⁵ .
LF	Glicoproteína Lactoferrina bovina.
LTF	Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
<i>m/z</i>	Relação massa-carga

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NST	Carcinoma ductal do tipo não especial.
OMS	Organização Mundial da Saúde
PACs	Peptídeos anticancerígenos
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
PEG	Polyethylene glycol
PR	Receptores hormonais de progesterona (Inglês: Progesterone hormone receptors)
SAMP	Grupo de pesquisa da <i>Universidad Nacional de Colombia, Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas</i>
SFB	Soro fetal bovino
SPE	Cromatografia de extração em fase sólida
SPPS	Síntese de peptídeos em fase sólida
TFA	Ácido trifluoroacético
TIPS	triisopropil silano
Trp	Triptofano
UV/Vis	Espectro UV ou visível.
WHO	World Health Organization
[M+H] ⁺	Íon molecular (Íon da molécula estudada mais um hidrogênio)
1-NAL	1-naftil
²⁶ [F] LfcinB [20 – 30] ₂	Peptídeo dimerico sintético derivado da Lactoferricina bovina, cuja sequência de aminoácidos é (RRWQWRFKCLG) ₂ K-Ahx
²⁶ [1-NAL] LfcinB [20 – 30] ₂	Peptídeo dimerico sintético derivado da Lactoferricina bovina, cuja sequência de aminoácidos corresponde a (RRWQWR-1-NAL-KCLG) ₂ K-Ahx.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Tipos de nanopartículas comumente usadas nos estudos visando o tratamento do câncer de mama. 35
- Figura 2 - Estratégias de direcionamento de fármacos. **(a)**: entrega passiva de fármacos pelo efeito de permeação e retenção (EPR); e **(b)**: mecanismos ativos de entrega de fármacos. 36
- Figura 3 - Estruturas de alguns fosfolipídios comumente usados em formulações lipossomais. **a)** fosfatidilcolina, **b)** fosfatidilserina, **c)** fosfatidilglicerol, e, **d)** esfingomiéline. 38
- Figura 4 - Estrutura e classificação dos lipossomas. **(a)** Estrutura geral dos lipossomas; **(b)** Classificação das vesículas lipossomais de acordo com sua lamelaridade e tamanho de partícula. 41
- Figura 5 - Fluxograma da estratégia experimental do estudo. 44
- Figura 6 - Estrutura dos peptídeos: a) 26 [F] LfcinB [20 – 30]₂ cuja sequência de aminoácidos corresponde a (RRWQWRFK K LG)₂**K-Ahx** e sua massa molecular teórica (m/z) é 3344,10; e b) 26 [1-NAL] LfcinB [20 – 30]₂ cuja sequência de aminoácidos corresponde a (RRWQWR-1-NAL-KKLG)₂**K-Ahx** e sua massa molecular teórica (m/z) é 3444,22. 45
- Figura 7 - Eliminação do grupo Fmoc pela 4-metilpiperidina para formar um –NH₂ livre na resina inicial (reação *i*). 47
- Figura 8 - Mecanismo da reação de ativação por DCC/6-Cl-HOBt e acoplamento do Fmoc-aminoácido ativado ao -NH₂ da resina (reação *ii*). 48
- Figura 9 - Estrutura da resina acoplada ao ácido 6-aminohexanóico (Ahx) e ao resíduo de lisina com duplo grupo protetor (Fmoc-Lys(Fmoc)-OH) para facilitar a síntese de um peptídeo dimérico. 49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 10 - Sínteses do peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ em fase sólida (SPPS). 50
- Figura 11 - Sistema microfluídico homemade para o preparo dos lipossomas. 55
- Figura 12 - Cromatogramas dos peptídeos sintetizados e purificados. a) $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ e b) $^{26}\text{[1-NAL] LfcinB (20 - 30)}_2$. Condições CLAE-FR: Detector UV/Vis - 210 nm, coluna monolítica Chromolith C18 (50 × 4,6 mm), fase móvel em gradiente de 5% a 50% em 8 min com água-TFA a 0,05% e ACN-TFA a 0,05%, fluxo de 2,0 mL/min. 59
- Figura 13 - Espectrometria de massa ESI-MS para caracterização da estrutura do peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$. 59
- Figura 14 - Espectrometria de massa ESI-MS para caracterização da estrutura do peptídeo $^{26}\text{[1-NAL] LfcinB (20 - 30)}_2$. 60
- Figura 15 - Espectrometria de massas MALDI-TOF-MS para os peptídeos: A) $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$; e B) $^{26}\text{[1-NAL] LfcinB (20 - 30)}_2$. 61
- Figura 16 - Avaliação da viabilidade celular da linhagem **a)** MCF-7, **b)** MDA-MB-231 após 48h de exposição aos peptídeos sintetizados (Concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$), e **c)** CCD1059 SK após 48h de exposição (Concentrações de 400, 200, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$). 63
- Figura 17 - (a) Efeito de diferentes concentrações do peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ na migração das células MCF-7 após 24h e 48h de tratamento. (b) Percentagem de fechamento da ranhura em função do tempo (n = 4). 65

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 18 - (a) Efeito de diferentes concentrações do peptídeo $^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30)₂ na migração das células MDA-MB-231 após 24h e 48h de tratamento. (b) Percentagem de fechamento da ranhura em função do tempo (n = 4). 66
- Figura 19 - Cromatogramas correspondentes a: a) O peptídeo na concentração de 100 µg/mL. b) Dialisado referente ao Lip-B e c) Dialisado referente ao Lip-Pep. 71
- Figura 20 - Curva analítica, equação da reta e coeficiente de determinação para o peptídeo $^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30)₂ nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, e 12,5 µg/mL. 72
- Figura 21 - Perfil de liberação do peptídeo $^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30)₂ a partir dos lipossomas. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Categorização, informação molecular e as características clínicas dos tumores dos quais derivam algumas das 84 linhagens celulares de câncer de mama.	25
Tabela 2	-	Atividade citotóxica do motivo mínimo da LfcinB e seus derivados em diferentes linhagens de células cancerígenas.	30
Tabela 3	-	Exemplos de produtos lipossomais aprovados para uso humano.	39
Tabela 4	-	Resumo da caracterização analítica de peptídeos derivados da LfcinB por CLAE-FR e ESI-MS.	60
Tabela 5	-	Cl ₅₀ (µg/mL) dos peptídeos frente às linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e CCD1059 SK.	64
Tabela 6	-	IS para os peptídeos sintetizados.	64
Tabela 7	-	Características físico-químicas dos lipossomas*	69

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. CÂNCER DE MAMA.....	23
2.2. PEPTÍDEOS BIOATIVOS.....	27
2.3. PEPTÍDEOS DERIVADOS DA LACTOFERRICINA BOVINA (LfcinB)	28
2.4. NANOPARTÍCULAS NO TRATAMENTO DO CÂNCER	34
2.5. LIPOSSOMAS	37
3. OBJETIVOS	43
3.1. OBJETIVO GERAL.....	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1. DESENHO DO ESTUDO	44
4.2. SINTESE DOS PEPTÍDEOS	44
4.3. PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS.....	51
4.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS PEPTÍDEOS.....	51
4.5. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS.....	52
4.5.1. Avaliação da citotoxicidade	52
4.5.2. Avaliação do efeito anti-migratório	53
4.6. DESENVOLVIMENTO DOS LIPOSSOMAS.....	54
4.7. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS LIPOSSOMAS.....	56
4.7.1. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), Índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)	56
4.7.2. Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE)	56
4.7.3. Avaliação da liberação <i>in vitro</i>	57

4.7.4. Análises estatísticas	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS.....	58
5.2. AVALIAÇÃO DA INFLUENCIA DOS PEPTÍDEOS NA VIABILIDADE DE CÉLULAS MCF-7, MDA-MB-231 E CCD1059 SK.....	62
5.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-MIGRATÓRIO	65
5.4. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	
6. CONCLUSÃO	74
REFERENCIAS	75
ANEXO A - Estrutura química dos aminoácidos.	85
ANEXO B – Produção científica	89

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2020, 2,3 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama, com 685 mil óbitos em todo o mundo. Além disso, entre 2015 e 2020, foram relatados 7,8 milhões de diagnósticos de câncer de mama, o que torna essa neoplasia a mais prevalente do planeta (CHHIKARA; PARANG, 2023; WHO, 2021). Apesar dos avanços significativos no diagnóstico e detecção da doença, ainda há uma grande carência de terapias mais efetivas para o combate das formas invasivas, especialmente aquelas com elevada incidência de metástases (DURANTI *et al.*, 2021). Nesse sentido, os principais inconvenientes do tratamento medicamentoso envolvem a ocorrência de mecanismos de resistência do tumor, bem como efeitos colaterais gerados pela baixa seletividade dos fármacos frente às células tumorais, os quais atingem, também, células saudáveis (WAKS; WINER, 2019).

Pelo exposto, a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes para aplicação no tratamento do câncer de mama tem sido objeto de investigação de diversos estudos científicos (BAILLEUX *et al.*, 2021; SMOLARZ; NOWAK; ROMANOWICZ, 2022; WATASE *et al.*, 2021). Nesse contexto, a aplicação de peptídeos bioativos com atividade antitumoral vindo sendo investigada e os resultados mostram-se promissores (LI; GAO; SU, 2020; NEVAGI; TOTH; SKWARCZYNSKI, 2018; XIAO *et al.*, 2015). Essa abordagem é o alvo de pesquisas conduzidas pelo grupo de *Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas* (Grupo SAMP), coordenado pelos professores Dr. Javier García Castañeda, Dr^a Zuly Jenny Rivera Monroy e Dr. Ricardo Fierro Medina, do Departamento de *Química* da *Universidad Nacional de Colombia*, os quais são colaboradores deste trabalho. O grupo de pesquisa tem se dedicado a sintetizar peptídeos derivados da lactoferrina bovina (LfcinB (17 – 41), correspondente à sequência ¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹) e investigar sua aplicação no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o de mama. Dentre esses, os peptídeos desenhados a partir da sequência ²⁰RRWQWR²⁵ apresentaram maior eficácia *in vitro* (BARRAGÁN, *et al.*, 2020; BARRAGÁN *et al.*,

2023; GUERRA *et al.*, 2019; INSUASTY *et al.*, 2020; RAHMAN *et al.*, 2021; VARGAS *et al.*, 2017).

Apesar dos resultados encorajadores, os peptídeos bioativos apresentam o inconveniente de baixa estabilidade devido à sua rápida degradação *in vivo* (FROKJAER; OTZEN, 2005; MARQUS *et al.*, 2017). Assim, o delineamento de sistemas de liberação para a administração dessas moléculas é essencial. Dentre esses, os carreadores nanoestruturados apresentam vantagens significativas em comparação aos sistemas de liberação convencional, incluindo o aumento da estabilidade dos ativos encapsulados, além da propriedade de modular sua liberação (JAIN, 2020). Além disso, esses nanocarreadores possuem a capacidade de acúmulo na região tumoral via direcionamento passivo, o que pode contribuir para um maior aporte do fármaco no sítio de ação, com consequente redução da dose administrada e de possíveis efeitos colaterais (GOTE *et al.*, 2021).

Diversos tipos de nanoestruturas podem ser utilizadas para a encapsulação de substâncias ativas. Nessa perspectiva, devido à biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, os lipossomas vêm sendo amplamente estudados. Os lipossomas, além de contribuírem para o aumento da eficácia, são capazes de diminuir a toxicidade, garantir a estabilidade e favorecer o controle da liberação dos agentes encapsulados (GUIMARÃES *et al.*, 2021). Diante das potencialidades dessas nanoestruturas, produtos à base de lipossomas foram aprovados por diferentes agências regulatórias, incluindo FDA, EMA e ANVISA, para o tratamento de algumas patologias, incluindo o câncer (LIU *et al.*, 2022).

Diante do exposto, a proposta deste trabalho foi realizar a síntese, caracterização e posterior avaliação da atividade antitumoral de dois peptídeos derivados da lactoferricina bovina 26 [F] LfcinB (20 – 30)₂ e 26 [1-NAL] LfcinB (20 – 30)₂ contra linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). Dessa forma, este trabalho ainda propôs uma formulação lipossomal preliminar contendo o peptídeo considerado mais promissor foi desenvolvida e caracterizada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CÂNCER DE MAMA

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) define o câncer como um termo designado para mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas. Nesse sentido, a característica comum entre essas doenças diz respeito ao crescimento desordenado e excessivo de células, devido a mutações causadas nos pontos de controle do ciclo celular de uma célula eucariótica, as quais invadem tecidos adjacentes ou órgãos a distância (INCA, 2022; MATTHEWS *et al.*, 2022). Aproximadamente entre 19 e 20 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer anualmente, com mais de 10 milhões de óbitos estimados, em todo o mundo, no ano de 2020 (CHHIKARA; PARANG, 2023; FERLAY *et al.*, 2021). Em relação ao câncer de mama, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre 2015 e 2020, 7,8 milhões de mulheres haviam sido diagnosticadas com câncer de mama, tornando-o o câncer mais prevalente no planeta (DURANTI *et al.*, 2021; WHO, 2021). No caso do Brasil, são esperados 66.280 novos casos de câncer de mama até 2022, com risco estimado de 62 óbitos por cada 100.000 mulheres (SILVA, 2018).

O câncer de mama é uma doença heterogênea que compreende múltiplas manifestações associadas a características biológicas e histológicas específicas, bem como diferentes comportamentos e apresentações clínicas, apresentando vários fatores de risco e características patológicas. Os cânceres de mama podem ser classificados em subgrupos com base em sua diferenciação histológica (WEIGELT *et al.*, 2010). Nesse sentido, para o diagnóstico adequado e posterior decisão sobre o tratamento, é essencial o conhecimento das características histológicas e moleculares do carcinoma (HARBECK *et al.*, 2019). Assim, decide-se entre a aplicação de terapias locais, como a cirurgia, ou sistêmicas, como a quimioterapia e a terapia endócrina (HACK *et al.*, 2015; WAKS; WINER, 2019).

Em relação às características moleculares, sabe-se atualmente que dois principais marcadores moleculares foram identificados na patogênese do câncer de

mama. O primeiro é o receptor de estrogênio alfa ($ER\alpha$), que é um receptor de hormônio esteróide e fator de transcrição que ativa as vias de crescimento oncogênico em células de câncer de mama. Além disso, outro marcador da sinalização $ER\alpha$ é a expressão do receptor de progesterona (PR) do hormônio esteroide. Este marcador é expresso em aproximadamente 70% dos cânceres de mama invasivos. O segundo marcador molecular é o fator de crescimento epidérmico 2 (ERBB2 ou HER2). Este é um receptor tirosina quinase transmembranar da família do receptor do fator de crescimento epidérmico que é amplificado ou superexpresso em aproximadamente 20% dos cânceres de mama e está associado a um prognóstico ruim na ausência de tratamento sistêmico (WAKS; WINER, 2019).

Usando esses marcadores e sua origem no tecido mamário, Perou *et al* (2000) desenvolveram uma classificação intrínseca de quatro subtipos de câncer de mama. De acordo com os autores, dependendo da presença ou ausência de marcadores moleculares para receptores ER ou PR e também ao fator de crescimento HER2, pode-se classificar a doença nos subtipos: (i) luminal A; (ii) luminal B, dos quais ambos expressam ER; (iii) o subtipo não luminal ou enriquecido com HER2, sem expressão de ER e PR; e, finalmente, (iv) o câncer de tipo basal (GOTE *et al.*, 2021; PEROU *et al.*, 2000; WAKS; WINER, 2019).

Outra forma de classificar o câncer de mama é pela presença e ausência de receptores na superfície celular. Tumores que expressam ER e/ou PR são considerados câncer de mama de receptor hormonal positivo, enquanto tumores que não expressam ER, PR ou HER2 são cânceres de mama triplo negativo. Assim, tem-se o subtipo do receptor hormonal positivo/ERBB2 negativo ($HR+/ERBB2-$) presente em aproximadamente 70% dos casos, o tipo ERBB2 positivo ($ERBB2+/HR+$ ou $HR-$) com 10-15% dos pacientes e o câncer de mama triplo negativo, presente em aproximadamente 15% dos casos (DURANTI *et al.*, 2021; WAKS; WINER, 2019). O câncer de mama triplo negativo tem maior risco de apresentar recorrência do que os outros 2 subtipos, com uma sobrevida específica de 5 anos em 85% de indivíduos com tumores de estágio I comparado com um

índice de sobrevida específica de 94 – 99% para pacientes com carcinomas de receptores ERBB2+/HR+ (DURANTI *et al.*, 2021).

Por meio desse perfil de expressão gênica, 84 linhagens celulares de câncer de mama foram classificadas para estudos *in vitro*. Os mais comuns na literatura são MCF-7, T47D e MDA-MB-231 (DAI *et al.*, 2017). As características de apenas algumas linhagens celulares de câncer de mama encontram-se na Tabela 1. É importante mencionar que o subtipo Luminal A é considerado o câncer de mama menos agressivo e com melhor prognóstico, enquanto o subtipo triplo negativo A ou B é considerado o mais agressivo e mais difícil de diagnosticar (DAI *et al.*, 2017; HARBECK *et al.*, 2019; WAKS; WINER, 2019).

Tabela 1 – Categorização, informação molecular e as características clínicas dos tumores dos quais derivam algumas das 84 linhagens celulares de câncer de mama.

Linhagem celular	ER	PR	HER2	Subtipo	Tumor
MCF-7	+	+	-	Luminal A	Carcinoma ductal invasivo (IDC)
T-47D	+	+	-		
CAMA 1	+	+/-	-		
BT-474	+	+	+	Luminal B	Carcinoma ductal invasivo (IDC)
ZR7530	+	-	+		
AU565	-	-	+	HER2	Adenocarcinoma (AC)
MDA-MB-453	-	-	+		
MDA-MB-231	-	-	-	Triplo negativo B	Adenocarcinoma (AC)
MDA-MB-468	-	-	-		

Fonte: Adaptada de DAI *et al* (2017). As abreviaturas ER, PR e HER2 são os principais marcadores usados para a subtipagem de linhagem celular de câncer de mama.

Por outro lado, em relação ao diagnóstico histológico, existem dois subtipos de câncer de mama que ocorrem com maior frequência. O pré-invasivo, que se apresenta como carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e o carcinoma lobular *in situ* (CLIS), e o câncer de mama invasivo, o qual é dividido em carcinoma ductal do tipo não

especial (NST) (50 – 75% dos pacientes) e carcinoma lobular (CL) (5 – 15% dos pacientes) (HARBECK *et al.*, 2019; WEIGELT *et al.*, 2010) .

A terapia ideal para cada paciente depende do subtipo de tumor, da expressão imuno-histoquímica de proteínas-chave, do estágio anatômico e das preferências do paciente. Mais de 90% dos cânceres de mama não são metastáticos no momento do diagnóstico, portanto, o tratamento se concentra na erradicação do tumor através de cirurgia e na prevenção subsequente de recorrência. Pacientes com tumores do tipo HR+ recebem terapia endócrina e, na minoria dos casos, quimioterapia; pacientes com tumores positivos para ERBB2 recebem terapia com inibidores de metabólitos ou anticorpos direcionados em combinação com quimioterapia; já pacientes com tumores triplo-negativos recebem quimioterapia (WAKS; WINER, 2019). Porém, tanto o tratamento com terapia endócrina quanto com quimioterapia apresenta efeitos colaterais de longa duração que prejudicam a qualidade de vida das pacientes e a adesão ao tratamento (FRANZOI *et al.*, 2021).

De fato, além do alto custo, um dos principais problemas com os tratamentos disponíveis atualmente está atrelado à ocorrência de efeitos colaterais. Alguns efeitos colaterais associados à terapia endócrina incluem disfunção sexual, ganho de peso, alterações musculoesqueléticas, perda de densidade óssea, depressão, disfunção cognitiva e fadiga. Da mesma forma, os pacientes apresentam sintomas durante e após a quimioterapia como linfedema, alopecia, problemas nervosos, problemas urinários, insônia, anemia, trombocitopenia, constipação, diarreia, edema, entre outros (BAKARE *et al.*, 2021; BINKLEY *et al.*, 2012; FRANZOI *et al.*, 2021). Como exemplo específico, a doxorubicina, molécula amplamente utilizada no tratamento de muitos tumores, incluindo o câncer de mama, pode causar danos mediados pelo estresse oxidativo nos rins, coração e cérebro (MARQUS *et al.*, 2017).

Por outro lado, a utilização de taxanos e antraciclinas não têm sido totalmente eficazes no controle do câncer de mama, pois o tumor desenvolve resistência a esses fármacos. Além disso, ainda há uma grande carência de terapias mais eficazes para combater as formas invasivas, principalmente aquelas com alta incidência de metástases (DURANTI *et al.*, 2021).

Pelo exposto, um dos alvos de pesquisa atual de diversos estudos científicos é a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes e com pouco ou nenhum efeito colateral para reduzir a incidência de câncer de mama e sua crescente ameaça. Dentre essas, moléculas bioativas como sequências peptídicas com atividade anticancerígena (PAC) vêm sendo estudadas, apresentando resultados encorajadores (BAKARE *et al.*, 2021).

2.2. PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Uma das estratégias de proteção do sistema imune inato de invertebrados e vertebrados é o uso de peptídeos para proteger um hospedeiro de organismos externos. Essas moléculas são conhecidas como peptídeos de defesa do hospedeiro (HDPs, *Host Defense Peptides*) ou peptídeos antimicrobianos (PAMs) (BAKARE *et al.*, 2021; LIAO *et al.*, 2019). Os HDPs desempenham funções como agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios, imunomoduladores e antioxidantes, além de serem inibidores de proteases e antiparasitários. Além disso, muitas dessas moléculas têm se mostrado anticancerígenas (os peptídeos anticancerígenos, PACs). A grande maioria desses bioativos são sequências catiônicas curtas e anfipáticas (BAKARE *et al.*, 2021; DURANTI *et al.*, 2021; LIAO *et al.*, 2019; SIDDIQUA *et al.*, 2019).

Existem diferentes estratégias no uso de peptídeos para o tratamento do câncer, dentre essas, destacam-se a imitação de proteínas naturais para aumentar ou inibir a sinalização celular. Essa estratégia pode ser usada para terapias direcionadas especificamente para células cancerígenas ou como ferramenta para otimização do tráfego intercelular. Um exemplo específico dessa utilização é dado pelo uso clínico do peptídeo agonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) para o tratamento de câncer de próstata avançado e para câncer de mama. Alguns de seus nomes comerciais são Buserelin[®], Nafarelin[®] e Leuprolide[®], dentre outros (KURRIKOFF *et al.*, 2019).

Outros dois peptídeos que estão atualmente em ensaios clínicos (Fase I/II) também merecem destaque: i) clorotoxina, isolada do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus*, utilizada para o diagnóstico de gliomas no tratamento de câncer de

cérebro e pele; e ii) o composto peptídico BT1718 para o tratamento de tumores sólidos avançados (BENNETT *et al.*, 2017; DARDEVET *et al.*, 2015; NIH, 2024).

2.3. PEPTÍDEOS DERIVADOS DA LACTOFERRICINA BOVINA (LfcinB)

Dentre os HDPs de mamíferos, existe uma glicoproteína multifuncional ligadora de ferro originalmente descoberta no leite bovino denominada Lactoferrina bovina (LF) (~80 kDa). Na presença da pepsina, essa proteína é clivada em um peptídeo catiônico com 25 aminoácidos, conhecido como Lactoferrina bovina (LfcinB: ¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹) (vide Anexo A) que demonstrou ter ampla atividade antimicrobiana, antiviral, antitumoral e imunomoduladora (GIFFORD *et al.*, 2005; HUERTAS *et al.*, 2017; LIAO *et al.*, 2019; VARGAS *et al.*, 2017). A nomenclatura correspondente encontrada na literatura para este peptídeo refere-se às iniciais LfcinB (Lactoferrina bovina) e à numeração da sequência de aminoácidos que compõe o peptídeo dentro dos símbolos "()". Nesse caso, a numeração da sequência de aminoácidos que vem da proteína LF e que compõe o peptídeo com maior atividade antimicrobiana e anticancerígena refere-se à sequência que vai do resíduo 17 ao resíduo 41 (¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹).

Deve-se acrescentar que a sequência peptídica da LfcinB é carregada positivamente (+8), pois contém cinco argininas, três lisinas e alguns aminoácidos aromáticos (dois triptofanos e dois fenilalaninas), que lhe conferem importantes propriedades hidrofóbicas. De acordo com a literatura, essa propriedade permite a interação seletiva da LfcinB com células cancerosas, pois estas últimas são abundantemente carregadas negativamente em sua superfície (HILCHIE *et al.*, 2013; SOLARTE *et al.*, 2015).

Por outro lado, vários estudos mostram que o motivo mínimo do peptídeo derivado da LfcinB é a principal sequência de aminoácidos que gera atividade antimicrobiana e anticancerígena. O motivo mínimo refere-se à sequência de aminoácidos ²⁰RRWQWR²⁵ encontrada na molécula de LfcinB. Nesse sentido, a maioria de peptídeos desenhados e sintetizados que apresentam atividade

antimicrobiana ou anticancerígena contem essa sequência na sua estrutura. Por esta razão, estudos de atividade para diferentes linhagens de células cancerosas com sequências de aminoácidos desenhadas a partir do motivo mínimo da LfcinB são encontrados na literatura e algumas dessas sequências estão descritas na Tabela 2 (BARRAGÁN, A. *et al.*, 2020; GUERRA *et al.*, 2019; HUERTAS *et al.*, 2017; INSUASTY *et al.*, 2019; RICHARDSON *et al.*, 2009; SOLARTE *et al.*, 2015).

Ainda não há consenso em relação aos mecanismos de ação antimicrobiano e antitumoral dos peptídeos. No entanto, sabe-se que algumas sequências peptídicas são componentes-chave do sistema imune inato em todas as formas de vida, tanto vertebrados quanto invertebrados. Mesmo alguns insetos e crustáceos não possuem um sistema imune adaptativo e utilizam apenas o sistema imune inato como mecanismo de proteção. No caso dos estudos dos mecanismos dos peptídeos anticancerígenos, sabe-se que eles permeabilizam a membrana ou formam poros em sua superfície. Esse tipo de mecanismo representa uma vantagem, pois há menor probabilidade de desenvolver resistência do tumor ao tratamento (BAKARE *et al.*, 2021).

Por outro lado, foram encontrados peptídeos com atividade anticancerígena que interagem com a membrana sem causar danos, mas que conseguem internalizá-las, mediando a imunidade inata do hospedeiro ou bloqueando ativamente as vias que levam à formação do tumor (BAKARE *et al.*, 2021). Um exemplo é o peptídeo Mastoparan-C, cuja sequência de aminoácidos é INLKALAALAKKIL, o qual apresenta atividade contra vários tipos de cânceres, incluindo o câncer de mama. Nesse caso, o mecanismo de ação se dá através da indução da apoptose, com ativação da fosfolipase e inibição seletiva da atividade da ATPase (SIDDIQUA; KHATTAK; NWAZ, 2019). Outro exemplo é o peptídeo Buforin IIb (TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK), que atua por apoptose mitocondrial (BAKARE *et al.*, 2021; LIU; TAVANA; GU, 2019).

Tabela 2 – Atividade citotóxica do motivo mínimo da LfcinB e seus derivados em diferentes linhagens de células cancerígenas.

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	Linhagens celular	IC ₅₀ (μM)	Ref
²⁶ [D]-LfcinB (20-30) ₂	(RRWQWRDKKLG) ₂ -K*-Ahx	MCF-7 ^z	ND	(INSUASTY <i>et al.</i> , 2020)
		MDA-MB-468 ^z	>60	
²⁶ [K]-LfcinB (20-30) ₂	(RRWQWRKKKLG) ₂ -K*-Ahx	MCF-7 ^z	ND	
		MDA-MB-468 ^z	>60	
²⁶ [M]-LfcinB (20-30) ₂	(RRWQWRMKKLG) ₂ -K*-Ahx	MCF-7 ^z	>60	
		MDA-MB-468 ^z	30	
²⁶ [A]-LfcinB (20-30) ₂	(RRWQWRAKKLG) ₂ -K*-Ahx	MCF-7 ^z	>60	
		MDA-MB-468 ^z	26	
²⁶ [L]-LfcinB (20-30) ₂	(RRWQWRLKKLG) ₂ -K*-Ahx	MCF-7 ^z	20	
		MDA-MB-468 ^z	10	
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	(RRWQWRFKKLG) ₂ -K*-Ahx	MCF-7 ^z	6	
		MDA-MB-468 ^z	13	
LfcinB (20-25)	²⁰ RRWQWR ²⁵	MDA-MB-231 ^y	>203	(VARGAS <i>et al.</i> , 2017)
		MDA-MB-468 ^y	>203	
LfcinB (20-25) ₂	(RRWQWR) ₂ -K*-Ahx	MDA-MB-231 ^y	130	
		MDA-MB-468 ^y	>100	
LfcinB (20-25) ₄	(RRWQWR) ₄ -K* ₂ -Ahx ₂ -C ₂	MDA-MB-231 ^y	15	
		MDA-MB-468 ^y	6	
LfcinB (20-25) _{cyc}	C ^a -RRWQWR-Ahx ₂ -C ^a	MDA-MB-231 ^y	>200	
		MDA-MB-468 ^y	>200	

LfcinB (20–30)	²⁰ RRWQWRMKKLG ³⁰	MDA-MB-231 ^y	>130	
		MDA-MB-468 ^y	>130	
LfcinB (20–30) ₂	(RRWQWRMKKLG) ₂ –K*–Ahx	MDA-MB-231 ^y	14	
		MDA-MB-468 ^y	5	
LfcinB (20–30) ₄	(RRWQWRMKKLG) ₄ –K* ₂ –Ahx ₂ –C ₂	MDA-MB-231 ^y	6	
		MDA-MB-468 ^y	2	
LfcinB (20–30) _{cyc}	C ^a –RRWQWRMKKLG–Ahx–C ^a	MDA-MB-231 ^y	27	
		MDA-MB-468 ^y	>107	(VARGAS <i>et al.</i> , 2017)
¹⁹ [A]-LfcinB (17–31)	¹⁷ FKARRWQWRMKKLGA ³¹	MDA-MB-231 ^y	>102	
		MDA-MB-468 ^y	>102	
¹⁹ [A]-LfcinB (17–31) ₂	(FKARRWQWRMKKLGA) ₂ –K*–Ahx	MDA-MB-231 ^y	31	
		MDA-MB-468 ^y	11	
¹⁹ [A]-LfcinB (17–31) ₄	(FKARRWQWRMKKLGA) ₄ –K* ₂ – Ahx ₂ –C ₂	MDA-MB-231 ^y	9	
		MDA-MB-468 ^y	5	
¹⁹ [A]-LfcinB (17–31) _{cyc}	C ^a –FKARRWQWRMKKLGA–Ahx–C ^a	MDA-MB-231 ^y	>102	
		MDA-MB-468 ^y	>102	
1	_WQWRWQW_NH ₂	MDA-MB-231 ^y	>170	
		MCF-7 ^y	105	
R-1-R	R -WQWRWQW- R	MDA-MB-231 ^y	103	
		MCF-7 ^y	81	
RR-1-RR	RR -WQWRWQW- RR	MDA-MB-231 ^y	67	
		MCF-7 ^y	48	
R-1-RR	R -WQWRWQW- RR	MDA-MB-231 ^y	95	(BARRAGÁN <i>et al.</i> , 2023)
		MCF-7 ^y	122	
RR-1-R	RR -RWQWRWQW- R	MDA-MB-231 ^y	73	
		MCF-7 ^y	68	
R-1	R -WQWRWQW_NH ₂	MDA-MB-231 ^y	>150	
		MCF-7 ^y	58	
1-R	_WQWRWQW R -NH ₂	MDA-MB-231 ^y	>150	
		MCF-7 ^y	130	

LfcinB (21–25) _{Pal}	RWQWRWQWR		49	
A1	A WQWRWQWR		108	
A2	R AQWRWQWR		>115	
A3	R A WWRWQWR		106	
A4	RWQ A RWQWR	MDA-MB-468 ^z	>115	(BARRAGÁN, A. <i>et al.</i> , 2020)
A5	RWQW A WQWR		>108	
A6	RWQWR A QWR		115	
A7	RWQWR A WR		>106	
A8	RWQWRWQ A R		>115	
A9	RWQWRWQ A		>103	
LfcinB (21–25) _{Pal}	RWQWRWQWR	MDA-MB-231 ^y	135	(BARRAGÁN <i>et al.</i> , 2020)
		MCF-7 ^y	66	
LfcinB (20–25) ₄	(RRWQWR) ₄ -K* ₂ -Ah _{x2} -C ₂	MCF-7 ^x	22	(GUERRA <i>et al.</i> , 2019)
LfcinB (20–25)	RRWQWR	SCC 15 e	> 100	(SOLARTE <i>et al.</i> , 2015)
LfcinB (21–25) _{Pal}	RWQWRWQWR	CAL 27	22	
LfcinB (20–25) ₄	(RRWQWR) ₄ -K* ₂ -Ah _{x2} -C ₂		9	

Aminoácidos: **R**: arginina (arg), **W**: triptofano (trp), **Q**: glutamina (glu), **A**: alanina (ala), **L**: leucina (leu), **G**: glicina (gly), **F**: fenilalanina (phe), **M**: metionina (met), **K**: lisina (lys), **P**: prolina (pro), **S**: serina (ser), **I**: isoleucina, **T**: treonina (thr), **V**: valina (val), **K***: Precursor de lisina para peptídeo dimérico e tetramérico. **Ahx**: resíduo 6-aminohexanóico; **C^a** Precursor do peptídeo cíclico.

Tempo de tratamento: *1 hora; ^y2 horas; ^z24 horas.

ND: Não determinado.

No caso do peptídeo LfcinB, diferentes investigações mostraram que esse peptídeo induz a apoptose por diferentes vias em linhagens de células cancerígenas, como câncer de pulmão (A459), câncer intestinal (Caco-2), câncer renal (HTB9) e câncer de mama (HS578T e T47D) (DUARTE *et al.*, 2011). No entanto, outros estudos mostram que o peptídeo inibe o ciclo celular e induz o estresse oxidativo (ZHANG *et al.*, 2014).

Em relação aos derivados sintéticos da LfcinB, vários estudos mostram que existe uma forte relação entre a citotoxicidade contra linhagens celulares de câncer de mama e a posição, hidrofobicidade e carga positiva dos aminoácidos em tais peptídeos. Dentre esses, destaca-se a pesquisa realizada por Insuasty Cepeda e *et al* (2020), na qual foram sintetizados 6 peptídeos diferentes, alterando a posição 26 do peptídeo LfcinB (20-30)₂ (INSUASTY *et al.*, 2020). Na Tabela 2 é possível observar como os peptídeos com fenilalanina (²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂) e leucina (²⁶[L]-LfcinB (20-30)₂) deram os resultados de IC₅₀ mais promissores contra a linhagem celular MCF-7 (Luminal A) enquanto que não apresentaram toxicidade em linhagens saudáveis como MCF-12. Nesse estudo, os autores concluem que a citotoxicidade aumenta quando a hidrofobicidade também aumenta mostrando uma ordem de IC₅₀ de ²⁶[F] > ²⁶[L] > ²⁶[A] > ²⁶[M].

Além disso, outra pesquisa sugeriu que o aumento da carga positiva e do comprimento dos peptídeos derivados da LfcinB também aumenta o efeito citotóxico contra linhagens de câncer de mama. Nesse caso, os pesquisadores sintetizaram 6 peptídeos adicionando e excluindo arginina (Arg) no N-terminal, no C-terminal ou em ambas as extremidades da estrutura do peptídeo palindrômico LfcinB (21-25)_{Pal}. Os resultados de IC₅₀ podem ser observados na Tabela 2 e mostraram que a adição de arginina no N-terminal aumentou os efeitos citotóxicos, mantendo algum nível de seletividade (BARRAGÁN *et al.*, 2023).

Ademais, vários pesquisadores presumem que os resíduos de triptofano (Trp) na estrutura do peptídeo LfcinB desempenham um papel fundamental na sua internalização nas células cancerosas. Na tentativa de elucidar essa hipótese, Barragán *et al.* sintetizaram 9 peptídeos da LfcinB (21-25)_{Pal} substituindo alanina (Ala) em cada posição (Tabela 2) e avaliaram o efeito de citotoxicidade contra MDA-

MB-468. Os autores descobriram que a substituição do Trp por Ala diminuiu seu efeito citotóxico, sugerindo uma associação entre a hidrofobicidade e a posição do Trp com o modo de sua internalização na célula de câncer de mama (BARRAGÁN, A. *et al.*, 2020).

Uma das grandes vantagens dos derivados de LfcinB é sua baixa citotoxicidade em linhagens celulares normais como MCF-12 e PCS-201-012, apresentando, portanto, seletividade contra células cancerígenas. Assim, é possível sugerir que esse comportamento possa contribuir para a diminuição de efeitos colaterais (BAKARE *et al.*, 2021; BARRAGÁN, A. *et al.*, 2020; GUERRA *et al.*, 2019; HUERTAS *et al.*, 2017; INSUASTY *et al.*, 2020; RICHARDSON *et al.*, 2009; SOLARTE *et al.*, 2015). É importante ressaltar, também, que o peptídeo LfcinB (21-25)_{Pal} é o único derivado peptídico que foi testado *in vivo* usando um modelo de larvas de *Galleria mellonella*, mostrando uma taxa de sobrevivência de 90% após 10 dias quando administrado em uma dosagem de 800 µg/mg (BARRAGÁN *et al.*, 2023).

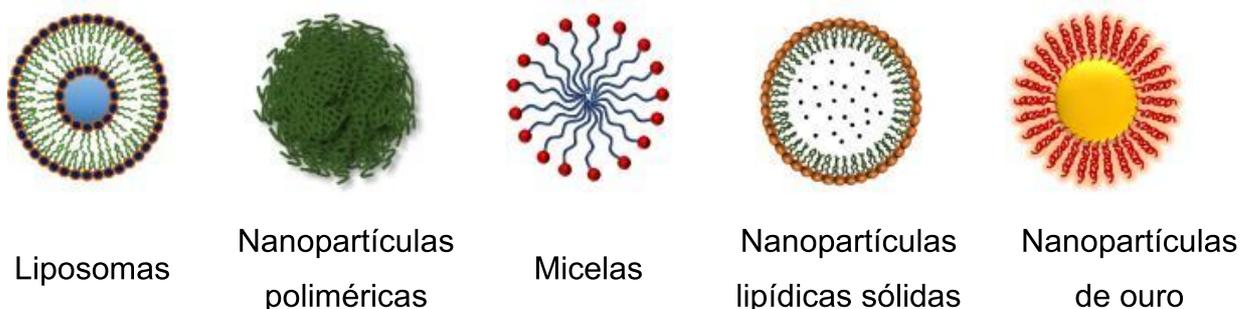
Por outro lado, as principais desvantagens dessas moléculas bioativas dizem respeito à sua elevada instabilidade frente a peptidase, o que dificultaria sua administração *in vivo* (FROKJAER; OTZEN, 2005; MARQUS *et al.*, 2017). Nesse sentido, a nanoestruturação desses ativos poderia contornar esse inconveniente.

2.4. NANOPARTÍCULAS NO TRATAMENTO DO CÂNCER

A encapsulação de fármacos em nanopartículas é uma estratégia atual que pode trazer inúmeros benefícios, tais como melhoria das propriedades biofarmacêuticas (solubilidade e permeabilidade), aumento de estabilidade, controle de liberação, direcionamento, redução de toxicidade e incremento de eficácia (ERDOĞAR *et al.*, 2019). Diversos materiais podem ser utilizados para o preparo das nanopartículas, o que pressupõe a obtenção de diferentes nanoestruturas. Para a utilização nos estudos envolvendo o tratamento do câncer, as formulações mais amplamente empregadas são as constituídas por lipossomas, micelas, nanopartículas

poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas e nanopartículas metálicas (Figura 1) (GOTE *et al.*, 2021; JAIN, K., 2020; JAIN, V. *et al.*, 2020; TRAN *et al.*, 2020).

Figura 1 - Tipos de nanopartículas comumente usadas nos estudos visando o tratamento do câncer de mama.

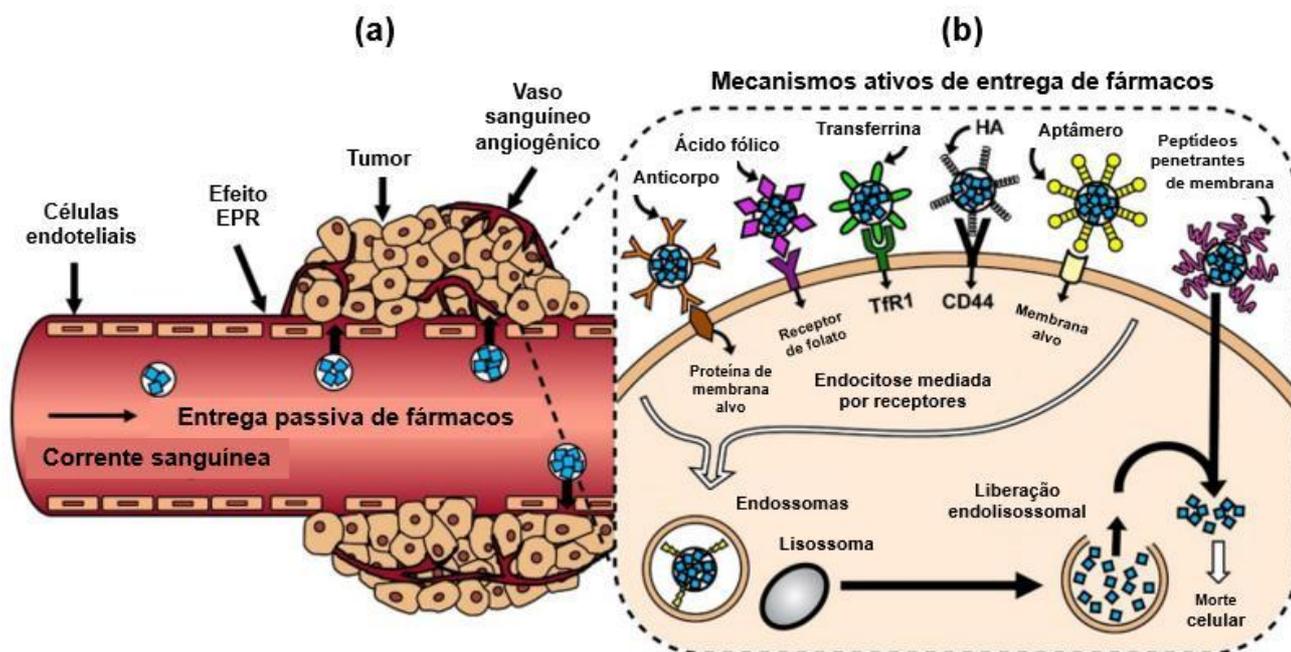


Fonte: Adaptado de TRAN *et al.*, 2020.

De forma geral, as nanopartículas podem ser usadas para a acumulação ativa ou passiva de fármacos na região do tumor. Na acumulação passiva, o direcionamento do fármaco ocorre devido ao efeito de permeação e retenção aumentados (EPR, *enhanced permeability and retention*). Nessa situação, em virtude do rápido processo de angiogênese no ambiente tumoral, no qual vasos sanguíneos são produzidos de maneira rápida e defeituosa pelo tumor, há a formação de fenestrações (com diâmetro entre 100 a 780 nm) entre as células do epitélio capilar (Figura 2). Devido à essas fenestrações, há uma maior permeação das nanoestruturas na região do tumor (KALYANE *et al.*, 2019). A esse respeito, a literatura descreve que nanopartículas com diâmetro médio entre 50-150 nm conseguiriam penetrar de maneira eficaz nessas fenestrações mais largas dos neovasos, sem atingir fenestrações estreitas dos endotélios dos tecidos normais (tamanho entre 5-10 nm) (LIECHTY; PEPPAS, 2012; FAN *et al.*, 2023).

Ademais, diante da redução da drenagem linfática no local, um maior acúmulo desses carreadores tende a ocorrer, o que permite que permaneçam por um maior tempo no sítio de ação (KALYANE *et al.*, 2019; LARGE *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2021).

Figura 2 – Estratégias de direcionamento de fármacos. **(a)**: entrega passiva de fármacos pelo efeito de permeação e retenção (EPR); e **(b)**: mecanismos ativos de entrega de fármacos.



Fonte: Adaptado de GOTE *et al*, 2021. **TfR1**: Proteína receptora de transferrina 1, em inglês *transferrin receptor protein 1*; **EPR**: efeito de permeação e retenção; **CD44**: O antígeno CD44 é uma glicoproteína transmembrana; e **HA**: hialuronano.

Por outro lado, o segundo mecanismo pressupõe a acumulação ativa. Nesse caso, os nanocarreadores ativamente direcionados usam certos receptores que são superexpressos em células cancerígenas para a entrega direcionada de agentes anticancerígenos. Essas nanopartículas geralmente contêm em sua superfície anticorpos, peptídeos, polímeros, aptâmeros de DNA e pequenas moléculas para detecção direcionada e captação por células cancerígenas (Figura 2) (GOTE *et al.*, 2021; TRAN *et al.*, 2020).

Exemplos de formulações comerciais com nanocarreadores para tratamento do câncer aprovados por diferentes agências regulatórias, tais como a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), incluem o Doxil™ e o Abraxane®. O Doxil™ (Janssen Cilag Farmacêutica) é uma formulação lipossomal contendo doxorrubicina, que mostrou

melhorias significativas em relação à doxorrubicina livre, incluindo o aumento da captação do fármaco pelo tumor. Já o Abraxane® (Abraxis Bioscience) é uma formulação de nanopartículas de paclitaxel ligada à albumina, o qual permitiu, além de melhorar a eficácia do fármaco, reduzir reações de hipersensibilidade relacionadas ao solvente e outras toxicidades associadas ao medicamento convencional (BHARALI *et al.*, 2009).

Além disso, outros medicamentos constituídos por nanocarreadores foram aprovados ou estão em ensaios pré-clínicos para o tratamento do câncer de mama em outros países. O Myocet™ é uma formulação lipossomal carregada com doxorrubicina aprovada para câncer de mama metastático com cardiotoxicidade reduzida em comparação com a doxorrubicina livre. Já o Lipusu™ representa a primeira formulação de lipossomas de paclitaxel e foi aprovado para uso clínico na China, em 2003, sendo capaz de reduzir os efeitos colaterais decorrentes do fármaco livre. Finalmente, a citarabina lipossomal (DepoCyt™) está em estudo clínico de Fase III para o tratamento de metástases leptomenígeas de câncer de mama (JUAN *et al.*, 2020).

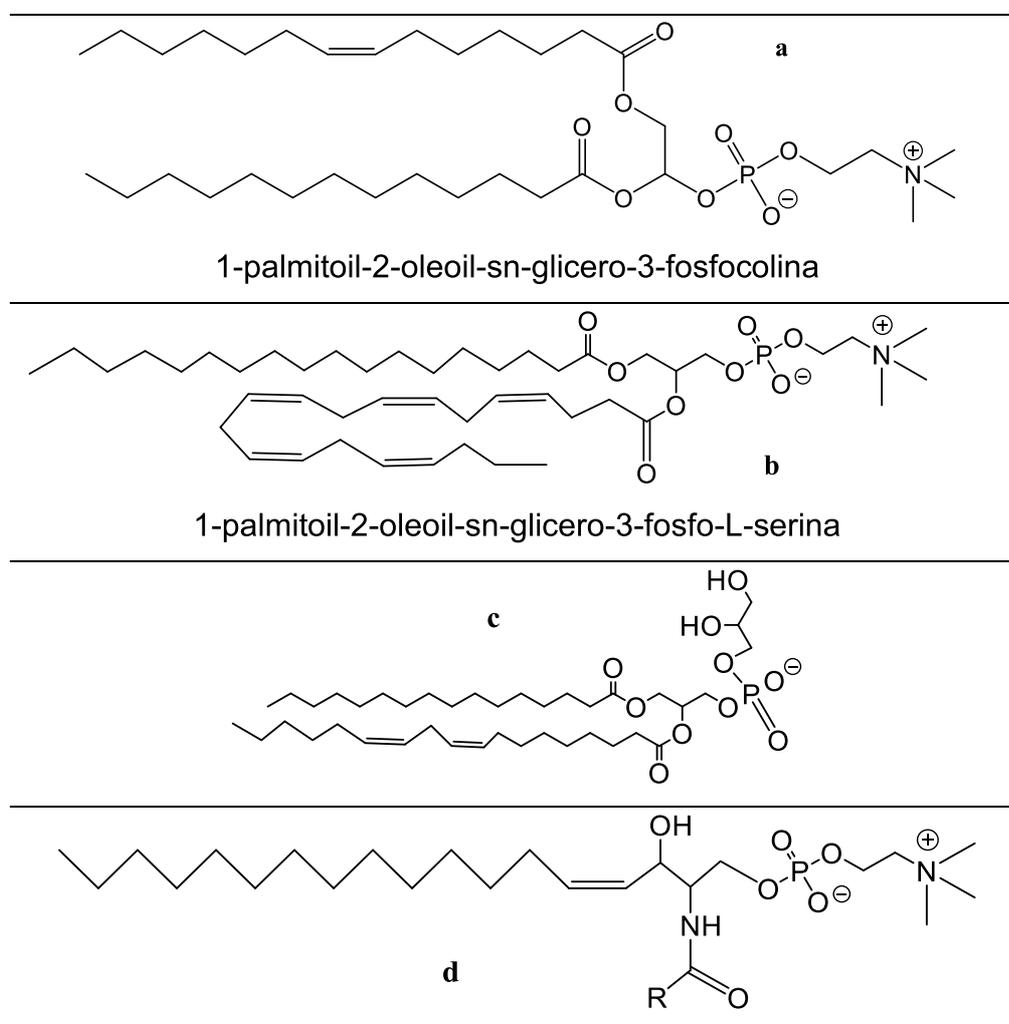
2.5. LIPOSSOMAS

Os lipossomas são vesículas constituídas por fosfolipídios (naturais, sintéticos ou semissintéticos), que formam uma bicamada e/ou uma série concêntrica de múltiplas bicamadas envolvendo um compartimento aquoso central (Figura 3a). Essas estruturas foram descobertas inicialmente por Alec D. Bangham e colaboradores no Instituto Babraham da Universidade de Cambridge, em 1965 (BANGHAM, A.D.; HORNE, 1964) e desde então, tornaram-se um veículo amplamente utilizado para encapsular e entregar moléculas para tratar uma variedade de doenças (BANGHAM, 1995; GUIMARÃES *et al.*, 2021; LARGE *et al.*, 2021).

Os fosfolipídios mais comumente empregados em formulações lipossomais são aqueles com forma cilíndrica, propensos a formar uma bicamada estável em meio aquoso. Exemplos desses fosfolipídios incluem fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline (Figura 3) (LARGE *et al.*, 2021).

Como são compostos por lipídeos anfífilicos, os lipossomas simulam uma membrana celular, permitindo uma boa interação com membranas de células de mamíferos, o que gera vantagens como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade (WANG *et al.*, 2023). Soma-se a isso a capacidade dos lipossomas em contribuir para o aumento da eficácia, diminuição da toxicidade e incremento da estabilidade, além de favorecerem o controle da liberação do fármaco encapsulado. Diante disso, vários produtos já foram aprovados para uso humano por diferentes agências regulatórias, incluindo FDA e EMA (LIU *et al.*, 2022). A Tabela 3 traz exemplos desses produtos.

Figura 3 – Estruturas de alguns fosfolipídios comumente usados em formulações lipossomais. a) fosfatidilcolina, b) fosfatidilserina, c) fosfatidilglicerol, e, d) esfingomielina.



Fonte: Elaborado pela autora com ChemDraw (2023).

Tabela 3 – Exemplos de produtos lipossomais aprovados para uso humano.

Nome comercial	Fármaco	Forma farmacêutica	Via de administração	Uso
Doxil Caelyx	Cloridrato de doxorubicina (DOX · HCl)	Suspensão	IV	Câncer de ovário, sarcoma de Kaposi, melanoma mieloide
DaunoXome	Daunorubicina	Suspensão	IV	Sarcoma de Kaposi
AmBisome	Anfotericina B (AmpB)	Pó para reconstituição	IV	Infecção fúngica sistêmica
DepoCyt DepoCyte	Citarabina	Suspensão	IT	Meningite linfomatosa
Myocet	DOX · HCl	Pó para reconstituição	IV	Câncer de mama
Visudyne	Verteporfina	Pó para reconstituição	IV	DMRI úmida
DepoDur	Morfina	Suspensão	Peridural	Analgesia pós-operatória
Mepact	MTP-PE	Pó para reconstituição	IV	Osteosarcoma
Exparel	Bupivacaína	Suspensão	Infiltração local	Analgesia pós-cirúrgica
Marqibo	Sulfato de Vincristina	Pó para reconstituição	IV	Leucemia
Onivyde	Cloridrato de irinotecano tri-hidratado	Suspensão	IV	Adenocarcinoma pancreático

Fonte: Adaptado de LIU; CHEN; ZHANG, 2022.

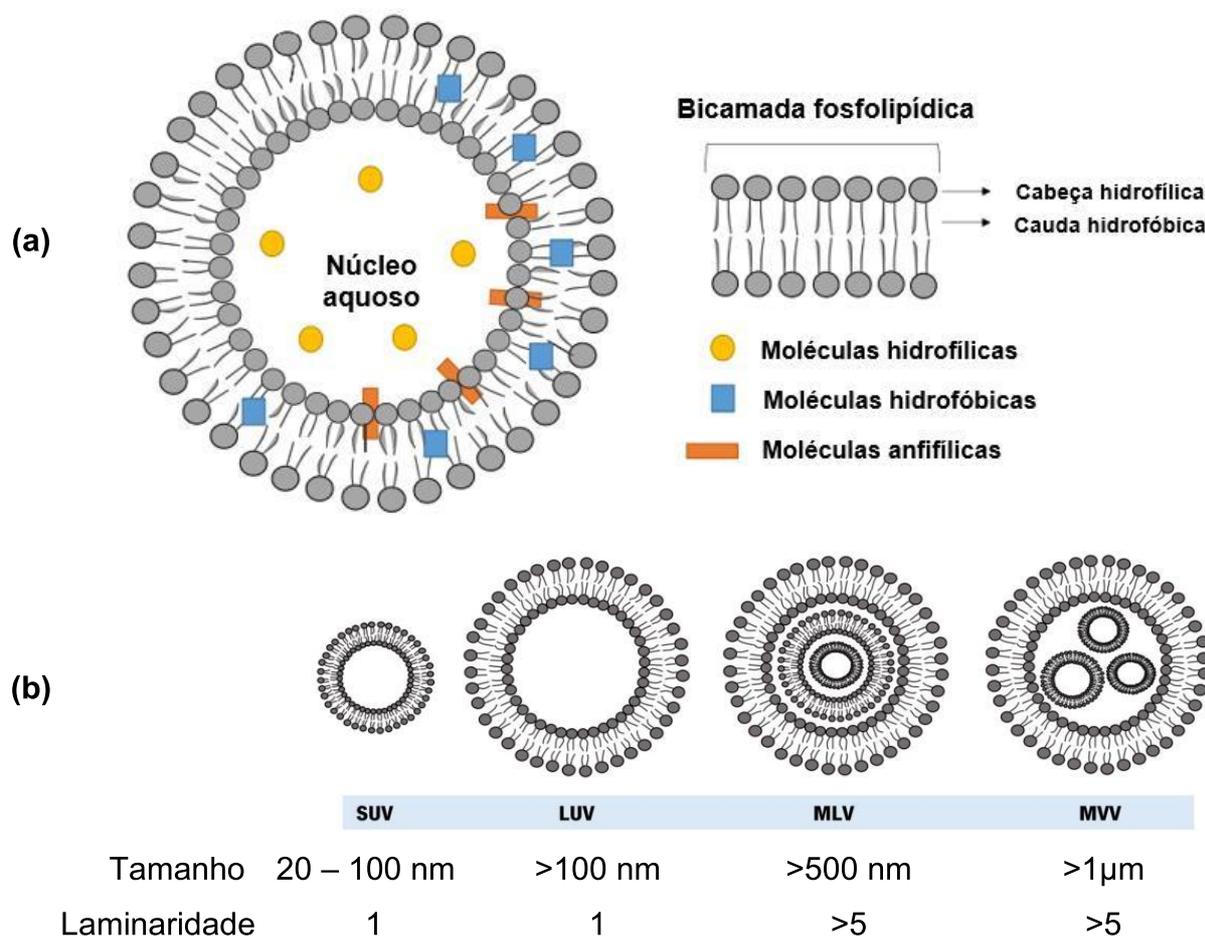
DMRI: Degeneração macular relacionada à idade, **IV:** Administração intravenosa, e, **IT:** injeção intratecal.

Os lipossomas são capazes de encapsular moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas e/ou anfífilas. Nesse sentido, moléculas hidrofílicas podem se localizar no compartimento aquoso ou se associar às vesículas por meio do estabelecimento de interações eletrostáticas com os grupamentos polares dos fosfolipídios. Por outro lado, as moléculas hidrofóbicas permanecem inseridas na bicamada lipídica e as anfífilas se organizam ao longo dos domínios polares e apolares (Figura 4a) (GUIMARÃES *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2023).

Dependendo da estrutura, do compartimento e da lamelaridade, os lipossomas podem ser classificados em vesículas unilamelares (LUVs, unilamellar vesicles em inglês), vesículas oligolamelares (OLVs, oligolamellar vesicles em inglês), vesículas multilamelares (MLVs, multilamellar vesicles em inglês) e lipossomas multivesiculares (MVLs, multivesicular liposomes em inglês) (Figura 4b). Os LUVs são divididos em três categorias, dependendo do tamanho de partícula: entre 20 – 100 nm tem-se as vesículas unilamelares pequenas (SUV, small unilamellar vesicles em inglês), os maiores de 100 nm são conhecidos como vesículas unilamelares médias (LUV, large unilamellar vesicles em inglês) e com tamanhos de 1 – 100 μm são vesículas unilamelares gigantes (GUV, giant unilamellar vesicles em inglês) (GUIMARÃES *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2022).

Além dos lipossomas unilamelares, as vesículas oligolamelares e multilamelares tem de 2 a 5, e até mais de 5 bicamadas, o que resulta em tamanhos de 100 – 1000 nm. Finalmente, com um tamanho maior do que 1 μm estão as vesículas multilamelares (MVV), as quais possuem em seu interior vários lipossomas menores (Figura 4b) (GUIMARÃES *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2022). O tipo de lipossoma obtido depende da técnica de preparo utilizada. Dentre essas, estão a hidratação de filme fino, sonicação, extrusão, homogeneização a alta pressão, evaporação em fase reversa, injeção por etanol e congelamento-descongelamento (LARGE *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2023).

Figura 4 – Estrutura e classificação dos lipossomas. **(a)** Estrutura geral dos lipossomas; **(b)** Classificação das vesículas lipossomais de acordo com sua lamelaridade e tamanho de partícula.



Fonte: Adaptado de GUIMARÃES *et al*, 2021.

Além da classificação com base no tamanho e lamelaridade, os lipossomas podem ser classificados de acordo com sua carga, o que depende do tipo de fosfolípido utilizado. Dessa forma, é possível a obtenção de lipossomas neutros ou eletricamente carregados (aniônicos ou catiônicos) (LARGE *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2023). Ademais, podem ser categorizados em cinco categorias principais:

- I) Lipossomas convencionais, quando preparados a partir da associação entre fosfolípidos e, geralmente, esteróis.

- II) Lipossomas furtivos ou PEGuilados (também denominados de “lipossomas de longa circulação” ou “*stealth liposomes*”), os quais apresentam moléculas de polietilenoglicol presentes em sua superfície externa. Essa estratégia visa aumentar o tempo de meia-vida plasmática quando em comparação aos lipossomas convencionais, os quais são rapidamente opsonizados após administração endovenosa.
- III) Lipossomas pH-sensíveis, os quais são constituídos por fosfolídeos que, devido à transição de fases, se desestabilizam em pH ácido, típico de microambientes patológicos (inflamações, infecções e tumores), liberando seletivamente o fármaco encapsulado nessas regiões;
- IV) Lipossomas sítio-específicos, os quais, além do revestimento com PEG, apresentam ligantes em sua superfície (por exemplo, anticorpos, proteínas, peptídeos e carboidratos) visando maior direcionamento do fármaco; e
- V) Lipossomas multifuncionais (ou teranósticos) nos quais estão encapsulados, além de fármacos, agentes de imagem para seu monitoramento *in vivo* (GUIMARÃES *et al*, 2021; LIU *et al.*, 2022).

É importante considerar que a liberação dos ativos encapsulados a partir dos lipossomas está associada a mudança da permeabilidade da bicamada lipídica, a qual está atrelada à temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalina (T_m). Nesse sentido, as cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolídeos permanecem naturalmente em estado rígido ordenado em temperatura abaixo da T_m . Assim, quando a temperatura se aproxima da T_m , os fosfolídeos da bicamada do lipossoma se tornam desordenados, gerando espaços entre os fosfolídeos e maior fluidez na bicamada, o que contribui para a difusão do fármaco encapsulado (CHEN *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de peptídeos derivados da lactoferricina bovina frente a linhagens celulares de câncer de mama e investigar a viabilidade de sua incorporação em formulação lipossomal.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

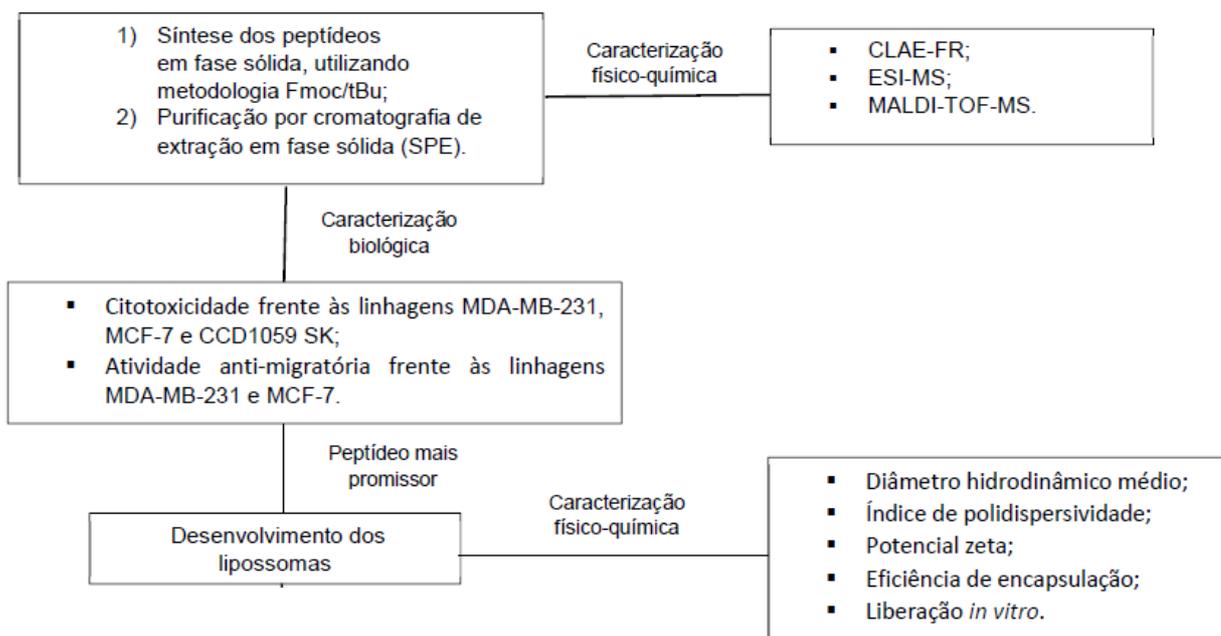
- Sintetizar e caracterizar os peptídeos $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ e $^{26}\text{[1-NAL] LfcinB (20 - 30)}_2$;
- Avaliar a atividade citotóxica frente às linhagens celulares de câncer de mama humano (MDA-MB-231 e MCF-7) e de fibroblasto humano (CCD1059 SK);
- Avaliar a atividade anti-migratória frente às linhagens celulares de câncer de mama humano (MDA-MB-231 e MCF-7);
- Desenvolver e caracterizar lipossomas contendo o peptídeo considerado mais promissor;
- Avaliar a liberação *in vitro* do peptídeo a partir dos lipossomas;
- Avaliar a atividade citotóxica dos lipossomas frente à linhagem MCF-7.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESENHO DO ESTUDO

O fluxograma abaixo (Figura 5) foi organizado para melhor entendimento da estratégia experimental adotada para o atingimento dos objetivos do trabalho.

Figura 5 – Fluxograma da estratégia experimental do estudo.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

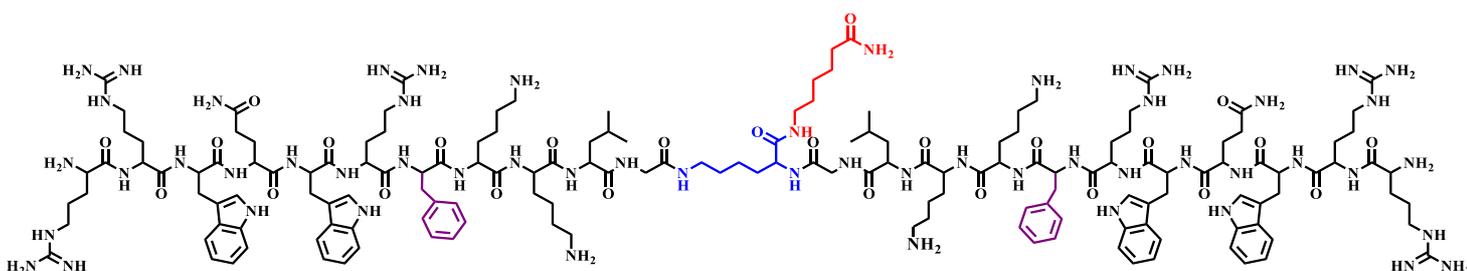
4.2. SINTESE DOS PEPTÍDEOS

As etapas de síntese, purificação e caracterização foi realizada no Laboratório de *Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas* do Departamento de *Química* da *Universidad Nacional de Colombia*, sob supervisão dos professores Dr. Javier García Castañeda, Dr^a Zuly Jenny Rivera Monroy e Dr. Ricardo Fierro Medina.

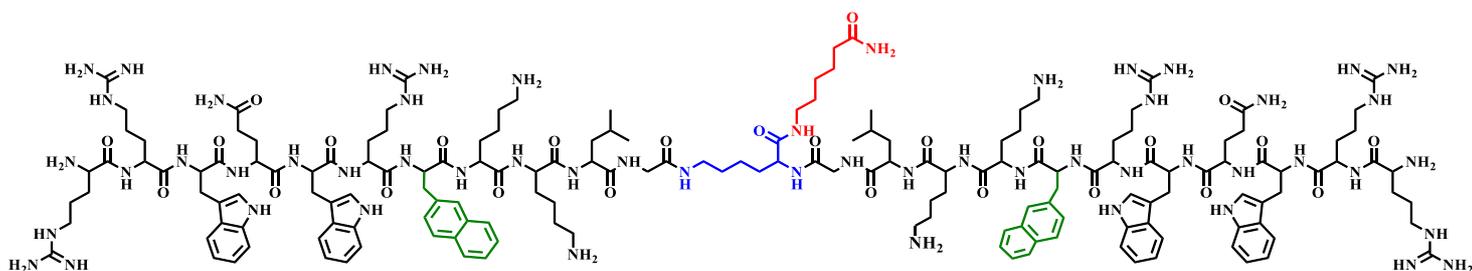
A síntese dos peptídeos foi realizada em fase sólida (SPPS), utilizando a metodologia de micro-ondas 9-fluorenilmetiloxycarbonilo/*terc*-butila (Fmoc/tBu) (INSUASTY CEPEDA *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ *et al.*, 2020). Nessa perspectiva, dois peptídeos foram sintetizados: o peptídeo 26 [F] LfcinB (20 – 30)₂ [Sequência de aminoácidos: (RRWQWRFKKLK)₂-K-Ahx] e 26 [1-NAL] LfcinB (20 – 30)₂ [Sequência de aminoácidos: (RRWQWR-1-NAL-KKLK)₂-K-Ahx]. As estruturas químicas dos peptídeos estão demonstradas na Figura 6 A e B.

Figura 6 – Estrutura dos peptídeos: a) 26 [F] LfcinB (20 – 30)₂ cuja sequência de aminoácidos corresponde a (RRWQWRFKKLK)₂K-Ahx e sua massa molecular teórica (*m/z*) é 3344,10; e b) 26 [1-NAL] LfcinB (20 – 30)₂ cuja sequência de aminoácidos corresponde a (RRWQWR-1-NAL-KKLK)₂K-Ahx e sua massa molecular teórica (*m/z*) é 3444,22.

(a)



(b)



Fonte: Elaborado pela autora com ChemDraw (2022).

Para a síntese, foram construídos reatores compostos por seringa com filtros para que não houvesse o escape da resina. A resina Rink Amida (AAPPTec,

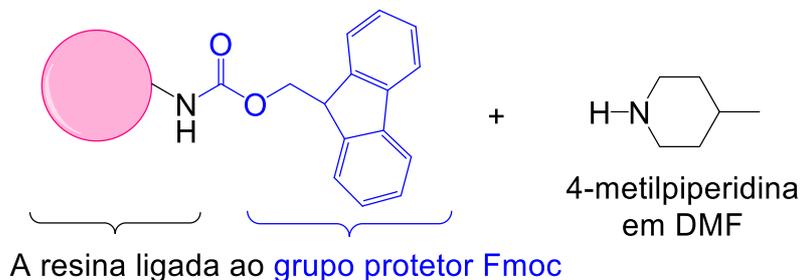
Louisville, KY, EUA) foi utilizada como suporte sólido. Essa resina foi previamente solvatada em dimetilformamida (DMF) por 1 h e, em seguida, as seguintes reações foram realizadas: **i)** reação de desproteção (Figura 7), com eliminação do grupo protetor Fmoc por tratamento com 2,5% de 4-metilpiperidina em DMF, com três ciclos de micro-ondas de 20 segundos em potência média e resfriamento dos reatores entre os ciclos e **ii)** reação de acoplamento (Figura 8), na qual o aminoácido-Fmoc é pré-ativado com uma mistura de diciclohexilcarbodiimida/6-cloro-1-hidroxibenzotriazol (DCC/6-Cl-HOBt) em DMF. Para essa reação, todos os reagentes foram pesados em excesso em relação à quantidade inicial de resina, sendo adicionados 2 mL de DCC/6-Cl-HOBt e 1 mL de DMF e deixados em agitação por, no máximo, 5 minutos. Foram realizados três ciclos de micro-ondas de 20 segundos em potência média, alcançando até 35°C, com resfriamento dos reatores entre os ciclos entre 1-2 minutos.

Para a síntese de peptídeos diméricos, foi usado primeiro o ácido 6-aminohexanóico (Ahx) entre a sequência dimérica e a resina para facilitar a síntese e estabilizar os dímeros (Figura 9). Depois de adicionar o Ahx, o resíduo Fmoc-Lys(Fmoc)-OH foi usado para construir simultaneamente duas cadeias contendo o motivo RRWQWRXKCLG (onde "X" refere-se ao resíduo fenilalanina ou 1-naftil, dependendo da sequência de aminoácidos correspondente) (INSUASTY-CEPEDA *et al.*, 2020).

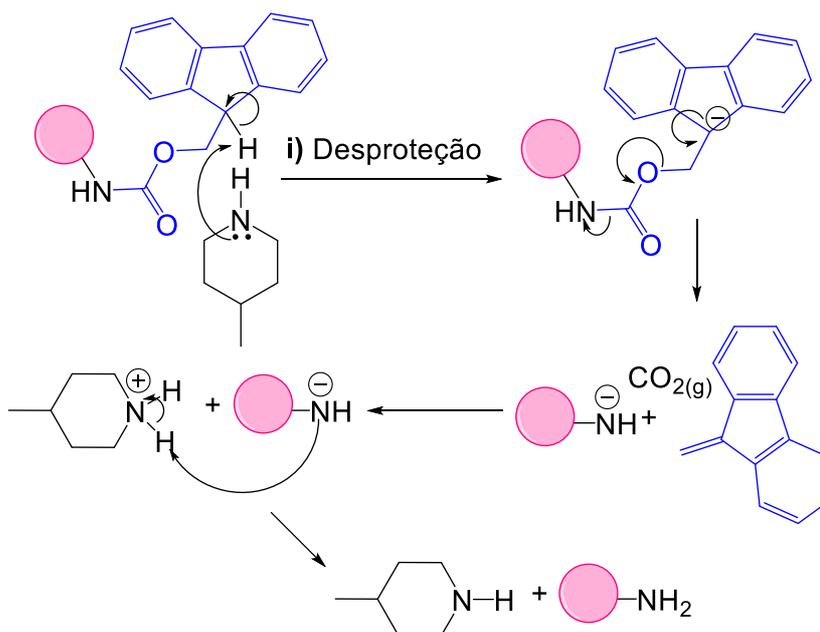
O acoplamento ou a remoção de Fmoc foram monitoradas pelo teste de Kaiser, o qual foi realizado à medida que a sequência esperada era construída, aminoácido por aminoácido. Para a realização do teste, adicionou-se a um frasco 1 mg da resina obtida, em seguida adicionou-se uma gota de uma solução feita com 2 mL de KCN (1 mmol L^{-1}) e 98 mL de piridina com duas gotas de uma solução de 80% (p/p) de fenol em etanol e uma gota de solução de 5% (p/p) de ninidrina em etanol (KAISER *et al.*, 1970). O frasco foi aquecido em água à 100°C durante 5 min. Se a reação envolver a desproteção da resina, o teste deve gerar uma coloração azul, indicando a presença do grupo amino livre. A cor azul se deve ao mecanismo de reação entre o grupo amino primário de um aminoácido e a ninidrina, formando o *azul de Ruhemann*. Caso a reação envolva o acoplamento de um aminoácido à resina,

espera-se que a cor seja amarela ou marrom, pois a solução não reage com nenhuma amina primária ou secundária livre, indicando a presença do grupo protetor Fmoc (KAISER *et al.*, 1970).

Figura 7 – Eliminação do grupo Fmoc pela 4-metilpiperidina para formar um -NH_2 livre na resina inicial (reação *i*).

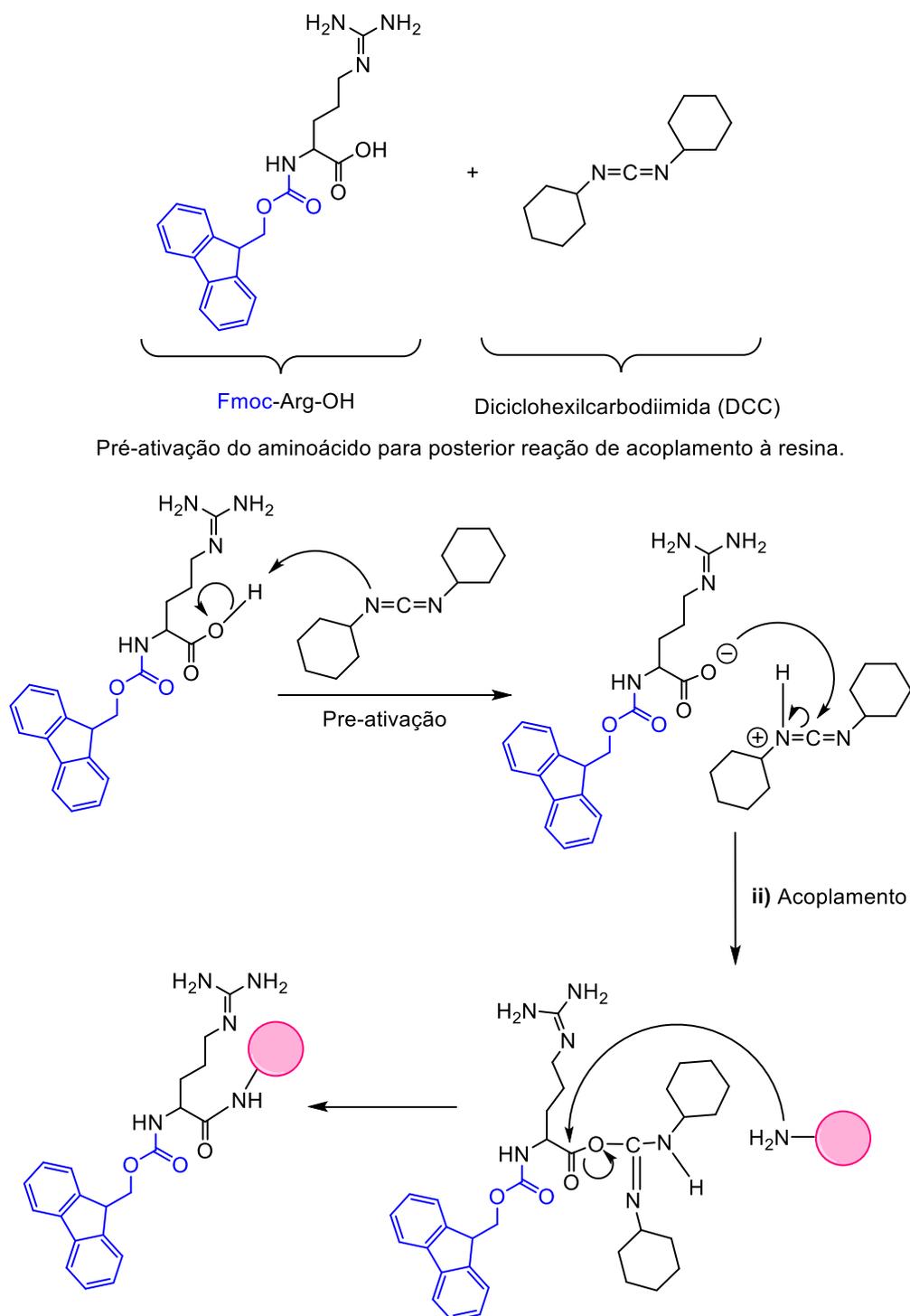


Eliminação do grupo protetor Fmoc da resina por tratamento com 2,5% de 4-metilpiperidina em dimetilformamida (DMF).



Fonte: Elaborado pela autora (2022), baseado nos mecanismos de reação propostos por PIRES (2014).

Figura 8 – Mecanismo da reação de ativação por DCC/6-Cl-HOBt e acoplamento do Fmoc-aminoácido ativado ao -NH₂ da resina (reação *ii*).



Fonte: Elaborado pela autora, baseado nos mecanismos de reação propostos por PIRES (2014).

A reação de eliminação das cadeias laterais dos peptídeos e a separação do peptídeo da resina Rink Amide, foram realizadas com um coquetel de clivagem contendo ácido trifluoroacético/água/trisopropil silano/etanoditiol TFA/água/TIPS/EDT (92,5/2,5/2,5/2,5 v/v/v/v) durante 6 – 8 h. Os peptídeos brutos foram precipitados por tratamento com éter etílico frio, depois a solução foi filtrada e finalmente foram feitas lavagens com éter etílico por cinco vezes. Deixou-se secar durante um dia para depois proceder a etapa de purificação (BARRAGÁN-CÁRDENAS, A. *et al.*, 2020; INSUASTY-CEPEDA *et al.*, 2020).

Os mecanismos das reações referentes à síntese dos peptídeos são esquematizados nas Figuras 7 e 8 correspondentes à reação de desproteção e acople respectivamente. Na Figura 8, o aminoácido arginina (Fmoc-Arg-OH) foi tomado como exemplo para ilustrar o mecanismo da reação orgânica. Como exemplo específico para peptídeos diméricos, na Figura 9 observamos os primeiros dois acoplos na resina, o primeiro é a adição do ácido 6-aminohexanóico (Ahx) e, depois, o acople do resíduo lisina, o qual permite a síntese simultânea das cadeias de aminoácidos. Finalmente, a Figura 10 mostra os mecanismos reacionais (reações *i* e *ii*) referentes à síntese do peptídeo $^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30)₂.

Figura 9 – Estrutura da resina acoplada ao ácido 6-aminohexanóico (Ahx) e ao resíduo de lisina com duplo grupo protetor (Fmoc-Lys(Fmoc)-OH) para facilitar a síntese de um peptídeo dimérico.

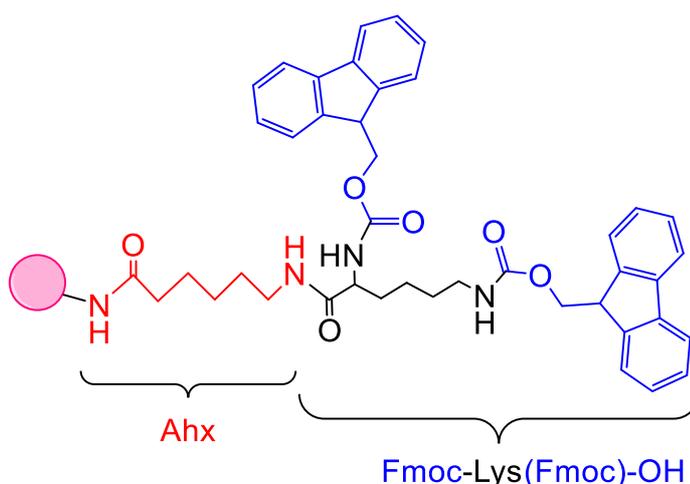
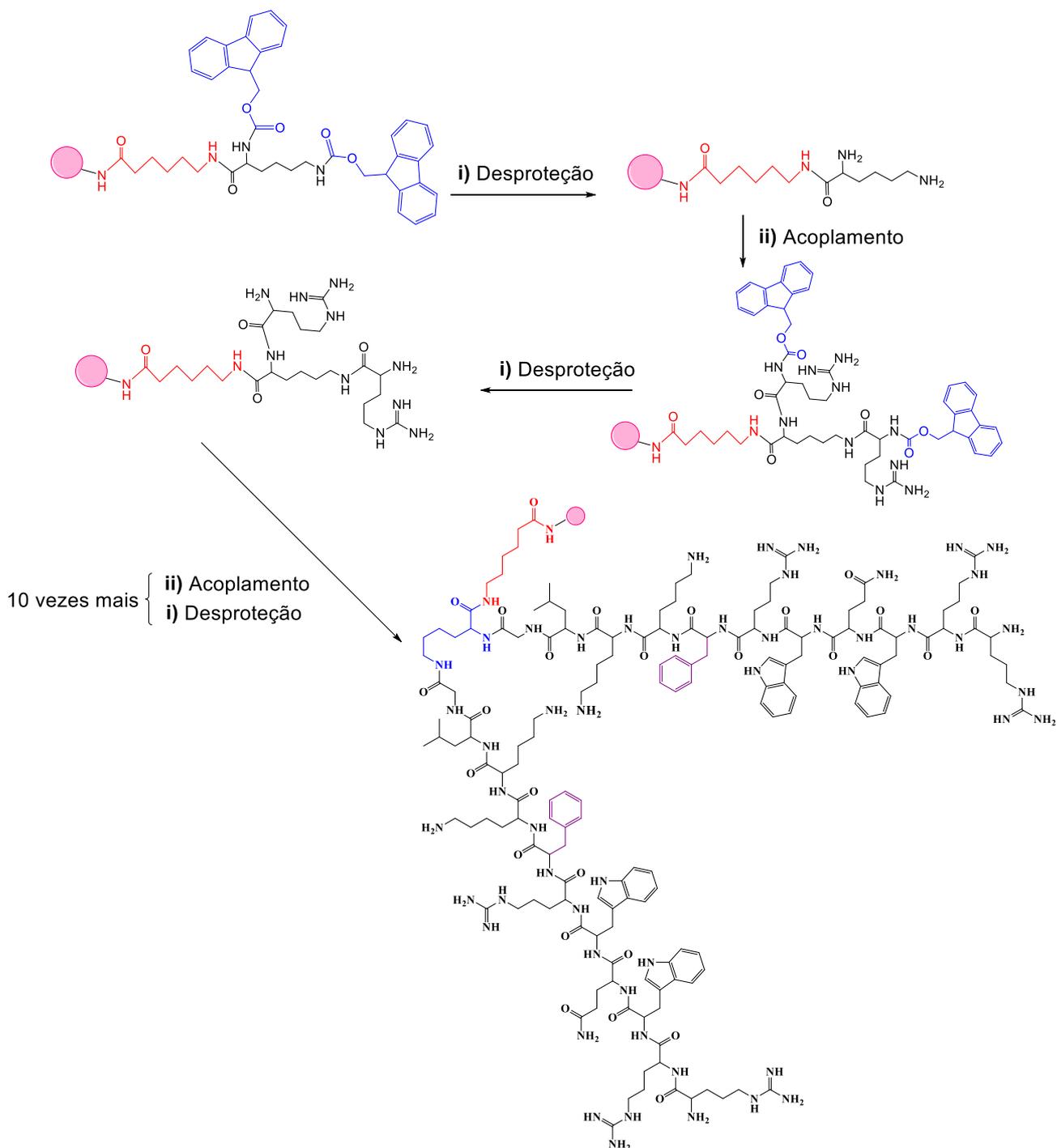


Figura 10 – Síntese do peptídeo $^{26}[F]$ LfcinB (20 – 30)₂ em fase sólida (SPPS).



Fonte: Elaborado pela autora (2022), baseado nos mecanismos de reação propostos por PIRES (2014).

4.3. PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Essa etapa foi realizada no Laboratório de *Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas* do Departamento de *Química* da *Universidad Nacional de Colombia*, sob supervisão dos professores Dr. Javier García Castañeda, Dr^a Zuly Jenny Rivera Monroy e Dr. Ricardo Fierro Medina.

A purificação foi realizada por cromatografia de extração em fase sólida (SPE) usando colunas Supelclean (INSUASTY CEPEDA *et al.*, 2019). Inicialmente, a coluna foi pré-ativada com 30 mL de metanol, 30 mL de ACN (com 0,05% de TFA) e água (com 0,05% TFA). Cerca de 100 mg de cada peptídeo bruto foi então pesado e dissolvido em 1 mL de água (com 0,05% de TFA) e adicionados à coluna. A eluição peptídica foi realizada aumentando-se a porcentagem de ACN (com 0,05% TFA) no eluente. De 12 a 15 frações (volume final de 12 mL) de cada peptídeo foram coletadas em frascos de polipropileno. As frações coletadas foram analisadas via CLAE-FR e as frações contendo o peptídeo puro foram reunidas e em seguida liofilizadas.

4.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS PEPTÍDEOS

Essa etapa foi realizada no Laboratório de *Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas* do Departamento de *Química* da *Universidad Nacional de Colombia*, sob supervisão dos professores Dr. Javier García Castañeda, Dr^a Zuly Jenny Rivera Monroy e Dr. Ricardo Fierro Medina.

Inicialmente a caracterização dos peptídeos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) utilizando um cromatógrafo líquido com detector UV/Vis, coluna monolítica Chromolith C18 (50 × 4,6 mm), fase móvel em gradiente de 5% a 50% em 8 minutos com água-TFA à 0,05% e acetonitrila-TFA à 0,05%, em um fluxo de 2,0 mL/min e detecção em 210 nm.

Posteriormente, os peptídeos foram caracterizados por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS). Os peptídeos (10 mg/mL) foram analisados em um espectrômetro Bruker Impact II LC Q-TOF MS equipado com

uma fonte de ionização por eletropulverização (ESI) operando em modo positivo. As condições ESI foram: compensação tardia final 500 V, tensão capilar 4500 V, temperatura seca de 220 °C e um fluxo de nitrogênio 8 L/min.

Por fim, os peptídeos foram caracterizados por espectrometria de massa por ionização com dessorção à laser assistido por matriz e analisador do tipo tempo de voo (MALDI-TOF-MS). Essa análise foi realizada em um espectrômetro de massa Ultraflex III TOF-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) no modo reflectron, usando um alvo de aço polido MTP384 (BrukerDaltonics), ácido 2,5-diidroxibenzóico ou ácido sinapínico (1 mg/mL) como uma matriz. 1 µL da solução de peptídeo purificado (0,5 mg/mL) foi misturado com 18 µL de matriz (ácido aciano-4-hidroxicinâmico, 5 mg/mL) e, em seguida, 1 mL da mistura foi semeada na placa porta-amostras. Os espectros foram gerados com uma média de 500 disparos do laser, com a potência variando entre 25% e 30%.

4.5. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS PEPTÍDEOS

4.5.1. Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade dos peptídeos foi avaliada frente às linhagens de carcinoma ductal invasivo de mama humana (MCF-7 e MDA-MB-231) e fibroblastos humanos (CCD1059 SK). Em todos os casos, as análises foram realizadas por meio do ensaio do metabolismo do reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), de acordo com o método descrito por Mosmann, 1983. Para tanto, as linhagens celulares foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contendo penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 mg/mL), L-glutamina (2 mM) e 10% de soro fetal bovino. Para o ensaio, as células foram padronizadas na concentração de 1×10^3 células/200µL e plaqueadas em placas de 96 poços estéreis. Após 24 horas de incubação (37°C e 5% CO₂), o meio de cultura foi retirado e diferentes concentrações dos peptídeos (200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL para as células tumorais e 400, 200, 100 e 50 µg/mL para os fibroblastos) foram adicionadas (n=4). As células foram incubadas por 48 horas nas mesmas condições descritas e, após o tempo de incubação, o meio de cultura de

cada poço foi retirado e uma solução contendo MTT (1mg/mL) foi adicionada (100µL/poço). A incubação foi mantida durante 4 horas à 37°C e os cristais formados foram diluídos em DMSO. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca em comprimento de onda de 590nm. O controle negativo foi constituído por poços contendo somente meio DMEM. Como controle positivo foi utilizado o DMSO 10% (v/v). O cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com as amostras em estudo foi realizado a partir das médias das respectivas absorbâncias, considerando-se o valor médio da absorbância do grupo controle negativo como 100% de viabilidade. A Concentração inibitória de 50% (CI₅₀) para cada amostra foi determinada a partir da curva de dose-resposta, utilizando o software GraphPad Prism®. A partir dos valores obtidos, o Índice de Seletividade (IS) foi calculado de acordo com a seguinte Equação:

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ para os fibroblastos}}{CI_{50} \text{ para a linhagem de cancer de mama}}$$

4.5.2. Avaliação do efeito anti-migratório

A avaliação do efeito anti-migratório dos peptídeos frente às linhagens de carcinoma ductal invasivo de mama humana (MCF-7 e MDA-MB-231) foram realizadas por meio do ensaio *scratch assay* de acordo com o método descrito por (LIANG *et al*, 2007). Para o ensaio, as células foram padronizadas na concentração de 5x10³ células/500µL e plaqueadas em placas de 24 poços estéreis. Em seguida, as placas foram incubadas até a completa aderência das células. Logo após, o meio de cultura dos poços foi retirado, substituído por 2 mL de meio de cultura sem SFB e as placas foram novamente reincubadas.

Após 24h de incubação (37°C e 5% CO₂), foi feito o *scratch* no diâmetro do poço com o auxílio de uma ponteira de 200 µL. Em seguida, as células foram lavadas uma vez com PBS 1x, visando remover partículas e restos celulares. Em seguida,

diferentes concentrações dos peptídeos (50 e 25 µg/mL) foram adicionadas (n = 4). Para o controle foi utilizado apenas meio de cultura.

As células foram incubadas por 24 e 48 horas e, após esse tempo, a área do *scratch* foi fotografada utilizando microscópio óptico invertido acoplado a uma câmera fotográfica sendo este o instante 0h, partindo de um ponto específico inicial marcado na placa. Foram tiradas 4 fotos do *scratch* em sequência, em todos os grupos de tratamento. Após este procedimento, as placas foram reincubadas e novas fotos nos instantes 24h e 48h foram tiradas partindo do mesmo ponto na placa, de forma a serem analisados os mesmos campos com a progressão do tempo.

A medida das áreas foi realizada utilizando o software *Image J* 1.4.3.67. A porcentagem de fechamento das ranhuras (FR) foi calculada utilizando a equação abaixo:

$$FR (\%) = \left(\frac{(\text{área da ranhura no tempo } 0 \text{ h} - \text{área da ranhura nos tempos de tratamento})}{\text{área da ranhura no tempo } 0 \text{ h}} \right) \times 100\%$$

4.6. DESENVOLVIMENTO DOS LIPOSSOMAS

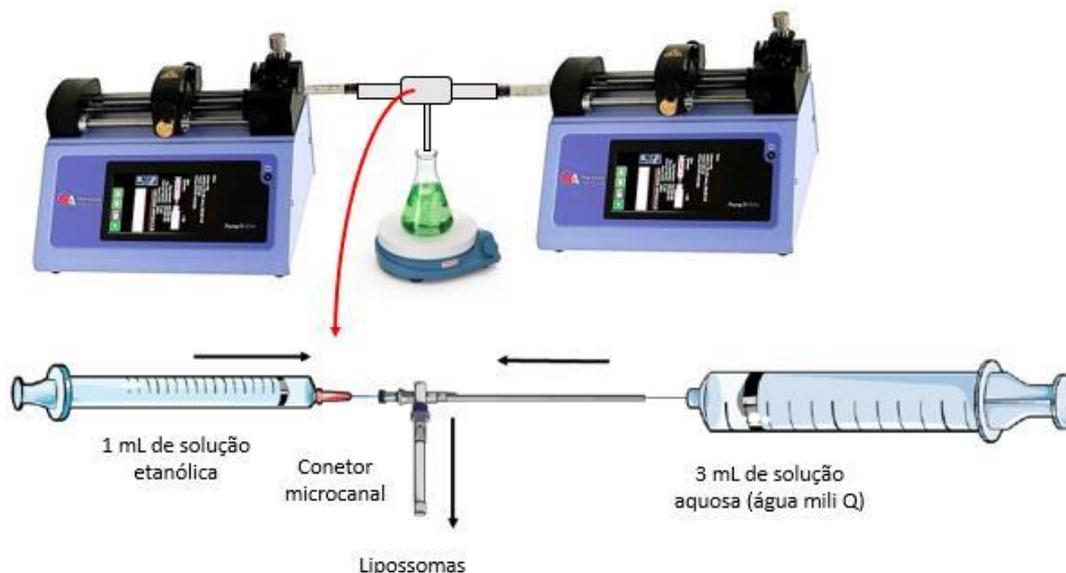
Essa etapa foi realizada no Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Faculdade de Farmácia da UFMG, sob supervisão do prof. Dr. Diego dos Santos Ferreira.

Para o preparo dos lipossomas contendo o peptídeo $^{26}[F] \text{ LfcinB } (20 - 30)_2$ (Lip-Pep, n=3) foi empregada a técnica de nanoprecipitação, por meio de um sistema microfluídico *homemade* (Figura 11). Resumidamente, foi preparada uma solução etanólica estoque dos lípides dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e colesterol, na concentração molar total de 5 mM, proporção molar de 6:4, respectivamente.

Primeiramente, 1,0 mg do peptídeo foi dissolvido em 1,0 mL da solução estoque de lípides. Para a formação dos lipossomas a solução contendo o peptídeo foi injetada contra água ultra-pura, utilizando uma bomba de injeção (Harvard

Apparatus, Holliston, EUA). As soluções foram misturadas em um conector em T (Valco Instruments Company, Schenkon, Suíça) com diâmetro interno de 150 μm , com velocidade de injeção total de 4 mL/min e proporção entre o volume de água e etanol de 3:1. A dispersão de lipossomas foi coletada na saída do conector, em um frasco de vidro de 10 mL, sob agitação mecânica constante de 500 rpm.

Figura 11 – Sistema microfluídico *homemade* para o preparo dos lipossomas.



Fonte: elaborado pela autora (2023) e adaptado de GOUDA *et al.*, 2021.

Para a eliminação do etanol e do peptídeo não encapsulado, as formulações foram purificadas por diálise, adicionando a formulação de lipossomas no interior de membranas de celulose. A diálise foi realizada contra água mili Q, sob agitação de 500 rpm por 12 horas. A concentração lipídica final foi de 0,5 mM e a concentração do peptídeo foi de 0,1 mg/mL.

Para fins de comparação, lipossomas sem a adição do peptídeo (lipossomas “brancos”, Lip-B) foram preparados pela mesma técnica (n=3).

4.7. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS LIPOSSOMAS

4.7.1. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), Índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)

O DHm e o Pdl foram avaliados empregando-se a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*) utilizando um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 173°. O PZ foi determinado por meio da avaliação da mobilidade eletroforética. Para as leituras, as amostras foram diluídas em água ultrapura (1:400 v/v). As determinações foram realizadas em triplicata e à temperatura ambiente, utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

Os resultados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (One Way ANOVA) no programa GraphPad PRISM InStat 8.0.2, considerando-se o nível de significância de p-valor $\leq 0,05$.

4.7.2. Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE)

A EE do peptídeo nos lipossomas desenvolvidos foi determinada de forma indireta a partir da quantificação do dialisado. Para tanto, a solução obtida foi previamente liofilizada e o pó foi diluído em água ultrapura. Em seguida, uma alíquota foi retirada, previamente diluída e filtrada em filtro PVDF de 0,45 μm acoplado à seringa. A quantificação do peptídeo foi realizada por CLAE-FR, conforme descrito no item 4.4.

A curva analítica foi construída a partir de soluções aquosas do peptídeo em concentrações variando entre 400, 200, 100, 50, 25, e 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Para a avaliação da interferência dos constituintes da formulação na quantificação do peptídeo, uma solução proveniente da diálise dos LipB foi também avaliada. As análises foram realizadas em triplicata.

A EE foi calculada por meio da Equação abaixo:

$$EE\% = \left(\frac{\text{Concentração do peptídeo adicionado} - \text{Concentração do peptídeo no sobrenadante}}{\text{Concentração total do peptídeo na formulação}} \right) \times 100\%$$

4.7.3. Avaliação da liberação *in vitro*

A avaliação da liberação *in vitro* do peptídeo a partir dos liposomas foi realizado por método da difusão através de membrana de diálise (membrana de acetato de celulose; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As amostras (LipP e peptídeo livre; n=3) (1,0 mL) foram introduzidas no interior das membranas de diálise e mantidas em frascos schott (50 mL) contendo 10 mL de tampão fosfato pH 7,4, garantindo-se a condição *sink*. Durante todo o experimento, a temperatura foi mantida em $37 \pm 1^\circ\text{C}$, e a velocidade de agitação em 70 rpm. Alíquotas (1mL) foram retiradas nos tempos 0, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h e 24h com reposição imediata de uma quantidade idêntica do meio fresco à 37°C . Após diluições adequadas, as amostras foram quantificadas por CLAE-FR nas condições previamente descritas. Os resultados foram expressos em porcentagem de fármaco liberado ao longo do tempo.

4.7.4. Análises estatísticas

Os dados experimentais foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (One Way ANOVA)/Dunnett, considerando-se o nível de significância de 0,05. A comparação entre as amostras foi feita através do teste de significância de Tukey em programa GraphPad Prism 9.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Em relação aos derivados da LfcinB, a LfcinB (20 – 25) tem mostrado resultados promissores contra linhagens celulares de câncer (SOLARTE *et al.*, 2015), além de apresentar uma ampla atividade antimicrobiana (HUERTAS *et al.*, 2017; VARGAS CASANOVA *et al.*, 2017). Nesse sentido, esse peptídeo é considerado como o motivo mínimo que apresenta características favoráveis para permitir a interação com células cancerosas, já que se encontra carregado positivamente, uma vez que contém três argininas e o triptofano (HILCHIE *et al.*, 2013; SOLARTE *et al.*, 2015). Dessa forma, os dímeros $^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30)₂ e $^{26}\text{[1-NAL]}$ LfcinB (20 – 30)₂ foram desenhados de forma a conter em sua sequência peptídica o motivo mínimo $^{20}\text{RRWQWR}^{25}$ (Figura 6).

O peptídeo $^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30)₂ foi testado em linhagens celulares de câncer de cólon: CaCo-2 (Cl₅₀ de 18 µM/ 58 µg/mL), HCT-116 (Cl₅₀ de 7 µM/ 23 µg/mL) e HEK-293 (Cl₅₀ de 33 µM/ 110 µg/mL). Além disso, nesse mesmo estudo, os autores descreveram que para essas linhagens, tanto o LfcinB (21 – 25)_{Pal} como o $^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30)₂ induziram a morte celular por vias necróticas e apoptóticas (BARRAGÁN, A. C. *et al.*, 2022). Esse dímero também foi testado em linhagens de câncer de mama (HTB-132 Cl₅₀: 13 µM/ 43 µg/mL e MCF-7 com Cl₅₀: 6 µM/ 19 µg/mL) (INSUASTY *et al.*, 2020). Além disso, os resultados recentemente publicados por INSUASTY *et al.* (2023) sobre o peptídeo $^{26}\text{[1-NAL]}$ LfcinB (20 – 30)₂ mostram como a substituição na posição 26 do aminoácido $^{26}\text{[F]}$ por $^{26}\text{[1-NAL]}$ incrementa o efeito citotóxico contra a linhagem MCF-7 ($^{26}\text{[F]}$ Cl₅₀ = 23 µM versus $^{26}\text{[1-Nal]}$ Cl₅₀ = 14 µM).

Pelo exposto, decidimos investigar o comportamento desses peptídeos frente a linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), a fim de identificar aquele de maior atividade e seletividade para encapsulação posterior em lipossomas. Esses peptídeos foram sintetizados e purificados e os resultados referentes à etapa de caracterização estão descritos nas figuras a seguir.

Figura 12 – Cromatogramas dos peptídeos sintetizados e purificados. a) $^{26}\text{[F]}$ LfcinB $(20 - 30)_2$ e b) $^{26}\text{[1-NAL]}$ LfcinB $(20 - 30)_2$. Condições CLAE-FR: Detector UV/Vis - 210 nm, coluna monolítica Chromolith C18 $(50 \times 4,6 \text{ mm})$, fase móvel em gradiente de 5% a 50% em 8 min com água-TFA a 0,05% e ACN-TFA a 0,05%, fluxo de 2,0 mL/min.

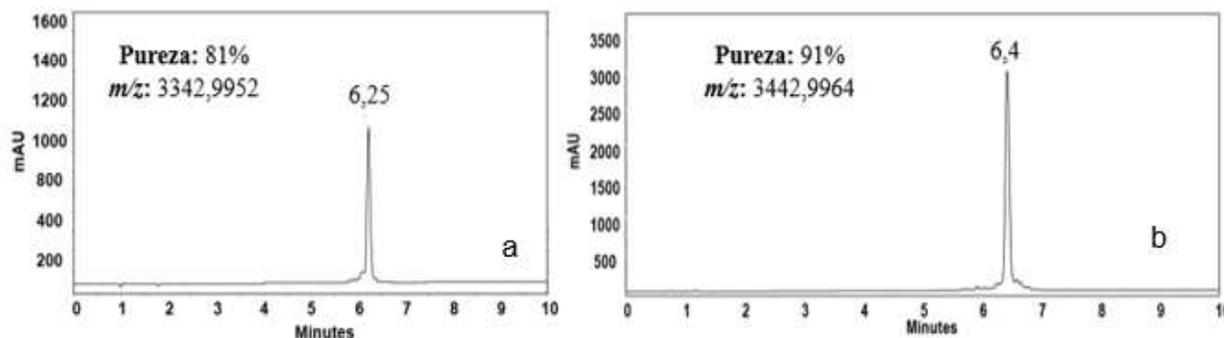
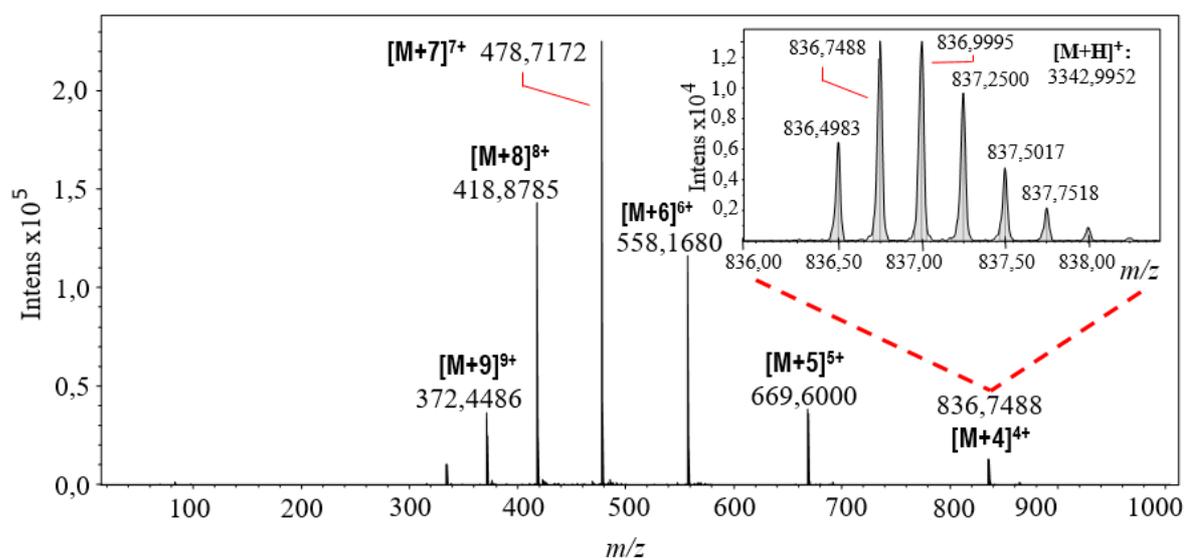


Figura 13 – Espectrometria de massa ESI-MS para caracterização da estrutura do peptídeo $^{26}\text{[F]}$ LfcinB $(20 - 30)_2$.



Para o dímero $^{26}\text{[F]}$ LfcinB $(20 - 30)_2$, o tempo de retenção (t_R) por CLAE-FR foi de 6,2 min, compatível com o reportado em outros estudos (5,6 e 6,0 min) (INSUASTY *al.*, 2023; INSUASTY *al.*, 2020) e sua pureza foi de 81% (Figura 12a). Em relação ao espectro de ESI-MS, observamos resultados similares em relação à massa molar esperada. Nesse caso, obtivemos o valor de 3342,9952 Da ante ao valor teórico de 3344,10 Da, por meio de sequenciamento dos picos (MS/MS) do

primeiro espectro de massas (Figura 13 e Tabela 4). De modo semelhante, na Figura 15, obtivemos resultados similares de massa molecular por meio da técnica MALDI-TOF.

Figura 14 – Espectrometria de massa ESI-MS para caracterização da estrutura do peptídeo $^{26}[1\text{-NAL}] \text{LfcinB} (20 - 30)_2$.

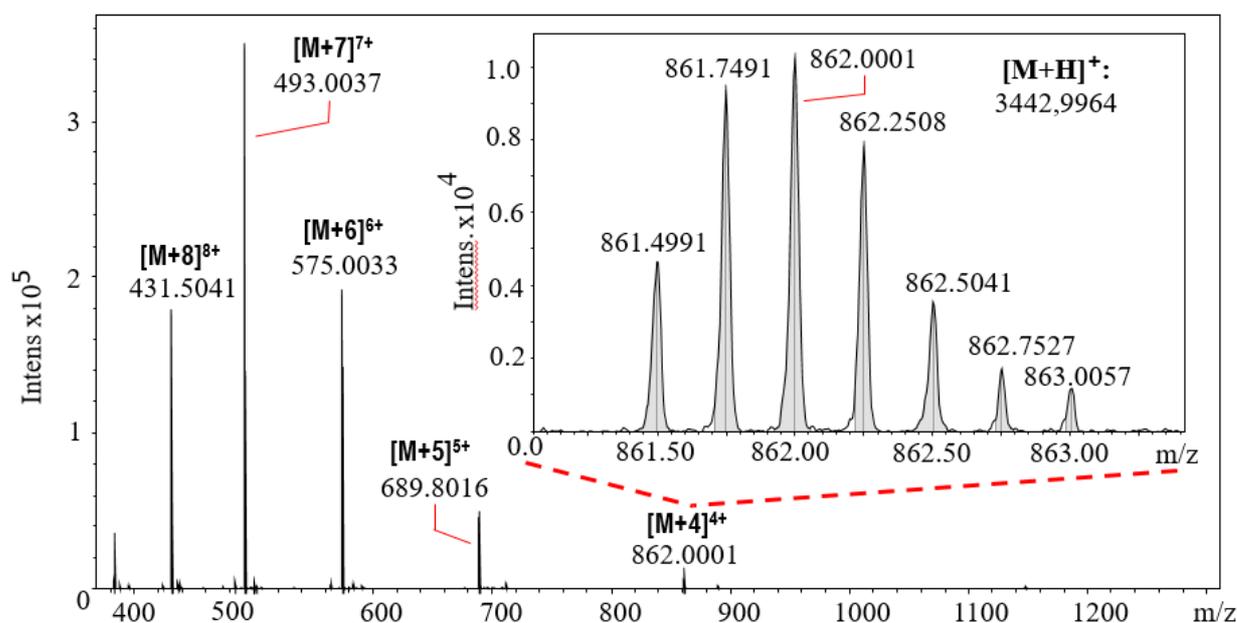


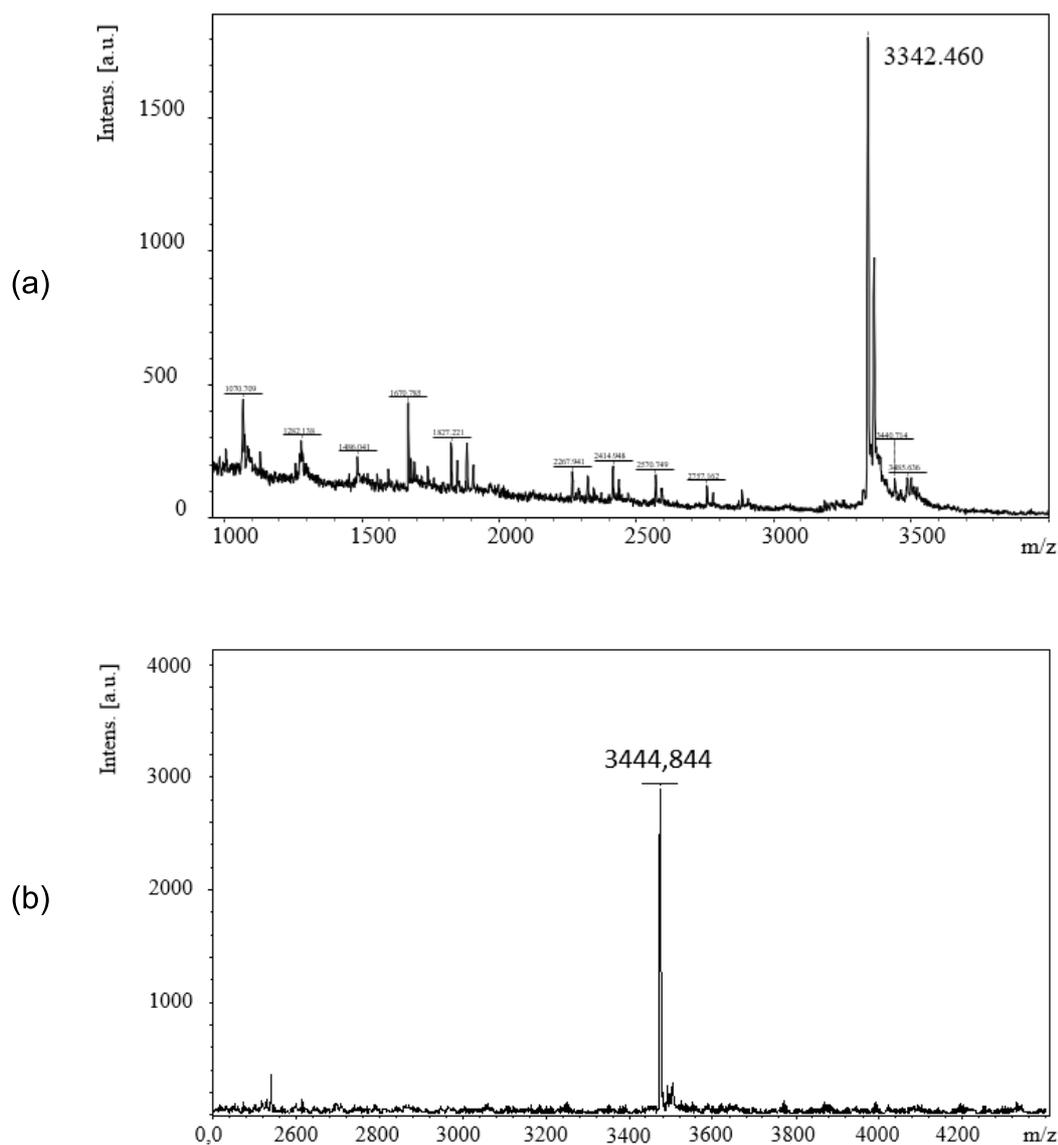
Tabela 4 – Resumo da caracterização analítica de peptídeos derivados da LfcinB por CLAE-FR e ESI-MS.

Peptídeo	Sequência	CLAE-FR		ESI-Q-TOF m/z	
		t_R	Pureza (%)	Teórico	Experimental
$^{26}[\text{F}] \text{LfcinB} (20 - 30)_2$	$(\text{RRWQWRFKKLG})_2\text{-K-Ahx}$	6,2	81	3344,10	3342,9952
$^{26}[1\text{-NAL}] \text{LfcinB} (20 - 30)_2$	$(\text{RRWQWR-1-NAL-KKLG})_2\text{-K-Ahx}$	6,4	91	3444,22	3442,9964

Para o dímero $^{26}[1\text{-NAL}] \text{LfcinB} (20 - 30)_2$ os resultados foram t_R de 6,4 min e pureza de 91% (Figura 12b) comparáveis com o t_R da literatura (6,4 min) (INSUASTY *et al.*, 2023). Além disso, o espectro ESI-MS mostrou resultado semelhante (3442,9964 Da) à massa molar teórica (3444,22) (Figura 14 e Tabela 4) e o espectro de massas MALDI-TOF confirma essa informação (Figura 15).

Na Tabela 4, mostramos o compilado dos resultados referentes às análises por CLAE-FR e ESI-MS para os peptídeos sintetizados.

Figura 15 – Espectrometria de massas MALDI-TOF-MS para os peptídeos: a) $^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30)₂; e b) $^{26}\text{[1-NAL]}$ LfcinB (20 – 30)₂.



5.2. AVALIAÇÃO DA INFLUENCIA DOS PEPTÍDEOS NA VIABILIDADE DE CÉLULAS MCF-7, MDA-MB-231 E CCD1059 SK

A Figura 16 apresenta os resultados de viabilidade das células de tumor de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e de células humanas sadias (CCD1059 SK) frente a diferentes concentrações dos peptídeos, após 48 horas de tratamento.

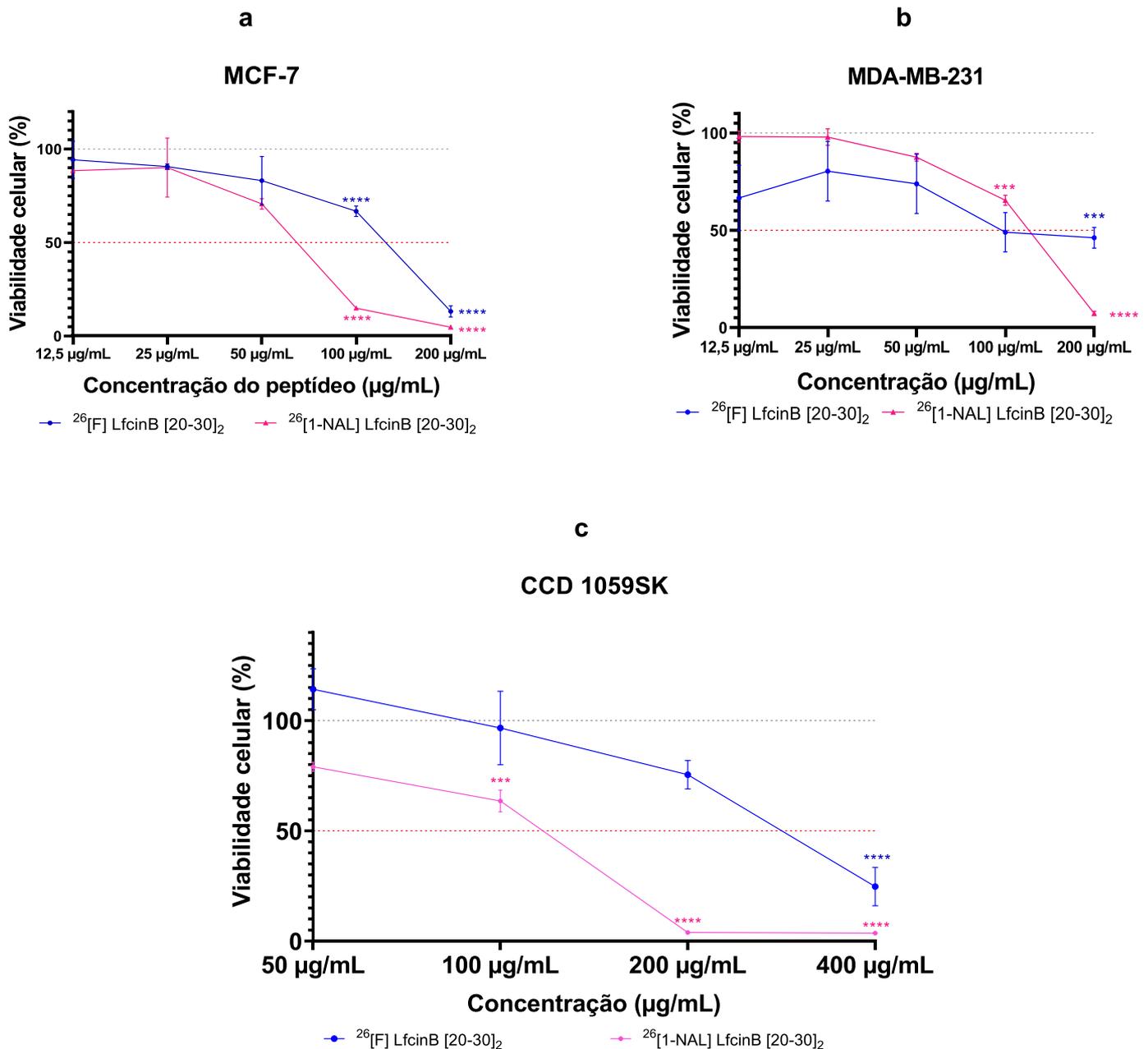
Para ambos os peptídeos, observamos citotoxicidade dose-dependente para todas as linhagens testadas (Figura 16). Especificamente para o peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$, houve menor alteração da viabilidade das células normais ($\text{CI}_{50} = 324,2 \mu\text{g/mL}$; Tabela 5) em detrimento às linhagens tumorais, sendo a citotoxicidade seletiva para essas linhagens (Tabela 6). A principal hipótese para essa seletividade está atrelada ao fato de as membranas plasmáticas das células do tumor apresentarem-se mais negativas em virtude da maior expressão de elementos aniônicos (tais como heparan sulfato e ácido siálico), o que contribui para uma maior interação com o peptídeo catiônico. Além disso, a maior presença de microvilosidades quando em comparação às membranas de células sadias, pode aumentar a superfície de contato com o peptídeo (HUANG *et al.*, 2014; MULDER *et al.*, 2013).

É importante destacar que a literatura aponta que valores de $\text{IS} \geq 3,0$ são considerados altamente seletivos para moléculas ou compostos com suposta atividade antitumoral (WEERAPREEYAKUL *et al.*, 2012). Nesse sentido, nossos resultados indicam, para o peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$, uma maior seletividade para as células MDA-MB-231 ($\text{IS} = 3,0$ – Tabela 6). Esse achado é particularmente importante porque, conforme já descrito, essa linhagem, a qual é classificada como triplo negativo, caracteriza-se como a de maior risco de apresentar recorrência, além de ser considerada o tipo de câncer mais agressivo e mais difícil de diagnosticar (DAI *et al.*, 2017; HARBECK *et al.*, 2019; WAKS; WINER, 2019).

Como anteriormente foi mencionado, o peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ já foi testado em linhagens celulares de câncer de cólon: CaCo-2 (CI_{50} de $18 \mu\text{M}/ 58 \mu\text{g/mL}$), HCT-116 (CI_{50} de $7 \mu\text{M}/ 23 \mu\text{g/mL}$) e HEK-293 (CI_{50} de $33 \mu\text{M}/ 110 \mu\text{g/mL}$) (BARRAGÁN, A. C. *et al.*, 2022). Esse dímero também foi testado frente às

linhagens MCF-7 (CI_{50} : 6 μ M/19 μ g/mL) e MDA-MB-231 (CI_{50} : 13 μ M/43 μ g/mL) (INSUASTY *et al.*, 2020). Nesse sentido, nossos resultados estão concordantes aos obtidos no referido trabalho.

Figura 16 – Avaliação da viabilidade celular das linhagens a) MCF-7, b) MDA-MB-231 e c) CCD1059 SK após 48h de exposição aos peptídeos



* p-valor $\leq 0,05$; **p-valor $\leq 0,01$; ***p-valor $\leq 0,005$; ****p-valor $< 0,0001$.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 5 – Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$) dos peptídeos frente às linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e CCD1059 SK.

	MCF-7	MDA-MB-231	CCD1059 SK
Peptídeo	Cl_{50}	Cl_{50}	Cl_{50}
$^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30) ₂	166,7	107,9	324,2
$^{26}\text{[1-NAL]}$ LfcinB (20 – 30) ₂	64,93	130,8	88,28

Tabela 6 – IS para os peptídeos sintetizados.

Peptídeo	IS para MCF-7	IS para MDA-MB-231
$^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30) ₂	1,94	3,0
$^{26}\text{[1-NAL]}$ LfcinB (20 – 30) ₂	1,36	0,67

Em relação ao peptídeo $^{26}\text{[1-NAL]}$ LfcinB (20 – 30)₂, observamos uma baixa seletividade frente às linhagens tumorais. Nesse caso, foi constatado um efeito citotóxico significativo para a linhagem de fibroblastos, com redução de cerca de 3,7 vezes no valor de Cl_{50} quando em comparação ao peptídeo $^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30)₂. Nesse caso, é possível que esse efeito esteja atrelado ao aumento da interação com a membrana das células devido à maior hidrofobicidade deste peptídeo, já que houve a substituição do aminoácido fenilalanina (F) por uma molécula de 1-naftil (1-NAL) (Figura 6). Além disso, comparando-se o efeito frente às linhagens tumorais, esse peptídeo apresentou maior citotoxicidade para a linhagem MCF-7 ($^{26}\text{[1-NAL]}$ Cl_{50} = 64,93 $\mu\text{g/mL}$ versus $^{26}\text{[F]}$ 166,7 $\mu\text{g/mL}$ – Tabela 5). Esse resultado pode estar ligado às diferenças entre essas linhagens no que diz respeito às suas características moleculares.

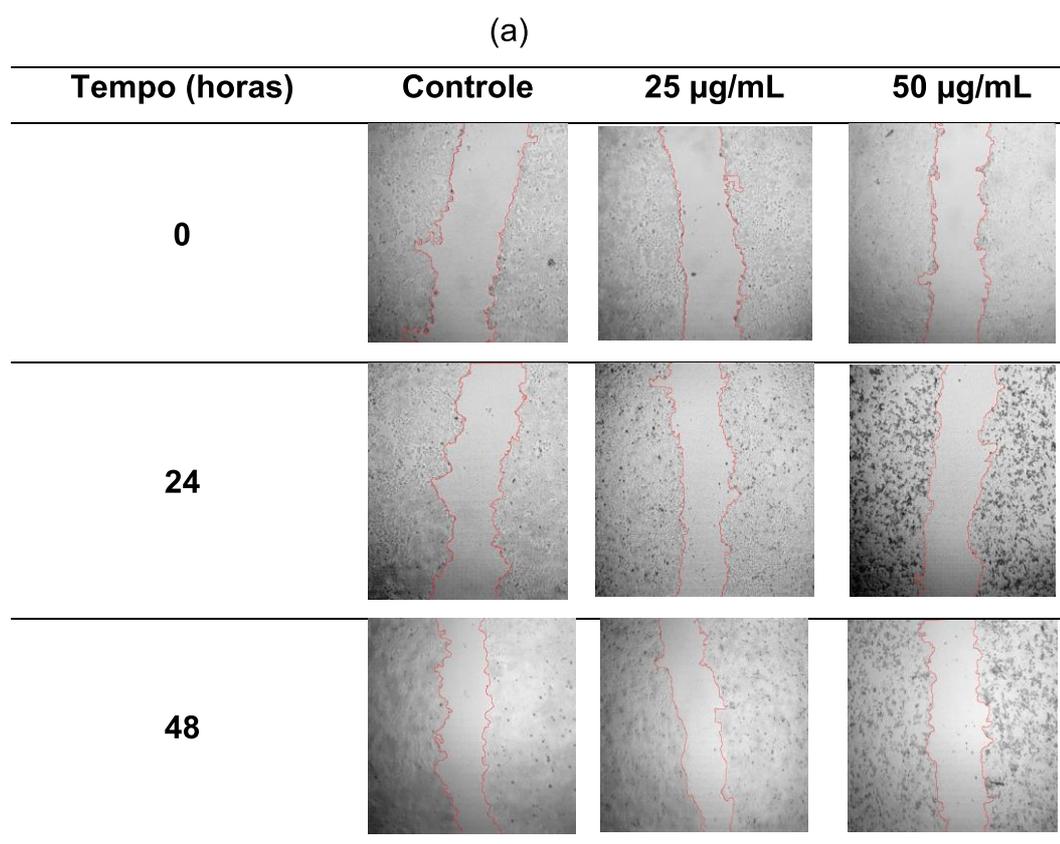
É importante ressaltar que, recentemente, foram publicados resultados promissores em relação ao peptídeo $^{26}\text{[1-NAL]}$ LfcinB (20 – 30)₂ mostrando um Cl_{50} de 48 $\mu\text{g/mL}$ após 2 horas de tratamento contra MCF-7. Além dos estudos *in vitro*, foram realizados estudos preliminares de toxicidade em ratos, os quais mostram que o peptídeo é seguro em concentrações até 140% superiores ao Cl_{50} , o que é um resultado importante para futuros estudos clínicos (INSUASTY *et al.*, 2023).

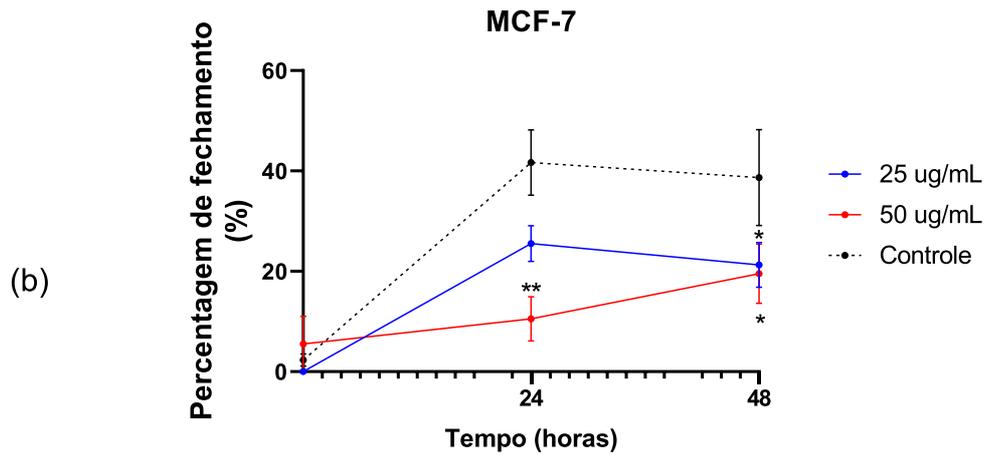
Porém, analisados em conjunto, nossos resultados levaram à escolha do peptídeo $^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30)₂ para o prosseguimento do estudo.

5.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-MIGRATÓRIO

No ambiente *in vivo*, as células utilizam o processo de migração seja em condições fisiológicas como também em situações patológicas. No processo metastático, as células tumorais migram do tumor primário para o sistema circulatório e se estabelecem em um novo local (Yamaguchi; Condeelis, 2007). Dessa forma, a investigação do potencial anti-metastático por meio de ensaio anti-migratório (também conhecido por *scratch assay*) constitui uma valiosa ferramenta *in vitro*. Assim, esse ensaio foi realizado para o peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ frente às linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Os resultados estão demonstrados nas Figuras 17 e 18.

Figura 17 – (a) Efeito de diferentes concentrações do peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ na migração das células MCF-7 após 24h e 48h de tratamento. (b) Percentagem de fechamento da ranhura em função do tempo (n = 4).

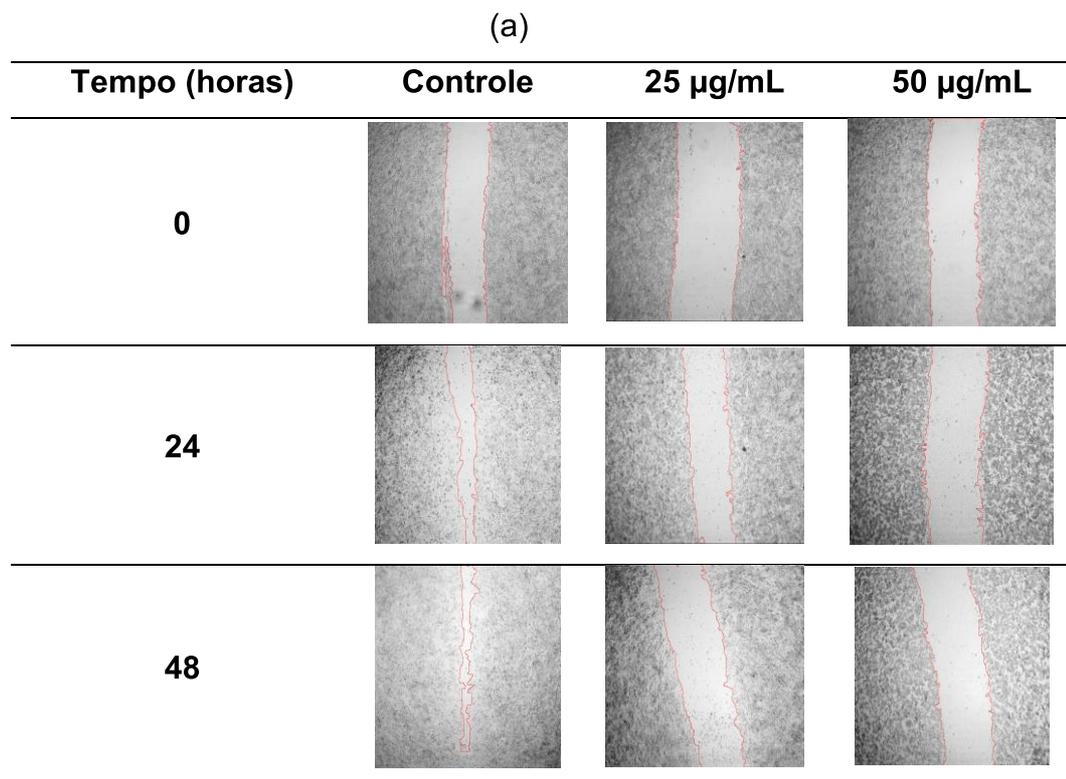


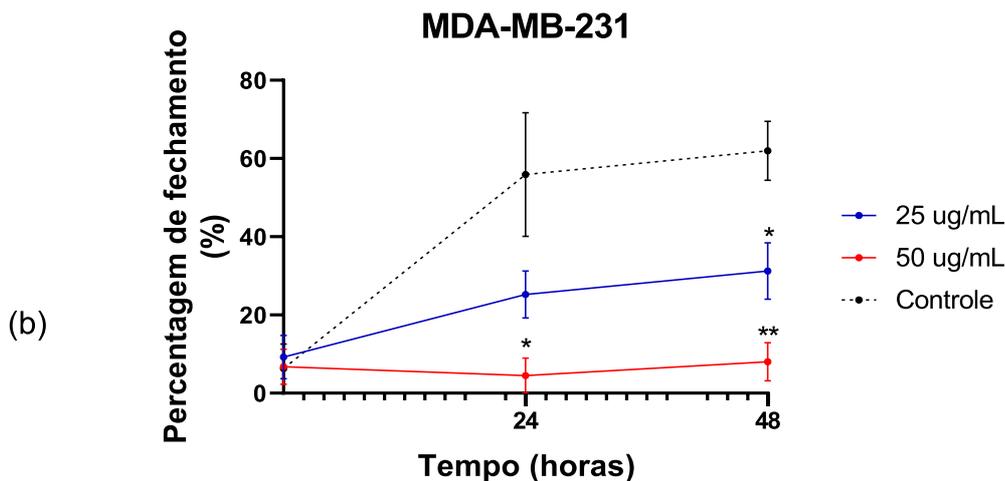


* p-valor $\leq 0,05$; **p-valor $\leq 0,01$.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 18 – (a) Efeito de diferentes concentrações do peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ na migração das células MDA-MB-231 após 24h e 48h de tratamento. (b) Percentagem de fechamento da ranhura em função do tempo (n = 4).





* p-valor $\leq 0,05$; **p-valor $\leq 0,01$.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Em relação à linhagem MCF-7, constatamos que, para o controle, há um aumento gradual do fechamento da ranhura ao longo do tempo (Figura 17a). De modo que, após 48h, a porcentagem de fechamento chega em aproximadamente 39% (Figura 17b), o que caracteriza uma baixa capacidade de migração. Nesse sentido, é sabido que, para que a metástase possa ocorrer, as células tumorais necessitam passar pela “transição epitélio-mesenquimal” (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*). Essa transição permite maior mobilidade às células, as quais poderão migrar para novos sítios e invadir outros tecidos, originando focos de tumor secundários (Spano et al., 2012). Sob essa perspectiva, as células MCF-7 são caracterizadas como de crescimento moderado, apresentando um perfil intermediário entre epitelial e mesenquimal, o que reflete em não serem muito invasivas e apresentarem menor capacidade de migração (Ziegler et al., 2014; Comşa et al., 2015).

Para o tratamento com o peptídeo, os resultados evidenciaram efeito dose e tempo dependente na inibição da migração celular. No tempo de 24h, houve redução significativa na migração celular apenas para a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (~10% de fechamento da ranhura) (Figura 17b). Por outro lado, após 48h, ambas as concentrações propiciaram efeito anti-migratório significativo, com 21,2 e 19,5% de fechamento para as concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente

(Figura 17b). Esses resultados indicam que o peptídeo sintetizado não somente promove a morte celular, mas também diminui a capacidade de migração das células MCF-7. Esse comportamento já foi relatado para a LfcinB (GIBBONS *et al.*, 2015).

Efeito semelhante foi reportado por Barragán *et al* (2023), quando da avaliação do efeito anti-migratório de diferentes peptídeos palindrômicos derivados da LfcinB, obtidos a partir do motivo RWQWRWQWR. No estudo, os pesquisadores empregaram concentrações dos peptídeos variando entre 78-200 $\mu\text{g/mL}$ (referente às CI_{50}) e observaram porcentagem de fechamento da ranhura entre 3 e 14%, diferentemente do grupo controle, o qual apresentou valor igual a 30% após 48h. É importante ressaltar que, ao contrário da metodologia empregada no referido estudo, optamos por empregar concentrações abaixo da CI_{50} visando minimizar possíveis efeitos citotóxicos às células, os quais poderiam influenciar no resultado do efeito anti-migratório. Assim, de acordo com nossos resultados, pode-se perceber que, mesmo em concentrações equivalentes a 1/3 (50 $\mu\text{g/mL}$) e 1/6 (25 $\mu\text{g/mL}$) da CI_{50} , houve um efeito significativo na migração celular.

O mesmo tratamento foi realizado para a linhagem MDA-MB-231 (Figura 18a), a qual é considerada invasiva e com elevado potencial metastático, por apresentar características mesenquimais (Rodriguez-Ochoa *et al.*, 2023). A característica de maior capacidade de migração dessas células foi constatada após as 48h do experimento, em que houve porcentagem de fechamento da ranhura de aproximadamente 62% (Figura 18b). Para as células tratadas com o peptídeo, o efeito anti-migratório também se mostrou dependente da dose e do tempo de exposição, sendo o efeito significativamente maior que o apresentado para o grupo controle para a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (no tempo de 48h, 31,2%) e na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (4,5 e 8,0% nos tempos de 24 e 48h, respectivamente). No entanto, para a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (1/2 CI_{50}), observamos um efeito anti-migratório mais pronunciado quando em comparação à linhagem MCF-7. Esse resultado pode estar atrelado à maior seletividade do peptídeo pela linhagem MDA-MB-231 (Tabela 6) e indica, além do efeito citotóxico, uma promissora atividade anti-migratória frente à uma linhagem tumoral altamente agressiva. Nesse contexto, a

efeito anti-migratório da LfcinB frente às células MDA-MB-231 também já foi relatado na literatura (RODRIGUEZ-OCHOA et al., 2023).

5.4. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Como já descrito, avaliamos inicialmente a citotoxicidade dos peptídeos frente as linhagens de câncer de mama, com resultados mais promissores para o peptídeo $^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30)₂. Por essa razão, o desenvolvimento do carreador nanoestruturado foi realizado com esse peptídeo. Apesar de não contemplarmos na metodologia, é importante mencionar que, inicialmente, avaliamos a possibilidade de encapsulação desse peptídeo em nanopartículas constituídas pelo copolímero poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) por meio do método de dupla emulsificação/evaporação de solvente associado ao uso de ultrassom. No entanto, obtivemos baixa eficiência de encapsulação ($5,1 \pm 0,1\%$; n=3), muito provavelmente pelo limitado compartimento aquoso presente nas nanopartículas formadas. Assim, decidimos avaliar preliminarmente a viabilidade tecnológica do uso de lipossomas. Muito embora não sejam os carreadores ideais para a aplicação pretendida, em virtude do curto tempo de meia-vida plasmática, optamos por desenvolver lipossomas convencionais devido à maior simplicidade tecnológica. Os resultados referentes à caracterização físico-química das formulações estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Características físico-químicas dos lipossomas*

	DHm (nm)	Pdl	PZ (mV)	EE(%)
Lip-B	$74,99 \pm 1,32^a$	$0,247 \pm 0,015^c$	$-32,0 \pm 1,82^d$	---
Lip-Pep	$102,6 \pm 9,91^b$	$0,263 \pm 0,112^c$	$-22,3 \pm 3,54^e$	~ 100

Lip-B: Lipossomas brancos; **Lip-Pep:** Lipossomas carregados com o peptídeo $^{26}\text{[F]}$ LfcinB (20 – 30)₂. *Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (n = 3). **Letras iguais em uma mesma coluna representam valores sem diferença estatística significativa.

Os Lip-B apresentaram DHm compatível com o observado na literatura quando da preparação de lipossomas constituídos por DPPC e colesterol, empregando a mesma técnica utilizada em nosso trabalho (NANJLAH *et al.*, 2019). Por outro lado, constatamos que os Lip-Pep apresentaram DHm significativamente maior que os Lip-B (Tabela 7). Esse resultado pode ser o primeiro indício da encapsulação do peptídeo nos lipossomas desenvolvidos. Apesar do aumento, o DHm dos Lip-Pep encontra-se compatível com a aplicação pretendida, uma vez que nanocarreadores com diâmetro médio entre 50-150 nm conseguem penetrar mais facilmente na região do tumor, via efeito EPR (FAN *et al.*, 2023).

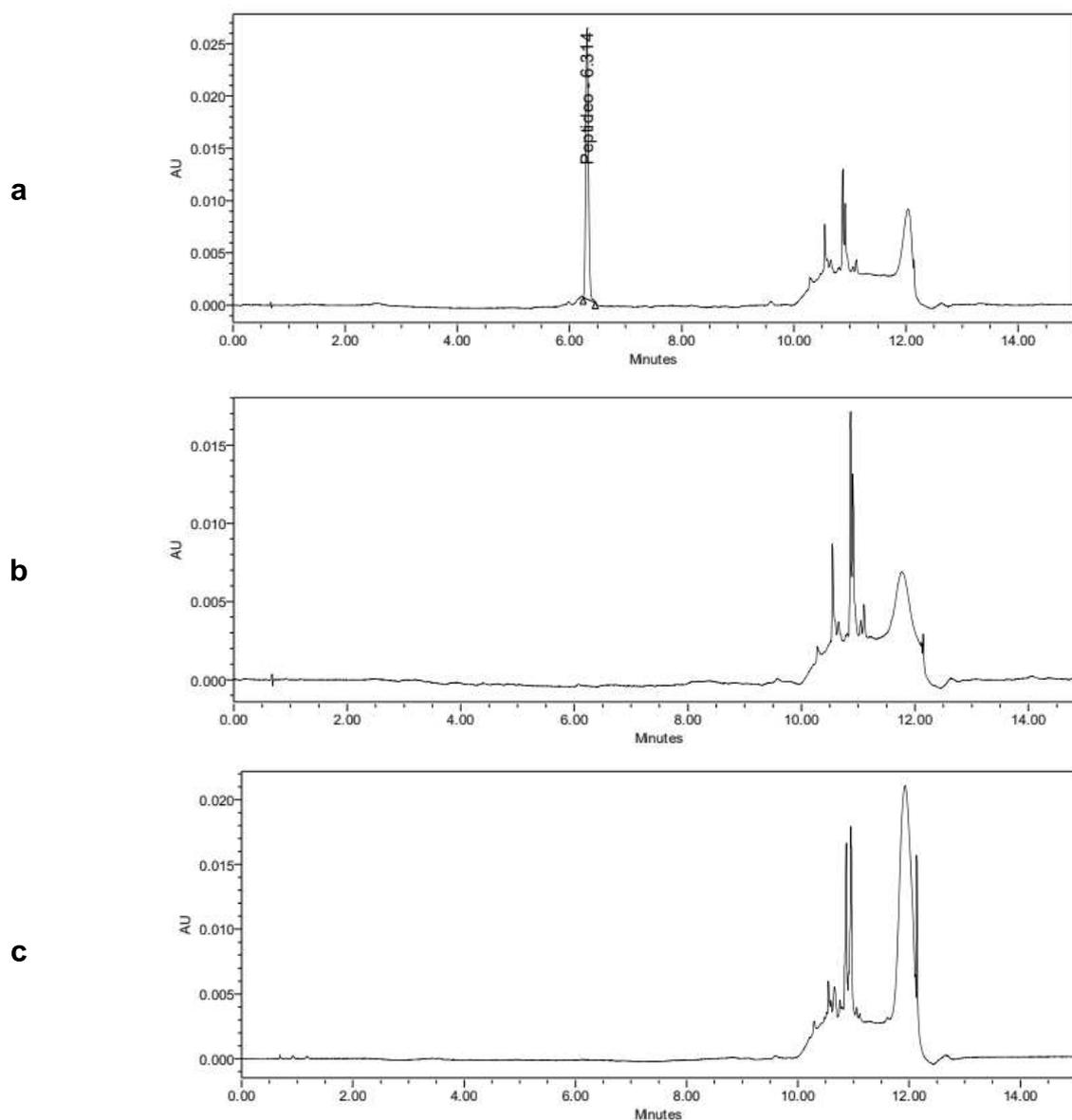
O Pdl é um parâmetro importante que reflete a homogeneidade de distribuição de tamanho das partículas em suspensão, estando associado à estabilidade do sistema coloidal. Nesse sentido, a literatura aponta que valores $\leq 0,3$ caracterizam sistemas monodispersos (DANAEI *et al.*, 2018). Para as formulações desenvolvidas, obtivemos valores de Pdl abaixo de 0,3 (Tabela 7), o que indica a obtenção de sistemas contendo população homogênea de vesículas fosfolipídicas.

Em relação ao PZ, obtivemos valores negativos para ambas as formulações. Isso pode ser devido à natureza do DPPC, um fosfolípido zwitteriônico. É interessante observar que, para os Lip-Pep, o PZ atinge valores menos negativos, sendo que houve diferença significativa em relação ao PZ dos Lip-B (Tabela 7). Nesse caso, nossa hipótese é a de que o peptídeo catiônico esteja encapsulado no compartimento aquoso dos lipossomas, mas também associado à superfície externa dos mesmos por meio da interação eletrostática com as cargas negativas do fosfolípido. De fato, a literatura aponta que moléculas hidrofílicas podem se localizar no compartimento aquoso dos lipossomas ou se associar às vesículas por meio do estabelecimento de interações eletrostáticas com os grupamentos polares dos fosfolípidos (WANG *et al.*, 2023). No entanto, novas análises, tais como a técnica de Difração de Raios-X devem ser realizadas para confirmarmos tal hipótese.

Ainda sobre o PZ, é sabido que nanoestruturas com $PZ \geq \pm 30$ mV são altamente estáveis do ponto de vista coloidal, uma vez que, devido à repulsão eletrostática, não há a tendência à agregação das partículas em suspensão (SMITH

et al., 2017). Essa característica de elevada estabilidade coloidal se aplica aos Lip-B (PZ = $-32,0 \pm 1,82$ mV – Tabela 7). No entanto, partículas com PZ compreendido entre ± 20 -30 mV, tal como o apresentado pelos Lip-Pep ($-22,3 \pm 3,54$ mV – Tabela 7) podem apresentar estabilidade satisfatória (ARDANI *et al.*, 2017).

Figura 19 – Cromatogramas correspondentes a: **a)** O peptídeo na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. **b)** Dialisado referente ao Lip-B e **c)** Dialisado referente ao Lip-Pep.

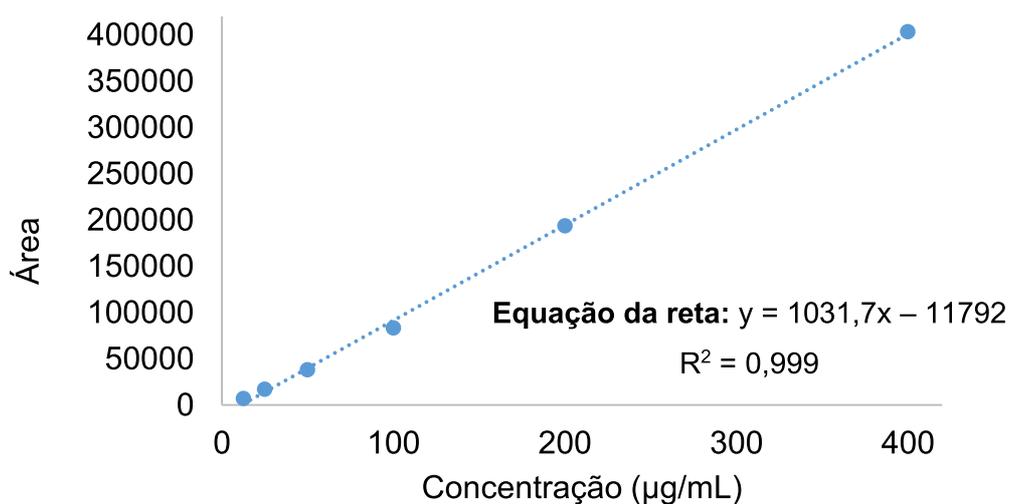


Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Para a determinação da EE, a quantificação do peptídeo foi realizada de forma indireta, após liofilização e reconstituição da solução de diálise obtida. Em um primeiro momento, uma solução aquosa do peptídeo (100 µg/mL) foi analisada por CLAE-FR, conforme descrito no item 4.4. Como resultado, obtivemos um pico bem resolvido em 210 nm, com tempo de retenção próximo a 6,25 minutos (Figura 19a), compatível com o resultado anteriormente obtido (Figura 12). Posteriormente, para a avaliação da interferência dos constituintes da formulação na detecção do peptídeo, o dialisado obtido a partir dos Lip-B foi avaliado por CLAE-FR. A partir do cromatograma obtido (Figura 19b), pode-se perceber que os excipientes não interferem na detecção do ativo.

Com isso, procedemos a quantificação do peptídeo em alíquotas provenientes do dialisado. Para tanto, uma curva analítica foi previamente construída a partir de diferentes concentrações do peptídeo (Figura 20). Como resultado, constatamos que no cromatograma obtido (Figura 19c), não houve detecção do peptídeo. Assim, assumimos que a EE foi próxima de 100%. Esse resultado indica que o método de nanoprecipitação padronizado em nosso trabalho foi eficiente para incorporar o peptídeo aos lipossomas.

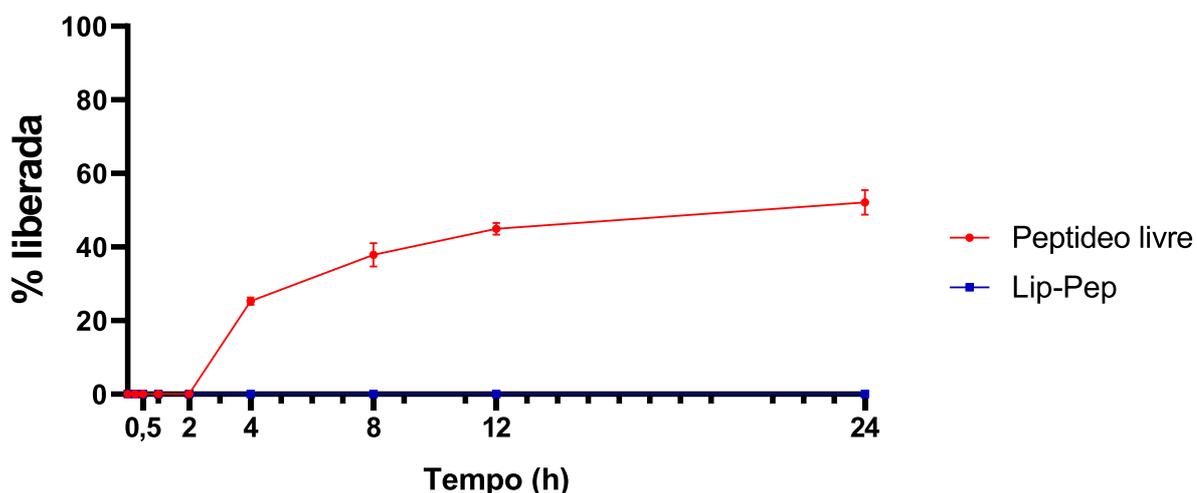
Figura 20 – Curva analítica, equação da reta e coeficiente de determinação para o peptídeo $^{26}[F]$ LfcinB (20 – 30)₂ nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, e 12,5 µg/mL.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os lipossomas também foram caracterizados com base no perfil de liberação *in vitro* do peptídeo. Surpreendentemente, observamos que não houve liberação do peptídeo a partir dos lipossomas durante as 24h de experimento (Figura 21). É possível que esse resultado esteja atrelado à forte interação eletrostática entre o fosfolipídio zwitteriônico (DPPC) e o peptídeo catiônico, o que dificulta sua liberação para o meio externo. Nesse sentido, para a continuidade do trabalho, sugerimos o desenvolvimento de lipossomas a partir de fosfolipídios neutros associados ao colesterol. Além disso, nossa intenção é preparar lipossomas furtivos visando ao aumento da eficácia *in vivo* da formulação.

Figura 21 – Perfil de liberação do peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ a partir dos lipossomas.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

6. CONCLUSÃO

Por meio do método de síntese de peptídeos em fase sólida, utilizando a metodologia de micro-ondas Fmoc/tBu, foi possível obter dois peptídeos derivados da LfcinB ($^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ e $^{26}\text{[1-NAL] LfcinB (20 - 30)}_2$). Os peptídeos apresentaram características comparáveis às descritas na literatura, incluindo os tempos de retenção (dados pela análise de CLAE-FR) e as respectivas massas moleculares (obtidas pelas análises de espectrometria de massa). Esses resultados permitiram confirmar as identidades moleculares dos derivados. No ensaio de viabilidade celular, o peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ apresentou maior seletividade frente às linhagens tumorais, sobretudo em relação às células MDA-MB-231, com baixa citotoxicidade para as células normais. Além disso, esse peptídeo, mesmo em concentrações abaixo da CI_{50} , apresentou efeito anti-migratório promissor para ambas as células tumorais, com efeito mais pronunciado para as células MDA-MB-231. Esses resultados indicam que o peptídeo $^{26}\text{[F] LfcinB (20 - 30)}_2$ possa ser uma alternativa promissora para o tratamento do câncer de mama de maior poder invasivo e com elevado potencial metastático. A partir do desenvolvimento da formulação, demonstramos a viabilidade tecnológica de encapsulação desse peptídeo em lipossomas convencionais. Os lipossomas obtidos apresentaram diâmetro adequado para a aplicação pretendida, potencial Zeta típico de sistemas coloidais fisicamente estáveis e eficiência de encapsulação elevada. No entanto, a liberação do peptídeo foi comprometida possivelmente devido às interações eletrostáticas entre essa molécula catiônica e o fosfolipídio zwitteriônico utilizado para o preparo dos lipossomas. Assim, para a continuidade do estudo, pretendemos desenvolver uma formulação alternativa, por meio da utilização de fosfolipídio não-iônico. Além disso, nossa intenção é a de obter lipossomas furtivos, utilizando o recobrimento desses lipossomas com PEG, para a otimização da eficácia in vivo da formulação.

REFERENCIAS

ARDANI, H K; IMAWAN, C; HANDAYANI, W; DJUHANA, D; HARMOKO, A; FAUZIA, V. Enhancement of the stability of silver nanoparticles synthesized using aqueous extract of *Diospyros discolor* Willd. leaves using polyvinyl alcohol. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 188, p. 012056, abr. 2017. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/188/1/012056>.

BAILLEUX, Caroline; EBERST, Lauriane; BACHELOT, Thomas. Treatment strategies for breast cancer brain metastases. **British Journal of Cancer**, v. 124, n. 1, p. 142–155, 5 jan. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01175-y>.

BAKARE, Olalekan Olanrewaju; GOKUL, Arun; WU, Ruomou; NIEKERK, Lee-Ann; KLEIN, Ashwil; KEYSTER, Marshall. Biomedical Relevance of Novel Anticancer Peptides in the Sensitive Treatment of Cancer. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1120, 29 jul. 2021. <https://doi.org/10.3390/biom11081120>.

BANGHAM, A.D.; HORNE, R.W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. **Journal of Molecular Biology**, v. 8, n. 5, p. 660-1N10, jan. 1964. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(64\)80115-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(64)80115-7).

BANGHAM, Alec D. Surrogate cells or trojan horses. The discovery of liposomes. **BioEssays**, v. 17, n. 12, p. 1081–1088, dez. 1995. <https://doi.org/10.1002/bies.950171213>.

BARRAGÁN CÁRDENAS, A.; INSUASTY CEPEDA, Diego Sebastián; NIÑO RAMÍREZ, Víctor Alfonso; UMAÑA PÉREZ, Adriana; OCHOA ZARZOSA, Alejandra; LÓPEZ MEZA, Joel E.; RIVERA-MONROY, Zuly Jenny; GARCÍA CASTAÑEDA, Javier Eduardo. The Nonapeptide RWQWRWQWR: A Promising Molecule for Breast Cancer Therapy. **ChemistrySelect**, v. 5, n. 31, p. 9691–9700, 21 ago. 2020. <https://doi.org/10.1002/slct.202002101>.

BARRAGÁN-CÁRDENAS, Andrea Carolina; INSUASTY-CEPEDA, Diego Sebastián; CÁRDENAS-MARTÍNEZ, Karen Johanna; LÓPEZ-MEZA, Joel; OCHOA-ZARZOSA, Alejandra; UMAÑA-PÉREZ, Adriana; RIVERA-MONROY, Zuly Jenny; GARCÍA-CASTAÑEDA, Javier Eduardo. LfcinB-Derived Peptides: Specific and punctual change of an amino acid in monomeric and dimeric sequences increase selective cytotoxicity in colon cancer cell lines. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 8, p. 103998, ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103998>.

BARRAGÁN CÁRDENAS, Andrea Carolina; URREA PELAYO, Maribel; NIÑO RAMÍREZ, Víctor Alfonso; UMAÑA PÉREZ, Adriana; VERNOT, Jean Paul; PARRA GIRALDO, Claudia Marcela; FIERRO MEDINA, Ricardo; RIVERA-MONROY, Zuly; GARCÍA CASTAÑEDA, Javier. Selective cytotoxic effect against the MDA-MB-468

breast cancer cell line of the antibacterial palindromic peptide derived from bovine lactoferricin. **RSC Advances**, v. 10, n. 30, p. 17593–17601, 2020. <https://doi.org/10.1039/D0RA02688C>.

BARRAGÁN-CÁRDENAS, Andrea Carolina; INSUASTY-CEPEDA, Diego Sebastián; VARGAS-CASANOVA, Yerly; LÓPEZ-MEZA, Joel Edmundo; PARRA-GIRALDO, Claudia Marcela; FIERRO-MEDINA, Ricardo; RIVERA-MONROY, Zuly Jenny; GARCÍA-CASTAÑEDA, Javier Eduardo. Changes in Length and Positive Charge of Palindromic Sequence RWQWRWQWR Enhance Cytotoxic Activity against Breast Cancer Cell Lines. **ACS Omega**, v. 8, n. 2, p. 2712–2722, 17 jan. 2023. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07336>.

BENNETT, Gavin; LUTZ, Robert; PARK, Peter; HARRISON, Helen; LEE, Kevin. Abstract 1167: Development of BT1718, a novel Bicycle Drug Conjugate for the treatment of lung cancer. **Cancer Research**, v. 77, n. 13_Supplement, p. 1167–1167, 1 jul. 2017. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2017-1167>.

BHARALI, Dhruba J.; KHALIL, Marianne; GURBUZ, Mujgan; SIMONE, Tessa M.; MOUSA, Shaker A. Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, p. 1–7, 2009. .

BINKLEY, Jill M.; HARRIS, Susan R.; LEVANGIE, Pamela K.; PEARL, Marcia; GUGLIELMINO, Janine; KRAUS, Valerie; ROWDEN, Diana. Patient perspectives on breast cancer treatment side effects and the prospective surveillance model for physical rehabilitation for women with breast cancer. **Cancer**, v. 118, n. S8, p. 2207–2216, 15 abr. 2012. <https://doi.org/10.1002/cncr.27469>.

CHEN, Wen; DUŠA, Filip; WITOS, Joanna; RUOKONEN, Suvi-Katriina; WIEDMER, Susanne K. Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14815, 4 out. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33107-5>.

CHHIKARA, Bhupender S.; PARANG, Keykavous. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. v. 10, n. 1, p. 451, 2023.

Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **Anticancer Res**. 35 (6): 3147-54, 2015. PMID: 26026074.

DAI, Xiaofeng; CHENG, Hongye; BAI, Zhonghu; LI, Jia. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3131–3141, 2017. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>.

DANAELI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018. DOI: [10.3390/pharmaceutics10020057](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057).

DARDEVET, Lucie; RANI, Dipti; AZIZ, Tarek; BAZIN, Ingrid; SABATIER, Jean-Marc; FADL, Mahmoud; BRAMBILLA, Elisabeth; DE WAARD, Michel. Chlorotoxin: A Helpful Natural Scorpion Peptide to Diagnose Glioma and Fight Tumor Invasion. **Toxins**, v. 7, n. 4, p. 1079–1101, 27 mar. 2015. <https://doi.org/10.3390/toxins7041079>.

DUARTE, D.C.; NICOLAU, A.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. The effect of bovine milk lactoferrin on human breast cancer cell lines. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 66–76, jan. 2011. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3629>.

DURANTI, Simona; FABI, Alessandra; FILETTI, Marco; FALCONE, Rosa; LOMBARDI, Pasquale; DANIELE, Gennaro; FRANCESCHINI, Gianluca; CARBOGNIN, Luisa; PALAZZO, Antonella; GARGANESE, Giorgia; PARIS, Ida; SCAMBIA, Giovanni; PIETRAGALLA, Antonella. Breast Cancer Drug Approvals Issued by EMA: A Review of Clinical Trials. **Cancers**, v. 13, n. 20, p. 5198, 16 out. 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13205198>.

ERDOĞAR, Nazlı; AKKIN, Safiye; BILENSOY, Erem. Nanocapsules for Drug Delivery: An Updated Review of the Last Decade. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 12, n. 4, p. 252–266, 11 mar. 2019. <https://doi.org/10.2174/1872211313666190123153711>.

FAN, D. et al. Nanomedicine in cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 293, 7 ago. 2023. DOI: 10.1038/s41392-023-01536-y.

FERLAY, Jacques; COLOMBET, Murielle; SOERJOMATARAM, Isabelle; PARKIN, Donald M.; PIÑEROS, Marion; ZNAOR, Ariana; BRAY, Freddie. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, 15 ago. 2021. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>.

FRANZOI, Maria Alice; AGOSTINETTO, Elisa; PERACHINO, Marta; DEL MASTRO, Lucia; DE AZAMBUJA, Evandro; VAZ-LUIS, Ines; PARTRIDGE, Ann H; LAMBERTINI, Matteo. Evidence-based approaches for the management of side-effects of adjuvant endocrine therapy in patients with breast cancer. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 7, p. e303–e313, jul. 2021. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30666-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30666-5).

FROKJAER, Sven; OTZEN, Daniel E. Protein drug stability: a formulation challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 4, p. 298–306, abr. 2005. <https://doi.org/10.1038/nrd1695>.

GIBBONS, J. A.; KANWAR, J. R.; KANWAR, R. K. Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 425, dez. 2015. DOI: 10.1186/s12885-015-1441-4.

GIFFORD, J. L.; HUNTER, H. N.; VOGEL, H. J. Lactoferricin: Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 22, p. 2588–2598, nov. 2005. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5373-z>.

GOTE, Vrinda; NOOKALA, Anantha Ram; BOLLA, Pradeep Kumar; PAL, Dhananjay. Drug Resistance in Metastatic Breast Cancer: Tumor Targeted Nanomedicine to the Rescue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4673, 28 abr. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22094673>.

GOUDA, Ahmed; SAKR, Omar S.; NASR, Maha; SAMMOUR, Omaima. Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, p. 102174, fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102174>.

GUERRA, Jorge Rodríguez; CÁRDENAS, Andrea Barragán; OCHOA-ZARZOSA, Alejandra; MEZA, Joel López; UMAÑA PÉREZ, Adriana; FIERRO-MEDINA, Ricardo; RIVERA MONROY, Zuly Jenny; GARCÍA CASTAÑEDA, Javier Eduardo. The tetrameric peptide LfcinB (20–25)₄ derived from bovine lactoferricin induces apoptosis in the MCF-7 breast cancer cell line. **RSC Advances**, v. 9, n. 36, p. 20497–20504, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9RA04145A>.

GUIMARÃES, Diana; CAVACO-PAULO, Artur; NOGUEIRA, Eugénia. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, p. 120571, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120571>.

HACK, C.; VOISS, P.; LANGE, S.; PAUL, A.; CONRAD, S.; DOBOS, G.; BECKMANN, M.; KÜMMEL, S. Local and Systemic Therapies for Breast Cancer Patients: Reducing Short-term Symptoms with the Methods of Integrative Medicine. **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, v. 75, n. 07, p. 675–682, 30 jul. 2015. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1557748>.

HARBECK, Nadia; PENAULT-LLORCA, Frédérique; CORTES, Javier; GNANT, Michael; HOUSSAMI, Nehmat; POORTMANS, Philip; RUDDY, Kathryn; TSANG, Janice; CARDOSO, Fatima. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 66, 23 set. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>.

HILCHIE, Ashley L.; VALE, Rachel; ZEMLAK, Tyler S.; HOSKIN, David W. Generation of a hematologic malignancy-selective membranolytic peptide from the antimicrobial core (RRWQWR) of bovine lactoferricin. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 95, n. 2, p. 192–198, out. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.07.006>.

HUANG, W. et al. Learning from Host-Defense Peptides: Cationic, Amphipathic Peptoids with Potent Anticancer Activity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e90397, 28 fev. 2014.

HUERTAS, Nataly; MONROY, Zuly; MEDINA, Ricardo; CASTAÑEDA, Javier. Antimicrobial Activity of Truncated and Polyvalent Peptides Derived from the FKRRRQWQWRMKKGLA Sequence against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 987, 14 jun. 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22060987>.

INCA. **O que é câncer?** 31 maio 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>.

INSUASTY CEPEDA, Diego; PINEDA CASTAÑEDA, Héctor; RODRÍGUEZ MAYOR, Andrea; GARCÍA CASTAÑEDA, Javier; MALDONADO VILLAMIL, Mauricio; FIERRO MEDINA, Ricardo; RIVERA MONROY, Zuly. Synthetic Peptide Purification via Solid-Phase Extraction with Gradient Elution: A Simple, Economical, Fast, and Efficient Methodology. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1215, 28 mar. 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24071215>.

INSUASTY CEPEDA, Diego Sebastián; BARRAGÁN CÁRDENAS, Andrea Carolina; ARDILA CHANTRE, Natalia; CÁRDENAS MARTÍNEZ, Karen Johanna; RINCÓN QUIÑONES, Isabella; VARGAS CASANOVA, Yerly; OCHOA ZARZOSA, Alejandra; LOPEZ MEZA, Joel Edmundo; PARRA GIRALDO, Claudia Marcela; OSPINA GIRALDO, Luis Fernando; FIERRO MEDINA, Ricardo; GARCÍA CASTAÑEDA, Javier Eduardo; RIVERA MONROY, Zuly Jenny. Non-natural amino acids into LfcinB-derived peptides: effect in their (i) proteolytic degradation and (ii) cytotoxic activity against cancer cells. **Royal Society Open Science**, v. 10, n. 6, p. 221493, jun. 2023. <https://doi.org/10.1098/rsos.221493>.

INSUASTY CEPEDA, Diego Sebastián; BARRAGÁN CÁRDENAS, Andrea Carolina; OCHOA ZARZOSA, Alejandra; LÓPEZ MEZA, Joel E.; FIERRO MEDINA, Ricardo; GARCÍA CASTAÑEDA, Javier Eduardo; RIVERA MONROY, Zuly Jenny. Peptides Derived from (RRWQWRMKKLG)₂-K-Ahx Induce Selective Cellular Death in Breast Cancer Cell Lines through Apoptotic Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4550, 26 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21124550>.

JAIN, Kewal K. An Overview of Drug Delivery Systems. *In*: JAIN, Kewal K. (org.). **Drug Delivery Systems**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2020. v. 2059, p. 1–54. DOI 10.1007/978-1-4939-9798-5_1. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9798-5_1. Acesso em: 10 jan. 2023.

JAIN, Vikas; KUMAR, Hitesh; ANOD, Haritha V.; CHAND, Pallavi; GUPTA, N. Vishal; DEY, Surajit; KESHARWANI, Siddharth S. A review of nanotechnology-based approaches for breast cancer and triple-negative breast cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 326, p. 628–647, out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.003>.

JUAN, Alberto; CIMAS, Francisco J.; BRAVO, Iván; PANDIELLA, Atanasio; OCAÑA, Alberto; ALONSO-MORENO, Carlos. Antibody Conjugation of

Nanoparticles as Therapeutics for Breast Cancer Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6018, 21 ago. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21176018>.

KAISER, E.; COLESCOTT, R.L.; BOSSINGER, C.D.; COOK, P.I. 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, abr. 1970. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(70\)90146-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90146-6).

KALYANE, Dnyaneshwar; RAVAL, Nidhi; MAHESHWARI, Rahul; TAMBE, Vishakha; KALIA, Kiran; TEKADE, Rakesh K. Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. **Materials Science and Engineering: C**, v. 98, p. 1252–1276, maio 2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.066>.

KURRIKOFF, Kaido; APHKHAZAVA, David; LANGEL, Ülo. The future of peptides in cancer treatment. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 47, p. 27–32, ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.01.008>.

LARGE, Danielle E.; ABDELMESSIH, Rudolf G.; FINK, Elizabeth A.; AUGUSTE, Debra T. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 176, p. 113851, set. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851>.

LI, Xian; GAO, Beibei; SU, Xiulan. Anticancer bioactive peptide combined with docetaxel and its mechanism in the treatment of breast cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 18 jun. 2020. DOI 10.3892/etm.2020.8902. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.8902>. Acesso em: 10 jan. 2023.

LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, fev. 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>.

LIAO, Hsin-Wei; GARRIS, Christopher; PFIRSCHKE, Christina; RICKELT, Steffen; ARLAUCKAS, Sean; SIWICKI, Marie; KOHLER, Rainer H.; WEISSLEDER, Ralph; SUNDVOLD-GJERSTAD, Vibeke; SVEINBJØRNSSON, Baldur; REKDAL, Øystein; PITTET, Mikael J. LTX-315 sequentially promotes lymphocyte-independent and lymphocyte-dependent antitumor effects. **Cell Stress**, v. 3, n. 11, p. 348–360, 11 nov. 2019. <https://doi.org/10.15698/cst2019.11.204>.

LIECHTY, William B.; PEPPAS, Nicholas A. Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 2, p. 241–246, fev. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.08.004>.

LIU, Peng; CHEN, Guiliang; ZHANG, Jingchen. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1372, 17 fev. 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>.

LIU, Yanqing; TAVANA, Omid; GU, Wei. p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 7, p. 564–577, 19 jul. 2019. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz060>.

MARQUS, Susan; PIROGOVA, Elena; PIVA, Terrence J. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 1, p. 21, dez. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0328-x>.

MATTHEWS, Helen K.; BERTOLI, Cosetta; DE BRUIN, Robertus A. M. Cell cycle control in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 74–88, jan. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

MULDER, K. C. L. et al. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.

NAJLAH, M. et al. Development of Injectable PEGylated Liposome Encapsulating Disulfiram for Colorectal Cancer Treatment. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, p. 610, 14 nov. 2019. DOI: 10.3390/pharmaceutics11110610.

National Library of Medicine (NIH). A Cancer Research UK Phase I/IIa Clinical Trial of BT1718, (A Bicycle Drug Conjugate) Given Intravenously in Patients With Advanced Solid Tumours. **Clinical Trials**. 2024. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03486730?cond=Solid%20Tumor&intr=BT1718&rank=1>

National Library of Medicine (NIH). A Phase 1/2 Multi-Center, Safety and Efficacy Study Evaluating Intravenously Administered 131I-TM601 in Patients With Progressive and/or Recurrent Malignant Glioma. **Clinical Trials**. 2024. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00683761?cond=Glioma&term=Peptide&intr=Chlorotoxin&rank=1>

NEVAGI, Reshma J.; TOTH, Istvan; SKWARCZYNSKI, Mariusz. Peptide-based vaccines. **Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering**. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 327–358. DOI 10.1016/B978-0-08-100736-5.00012-0. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081007365000120>. Acesso em: 10 jan. 2023.

PEROU, Charles M.; SØRLIE, Therese; EISEN, Michael B.; VAN DE RIJN, Matt; JEFFREY, Stefanie S.; REES, Christian A.; POLLACK, Jonathan R.; ROSS, Douglas T.; JOHNSEN, Hilde; AKSLEN, Lars A.; FLUGE, Øystein; PERGAMENSCHIKOV, Alexander; WILLIAMS, Cheryl; ZHU, Shirley X.; LØNNING, Per E.; BØRRESEN-DALE, Anne-Lise; BROWN, Patrick O.; BOTSTEIN, David. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 17 ago. 2000. <https://doi.org/10.1038/35021093>.

RAHMAN, Rizdwan; FONSEKA, Alyssa Danielle; SUA, Shiang-Chia; AHMAD, Munirah; RAJENDRAN, Ramkumar; AMBU, Stephen; DAVAMANI, Fabian; KHOO, Alan Soo-Beng; CHITRA, Ebenezer. Inhibition of breast cancer xenografts in a mouse model and the induction of apoptosis in multiple breast cancer cell lines by lactoferricin B peptide. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, n. 15, p. 7181–7189, ago. 2021. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16748>.

RICHARDSON, Angela; DE ANTUENO, Roberto; DUNCAN, Roy; HOSKIN, David W. Intracellular delivery of bovine lactoferricin's antimicrobial core (RRWQWR) kills T-leukemia cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, n. 4, p. 736–741, out. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.083>.

RODRIGUEZ-OCHOA, N. et al. Bovine holo-lactoferrin inhibits migration and invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 1, p. 193–201, jan. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07943-8>.

RODRÍGUEZ, Verónica; PINEDA, Héctor; ARDILA, Natalia; INSUASTY, Diego; CÁRDENAS, Karen; ROMÁN, Julieth; URREA, Maribel; RAMÍREZ, David; FIERRO, Ricardo; RIVERA, Zuly; GARCÍA, Javier. Efficient Fmoc Group Removal Using Diluted 4-Methylpiperidine: An Alternative for a Less-Polluting SPPS-Fmoc/tBu Protocol. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 585–587, mar. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09865-9>.

SANTOS, Elias da Silva; NOGUEIRA, Karina Alexandre Barros; FERNANDES, Luiziana Cavalcante Costa; MARTINS, Jéssica Roberta Pereira; REIS, Alice Vitoria Frota; NETO, José de Brito Vieira; JÚNIOR, Ivanildo José da Silva; PESSOA, Claudia; PETRILLI, Raquel; ELOY, Josimar O. EGFR targeting for cancer therapy: Pharmacology and immunoconjugates with drugs and nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, p. 120082, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120082>.

SIDDIQUA, A; KHATTAK, K; NWAZ, S. Venom proteins; Prospects for anticancer therapy. v. 52, n. 2, 2019. Disponível em: <http://www.pjbm.com/index.php/pjbm/article/view/35>.

SILVA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. [S. l.]: Inca, 2018.

SMOLARZ, B.; NOWAK, Anna Zadrożna; ROMANOWICZ, H. Breast Cancer - Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). v. 10, n. 14, 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/cancers14102569>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/10/2569>.

SOLARTE, Víctor A.; ROSAS, Jaiver E.; RIVERA, Zuly J.; ARANGO-RODRÍGUEZ, Martha L.; GARCÍA, Javier E.; VERNOT, Jean-Paul. A Tetrameric Peptide Derived from Bovine Lactoferricin Exhibits Specific Cytotoxic Effects against Oral Squamous-Cell Carcinoma Cell Lines. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–13, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/630179>.

SMITH, M. C. et al. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 24, p. 5779–5787, set. 2017. DOI: 10.1007/s00216-017-0527-z.

SPANO, D. et al. Molecular networks that regulate cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 3, p. 234–249, jun. 2012. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.03.006.

TRAN, Phuong; LEE, Sang-Eun; KIM, Dong-Hyun; PYO, Yong-Chul; PARK, Jeong-Sook. Recent advances of nanotechnology for the delivery of anticancer drugs for breast cancer treatment. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 50, n. 3, p. 261–270, maio 2020. <https://doi.org/10.1007/s40005-019-00459-7>.

VARGAS CASANOVA, Yerly; RODRÍGUEZ GUERRA, Jorge; UMAÑA PÉREZ, Yadi; LEAL CASTRO, Aura; ALMANZAR REINA, Giovanni; GARCÍA CASTAÑEDA, Javier; RIVERA MONROY, Zuly. Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1641, 29 set. 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22101641>.

WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA**, v. 321, n. 3, p. 288, 22 jan. 2019. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>.

WANG, Shile; CHEN, Yanyu; GUO, Jiancheng; HUANG, Qinqin. Liposomes for Tumor Targeted Therapy: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2643, 31 jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24032643>.

WATASE, Chikashi; SHIINO, Sho; SHIMOI, Tatsunori; NOGUCHI, Emi; KANEDA, Tomoya; YAMAMOTO, Yusuke; YONEMORI, Kan; TAKAYAMA, Shin; SUTO, Akihiko. Breast Cancer Brain Metastasis—Overview of Disease State, Treatment Options and Future Perspectives. **Cancers**, v. 13, n. 5, p. 1078, 3 mar. 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13051078>.

WEERAPREEYAKUL, N. et al. Evaluation of the anticancer potential of six herbs

against a hepatoma cell line. **Chinese Medicine**, v. 7, n. 1, p. 15, 2012.

WEIGELT, Britta; GEYER, Felipe C.; REIS-FILHO, Jorge S. Histological types of breast cancer: How special are they? **Molecular Oncology**, v. 4, n. 3, p. 192–208, jun. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004>.

WHO. Breast Cancer. 36/03 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.

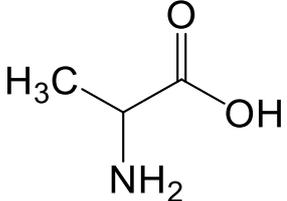
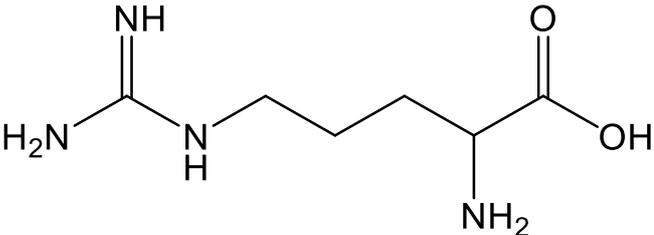
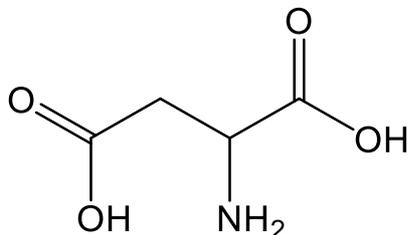
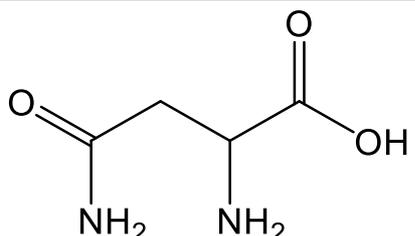
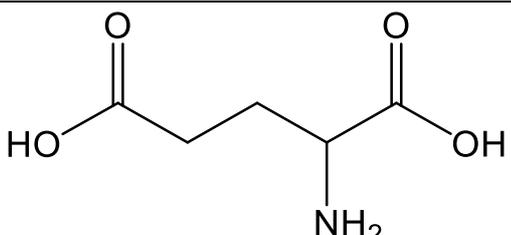
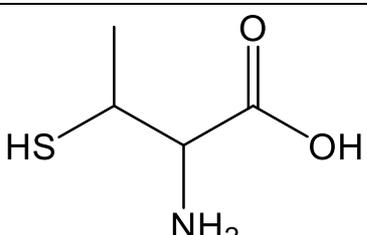
XIAO, Yu-Feng; JIE, Meng-Meng; LI, Bo-Sheng; HU, Chang-Jiang; XIE, Rui; TANG, Bo; YANG, Shi-Ming. Peptide-Based Treatment: A Promising Cancer Therapy. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–13, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/761820>.

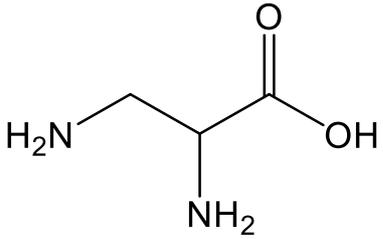
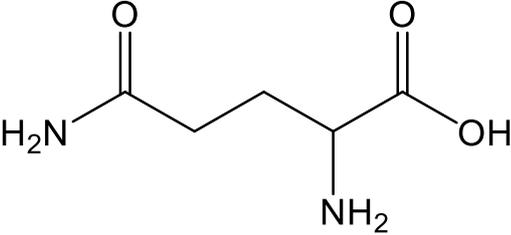
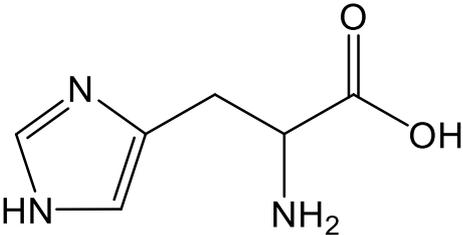
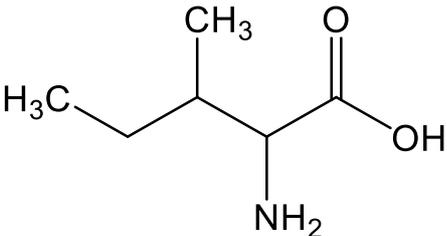
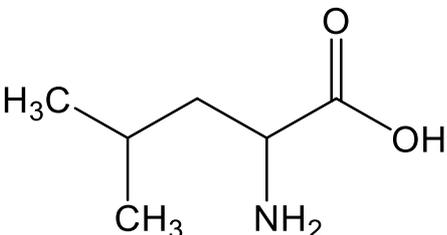
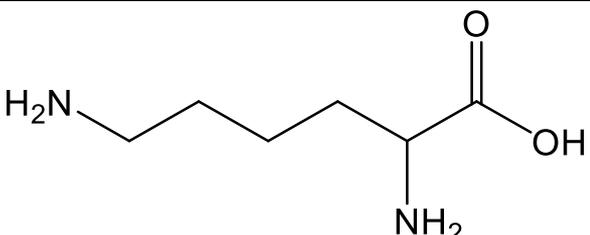
YAMAGUCHI, H.; CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 5, p. 642–652, maio 2007.

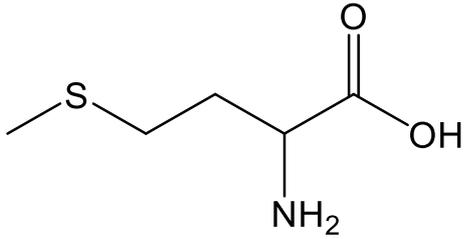
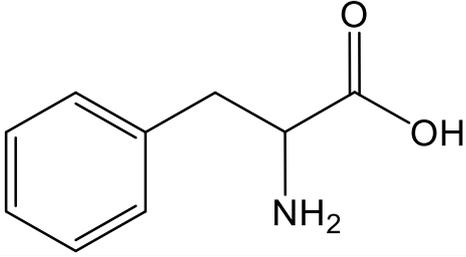
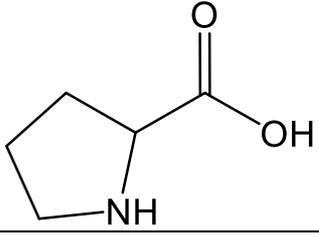
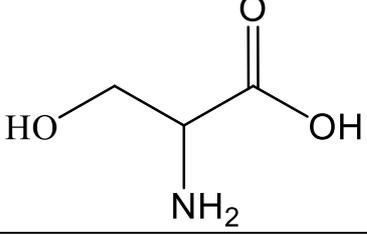
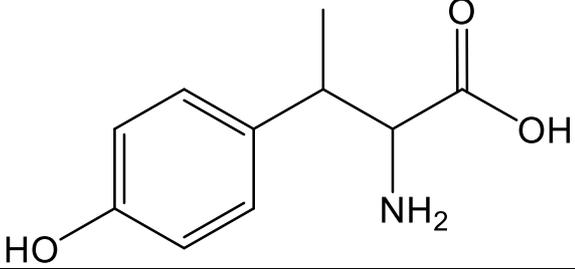
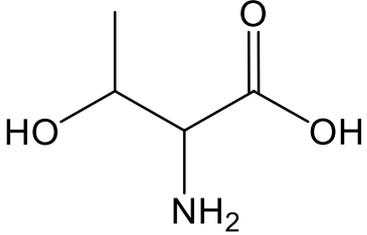
ZHANG, Yunlei; NICOLAU, Ana; LIMA, Cristovao F.; RODRIGUES, Lígia R. Bovine Lactoferrin Induces Cell Cycle Arrest and Inhibits Mtor Signaling in Breast Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 8, p. 1371–1385, 17 nov. 2014. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.956260>.

ZIEGLER, E. et al. Generation of MCF-7 cells with aggressive metastatic potential in vitro and in vivo. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 148, n. 2, p. 269–277, nov. 2014. DOI: 10.1007/s10549-014-3159-4.

ANEXO A - Estrutura química dos aminoácidos.

Nome	Letra	Abreviatura	Estrutura
Alanina	A	Ala	
Arginina	R	Arg	
Ácido aspártico	D	Asp	
Asparagina	N	Asn	
Ácido glutâmico	E	Glu	
Cisteína	C	Cys	

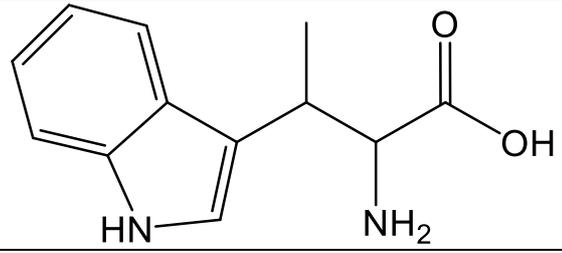
Glicina	G	Gly	 <chem>NCC(N)C(=O)O</chem>
Glutamina	Q	Gln	 <chem>NC(=O)CCC(N)C(=O)O</chem>
Histidina	H	His	 <chem>NC1=CN=CN=C1CC(N)C(=O)O</chem>
Isoleucina	I	Ile	 <chem>CC(C)C(C)C(N)C(=O)O</chem>
Leucina	L	Leu	 <chem>CC(C)CC(N)C(=O)O</chem>
Lisina	K	Lys	 <chem>NCCCCC(N)C(=O)O</chem>

Metionina	M	Met	
Fenilalanina	F	Phe	
Prolina	P	Pro	
Serina	S	Ser	
Tirosina	Y	Tyr	
Treonina	T	Thr	

Triptofano

W

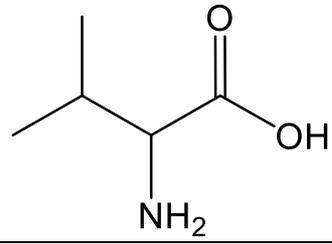
Trp



Valina

V

Val



ANEXO B – Produção científica

Apresentação de poster no VII Congresso de Ciências Farmacêuticas de Ouro Preto - CONCIFOP





Review

Manuela de la Rosa Arbeláez, Davi Trombini Aleixo, Andrea Carolina Barragán Cárdenas, Frederico Pittella and Guilherme Diniz Tavares*

The role of synthetic peptides derived from bovine lactoferricin against breast cancer cell lines: a mini-review

<https://doi.org/10.1515/oncologie-2023-0297>

Received July 23, 2023; accepted October 8, 2023;
published online October 24, 2023

Introduction

Breast cancer has emerged as a burgeoning global health