

# Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços  
e Possibilidades

Manuel Simões  
(organizador)

VOL V

 EDITORA  
ARTEMIS  
2025

# Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços  
e Possibilidades

Manuel Simões  
(organizador)

VOL V

 EDITORA  
ARTEMIS  
2025



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

<b>Editora Chefe</b>	Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira
<b>Editora Executiva</b>	M. <sup>a</sup> Viviane Carvalho Mocellin
<b>Direção de Arte</b>	M. <sup>a</sup> Bruna Bejarano
<b>Diagramação</b>	Elisangela Abreu
<b>Organizador</b>	Prof. Dr. Manuel Simões
<b>Imagem da Capa</b>	Vivilweb/123RF
<b>Bibliotecário</b>	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

#### Conselho Editorial

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”*, Cuba  
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, *Universidade Federal de Uberlândia*, Brasil  
Prof. Dr. Agustín Olmos Cruz, *Universidad Autónoma del Estado de México*, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amanda Ramalho de Freitas Brito, *Universidade Federal da Paraíba*, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Júlia Viamonte, *Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP)*, Portugal  
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano*, Peru  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Ester Mallmann Centenaro, *Universidade do Estado de Mato Grosso*, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla*, Espanha  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Pimentel, *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Catarina Castro, *Universidade Nova de Lisboa*, Portugal  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cirila Cervera Delgado, *Universidad de Guanajuato*, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Neves, *Universidade Aberta de Portugal*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Padovesi Fonseca, *Universidade de Brasília-DF*, Brasil  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, *Universidade Federal da Grande Dourados*, Brasil  
Dr. Cristo Ernesto Yáñez León – *New Jersey Institute of Technology*, Newark, NJ, Estados Unidos  
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid*, Espanha  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Deuzimar Costa Serra, *Universidade Estadual do Maranhão*, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dina Maria Martins Ferreira, *Universidade Estadual do Ceará*, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edith Luévano-Hipólito, *Universidad Autónoma de Nuevo León*, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, *Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro*, Portugal  
Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, *Universidade de São Paulo (USP)*, Brasil  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, *Universidade Federal de Roraima*, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Emilas Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste/ Universidad Tecnológica Nacional*, Argentina

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca*, Espanha  
 Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República*, Uruguay  
 Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara*, México  
 Prof. Dr. Fernando Hitt, *Université du Québec à Montréal*, Canadá  
 Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona*, Espanha  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gabriela Gonçalves, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Galina Gumovskaya – Higher School of Economics, Moscow, Russia  
 Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis*, Argentina  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina  
 Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, Instituto Politécnico da Guarda, Portugal  
 Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca*, Argentina  
 Prof. Dr. Guillermo Julián González-Pérez, *Universidad de Guadalajara*, México  
 Prof. Dr. Håkan Karlsson, *University of Gothenburg*, Suécia  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iara Lúcia Tescarollo Dias, Universidade São Francisco, Brasil  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura*, Peru  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina  
 Prof. Dr. Ivan Amaro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil  
 Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bío-Bío*, Chile  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivânia Maria Carneiro Vieira, Universidade Federal do Amazonas, Brasil  
 Prof. Me. Javier Antonio Albornoz, *University of Miami and Miami Dade College*, Estados Unidos  
 Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha*, Espanha  
 Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, Universidade de Évora, Portugal  
 Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, Unifimes - Centro Universitário de Mineiros, Brasil  
 Prof. Dr. Jorge Ernesto Bartolucci, *Universidad Nacional Autónoma de México*, México  
 Prof. Dr. José Cortez Godínez, Universidad Autónoma de Baja California, México  
 Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Díaz, Instituto Politécnico Nacional, México  
 Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid*, Espanha  
 Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín*, Colômbia  
 Prof. Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez, *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, México  
 Prof. Dr. Juan Porras Pulido, *Universidad Nacional Autónoma de México*, México  
 Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil  
 Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Livia do Carmo, Universidade Federal de Goiás, Brasil  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciane Spanhol Bordignon, Universidade de Passo Fundo, Brasil  
 Prof. Dr. Luis Fernando González Beltrán, *Universidad Nacional Autónoma de México*, México  
 Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide*, Espanha  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide*, Espanha  
 Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodríguez, *Universidad Santiago de Compostela*, Espanha  
 Prof. Dr. Manuel Simões, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia de Souza Luz Freitas, Universidade Federal de Itajubá, Brasil  
 Prof. Dr. Marcos Augusto de Lima Nobre, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil  
 Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mar Garrido Román, *Universidad de Granada*, Espanha  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Margarida Márcia Fernandes Lima, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> María Alejandra Arecco, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida José de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Brasil  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Carmen Pastor, *Universitat Jaume I*, Espanha  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Luz Vale Dias – Universidade de Coimbra, Portugal  
 Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria do Céu Caetano, Universidade Nova de Lisboa, Portugal



Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão, Brasil  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> M<sup>ª</sup>Graça Pereira, Universidade do Minho, Portugal  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maria Gracinda Carvalho Teixeira, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> María Guadalupe Vega-López, *Universidad de Guadalajara, México*  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maria Lúcia Pato, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana, Cuba*  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maurícea Silva de Paula Vieira, Universidade Federal de Lavras, Brasil  
 Prof. Dr. Melchor Gómez Pérez, Universidad del Pais Vasco, Espanha  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Ninfa María Rosas-García, Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, México  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Odara Horta Boscolo, Universidade Federal Fluminense, Brasil  
 Prof. Dr. Osbaldo Turpo-Gebera, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Peru*  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Patrícia Vasconcelos Almeida, Universidade Federal de Lavras, Brasil  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Paula Arcoverde Cavalcanti, Universidade do Estado da Bahia, Brasil  
 Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, Universidade Federal do Pará, Brasil  
 Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, Universidade Federal do Piauí, Brasil  
 Prof. Dr. Sergio Bitencourt Araújo Barros, Universidade Federal do Piauí, Brasil  
 Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Silvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Solange Kazumi Sakata, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)- USP, Brasil  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Stanislava Kashtanova, *Saint Petersburg State University, Russia*  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Susana Álvarez Otero – Universidad de Oviedo, Espanha  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Teresa Cardoso, Universidade Aberta de Portugal  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Teresa Monteiro Seixas, Universidade do Porto, Portugal  
 Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, Universidade Federal de Viçosa, Brasil  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Vanessa Bordin Viera, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil  
 Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil  
 Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca, Colômbia*  
 Prof. Dr. Xosé Somoza Medina, *Universidad de León, Espanha*

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

E82      Estudos em biociências e biotecnologia [livro eletrônico] : desafios, avanços e possibilidades V / Organizador Manuel Simões. – Curitiba, PR: Artemis, 2025.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

Edição bilíngue

ISBN 978-65-81701-73-4

DOI 10.37572/EdArt\_081225734

1. Ciências biológicas. 2. Biotecnologia. 3. Biomedicina.  
I. Simões, Manuel.

CDD 574

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**



## PRÓLOGO

O volume V de **Estudos em Biociências e Biotecnologia: Desafios, Avanços e Possibilidades** reúne contribuições que refletem a riqueza, a complexidade e a interdisciplinaridade que caracterizam o campo contemporâneo das biociências. Os oito capítulos que compõem esta edição foram organizados em três eixos amplos, estruturados de forma a destacar conceitos, convergências metodológicas e interfaces entre pesquisa básica, aplicações tecnológicas e a estratégia e ética em ciências da saúde e na investigação.

O **primeiro eixo, Biotecnologia, Bioativos e Ciências Biológicas Aplicadas**, concentra estudos que exploram fenômenos essenciais da vida em níveis molecular, celular e fisiológico. Os capítulos analisam desde interações entre peptídeos e bicamadas lipídicas aplicadas ao desenvolvimento de nanopartículas, até o potencial terapêutico de espécies vegetais amplamente utilizadas em medicina tradicional, nomeadamente a planta *Salvia purpurea*. A ecofisiologia também se faz presente, com investigações sobre o impacto da temperatura no crescimento e metabolismo energético de organismos aquáticos, fundamentais para manejo sustentável e produção controlada. Assim, este bloco articula biotecnologia, bioativos e modelos experimentais, oferecendo uma visão integrada das bases e das possibilidades da investigação biomolecular e biotecnológica.

O **segundo eixo, Biotecnologia Ambiental, Sustentabilidade e Profissões da Saúde**, reúne trabalhos voltados à aplicação direta das biociências na resposta a desafios ambientais e tecnológicos. Os dois capítulos apresentam soluções inovadoras de biorremediação por meio do uso de biomassa vegetal, demonstrando a eficiência de resíduos agroindustriais – como bagaço de cana-de-açúcar e cáscara de amendoim – na remoção de contaminantes tóxicos e recalcitrantes. Tais estudos reforçam a relevância da biotecnologia ambiental para o desenvolvimento sustentável e para a mitigação de impactos da ação antropogênica.

No terceiro eixo, **Dimensões Éticas e Profissionais da Ciência e da Saúde**, destacam-se reflexões sobre a crescente complexidade dos ensaios clínicos e sobre o papel estratégico do coordenador na interface entre pesquisa, ética e regulamentação. Complementa o eixo uma análise aprofundada dos limites, desafios e inovações éticas na prática da enfermagem, ressaltando a centralidade da conduta profissional e da responsabilidade humana no cuidado em saúde. Este eixo se completa com a reflexão sobre o legado científico de Rosalind Franklin, no pioneirismo na cristalografia de raios X, cuja contribuição foi decisiva para a elucidação da estrutura do DNA. O seu trabalho, apesar de não devidamente reconhecido, mudou o curso da biologia molecular, suscitando atualmente debates sobre o reconhecimento, a ética e a equidade na ciência.

Ao articular avanços moleculares, aplicações (bio)tecnológicas, reflexões históricas e práticas profissionais, este volume reafirma a vocação das biociências e da biotecnologia como campos em constante evolução, cuja produção científica dialoga tanto com os fundamentos da vida quanto com os grandes desafios sociais e ambientais do nosso tempo. Esperamos que a leitura inspire novas investigações, fortaleça perspectivas interdisciplinares e contribua para a construção de soluções inovadoras que ampliem as fronteiras do conhecimento e de suas aplicações.

Desejo a todos uma excelente leitura!

Manuel Simões

SUMÁRIO

BIOTECNOLOGIA, BIOATIVOS E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS APLICADAS

**CAPÍTULO 1..... 1**

INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO MELITINA CON BICAPAS LIPÍDICAS: EFECTOS EN LA PERMEABILIDAD Y APLICACIÓN CON NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Azucena González-Horta

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_0812257341](https://doi.org/10.37572/EdArt_0812257341)

**CAPÍTULO 2..... 16**

ETNOFARMACOLOGÍA DE *Salvia purpurea* L.

Gabriela Ávila Villarreal

Brisia Marlen Ortiz Vargas

Guadalupe Yáñez Ibarra

Martha Edith Cancino Marentes

Yoshajandith Aguirre Vidal

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_0812257342](https://doi.org/10.37572/EdArt_0812257342)

**CAPÍTULO 3..... 29**

EFFECT OF TEMPERATURE ON THE GROWTH, BIOMASS PRODUCTION AND ENERGY METABOLISM OF *Poecilia reticulata* (PETERS, 1860)

José Román Latournerié Cervera

Alma Rosa Estrada-Ortega

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_0812257343](https://doi.org/10.37572/EdArt_0812257343)

BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL E SUSTENTABILIDADE

**CAPÍTULO 4..... 36**

REMOCIÓN DE CROMO (VI) EN SOLUCIÓN ACUOSA POR LA BIOMASA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*)

Alejandra C. Hernández Terán

Daniela C. Aranda González

Adriana Rodríguez Pérez

Juan Fernando Cárdenas González

Víctor Manuel Martínez Juárez

Ismael Acosta Rodríguez

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_0812257344](https://doi.org/10.37572/EdArt_0812257344)



**CAPÍTULO 5.....47**

ELIMINACIÓN DE CROMO (VI) DE AGUAS CONTAMINADAS POR LA BIOMASA DE LA CÁSCARA DE CACAHUATE (*Arachys hypogaea*)

Adriana Rodríguez Pérez

Juan Fernando Cárdenas González

Víctor Manuel Martínez Juárez

Dalila del Socorro Contreras Briones

Claudia M. Martínez Rodríguez

Ismael Acosta Rodríguez

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_0812257345](https://doi.org/10.37572/EdArt_0812257345)

**DIMENSÕES ÉTICAS E PROFISSIONAIS DA CIÊNCIA E DA SAÚDE**

**CAPÍTULO 6..... 54**

EL PAPEL ESTRATEGICO DEL COORDINADOR EN LOS ENSAYOS CLÍNICOS

Pilar de la Torre Flórez

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_0812257346](https://doi.org/10.37572/EdArt_0812257346)

**CAPÍTULO 7..... 64**

ÉTICA EM ENFERMAGEM: LIMITES, DESAFIOS E INOVAÇÃO

Isabel Maria Ribeiro Fernandes

Hélène Ferreira Malta

Maria Hermínia Nunes Barbosa

Paula Cristina do Vale Lopes Pissarra

Paulo Jorge Lopes Matos

António Manuel Almeida Tavares Sequeira

Maria João Almeida Nunes

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_0812257347](https://doi.org/10.37572/EdArt_0812257347)

**CAPÍTULO 8.....77**

ROSALIND ELSIE FRANKLIN. UNA CIENTÍFICA RECONOCIDA TARDÍAMENTE

Donají López Torres

Edith Cortés Barberena

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_0812257348](https://doi.org/10.37572/EdArt_0812257348)

**SOBRE O ORGANIZADOR.....92**

**ÍNDICE REMISSIVO ..... 93**

# CAPÍTULO 1

## INTERACCIÓN DEL PÉPTIDO MELITINA CON BICAPAS LIPÍDICAS: EFECTOS EN LA PERMEABILIDAD Y APLICACIÓN CON NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

*Data de submissão: 08/11/2025*

*Data de aceite: 27/11/2025*

**Azucena González-Horta**

Facultad de Ciencias Biológicas  
Laboratorio de Ciencias Genómicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Pedro de Alba s/n Cd. Universitaria  
San Nicolás de los Garza, N.L. 66455  
México

<https://orcid.org/0000-0002-8222-2111>

**RESUMEN:** La encapsulación de ingredientes activos en nanopartículas coloidales tiene un enorme potencial para la administración de compuestos. Recientemente se ha implementado la encapsulación aplicada a activos naturales para brindarles mayor estabilidad y biodisponibilidad. En el presente trabajo se evaluó el efecto que tiene la melitina, un péptido presente en el veneno de las abejas, al ser incorporado en nanopartículas de PLGA sobre bicapas fosfolipídicas ya que, aunque se ha reportado el potencial terapéutico de este péptido, su aplicación es limitada debido a la baja especificidad que presenta y la hemólisis que origina. Los resultados demuestran que al incorporar la melitina de forma tetramérica

en nanopartículas de PLGA se logra reducir el daño a las bicapas fosfolipídicas en un 20%.

**PALABRAS-CLAVE:** encapsulación de ingredientes activos; nanopartículas de PLGA; melitina tetramérica; bicapas fosfolipídicas; estabilidad y biodisponibilidad.

### INTERACTION OF THE MELITTIN PEPTIDE WITH LIPID BILAYERS: EFFECTS ON PERMEABILITY AND APPLICATION WITH POLYMERIC NANOPARTICLES

**ABSTRACT:** The encapsulation of active ingredients in colloidal nanoparticles has enormous potential for the controlled delivery of bioactive compounds. Recently, encapsulation strategies applied to natural bioactives have been implemented to provide greater stability and bioavailability. In this study, we evaluated the effect of melittin—a peptide present in bee venom—when incorporated into PLGA nanoparticles on phospholipid bilayers. Although the therapeutic potential of this peptide has been reported, its clinical application remains limited due to its low specificity and hemolytic activity. Our results show that the incorporation of tetrameric melittin into PLGA nanoparticles reduces damage to phospholipid bilayers by approximately 20%.

**KEYWORDS:** encapsulation of active ingredients; PLGA nanoparticles; tetrameric melittin; phospholipid bilayers; stability and bioavailability.

# 1. INTRODUCCIÓN

La encapsulación de ingredientes activos en nanopartículas coloidales tiene un enorme potencial para la administración de medicamentos en la industria farmacéutica y cosmética. Consiste en atrapar un fármaco / compuesto dentro de un material portador, con el objetivo de mejorar algunas características fisicoquímicas de la sustancia encapsulada mientras se obtiene un suministro del activo más eficiente y controlado. Hasta el momento, se han diseñado y desarrollado diversos sistemas de administración que incluyen liposomas, dendrímeros, polímeros y portadores de fármacos particulados incluyendo nanopartículas poliméricas, nanopartículas sólidas y nanotubos (Tabla1) (Wen *et al*; 2015).

Tabla 1.- Características de los diferentes tipos de nanoportadores utilizados como sistemas de liberación.

Tipos de nanoportadores	Características
<b>Liposomas</b>	Vesículas esféricas compuestas de fosfolípidos y esteroides, aumentan la solubilidad de los medicamentos y mejoran sus propiedades farmacocinéticas, sin embargo, debido a su tamaño pueden activar la respuesta inmune.
<b>Nanotubos de carbono</b>	Partículas con forma cilíndrica nanoestructurada, similar a las láminas enrolladas de anillos de grafeno, son muy dinámicos y se usan potencialmente en el sistema de administración de fármacos, se les ha demostrado alta toxicidad
<b>Micelas</b>	Partículas coloidales que tienen un tamaño ajustable y funcionalidad superficial alta monodispersidad y excelente estabilidad, observándose en ellas citotoxicidad ocasional y necesidad de modificaciones superficiales
<b>Dendrímeros</b>	Estructuras ramificadas de tamaño nanométrico con uniformidad en el tamaño, buena biocompatibilidad y parámetros farmacocinéticos, sin embargo, se ha demostrado que tienen una muy compleja y costosa síntesis
<b>Nanopartículas metálicas</b>	Partículas formadas de material inorgánico con uniformidad en el tamaño, forma y longitud una ajustada farmacocinética y biodistribución, así como mayor área de superficie reportándose en estas elevada toxicidad.
<b>Quantum dots</b>	son nanomateriales inorgánicos, caracterizados como nanocristales semiconductores coloidales, la principal desventaja es que no pueden difundirse a través de las membranas celulares por lo que el proceso de entrega puede ser realmente peligroso
<b>Ciclodextrinas</b>	Son materiales derivados naturales que tienen forma de cono, con caras hidrofílicas primarias y secundaria y una cavidad hidrófoba. Sin embargo, posee baja solubilidad en agua lo que dificulta su aplicación
<b>Polímeros</b>	Las nanopartículas poliméricas se preparan a partir de productos naturales o sintéticos, son biodegradables y biocompatibles y se funcionalizan fácilmente con ligandos, aunque su uso podría ser difícil de escalar ha sido una alternativa preferida

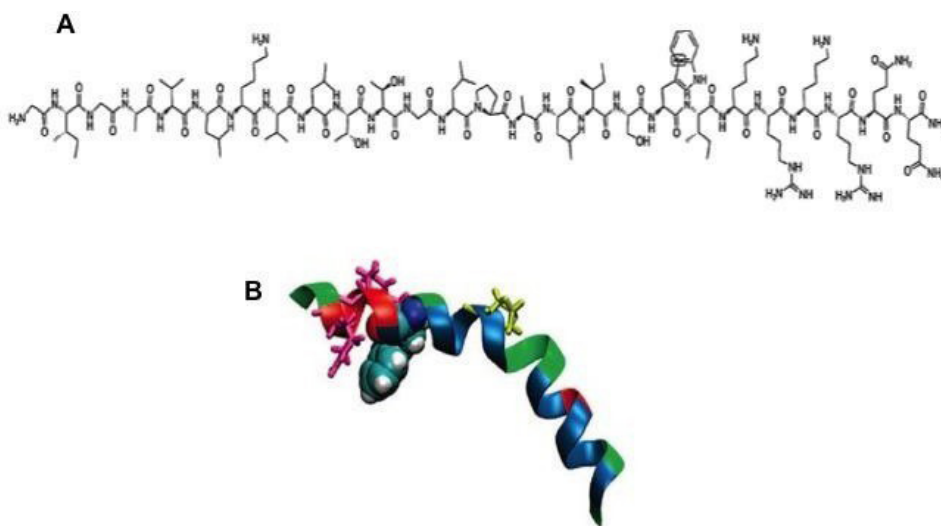
Adaptado de: (Kahraman *et al*; 2017).

El Ácido polilactico-co-glicólico (PLGA) es uno de los nanosistemas biodegradables más exitosamente utilizados para el desarrollo de nanomedicinas porque se somete a hidrólisis en el cuerpo para producir los monómeros de metabolitos biodegradables, ácido láctico y ácido glicólico por lo que existe una toxicidad sistémica mínima asociada con el uso de PLGA para la administración de fármacos o aplicaciones de biomateriales (Reis *et al*; 2006).

La melitina, presente en el veneno de las abejas, consiste principalmente en un péptido de 26 aminoácidos sin puentes disulfuro en el que la parte N-terminal de la molécula (residuos 1-20) es predominantemente hidrófoba, mientras que la C-terminal (residuos 21-26) es hidrófila y muy básica; tiene 2847.5 Da de peso molecular, su secuencia aminoacídica es:

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg- Lys-Arg-Gln-Gln (Terwilliger, Weissman, & Eisenberg, 1982) (Fig 1). La melitina, como otros péptidos y proteínas de unión a membrana, es predominantemente hidrófoba. Sin embargo, el péptido tiene una carga neta de +6 a pH fisiológico, cuatro de los cuales están en un tramo en la región terminal C (Lys-Arg-Lys-Arg) y los dos restantes en la región terminal N, Lys- 7 y el grupo N-terminal (Gly-1).

Figura 1. Estructura de la melitina. (A) Secuencia de aminoácidos (B) Estructura secundaria de la melitina en azul se muestra el triptófano, en amarillo la prolina y en rosa los aminoácidos básicos lisina y arginina.



Aunque la melitina tiene una alta proporción de aminoácidos no polares, es altamente soluble en agua. A baja concentración, la melitina es monomérica y adopta esencialmente una conformación aleatoria en solución acuosa. Sin embargo, se ha

observado que adopta una conformación alfa- helicoidal y se agrega en tetrámeros dependiendo de varios factores como el incremento en la concentración de sal, alta concentración de melitina e incremento en el pH. (Liao *et al.*, 2015) los cuatro monómeros de melitina en el tetrámero tienen una conformación casi idéntica, cada cadena de melitina está compuesta por dos segmentos  $\alpha$ - helicoidales los cuales finalmente toman la forma de una horquilla (Pino, 2018).

Cuando se acumulan varios péptidos de melitina formando agregados tetraméricos en la membrana celular, el empaquetamiento de fosfolípidos es gravemente interrumpido, lo que conduce a la lisis de membranas tanto naturales como sintéticas (Pino, 2018). La melitina desencadena la lisis de una amplia gama de membranas plasmáticas y aunque la melitina es el péptido del veneno de abeja más estudiado es un péptido citolítico con baja especificidad que ataca todo tipo de membranas, lo que ocasiona que su aplicación aún se vea limitada. La melitina es un candidato muy atractivo para la quimioterapia del cáncer porque las células cancerosas son menos propensas a desarrollar resistencia contra las moléculas capaces de formar poros en una membrana. La combinación de un fármaco quimioterapéutico junto con la melitina podría tener un efecto sinérgico reduciendo de este modo la dosis terapéutica requerida de cualquiera de los dos (Pan *et al.*, 2011) aunque la posible aplicación de la melitina como agente quimioterapéutico contra el cáncer ha sido ampliamente reconocida, la rápida degradación del péptido en la sangre y su baja especificidad lítica celular plantean desafíos significantes. Hasta la fecha se ha demostrado que la melitina es tóxica para las células del sistema hematopoyético incluyendo linfocitos y eritrocitos y su toxicidad también se ha observado en células intestinales (Y. J. Lee *et al.*; 2007). Es por ello que en el presente trabajo se abordó el desarrollo de una formulación de nanopartículas de PLGA (ácido poliláctico co-glicólico) que incorpora melitina en su conformación tetramérica, con el fin de disminuir su actividad lítica.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. PREPARACIÓN DE MELITINA TETRAMÉRICA

La melitina tetramérica se preparó colocando 1mg de melitina en 1 mL de buffer Hepes 20mM NaCl 250mM pH 7.4. Para mantener la conformación monomérica, el péptido se disolvió en 1mL de buffer Hepes 20mM pH 7.4 en ausencia de NaCl.

## 2.2. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE MELITINA

Para la preparación de las formulaciones de nanopartículas poliméricas se siguió el método de doble emulsión evaporación. Se preparo un reactor que contenía 1.5mL de una solución orgánica de acetato de etilo con 20mg de PGLA (75:25) ácido poliL-lactico- co- glicólico (sigma-aldrich chemical Ltd, Alemania M.W 24,000-38,000) y 20 mg de Lutrol 68 Mp (Poloxamer 188, BASF). A la mezcla anterior se le adicionó una solución acuosa de cloruro de magnesio al 3% p/p se agitó para formar una emulsión mediante agitación con ultrasonidos durante 90 s (Branson Ultrasonics Corp, Danbury, CT, USA). A la emulsión formada se le adicionaron 5ml de agua bidestilada y se favoreció la formación de una emulsión múltiple mediante una segunda agitación de 90 s con ultrasonido. La formación de las nanopartículas se consiguió mediante la evaporación del disolvente a presión reducida con un rotavapor (Heidolph instruments, Alemania). Una vez formadas las nanopartículas se colocó un reactor sobre una placa de agitación conteniendo la formulación y a la misma se le adicionaron 200µg de melitina en solución.

## 2.3. EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA MELITINA

Para evaluar la estructura secundaria de la melitina, se registraron los espectros de dicroísmo circular empleando un espectropolarímetro J-1100 (Jasco, Easton, MD) equipado para mantener la temperatura constante a 25°C con un Koolance Peltier. Todos los espectros se registraron en el ultravioleta lejano (190-240nm) a una velocidad de 50nm/min, obteniendo el promedio de 5 espectros con una sensibilidad de 50mdeg. Todos los espectros se corrigieron restando los blancos correspondientes. Las mediciones se realizaron en una celda de 0.1cm con soluciones de melitina a [70mM] o bien de suspensiones de nanopartículas conteniendo 100mg de péptido por mL. Las muestras se equilibraron en buffer Hepes 5mM pH 7.4 El contenido helicoidal de las muestras se asumió era directamente proporcional a la elipticidad promedio por residuo (MRE) a 222nm  $[\Theta]^{222}$ . El contenido alfa-helicoidal se calculó usando la fórmula:

$$\max[\Theta]^{222} = -40,000 \times [1-2.5/h] + 100 \times T)$$

donde h es el número de residuos y T es la temperatura en °C (Jamاسبi *et al.* 2014; Scholtz *et al.* 1991).

El porcentaje de helicidad se calculó después como  $100 \times [\Theta]^{222} / \max[\Theta]^{222}$



## 2.4. CUANTIFICACIÓN DE LA MELITINA PRESENTE EN LA SUPERFICIE DE LAS NANOPARTÍCULAS

La determinación del contenido de melitina en la superficie de las nanopartículas se realizó mediante el método de Bradford y por espectroscopía de fluorescencia. Para ello, la suspensión de nanopartículas recién preparadas se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 hr (Ultracentrífuga Beckman Coulter, Brea CA), se tomó 1 mL del sobrenadante y se cuantificó la cantidad de melitina presente por el método de Bradford. Para la cuantificación por espectroscopía de fluorescencia se tomó una alícuota del sobrenadante y del precipitado y se midió la fluorescencia emitida por el triptófano empleando una longitud de onda de excitación de 280 nm. La fluorescencia máxima obtenida se interpoló en una recta patrón realizada a partir de una solución estándar de melitina de concentración conocida.

## 2.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE NANOPARTÍCULAS DE MELITINA

Las formulaciones de nanopartículas se caracterizaron mediante la evaluación del tamaño promedio de partícula y la homogeneidad de tamaño (índice de polidispersidad, PDI) por espectroscopia de correlación fotonica Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, R.U.) a partir de una alícuota de cada lote diluida en agua Milli-Q.

## 2.6. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES (LUVS)

Para obtener suspensiones de LUVs de tamaño definido, se prepararon suspensiones de vesículas multilamelares por el método de evaporación-hidratación y posteriormente se pasaron 10 veces a través de un mini-extrusor de alta presión (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) equipado con una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 100 nm y termostatzado a la misma temperatura a la que se hidrataron los lípidos, obteniendo de esta forma una suspensión homogénea de vesículas lipídicas de unos 100nm de tamaño promedio.

## 2.7. CUANTIFICACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS

La cantidad de fosfolípido se determinó mediante valoración de fósforo según el método descrito por Rouser y colaboradores (1966) para lo cual se secaron las muestras a analizar bajo flujo de nitrógeno para posteriormente añadir ácido perclórico al 70% (0.45 mL) e incubarlas en baño de arena a 250-260°C durante 30 minutos con el fin de conseguir la mineralización del fósforo. Transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar los

tubos y se añadieron 0.5mK de molibdato amónico (2.5% p/v), 0.5mL de ácido ascórbico (10% p/v) y 3.5 mL de agua bidestilada por muestra, incubándose éstas durante 7 minutos en baño de agua hirviendo. La reacción cromogénica se detuvo colocando los tubos en hielo, midiéndose la absorbancia a 820 nm del producto coloreado que se forma en presencia de fósforo, en un espectrofotómetro Génesis 10 Thermo-scientific. Para conocer la cantidad de fosfolípidos en cada muestra, la absorbancia obtenida se interpolará en una recta patrón realizada a partir de una solución estándar de concentración conocida de fosfato inorgánico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05mg/mL).

## 2.8. ENSAYOS DE LIBERACIÓN DE CONTENIDOS ACUOSOS

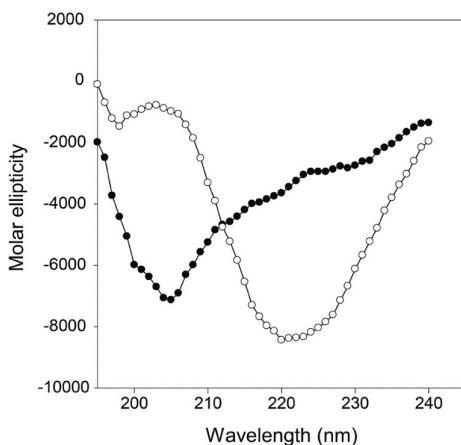
La capacidad del sistema nanoparticulado conteniendo melitina para provocar la pérdida de contenidos acuosos de vesículas fosfolípídicas de diferente composición se valoró mediante el método ANTS/DPX descrito por Ellens y colaboradores en 1985. Las vesículas de fosfolípido se prepararon mediante extrusión en HEPES 50 mM, pH 7 con NaCl 30 mM, ANTS 12.5 mM y DPX 45 mM. Una vez preparadas se pasaron a través de una columna Sephadex G-75 y se eluyeron con buffer HEPES 50 mM pH 7, NaCl 150 mM. El proceso cromatográfico se siguió midiendo la absorbancia de las fracciones a 259 nm y 353 nm, longitudes de onda de los máximos de absorción del desactivador y fluoróforo DPX y ANTS respectivamente. Las fracciones correspondientes a las vesículas con sonda y desactivador coencapsulados se recogieron y reunieron para determinar su concentración mediante el método de Rouser. El ensayo de liberación de contenidos se inició disponiendo 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión de vesículas conteniendo ANTS/DPX, a una concentración final de fosfolípido de 75  $\mu\text{M}$  en la cubeta del espectrofluorímetro, termostatzada a 25 °C. Para iniciar el ensayo se inyectaron alícuotas de entre 10 y 50  $\mu\text{L}$  para obtener las cantidades de péptido requeridas (1.8, 2.5, 7, 10.7, 14  $\mu\text{M}$ ) en la celda de fluorescencia. La liberación del contenido de las vesículas del ANTS se siguió monitorizando la emisión de fluorescencia del ANTS a 536 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 353 nm. La liberación del contenido de las vesículas va acompañada de un incremento en la intensidad de fluorescencia del ANTS, consecuencia de la reducción por dilución del efecto desactivador del DPX. El experimento se finalizará con la adición de una alícuota de Triton X-100 (0.5% concentración final) que proporciona la fluorescencia correspondiente al 100% de liberación como referencia.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. PREPARACIÓN DEL AGREGADO TETRAMÉRICO DE MELITINA

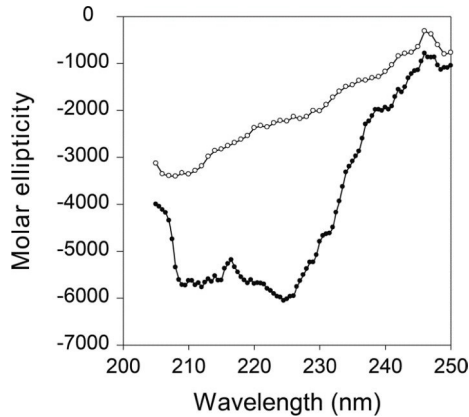
La melitina es una molécula que en solución presenta una conformación aleatoria mientras que, al unirse el monómero a membranas se incrementa drásticamente su contenido alfa- helicoidal (Vogel y Jähnig, 1986). Para corroborar la presencia de la conformación tetramérica del péptido bajo las condiciones empleadas en este trabajo, se analizó por dicroísmo circular su estructura secundaria. En la figura 2 puede observarse que la melitina monomérica presenta un mínimo ~205nm representativo de una conformación aleatoria mientras que, la melitina tetramérica presentó un pico de elipticidad negativo centrado en los 222nm característico de una conformación alfa-helicoidal originada por la auto asociación del péptido. Para corroborar que la conformación tetramérica de la melitina se mantenía una vez incorporado el péptido a las nanopartículas, se realizaron los espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano y además se siguió la intensidad de fluorescencia del Trp<sup>19</sup> de la melitina.

Figura 2. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano para la melitina monomérica (○) y tetramérica (●).



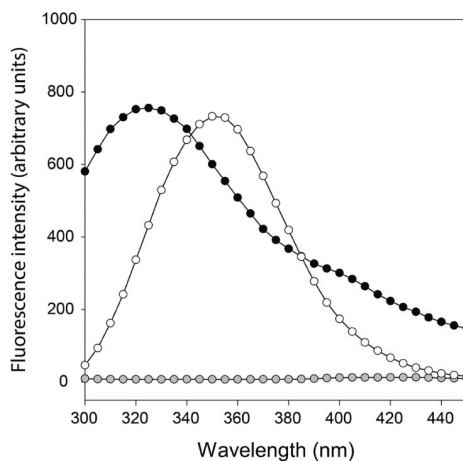
En la figura 3 se muestra el espectro de la melitina tetramérica una vez incorporada a las nanopartículas de PLGA y, como puede observarse, las nanopartículas solas no presentan un pico característico de estructura secundaria mientras que el espectro del sistema nano- melitina refleja una conformación alfa-helicoidal al presentar un pico negativo a 222nm. El contenido helicoidal de la melitina presente en las nanopartículas resultó de un 40%, similar a lo reportado para la melitina tetramérica a una concentración de péptido de 0.5mM (Huang *et al.*, 2013) sugiriendo que la formación del tetrámero permanece estable después de la incorporación del péptido a la nanopartícula.

Figura 3. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano de la suspensión de nanopartículas de PLGA en ausencia (O) o presencia de melitina tetramérica (●).



Al realizar el seguimiento del Trp<sup>19</sup> por espectroscopía de fluorescencia (Fig. 4) pudo observarse que el espectro de las nanopartículas cargadas con melitina presenta un desplazamiento hacia el azul, es decir un cambio en la intensidad de fluorescencia de 351nm a 331nm, si se compara con el espectro de la melitina en solución, estas diferencias en las propiedades de fluorescencia son indicativas de un cambio en el entorno de los residuos aromáticos, es decir que el residuo de Trp de la posición 19 se encuentra menos expuesto al agua cuando está en las nanopartículas que cuando se encuentra en la melitina monomérica confirmándose nuevamente la presencia del tetrámero de melitina en las nanopartículas.

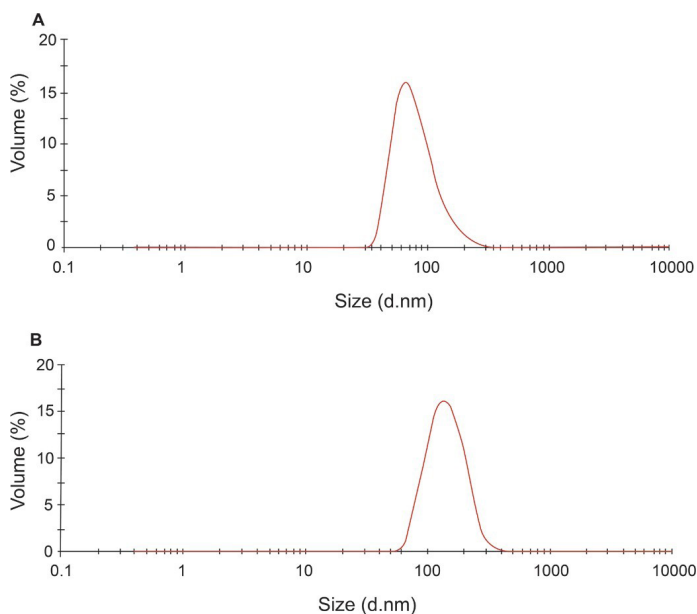
Figura 4. Espectros de emisión de fluorescencia de las nanopartículas de PLGA cargadas con melitina. Se muestran los espectros correspondientes a la emisión de fluorescencia intrínseca del residuo de triptófano de la melitina en solución (O), del sistema nano-melitina (●) y de las nanopartículas de PLGA (●). La longitud de onda de excitación fue de 280nm y la concentración de péptido de 20 mg/mL.



### 3.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE NP CARGADAS CON MELITINA

La figura 5 muestra el tamaño promedio de las formulaciones de nanopartículas poliméricas biodegradables preparadas para la realización de este trabajo con y sin melitina. En la figura 5A puede observarse que el diámetro promedio obtenido para las nanopartículas oscila entre los  $85\text{nm} \pm 20\text{nm}$  ( $n=3$ ) con un índice de polidispersidad  $\text{PDI} < 0.1$ , lo que indica que la homogeneidad de tamaño es elevada y que se cuenta con un sistema mono-disperso típico. La adsorción de melitina en la superficie de las nanopartículas produjo un incremento en su tamaño, con valores de diámetro promedio de  $110 \pm 20\text{nm}$  ( $n=3$ ) y un  $\text{PDI} < 0.1$  (Fig 5B) originado probablemente por la interacción electrostática entre los residuos básicos presentes en la secuencia peptídica ( $\text{I}^{20}$ - $\text{K}^{21}$ - $\text{R}^{22}$ - $\text{K}^{33}$ - $\text{R}^{24}$ - $\text{Q}^{25}$ ) y el grupo polar del lutrol de las nanopartículas (Cui *et al.*, 2005).

Figura 5. Tamaño promedio de las nanopartículas de PLGA en ausencia (A) y presencia de melitina (B).



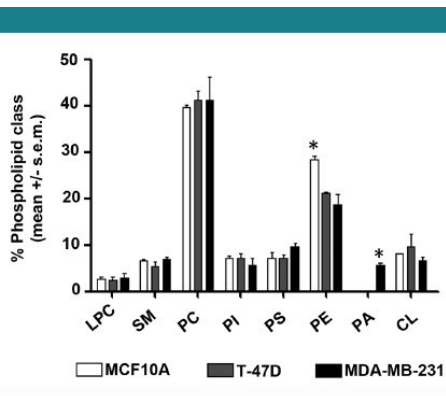
Para cuantificar la melitina encapsulada se empleó la ecuación  $y=49.036x+1.17$  de la curva de calibración realizada para tal efecto, resultando un porcentaje de eficiencia de encapsulación del 85%.

### 3.3. EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN Y PERMEABILIDAD ORIGINADA POR EL SISTEMA NP-MELITINA CON MODELOS DE MEMBRANA

Para poder evaluar la capacidad lítica de las nanopartículas cargadas con melitina, se prepararon liposomas de distintas especies fosfolípicas conteniendo

ANTS como fluoróforo y DPX como quenchedor. Los fosfolípidos empleados para la preparación de cada uno de los liposomas utilizados en este trabajo se basan en el estudio realizado por Dória y colaboradores (2013), sobre las alteraciones presentadas en el perfil fosfolipídico de células de epitelio mamario (MCF10A) y células de cáncer de mama (T-47D y MDA-MB-23) (Figura 6). Por lo que para simular las membranas de las células de epitelio mamario sano se empleó la mezcla PC/PE/PS (50:40:10 p/p) y para semejar las membranas de las células de cáncer de mama se utilizó la mezcla PC/PE/PS/PA (50:25:15:10 p/p). Estos liposomas permiten tener un sistema modelo bien definido, permitiendo identificar las especies lipídicas y las propiedades de membrana que influyen la unión entre el sistema nanomelitina y los lípidos. Como lípido representativo de membranas celulares se emplearon liposomas compuestos en su totalidad por PC. La capacidad lítica del sistema nanomelitina se evaluó empleando el método de liberación de sondas, el cual consiste en medir el aumento en la intensidad de fluorescencia que resulta de la fuga y separación de la sonda ANTS y el apagador DPX que se encuentran en el interior de los liposomas.

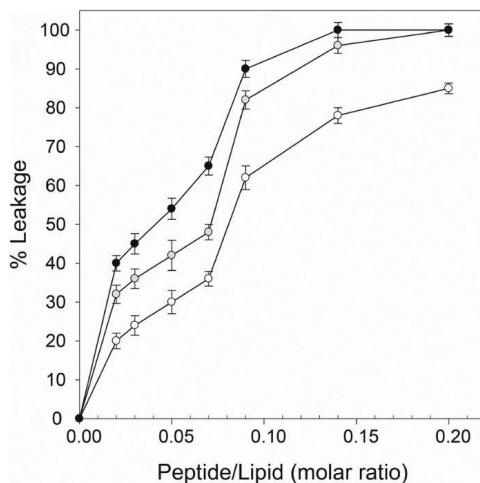
Figura 6. Abundancia relativa de fosfolípidos en células epiteliales mamarias humanas y líneas celulares de cáncer de mama. Tomado de Dória y colaboradores (2013).



En la figura 7 se resumen las propiedades líticas del sistema nano-melitina, en ella puede observarse que la incorporación de la melitina tetramérica en las nanopartículas de PLGA no altera la capacidad lítica de este péptido en ninguna de las composiciones lipídicas analizadas. El sistema nano-melitina fue capaz de permeabilizar el 50% de los liposomas de PC a una concentración entorno 2 mM, resultando más efectivo para inducir la perturbación de los liposomas que semejaban la membrana de células cancerosas y sanas, con una concentración de 1.2 mM y 1.8 mM respectivamente, indicando la importancia de las interacciones electrostáticas en este rompimiento.



Figura 7. Efecto de la relación péptido/lípido en la liberación de contenidos acuosos desde vesículas de PC (○) PC/PE/PS (50:40:10 p/p) (●) y PC/PE/PS/PA (50:25:15:10 p/p) (●) originados por el sistema nano-melitina. La concentración de péptido probada fue de 0.6, 0.8, 1.2, 1.8, 2.4, 3.6 y 4.8 mM y la concentración final de lípido fue de 75mM. El porcentaje de liberación de contenidos se calculó considerando como el 100%, la fluorescencia resultante después de la adición de Triton X-100 (0.5% v/v) a los liposomas.



#### 4. DISCUSION

La melitina es un péptido anfipático catiónico de 26 aminoácidos que cuando se encuentra en solución adquiere una estructura aleatoria. Este péptido deriva del veneno de las abejas y tiene una variedad de propiedades farmacéuticas entre las que destacan efectos biológicos como antiviral, antibacteriano, antifúngico, antiparasitario y antitumoral. Se propuso que la melitina actúa como un compuesto citolítico no selectivo, es decir; el péptido interrumpe física y químicamente membranas celulares causando lisis celular por lo que fue considerado un candidato atractivo para la quimioterapia contra el cáncer. (Wu *et al.*, 2018). La literatura actual disponible que involucra estudios *in vitro* e *in vivo* sugiere que la melitina afecta la transducción de señales y las vías reguladoras que conducen a múltiples mecanismos de muerte por cáncer, incluida la inhibición de la proliferación, la inducción de apoptosis, la inhibición de la angiogénesis, la detención del ciclo celular y la inhibición de la motilidad del cáncer, la migración, metástasis e invasión. (Rady *et al.*; 2017). Sin embargo, la aplicación de melitina en el cáncer ha tenido un éxito limitado debido a varios problemas que incluyen toxicidad, baja especificidad, degradación, entrega sistémica ineficiente, biodisponibilidad limitada y principalmente alta hemólisis. Para sortear el problema con el uso del péptido para la terapia contra el cáncer, se han utilizado estrategias para mejorar estas desfavorables características estudiando la relación estructura-actividad con la finalidad de disminuir su actividad hemolítica

utilizando estrategias como fusión o hibridación molecular, semisíntesis química, inserción o eliminación de aminoácidos y apoyándose en el uso de la nanotecnología como sistema de transporte. Las estrategias se enfocan principalmente en el segmento hidrofóbico N-terminal, residuos 1- 20, que confieren al péptido la capacidad de unión a membranas. En este trabajo se utilizó la estrategia de favorecer un cambio estructural en el péptido y posteriormente incorporarlo en nanopartículas poliméricas. Dado que está bien descrito por Miura (2015) que la concentración creciente de péptido o NaCl favorecen la formación del tetrámero de melitina y que la formación del tetrámero podría ayudar a disminuir la actividad hemolítica del péptido se decidió evaluar si esta estrategia resulta factible. Los resultados obtenidos demuestran que bajo las condiciones experimentales empleadas se logra formar el tetrámero de melitina y que esta conformación estructural se mantiene incluso después de incorporarlo a las nanopartículas de PLGA , presentando una estructura principalmente alfa-helicioidal (40%) aún en ausencia de moléculas lipídicas, lo que concuerda con lo reportado por otros autores (Huang *et al.*, 2013).

La disrupción de la membrana por el sistema nanomelitina se caracterizó usando un ensayo de liberación de contenidos acuosos como se describe en materiales y métodos. Los resultados demostraron que la incorporación de melitina en las nanopartículas de PLGA no altera la capacidad citolítica de este péptido en ninguna de las vesículas de fosfolípidos analizadas (simulación del epitelio mamario sano, canceroso, eritrocitario). El sistema nanomelitina pudo irrumpir el 50% de los liposomas que simulan la membrana eritrocitaria (PC) a concentraciones de alrededor de 2mM, observándose que el sistema fue más efectivo induciendo permeabilidad en los liposomas que simulaban membranas de tejido mamario tanto sano (PC/PE/PS (50:40:10 p/p)) como cancerígeno (PC/PE/PS/PA (50:25:15:10 p/p), aproximadamente 1.2 mM y 1.8 mM, respectivamente. Así pues, los resultados demuestran que existe cierta protección en el daño inducido a las membranas al tener al péptido en su conformación tetramérica lo cual posiblemente se deba a que al ser incorporado en las nanopartículas de PLGA se forme un parche hidrofóbico lo que reduce la actividad lítica en los lípidos zwitteriónicos mientras que conserva su actividad citotóxica frente a las membranas aniónicas. Estos resultados concuerdan con las observaciones hechas por Pandey y col. (2010), quienes reportan que lograron aumentar la selectividad celular realizando también una modificación estructural en el péptido usando una mutación Leu9Ala, la cual presentó una reducción significativa de la actividad hemolítica, al mismo tiempo que mostraba actividad antibacteriana contra las bacterias Grampositivas y negativas (Pandey *et al.* 2010). Es importante tener en cuenta que la actividad lítica de nuestro sistema nanomelitina es más citotóxica que otros

sistemas de nanopartículas de melitina reportados. Huang y col. (2013) diseñaron un péptido citolítico híbrido,  $\alpha$ -melitina, en el que el extremo N terminal de melitina está unido al extremo C terminal de un péptido  $\alpha$ -helicoidal anfipático a través de un conector GSG. Estas nanopartículas de melitina indujeron una liberación mínima de hemoglobina a una concentración de 50 mM mientras que la citotoxicidad en las células tumorales se alcanzó a 12 mM. Esto representa una tolerancia de aproximadamente 10 veces más que nuestro sistema para la simulación de membranas eritrocitarias y alrededor de 2 veces más para membranas que contienen fosfolípidos aniónicos tomando en cuenta la concentración máxima probada en este estudio (4.8mM). Soman y col. (2009) observaron una acción más protectora contra la hemólisis de glóbulos rojos con el uso de nanopartículas de perfluorocarbono recubierto con lípidos incorporando melitina; informan que incluso una concentración de nanopartículas de melitina 25 mM solo provocó 10% de hemólisis.

## 5. CONCLUSIÓN

Está claro que para reducir la actividad hemolítica de melitina es necesario proteger su segmento N-terminal hidrófobo a través de cambios estructurales o alterar la secuencia aminoacídica de este péptido mediante la conjugación con otras moléculas hidrofóbicas. En este sentido, nuestros resultados demostraron que, es posible favorecer selectivamente la agregación de melitina y preservar la estructura tetramérica del péptido en forma activa una vez incorporada a las nanopartículas. Sin embargo, es necesario mejorar esta formulación para reducir aún más la actividad lítica de melitina en las membranas modelo.

## REFERENCIAS

- Cui F., Cun D., Tao A., Yang M., Shi K., Zhao M., Guan Y. (2005). Preparation and characterization of melittin-loaded poly (DL-lactic acid) or poly (DL-lactic-co-glycolic acid) micro- spheres made by the double emulsion method. *J. Con. Rel.* 107, 310–319 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.07.001>
- Doria M. L., Cotrim C.Z., Simoes C., Macedo P.D., Dominguez R., Helguero L. A. (2013). Lipidomic analysis of phospholipids from human mammary epithelial and breast cancer cell line. *J. Cell. Physiol.* 228, 457–468 <https://doi.org/10.1002/jcp.24152>
- Huang C., Jin H., Qian Y, Qi S., Luo H., Luo Q., Zhang Z. (2013). Hybrid melittin cytolytic peptide-driven ultrasmall lipid nanoparticles block melanoma growth in vivo. *ACS Nano* 7, 5791–5800 <https://doi.org/10.1021/nn400683s>
- Jamasbi E., Batinovic S., Sharples R., Sani M. A., Robins-Bowne R. M., Wade J. D., Sparovic F., Hossain M. A. (2014). Melittin peptides exhibit different activity on different cells and model membranes. *Amino Acids* 46, 2759–2766.

Liao C., Myvizhi E., Zhao J., Slimovitch J., Schneebeli S., Shelley M., Shelley J., Li J. (2015) Melittin aggregation in aqueous solutions: insight from molecular dynamics simulation. *J. Phys. Chem. B* **119**, 10390–10398 <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.5b03254>

Liu S., Yu M., He Y., Xiao L., Wang F., Song C., Ling C., Xu Z. (2008). Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway. *Hepatology* **47**, 1964–1973 <https://doi.org/10.1002/hep.22240>

Pan H., Soman N. R., Sclesringer P. H., Lanza G. M., Wickline S. A. (2011). Cytolytic peptide nanoparticles (NanoBees) for cancer therapy. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **3**, 318–327 <https://doi.org/10.1002/wnan.126>

Pandey B. K., Ahmad A., Asthana N., Azmi S., Srivastava R. M., Srivastava S., Verma R., Vishwakarma A. L., Ghosh J. K. (2010): Cell-Selective lysis by novel analogues of melittin against human red blood cells and *Escherichia coli*. *Biochemistry* **49**, 7920–7929 <https://doi.org/10.1021/bi100729m>

Raghuraman H., Ganguly S., Chattopadhyay A. (2006): Effect of ionic strength on the organization and dynamics and membrane-bound melittin. *Biophys. Chem.* **124**, 115–124 <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.06.011>

Takahashi T., Nomura F., Yokoyama Y., Tanaka-Takaguchi Y., Homma M., Takaguchi K. (2013): Multiple membrane interactions and versatile vesicle deformations elicited by melittin. *Toxins* **5**, 637–664 <https://doi.org/10.3390/toxins5040637>

Van den Bogaart G., Velasquez Guzman J., Mika J. T., Poolman B. (2008): On the mechanism of pore formation by melittin. *J. Biol. Chem.* **283**, 33854–33858 <https://doi.org/10.1074/jbc.M805171200>

## SOBRE O ORGANIZADOR

**Manuel Simões** é licenciado em Engenharia Biológica e doutorado em Engenharia Química e Biológica. Atualmente é Professor Associado com Agregação e Pró-Diretor da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), e investigador sénior do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPABE) do Departamento de Engenharia Química da FEUP. Nos últimos anos esteve envolvido em 10 projetos nacionais (5 como investigador principal) e 6 projetos europeus. Foi membro do comité de gestão da ação COST BACFOODNET (Rede Europeia para Mitigação da Colonização e Persistência Bacteriana em Alimentos e Ambientes de Processamento de Alimentos) e esteve envolvido em outras 2 ações: iPROMEDAI e MUTALIG. Manuel Simões tem mais de 190 artigos publicados em revistas indexadas no Journal of Citation Reports, 4 livros (1 como autor e 3 como editor) e mais de 40 capítulos em livros. Ele é Editor Associado para o jornal Biofouling - The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research (o periódico mais antigo sobre pesquisa em biofilme), Editor Associado para o jornal Frontiers in Microbiology e Section Editor-in-Chief para o jornal Antibiotics. Seus principais interesses de pesquisa estão focados nos mecanismos de formação de biofilme e seu controlo com agentes antimicrobianos, particularmente usando novas moléculas antimicrobianas, e no uso de microalgas para tratamento de efluentes. É um dos investigadores mais citados do mundo (top 1%), tendo sido distinguido nos últimos dois anos no índice Essential Science Indicators, um dos mais prestigiados indicadores da qualidade de investigação.

Identificação SCOPUS: 55608338000; No orcid: 0000-0002-3355-4398

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Aguas contaminadas 47, 48, 49, 53

Aguas residuales 37, 44, 52, 53

Aplicación 1, 2, 4, 12, 26, 44, 48, 53, 58

### B

Bicapas fosfolipídicas 1

Biomosas naturales 44, 48, 52

Biorremediación 37, 42, 44, 52, 53

Buenas prácticas clínicas (BPC) 54

### C

Cacahuete 47, 48, 49, 50, 52

Caña de azúcar 36, 37, 38, 39, 46

Coordinador de investigación clínica (CRC) 54

Cristalografía de rayos X 77, 80

Cromo (VI) 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53

Cuidar 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 75, 76

Culture 30

### E

Ecophysiology 29, 30

Encapsulación de ingredientes activos 1, 2

Enfermagem 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 74, 75, 76

Ensayos clínicos 54, 55, 56, 57, 59, 60, 61

Estabilidad y biodisponibilidad 1

Estructura del ADN 77, 80, 81, 82, 83, 85, 86, 88, 89, 90

Ética 54, 56, 57, 58, 59, 61, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 75

Etnofarmacología 16, 17

### G

Gestión de estudios clínicos 54



## I

Inflamación 17, 21

## M

Management 29, 30, 34, 55

Medicina Tradicional 16, 17, 26

Melitina tetramérica 1, 4, 8, 9, 11

Mujeres en áreas STEM 77, 87

## N

Nanopartículas de PLGA 1, 4, 8, 9, 10, 11, 13

## O

Optimization 30

## P

Plantas medicinales 16, 17, 18, 26, 28

*P. reticulata* 29, 30, 32, 33, 34

Principialismo 65, 71

Profesionalización en la investigación 54

## R

Remoción 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53

Rosalind Franklin 77, 78, 79, 80, 85, 86, 87, 89, 90, 91

## S

*Salvia purpurea* 16, 17, 21, 22, 27, 28

