



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de rãs: citotoxicidade *in vitro* em células tumorais humanas e genotoxicidade em *Allium cepa* e linfócitos sanguíneos humanos

JOSÉ JAURO LOPES ANCHIÊTA JÚNIOR

Teresina – Piauí

2012

JOSÉ JAURO LOPES ANCHIÊTA JÚNIOR

Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de rãs: citotoxicidade *in vitro* em células tumorais humanas e genotoxicidade em *Allium cepa* e linfócitos sanguíneos humanos

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.

Orientadora: Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim.

TERESINA

2012

JOSÉ JAURO LOPES ANCHIÊTA JÚNIOR

Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de rãs: citotoxicidade *in vitro* em células tumorais humanas e genotoxicidade em *Allium cepa* e linfócitos sanguíneos humanos

Aprovado em 28/11/2012

BANCA EXAMINADORA:

Presidente:

Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim

Campus Senador Helvídio Nunes de Barros - UFPI

Examinador Interno:

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Campus Senador Helvídio Nunes de Barros - UFPI

Examinador Externo:

Profa. Dra. Carla Eiras

Campus Ministro Reis Velloso - UFPI

Suplente:

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Campus Ministro Petrônio Portella - UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Antonio dos Santos Rocha Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Guilherme Ferre Pompeu

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Lívio Cesar Cunha Nunes

AGRADECIMENTOS

À Deus pela inspiração, motivação, força, coragem e saúde.

À minha orientadora, Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim, pela orientação e exemplo de pessoa e pesquisadora, ao qual irei seguir.

Aos Professores/Pesquisadores, Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite, Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão e Dra. Ana Amélia Carvalho Melo Cavalcante, pela colaboração nas pesquisas referentes à essa dissertação.

Aos colegas de laboratório, Handerson Rodrigues Silva Lima, Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti, Msc. Alisson Ferreira Dantas, Msc. Débora Cássia Vieira Gomes e Msc. Leiz Maria Costa Veras Miura, pela efetiva e decisiva contribuição nos experimentos realizados, muito obrigado!

Ao Coordenador do PPGCF/UFPI, Dr. Rivelilson Mendes de Freitas, pelo exemplo de pesquisador e pelo empenho para contribuir com o crescimento deste programa.

Aos professores do PPGCF/UFPI.

Aos colegas da segunda turma do PPGCF/UFPI pelas experiências compartilhadas durante o período de convivência dentro e fora da sala de aula.

Aos professores que compuseram as bancas de qualificação e defesa: Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho, Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira, Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira e Dra. Carla Eiras.

Aos meus pais, José Jauro Lopes Anchiêta e Maria do Socorro e Silva Anchiêta, pelo amor incondicional, exemplo e investimento em minha formação.

Aos meus irmãos, Jardel Franco e Silva Anchiêta e Jamaira Lanna e Silva Anchiêta.

À toda minha família, incluindo avós, tias, tios, primos e primas, em especial às minhas madrinhas, Maria do Rosário de Fátima e Silva e Maria de Jesus Assunção e Silva, pelo amor e exemplo.

À amiga e colega de mestrado, Talita Mendes de Oliveira, por tudo desde a época da Graduação em Farmácia.

À todos que torceram e torcem pelo meu sucesso!

LABORATÓRIOS E INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Laboratório de Nanossistemas Farmacêuticos de Liberação Sustentada – NANOSFAR/ NTF - UFPI

Responsável: Prof. Dra. Hercília Maria Lins Rolim

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela – Bairro Ininga.

CEP: 64049-55. Teresina – PI. Brasil.

Laboratório de Genotoxicidade – NTF - UFPI

Responsável: Prof. Dra. Ana Amélia Carvalho Melo Cavalcante

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela – Bairro Ininga.

CEP: 64049-55. Teresina – PI. Brasil.

Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC) – UFPI

Responsável: Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

Campus Universitário Ministro Reis Velloso.

CEP: 64202-020. Parnaíba – PI. Brasil.

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE

Responsável: Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães.

Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Cidade Universitária.

CEP: 50670-901. Recife – PE. Brasil.

Laboratório de Cancerologia Experimental – UFPE

Responsável: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva.

Av. Prof. Moraes Rego, S/N. Cidade Universitária.

CEP: 50670-901. Recife – PE. Brasil.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	9
Lista de tabelas	11
Lista de figuras	12
Resumo	15
Abstract	16
1. Introdução	17
2. Capítulo 1 - Revisão de literatura geral: utilização terapêutica de peptídeos citotóxicos extraídos da pele de rãs	21
Resumo	21
Abstract	22
2.1. Nanotecnologia Farmacêutica	23
2.2. Lipossomas	24
2.3. Terapêutica do câncer	28
2.4. Genotoxicidade	29
2.5. Peptídeos catiônicos anfipáticos	31
2.6. Dermaseptina 01: um peptídeo obtido da secreção de anuros da espécie <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	33
2.7. Conclusão	36
Referências	36
3. Capítulo 2 – Desenvolvimento, caracterização físico-química e estabilidade física de lipossomas contendo dermaseptina 01	43
Resumo	43
Abstract	44
3.1. Introdução	45
3.2. Material e Métodos	47
3.3. Resultados e Discussão	49
3.4. Conclusão	60

Referências	60
4. Capítulo 3 – Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> de um peptídeo derivado de rãs (dermaseptina 01) na forma livre e lipossomal em células tumorais humanas	65
Resumo	65
Abstract	66
4.1. Introdução	67
4.2. Material e Métodos	69
4.3. Resultados e Discussão	70
4.4. Conclusão	74
Referências	74
5. Capítulo 4 – Avaliação genotóxica da dermaseptina 01 livre (não-encapsulada) em <i>Allium cepa</i>, e encapsulada em lipossomas em linfócitos sanguíneos humanos	79
Resumo	79
Abstract	80
5.1. Introdução	81
5.2. Material e Métodos	83
5.3. Resultados e Discussão	86
5.4. Conclusão	96
Referências	96
Referências	100
Apêndices	102

Lista de abreviaturas

ACN – acetonitrila

Apop – células apoptóticas

ATP – trifosfato de adenosina

BNMN – células binucleadas com micronúcleos

CBMN – Cytokinesis-Blocked Micronucleus

CIM – concentração inibitória mínima

CI₅₀ – concentração inibitória em 50% para o crescimento celular

Da – daltons

DMSO – dimetilsulfóxido

DS - dermaseptina

DS 01 – dermaseptina 01

DSPE - fosfatidiletanolamina

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

(GLWS-TIKQKGKEAAIAAAKAA-GQAALGAL - NH₂) – (Glicina, Leucina, Triptofano, Serina - Treonina, Isoleucina, Lisina, Glutamina, Lisina, Glicina, Lisina, Ácido glutâmico, Alanina, Alanina, Isoleucina, Alanina, Alanina, Alanina, Lisina, Alanina, Alanina - Glicina, Glutamina, Alanina, Alanina, Leucina, Glicina, Alanina, Leucina – extremidade aminoterminal).

HEp-2 – células de carcinoma epidermóide de laringe humana

HPLC – *high-performance liquid chromatography*

HT-29 - células de adenocarcinoma de cólon humano

Hz - hertz

IDN – índice de divisão nuclear

IDNC – índice de divisão nuclear com citotoxicidade

LC – lipossomas convencionais neutros vazios

LF – lipossomas furtivos neutros vazios

LC+ – lipossomas convencionais catiônicos vazios

LF+ – lipossomas furtivos catiônicos vazios

LCD – lipossomas convencionais neutros contendo dermaseptina 01

LFD – lipossomas furtivos neutros contendo dermaseptina 01

LCD+ – lipossomas convencionais catiônicos contendo dermaseptina 01

LFD+ – lipossomas furtivos catiônicos contendo dermaseptina 01

LUVs – *large unilamellar vesicles*

MLVs – *multilamellar vesicles*

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

M1 a M4 - número de células viáveis contendo de 1 a 4 núcleos

NADP – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

Necrot – células necróticas

NCI-H292 – células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano

NT – número total de células viáveis

NTC – número total de células (viáveis e não-viáveis)

PDI – índice de polidispersão

pKa – constante de dissociação ácida

PC – fosfatidilcolina

PEG - polietilenoglicol

PZ – potencial zeta

rpm – rotações por minuto

SUVs – *small unilamellar vesicles*

TFA – ácido trifluoroacético

TP – tamanho de partícula

μM – micromolar

Lista de tabelas

Capítulo 2

Tabela 1 - Características físico-químicas iniciais (tempo zero) dos lipossomas contendo DS 01	50
Tabela 2 – Características físico-químicas iniciais (tempo zero) dos lipossomas vazios	52
Tabela 3 – Testes de estabilidade acelerada dos lipossomas convencionais e furtivos, neutros, contendo DS 01.....	53
Tabela 4 – Testes de estabilidade acelerada dos lipossomas convencionais e furtivos, catiônicos, contendo DS 01.....	54
Tabela 5 – Médias dos parâmetros numéricos de TP, PDI e pH no tempo zero e após a estabilidade acelerada para as quatro formulações lipossomais contendo DS 01	56
Tabela 6 – Testes de estabilidade em longo prazo dos lipossomas convencionais e furtivos, neutros, contendo DS 01.....	57
Tabela 7 – Testes de estabilidade em longo prazo dos lipossomas convencionais e furtivos, catiônicos, contendo DS 01.....	58
Tabela 8 – Médias dos parâmetros numéricos de TP, PDI e pH no tempo zero e após a estabilidade a longo prazo para as quatro formulações lipossomais contendo DS 01	59

Capítulo 3

Tabela 9 - Inibição do crescimento de linhas celulares de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano (NCI-H292)	71
Tabela 10 - Inibição do crescimento de linhas celulares de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2)	72

Capítulo 4

Tabela 11 – Índice mitótico (citotoxicidade), aberrações cromossômicas e micronúcleos (mutagenicidade) e comprimento das raízes (toxicidade) de células de <i>Allium cepa</i> expostas a DS 01 livre	87
Tabela 12 – Teste CBMN em linfócitos sanguíneos humanos expostos à DS 01 50 µg/mL e lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01	92

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1. Tamanhos de estruturas biologicamente relevantes	23
Figura 2. Representação esquemática do direcionamento de substâncias encapsuladas em lipossoma multilamelar: moléculas hidrossolúveis, lipossolúveis e anfipáticas	25
Figura 3. Vesícula lipossomal furtiva e sítio-específico	27
Figura 4. <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i> Daudin (1801)	33
Figura 5. Peptídeo bioativo DS 01: estrutura em hélice, demonstrando o caráter anfifílico da molécula	34

Capítulo 2

Figura 1. Representação esquemática da formação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico e sonicação	48
---	----

Capítulo 4

Figura 1. Bulbos de <i>A. cepa</i> expostos à DS 01 (12,5, 25 e 50 µg/mL), quatro recipientes por concentração	84
Figura 2. Toxicidade da DS 01 livre (12,5, 25 e 50 µg/mL) em meristemas de raízes de <i>A. cepa</i> através do crescimento das raízes	88
Figura 3. Citotoxicidade da DS 01 livre (12,5, 25 e 50 µg/mL) em meristemas de raízes de <i>A. cepa</i> através do índice mitótico	89
Figura 4. Mutagenicidade da DS 01 livre (12,5, 25 e 50 µg/mL) em meristemas de raízes de <i>A. cepa</i> através da frequência total de aberrações cromossômicas	90
Figura 5. Mutagenicidade da DS 01 livre (12,5, 25 e 50 µg/mL) em meristemas de raízes de <i>A. cepa</i> através da frequência de micronúcleos	90
Figura 6. Microscopia óptica (1000x) das aberrações cromossômicas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expostas à DS 01 livre (50 µg/mL)	91
Figura 7. Representação esquemática simplificada dos processos de apoptose e necrose	94

Figura 8. Microscopia óptica (1000x) de células binucleadas e dos efeitos mutagênicos e citotóxicos de DS 01, LCD+ ou Paraquat em linfócitos sanguíneos humanos 95

Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de rãs: citotoxicidade *in vitro* em células tumorais humanas e genotoxicidade em *Allium cepa* e linfócitos sanguíneos humanos

ANCHIÊTA JÚNIOR, J.J.L.¹; LIMA, H.R.S.²; GOMES, D.C.V.³; DANTAS, A.F.³; CAVALCANTI, I.M.F.⁴; LEITE, J.R.S.A.⁵; MILITÃO, G.C.G.⁶; DA SILVA, T.G.⁶; CAVALCANTE, A.A.C.M.¹; MAGALHÃES, N.S.S.⁴; SANTOS, H.M.L.R.¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; ²Curso de Bacharelado em Farmácia; ³Núcleo de Tecnologia Farmacêutica. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, 64049-550, Teresina – PI, Brasil.

⁴Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami. Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife – PE, Brasil.

⁵Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, 64202-020, Parnaíba – PI, Brasil.

⁶Laboratório de Cancerologia Experimental. Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife – PE, Brasil.

Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de rãs: citotoxicidade *in vitro* em células tumorais humanas e genotoxicidade em *Allium cepa* e linfócitos sanguíneos humanos. JOSÉ JAURO LOPES ANCHIÊTA JÚNIOR. Orientadora: Hercília Maria Lins Rolim. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2012.

RESUMO

A dermaseptina 01 (DS 01) é um peptídeo catiônico anfipático isolado da secreção cutânea de rãs da espécie *Phyllomedusa hypochondrialis*. As dermaseptinas exercem ação lítica sobre membranas celulares de patógenos. Todavia, apresentam baixa resistência à atividade proteolítica plasmática quando administradas *in vivo*, e portanto, são rapidamente depuradas. Lipossomas são nanocarreadores amplamente utilizados e podem encapsular proteínas, protegendo-as contra a proteólise ou outros fatores desestabilizadores. O objetivo desse trabalho foi encapsular a DS 01 em lipossomas unilamelares pequenos (SUVs), realizando a caracterização físico-química e avaliando a estabilidade; estudar a citotoxicidade *in vitro* da DS 01 encapsulada e livre em células tumorais humanas; bem como verificar a genotoxicidade dessas formulações em *Allium cepa* e linfócitos sanguíneos humanos. Os lipossomas contendo DS 01 e vazios, neutros e catiônicos, foram preparados pelos métodos de hidratação do filme lipídico e sonicação. A caracterização físico-química inicial foi realizada em 24 horas. A estabilidade foi verificada pelos testes de estabilidade acelerada e em longo prazo. A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada pelo método do tetrazólio (MTT), e a genotoxicidade pelos testes *Allium cepa* e CBMN (Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese). Os lipossomas apresentaram caracterização e estabilidade satisfatórias. A DS 01 encapsulada e livre apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais de pulmão humano (NCI-H292), adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2). Para NCI-H292, os lipossomas convencionais neutros contendo DS 01 apresentaram efeito citostático maior que o peptídeo livre, ao contrário dos lipossomas furtivos. Para HT-29 e HEp-2, a encapsulação da DS 01 em lipossomas catiônicos potencializou a ação citotóxica do peptídeo, com inibições entre 82 e 100%. Os lipossomas vazios, destacadamente os catiônicos, foram citotóxicos. No teste *A. cepa*, a DS 01 50 µg/mL apresentou toxicidade e citotoxicidade significativa, e provavelmente não foi mutagênica. Outras concentrações (25 e 12,5 µg/mL) não apresentaram genotoxicidade significativa. No ensaio CBMN, o peptídeo livre e encapsulado em lipossomas catiônicos apresentaram mutagenicidade significativa, pela contagem de células binucleadas com micronúcleos, ainda que o peptídeo livre tenha promovido um valor maior. Quanto à citotoxicidade, a encapsulação reduziu significativamente a contagem de células necróticas; ambas as amostras não provocaram apoptose celular em número significativo. Outros ensaios de citotoxicidade em células tumorais e genotoxicidade estão sendo realizados.

Palavras-chave: Citotoxicidade *in vitro*, Dermaseptina 01, Genotoxicidade, Lipossomas, Peptídeos catiônicos anfipáticos.

Nanoencapsulation of a peptide isolated from frogs: *in vitro* cytotoxicity on human tumor cells and genotoxicity in *Allium cepa* and human blood lymphocytes. JOSÉ JAURO LOPES ANCHIÊTA JÚNIOR. Advisor: Hercília Maria Lins Rolim. Master's Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center of Health Sciences. Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2012.

ABSTRACT

Dermaseptin 01 (DS 01) is an amphipathic cationic peptide isolated from cutaneous secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis* frogs specie. Dermaseptins exert lytic action on pathogens cell membranes. However, exhibit low resistance to plasmatic proteolytic activity when *in vivo* administered, and therefore are rapidly cleared. Liposomes are nanocarriers widely used, and can encapsulate proteins, protecting them against proteolysis or others destabilizing factors. This work aimed to encapsulate DS 01 in small unilamellar vesicles (SUVs), performing the physicochemical characterization and evaluating stability; to study the *in vitro* cytotoxicity of DS 01 encapsulated and free in human tumor cells; and to verify the genotoxicity of these in *Allium cepa* and human blood lymphocytes. Liposomes loaded DS 01 and not-loaded, neutral and cationic, were prepared by lipid film hydration and sonication methods. Initial physicochemical characterization was performed after 24 hours. Stability was verified by accelerated and long-term tests. *In vitro* cytotoxicity was measured by tetrazolium method (MTT), and genotoxicity by *Allium cepa* and CBMN (Cytokinesis-Blocked Micronuclei) assays. Liposomes presented satisfactory characterization and stability. Encapsulated and free DS 01 showed cytotoxic activity on human lung tumor (NCI-H292), human colon adenocarcinoma (HT-29) and human larynx epidermoid carcinoma (HEp-2). To NCI-H292, neutral conventional liposomes containing DS 01 showed cytostatic effect higher than free peptide, unlike to the stealth liposomes. To HT-29 and HEp-2, the DS 01 encapsulation in cationic liposomes enhanced the cytotoxic action of peptide, with inhibitions between 82 and 100%. Not-loaded liposomes, notably cationic, were cytotoxic. In *A. cepa* assay, DS 01 50 µg/mL presented significant toxicity and cytotoxicity, and probably was not mutagenic. Other concentrations (25 and 12.5 µg/mL) don't showed significant genotoxicity. In CBMN assay, the free and cationic-liposomal peptide showed significant mutagenicity, by binucleated cells with micronuclei count, although the free peptide has promoted a higher value. For cytotoxicity, the encapsulation significantly reduced necrotic cell cont; both samples didn't caused apoptosis in significant number. Other tumor cytotoxicity and genotoxicity assays are being performed.

Key-words: Amphipatic cationic peptides, Dermaseptin 01, Genotoxicity, *In vitro* cytotoxicity, Liposomes.

1. Introdução

O Brasil encontra-se entre os países de maior biodiversidade mundial, contendo aproximadamente de 22% de todas as espécies vegetais e animais do planeta. Em contraste, apenas uma pequena parcela dessa biodiversidade tem sido explorada cientificamente quanto ao seu potencial para a produção de fármacos, extratos vegetais, dentre outros. A biodiversidade brasileira é uma importante fonte de riqueza que, para ser quantificada, mapeada e utilizada sustentavelmente, necessita de estudos prévios das descrições da fauna e flora regional, que interpretem os mecanismos da natureza (GOTTLIEB, 1998; TAKAKI; MODESTO; FIGUEIREDO, 2007).

Existe uma relação simbiótica entre o grau de biodiversidade e a descoberta de fármacos. Ao mesmo tempo, há uma falta de reconhecimento e valorização pela medicina, farmácia e leigos no mundo inteiro de que uma porcentagem considerável dos fármacos atualmente disponíveis advêm de fontes naturais. O maior potencial econômico da biodiversidade está associado ao descobrimento de novos fármacos originados ou sintetizados a partir de plantas, animais, fungos e bactérias (CORDELL, 2000; ENRÍQUEZ, 2001).

O delta do rio Parnaíba é uma importante área da zona costeira brasileira. Apresenta uma alta biodiversidade sendo o único delta em mar aberto das Américas, formado a partir do rio Parnaíba, divisor natural dos estados do Piauí e Maranhão. É composto por mais de 75 ilhas (MATTOS; IRVING, 2003). Neste bioma, encontram-se vários gêneros de plantas e animais, dentre eles espécies de anfíbios anuros (rãs e sapos).

Alguns animais vertebrados, mais precisamente os anfíbios da ordem Anura (anuros), produzem nas células que revestem as glândulas glandulares um verdadeiro arsenal de princípios ativos moleculares, como esteróides, alcalóides, amins biogênicas, proteínas e peptídeos. Essas substâncias são liberadas mediante estímulos apropriados e têm papel diversificado sobre as funções fisiológicas da pele ou na defesa contra predadores e microorganismos (PRATES; BLOCH JÚNIOR, 2000).

Os peptídeos produzidos por anfíbios estão entre as principais moléculas efetoras da imunidade inata. São codificados por genes, sintetizados por ribossomas e compreendem cadeias de aproximadamente 10 a 50 aminoácidos. A pele das rãs é uma fonte extraordinária de peptídeos antimicrobianos que atuam com um amplo espectro microbicida contra bactérias, fungos e protozoários. Essas substâncias possuem características particulares e potenciais utilidades terapêuticas, o que têm estimulado crescente interesse dos pesquisadores (RINALDI, 2002). Além da atividade microbicida com potencial para superar a resistência bacteriana, alguns destes peptídeos exibem potencial atividade anti-tumoral. Peptídeos

catiônicos com atividade antibacteriana potente não apresentaram atividade hemolítica em eritrócitos de mamíferos, mesmo em concentrações elevadas (1000 µg/mL) (REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004; BISHT et al., 2007).

Diferentes famílias de peptídeos têm sido descritas segundo atividade, características estruturais e organização genômica. Peptídeos obtidos de rãs da subfamília Phyllomedusinae possuem atividade antimicrobiana potente e relevância bioquímica. Dentre esses, estão as dermaseptinas (DSs). As DSs constituem uma família de peptídeos catiônicos que apresentam uma estrutura secundária aleatória em água e que, quando solubilizados em meios apolares, assumem uma estrutura anfipática em α -hélice. Exercem ação lítica sobre bactérias, protozoários, leveduras e fungos filamentosos em concentrações micromolares e apresentam como vantagens: ação rápida e espectro de atividade amplo, incluindo em patógenos gravemente resistentes, oferecendo, assim, possibilidades promissoras para superar a crescente resistência farmacológica bacteriana. As DSs têm fraco efeito desestabilizador sobre as membranas celulares de mamíferos (BATISTA et al., 1999; SALAY et al., 2011).

Algumas DSs com alto espectro e potência antimicrobiana (por exemplo, DSS4) apresentam menor capacidade seletiva entre as células-alvo, ou seja, maior atividade hemolítica e toxicidade *in vivo*, fatores limitantes para sua utilização, especialmente em nível sistêmico. Mesmo as modificações estruturais produzidas em análogos sintéticos dessas DSs não trouxeram resultados satisfatórios, já que a melhor seletividade celular afetou significativamente a organização anfipática e a atividade. Além disso, devido à baixa resistência à atividade proteolítica do soro e plasma, peptídeos catiônicos naturais geralmente apresentam atividade *in vitro* expressiva, mas uma limitada atividade *in vivo*. Peptídeos sintéticos multiméricos possuem uma longa meia-vida de circulação e uma melhor atividade antimicrobiana quando comparados aos seus homólogos lineares (PINI et al., 2005; ROTEM; MOR, 2008; ZAMPA et al., 2009).

Em um estudo realizado por Salay et al. (2011), a dermaseptina 01 (DS 01), extraída da pele das espécies *Phyllomedusa hypochondrialis* Daudin (1801) e *Phyllomedusa oreades* Brandão (2002), apresentou alta atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, antiprotozoária contra *Trypanosoma cruzi* e antileishmanial contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Lipossomas são microvesículas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas separadas por um meio aquoso. Essas vesículas podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas e são empregadas como potentes sistemas de carreamento e liberação de fármacos, eficazes na terapêutica do câncer, de infecções microbianas dentre outras. As formulações lipossomais podem apresentar eficácia e segurança superior em relação

aos tratamentos convencionais, uma vez que aumentam a biodisponibilidade, reduzem a toxicidade e reações adversas, e potencializam o efeito dos medicamentos (ANDRADE et al., 2004; BATISTA; DE CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007; PIMENTEL et al., 2007).

Ao observar os fatores limitantes para a aplicação *in vivo* das DSs, bem como a potencialidade terapêutica e toxicológica da DS 01, o objetivo desse trabalho foi encapsular este peptídeo em lipossomas; estudar a citotoxicidade *in vitro* dessas formulações em células tumorais humanas; bem como avaliar a genotoxicidade em *Allium cepa* e linfócitos sanguíneos humanos.

**Revisão de literatura geral: utilização terapêutica de peptídeos citotóxicos
extraídos da pele de rãs**

ANCHIÊTA JÚNIOR, J.J.L.¹; LEITE, J.R.S.A.²; SANTOS, H.M.L.R.¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas; Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, 64049-550, Teresina – PI, Brasil.

²Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, 64202-020, Parnaíba – PI, Brasil.

2. Capítulo 1 - Revisão de literatura geral: utilização terapêutica de peptídeos citotóxicos extraídos da pele de rãs

ANCHIÊTA JÚNIOR, J.J.L.¹; LEITE, J.R.S.A.²; SANTOS, H.M.L.R.¹

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas envolvida com o desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas farmacêuticos em escala micrométrica e nanométrica para controlar e direcionar a liberação de fármacos. Sistemas nanotecnológicos de carreamento conhecidos como lipossomas são vesículas formadas através da auto-organização de fosfolípidos em água e que podem encapsular fármacos, peptídeos, alimentos entre outros. Lipossomas são frequentemente utilizados como carreadores de fármacos antineoplásicos, como uma maneira de superar as limitações da terapia anti-câncer convencional. Substâncias citotóxicas e fármacos antineoplásicos exibem uma potencial genotoxicidade, como por exemplo, efeitos mutagênicos e danos cromossômicos. Neste contexto, peptídeos antimicrobianos anfipáticos secretados por uma ampla gama de organismos superiores, como rãs, possuem uma atividade citotóxica contra microorganismos, como bactérias e fungos, e são um importante componente da imunidade inata desses animais. Como as membranas celulares de microorganismos apresentam características estruturais semelhantes às de células cancerosas, esses peptídeos exibem uma potencial atividade antitumoral. Rãs da espécie *Phyllomedusa hypochondrialis* secretam em suas células cutâneas o peptídeo dermaseptina 01 (DS 01). Estudos preliminares com a DS 01 demonstraram citotoxicidade seletiva para microorganismos e ausência de toxicidade para hemácias e glóbulos brancos de mamíferos. Dessa forma, a DS 01 pode exibir uma atividade citotóxica seletiva para células cancerosas, e a encapsulação deste peptídeo em lipossomas, protegê-lo contra a inativação enzimática sanguínea, à qual peptídeos são naturalmente suscetíveis, para um posterior ensaio de atividade farmacológica *in vivo*.

Palavras-chave: Dermaseptina 01, Fármacos antineoplásicos, Genotoxicidade, Lipossomas, Nanotecnologia farmacêutica.

Abstract – Literature review: therapeutic use of cytotoxic peptides extracted from frogs skin

Pharmaceutical nanotechnology is the pharmaceutical sciences area involved with development, characterization and application of pharmaceutical systems in nanometer and micrometer scale to control and direct drug release. Nanotechnology systems of carrying known as liposomes are nanovesicles formed by self-organization of phospholipids in water and can encapsulate drugs, peptides, foods etc. Liposomes are frequently used as anticancer drugs carriers, to overcome limitations of conventional anticancer therapy. Cytotoxic substances and antineoplastic drugs exhibit a potential genotoxicity, for example mutagenic and chromosomal damage. In this context, amphipatic antimicrobial peptides secreted by a range variety of superior organisms, such frogs, have a cytotoxic activity against microorganisms as bacteria and fungi, and is an importante component of their innate immunity. As microorganisms cell membranes present structural characteristics similar to cancer cells, these peptides exhibit a potential anti-tumor activity. Frogs of *Phyllomedusa hypochondrialis* specie secrete by skin cells the dermaseptin 01 (DS 01) peptide. Preliminary studies showed selective cytotoxicity to microorganisms and no toxicity to mammals red and white blood cells. Thus, DS 01 could exhibit a selective cytotoxic activity to cancer cells, and its encapsulation in liposomes, protect it against blood enzymatic inactivation, wich peptides are naturally susceptible, to a subsequent *in vivo* pharmacological activity assay.

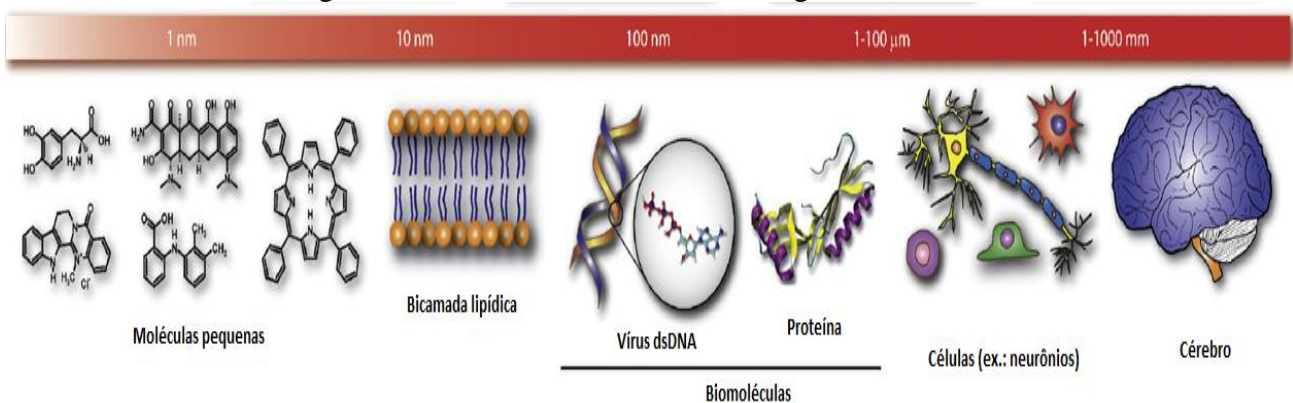
Key-words: Antineoplastic agents, Dermaseptin 01, Genotoxicity, Liposomes, Pharmaceutical nanotechnology.

2.1. Nanotecnologia Farmacêutica

O termo nanotecnologia recentemente tornou-se popular e representa os principais esforços atuais da Ciência e Tecnologia. Geralmente, refere-se à pesquisa na escala de 100 nanômetros ou menos. A nanotecnologia não é representada por apenas uma área específica, mas sim por uma grande variedade de disciplinas desde a ciência básica até as aplicações em saúde. Uma das importantes áreas da nanotecnologia é a nanomedicina, intervenção médica altamente específica em escala molecular para o diagnóstico, prevenção e tratamento das doenças (PARK, 2007).

A figura 1 demonstra a escala de tamanho para algumas estruturas biologicamente relevantes. A nanotecnologia farmacêutica atua em níveis micro e/ou nanomoleculares de estruturas .

Figura 1. Tamanhos de estruturas biologicamente relevantes.



Fonte: Adaptado de SUH et al., 2009.

A nanomedicina possui um grande potencial para revolucionar diagnóstico e terapêutica. Uma descrição da nanotecnologia farmacêutica baseada apenas nos limites de tamanho dos sistemas de carreamento e liberação de fármacos não é adequada, já que a utilidade desses sistemas deve-se à mais do que isso. A utilização dos nanotransportadores melhora a biodistribuição de fármacos, direciona moléculas ativas para os tecidos doentes (por exemplo, aumentando a absorção em células cancerosas), ao mesmo tempo em que protege os tecidos saudáveis, e impede que os fármacos sejam metabolizados no organismo antes de atingirem seu objetivo (PARK, 2007; BOISSEAU; LOUBATON, 2011).

Os nanossistemas apresentam como principais vantagens: o aumento da eficácia terapêutica; a liberação progressiva, controlada e/ou condicionada a estímulos, como pH ou temperatura; a possibilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas; a redução da dose terapêutica e da posologia; e o aumento da aceitação da terapia pelo paciente.

Alguns inconvenientes podem existir como: toxicidade, ausência de biocompatibilidade dos materiais e o relativo custo elevado para o desenvolvimento das formulações (PIMENTEL et al., 2007).

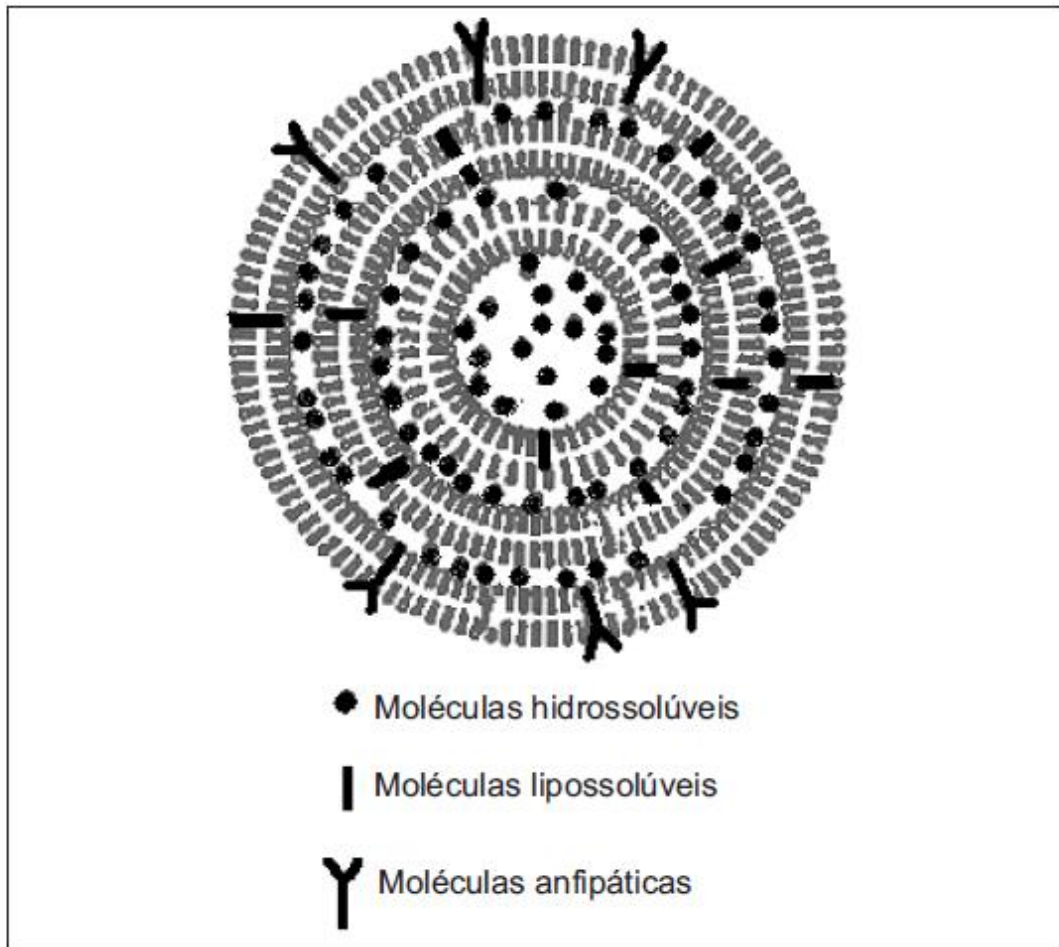
Ao interagir com moléculas biológicas em nanoescala, a nanotecnologia abre um campo vasto de pesquisas e aplicações em diagnóstico e tratamento *in vivo* e *in vitro*. Geralmente, consideram-se três gerações de sistemas nanotecnológicos de carreamento de fármacos (BOISSEAU; LOUBATON, 2011):

1. Primeira geração: tradicionais, como nanoesferas, nanocápsulas e lipossomas;
2. Segunda geração: nanopartículas revestidas com polímeros hidrofílicos;
3. Terceira geração: em desenvolvimento, representada pelas pesquisas mais recentes e complexas, por exemplo, combinação de núcleos biodegradáveis envolvidos por polímeros, com ligantes de reconhecimento na membrana.

2.2. Lipossomas

Lipossomas são microsferas formadas a partir da auto-organização de fosfolipídeos em água. Suas membranas são constituídas por uma ou várias bicamadas lipídicas curvas que aprisionam uma parte do meio aquoso no qual são suspensas. Devido ao caráter anfifílico dos fosfolipídeos e sua organização em estruturas fechadas, lipossomas podem encapsular moléculas hidrofóbicas em sua membrana bicamada ou hidrofílicas na cavidade aquosa interna, bem como substâncias anfifílicas. Além disso, os fármacos podem ser intercalados na região polar (cabeça), adsorvidos sobre a superfície de membrana ou ancorados pela cauda hidrofóbica. Os sistemas lipossomais de carreamento são uma plataforma tecnológica bem estabelecida para a distribuição de uma ampla variedade de agentes medicinais, produzindo uma série de produtos aprovados clinicamente (GRABIELLE-MADELMONT; LESIEUR; OLLIVON, 2003; CHAUDHURY, et al., 2012). A figura 2 representa o direcionamento da encapsulação de moléculas em um lipossoma multilamelar.

Figura 2. Representação esquemática do direcionamento de substâncias encapsuladas em lipossoma multilamelar: moléculas hidrossolúveis, lipossolúveis e anfipáticas.



Fonte: ARAUJO et al., 2003.

Uma vantagem dos lipossomas em relação à outros sistemas de transporte de fármacos é a sua alta biocompatibilidade, especialmente quando seus constituintes lipídicos pertencem às famílias de lipídios naturais. Além disso, são sistemas versáteis, uma vez que parâmetros como tamanho, volume, superfície, composição lipídica e do meio aquoso podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos (FRÉZARD et al., 2005).

Outras vantagens da utilização de lipossomas para a liberação de fármacos (TORCHILIN, 2005):

- Ligação mais ávida às células-alvo;
- Protegem produtos lábeis biologicamente ativos, como peptídeos, contra à inativação pelo organismo;
- Podem permitir a liberação de medicamentos em compartimentos intracelulares.

Os constituintes básicos das vesículas lipossomais são: fosfolipídeos, naturais ou sintéticos, e esteróis. Os fosfolipídeos mais utilizados são os cilíndricos, como as

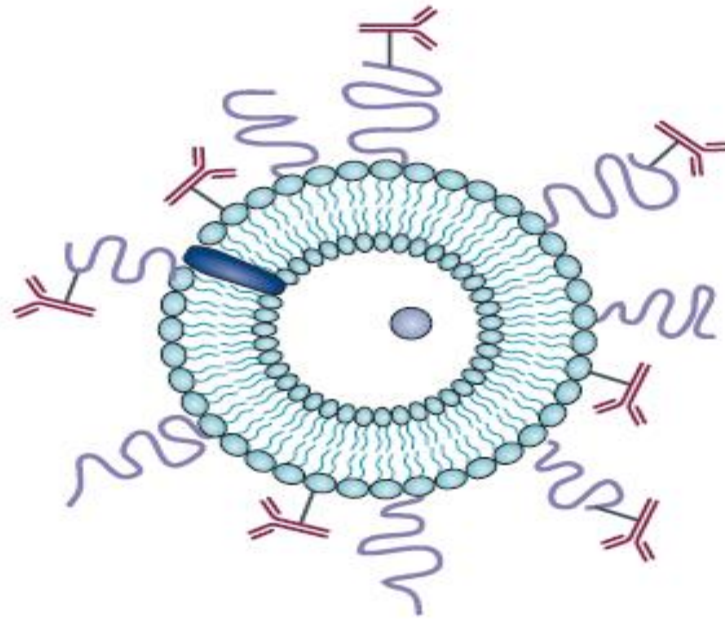
fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline, sendo os primeiros mais empregados, devido a estabilidade frente a variações de pH ou de concentração salina no meio. Dentre os esteróis, o colesterol é o mais utilizado, uma vez que está muito presente nas membranas celulares de mamíferos. Mesmo incapaz de se organizar em bicamadas, o colesterol pode ser incorporado em altas proporções nas membranas fosfolipídicas para modular a fluidez, reduzindo a permeabilidade e melhorando a estabilidade da membrana em fluidos biológicos (BATISTA; DE CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007; TORRES, 2008).

Quando contêm uma única bicamada lipídica, os lipossomas são chamados unilamelares; quando contêm bicamadas múltiplas, multilamelares. Quanto ao tamanho, as vesículas lipossomais unilamelares podem ser pequenas ou grandes (BATISTA; DE CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007).

Os lipossomas também podem ser classificados segundo a interação com os sistemas biológicos, como convencionais, de longa circulação e sítio-específicos. Os lipossomas convencionais são tipicamente compostos somente por fosfolipídeos neutros e/ou carregados, e/ou colesterol. Lipídeos com carga são incorporados a membranas lipossomais para prevenir a agregação de vesículas e aumentar o volume aquoso interno. Para a obtenção de lipossomas carregados, utiliza-se frequentemente as seguintes substâncias: octadecilamina (estearilamina), fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e ácido fosfatídico, sendo que a primeira apresenta carga positiva, e as seguintes, negativa. Os lipossomas de longa circulação, também chamados *stealth* ou furtivos, contêm na sua superfície carboidratos hidrofílicos (ex.: polímeros de potietilenoglicol) que evadem o reconhecimento pelo sistema retículoendotelial, aumentando o tempo de meia-vida das vesículas e tornando a farmacocinética dos lipossomas dose-independente. Os lipossomas sítio-específicos aumentam a especificidade de interação entre lipossomas e células-alvo, e a quantidade de fármaco liberado nestas células. São utilizados ligantes acoplados em sua superfície, o que confere seletividade ao sítio de ação desejado (ROLIM-SANTOS et al., 2006; BATISTA; DE CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007).

A figura 3 representa uma vesícula lipossomal furtiva e sítio-específica, simultaneamente, contendo em sua superfície de membrana polímeros protetores e ligantes de reconhecimento.

Figura 3. Vesícula lipossomal furtiva e sítio-específica.



Fonte: TORCHILIN, 2005.

Existem vários métodos de preparação de lipossomas, que levam a formação de vesículas unilamelares e multilamelares. As vesículas multilamelares (MLVs) formam-se espontaneamente pela hidratação do filme lipídico com excesso de água ou tampão, processo que necessita de pouca energia. As vesículas unilamelares possuem maior energia livre, e portanto, deve haver a dissipação de alguma forma de energia no sistema para obtê-las, por exemplo extrusão (LUVs) ou sonicação (SUVs). As etapas semelhantes para os métodos de preparação são: dissolução dos fosfolipídios em solvente orgânico, evaporação deste solvente, dispersão dos fosfolipídeos secos em solução aquosa, dissolução da substância a encapsular na fase orgânica ou aquosa, eliminação das substâncias não encapsuladas e análise do produto final (LASIC, 1992; DE ANDRADE, 2003).

A natureza dos lipídios e os métodos de preparação dos lipossomas definem as suas características físicas e químicas. A definição dos parâmetros estruturais, como organização da bicamada lipídica, lameralidade, tamanho médio, carga e volume interno, são essenciais para a utilização desses sistemas como carreadores de fármacos. Para a caracterização lipossomal, são utilizados diversos procedimentos analíticos como dispersão dinâmica da luz, difração de raios-X, microscopia eletrônica, ultracentrifugação analítica, fracionamento por campo, fluxo e sedimentação, cromatografias, e medições do volume interno (GRABIELLE-MADELMONT; LESIEUR; OLLIVON, 2003).

A estabilidade é a chave para a aplicação farmacêutica dos lipossomas. Possíveis problemas de estabilidade lipossomal incluem: perda do fármaco encapsulado; alterações estruturais, incluindo tamanho de partículas, distribuição e agregação/fusão; sedimentação; e instabilidade química como reações entre lipídeos e fármacos encapsulados. Além disso, condições de temperatura, pH e proteção contra luminosidade também são relevantes. A liofilização é uma estratégia para a conservação de lipossomas por um maior período de tempo (CASALS et al., 2003; MERTINS, 2004).

2.3. Terapêutica do câncer

Os lipossomas são sistemas efetivos de carreamento de fármacos antineoplásicos, promovendo a redução ou eliminação de efeitos tóxicos (comuns nessa classe de medicamentos) e aumentando a eficácia terapêutica. Além disso, outras limitações relacionadas ao tratamento antineoplásico convencional podem ser superadas com a encapsulação lipossomal.

O câncer é uma doença crônica, com mortalidade e impacto relevantes e crescentes em todo o mundo. O termo câncer é uma denominação genérica que se dá aos processos neoplásicos malignos, e apresenta como fatores de risco: sexo, idade, antecedentes familiares, tabagismo, uso de substâncias químicas, exposição solar, dieta e sedentarismo (BRUNHEROTTI, 2007).

Atualmente, existem vários tipos de tratamento para o câncer. A cirurgia é método mais empregado e de escolha para tumores sólidos localizados; a radioterapia geralmente é utilizada como adjuvante e/ou após a cirurgia; e a quimioterapia é o tratamento de escolha para os tumores generalizados, e é utilizada como adjuvante à cirurgia e/ou radioterapia. A maioria dos fármacos antineoplásicos são agentes antiproliferativos que interferem no ciclo celular, uma vez que as células cancerosas multiplicam-se mais rapidamente que a maioria das normais. Comumente, quando se administra um fármaco antineoplásico, apenas uma pequena fração da dose reage com os sítios de ação. A maior parte é distribuída aos órgãos saudáveis, provocando-lhes toxicidade (ROLIM-SANTOS et al., 2006).

Segundo Gilman et al. (2003), os agentes quimioterápicos são divididos nas seguintes classes:

- Alquilantes: mostardas nitrogenadas, etileniminas e metilmelaminas, alquilsulfonatos, nitrossouréias e triazenos;
- Antimetabólitos: análogos do ácido fólico, análogos da pirimidina e das purinas e inibidores correlatos;

- Hormônios e antagonistas: adrenocorticosteróides, progestinas, estrogênios, antiestrogênio, androgênios, antiandrogênio e análogo do hormônio de liberação das gonadotropinas;
- Diversos: complexos da platina, antracenediona, uréia substituída, derivado da metilidrazina, supressor adrenocortical e inibidor da tirosinocinase.
- Produtos naturais: alcalóides da *Vinca rósea*, taxanos, epipodofilotoxinas, camptotecinas, antibióticos, enzimas e modificadores da resposta biológica;

A resistência farmacológica múltipla é o maior obstáculo à uma quimioterapia bem-sucedida, e resulta em uma resposta terapêutica incompleta, recorrente e em metástases. É causada por alterações genéticas nas células cancerosas por alteração das funções dos genes pró-apoptóticos ou apoptóticos codificados por proteínas sinalizadoras específicas. Além disso, muitos antineoplásicos apresentam citotoxicidade não-seletiva (células cancerosas e saudáveis) e baixo índice terapêutico, o que têm impulsionado o desenvolvimento de pesquisas para não apenas novos fármacos, mas também formas inovadoras de melhorar a utilização dos já existentes. Uma destas são as tecnologias de carreamento e liberação de fármacos, como os lipossomas (JULIANO; DAOUD, 1990; WANG et al., 2011).

Os lipossomas apresentam uma base potente e versátil para a liberação de fármacos antineoplásicos com diferentes mecanismos de ação, maximizando a eficácia terapêutica e minimizando a probabilidade do desenvolvimento de resistência. Eles promovem uma liberação uniforme e um controle da exposição aos fármacos. Lipossomas têm sido utilizados também como sistemas de carreamento intratumoral direto de medicamentos utilizados na terapia do câncer, com vantagens significantes como uma maior retenção local do fármaco e evasão às barreiras fisiológicas como a alta pressão intersticial presente na maioria dos tumores (BAO et al., 2006; JACK HU; ZHANG, 2012).

2.4. Genotoxicidade

Os fármacos antineoplásicos são empregados com o objetivo de destruir as células tumorais, podendo agir direta ou indiretamente sobre elas. Eles interferem no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese, transcrição e tradução do DNA, constituindo-se potenciais agentes genotóxicos demonstrando atividade mutagênica, citotóxica e carcinogênica, o que pode provocar o aparecimento de neoplasias secundárias em pacientes tratados (NASRALLA, 2008).

Os estudos de genotoxicidade têm destaque nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos visto que dentre as reações adversas que os

medicamentos podem causar, não se pode descartar a ocorrência de efeitos genotóxicos e carcinogênicos. Esses estudos são supervisionados por agências reguladoras em todo o mundo, e geralmente incluem três ou quatro ensaios, como: teste de mutagênese bacteriana, ensaio de mutagênese em células de mamíferos *in vitro*, análise de aberrações cromossômicas *in vitro* e um teste de estabilidade cromossomal *in vivo*. Esses ensaios são a melhor abordagem para identificar os riscos da genotoxicidade (SNYDER; GREEN, 2001; BRAMBILLA; MARTELLI, 2009). Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético formando adutos, alterações oxidativas ou mesmo quebras na molécula de DNA, alterando sua replicação e transmissão genética. Esses danos podem ser reparados pelo próprio organismo ou podem levar à eliminação celular, como também à fixação da lesão provocando alterações hereditárias (mutações) (LUCIO NETO, 2011).

As plantas superiores são reconhecidas como excelentes modelos genéticos para a detecção de agentes mutagênicos e frequentemente são utilizadas em estudos de monitoramento genotoxicológico. Dentre as espécies de plantas, *Allium cepa* tem sido utilizada desde a década de 1940 para avaliar danos ao DNA, aberrações cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico celular, em um grande número de agentes químicos. *A. cepa* é o melhor modelo de organismo para o estudo de toxicologia genética de nanopartículas (LEME; MARIN-MORALES, 2009; KUMARI, et al., 2011). Além disso, o teste com *A. cepa* também detecta a frequência de micronúcleos, indicativo de mutagenicidade.

Os micronúcleos podem ser originados de diferentes mecanismos como quebras cromossômicas ou falhas no metabolismo das fibras do fuso mitótico (aneuploidogênese). Forma-se um minúsculo núcleo envolto por membrana, separado do núcleo principal mas com colaração semelhante à este. Esta formação pode ser espontânea ou induzida, pela exposição a agentes mutagênicos (GOMES, 2008).

O teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (*Cytokinesis-Blocked Micronucleus* – CBMN) é empregado para avaliar a extensão mutagênica de substâncias em linfócitos sanguíneos periféricos de humanos. É um teste simples, sensível e suplementar à outros testes de genotoxicidade *in vitro*. É considerado um sistema ideal para a avaliação de micronúcleos, mensurando a extensão da clastogenicidade e aneugenicidade de substâncias, também podendo ser usado para detectar pontes nucleoplásmicas, botões nucleares, morte celular (por apoptose ou necrose) e taxa de divisão nuclear (NOEL; KASINATHAN; RATH, 2006; FENECH, 2006).

2.5. Peptídeos catiônicos anfipáticos

Apesar dos grandes avanços na terapia anticâncer, existe um interesse considerável no desenvolvimento de agentes antineoplásicos com novos mecanismos de ação, devido ao desenvolvimento de resistência farmacológica pelas células tumorais aos medicamentos convencionais. Um crescente número de estudos tem demonstrado que alguns peptídeos catiônicos antimicrobianos (naturais e sintéticos), que são ativos contra microorganismos, apresentam um amplo espectro de citotoxicidade para células cancerosas, o que vem aumentando a relevância dessas moléculas (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008).

Segundo Van Slooten et al. (2001), a aplicação de proteínas bioativas como agentes terapêuticos é, em muitos casos, limitada fortemente pela rápida depuração após administração, seja no local da injeção ou na circulação. Geralmente, são necessárias doses frequentes para atingir níveis terapêuticos, o que pode resultar em efeitos adversos sistêmicos. Os lipossomas têm sido propostos para melhorar a biodistribuição das proteínas devido à liberação sustentada.

A sobrevivência dos organismos multicelulares depende de uma rede de mecanismos de defesa, envolvendo vários níveis de sistemas de interação. Dentre estes, os peptídeos endógenos antimicrobianos proporcionam um mecanismo rápido e energeticamente eficiente de defesa de 1ª linha, em contraste à imunidade adaptativa adquirida. A maioria desses peptídeos são moléculas catiônicas (polares) com as regiões hidrofóbicas e carregadas separadas espacialmente. Os resíduos catiônicos geralmente são arginina e lisina, e com frequência a carga global total dessas moléculas é +4. Esta natureza catiônica da maioria dos peptídeos deve-se à natureza aniônica da maior parte dos microorganismos, uma vez que a atração eletrostática é o principal mecanismo de lise ou disrupção das membranas celulares de bactérias. No entanto, existem várias famílias de peptídeos que diferem caracteristicamente quanto ao tamanho, sequência de aminoácidos e padrões estruturais. Aproximadamente 30% dos peptídeos formam estruturas secundárias em α -hélice (BALS, 2000; STROMSTEDT et al., 2010).

Até o momento, mais de 1000 sequências de aminoácidos foram relatadas e documentadas para a estrutura primária de diversos peptídeos. Porém, a maioria deriva de precursores maiores que sofreram modificações químicas como glicosilação, fluoreção, mutações pontuais de aminoácidos, dentre outros. Devido a sua estrutura e mecanismo de ação, esses peptídeos podem escapar aos mecanismos de resistência multifarmacológica de patógenos (WIRADHARMA et al., 2011).

Segundo Schweizer (2009), o modo exato de ação dos peptídeos catiônicos anfipáticos não está completamente elucidado. Todavia, existe um consenso de que a maioria destas moléculas promove a disrupção seletiva de membranas celulares, através da formação de poros de transição ou perturbação da estrutura lipídica. Em adição, alguns peptídeos podem possuir alvos intracelulares. Curiosamente, muitos deles também apresentam capacidade de destruir células cancerosas, e baseado neste espectro de ação, são divididos em 2 classes principais. A primeira inclui os peptídeos que possuem alta potência contra células bacterianas e tumorais, mas não contra células saudáveis de mamíferos (exemplo: magaininas, isoladas da pele de sapos); a segunda, peptídeos que são tóxicos para bactérias, células tumorais e saudáveis (exemplo: melitinas, de abelhas). Todavia, muitos outros peptídeos da imunidade inata não apresentam potencial atividade antitumoral.

Um crescente número de peptídeos catiônicos antimicrobianos tem sido isolado da pele de rãs pertencentes a subfamília Phyllomedusinae, compondo sete famílias peptídicas distintas: dermaseptinas (DSs), filoseptinas, plasticinas, dermatoxinas, filoxinas, hyposinas e peptídeos órfãos. As DSs incluem cerca de 50 peptídeos, oriundos das espécies *P. sauvagi*, *P. bicolor*, *P. hypochondrialis*, *P. distincta*, *P. oreades*, *P. tarsius*, *P. trinitatis*, *Pachymedusa dactylos*, *Agalychnis annae*, *A. callidryas* e *Hylomantis lemur*, e compartilham uma estrutura comum paternal que consiste em um resíduo de triptofano conservado na posição 3 e a sequência de aminoácidos AA(A/G)KAAL(G/N)A na região central da cadeia. Dentre as 50 DSs, estão: DSB1, DSB2, DSS1, DSS2, DSS4, DSS8 e DS 01 (AMICHE; LADRAM; NICOLAS, 2008).

O mecanismo de ação das DSs parece ser por permeação/disrupção da membrana plasmática lipídica das células-alvo por meio do mecanismo “de tapete”. Inicialmente, os peptídeos ligam-se eletrostaticamente à superfície negativamente carregada da membrana-alvo e a cobre como um tapete. Esses peptídeos ligam-se especificamente aos grupos da cabeça fosfolipídica formando uma hélice peptídica anfipática. Em seguida, alinham-se na superfície de membrana de modo que a superfície hidrofílica fica voltada para os grupos da cabeça fosfolipídica. Depois, ocorre uma rotação dos peptídeos helicoidais levando a uma reorientação dos resíduos hidrofóbicos para o núcleo hidrofóbico da membrana, mas não profundamente. Por fim, há a desintegração da membrana revestida com o peptídeo (SHAI, 1999).

2.6. Dermaseptina 01: um peptídeo obtido da secreção de anuros da espécie *Phyllomedusa hypochondrialis*

A espécie *Phyllomedusa hypochondrialis* apresentam a seguinte classificação taxonômica: Animália (Reino), Chordata (Filo), Vertebrata (Subfilos), Tetrapoda (Superclasse), Amphibia (Classe), Lissamphibia (Subclasse), Anura (Ordem), Neobatrachia (Subordem), Hylidae (Família), Phyllomedusinae (Subfamília), *Phyllomedusa* (Gênero), *Phyllomedusa hypochondrialis* (Grupo de espécies).

As rãs do gênero *Phyllomedusa* ocorrem da Costa Rica à Argentina, e possuem aproximadamente 32 espécies conhecidas. Apresentam coloração dorsal verde-folha, com as partes internas dos flancos e membros nas cores vermelha, laranja ou amarela, pupilas na posição vertical e locomoção por marcha lenta (raramente saltam). Outras características do gênero incluem a presença de glândulas paratóides, primeiro dedo do pé mais longo e robusto que o segundo, membranas interdigitais ausentes e ovoposição acima da superfície da água, aderida ao interior de uma folha dobrada, formando um ninho característico. O nome *Phyllomedusa*, do grego *phyllos* = folha e *medusa* = protetora, refere-se ao modo de vida particular desses animais essencialmente arborícolas. O grupo de espécies *Phyllomedusa hypochondrialis* é o mais diverso do gênero, possuindo 11 espécies descritas, dentre elas: *P. hypochondrialis* Daudin (Figura 4), *P. oreades* Brandão, *P. azurea* Cope, *P. nordestina* sp.nov. e *P. ayeaye* B. Lutz (ÁLVARES, 2008).

Figura 4. *Phyllomedusa hypochondrialis* Daudin (1801).

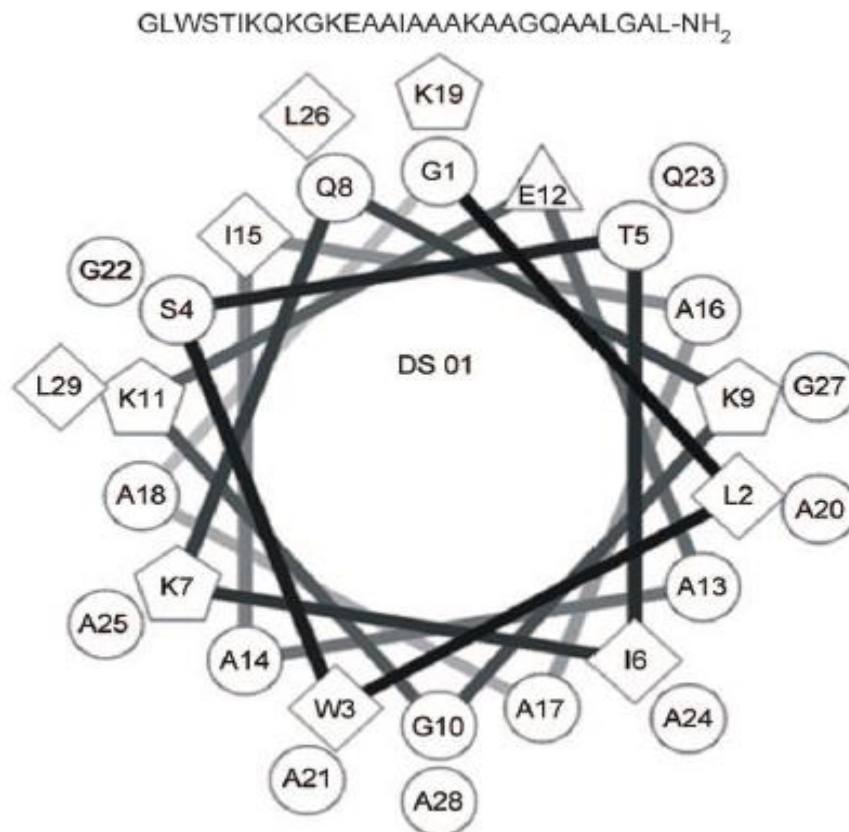


Fonte: Adaptado de <http://amphibiaweb.org>, AMOROS. Acesso em 19.05.2012.

O fracionamento e análise do extrato total da secreção cutânea de *P. hypochondrialis* realizado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa gerou várias frações peptídicas, denominadas: DShypo 01, DShypo 02, DShypo 03, DShypo 04, DShypo 05, DShypo 06 e DShypo 07. A DS 01 corresponde à fração DShypo 05, também isolada a partir de *P. oreades* (BRAND, 2007).

A DS 01 apresenta estrutura primária (sequência de aminoácidos): GLWS-TIKQKGKEAAIAAAKAA-GQAALGAL – NH₂ e massa molecular de 2793,39 Da. Possui carga global total (número de aminoácidos positivos e negativos), + 4; ponto isoeletrico teórico, 10,0; e hidrofobicidade, 1,8. É composta por aproximadamente 70% de aminoácidos apolares, e então provavelmente poderá ser estudada somente em meios que sejam pelo menos parcialmente apolares, como solventes orgânicos e micelas anfífilas. Também contém resíduos de aminoácidos alifáticos e polares neutros. As cadeias de aminoácidos são projetadas para baixo do eixo da α -hélice (LEITE et al., 2008; DE MORAES et al., 2011), conforme a figura 5.

Figura 5. Peptídeo bioativo DS 01: estrutura em hélice, demonstrando o caráter anfifílico da molécula. Os pentágonos, diamantes, círculos e triângulos representam respectivamente os resíduos: catiônicos, alifáticos, polares sem carga e carregados negativamente. As cadeias terminais de aminoácidos são projetadas para baixo do eixo da α -hélice.



Fonte: DE MORAES et al., 2011.

Ensaio da atividade antibacteriana da DS 01 contra 4 espécies bacterianas (*S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. aureus* e *Nocardia spp*) demonstraram que o peptídeo apresenta uma concentração inibitória mínima (CIM) significativamente menor que os antibióticos controle (amoxicilina, imipenem e cefalosporina). Outro estudo demonstrou que a DS 01 apresenta maior atividade contra *Escherichia coli*, do que antibióticos convencionais (ceftazidina, amoxicilina, imipenem, trimetropim) e outra DS (DSHypo 01). Foram demonstradas propriedades antibacterianas da DS 01 contra as gram-positivas *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSAs) e gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*, em faixas de concentrações específicas (LEITE et al., 2008; BRAND et al., 2006; BRAND et al., 2002).

Outros bioensaios com a DS 01 demonstraram que este peptídeo apresenta atividade antiparasitária promissora contra as formas promastigotas da espécie *Leishmania chagasi*, com uma inibição total e irreversível do crescimento e morte desses parasitas. A DS 01 também apresentou atividade contra as formas promastigotas da espécie *L. amazonensis* (ZAMPA et al., 2009). Ensaio *in vitro* em formas adultas de *Schistosoma mansoni* demonstraram que, em diferentes concentrações, a DS 01 provocou redução na atividade motora e na produção de ovos (reprodução), alterações morfológicas no tegumento, destruição extensa dos tubérculos e morte dos parasitas (BRAND et al., 2006; DE MORAES et al., 2011).

Em um teste de citotoxicidade sanguínea *in vivo* em camundongos suíços fêmeas, a DS 01 não apresentou contagem de leucócitos (total e diferencial) significativamente diferente dos grupos tratados com o controle (solução salina 0,9%). Em um ensaio de citotoxicidade sanguínea humana *in vitro*, a DS 01 (assim como outras DSs) demonstrou baixo potencial em lisar as células vermelhas mesmo em altas concentrações (128 µg/mL). Além disso, não houve diferenças qualitativas (morfologia) e quantitativas significativas para os glóbulos brancos entre o grupo controle e o grupo tratado com o peptídeo, demonstrado na microscopia óptica (BRAND et al., 2002; LEITE et al., 2008).

A DS 01, em concentrações similares à dos antibióticos convencionais, reduziu aproximadamente 20% a viabilidade celular do peritônio de camundongos suíços, quando comparada ao controle (tampão-fosfato, pH: 7,2) após 4 horas de incubação, o que representa ausência significativa de toxicidade para células saudáveis. Outras DSs reduziram esta viabilidade celular em 35% e 55% (LEITE et al., 2008).

2.7. Conclusão

A dermaseptina 01, um peptídeo citotóxico antimicrobiano isolado da pele de rãs, apresenta características estruturais e físico-químicas que podem torná-la um potencial agente antineoplásico. Para sua eficácia *in vivo*, a DS 01 pode ser encapsulada em lipossomas que a protegem contra a degradação enzimática sanguínea e aumentam a biodisponibilidade e biodistribuição. O mecanismo de ação de agentes citotóxicos, os tornam potencialmente mutagênicos. Por isso, é importante a realização de testes de genotoxicidade nesse peptídeo.

Referências

ÁLVARES, G.F.R. **Taxonomia, distribuição geográfica potencial e conservação das espécies de *Phyllomedusa* do grupo *Hypochondrialis***. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade de Brasília. Orientador: Reuber Albuquerque Brandão.

AMICHE, M.; LADRAM, A.; NICOLAS, P. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. **Peptides**. v. 29, p. 2074-2082, 2008.

AMOROS, C.L.B. *Phyllomedusa hypochondrialis*. Disponível em: <http://amphibiaweb.org>. Acesso em 19.05.2012.

ARAÚJO, D.R.; PINTO, L.M.A.; BRAGA, A.F.A.; PAULA, E. Drug-delivery systems for local anesthetics: therapeutic applications. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 53, p. 663-671, 2003.

BALS, R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. **Respiratory Research**. v. 1, p. 141-150, 2000.

BAO, A.; PHILLIPS, W.T.; GOINS, B.; ZHENG, X.; SABOUR, S.; NATARAJAN, M.; WOOLLEY, F.R.; ZAVALETA, C.; OTTO, R.A. Potential use of drug carried-liposomes for cancer therapy via direct intratumoral injection. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 316, p. 162-169, 2006.

BATISTA, C.M.; DE CARVALHO, C.M.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 43, p. 167-179, 2007.

BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**. v. 12, p. 620-636, 2011.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**. v. 60, p. 1-17, 2009.

BRAND, G.B. **Estratégias para prospecção e predição de peptídeos bioativos**. 2007. Tese. 217 f. Tese (Pós-Graduação em Biologia Animal) – Universidade de Brasília. Orientador: Carlos Bloch Jr.

BRAND, G.D.; LEITE, J.R.S.A.; MANDEL, S.M.S.; MESQUITA, D.A.; SILVA, L.P.; PRATES, M.V.; BARBOSA, E.A.; VINECKY, F.; MARTINS, G.R.; GALASSO, J.H.; KUCKELHAUS, S.A.S.; SAMPAIO, R.N.R.; FURTADO JR, J.R.; ANDRADE, A.C.; BLOCH JÚNIOR, C. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 347, p. 739-746, 2006.

BRAND, G.D.; LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; ALBUQUERQUE, S.; PRATES, M.V.; AZEVEDO, R.B.; CARREGARO, V.; SILVA, J.S.; SÁ, V.C.L.; BRANDÃO, R.A.; BLOCH JÚNIOR, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distinct* anti – *Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 49332-49340, 2002.

BRUNHEROTTI, M.R. **Intervenções no extravasamento de quimioterápicos vesicantes: revisão integrativa da literatura**. 2007. 144 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental) – Universidade de São Paulo.

CASALS, E.; GALÁN, A.M.; ESCOLAR, G.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 125, p. 139-146, 2003.

CHAUDHURY, A.; DAS, S.; LEE, R.F.S.; TAN, K.; NG, W.; TAN, R.B.H.; CHIU, G.N.C. Lyophilization of cholesterol-free PEGylated liposomes and its impact on drug loading by passive equilibration. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 430, p. 167-175, 2012.

DE ANDRADE, C.A.S. **Atividade antitumoral de lectina de *Cratylia mollis* encapsulada em lipossomas**. 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; MIURA, L.M.C.V.; LEITE, J.R.S.A.; NAKANO, E.; KAWANO, T. Evaluation of the in vitro activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. **Chemistry & Biodiversity**. v. 8, p. 548 – 558, 2011.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**. v. 600, p. 58-66, 2006.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônios. **Química Nova**. v. 28, p. 511-518, 2005.

GILMAN, A. G., RALL, T. W., NIES, A. S., TAYLOR, P. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill interamericana, 2003.

GOMES, C.C. **Avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade de uma liga metálica utilizada em implantes médicos**. 2008. 62f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Vale do Paraíba.

GRABIELLE-MADELMONT, C.; LESIEUR, S.; OLLIVON, M. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. v. 56, p. 189-217, 2003.

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

JACK HU, C.; ZHANG, L. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. **Biochemical Pharmacology**. v. 83, p. 1104-1111, 2012.

JULIANO, R.L.; DAOUD, S.S. Liposomes as a delivery system for membrane-active antitumor drugs. **Journal of Controlled Release**. v. 11, p. 225-232, 1990.

KUMARI, M.; KHAN, S.S.; PAKRASHI, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Cytogenetic and genotóxica effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**. v. 190, p. 613-621, 2011.

LASIC, D. D. Liposomes. **American scientist**. v. 80, p. 20-30, 1992.

LEITE, J.R.S.A.; BRAND, G.D.; SILVA, L.P.; KUCKELHAUS, S.A.S.; BENTO, W.R.C.; ARAÚJO, A.L.T.; MARTINS, G.R.; LAZZARI, A.M.; BLOCH JÚNIOR, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 151, p. 336-343, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**. v. 682, p. 71-81, 2009.

LUCIO NETO, M.P. **Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas**. 2011. 130f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí.

MERTINS, O. **Desenvolvimento e caracterização de nanovesículas lipossômicas compósitas de fosfatidilcolina de lecitina de soja e quitosana**. 2004. 63 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

NASRALLA, F.D. **Avaliação do dano de DNA causado por drogas antineoplásicas e outros fatores ambientais em pacientes com leucemia**. 2008. 73f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Gestão Tecnológica) – Centro Universitário Feevale.

NOEL, S.; KASINATHAN, M.; RATH, S.K. Evaluation of apigenin using *in vitro* cytochalasin blocked micronucleus assay. **Toxicology in Vitro**. v. 20, p. 1168-1172, 2006.

PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. **Journal of Controlled Release**. v. 120, p. 1-3, 2007.

PIMENTEL, L.F.; JÁCOME JÚNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, V.C.; SANTOSMAGALHÃES, N.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 503-514, 2007.

ROLIM-SANTOS, H.M.L.; DE QUEIROZ, F.B.; MAIOR, R.M.S.; DO NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Cytotoxicity of doxorubicin-loaded Com A-liposomes. **Drug Development Research**. v. 67, p. 430-437, 2006.

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

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

SNYDER, R.D.; GREEN, J.W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**. v. 488, p. 151-169, 2001.

STROMSTEDT, A.A.; RINGSTAD, L.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Interaction between amphiphilic peptides and phospholipid membranes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 15, p. 467-478, 2010.

SUH, W.H.; SUSLICK, K.S.; STUCKY, G.D.; SUH, Y. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. **Progress in Neurobiology**. v.87, p. 133-170, 2009.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature**. v. 4, p. 145-160, 2005.

TORRES, I.M.S. **Ceftazidima e cefepima encapsuladas em lipossomas unilamelares: obtenção, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.** 2008. 123 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília.

VAN SLOOTEN, M.L.; BOERMAN, O.; ROMOREN, K.; KEDAR, E.; CROMMELIN, D.J.A.; STORM, G. Liposomes as sustained release system for human interferon- γ : biopharmaceutical aspects . **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1530, p. 134-145, 2001.

WANG, X.; LI, Y.; YAO, H.; JU, R.; ZHANG, Y.; LI, R.; YU, Y.; ZHANG, L.; LU, W. The use of mitochondrial targeting resveratrol liposomes modified with a dequalinium polyethylene glycol-distearoylphosphatidyl ethanolamine conjugate to induce apoptosis in resistant lung cancer cells. **Biomaterials.** v. 32, p. 5673-5687, 2011.

WIRADHARMA, N.; KHOE, U.; HAUSER, C.A.E.; SEOW, S.V.; ZHANG, S. Synthetic cationic amphiphilic α -helical peptides as antimicrobial agents. **Biomaterials.** v. 32, p. 2204-2212, 2011.

ZAMPA, M.F.; ARAÚJO, I.M.S.; COSTA, V.; COSTA, C.H.N.; SANTOS JR, J.R.S.; ZUCOLOTTO, V.; EIRAS, C.; LEITE, J.R.A.L. Leishmanicidal activity and immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.** v. 5, p. 352-358, 2009.

Desenvolvimento, caracterização físico-química e estabilidade física de lipossomas contendo dermaseptina 01

ANCHIÊTA JÚNIOR, J.J.L.¹; LIMA, H.R.S.²; CAVALCANTI, I.M.F.³; LEITE, J.R.S.A.⁴; MAGALHÃES, N.S.S.³; SANTOS, H.M.L.R.¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; ²Curso de Bacharelado em Farmácia. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, 64049-550, Teresina – PI, Brasil.

³Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami. Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife – PI, Brasil.

⁴Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, 64202-020, Parnaíba – PI, Brasil.

3. Capítulo 2 – Desenvolvimento, caracterização físico-química e estabilidade física de lipossomas contendo dermaseptina 01

ANCHIÊTA JÚNIOR, J.J.L.¹; LIMA, H.R.S.²; CAVALCANTI, I.M.F.³; LEITE, J.R.S.A.⁴; MAGALHÃES, N.S.S.³; SANTOS, H.M.L.R.¹

A dermaseptina 01 (DS 01) é um peptídeo catiônico anfipático isolado da secreção mucocutânea de rãs da espécie *P. hypochondrialis*. As dermaseptinas exercem ação lítica rápida, forte e seletiva sobre membranas celulares de patógenos, e ação fraca sobre membranas de mamíferos. Exibem baixa resistência à atividade proteolítica plasmática, e são rapidamente depuradas pelo organismo após a administração, isto é, possuem atividade *in vivo* limitada. Lipossomas são nanocarreadores de fármacos amplamente utilizados que podem encapsular proteínas, protegendo-as contra a proteólise ou outros fatores desestabilizadores. O objetivo desse capítulo foi encapsular a DS 01 em lipossomas unilamelares pequenos (SUVs), convencionais e furtivos; realizar a caracterização físico-química dessas formulações, e avaliar a estabilidade. Os lipossomas foram preparados pelos métodos de hidratação do filme lipídico e sonicação, e ao final foram liofilizados. A DS 01 foi encapsulada na concentração de 50 µg/mL e a concentração lipídica total foi 38 µM. Foram preparadas formulações neutras e catiônicas. Lipossomas vazios (sem o peptídeo) foram preparados para controle. A caracterização físico-química foi realizada após 24 horas da preparação, por meio do tamanho médio de vesículas, índice de polidispersão, pH, potencial zeta, microscopia óptica e macroscopia. Foram realizados testes de estabilidade acelerada após centrifugação e agitação mecânica, e estabilidade a longo prazo até 21 dias. Ao tempo zero, os lipossomas apresentaram caracterização físico-química adequada. Os lipossomas convencionais neutros contendo DS 01 (LCD) apresentaram tamanho médio acima de 150 nm (unilamelares grandes), mas apresentaram estabilidade acelerada e em longo prazo. No geral, todos os lipossomas contendo DS 01 foram estáveis, ou seja, a DS 01 não representou-os um fator desestabilizador. Os diferentes lipossomas apresentaram resultados semelhantes de TP, PDI e pH. Outros testes de caracterização físico-química e a estabilidade em longo prazo após 21 dias estão sendo realizados. Previamente, os lipossomas desenvolvidos nesse trabalho poderão ser utilizados em ensaios pré-clínicos de atividade farmacológica e toxicológica *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Dermaseptinas, Dermaseptina 01, Lipossomas, Nanotecnologia farmacêutica, Peptídeos catiônicos.

Abstract – Development, physicochemical characterization and physical stability of liposomal dermaseptin 01

Dermaseptin 01 (DS 01) is an amphipathic cationic peptide isolated from mucocutaneous secretion of *P. hypochondrialis* frogs specie. Dermaseptins exert fast, strong and selective lytic action on pathogens cell membranes, and weak action on mammals membranes. Exhibit low resistance to plasmatic proteolytic activity, and are rapidly cleared by the body after administration, ie, have limited *in vivo* activity. Liposomes are drug nanocarriers widely used that can encapsulate proteins, protecting them against proteolysis and other destabilizing factors. This chapter aimed to encapsulate DS 01 in small unilamellar vesicles (SUVs), conventional and stealth; to perform the physicochemical characterization; and to evaluate the stability. Liposomes were prepared by lipid film hydration and sonication methods, and were lyophilized at the end. DS 01 was encapsulated in 50 µg/mL concentration and the total lipid concentration was 38 µM. Neutral and cationic formulations were prepared. Not-loaded liposomes were prepared for control. Physicochemical characterization was performed after 24 hours of preparation by medium size, polydispersity index, pH, zeta potential, optical microscopy and macroscopy. We performed accelerated stability after centrifugation and mechanical agitation, and long-term tests over 21 days. At zero time, liposomes showed adequate physico-chemical characterization. Neutral conventional liposomes containing DS 01 (LCD) had medium size above 150 nm (large unilamellar), but showed accelerated and long-term stability. Generally, all liposomes containing DS 01 were stable, ie, DS 01 not represented to them a destabilizing factor. The different liposomes showed similar results to TP, PDI e pH. Other physicochemical characterization and long-term stability tests after 21 days are being performed. Previously, the liposomes developed in this study could be used in *in vitro* and *in vivo* pharmacological and toxicological activity pre-clinical tests.

Key-words: Cationic peptides, Dermaseptins, Dermaseptin 01, Liposomes, Pharmaceutical nanotechnology,.

3.1. Introdução

As principais áreas de aplicação da nanomedicina são: carreamento de fármacos; diagnósticos *in vitro*, ao vivo e *in vivo*, incluindo imagiologia, medicina regenerativa e dispositivos médicos implantáveis. Muitos dos atuais nanossistemas de distribuição de fármacos são considerados remanescências dos sistemas convencionais que se apresentam em escala nanométrica, como é o caso dos lipossomas, micelas poliméricas, nanopartículas e nanocristais. A importância da nanotecnologia no contexto dos sistemas de carreamento de fármacos está no conceito e capacidade de manipular moléculas e estruturas supramoleculares para produzir dispositivos com funções programadas, e não apenas nos tamanhos desses sistemas (PARK, 2007; BOISSEAU; LOUBATON, 2011).

Novos sistemas de distribuição de fármacos como os lipossomas são desenvolvidos quando uma formulação já existente não é satisfatória, e essa reformulação oferece uma eficácia terapêutica superior e maior segurança, pré-clínicas e/ou clínicas. Algumas das principais aplicações terapêuticas são: auxílio na formulação, carreamento intracelular de fármacos, liberação farmacológica sustentada, liberação sítio-preventiva e sinalização sítio-específica ativa e passiva de fármacos (SHARMA; SHARMA, 1997).

Para a preparação de lipossomas em escala laboratorial, numerosas técnicas foram desenvolvidas que podem apresentar variantes, sendo que os objetivos principais são promover a encapsulação de princípios ativos, conferir uniformidade às vesículas e otimizar sua utilização terapêutica. Além disso, procura-se métodos que possibilitem o escalonamento industrial. O processo clássico é a obtenção de vesículas multilamelares por dispersão de um filme lipídico em meio aquoso. Outros são: sonicação, congelamento/descongelamento, extrusão, injeção, evaporação em fase reversa e desidratação/reidratação (WINDEN; ZUIDAM; CROMMELIN, 1998; DE MANSILHA, 2002).

Segundo Lasic (1993), no método de hidratação do filme lipídico, os lipídios, em suas devidas proporções, são dissolvidos em dietil éter para a obtenção de uma solução límpida. Em seguida, o solvente é rotaevaporado em pressão reduzida controlada, formando-se um fino filme nas paredes do receptáculo. Para assegurar a ausência de resíduos do solvente orgânico, as amostras lipídicas são armazenadas sob vácuo elevado por pelo menos quatro horas. Em seguida, introduz-se a substância aquosa à encapsular no receptáculo e agita-se vigorosamente em temperatura ambiente, até observar a ausência completa do filme nas paredes. Após esse processo, a suspensão lipossomal pode ser submetida a sonicação por sonda, à uma força de sonicação de 40% em um banho de gelo por 5 minutos, com uma

sequência de 1 segundo de sonicação e 1 segundo de descanso. Armazena-se os lipossomas à 4 °C.

Um pré-requisito para a utilização de lipossomas é o desenvolvimento de métodos que permitam o controle da preparação lipossomal, incluindo tamanho de partícula, estabilidade, taxa de encapsulação e cinética de liberação das substâncias encapsuladas. Os processos de caracterização dos lipossomas imediatamente após a preparação e após o armazenamento são necessários para o controle de qualidade, e devem ser reprodutíveis, precisos e rápidos no contexto da utilização no ambiente industrial (VEMURI; RHODES, 1995; GABRIELLE-MADELMOT; LESIEUR; OLLIVON, 2003). Alguns dos parâmetros de caracterização são: pH, tamanho médio das vesículas, índice de polidispersão, potencial zeta e características microscópicas e macroscópicas.

A estabilidade dos lipossomas é a chave para as suas aplicabilidades farmacêuticas. Possíveis problemas de estabilidade lipossomal incluem perda do fármaco encapsulado, alterações estruturais incluindo tamanho de partícula e agregação/fusão de lipossomas, sedimentação, e instabilidade química de lipossomas e fármacos encapsulados (CASALS et al., 2003). Os testes de estabilidade para lipossomas podem ser realizados em curto prazo (estabilidade acelerada) e à longo prazo (de vários dias até anos).

O processo de liofilização é utilizado com sucesso para garantir uma estabilidade em longo prazo de lipossomas. Para manter o índice de polidispersão e evitar a saída do fármaco encapsulado é necessária a adição de uma substância crioprotetora que desempenha um papel crítico na formulação, assim como composição da bicamada, temperatura e taxa de congelamento e níveis de água residual (JANICKI et al., 2002; GLAVAS-DODOV, et al., 2005).

A dermaseptina 01 (DS 01) é um peptídeo catiônico anfipático que compõe a família das dermaseptinas, moléculas citotóxicas liberadas por rãs da sub-família Phyllomedusinae em resposta ao estresse ou outros estímulos. A DS 01 possui atividade antimicrobiana potente contra uma vasta gama de microorganismos como bactérias e fungos, em concentrações micromolares. Porém, já que alguns peptídeos biologicamente ativos, a DS 01 apresenta baixa biodisponibilidade pois é rapidamente inativada pelas proteases plasmáticas sanguíneas, quando administrada em sua forma livre (CONLON et al., 2007; LEITE et al., 2008; AMICHE; LADRAM; NICOLAS, 2008).

O objetivo desse capítulo foi encapsular o peptídeo DS 01 em lipossomas unilamelares pequenos, convencionais e furtivos, bem como realizar a caracterização físico-química e avaliar a estabilidade física acelerada e em longo prazo dessas formulações.

3.2. Material e Métodos

Os lipossomas foram preparados pelo métodos de hidratação do filme lipídico e sonicação. A concentração peptídica encapsulada foi 50 µg/mL, e a concentração lipídica total, 38 µM. Foram delineados quatro diferentes tipos de formulações lipossomais contendo DS 01, com as seguintes proporções:

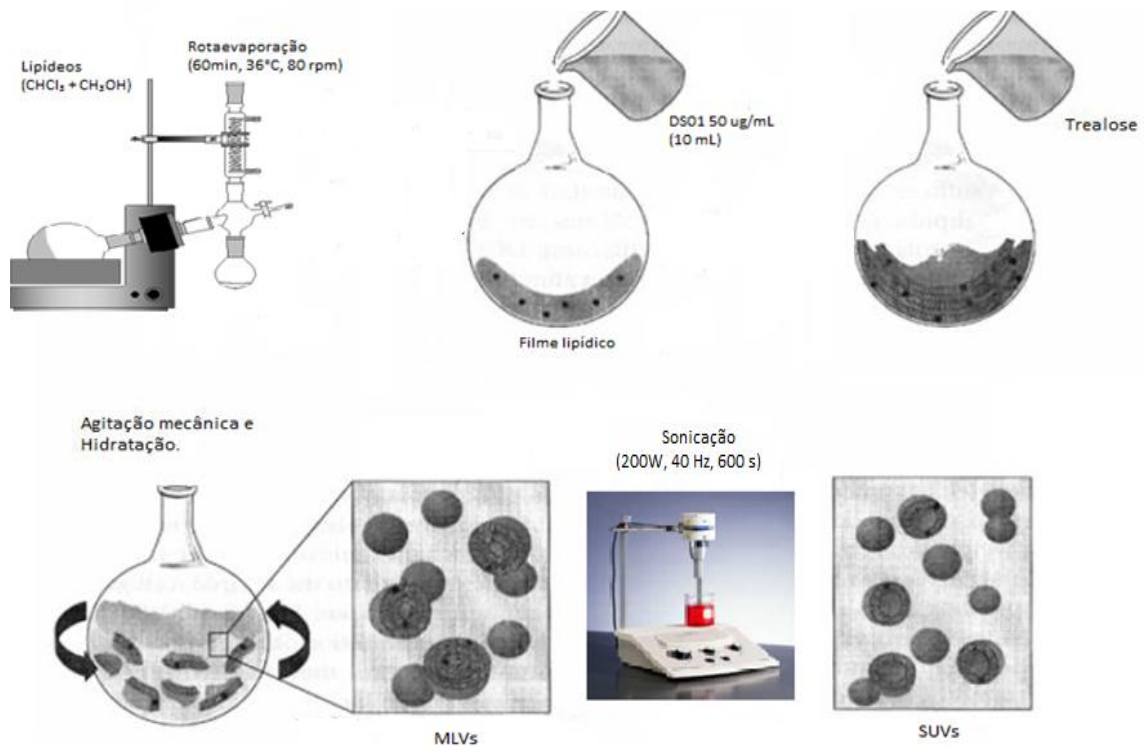
- 1) Lipossomas convencionais neutros contendo DS 01 (LCD): fosfatidilcolina de soja / colesterol (8 : 2);
- 2) Lipossomas furtivos neutros contendo DS 01 (LFD): fosfatidilcolina de soja / DSPE - polietilenoglicol / colesterol (7,5 : 0,5 : 2).
- 3) Lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01 (LCD+): fosfatidilcolina de soja / colesterol / estearilamina (7 : 2 : 1);
- 4) Lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01 (LFD+): fosfatidilcolina de soja / DSPE - polietilenoglicol / colesterol / estearilamina (6,5 : 0,5 : 2 : 1).

Estes constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio/metanol (3:1, v/v), sob agitação magnética em um balão volumétrico. A solução foi rotaevaporada por aproximadamente 60 minutos ($36 \pm 1^\circ\text{C}$, 80 rpm), formando-se um fino filme lipídico no balão. Este filme foi hidratado este com 10 mL de DS 01 (50 µg/mL). Uma agitação leve favoreceu o despreendimento da camada lipídica a partir do balão, formando-se as vesículas multilamelares grandes (MLVs). Em seguida, foi adicionado trealose (1g) ao balão para a posterior liofilização dos lipossomas. Os MLVs foram colocados em um banho de gelo, para então submetê-los à sonicação por sonda ultrassônica (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz por 600 s, obtendo-se as vesículas unilamelares pequenas (SUVs) contendo DS 01.

Lipossomas vazios (sem o peptídeo) também foram preparados, utilizando-se tampão fosfato pH 7,4 (10 mL) para hidratar o filme lipídico. Estas formulações foram produzidas para controle negativo nos ensaios farmacológicos e toxicológicos.

Ao final, todas as soluções foram filtradas por filtros de membrana (Milipore, Billerica, Massachusetts, USA), com poros de 0,22 µm e armazenadas à 4 °C. A figura 6 representa esquematicamente o método de preparação explicado anteriormente.

Figura 1. Representação esquemática da formação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico e sonicação.



Fonte: Adaptado de TORRES, 2008

Para a aferição do pHs dos lipossomas, foi utilizado um medidor de pH digital (bioblock Científico 99.622, Prolabo, Paris, França) devidamente calibrado, à temperatura ambiente. Tamanho de partícula e índice de polidispersão foram determinados através da espectroscopia de correlação de fótons (analisador de partícula Beckman Coulter DelsaTM Nano S) em que utilizou-se, para cada análise, 300 µL da amostra diluída em 1 mL de água ultra-pura. O microscópio óptico foi utilizado para identificar características microscópicas dos lipossomas SUVs, e luz visível para os parâmetros macroscópicos. A determinação do potencial zeta foi realizada no aparelho Microtac Zetatrac S 3500, em que cada formulação (100 µL) foi diluída em 3 mL de água ultra-pura.

Após as primeiras 24 horas de preparados os lipossomas, os parâmetros de caracterização foram preparados. Este é chamado tempo 0 (zero) que servirá para a comparação com os registros nos testes de estabilidade acelerada e à longo prazo.

Para a estabilidade acelerada, os lipossomas foram submetidos às seguintes condições distintas: centrifugação por 1 hora, 4 °C e 6000 rpm, e agitação mecânica horizontal por 48 horas, 37 ± 1 °C. Em seguida, os parâmetros de caracterização foram devidamente aferidos. Para a estabilidade a longo prazo, nos períodos de 7, 14 e 21 dias após

o tempo zero, os parâmetros foram aferidos. Para a obtenção das formulações liofilizadas foi utilizado o sistema EZ-DRY; FTS System, USA.

Os valores dos resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média dos dados.

3.3. Resultados e Discussão

Os peptídeos antimicrobianos anfipáticos catiônicos são mediadores efetivos do sistema imune inato e adquirido de uma vasta gama de seres vivos como bactérias, plantas, peixes, anfíbios, insetos e mamíferos. Geralmente, apresentam atividade ampla e seletiva contra microorganismos e células cancerígenas, e ausência de toxicidade sobre células saudáveis dos hospedeiros (organismos superiores). Isso ocorre principalmente devido à natureza físico-química e composição das membranas fosfolipídicas, que difere significativamente entre procarióticos e eucarióticos. Membranas formadas por fosfolipídios neutros, como fosfatidilcolina e esfingomiéline, e esteróides neutros, como o colesterol e ergosterol, que são representadas pela maioria dos eucariontes não são suscetíveis à ação desestabilizadora dos peptídeos antimicrobianos. Essas moléculas atuam principalmente em membranas compostas por fosfolipídios zwitteriônicos como a fosfatidiletanolamina (bactérias Gram negativas) e fosfolipídios negativos como fosfatidilglicerol, cardiolipina e fosfatidilserina (bactérias e alguns fungos) (BOWDISH; DAVIDSON; HANCOCK, 2005; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012). Observando que os lipossomas preparados nesse trabalho são compostos por fosfolipídios e esteróides neutros, pode ser presumido que a encapsulação da DS 01 não irá desestabilizar as vesículas.

A tabela 1 apresenta os parâmetros de caracterização físico-química para o tempo zero dos lipossomas contendo DS 01.

Tabela 1 – Características físico-químicas iniciais (tempo zero) dos lipossomas contendo DS 01.

Caracterização / Lipossomas	LCD+	LFD+	LCD	LFD
pH	7,5	7,5	7,3	7,3
TP (nm)	100,7 ± 14,9	105,7 ± 2,0	185,4 ± 5,2	95,8 ± 19,4
PDI	0,154 ± 0,072	0,279 ± 0,008	0,307 ± 0,018	0,427 ± 0,034
Microscopia	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.
Macroscopia	Efeito Tyndall, sem precipitados.	Efeito Tyndall, sem precipitados.	Efeito Tyndall, sem precipitados.	Efeito Tyndall, sem precipitados.
pZ (mV)	+ 11,89 ± 2,11	+ 10,29 ± 1,08	0,003 ± 0,001	0,004 ± 0,000

Legenda: TP = Tamanho médio de partícula; PDI = Índice médio de polidispersão; pZ = potencial zeta; MLVs: vesículas multilamelares grandes; LCD+: lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01; LFD+: lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01; LCD: lipossomas convencionais neutros contendo DS 01; LFD: lipossomas furtivos neutros contendo DS 01.

Lipossomas catiônicos são um potencial sistema de carreamento e liberação sustentada para fármacos protéicos e peptídicos administrados por via parenteral, prolongando sua eficácia e biodisponibilidade. O polietilenoglicol é um polímero biologicamente inerte usado em carreadores farmacológicos para criar uma barreira estérica e/ou uma estrutura aquosa ao redor dos lipossomas, para protegê-los contra as proteínas plasmáticas do corpo. Essa barreira também pode prevenir a fusão, agregação e ruptura dos lipossomas, reduzindo o seu tamanho e aumentando a eficiência de encapsulação (CENTIS; VERMETTE, 2008; PARK et al., 2011). Isso justifica a preparação de lipossomas catiônicos e furtivos neste trabalho, além dos neutros e convencionais que são as formulações mais tradicionais.

O tamanho médio dos lipossomas e o índice de polidispersão são parâmetros importantes, particularmente em formulações parenterais ou inalatórias. Uma caracterização morfológica válida das vesículas pode ser obtida por microscopia eletrônica de quebra por congelamento. Porém, para o monitoramento da estabilidade, este método não é viável já que é compendioso. A técnica de espalhamento dinâmico da luz é mais conveniente, fornecendo uma determinação precisa do tamanho e distribuição, embora tenha limitações quando utilizado para amostras polidispersas (VEMURI; RHODES, 1995).

Ao tempo zero, todos os lipossomas apresentaram tamanho médio inferior à 150 nm, o que os caracteriza como unilamelares pequenos, exceto os LCD. A presença da estearilamina nos lipossomas convencionais previniu o aumento do tamanho médio. Os índices de polidispersão apresentaram valores considerados satisfatórios para as quatro formulações já que a distribuição do tamanho das vesículas foi uniforme.

Ainda segundo Vemuri & Rhodes (1995), a seleção da composição do tampão e do pH durante a hidratação e os processos subsequentes estabilizam as condições do tamanho e composição interna das vesículas. As quatro formulações apresentaram valores de pH normais.

Com a microscopia óptica, foi verificada ausência de vesículas multilamelares e precipitados ou agregados, para os quatro sistemas. As vesículas unilamelares não são visíveis neste tipo de microscopia. Com o auxílio de luz visível, foi constatada ausência de precipitados, coloração branco-azulada e efeito Tyndall que é o fenômeno de refração da luz pelas partículas de um sistema coloidal, evidenciando a presença de nanopartículas lipossomais.

O potencial zeta indica a estabilidade potencial de um sistema coloidal. Aumenta proporcionalmente às forças de repulsão entre as partículas, conduzindo a uma formulação mais estável, pois as partículas não tendem ao agregamento (PAOLINO et al., 2006; MADY et al., 2011). Em um coloide estável, as partículas permanecem separadas e dispersas; no instável, são aglomeradas gradualmente. Se possuírem carga elevada, repelem-se; se a carga for zero ou próxima, o movimento browniano provoca colisão e fusão entre elas. Sendo assim, é desejável maximizar as cargas das partículas para alcançar maior estabilidade (PLESSIS et al., 1996).

Segundo Silva et al. (2006), a estearilamina apresenta um pKa de 10,6, conferindo assim uma carga global positiva às nanoformulações no pH = 7,4, devido ao seu grupo nitrogenado. A adição crescente desse lipídeo catiônico conduz a um aumento do potencial zeta. Neste experimento, os lipossomas catiônicos (estearilamina) apresentaram potencial zeta positivo (tabela 1), com valores semelhantes, o que está de acordo com a presença da mesma quantidade de estearilamina (0,102 g) em cada formulação. Os lipossomas neutros apresentaram potencial zeta próximo de zero, indicando que a ausência da estearilamina reduz o potencial zeta das formulações.

A tabela 2 apresenta as características físico-químicas iniciais para os lipossomas vazios. Todas foram satisfatórias. Não se mensurou o potencial zeta para essas formulações.

Tabela 2 – Características físico-químicas iniciais (tempo zero) dos lipossomas vazios.

Caracterização / Lipossomas	LC+	LF+	LC	LF
pH	7,4	7,4	7,3	7,3
TP (nm)	130,1 ± 3,5	143,3 ± 6,3	142,9 ± 2,9	89,2 ± 6,1
PDI	0,287 ± 0,015	0,267 ± 0,034	0,296 ± 0,008	0,368 ± 0,109
Microscopia	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.
Macroscopia	Efeito Tyndall, sem precipitados.	Efeito Tyndall, sem precipitados.	Efeito Tyndall, sem precipitados.	Efeito Tyndall, sem precipitados.

Legenda: TP = Tamanho médio de partícula; PDI = Índice médio de polidispersão; pZ = potencial zeta; MLVs: vesículas multilamelares grandes; ; LC+: lipossomas convencionais catiônicos vazios; LF+: lipossomas furtivos catiônicos vazios; LC: lipossomas convencionais neutros vazios; LF: lipossomas furtivos neutros vazios.

Os testes de estabilidade acelerada simulam as condições de estresse às quais os lipossomas são submetidos durante sua fabricação, transporte e armazenamento. A centrifugação simula a passagem acelerada do tempo e a agitação mecânica, as condições de transporte (LIRA et al., 2009). As tabelas 3 e 4 apresentam a estabilidade acelerada para as quatro formulações lipossomais contendo DS 01.

Tabela 3 – Testes de estabilidade acelerada dos lipossomas convencionais e furtivos, neutros, contendo DS 01.

Formulação	Parâmetro / Teste	Tempo 0	Centrifugação	Agitação mecânica
LCD	TP (nm)	185,4 ± 5,2	105,3 ± 12,5	138,1 ± 2,4
	PDI	0,307 ± 0,018	0,516 ± 0,126	0,310 ± 0,019
	pH	7,3	7,4	7,3
	Macroscopia	Efeito Tyndall, sem precipitados Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.
	Microscopia			
LFD	TP (nm)	95,8 ± 19,4	76,4 ± 11,5	89,2 ± 1,3
	PDI	0,427 ± 0,034	0,466 ± 0,143	0,252 ± 0,013
	pH	7,3	7,4	7,3
	Macroscopia	Efeito Tyndall, sem precipitados Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.
	Microscopia			

Legenda: TP = Tamanho médio de partícula; PDI = Índice médio de polidispersão; MLVs: vesículas multilamelares grandes; LCD: lipossomas convencionais neutros contendo DS 01; LFD: lipossomas furtivos neutros contendo DS 01.

Tabela 4 – Testes de estabilidade acelerada dos lipossomas convencionais e furtivos, catiônicos, contendo DS 01.

Formulação	Parâmetro / Teste	Tempo 0	Centrifugação	Agitação mecânica
LCD+	TP (nm)	100,7 ± 14,9	128,0 ± 31,6	106,6 ± 19,2
	PDI	0,154 ± 0,072	0,135 ± 0,003	0,119 ± 0,007
	pH	7,5	7,5	7,5
	Macroscopia	Efeito Tyndall, sem precipitados.	Efeito Tyndall, sem precipitados.	Efeito Tyndall, sem precipitados.
	Microscopia	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.
LFD+	TP (nm)	105,7 ± 2,0	87,6 ± 12,6	129,9 ± 1,3
	PDI	0,279 ± 0,008	0,320 ± 0,029	0,231 ± 0,018
	pH	7,5	7,5	7,3
	Macroscopia	Efeito Tyndall, sem precipitados.	Efeito Tyndall, sem precipitados.	Efeito Tyndall, sem precipitados.
	Microscopia	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.

Legenda: TP = Tamanho médio de partícula; PDI = Índice médio de polidispersão; MLVs: vesículas multilamelares grandes; LCD+: lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01; LFD+: lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01.

A estabilidade é o principal componente nas etapas de produção, armazenamento e administração dos lipossomas. Uma formulação estável mantém a integridade física e química dos princípios ativos durante o período na prateleira. Em um estudo de estabilidade lipossomal, devem ser considerados os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos. Potencialmente, os lipossomas apresentam problemas de estabilidade física e química, como por exemplo, a tendência à fusão e aumento de tamanho já que as vesículas maiores são termodinamicamente mais estáveis. Fusão e ruptura também representam um problema para o extravasamento do fármaco. Interações entre o fármaco e os fosfolipídeos de membrana podem provocar problemas de estabilidade química, como reações fosfolipídicas de oxidação e hidrólise. Mais ainda, a maioria dos lipossomas são destinados à administração parenteral (injetáveis ou inalatórios) e, portanto, precisam ser esterilizados para a remoção de contaminantes microbiológicos (VEMURI; RHODES, 1995).

O tamanho e distribuição das partículas são aspectos muito importantes para a estabilidade coloidal. Ocorrem principalmente por dois mecanismos: maturação de Ostwald (troca assimétrica molecular) e agregação, fusão, coacervação ou precipitação de partículas, sendo que agregação e fusão ocorrem mais extensivamente e por longos períodos. Em lipossomas neutros, a agregação das vesículas ocorre natural e inevitavelmente por forças de *Van der Waals* e são mais pronunciadas em vesículas grandes. O modo mais simples de combatê-las é adicionar carga à fração lipídica, gerando forças de repulsão eletrostática entre as vesículas e a estabilização *in vitro* (HUNTER, 1981; CASALS et al., 2003).

Os lipossomas neutros contendo DS 01 apresentaram estabilidade acelerada (tabela 3). No entanto, quanto ao índice de polidispersão, as formulações apresentaram valores um pouco elevados após centrifugação. A tabela 4 demonstra que os lipossomas catiônicos contendo DS 01 apresentaram estabilidade acelerada, após centrifugação e agitação mecânica. Neste caso, todos os parâmetros característicos apresentaram-se satisfatórios.

Foi realizada uma média entre os parâmetros de TP, PDI e pH de cada formulação frente à caracterização no tempo zero e após a estabilidade acelerada, para que esses parâmetros fossem comparados entre os diferentes tipos de lipossomas, o que está apresentado na tabela 5.

Tabela 5 – Médias dos parâmetros numéricos de TP, PDI e pH no tempo zero e após a estabilidade acelerada para as quatro formulações lipossomais contendo DS 01.

Parâmetro/Formulação	LCD	LND	LCD+	LFD+
TP (nm)	142,9 ± 40,3	87,1 ± 9,9	111,8 ± 14,4	107,7 ± 21,2
PDI	0,3777 ± 0,120	0,382 ± 0,114	0,136 ± 0,018	0,277 ± 0,045
pH	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,5 ± 0,0	7,4 ± 0,1

Legenda: LCD = Lipossomas convencionais neutros contendo DS 01; LFD = Lipossomas furtivos neutros contendo DS 01; LCD+ = Lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01; LFD+ = Lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01; TP = Tamanho médio de partícula; PDI = Índice médio de polidispersão.

Os diferentes lipossomas apresentaram médias aproximadas de valores para os 3 parâmetros, ou seja, a variação da composição lipídica e as condições às quais foram submetidos não promoveram diferenças significantes no TP, PDI e pH. Os lipossomas com carga apresentaram, em média, um menor índice de polidispersão. Por conseguinte, a estearilamina preveniu a desuniformidade do tamanho das vesículas. As formulações furtivas apresentaram tamanhos menores, em média.

A estabilidade à longo prazo dos lipossomas foi avaliada nos tempos de 7, 14 e 21 dias, conforme as tabelas a seguir. Esta estabilidade continuará sendo verificada no decorrer do tempo até a perda.

Tabela 6 – Testes de estabilidade a longo prazo dos lipossomas convencionais e furtivos, neutros, contendo DS 01.

Formulação	Parâmetro / Dias	Tempo 0	7 dias	14 dias	21 dias
LCD	TP (nm)	185,4 ± 5,2	137,4 ± 10,7	141,2 ± 22,8	142,3 ± 4,6
	PDI	0,307 ± 0,018	0,393 ± 0,099	0,302 ± 0,098	0,352 ± 0,012
	pH	7,3	7,4	7,2	7,4
	Macroscopia	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.
	Microscopia	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.
LFD	TP (nm)	95,8 ± 19,4	97,1 ± 1,6	84,3 ± 18,9	93,1 ± 0,4
	PDI	0,427 ± 0,034	0,308 ± 0,014	0,409 ± 0,250	0,269 ± 0,003
	pH	7,3	7,4	7,2	7,4
	Macroscopia	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.
	Microscopia	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.

Legenda: LCD = Lipossomas convencionais neutros contendo DS 01; LFD = Lipossomas furtivos neutros contendo DS 01; TP = Tamanho médio de partícula; PDI = Índice médio de polidispersão; MLVs: vesículas multilamelares grandes.

Tabela 7 – Testes de estabilidade a longo prazo dos lipossomas convencionais e furtivos, catiônicos, contendo DS 01.

Formulação	Parâmetro / Dias	Tempo 0	7 dias	14 dias	21 dias
LCD+	TP (nm)	100,7 ± 14,9	131,5 ± 14,9	118,1 ± 13,8	125,7 ± 1,5
	PDI	0,154 ± 0,072	0,535 ± 0,024	0,538 ± 0,013	0,214 ± 0,017
	pH	7,5	7,4	7,4	7,5
	Macroscopia	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.
	Microscopia				
LFD+	TP (nm)	105,7 ± 62,0	137,8 ± 3,5	143,5 ± 12,5	122,6 ± 14,5
	PDI	0,279 ± 0,008	0,222 ± 0,031	0,199 ± 0,020	0,211 ± 0,023
	pH	7,5	7,4	7,4	7,2
	Macroscopia	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.	Efeito Tyndall, sem precipitados. Ausência de MLVs e grumos, movimento browniano.
	Microscopia				

Legenda: LCD+ = Lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01; LFD+ = Lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01; TP = Tamanho médio de partícula; PDI = Índice médio de polidispersão; MLVs: vesículas multilamelares grandes.

De maneira geral, os lipossomas neutros e catiônicos apresentaram estabilidade em longo prazo durante 21 dias (tabelas 6 e 7). Entre as formulações sem carga, as furtivas apresentaram menor tamanho médio de partícula, uma vez que o polietilenoglicol reduziu o tamanho. Para as formulações com carga, a estearilamina contribuiu para a estabilidade dos tamanhos. Nesse caso, os lipossomas furtivos apresentaram menor índice de polidispersão, ou seja, o polietilenoglicol favoreceu a uniformidade na distribuição do tamanho.

Foi realizada uma média entre os parâmetros de TP, PDI e pH de cada formulação frente à caracterização no tempo zero e após a estabilidade a longo prazo, para que esses parâmetros fossem comparados entre os diferentes tipos de lipossomas, o que está apresentado na tabela 8.

Tabela 8 – Médias dos parâmetros numéricos de TP, PDI e pH no tempo zero e após a estabilidade a longo prazo para as quatro formulações lipossomais contendo DS 01.

Parâmetro/Formulação	LCD	LFD	LCD+	LFD+
TP (nm)	151,6 ± 22,6	92,6 ± 5,8	119,0 ± 13,4	127,4 ± 16,9
PDI	0,339 ± 0,043	0,353 ± 0,077	0,360 ± 0,205	0,228 ± 0,035
pH	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,5 ± 0,1	7,4 ± 0,1

Legenda: LCD = Lipossomas convencionais neutros contendo DS 01; LFD = Lipossomas furtivos neutros contendo DS 01; LCD+ = Lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01; LFD+ = Lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01; TP = Tamanho médio de partícula; PDI = Índice médio de polidispersão.

Dentre os lipossomas neutros, os convencionais apresentaram, em média, maior tamanho até 21 dias; o inverso aconteceu com os lipossomas com carga, sugerindo que a estearilamina previne o aumento de tamanho independentemente da presença de polietilenoglicol. As diferentes formulações apresentaram PDI e pH semelhantes ao longo de 21 dias.

A liofilização é um método utilizado para aumentar o período de estabilidade e vida útil dos lipossomas, prevenindo a hidrólise dos fosfolípídeos e a degradação física das vesículas durante o armazenamento. O principal método de liofilização é a secagem por congelamento, técnica bem estabelecida na indústria farmacêutica, com fácil reconstituição. Para proteger os lipossomas contra o estresse provocado pela técnica, são adicionados carboidratos (sucrose, glucose, trealose, maltose ou lactose), que formam uma matriz vítrea amorfa durante o congelamento e exibem uma baixa mobilidade molecular após a secagem. Essa matriz é essencial para

evitar danos, por exemplo, por processos de fusão e formação de cristais. Além disso, a reidratação promove uma prevenção da ocorrência de transição de fase nas bicamadas lipossomais, o que é considerado essencial para as suas preservações, já que essa transição poderia promover o extravasamento de compostos encapsulados (WINDEN; CROMMELIN, 1999; WINDEN, 2003; OHTAKE et al., 2006; CHEN et al., 2010).

Neste experimento, todos os lipossomas foram liofilizados. O açúcar utilizado foi a trealose. Este procedimento poderia resolver algum potencial problema de estabilidade para essas formulações.

3.4. Conclusão

A dermaseptina 01, um peptídeo isolado da pele de rãs com atividade antimicrobiana comprovada, foi satisfatoriamente encapsulado em vesículas unilamelares pequenas (SUVs) convencionais e furtivas, neutras e catiônicas. Esses lipossomas apresentaram estabilidade acelerada e em longo prazo (pelo menos 21 dias), isto é, a DS 01 não os representou um fator desestabilizador. As diferentes formulações apresentaram médias de TP, PDI e pH semelhantes. Outros testes de caracterização físico-química e a estabilidade em longo prazo após 21 dias estão sendo realizados. Previamente, os lipossomas desenvolvidos neste trabalho poderão ser utilizados em ensaios pré-clínicos de atividade farmacológica e toxicológica *in vitro* e *in vivo*.

Referências

AMICHE, M.; LADRAM, A.; NICOLAS, P. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. **Peptides**. v. 29, p. 2074-2082, 2008.

BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**. v. 12, p. 620-636, 2011.

BOWDISH, D.M.E.; DAVIDSON, D.J.; HANCOCK, R.E.W.H. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. **Current Protein and Peptide Science**. v. 6, p. 35-51, 2005.

CASALS, E.; GALÁN, A.M.; ESCOLAR, G.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. **Chemistry and physics of lipids**. v. 125, p. 139-146, 2003.

CENTIS, V.; VERMETTE, P. Physico-chemical properties and cytotoxicity assessment of PEG-modified liposomes containing human hemoglobin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 65, p. 239-246, 2008.

CHEN, C.; HAN, D.; CAI, C.; TANG, X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. **Journal of Controlled Release**. v. 142, p. 299-311, 2010.

CONLON, J.M.; WOODHAMS, D.C.; RAZA, H.; COQUET, L.; LEPRINCE, J.; JOUENNE, T.; VAUDRY, H.; ROLLINS-SMITH, L.A. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). **Toxicon**. v. 50, p. 498-506, 2007.

DE MANSILHA, C.I.G.R. **Estudos de partição e localização de fármacos em lipossomas por técnicas espectroscópicas**. 2002. 230 f. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

GLAVAS-DODOV, M.; FREDRO-KUMBARADZI, E.; GORACINOVA, K.; SIMONOSKA, M.; CALIS, S.; TRAJKOVIC-JOLEVSKA, S.; HINCAL A., A. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 291, p. 79-86, 2005.

GRABIELLE-MADELMONT, C.; LESIEUR, S.; OLLIVON, M. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. **Journal of biochemical and biophysical methods**. v. 56, p. 189-217, 2003.

HUNTER, R.J. Zeta potential in colloid science. **Academic Press**. p. 69-71, 1981.

JANICKI, S.; JANKOWSKI, J.; SZULC, J.; WOYCZIKOWSKI, B.; SZNITOWSKA, M. The effect of cryoprotectants on the physical properties of large liposomes containing sodium diclofenac. **Acta Poloniae Pharmaceutica**. v. 59, p. 187-191, 2002.

LASIC, D.D. Liposomes: from physics to application. **Netherlands: Elsevier**. p. 575, 1993.

LEITE, J.R.S.A.; BRAND, G.D.; SILVA, L.P.; KUCKELHAUS, S.A.S.; BENTO, W.R.C.; ARAÚJO, A.L.T.; MARTINS, G.R.; LAZZARI, A.M.; BLOCH JÚNIOR, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 151, p. 336-343, 2008.

LIRA, M.C.B.; SIQUEIRA-MOURA, M.P.; ROLIM-SANTOS, H.M.L.; GALETTI, F.C.S.; SIMIONI, A.R.; SANTOS, N.P.; EGITO, E.S.T.; SILVA, C.L.; TEDESCO, A.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposome Research**. v. 19, p. 49-58, 2009.

MADY, M.M.; FATHY, M.M.; YOUSSEF, T.; KHALIL, W.M. Biophysical characterization of gold nanoparticles-loaded liposomes. **European Journal of Medical Physics**. v. xx, p. 1-8, 2011.

OHTAKE, S.; SCHEBOR, C.; DE PABLO, J.J. Effects of trehalose on the phase behavior of DPPC-cholesterol unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1758, p. 65-73, 2006.

PAOLINO, D.; FRESTA, M.; SINHA, P.; FERRARI, M. Drug delivery systems. **Encyclopedia of medical devices and instrumentation**. 2 ed., p. 427-495, 2006.

PARK, K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. **Journal of controlled release**. v. 120, p. 1-3, 2007.

PARK, S.J.; CHOI, S.G.; DAVAA, E.; PARK, J.S. Encapsulation enhancement and stabilization of insulin in cationic liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 415, p. 267-272, 2011.

PLESSIS, J.; RAMACHANDRAN, C.; WEINER, N.; MULLER, D.G. The influence of lipid composition and lamellarity of liposomes on the physical stability of liposomes upon storage. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 127, p. 273-278, 1996.

SHARMA, A.; SHARMA, U.S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 154, p. 123-140, 1997.

SILVA, C.; MARTIN, E.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; DE OLIVEIRA, M.C.; TEIXEIRA, H. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**. v. 25, p. 17-21, 2006.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M.J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**. v. 51, p. 149-177, 2012.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v. 70, p. 95-111, 1995.

WINDEN, E.C.A.V.; ZUIDAM, N.J.; CROMMELIN, D.J.A. Strategies for large scale production and optimized stability of pharmaceutical liposomes developed for parenteral use. **Medical Applications of Liposomes**. p. 567-596, 1998.

WINDEN, E.C.A.V.; CROMMELIN, D.J.A. Short term stability of freeze-dried, lyoprotected liposomes. **Journal of Controlled Release**. v. 58, p. 69-86, 1999.

WINDEN, E.C.A.V. Freeze-drying of liposomes: theory ad practice. **Methods in Enzymology**. v. 367, p. 99-110, 2003.

**Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de um peptídeo derivado de rãs
(dermaseptina 01) na forma livre e lipossomal em células tumorais
humanas**

**ANCHIÊTA JÚNIOR, J.J.L.¹; LIMA, H.R.S.²; CAVALCANTI, I.M.F.³; LEITE,
J.R.S.A.⁴; MILITÃO, G.C.G.⁵; DA SILVA, T.G.⁵; MAGALHÃES, N.S.S.³;
SANTOS, H.M.L.R.¹**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; ²Curso de Bacharelado em Farmácia. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, 64049-550, Teresina – PI, Brasil.

³Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami. Universidade Federal de Pernambuco. 50670-901, Recife – PE, Brasil.

⁴Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso. 64202-020, Parnaíba – PI, Brasil.

⁵Laboratório de Cancerologia Experimental. Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. 50670-901, Recife – PE, Brasil.

4. Capítulo 3 – Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de um peptídeo derivado de rãs (dermaseptina 01) na forma livre e lipossomal em células tumorais humanas

ANCHIÊTA JÚNIOR, J.J.L.¹; LIMA, H.R.S.²; CAVALCANTI, I.M.F.³; LEITE, J.R.S.A.⁴; MILITÃO, G.C.G.⁵; DA SILVA, T.G.⁵; MAGALHÃES, N.S.S.³; SANTOS, H.M.L.R.¹

A terapia antineoplásica convencional atual apresenta algumas limitações relacionadas aos medicamentos disponíveis, com fármacos tóxicos e/ou farmacocineticamente desfavoráveis, e às características intrínsecas das células tumorais, como instabilidade, heterogeneidade e resistência. Esses fatores podem ser superados através da utilização de nanossistemas de liberação controlada, como os lipossomas que possibilitam o direcionamento sítio-específico das substâncias anticancerígenas e previnem efeitos secundários. Peptídeos catiônicos anfipáticos com intensa atividade citolítica, sintetizados na pele de rãs, apresentam uma atividade citotóxica seletiva. No gênero *Phyllomedusa*, as dermaseptinas se destacam. Proteínas bioativas são suscetíveis às proteases plasmáticas quando administradas *in vivo*, e assim necessitam de sistemas carreadores que promovam a estabilidade na circulação sanguínea e prolonguem a atividade biológica. O objetivo desse capítulo foi estudar a citotoxicidade *in vitro* da dermaseptina 01 (DS 01) encapsulada em lipossomas unilamelares pequenos (SUVs) e na sua forma livre em células tumorais humanas. Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e sonicação, produzindo formulações neutras e catiônicas, convencionais e furtivas, contendo DS 01 50 µg/mL (LCD, LFD, LCD+ e LFD+) e vazias (LC, LF, LC+ e LF+). A citotoxicidade foi analisada em células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano (NCI-H292), adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2), pelo ensaio de redução do sal tetrazólio (MTT). Em NCI-H292, a DS 01 livre apresentou efeito citostático médio de 35,6%. A encapsulação em lipossomas convencionais neutros aumentou o efeito, ao contrário dos lipossomas furtivos. Os lipossomas neutros vazios foram levemente citotóxicos, provavelmente devido à presença de colesterol que pode ser desestabilizador de membranas. Para HT-29 e HEp-2, a DS 01 inibiu o crescimento celular em uma média de aproximadamente 50%. A encapsulação em lipossomas catiônicos potencializou o efeito do peptídeo; os lipossomas convencionais inibiram na faixa de 80%, e os furtivos promoveram uma inibição maior que 95% para as duas linhagens celulares. Os lipossomas catiônicos vazios foram altamente citotóxicos, provavelmente devido à estearilamina. Ensaio MTT com concentrações peptídicas maiores estão sendo realizados. A realização de ensaios pré-clínicos *in vivo* é necessária para diferenciar o perfil de inibição tumoral entre lipossomas catiônicos vazios e contendo DS 01.

Palavras-chave: câncer, peptídeos catiônicos, dermaseptina 01, lipossomas, citotoxicidade *in vitro*, tetrazólio.

Abstract – Evaluation of *in vitro* cytotoxicity of a peptide derived from frogs (dermaseptin 01) in free and liposomal form on human tumor cells

The current conventional anticancer therapy has some limitations related to available drugs, with toxic and/or unfavorable pharmacokinetically drugs, and to intrinsic characteristics of tumor cells, as instability, heterogeneity and resistance. These factors can be overcome by use of controlled release nanocarriers, as liposomes that allow site-specific targeting of antineoplastics and prevent side effects. Amphipatic cationic peptides with strong cytolytic activity, synthesized on frogs skin, present a selective cytotoxicity activity. In *Phyllomedusa* genus, stand out the dermaseptins. Bioactive proteins are susceptible to plasma proteases when *in vivo* administered, and need to carrier systems that promote blood stability and prolong the biological activity. This study aimed evaluate the *in vitro* cytotoxicity of dermaseptin 01 (DS 01) encapsulated in small unilamellar vesicles (SUVs) and free on human tumor cells. Liposomes were prepared by lipid film hydration and sonication methods, yielding conventional and stealth, neutral and cationic, formulations containing DS 01 50 µg/mL (LCD, LFD, LCD+ e LFD+) and not-loaded (LC, LF, LC+ e LF+). Cytotoxicity was analyzed on human lung mucoepidermoid carcinoma (NCI H-292), human colon adenocarcinoma (HT-29) and human larynx epidermoid carcinoma (HEp-2), by tetrazolium reduction method (MTT). On NCI-H292, free DS 01 showed medium cytostatic effect of 35,6%. Its encapsulation in neutral conventional liposomes increased the inhibition, unlike the stealth. Not-loaded neutral liposomes were slightly cytotoxic, probably due the cholesterol that is membrane destabilizing. To HT-29 and HEp-2, DS 01 inhibited cell growth on average by approximately 50%. Encapsulation in cationic liposomes increased the peptide effect; conventional liposomes inhibited about 80%, and stealth promoted an inhibition higher than 95% to both cell lines. Not-loaded cationic liposomes were highly cytotoxic, probably due stearylamine. MTT assays with higher peptide concentrations are being performed. The performing of *in vivo* pre-clinical assays is necessary to differentiate the anti-tumor effect between not-loaded and loaded-DS 01 cationic liposomes.

Key-words: cancer, cationic peptides, dermaseptin 01, liposomes, *in vitro* cytotoxicity, tetrazolium.

4.1. Introdução

Os tratamentos convencionais dos tumores malignos humanos apresentam vários obstáculos e limitações, principalmente em casos avançados. Isso se deve não somente ao arsenal terapêutico existente, mas também às características fisiopatológicas dos tumores, dentre elas: instabilidade genética, o que os tornam extraordinariamente adaptáveis às mudanças ambientais; heterogeneidade através das mutações genéticas, expressão de oncoproteínas, imunogenicidade etc; resistência farmacológica intrínseca ou adquirida; existência de uma fase de baixo crescimento celular, quando são menos suscetíveis às toxinas mitóticas e vetores de transferência de genes, que requerem células em divisão; apresentação antigênica infrarregulada, não expressando antígenos específicos ou moléculas imunológicas co-estimulatórias, mas induzindo tolerância imunológica ou inibindo mecanismos efetores da resposta imune; comportamento *in vivo* e *in vitro* diferentes, bem como quando se compara células tumorais em modelos animais de experimentação com células humanas; diagnóstico frequente em estágios avançados com ampla disseminação no organismo (GÓMEZ-NAVARRO; CURIEL; DOUGLAS, 1999).

Uma parcela considerável dos fármacos antineoplásicos apresentam propriedades farmacêuticas e farmacológicas inadequadas, como baixa hidrossolubilidade, instabilidade, farmacocinética desfavorável (biodistribuição não-seletiva ou inespecífica e metabolismo rápido) e toxicidade orgânica elevada. Isso pode ocasionar numerosas consequências negativas, como atividade terapêutica baixa e e/ou inefetividade terapêutica e baixa qualidade de vida do paciente. Os sistemas nanométricos de liberação controlada, definidos como os que possuem diâmetro de partícula em torno de 100 nm ou menos, estão atraindo uma atenção considerável como uma forma de superar as limitações da terapia antineoplásica convencional. Lipossomas são nanossistemas arquetípicos de liberação de fármacos que possibilitam o direcionamento específico de anticancerígenos para tumores, previnem efeitos secundários em tecidos sadios e aumentam a captação celular desses fármacos (ALLEN et al., 2006; SLINGERLAND; GUCHELAAR; GELDERBLOM, 2012).

Peptídeos citolíticos são sintetizados em glândulas granulares presentes na pele de uma vasta gama de espécies de anuros (sapos e rãs) e constituem um importante componente do sistema imune inato destes animais, protegendo-os contra a invasão por patógenos bacterianos e fúngicos, e contra a ingestão por predadores. Essas substâncias

são liberadas pela pele em resposta à infecções ou condições de estresse, geralmente em altíssimas concentrações. A sub-família *Phyllomedusinae* da família *Hylidae* compreende 56 espécies e é uma fonte rica de peptídeos com atividade citolítica, agrupados segundo suas semelhanças estruturais nas seguintes famílias: dermaseptinas, dermatoxinas, filoxinas, filoseptinas e Gly-Leu-rich peptídeos. Os membros dessas famílias diferem consideravelmente em sua estrutura primária e atividade biológica, mas conservam as sequências aminoácidas e as regiões amino-terminais, características estas herdadas dos seus precursores biossintéticos (HANCOCK, 2001; VANHOYE et al., 2003; CONLON et al., 2007).

As dermaseptinas representam os principais componentes peptídicos antimicrobianos em anuros. São sintetizadas pelo gênero *Phyllomedusa* e formam uma grande família com aproximadamente 30 diferentes peptídeos já identificados. Em geral, possuem uma cadeia longa de 27 a 34 aminoácidos e são catiônicas, com 3 a 6 resíduos de lisina dispersos uniformemente e 1 resíduo de triptofano na posição 3. Esta disposição espacial dos aminoácidos contribui para a estrutura anfipática dessas moléculas perante as membranas celulares. O provável mecanismo de ação das dermaseptinas ocorre pela formação de α -hélices anfipáticas que associam-se com as bicamadas fosfolipídicas das membranas celulares ou ambientes mimetizadores, provocando permeabilização e ruptura (LA ROCCA; SHAI; SANSOM, 1999; THOMPSON et al., 2007).

Uma variedade de diferenças fundamentais entre membranas de células cancerosas e de células normais pode explicar a toxicidade seletiva para tecidos neoplásicos de certos peptídeos catiônicos anfipáticos. As membranas de células cancerosas de mamíferos geralmente possuem carga negativa, devido à elevada expressão de moléculas aniônicas como a fosfatidilserina. Em contraste, as células não-cancerosas exibem principalmente fosfolipídeos zwitteriônicos neutros e esteróis. Isso sugere que o colesterol, maior componente das membranas celulares eucarióticas, promove a proteção das células sadias contra os efeitos citolíticos dos peptídeos catiônicos anfipáticos por alterações na fluidez da membrana, interferindo na inserção destes peptídeos. Essa hipótese concorda com alguns estudos que demonstraram uma proporcionalidade inversa entre os níveis de colesterol nas membranas celulares e sua susceptibilidade à lise pelos referidos peptídeos (SIMONS; IKONEN, 2000; DOBRZYNSKA et al., 2005; HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008; SCHWEIZER, 2009). Conlon et al. (2007), ao estudar a atividade citolítica de diferentes peptídeos

derivados da secreção da pele de seres da subfamília Phyllomedusinae, verificou que a dermaseptina L1 apresentou atividade citolítica seletiva contra células HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), com citotoxicidade em eritrócitos humanos observada apenas em concentrações elevadíssimas.

A aplicação de proteínas bioativas como agentes terapêuticos é fortemente limitada por sua rápida depuração após administração, seja no sítio de aplicação ou na circulação. Fármacos protéicos de baixo peso molecular possuem estabilidade química e física limitadas, sendo assim suscetíveis à proteólise, modificação química e desnaturação. Além disso, geralmente possuem meia-vida curta em fluidos biológicos. Doses frequentes são necessárias para que se atinja níveis terapêuticos, o que pode resultar em efeitos colaterais sistêmicos graves. Assim, a utilização adequada dessas macromoléculas na terapia médica depende do desenvolvimento de sistemas de carreamento que contornem os problemas relacionados ao uso dessas proteínas, aumentando a estabilidade e prolongando a atividade biológica após administração. Os lipossomas são sistemas carreadores de fármacos amplamente utilizados e que podem perfeitamente encapsular proteínas, protegendo-as contra a proteólise ou outros fatores desestabilizadores (MEYENBURG et al., 2000; VAN SLOOTEN et al., 2001).

O objetivo desse capítulo foi verificar a citotoxicidade *in vitro* da DS 01 encapsulada em lipossomas unilamelares pequenos, convencionais e furtivos, preparados conforme descrito no capítulo 2, bem como do peptídeo livre (não-encapsulado) em células tumorais humanas.

4.2. Material e Métodos

A citotoxicidade *in vitro* da DS 01 lipossomal e livre foi analisada em células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano (NCI-H292), adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2). Essas células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM – Minimum Essential Medium) em uma concentração de 10^5 células/mL e volume de 200 μ L, e semeadas em placas de culturas de 96 poços. O método utilizado foi o ensaio de citotoxicidade de redução do sal tetrazólio (MTT), e o corante azul tripan foi utilizado para avaliar a viabilidade celular.

O estudo compreendeu a análise de 9 amostras diferentes:

- 1) Lipossomas convencionais neutros contendo DS 01 (50 μ g/mL) - LCD;

- 2) Lipossomas furtivos neutros contendo DS 01 (50 µg/mL) - LFD;
- 3) Lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01 (50 µg/mL) – LCD+;
- 4) Lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01 (50 µg/mL) – LFD+
- 5) Lipossomas convencionais neutros vazios - LC;
- 6) Lipossomas furtivos neutros vazios - LF;
- 7) Lipossomas convencionais catiônicos vazios – LC+;
- 8) Lipossomas furtivos catiônicos neutros vazios – LF+;
- 9) DS 01 livre (50 µg/mL)

Inicialmente, uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi adicionada à 2 poços (duplicata) nas placas. Uma das colunas da placa foi utilizada como controle negativo (meio de cultura + células). O volume final de cada poço foi de 220 µL. A concentração final do peptídeo livre e encapsulado (teoricamente) foi de aproximadamente 4,55 µg/mL. Em seguida, as placas foram armazenadas por 72 horas, à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e - 1,3 % de CO_2 .

Na sequência, foi adicionado 25 µL de brometo de 3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) a cada um dos poços, e as placas foram armazenadas por mais 3 h nas mesmas condições de incubação. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e adicionou-se 100 µL do solvente dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura foi realizada em ELISA, à 540 nm.

4.3. Resultados e Discussão

Fármacos peptídicos têm sido utilizados para o tratamento de uma diversidade de doenças como câncer, hepatite e reumatismo. Essas substâncias geralmente possuem mecanismo de ação específico e necessitam teoricamente de baixas doses para sua atividade farmacológica, o que reduz o risco de efeitos secundários. No entanto, essas macromoléculas são inerentemente suscetíveis à clivagem por proteases uma vez que apresentam baixa biodisponibilidade. Assim, necessitam de posologias frequentes e altas doses para a obtenção de efeitos terapêuticos *in vivo*, juntamente com efeitos indesejáveis. A ação dos peptídeos bioativos pode ser melhorada com o ajuste de seus aspectos farmacocinéticos. O uso de carreadores farmacológicos, por exemplo, apresenta vantagens significativas como aumento da solubilidade e biodistribuição, liberação controlada, direcionamento ao tecido doente e diminuição do custo do

tratamento. Dentre os sistemas de carreamento aprovados para peptídeos e proteínas, estão os lipossomas que são estudados há mais de 3 décadas principalmente para a encapsulação de agentes não-peptídicos. Estudos com moléculas peptídicas incorporadas nesses carreadores devem ser mais explorados (ALLEN; CULLIS, 2004; DASS; CHOONG, 2006).

Ensaio colorimétrico que utiliza o sal metil tiazolil tetrazólio (MTT) são amplamente empregados para a avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular de substâncias. Esse sal forma uma solução aquosa amarelada que, na presença de desidrogenases e agentes redutores de células metabolicamente ativas, torna-se um precipitado azul-violeta denominado formazan, de quantidade diretamente proporcional ao número de células vivas. Esse precipitado pode ser extraído com solventes orgânicos para a leitura das absorvâncias e determinação da viabilidade celular (BERRIDGE et al., 2005; VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011; STOCKERT et al., 2012).

A tabela 9 apresenta as porcentagens de inibição do crescimento das linhas celulares de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano (NCI-H292).

Tabela 9 – Inibição do crescimento de linhas celulares de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano (NCI-H292).

Formulação / Linha celular	NCI-H292 Inibição % \pm DP
LCD	46,03 \pm 1,00
LFD	32,24 \pm 2,80
LC	4,91 \pm 2,80
LF	6,55 \pm 1,18
DS 01 4,55 μ g/mL	35,64 \pm 9,23

Legenda: LCD: lipossomas convencionais neutros contendo DS 01; LFD: lipossomas furtivos neutros contendo DS 01; LC: lipossomas convencionais neutros vazios; LF: lipossomas furtivos neutros vazios; DP: desvio padrão;

A tabela 10 apresenta as porcentagens de inibição do crescimento das células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2).

Tabela 10 – Inibição do crescimento de linhas celulares de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2).

Formulação / Linha celular	HT-29	HEp-2
	Inibição % ± DP	Inibição % ± DP
LCD+	82,26 ± 2,71	86,18 ± 4,36
LFD+	96,32 ± 0,81	100 ± 0,00
LC+	76,69 ± 4,03	84,42 ± 2,18
LF+	100 ± 0,00	100 ± 0,00
DS 01 4,55 µg/mL	50,10 ± 1,32	51,34 ± 3,52

Legenda: LCD+: lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01; LFD: lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01; LC+: lipossomas convencionais catiônicos vazios; LF+: lipossomas furtivos catiônicos vazios; DP: desvio padrão;

A DS 01 livre (4,55 µg/mL) inibiu em média o crescimento de NCI-H292 em aproximadamente 35,6%. Os lipossomas neutros convencionais contendo DS 01 (LCD) inibiram em uma porcentagem maior. Os lipossomas furtivos (LFD) inibiram ligeiramente menos. O polietilenoglicol (PEG), ao revestir a membrana lipídica lipossomal, poderia criar uma barreira para a liberação do peptídeo. Assim, durante o período em que as células ficaram armazenadas em estufa (72 horas), os lipossomas convencionais promoveriam uma maior liberação peptídica que os furtivos. Em um período mais longo, a concentração de DS 01, liberada a partir dos LFD, poderia se tornar progressivamente mais elevada, obtendo uma inibição do crescimento celular igual ou maior que LCD.

A DS 01 livre inibiu o crescimento de HT-29 e HEp-2 em porcentagens aproximadamente semelhantes (próximo de 50% ou IC₅₀). Os lipossomas catiônicos contendo DS 01 (LCD+ e LFD+) apresentaram maior percentual de inibição para as duas linhas celulares, em comparação com o peptídeo livre. Os lipossomas furtivos promoveram uma maior inibição média (96,32% e 100%), para HT-29 e HEp-2, respectivamente. Pode ser sugerido que para os lipossomas catiônicos, o PEG não interferiu na cinética de liberação das substâncias encapsuladas.

Segundo ROSAL et al. (2005), um requisito importante no uso de peptídeos na terapia do câncer é a capacidade dessas moléculas de serem transduzidas pela membrana celular cancerosa. Em geral, membranas plasmáticas celulares são altamente impermeáveis para proteínas e peptídeos. Mesmo assim, foi descoberto que certas sequências peptídicas pequenas, compostas principalmente por aminoácidos catiônicos (ex.: arginina e lisina), e regiões N-terminal e C-terminal tem a habilidade não apenas

de se transportar pelas membranas, mas também carrear moléculas ligadas (como proteínas, DNA etc). A interação iônica entre a carga positiva dos resíduos de aminoácidos e o grupo fosfato de carga negativa das bicamadas lipídicas tem papel-chave nesse processo, levando a um efeito citotóxico significativo e seletivo em células cancerosas humanas.

Os lipossomas vazios neutros (LC e LF) apresentaram uma leve citotoxicidade em NCI-H292. Alguns lipídeos podem apresentar citotoxicidade *in vitro*. Segundo Tabas (1997), a alta razão colesterol/fosfolipídeo em membranas celulares pode ser tóxica para as células, provocando-lhes necrose. O colesterol provoca distúrbios nas proteínas de membrana devido ao enrijecimento da bicamada e pela formação de cristais intracelulares de colesterol que podem provocar danos físicos às organelas celulares. De acordo com Jett & Alving (1983), estudos anteriores sugerem que lipossomas contendo colesterol podem ter efeitos citotóxicos em células tumorais. Sendo assim, o colesterol presente nos lipossomas poderia ter interagido com algumas das estruturas membranares das células cancerosas, desestabilizando-as e promovendo a morte celular. Como esses lipossomas são vazios, o polietilenoglicol não atuou como uma barreira à liberação do peptídeo, e, assim, os lipossomas furtivos foram mais tóxicos que os convencionais.

Ao se comparar os lipossomas vazios neutros entre si, os furtivos apresentaram uma discreta maior citotoxicidade para NCI-H292. Os lipossomas convencionais apresentaram tamanho médio de partícula maior que os furtivos (capítulo 2). Segundo Nagayasu; Uchiyama; Kiwada (1999), o tamanho é um ponto-chave no direcionamento celular de lipossomas, pois influencia na passagem pelos capilares endoteliais. Quanto menor ou mais próximo de 100 nm, maior será o acúmulo das vesículas em células doentes. Pode ser sugerido, então, que os lipossomas vazios furtivos poderiam atuar mais intensamente sobre às células tumorais, e por isso apresentaram percentual de inibição ligeiramente maior que os lipossomas convencionais.

Os lipossomas vazios catiônicos (LC⁺ e LF⁺) foram expressivamente citotóxicos para HT-29 e HEp-2. Layton et al. (1980) afirmam que lipossomas vazios podem apresentar alta toxicidade *in vitro* para determinados tipos celulares, especialmente as formulações que contêm estearilamina. Nesse caso, os lipossomas furtivos foram mais citotóxicos para as duas linhagens (100%), sugerindo que

lipossomas compostos por PEG e estearilamina apresentam citotoxicidade *in vitro* elevada.

Foi observado que a inibição promovida pelos lipossomas catiônicos foi maior que pelos lipossomas neutros. Lipossomas catiônicos proporcionam um aumento na captação celular e citotoxicidade *in vitro* devido à interação eletrostática com as células, facilitando a endocitose e a liberação citosólica (JUNG et al., 2009). A encapsulação da DS 01 em lipossomas catiônicos potencializou em um maior grau a citotoxicidade, ainda que esta comparação esteja sendo feita para linhagens tumorais diferentes.

Para a determinação do IC₅₀, ensaios MTT com DS 01 encapsulada e livre em concentrações maiores estão sendo realizados. A realização de ensaios pré-clínicos *in vivo* é necessária para diferenciar o perfil de inibição tumoral entre lipossomas catiônicos vazios e contendo DS 01.

4.4. Conclusão

A dermaseptina 01 (DS 01) encapsulada em lipossomas apresentou atividade citotóxica para NCI-H292, HT-29 e HEp-2. Em NCI-H292, os lipossomas convencionais neutros contendo DS 01 apresentaram maior atividade inibitória que os furtivos, sugerindo que o PEG cria uma barreira física para a liberação peptídica, tornando-a mais lenta e progressiva. Em HT-29 e HEp-2, a encapsulação em lipossomas catiônicos potencializou a citotoxicidade do peptídeo, com inibição de 100% para HEp-2. Os lipossomas catiônicos vazios produziram inibição expressiva. Ensaios MTT com concentrações peptídicas maiores estão sendo realizados. A realização de ensaios pré-clínicos *in vivo* é necessária para diferenciar o perfil de inibição tumoral entre lipossomas catiônicos vazios e contendo DS 01.

Referências

ALLEN, T.M.; CHENG, W.W.K.; HARE, J.I.; LAGINHA, K.M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lipidic nanoparticles in cancer. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 6, p. 513-523, 2006.

ALLEN, T.M.; CULLIS, P.R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**. v. 303, p. 1818-1822, 2004.

BERRIDGE, M.V., HERST, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**. v. 11, p. 127-152, 2005.

CONLON, J.M.; WOODHAMS, D.C.; RAZA, H.; COQUET, L.; LEPRINCE, J.; JOUENNE, T.; VAUDRY, H.; ROLLINS-SMITH, L.A. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). **Toxicon**. v. 50, p. 498-506, 2007.

DASS, C.R.; CHOONG, P.F.M. Carrier-mediated delivery of peptidic drugs for cancer therapy. **Peptides**. v. 27, p. 3020-3028, 2006.

DOBZYNSKA, J.; SZACHOWICZ-PETELSKA, B.; SULKOWSKI, S.; FIGASZEWSKI, Z. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 276, p. 113-119, 2005.

GÓMEZ-NAVARRO; J.; CURIEL, D.T.; DOUGLAS, J.T. Gene therapy for cancer. **European Journal of cancer**. v. 35, p. 2039-2057, 1999.

HANCOCK, R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **Lancet Infectious Diseases**. v. 1, p. 156-164, 2001.

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

JETT, M.; ALVING, C.R. Selective cytotoxicity of tumor cells induced by liposomes containing plant phosphatidylinositol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 114, p. 863-871, 1983.

JUNG, S.H.; JUNG, S.H.; SEONG, H.; CHO, S.H.; JEONG, K.; SHIN, B.C. Polyethylene glycol-complexed cationic liposomes for enhanced cellular uptake and anticancer activity. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 382, p. 254-261, 2009.

LA ROCCA, P.; SHAI, Y.; SANSOM, M.S.P. Peptide-bilayer interactions: simulations of dermaseptin B, an antimicrobial peptide. **Biophysical Chemistry**. v. 76, p. 145-159, 1999.

LAYTON, D.; LUCKENBACH, G.A.; ANDREESSEN, R.; MUNDER, P.G. The interaction of liposomes with cells: the relation of cell specific toxicity to lipid composition. **European Journal of Cancer**. v. 16, p. 1529-1538, 1980.

MEYENBURG, S.; LILIE, H.; PANZNER, S.; RUDOLPH, R. Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system Studies on the in vitro release behavior. **Journal of Controlled Release**. v. 69, p. 159-168, 2000.

NAGAYASU, A.; UCHIYAMA, K.; KIWADA, H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 40, p 75-87, 1999.

ROSAL, R.; BRANDT-RAUF, P.; PINCUS, M.R.; WANG, H.; MAO, Y.; LI, Y.; FINE, R.L. The role of alpha-helical structure in p53 peptides as a determinant for their mechanism of cell death: necrosis versus apoptosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 57, p. 653-660, 2005.

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

SIMONS, K.; IKONEN, E. How cells handle cholesterol. **Science**. v. 290, p. 1721-1726, 2000.

SLINGERLAND, M.; GUCHELAAR, H.; GELDERBLOM, H. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. **Drug Discovery Today**. v. 17, p. 160-166, 2012.

STOCKERT, J.C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R.W. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**. v.114, p. 785-796, 2012.

TABAS, I. Free cholesterol-induced cytotoxicity. **Trends Cardiovascular Medicine**. v. 7, p. 256-263, 1997.

THOMPSON, A.H.; BJOURSON, A.J.; ORR, D.F.; SHAW, C.; MCCLEAN, S. A combined mass spectrometric and cDNA sequencing approach to the isolation and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretions of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*. **Peptides**. v. 28, p. 1331-1343, 2007.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G.J.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**. v. 731, p. 237-245, 2011.

VAN SLOOTEN, M.L.; BOERMAN, O.; ROMOREN, K.; KEDAR, E.; CROMMELIN, D.J.A.; STORM, G. Liposomes as sustained release system for human interferon- γ : biopharmaceutical aspects . **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1530, p. 134-145, 2001.

VANHOYE, D.; BRUSTON, F.; NICOLAS, P.; AMICHE, M. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. **European Journal of Biochemistry**. v. 270, p. 2068-2081, 2003.

**Avaliação genotóxica da dermaseptina 01 livre (não-encapsulada) em
Allium cepa, e encapsulada em lipossomas em linfócitos sanguíneos
humanos**

**ANCHIÊTA JÚNIOR, J.J.L.¹; LIMA, H.R.S.²; GOMES, D.C.V.³; DANTAS, A.F.³;
CAVALCANTI, I.M.F.⁴; LEITE, J.R.S.A.⁵; MAGALHÃES, N.S.S.⁴;
CAVALCANTE, A.A.C.M.¹; SANTOS, H.M.L.R.¹**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; ²Curso de Bacharelado em Farmácia; ³Núcleo de Tecnologia Farmacêutica. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela. 64049-550, Teresina – PI, Brasil.

⁴Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami. Universidade Federal de Pernambuco. 50670-901, Recife – PE, Brasil.

⁵Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia. Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso. 64202-020, Parnaíba – PI, Brasil.

5. Capítulo 4 – Avaliação genotóxica da dermaseptina 01 livre (não-encapsulada) em *Allium cepa*, e encapsulada em lipossomas em linfócitos sanguíneos humanos

ANCHIÊTA JÚNIOR, J.J.L.¹; LIMA, H.R.S.²; GOMES, D.C.V.³; DANTAS, A.F.³; CAVALCANTI, I.M.F.⁴; LEITE, J.R.S.A.⁵; MAGALHÃES, N.S.S.⁴; CAVALCANTE, A.A.C.M.¹; SANTOS, H.M.L.R.¹

Os testes de genotoxicidade têm sido empregados para identificar o potencial genotóxico de substâncias químicas. Esses estudos têm destaque nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos, já que os medicamentos podem provocar efeitos mutagênicos, carcinogênicos e citotóxicos. O ensaio *Allium cepa* avalia danos ao DNA, aberrações cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico celular. O teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (CBMN – Cytokinesis-Blocked Micronuclei) é um método especial que identifica células binucleadas através do bloqueio da citocinese pela citocalasina-B, evidenciando micronúcleos, estruturas que indicam mutagenicidade. O objetivo desse capítulo foi avaliar a genotoxicidade da dermaseptina 01 (DS 01), um peptídeo antimicrobiano isolado da pele de rãs, encapsulada em lipossomas convencionais catiônicos e na sua forma livre. Os lipossomas foram preparados conforme o capítulo 2. A DS 01 livre foi estudada em células de *A. cepa* nas concentrações de 50, 25 e 12,5 µg/mL, e a DS 01 encapsulada, em linfócitos sanguíneos humanos pelo método CBMN, na concentração de 50 µg/mL. A DS 01 50 µg/mL foi significativamente tóxica (redução do comprimento das raízes) e citotóxica (redução do índice mitótico) para *A. cepa*; quanto a mutagenicidade, apresentou frequência significativa de aberrações cromossômicas, mas não de micronúcleos, o que indica que o peptídeo possivelmente foi não-mutagênico. As outras concentrações de DS 01 não foram genotóxicas para *A. cepa*. No ensaio CBMN, a DS 01 50 µg/mL apresentou contagem significativa de células binucleadas com micronúcleos (mutagenicidade) e de células necróticas (citotoxicidade). A encapsulação do peptídeo reduziu a contagem de células binucleadas com micronúcleos, ainda que não significativamente, e reduziu significativamente o número de células necróticas. As amostras não provocaram apoptose celular em número significativo. Ensaio CBMN com lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01 estão sendo realizados.

Palavras-chave: *Allium cepa*, Dermaseptina 01, Genotoxicidade, Mutagenicidade, Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese.

Abstract – Genotoxic evaluation of free dermaseptin 01 (non-encapsulated) in *Allium cepa*, and liposome-encapsulated in human blood lymphocytes

The genotoxicity tests have been employed to identify genotoxic potential of chemical substances. These studies have featured in initial stages of drug development, because drugs can to cause mutagenic, carcinogenic and cytotoxic effects. The *A. cepa* assay evaluates DNA damage, chromosomal aberrations and cell cycle disorders. The Cytokinesis-Blocked Micronuclei assay (CBMN) is a particular method that identifies binucleated cells by blocking of cytokinesis by cytochalasin-B, indicating micronuclei, structures that indicate mutagenicity. This chapter aimed to evaluate the genotoxicity of dermaseptin 01 (DS 01), an antimicrobial peptide isolated from frogs skin, encapsulated in conventional cationic liposomes and its free form. Liposomes were prepared according chapter 2. DS 01 free was studied on *A. cepa* cells at 50, 25 and 12.5 µg/mL, and liposomal-DS 01, on human blood lymphocytes by CBMN assay, at 50 µg/mL. DS 01 50 µg/mL was significantly toxic (reduction in length roots) and cytotoxic (reduced in mitotic index) to *A. cepa*; about mutagenicity, showed significant frequency of chromosome aberrations, but not micronuclei, indicating that the peptide was possibly non-mutagenic. Other DS 01 concentrations were not genotoxic to *A. cepa*. In CBMN assay, DS 01 50 µg/mL presented significant count of binucleated cells with micronuclei (mutagenicity) and necrotic cells (cytotoxicity). The peptide-encapsulation not significantly reduced the count of binucleated cells with micronuclei, and significantly reduced necrotic cells. The samples didn't cause significantly cell apoptosis. CBMN assays with stealth cationic liposomes containing DS 01 are being performed.

Key-boards: *Allium cepa*, Cytokinesis-Blocked Micronuclei Assay, Dermaseptin 01, Genotoxicity, Mutagenicity.

5.1. Introdução

Há mais de trinta anos, os testes de toxicologia genética têm sido empregados para identificar o potencial genotóxico de substâncias em células. Um ou mais testes podem ser conduzidos, dependendo da substância química, com destaque para os ensaios *in vivo*. São avaliados dois tipos de danos genéticos: mutações e danos cromossômicos. A realização de testes *in vitro* para detectar a presença de micronúcleos também é importante e os testes são complementares entre si (THYBAUD et al., 2007).

O teste de genotoxicidade em *Allium cepa* permite a avaliação de diferentes alterações. O índice mitótico é caracterizado pelo número total de células em divisão no ciclo celular e determina os níveis de citotoxicidade das substâncias. Este parâmetro pode estar significativamente diminuído ou aumentado em relação ao controle. O primeiro caso pode indicar alterações no crescimento e desenvolvimento de organismos expostos; o segundo, proliferação celular desordenada e tumores. Outra alteração, a aberração cromossômica é caracterizada por modificações na estrutura ou quantidade de cromossomos, que podem ocorrer espontaneamente ou não. As aberrações cromossômicas estruturais são as pontes e atrasos cromossômicos, e podem ser induzidas por fatores como quebra de DNA, inibição da síntese do DNA e replicação de DNA alterado. Aberrações cromossômicas numéricas (aneuploidia e poliploidia) são consequentes da segregação cromossômica anormal. No teste em *A. cepa*, as aberrações cromossômicas podem ser avaliadas em diferentes fases da divisão celular, principalmente anáfase e telófase (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; LEME; DE ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A indução de distúrbios do eixo em células de *A. cepa* pode levar a formação de micronúcleos no estágio seguinte de divisão celular, geralmente devido à separação irregular de cromossomos na anáfase que migram para os pólos antes de outros, podendo formar uma membrana nuclear em torno de si, constituindo dessa forma o micronúcleo. Os micronúcleos podem ser únicos ou múltiplos e preenchem os seguintes critérios: estrutura da cromatina e intensidade de cor similares ou mais fracas que o núcleo principal; borda evidente, sugerindo membrana nuclear; formato arredondado; localização intracitoplasmática; e diâmetro menor que 1/5 do núcleo principal. A detecção de micronúcleos e aberrações cromossômicas no teste *A. cepa* é

uma ferramenta para o diagnóstico rápido de substâncias genotóxicas (AKINBORO; BAKARE, 2007; BONASSI et al., 2007; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

Os micronúcleos são expressos somente em células que completam o processo de divisão nuclear. Por isso, foi desenvolvido um método especial que identifica células binucleadas através do bloqueio da citocinese pela citocalasina-B, chamado Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese (Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay - CBMN). As células que completam uma divisão nuclear são impedidas de realizar a citocinese e assim são identificadas pela sua aparência binucleada. A citocalasina-B é um inibidor da polimerização da actina, processo necessário para a formação dos microfilamentos em anel que contraem o citoplasma entre os núcleos-filhos durante a citocinese. Isso permite o acúmulo virtual de todas as células em divisão nos seus estágios binucleados. Os micronúcleos são marcados somente nas células binucleadas, o que permite comparações confiáveis de danos cromossômicos entre células que diferem em sua cinética de divisão celular. Além disso, mede-se mais precisamente a frequência de micronúcleos, uma vez que seria necessário o dobro de células mononucleadas para observar o mesmo nível de danos observados em células binucleadas. O ensaio CBMN foi inicialmente desenvolvido para uso em culturas de linfócitos humanos, mas foi adaptado para a utilização em vários tipos celulares como tumores sólidos e células da medula óssea. Este teste verifica as seguintes características de mutagenicidade e citotoxicidade: quebra cromossômica, perda de cromossomos, rearranjo cromossômico, inibição da divisão celular, necrose e apoptose (FENECH, 2000; FENECH, 2006; CHEQUER, 2008).

A dermaseptina 01 (DS 01) é um peptídeo catiônico anfipático que compõe a família das dermaseptinas, moléculas citotóxicas liberadas por rãs da sub-família Phyllomedusinae em resposta ao estresse ou outros estímulos. A DS 01 possui atividade antimicrobiana potente contra uma vasta gama de micrroorganismos como bactérias e fungos, em concentrações micromolares. Porém, como boa parte dos peptídeos biologicamente ativos, a DS 01 apresenta baixa biodisponibilidade pois é rapidamente inativada pelas proteases plasmáticas sanguíneas quando administrada em sua forma livre (CONLON et al., 2007; LEITE et al., 2008; AMICHE; LADRAM; NICOLAS, 2008).

O objetivo desse capítulo foi avaliar a genotoxicidade da DS 01 livre em *Allium cepa*, e desse peptídeo encapsulado em lipossomas em linfócitos sanguíneos humanos por meio do teste CBMN.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Teste *Allium cepa* com a DS 01 livre (não-encapsulada)

O teste em *Allium cepa* foi realizado de acordo com o descrito por Fiskejő (1985), com modificações. A DS 01 foi utilizada nas concentrações de 50, 25 e 12,5 µg/mL, com diluições realizadas em água destilada. Água desclorificada foi utilizada como controle negativo, e sulfato de cobre 1,2 µg/mL, como controle positivo. Os lipossomas contendo DS 01 não foram testados em *A. cepa*.

Bulbos da espécie *Allium cepa* (n = 16, diâmetro de 20-30 cm e peso de 5-10 g), com catáfilos externos brancos e de origens idênticas, não germinados e saudáveis, foram adquiridos comercialmente de supermercados em Teresina – PI, mantidos ao abrigo de luz e livres de umidade. Antes do teste, os catáfilos externos secos foram removidos com bisturi, sem danificar a área radicular. Em seguida, os bulbos foram colocados em água de torneira por duas horas para reduzir os possíveis efeitos de inibidores do brotamento.

A DS 01 nas 3 concentrações (50, 25 e 12,5 µg/mL) foram distribuídas em quatro recipientes de vidro esterilizados de capacidades de 5 mL e cada recipiente recebeu um bulbo com a área radicular em contato com a solução para germinar a 18 – 22 °C (KOVALCHUK et al., 1998) (figura 1). O volume de solução absorvido pelos bulbos foi repostado diariamente, para manter as raízes mergulhadas. Após 72 horas de exposição, as raízes foram medidas para a avaliação da toxicidade.

Figura 1. Bulbos de *A. ceppa* expostos à DS 01 (50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$), quatro recipientes por concentração.



Em seguida, as raízes foram colocadas em solução fixadora Carnoy (etanol 99% + ácido acético glacial, 3:1), para conservar as células em refrigeração, por 24 horas. Após esse período, foi adicionado etanol 70% e para conservação sob refrigeração até o momento da preparação das lâminas. O teste foi conduzido sobre bancada sem movimentos e sem iluminação direta (FISKEJÖ, 1985).

Para a preparação das lâminas, as raízes foram retiradas do etanol 70%, lavadas com água destilada (3 banhos de 5 minutos) e submetidas à hidrólise com ácido clorídrico 1N à 60°C por 8 minutos. Em seguida, foram transferidas para frascos de cor âmbar contendo o reativo de Schiff (fucsina básica + metabissulfito de sódio, 3:1), permanecendo nesses por 2 horas. As raízes foram retiradas com o auxílio de uma pinça, e a coifa (porção apical) em um comprimento de aproximadamente 1-2 mm, com um bisturi,. O restante foi desprezado. Foram adicionadas duas ou três gotas de carmin acético 2% para corar e as lâminas citológicas foram preparadas por esmagamento manual. A contagem e avaliação das células foi realizada em microscópio óptico no aumento de 1000x.

Para cada concentração de DS 01, foram examinadas 5000 células, observando-se as seguintes características microscópicas: índice mitótico (células em

divisão), aberrações cromossômicas (atrasos anafásicos, fragmentos, cromossomos soltos e pontes anafásicas) e micronúcleos.

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prism 5.00. O teste estatístico foi ANOVA (Dunnet's) com valores significantes de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ em relação ao controle negativo (ANOVA, seguido do Teste de Tukey com múltiplas comparações).

5.2.2. Teste de Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese (CBMN) com a DS 01 livre e lipossomal

O ensaio CBMN foi realizado segundo Fenech (2000) com algumas modificações, em linfócitos humanos saudáveis, com as seguintes amostras a serem testadas: DS 01 livre 50 $\mu\text{g/mL}$ e lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01 (LCD+). Os lipossomas foram preparados conforme o capítulo 2. Para controle negativo, foi realizada a leitura de células não tratadas, e como controle positivo, o agente tóxico Paraquat.

As etapas experimentais estão descritas a seguir:

1. Foi coletado sangue fresco por punção venosa, que foi transferido para tubos de plástico contendo o anticoagulante heparina;
2. Cada amostra (100 μL) e o sangue total (18 gotas) foram adicionados em tubos contendo o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 15% de soro bovino fetal, 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina); 1% de L-glutamina e 1% de fitohemaglutinina;
3. Os tubos foram incubados em estufa (37 °C) por 44 horas;
4. A citocalasina B foi adicionada;
5. Os tubos foram novamente incubados (37°C) por mais 28 horas;
6. Foi adicionada solução hipotônica de KCl (0,075 M) (5 mL) gelada por 2 - 3 min;
7. Foi adicionada solução fixadora (metanol + ácido acético, 5:1) (5 mL);
8. Foi adicionado formaldeído (3 gotas) e os tubos foram levemente agitados.
9. Foi adicionada solução fixadora (metanol + ácido acético, 3:1) (5 mL);
10. No decorrer dessas etapas, os tubos foram centrifugados por três vezes à 800 rpm por 5 minutos;

11. As lâminas foram preparadas através de gotejamento (4 lâminas por amostra), e em seguida, as células foram coradas com Giemsa 10%;
12. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (400x);
13. Foram avaliadas 1000 células binucleadas com citoplasma preservado quanto à frequência de micronúcleos, bem como a presença de células apoptóticas e necróticas.

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prism 5.00. O teste estatístico foi ANOVA com valores significantes de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ em relação ao controle negativo (ANOVA, seguido do Teste de Tukey com múltiplas comparações).

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Teste *Allium cepa* com a DS 01 livre (não-encapsulada)

Substâncias citotóxicas geralmente possuem efeitos adversos como por exemplo genotoxicidade. Por exemplo, fármacos antineoplásicos podem atingir células sadias induzindo a formação de tumores secundários. Ensaio com plantas vasculares são amplamente recomendados pelo Programa Ambiental das Nações Unidas para a avaliação genotóxica de substâncias, já que as plantas são similares aos mamíferos na detecção de alterações citogenéticas induzidas, apesar de possuírem metabolismos distintos. O ensaio *Allium cepa* é importante como um excelente modelo *in vivo*. As raízes crescem em contato direto com a substância a ser testada, para a detecção da genotoxicidade, sendo portanto um indicador relevante para a saúde humana. (CAVALCANTI et al., 2008; LUBINI et al., 2008; LAUGHINGHOUSE IV et al., 2012).

A tabela 11 apresenta os resultados da atividade genotóxica da DS 01 livre (não-encapsulada) em *Allium cepa*.

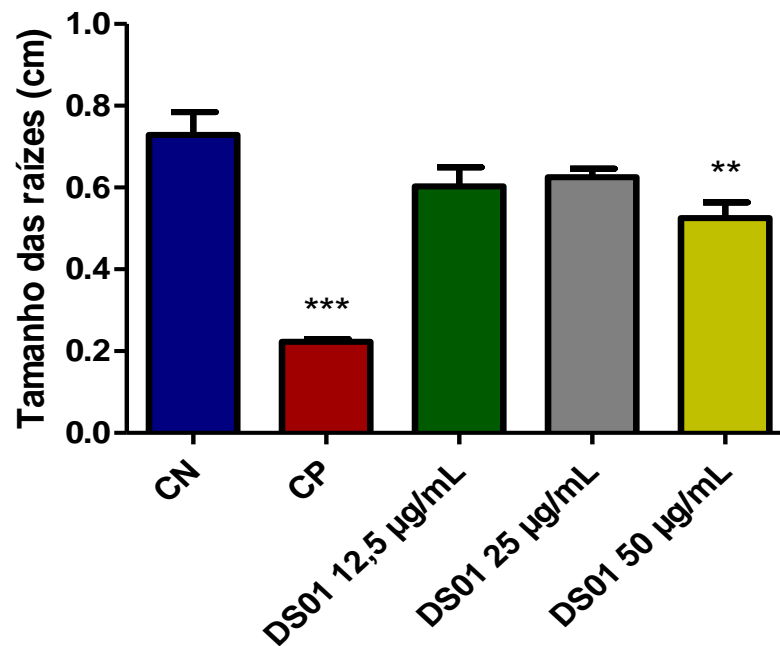
Tabela 11 - Índice mitótico (citotoxicidade), aberrações cromossômicas e micronúcleos (mutagenicidade), e comprimento das raízes (toxicidade) de células de *Allium cepa* expostas a DS 01 livre.

Grupos	Índice mitótico (células em divisão/5000)	Aberrações Cromossômicas					Células com micronúcleos (MN/5000)	Comprimento de raiz (cm)
		Pontes Anafásicas	Cromossomos soltos	Atrasos Anafásicos	Fragmentos	Frequência Total		
CN	40,66 ± 10,19	0,20 ± 0,44	0,80 ± 0,44	3,60 ± 1,34	0,60 ± 0,89	5,20 ± 2,16	0,40 ± 0,547	0,72 ± 0,14
CP	11,36 ± 4,86 ^{a***}	5,00 ± 3,67 ^{a*}	9,00 ± 3,00 ^{a*}	10,20 ± 2,28 ^{a*}	4,40 ± 1,14 ^{a**}	28,00 ± 5,17 ^{a***}	2,80 ± 1,30 ^{a*}	0,22 ± 0,01 ^{a***}
DS 01								
12,5 µg/mL	33,30 ± 7,22	0,44 ± 0,20	2,00 ± 1,00	3,20 ± 1,92	1,60 ± 0,89	7,00 ± 1,41	0,40 ± 0,54	0,60 ± 0,12
25 µg/mL	27,12 ± 7,64	2,60 ± 1,60	2,20 ± 1,09	5,00 ± 3,67	1,80 ± 0,83	10,60 ± 5,03	0,60 ± 0,54	0,62 ± 0,05
50 µg/mL	19,14 ± 4,32 ^{a**}	2,80 ± 1,04	2,40 ± 1,51	9,40 ± 4,87 ^{a*}	2,00 ± 1,58	15,60 ± 6,34 ^{a**}	1,20 ± 1,30	0,52 ± 0,10 ^{a**}

Legenda: CN (controle negativo: água desclorificada), CP (controle positivo: sulfato de cobre 0,0006 mg/mL), DS 01 (dermaseptina 01), ^a Significante em relação ao controle negativo. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. ANOVA. Teste de Tukey com múltiplas comparações.

O parâmetro de toxicidade é representado pelo crescimento das raízes. Conforme a tabela 11 e figura 8, a DS 01 demonstrou ser significativamente tóxica na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$). Não houve proporcionalidade entre toxicidade e concentração peptídica testada.

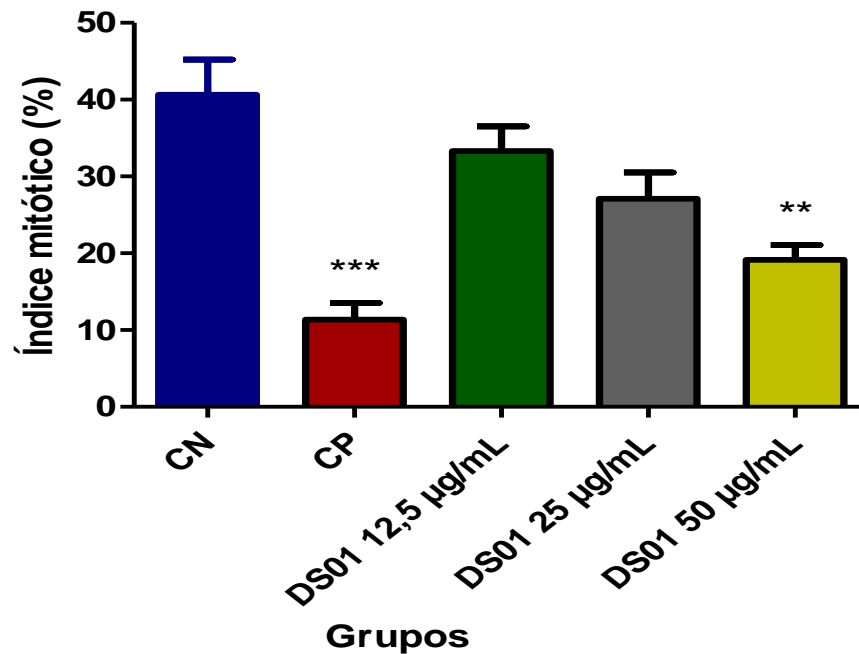
Figura 2. Toxicidade da DS 01 livre (50,25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$) em meristemas de raízes de *A. cepa* através do crescimento das raízes.



Legenda: CN (controle negativo: água desclorificada), CP (controle positivo: sulfato de cobre 1,2 $\mu\text{g/mL}$), DS 01 (dermaseptina 01), ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Quanto à citotoxicidade, a tabela 11 e a figura 2 demonstram que a DS 01 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentou uma atividade citotóxica significativa para células de *A. cepa* ($p < 0,01$), com redução do índice mitótico. As outras concentrações não foram significativamente citotóxicas. Houve uma proporcionalidade entre as concentrações.

Figura 3. Citotoxicidade da DS 01 livre (50,25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$) em meristemas de raízes de *A. cepa* através do índice mitótico.

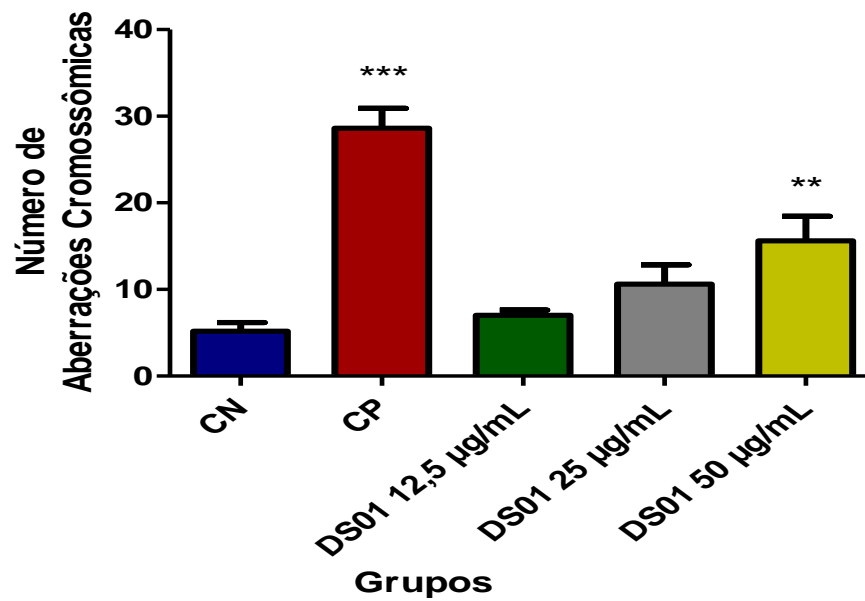


Legenda: CN (controle negativo: água desclorificada), CP (controle positivo: sulfato de cobre 0,0006 mg/mL), DS 01 (dermaseptina 01), ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

O presente estudo demonstrou que a DS 01, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, provocou citotoxicidade para células de *A. cepa*, sugerindo que em concentrações superiores a esta, a DS 01 apresente potencial risco de citotoxicidade para células não-tumorais. Reconhecidamente, as dermaseptinas são uma família de peptídeos catiônicos que não reduzem a viabilidade celular em mamíferos. Assim, outros estudos de citotoxicidade são necessários. O teste em *A. cepa* é considerado de triagem, e não de confirmação.

As aberrações cromossômicas são modificações estruturais resultantes de quebra ou mudança no material cromossômico. A maioria delas é letal às células meristemáticas de *A. cepa*. No entanto, algumas podem se tornar viáveis e causar efeitos genéticos (ASKIN; ASLANTURK, 2007). Foi verificado que a DS 01 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentou uma frequência total significativa de aberrações cromossômicas ($p < 0,01$), indicando que nesta concentração, o peptídeo provocou mutagenicidade (tabela 11 e figura 4). No entanto, ao se observar separadamente cada sub-tipo de aberrações, constatou-se que os atrasos anafásicos foram os responsáveis pela significância dos resultados na frequência total. Os 3 outros tipos de aberrações não apareceram em frequência significativa para a DS 01 50 $\mu\text{g/mL}$. Houve uma proporcionalidade entre efeito e concentração.

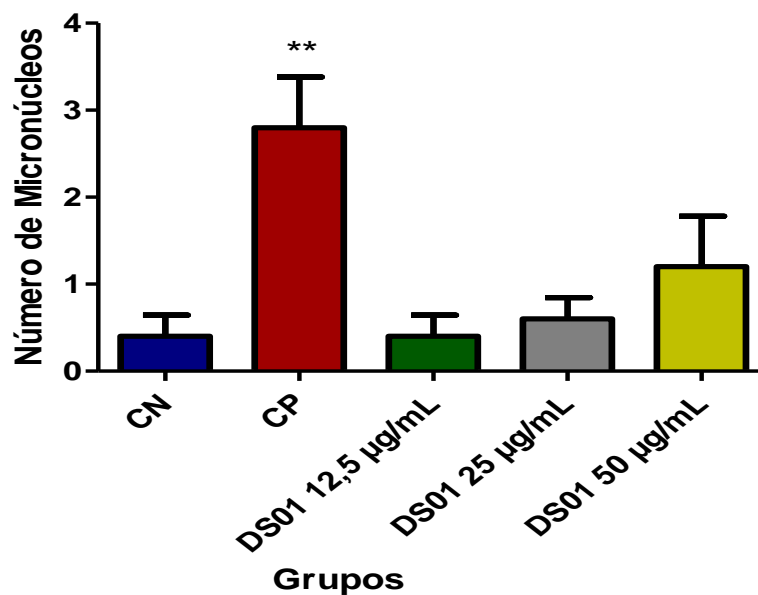
Figura 4. Mutagenicidade da DS 01 livre (50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$) em meristemas de raízes de *A. cepa* através da frequência total de aberrações cromossômicas.



Legenda: CN (controle negativo: água desclorificada), CP (controle positivo: sulfato de cobre 0,0006 mg/mL), DS 01 (dermaseptina 01), ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Quanto à frequência de micronúcleos, a DS 01 não foi mutagênica nas 3 concentrações testadas (tabela 11 e figura 5).

Figura 5. Mutagenicidade da DS 01 livre (50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$) em meristemas de raízes de *A. cepa* através da frequência de micronúcleos.

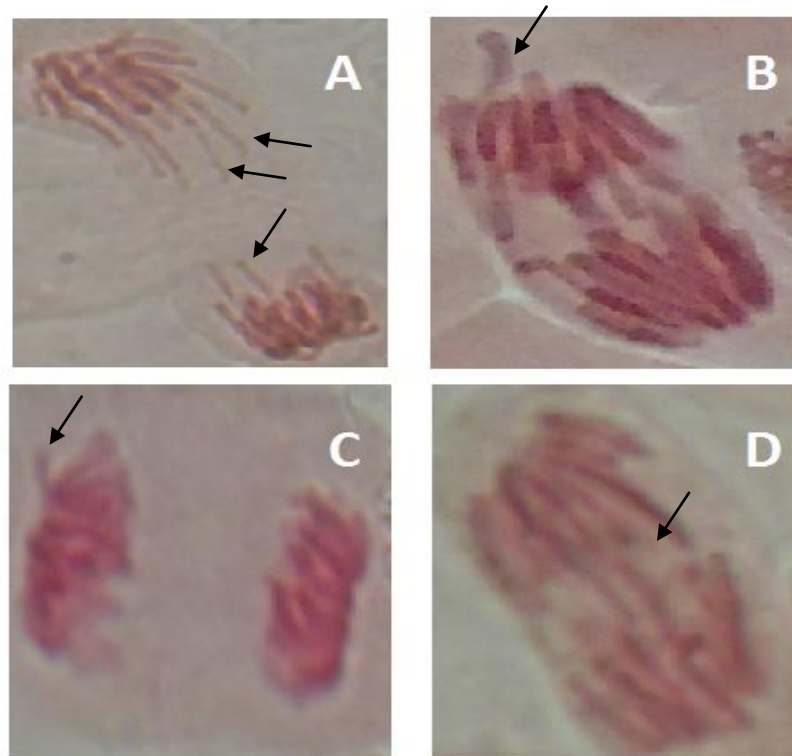


Legenda: CN (controle negativo: água desclorificada), CP (controle positivo: sulfato de cobre 0,0006 mg/mL), DS 01 (dermaseptina 01), ** $P < 0,01$.

Os micronúcleos são formados a partir do desenvolvimento de algumas aberrações cromossômicas que não foram reparadas ou foram indevidamente (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Como o teste não detectou uma frequência significativa de micronúcleos, provavelmente, as aberrações cromossômicas induzidas pela DS 01 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (atrasos anafásicos) foram reparadas. É sugerido, portanto, que a DS 01 apresenta um baixo potencial mutagênico. Não há relatos na literatura de atividade mutagênica para as dermaseptinas. De acordo com Snyder & Gren (2001), produtos biológicos e fármacos peptídicos presumidamente não possuem potencial genotóxico em virtude de suas composições estruturais.

Cada sub-tipo de aberrações cromossômicas (significativas e não-significativas) induzidas pela DS 01 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em *A. cepa* estão ilustradas na figura 6.

Figura 6. Microscopia óptica (1000x) das aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas à DS 01 livre (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$): (A) atraso anafásico, (B) cromossomo solto, (C) fragmento e (D) ponte anafásica.



5.3.2. Teste de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (CBMN) com a DS 01 livre e lipossomal

A tabela 12 apresenta os resultados para os efeitos mutagênicos e citotóxicos de DS 01 50 µg/mL, lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01 (LCD+) e controles.

Tabela 12 – Teste CBMN em linfócitos sanguíneos humanos expostos à DS 01 50 µg/mL e lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01.

GRUPOS	BNMN/ 1000 células	APOPTOSE/ 500 células viáveis	NECROSE/ 500 células viáveis	IDN/500 células	IDNC/500 células
^aControle Negativo	10,50 ± 2,12	45,00 ± 0,20	24,00 ± 1,41	2,04 ± 0,05	2,19 ± 0,26
^aParaquat	43,00 ± 2,82 *	145,00 ± 14,85 **	87,00 ± 4,24 ***	0,38 ± 0,40 *	0,13 ± 0,02 **
^aLCD+	17,00 ± 1,41 *	51,00 ± 1,41	22,00 ± 1,41	2,07 ± 0,03	2,16 ± 0,09
^aDS 01	44,00 ± 5,65 **	112 ± 26,87	67,50 ± 16,26 *	2,11 ± 0,50	1,95 ± 0,21

Legenda: a (média ± desvio padrão); DS 01 (dermaseptina 01); LCD+: lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01; BNMN: células binucleadas com micronúcleos; IDN: índice de divisão nuclear; IDNC: índice de divisão nuclear com citotoxicidade. Significância em *p<0,05, **p< 0,01, ***p<0,001 em relação ao controle negativo. ANOVA. Teste de Tukey com múltiplas comparações.

O Paraquat (1,1-dimetil-4,4-bipiridínio) é um herbicida não-seletivo de ação rápida introduzido comercialmente em 1962 e amplamente utilizado na agricultura. A ingestão intencional ou acidental de altas doses dessa substância pode provocar até a morte. Afeta órgãos como fígado, rins, timo e principalmente pulmão, em humanos e ratos. O mecanismo de toxicidade do paraquat envolve a sua re-oxidação e redução cíclica levando à oxidação de NADPH para NADP⁺ e a produção de radicais livres de oxigênio. Esses radicais podem interagir com membranas lipídicas provocando danos celulares. A depleção de NADPH leva à ruptura das vias de síntese que são dependentes desse nucleotídeo, como aquelas que envolvem a produção de surfactantes pulmonares (MAINWARING et al., 2006; TSAI et al., 2009). O Paraquat (controle positivo) apresentou resultados significativos com relação ao controle negativo (tabela 12).

DS 01 e LCD+ apresentaram contagem de células binucleadas com micronúcleos (BNMN) em número significativamente maior que o controle negativo ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). O peptídeo livre apresentou uma significância maior que o lipossomal e também que o controle positivo, já que para este parâmetro, a DS 01 50 µg/mL demonstrou alta mutagenicidade. A encapsulação da DS 01 em lipossomas, ao promover uma liberação lenta do peptídeo, reduziu a sua capacidade de formar micronúcleos, ainda que esta formação tenha ocorrido significativamente.

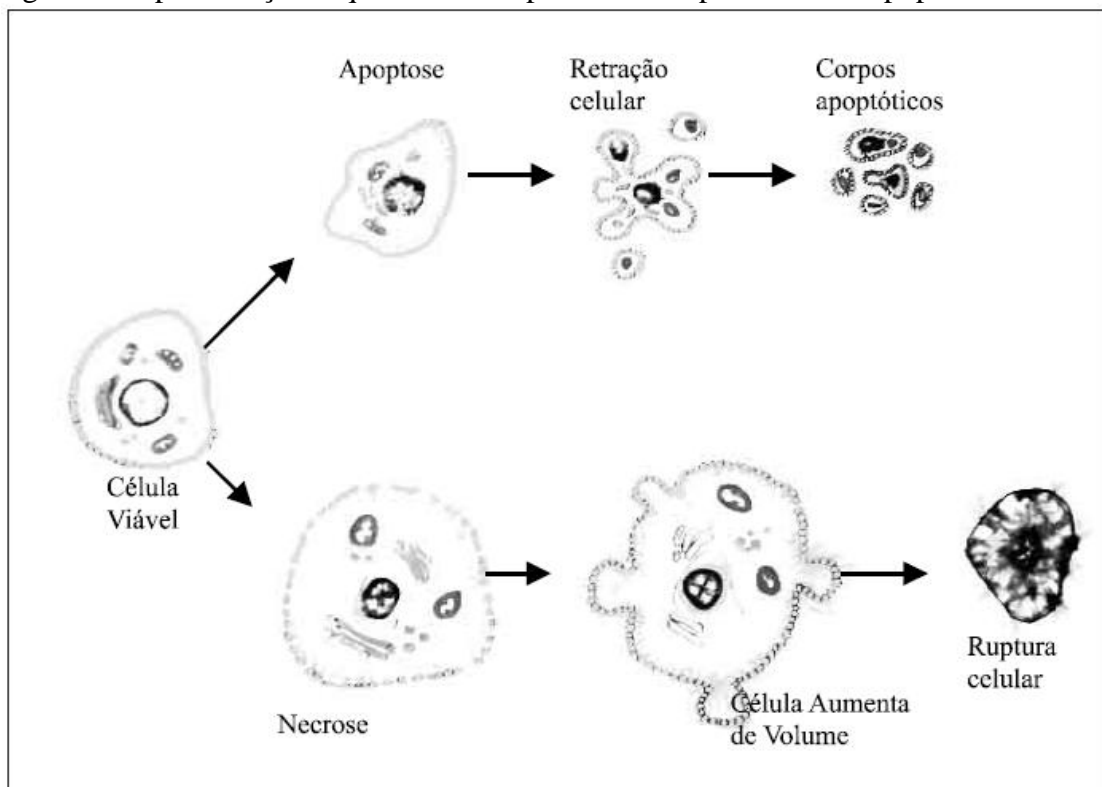
A apoptose é reconhecida como um mecanismo de morte celular criticamente controlado que assegura a homeostase orgânica e celular e previne a tumorigênese. Uma vez acionado, o processo de apoptose é iniciado com a permeabilização de membranas mitocondriais, ativação das caspases (asparto-cisteína proteases) e morte celular, de forma rápida, eficiente e irreversível. Muitos fármacos anti-câncer induzem apoptose em diferentes tipos de células. Células em apoptose apresentam mudanças bioquímicas e morfológicas em suas características, que incluem condensação da cromatina, fragmentação do DNA, encolhimento celular, perda da arquitetura membranal e aparência de vesícula (SILVA; OLIVEIRA; LIMA, 1996; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; COATES; GALANTE; BOLD, 2010). Quanto à apoptose, DS 01 e LCD+ não apresentaram resultados significativos.

A necrose é tradicionalmente descrita como um processo passivo de morte celular. É o resultado final de uma catástrofe bioenergética resultante da depleção de ATP em um nível incompatível de sobrevivência celular. Morfológicamente, a necrose é bastante diferente da apoptose. Ocorre a vacuolização do citoplasma, colapso da membrana plasmática e indução da inflamação em torno da célula morta atribuível à liberação de conteúdo celular e moléculas pró-inflamatórias. As células que morrem por necrose frequentemente apresentam

modificações na morfologia nuclear, mas não na condensação da cromatina e fragmentação do DNA (características da apoptose) (EDINGER; THOMPSON, 2004). Conforme a tabela 12, a DS 01 livre provocou necrose em um número significativo de células com relação ao controle negativo ($p < 0,05$). A encapsulação deste peptídeo reduziu significativamente a contagem de necrose em linfócitos sanguíneos humanos.

A figura 7 apresenta uma representação esquemática simplificada dos processos de apoptose e necrose.

Figura 7. Representação esquemática simplificada dos processos de apoptose e necrose.



Fonte: GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007

O índice de divisão nuclear (IDN) é sempre calculado segundo Eastmond & Tucker (1989). Quinhentas células viáveis são escolhidas para determinar a frequência de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos, e o cálculo é feito com a seguinte fórmula: $IDN = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / NT$, em que M1 – M4 representam o número de células viáveis contendo de 1 a 4 núcleos e NT, o número total de células viáveis. De acordo com Fenech (2000), o IDN é um parâmetro útil para comparar a resposta mitogênica de linfócitos e efeitos citostáticos de substâncias. DS 01 e LCD+ não apresentaram valores significativos de IDN, ou seja, o peptídeo livre e encapsulado não foram mutagênicos quanto à presença de micronúcleos em células binucleadas.

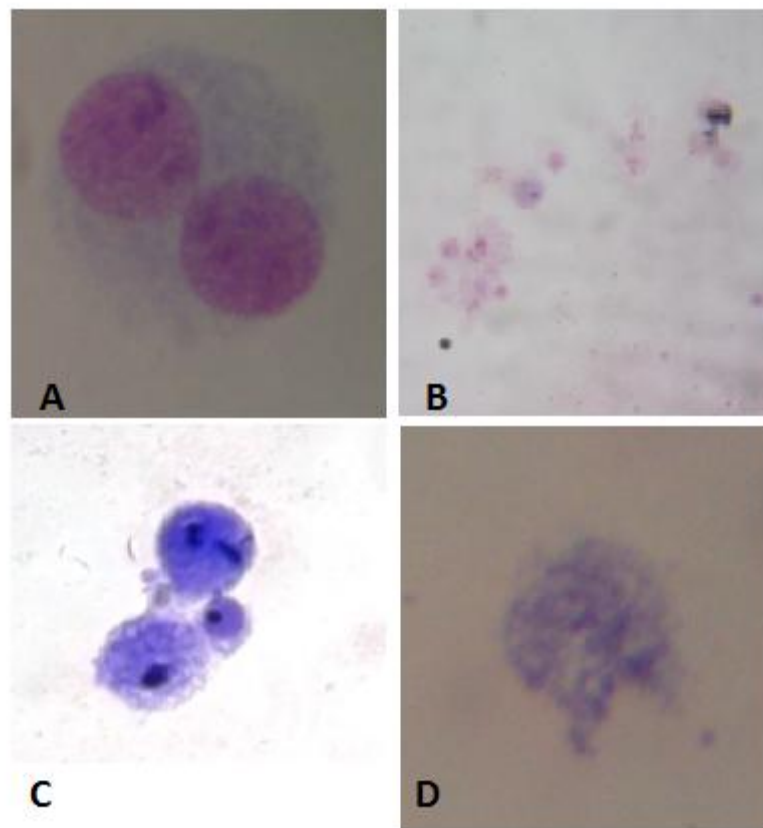
Uma avaliação mais precisa do estado de divisão nuclear é obtido pela inclusão das células necróticas e apoptóticas no número total de células marcadas (500), já que na mais alta dose das substâncias testadas, pode ser esperada uma grande proporção de células não-viáveis. Assim, realiza-se uma modificação na equação do IDN, incluindo também células necróticas e apoptóticas:

$$\text{IDNC} = [\text{Apop} + \text{Necrot} + \text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})] / \text{NTC}$$

IDNC é o índice de divisão nuclear com citotoxicidade; Apop, número de células apoptóticas; Necrot, número de células necróticas; M1 – M4, número de células viáveis contendo de 1 a 4 núcleos; e NTC, número total de células (viáveis e não-viáveis) (FENECH, 2000). Segundo a tabela 12, as amostras estudadas não apresentaram valor significativo de IDNC.

A figura 8 apresenta a microscopia óptica de células binucleadas e dos efeitos mutagênicos e citotóxicos de DS 01 50 µg/mL, LCD+ ou Paraquat em linfócitos sanguíneos humanos.

Figura 8. Microscopia óptica (1000x) de células binucleadas e dos efeitos mutagênicos e citotóxicos de DS 01, LCD+ ou Paraquat em linfócitos sanguíneos humanos: (A) células binucleadas, (B) células em apoptose, (C) células binucleadas com micronúcleos, (D) células em necrose.



Ensaio CBMN com lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01 (LFD+) estão sendo realizados.

5.4. Conclusão

A dermaseptina 01 (DS 01), um peptídeo antimicrobiano extraído da pele de rãs, apresentou toxicidade e citotoxicidade significativa em células de *A. cepa*, na concentração de 50 µg/mL. Nesta mesma concentração, o peptídeo provavelmente não provocou efeitos mutagênicos significativos. Concentrações menores (25 e 12,5 µg/mL) não foram genotóxicas. Em linfócitos sanguíneos humanos, a genotoxicidade do peptídeo livre (50 µg/mL) e encapsulado em lipossomas catiônicos foi avaliada pelo ensaio CBMN. A encapsulação diminuiu os riscos de efeitos citotóxicos e mutagênicos da DS 01, com redução do número de células binucleadas com micronúcleos e redução significativa de células necróticas. As duas amostras não promoveram apoptose celular. Ensaio CBMN com lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01 (LFD+) estão sendo realizados.

Referências

- AKINBORO, A.; BAKARE, A.A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 112, p. 470-475, 2007.
- AMICHE, M.; LADRAM, A.; NICOLAS, P. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. **Peptides**. v. 29, p. 2074-2082, 2008.
- ASKIN, C.T.; ASLANTURK, O.S. Cytotoxic and genotóxica effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. **Biologia**. v. 62, p. 292-296, 2007.
- BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micro-nucleus frequency in

peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**. v. 28, p. 625-631, 2007.

CAVALCANTI, B.C.; SOMBRA, C.M.L.; DE OLIVEIRA, J.H.H.L.; BERLINCK, R.G.S.; DE MORAES, M.O.; PESSOA, C. Cytotoxicity and genotoxicity of ingenamine C isolated from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 147, p. 409-415, 2008.

CHEQUER, F.M.D. **Utilização do teste de micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13**. 2008. 124f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Orientadora: Danielle Palma de Oliveira.

COATES, J.M.; GALANTE, J.M.; BOLD, R.J. Cancer therapy beyond apoptosis: autophagy and anoikis as mechanisms of cell death. **Journal of Surgical Research**. v. 164, p. 301-308, 2010.

CONLON, J.M.; WOODHAMS, D.C.; RAZA, H.; COQUET, L.; LEPRINCE, J.; JOUENNE, T.; VAUDRY, H.; ROLLINS-SMITH, L.A. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). **Toxicol.** v. 50, p. 498-506, 2007.

EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 13, p. 34-43, 1989.

EDINGER, A.L.; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 16, p. 663-669, 2004.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**. v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**. v. 600, p. 58-66, 2006.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide.. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 88, p. 252-259, 2007.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. v. 102, p. 99-112, 1985.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53, p. 335-343, 2007.

HOSHINA, M.M.; MARIN-MORALES, M.A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 72, p. 2090-2095, 2009.

KOVALCHUK, O.; KOVALCHUK, I.; ARKHIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B.; KOVALCHUK, L. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research** v.415, p.47–57, 1998.

LAUGHINGHOUSE IV, H.D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M.E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V.D.; FIORE, M.F.; TEDESCO, S.B. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**. v. 432, p. 180-188, 2012.

LEITE, J.R.S.A.; BRAND, G.D.; SILVA, L.P.; KUCKELHAUS, S.A.S.; BENTO, W.R.C.; ARAÚJO, A.L.T.; MARTINS, G.R.; LAZZARI, A.M.; BLOCH JÚNIOR, C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 151, p. 336-343, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**. v. 682, p. 71-81, 2009.

LEME, D.M.; DE ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**. v. 88, p. 214-219, 2008.

LUBINI, G.; FACHINETTO, J.M.; LAUGHINGHOUSE IV, H.D.; PARANHOS, J.T.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**. v. 63, p. 647-651, 2008.

MAINWARING, G.; LIM, F.L.; ANTROBUS, K.; SWAIN, C.; CLAPP, M.; KIMBER, I.; ORPHANIDES, G.; MOGGS, J.G. Identification of early molecular pathways affected by paraquat in rat lung. **Toxicology**. v. 225, p. 157-172, 2006.

SILVA, C.P.; OLIVEIRA, C.R.; LIMA, M.C.P. Apoptosis as a mechanism of cell death induced by different chemotherapeutic drugs in human leukemic T-lymphocytes. **Biochemical Pharmacology**. v. 51, p. 1331-1340, 1996.

SNYDER, R.D.; GREEN, J.W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**. v. 488, p. 151-169, 2001.

THYBAUD, V.; AARDEMA, M.; CLEMENTS, J.; DEARFIELD, K.; GALLOWAY, S.; HAYASHI, M.; JACOBSON-KRAM, D.; KIRKLAND, D.; MACGREGOR, J.T.; MARZIN, D.; OHYAMA, W.; SCHULER, M.; SUZUKI, H.; ZEIGER, E. Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing. **Mutation Research**. v. 627, p. 41-58, 2007.

TSAI, J.; LEE, R.; WANG, C.; FANG, T.; HSU, B. A clinical study of prognosis and glucocorticoid pulse treatment in patients with acute paraquat intoxication. **Tzu Chi Medical Journal**. v. 21, p. 156 – 160, 2009.

Referências

ANDRADE, C.A.; CORREIA, S.M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 278, p. 435-445, 2004.

BATISTA, C.M.; DE CARVALHO, C.M.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 43, p. 167-179, 2007.

BATISTA, C.V.F.; DA SILVA, R.; SEBBEN, A.; SCALONI, A.; FERRARA, L.; PAIVA, G.R.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L.D.; BLOCH JÚNIOR, C. Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distinct*. **Peptides**. v. 20, p. 679-686, 1999.

BISHT, G.S.; RAWAT, D.S.; KUMAR, A.; PASHA, S. Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 17, p. 4343-4346, 2007.

CORDELL, G.A. Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. **Phytochemistry**. v. 55, p. 463-480, 2000.

ENRIQUEZ, G. V. **A trajetoria de tecnologias dos produtos naturais biotecnológicos derivados na Amazonia**. Belém. p. 168, 2001.

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.M.B.; PAGOTTO, C.L.A.C.; ZOCHER, D.H.T. Biodiversity: the Brazilian interdisciplinary approach. **Ciências & Saúde Coletiva**. v. 3, p. 97-102, 1998.

MATTOS, F.F.; IRVING, M.A. Delta do Parnaíba nos rumos do ecoturismo: um olhar a partir da comunidade local. **Caderno Virtual de Turismo**. v. 3, p. 23-35, 2003.

PIMENTEL, L.F.; JÁCOME JÚNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, V.C.; SANTOSMAGALHÃES, N.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 503-514, 2007.

PINI, A.; GIULIANI, A.; FALCIANI, C.; RUNCI, Y.; RICCI, C.; LELLI, B.; MALOSSI, M.; NERI, P.; ROSSOLINI, G.M.; BRACCI, L. Antimicrobial activity of novel dendrimeric peptides obtained by phage display selection and rational modification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, p. 2665-2672, 2005.

PRATES, M.V.; BLOCH JÚNIOR, C. Peptídeos antimicrobianos – Uma alternativa no combate a microorganismos resistentes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v. 17, p. 30-36, 2000.

REDDY, K.V.R.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 24, p. 536-547, 2004.

RINALDI, A.C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario. **Commentary**. p. 799-804, 2002.

ROTEM, S.; MOR, A. Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1788, p. 1582-1592, 2008.

SALAY, L.C.; NOBRE, T.M.; COLHONE, M.C.; ZANIQUELLI, M.E.D.; CIANCAGLINI, P.; STABELI, R.G.; LEITE, J.R.S.A.; ZUCOLOTTO, V. Dermaseptin 01 as antimicrobial peptide with rich biotechnological potential: study of peptide interaction with membranes containing *Leishmania amazonensis* lipid-rich extract and membrane models. **Journal of Peptide Science**. v. 17, p. 700-707, 2011.

TAKAKI, E.Y.; MODESTO JR, M.S.; FIGUEIREDO, L.H.M. Intellectual property protection and brazilian biodiversity market analysis. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 48, p. 143-159, 2007.

ZAMPA, M.F.; ARAÚJO, I.M.S.; COSTA, V.; COSTA, C.H.N.; SANTOS JR, J.R.S.; ZUCOLOTTO, V.; EIRAS, C.; LEITE, J.R.A.L. Leishmanicidal activity and immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 5, p. 352-358, 2009.

Apêndices



Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

SINPOSPq

V Simpósio Internacional de Pós-Graduação e Pesquisa

Certificate

We hereby certify that

José Jauro Lopes Anchiêta Júnior

presented the poster entitled **"Nanoencapsulation a derivative isolated from frog secretion mucocutaneous (Dermaseptin 01) for potential pharmacological use"**

José Jauro Lopes Anchiêta Júnior; Handerson Rodrigues Silva Lima, Isabella Macário Ferro Cavalcanti; José Roberto de Souza de Almeida Leite; Nereide Stela Santos Magalhães; Hercília Maria Lins Rolim Santos

during the poster session of the 5th International Symposium of Post Graduation and Research (V SINPOSPq), held on September 12-14th, 2012 in Ribeirão Preto, Brazil.

Ribeirão Preto, September 14th, 2012.



FCFRP Director
Sérgio de Albuquerque Ph.D.



V SINPOSPq
Organizing Committee



**WORKSHOP
DE
PROJETOS &
DISSERTAÇÕES**



Certificado

Certificamos que José Jauro Lopes Anchiêta Júnior, Handerson Rodrigues Silva Lima, Gardênia Carmen Gadelha Militão, Nereide Stela Santos Magalhães e Hercília Maria Lins Rolim Santos participaram do 1º Workshop de Projetos e Dissertações, realizado no período de 30 e 31 de Outubro de 2012, na Universidade Federal do Piauí, na cidade de Teresina - PI, na qualidade de AUTOR(S) do trabalho: **Nanoencapsulação de um peptídeo isolado da secreção cutânea de rãs: citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas na categoria de APRESENTAÇÃO ORAL.**

Teresina, 31 de Outubro de 2012.

Cleide Maria da Silva Leite
Cleide Maria da Silva Leite
Coordenadora Geral

Rivelilson Mendes de Freitas
Rivelilson Mendes de Freitas
Coordenador Científico

Livio César Cunha Nunes
Livio César Cunha Nunes
Vice Coordenador Científico



Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado:

GENOTOXICITY OF A PEPTIDE ISOLATED FROM FROGS SKIN IN ALLIUM CEPA

JOSÉ JAURO LOPES ANCHIÊTA JÚNIOR, HANDERSON RODRIGUES SILVA LIMA, ALISSON FERREIRA DANTAS, JOSÉ ROBERTO DE SOUZA DE ALMEIDA LEITE, ANA AMÉLIA DE CARVALHO MELO CAVALCANTE, HERCÍLIA MARIA LINS ROLIM SANTOS

Foi apresentado durante a XI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq e 4th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, realizada em Recife, Pernambuco, no período de 5 a 7 de dezembro de 2012

Recife, 7 de dezembro de 2012

Vera Lucia de Lima
Profa. Dra. Vera Lucia de Menezes Lima
 Presidente da Comissão Organizadora

[Assinatura]
Prof. Dr. Moacir Wagner
 Presidente da SBBq

SBBq Sociedade Brasileira de Bioquímica e
 Biologia Molecular - SBBq