

POTENCIALIZAÇÃO DA AÇÃO ANTICANCERIGENA DE DERMASEPTINAS INCORPORADAS EM NANOSSISTEMAS FARMACÊUTICOS: UMA REVISÃO

JOSÉ JAURO LOPES ANCHIÊTA JÚNIOR¹
THAIS CRUZ RAMALHO²
HERCÍLIA MARIA LINS ROLIM³

RESUMO

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. Além de servirem como um sistema de entrega de fármacos, muitos demonstraram vantagens promissoras quando comparados com medicamentos convencionais, como aumentar a biodisponibilidade oral, superar a resistência a fármacos e ainda aumentar a adesão do paciente ao tratamento. Sistemas nanotecnológicos de carreamento bastante conhecidos, por exemplo, as vesículas lipossomais são vesículas formadas através da auto-organização de fosfolipídeos 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 anticâncer convencional. As nanopartículas são sistemas nanovesiculares que variam de 1 a 100nm com núcleo onde o fármaco líquido, sólido ou semi-sólido é confinado rodeado por uma membrana de polímero. Essa estrutura pode ser hidrofílica ou lipofílica dependendo dos compostos e método empregado. Outros sistemas nanoestruturados são utilizados para sistemas de carreamento ou incorporação de fármacos. Substâncias citotóxicas e fármacos antineoplásicos exibem um potencial de 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 peptídeos, as dermaseptinas (DS), estudos preliminares com as DS demonstraram citotoxicidade seletiva para microorganismos e em especial a dermaseptina 01 (DS01), e que também mostrou ausência de toxicidade para hemácias e glóbulos brancos de mamíferos. Dessa forma, algumas DS podem exibir uma atividade citotóxica seletiva para células cancerosas, e ainda serem protegidos pela incorporação em nanocarreadores farmacêuticos e protegidos contra a inativação enzimática sanguínea, à qual peptídeos são naturalmente suscetíveis.

Palavras-chave: Dermaseptinas. Antineoplásicos. Nanotecnologia farmacêutica.

¹ Mestre em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Nanossistemas Farmacêuticos – NANOSFAR – Universidade Federal do Piauí, Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI.

² Graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI. Email: thaiscramalho@gmail.com

³ Docente/Pesquisadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e Laboratório de Nanossistemas Farmacêuticos – NANOSFAR – Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI. Email: hercilia.rolim@gmail.com

1. Nanotecnologia Farmacêutica

A nanotecnologia farmacêutica é a área da Farmácia envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos desses sistemas compreende o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos. Uma das importantes áreas da nanotecnologia é a nanomedicina, intervenção médica altamente específica em escala molecular para o diagnóstico, prevenção e tratamento das doenças (SBALQUEIRO et al., 2018)

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 devem-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.

Lipossomas são exemplos de nanotecnologia constituída vesículas esféricas, formadas por estruturas lipídicas esféricas microscópicas que formam camadas envolvendo um espaço aquoso no interior. 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 (LAOUINI et al., 2012; CHAUDHURY et al., 2012).

Uma vantagem dos lipossomas em relação a 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 (SINGH et al., 2014).

Outras vantagens da utilização de lipossomas para a liberação de fármacos (RODRIGUES et al., 2016):

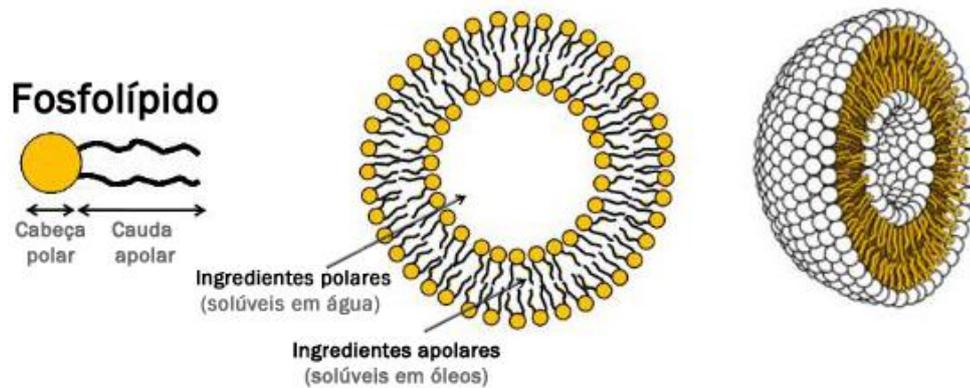
- Ligação mais ávida às células-alvo;
- Baixa toxicidade e não imunógenos;
- Protegem produtos lábeis biologicamente ativos, como peptídeos, contra à inativação pelo organismo;
- Podem permitir a liberação de medicamentos em compartimentos intracelulares.

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 esfingomielina, 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 (ZORZI et al., 2016).

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 (LAOUINI et al., 2012). A figura 1 representa o direcionamento da encapsulação de moléculas em lipossomas multilamelares.

Figura 1. Estrutura dos lipossomas



Fonte: ZEINELDIN et al., 2006.

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 fosfolípeos 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, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e ácido fosfático, 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. (ZORZI, 2016).

No caso de vesículas multilamelares (*multilamellar vesicles* - MLVs), a formação pode ocorrer 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 (vesículas unilamelares grandes, *large unilamellar vesicles* - LUVs) ou sonicação (vesículas unilamelares pequenas, *small unilamellar vesicles* - SUVs). As etapas semelhantes para os métodos de preparação são: dissolução dos fosfolípidios em solvente orgânico, evaporação deste solvente, dispersão dos fosfolípidios 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; FERREIRA et al., 2005).

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 (HOSSEINI et al., 2013).

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 (BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007).

As nanopartículas são sistemas nanovesiculares que variam de 1 a 100nm com núcleo onde o fármaco líquido, sólido ou semi-sólido é confinado rodeado por uma

membrana de polímero. Essa estrutura pode ser hidrofílica ou lipofílica dependendo dos compostos e método empregado. No entanto, o prefixo "nano" é comumente usado para partículas que possuem tamanho de até várias centenas de nanômetros (RODRIGUEZ et al., 2016). Existem vários métodos de preparação de nanopartículas poliméricas, sendo os principais: a polimerização *in situ*, polimerização interfacial, deposição interfacial de polímero, nanoprecipitação, *salting out*, emulsificação-difusão, emulsificação-evaporação de solvente e coacervação complexa (CODEVILLA et al., 2015).

A utilização de nanocarreadores em oncologia vem ganhando espaço rapidamente, com vários produtos no mercado apresentado diferentes estratégias de liberação de fármacos. São diversos os nanomateriais projetados para terapia de câncer como as micelas, lipossomas, dendrímeros, nanopartículas inorgânicas, nanopartículas de carbono e nanotubos, nanoemulsões, nanocarreadores virais, poliméricos ou nanopartículas peptídicas e de DNA e nanopartículas de lipídeos sólidas. Os nanomedicamentos podem ser utilizados como terapias contra o câncer ou funcionar como adjuvantes como parte de uma terapia combinatória (CHOW et al., 2011; SAWANT; DODIYA, 2008).

2. Terapêutica do câncer

O câncer é um grande problema de saúde pública com mortalidade, 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 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

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; INCA, 2017).

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).

Lipossomas têm sido utilizados também como sistemas de carreamento intratumoral direto de medicamentos utilizados na terapia do câncer, com vantagens significativas como uma maior retenção local do fármaco e evasão às barreiras fisiológicas como a alta pressão intersticial presente na maioria dos tumores (JACK HU; ZHANG, 2012).

3. Dermaseptinas: peptídeos obtidos da secreção de anuros da espécie *Phyllomedusa hypochondrialis*

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. Além disso, os peptídeos antimicrobianos atuam como componentes importantes da imunidade inata de diversos organismos, protegendo o hospedeiro contra infecções (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008; LEWIES et al., 2015).

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* são o mais diversos do gênero, possuindo 11 espécies descritas, dentre elas: *P. hypochondrialis* Daudin (Figura 2), *P. oreades* Brandão, *P. azurea* Cope, *P. nordestina* sp.nov. e *P. ayeaye* B. Lutz (ÁLVARES, 2008; HUANG et al., 2017).

Figura 2. *Phyllomedusa hypochondrialis* Daudin (1801).



Fonte: Adaptado de <http://amphibiaweb.org>, AMOROS. Acesso em 12.10.2018.

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): GLWSTIKQKGKEAAIAAKAA-GQAALGAL – NH₂ e massa molecular de 2793,39 Da. Possui carga global total (número de aminoácidos positivos e negativos), + 4; ponto isoelétrico 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 anfifílicas. 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).

O mecanismo de ação das dermaseptinas 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 uma estrutura mais rígida, são mais ordenados em solução aquosa e não sofrem mudança conformacional drástica após a interação com membrana biológica (SHAI, 1999; MAHLAPUU et al., 2016).

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 controles (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 (MRSA) 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).

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 *Swiss*, 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).

A Dermaseptina-PH quimicamente sintética foi investigada usando uma série de ensaios de avaliação de bioatividade para avaliar as atividades biológicas e citotoxicidade. Dermaseptina-PH mostrou um amplo espectro de atividades anticâncer contra várias linhagens celulares de câncer, incluindo MCF-7, H157, U251MG, MDA-MB-435S e PC-3. As potentes atividades antimicrobiana e anticancerígena da Dermaseptina-PH tornam-na uma candidata promissora na descoberta de novas drogas para aplicações clínicas (HUANG et al., 2017).

4. Potencial anticancerígeno de dermaseptinas incorporadas em nanossistemas farmacêuticos.

O recente interesse em peptídeos antimicrobianos como materiais ativos em bionanoestruturados é devido às propriedades mostradas por estas moléculas biológicas, tais como a presença de uma estrutura α -hélice e distribuição de cargas positivas ao longo da cadeia. No estudo de Zampa et al. (2009), DS 01 da secreção cutânea de rãs *P. hypochondrialis* foi imobilizado em filmes nanoestruturados em camadas com ftalocianinas tetrassulfonadas de níquel. A atividade leishmanicida do DS 01 foi confirmada por meio de ensaios cinéticos, nos quais o DS 01 promoveu a

morte de todas as células promastigotas metacíclicas em 45 minutos. Surpreendentemente, as moléculas DS 01 imobilizadas exibiram eletroatividade, como revelado por experimentos eletroquímicos, nos quais um pico de oxidação de cerca de 0,61 V foi observado para uma monocamada DS 01 depositada no topo de um eletrodo condutor. Essa eletroatividade foi utilizada para investigar as habilidades sensoriais dos filmes nanoestruturados em direção à *Leishmania*. Observou-se um aumento na corrente de oxidação em função do número de células de *Leishmania* na solução eletrolítica em concentrações abaixo de 10³ células/mL. Este último é indicativo de que o uso de peptídeos antimicrobianos imobilizados em filmes nanoestruturados eletroativos pode ser de interesse para aplicações na indústria farmacêutica e diagnóstico.

Outro trabalho teve como objetivo capturar e caracterizar a morfologia e os efeitos antitumorais de um peptídeo dermaseptina (DStomo01) em nanopartículas de quitosana, *in vitro*. As nanopartículas de DStomo01 apresentaram polidispersividade moderada, excelente estabilidade coloidal e liberação lenta. Notou-se que o DStomo01 livre induziu fragmentação de DNA e hiperpolarização mitocondrial em células HeLa. No entanto, quando aprisionado em nanopartículas de quitosana, DStomo01 foi ligeiramente mais ativo contra células HeLa do que o peptídeo livre. Em conclusão, o sistema de liberação sustentada foi eficiente em encapsular o peptídeo e reduzir a viabilidade das células tumorais, que são passos promissores para futuros estudos envolvendo o direcionamento específico de nanopartículas e tratamentos *in vivo* (MEDEIROS, JOANITTI, SILVA, 2013).

No estudo de Anchiêta Júnior et al. (2014), foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* da DS 01 isolada e encapsulada em vários tipos de lipossomas unilamelares pequenos (SUVs) em células tumorais humanas. A citotoxicidade em células tumorais de pulmão, a DS 01 livre apresentou efeito citostático médio de 35,6%, e de aproximadamente 50% nas células do cólon e da laringe. A encapsulação em lipossomas catiônicos potencializou o efeito; os lipossomas convencionais inibiram o efeito na faixa de 80% e os furtivos, mais que 95% para as duas linhagens celulares, provando que a DS 01, um peptídeo catiônico antimicrobiano, apresentou efeito citotóxico *in vitro* para células tumorais humanas que foi potencializado com a nanoencapsulação.

Tendo em vista que, os peptídeos obtidos de anuros em especial a dermaseptina DS01 tem comprovado potencial antineoplásico quando estudados na

sua forma isolada e os poucos artigos publicados com a incorporação dessas dermaseptinas em nanocarreadores farmacêuticos obtendo resultados promissores com a potencialização da ação anticancerígena deste peptídeo bioativos. Desta forma, a nanoencapsulação de dermaseptinas obtidas de *Phyllomedusa hypochondrialis* em nanossistemas farmacêuticos é uma área ainda não bem explorada, mas que desponta com grande potencial para o futuros testes in vivo e desenvolvimento de medicamentos direcionados a terapêutica contra o câncer.

5. Conclusão

Dermaseptinas isoladas da pele de rãs da espécie *Phyllomedusa hypochodrialis*, em especial a DS01 é caracterizada por ser um peptídeo com atividades antibacteriana e antiparasitária comprovadas, com citotoxicidade seletiva para microorganismos e ausência de toxicidade para hemácias e glóbulos brancos de mamíferos.

A atividade citotóxica seletiva para células neoplásicas *in vitro* fez deste peptídeo uma interessante molécula para ser incorporado em sistemas nanoestruturados farmacêuticos, afim de protegê-lo contra a inativação enzimática sanguínea, à qual peptídeos são naturalmente suscetíveis.

Apesar de poucos artigos terem sido publicados nesta temática, estes mostram que a encapsulação deste peptídeo potencializou suas propriedades anticancerígenas sendo, portanto de enorme potencial para continuidade das pesquisas direcionadas a terapêutica anticâncer.

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, Distrito Federal, 2008.
- AMOROS, C.L.B. ***Phyllomedusa hypochondrialis***. Disponível em: <http://amphibiaweb.org>. Acesso em 12.10.2018.
- ANCHIÊTA JÚNIOR, J.J. et al. Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de anuros: citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 35, n. 1, p.119-125, 2014.
- BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**, v. 12, p. 620-636, 2011.
- BRAND, G.B. **Estratégias para prospecção e predição de peptídeos bioativos**. 2007. Tese. 217 f. Tese (Pós-Graduação em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2007.
- BRAND, G.D. et al. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 347, n. 3, p. 739-746, 2006.
- BRAND, G.D. et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distinct* anti – *Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49332-49340, 2002.
- CHAUDHURY, A. et al. Lyophilization of cholesterol-free PEGylated liposomes and its impact on drug loading by passive equilibration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 2, p. 167-175, 2012.
- CHOW, E. K. et al. Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 73, p. 1-20, 2011.
- CODEVILLA, C.F. et al. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 142-151, 2015.
- FERREIRA, H. et al. Utilização de modelos membranares na avaliação da atividade de fármacos. **Química**, v. 99, p. 39–51, 2005.
- HOSKIN, D.W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, n. 2, p. 357-375, 2008.
- HOSSEINI, S. F.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAVI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50– 56, 2013.

HUANG, L. et al., Dermaseptin-PH: A Novel Peptide with Antimicrobial and Anticancer Activities from the Skin Secretion of the South American Orange-Legged Leaf Frog, *Pithecopus(Phyllomedusa) hypochondrialis*. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1805, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Tipos de câncer**. Rio de Janeiro, 2017b. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home>. Acesso em: 21 out. 2018.

JACK HU, C.; ZHANG, L. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 8, 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, n. 3, p. 225-232, 1990.

LAOUINI, A. et al. Preparation, characterization and applications of liposomes: State of the art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 1, p.147–168, 2012.

LASIC, D. D. Liposomes. **American scientist**, v. 80, n. 1, p. 20-30, 1992.

LEITE, J.R.S.A. et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 151, n. 3, p. 336-343, 2008.

LEWIES, A. et al. The Potential Use of Natural and Structural Analogues of Antimicrobial Peptides in the Fight against Neglected Tropical Diseases. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 15392-15433.

MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 6, p. 194-206, 2016.

MEDEIROS, K. A.; JOANITTI, G.; SILVA, L. P. Chitosan nanoparticles for dermaseptin peptide delivery toward tumor cells in vitro. **Anti-cancer Drugs**, v. 25, n.3, p. 323-331, 2013.

PIMENTEL, L.F. et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.4, p. 503-514, 2007.

RODRIGUES, L.; MARTÍN, M.A.; RUIZ, M.A.; CLARES, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p.41–59, 2016.

SAWANT, K. K.; DODIYA, S.S. Recent advances and patents on solid lipid nanoparticles. **Recent Patent Drug Delivery Formulation**, v. 2, n. 2, p. 120-135, 2008.

SBALQUEIRO, G.R. et al. Uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de fármacos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n. 10, p. 505-517, 2018.

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, n. 2, p. 55-70, 1999.

SIEGEL R.L.; MILLER K.D.; JEMAL A. Cancer statistics, 2017. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 322-342, 2017.

SINGH, M. N.; HEMANT, K. S. Y.; RAM, M.; SHIVAKUMAR, H. G. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p.65–77, 2014.

WANG, X. et al. 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, n. 24, p. 5673-5687, 2011.

ZAMPA, M.F. et al. 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.

ZEINELDIN, R. et al. Using bicellar mixtures to form supported and suspended lipid bilayers on silicon chips. **Langmuir**, v. 22, p. 8163-8168, 2006.

ZORZI, G.K. et al. Biomateriais para formulações de base nanotecnológica visando terapia genética ocular. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 74-84, 2017.