



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

SEPARAÇÃO DE MELITINA ATRAVÉS DA ULTRAFILTRAÇÃO: O EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA APITOXINA E DA DIFERENÇA DE PRESSÃO NO FLUXO E SELETIVIDADE

BRANDÃO ECV¹, BRITO JCM², ALVES IC² e FIGUEIREDO K¹

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Engenharia Química – EE/UFMG

²Fundação Ezequiel Dias – FUNED – Minas Gerais

E-mail para contato: evelinverdolin@hotmail.com

RESUMO – *A apitoxina (veneno da abelha) vem sendo utilizada há muitos anos como medicamento para diversas doenças, como artrites, dores nas costas e esclerose múltipla. Os benefícios deste veneno provêm, principalmente, do peptídeo denominado melitina (2,8 kDa), presente em 50% de sua massa seca. No entanto, a apitoxina possui em sua composição outros peptídeos com alto potencial alergênico, como é o caso da fosfolipase A₂ (19,0 kDa). A ultrafiltração com membrana de celulose regenerada de 10 kDa foi utilizada como método de separação, objetivando alcançar uma concentração de permeado com a menor ou nenhuma fração deste composto alergênico. Um planejamento estatístico foi desenvolvido para investigar os efeitos da diferença de pressão e da concentração no fluxo do permeado. A análise qualitativa do concentrado e permeado foi feita através da eletroforese em gel (SDS-PAGE). Os resultados experimentais indicaram que o fluxo está diretamente relacionado com a pressão e inversamente com a concentração. A eletroforese mostrou que apenas a melitina permeou pela membrana. As autoras agradecem ao CNPq, Capes e Fapemig pelo auxílio.*

1. INTRODUÇÃO

A apiterapia tem por definição o uso de produtos derivados de abelhas com fins medicinais tais como mel, pólen, própolis, geleia real e veneno. Os dados históricos mostram que os antigos egípcios, gregos e chineses já usavam esses produtos provenientes da abelha (ABDU AL-SAMIE e ALI, 2012). Uma vez que o veneno é composto quimicamente por enzimas, peptídeos e aminas, incluindo 18 ativos farmacêuticos, a terapia pode tratar várias doenças, como artrite, dor crônica e esclerose múltipla (MIRSHAFIEY, 2007), por exemplo.

A melitina é a molécula mais abundante na apitoxina, constituindo cerca de 50% de veneno de abelha em massa seca e com massa molar igual a 2,8 kDa. Os benefícios da melitina classificam-na como um produto desejado pela indústria farmacêutica e cosmética. No entanto, este peptídeo está presente na apitoxina em conjunto com outros compostos com alto potencial alergênico, como fosfolipase A₂ (PLA₂) e hialuronidase (MÜLLER e HELBLING, 2013). Assim, os processos de separação dos componentes da apitoxina vêm sendo estudados há décadas (BANKS *et al.*, 1981; TEOH *et al.*, 2017). Todavia, o uso dos métodos cromatográficos



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

é de elevado custo e de complexa produção em escala industrial, dificultando a comercialização desse produto a um preço mais acessível no mercado.

A ultrafiltração (UF) é um método alternativo para separar macromoléculas, como é o caso da melitina, 2,8 kDa, e os outros compostos alergênicos, de 19-50 kDa, porque a força motriz necessária é a diferença de pressão (HABERT *et al.*, 2006). Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi separar a melitina da apitoxina usando UF por meio de um planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central para investigar os efeitos da concentração do veneno e da diferença de pressão no fluxo permeado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O veneno foi fornecido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Ele foi solubilizado em água ultrapura (Milli-Q), filtrado em membrana de 0,45 μm e, em seguida, liofilizado. A membrana usada foi de celulose regenerada, com massa molar de corte igual a 10 kDa. As soluções do veneno foram preparadas em tampão fosfato com pH 5,5.

O planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central foi utilizado para análise da UF da apitoxina. A faixa de concentração de apitoxina (C_{ap}) foi de 1 a 10 mg/mL. Este intervalo foi definido tomando como base o trabalho de Brito (2013). Já a diferença de pressão foi variada de 0,5 a 1,5 bar.

Com o volume de permeado coletado durante a UF foi calculado o fluxo conforme a Equação 1:

$$J = \frac{1}{A} \frac{dV}{dt} \quad (1)$$

onde V é o volume de permeado, A é a área efetiva da membrana ($1,39 \times 10^{-3} \text{ m}^2$), e Δt é o tempo de permeação.

A correlação entre as variáveis, P e C_{ap} , em relação ao fluxo de permeado foi obtida após avaliação do modelo matemático pela análise de variância (ANOVA).

O sistema Mini-PROTEAN[®] Tetra Handcast da Bio-Rad foi utilizado para executar a eletroforese. Um total de 20 amostras, incluindo um padrão de eletroforese de baixa massa molecular, padrão de fosfolipase A₂ e o padrão da melitina, foram analisadas em géis de 15% de poliacrilamida. O tempo de análise foi de 2 horas, a 90 volts e 400 mA. O gel foi revelado em corante Coomassie Brilliant Blue por uma hora.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fluxo do permeado apresentou uma queda durante o estágio inicial e se estabilizou cerca de 10 minutos depois, atingindo um estado estacionário, indicando que houve polarização de concentração. A partir do fluxo em 25 minutos, foi possível estabelecer um modelo para o fluxo em função das variáveis investigadas, conforme apresentado na Equação 2. A análise estatística indicou que, para um intervalo de confiança de 95%, obteve-se um coeficiente de determinação (R^2) de 99,87%, indicando que o modelo quadrático representou adequadamente a relação entre os efeitos e a resposta.

$$\text{Fluxo permeado} = 35,21 - 10,96 \text{ Cap} + 11,39 \text{ P} - 1,40 \text{ Cap} * \text{P} \quad (2)$$

Analisando a Equação 2, observou-se que a diferença de pressão (P) foi diretamente proporcional ao fluxo permeado, conforme esperado, já que o aumento da pressão compelirá mais solução para a superfície da membrana e, conseqüentemente, o fluxo de permeado aumentará. Por outro lado, a concentração de apitoxina na solução (Cap) afeta inversamente o fluxo de permeado, isto é, quando a concentração de apitoxina aumenta, o fluxo de permeado diminui. A interação entre as variáveis, embora pequena em módulo, também apresentou influência negativa, mas com menor significância quando comparada à concentração e à diferença de pressão.

A análise qualitativa das amostras realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) é apresentada na Figura 1.

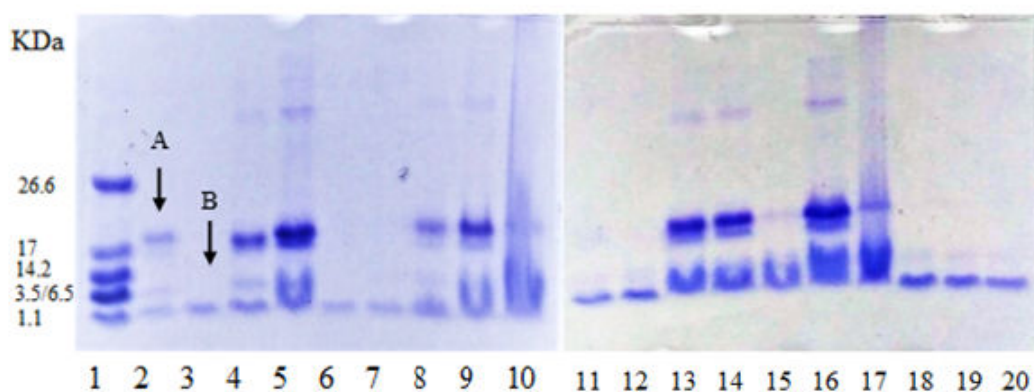


Figura 1 – Eletroforese da solução de apitoxina, permeado e concentrado resultante da ultrafiltração. A seta A indica as faixas de fosfolipase A₂ e B de melitina. Os géis SDS-PAGE foram rotulados da seguinte forma: (1) Marcador de tamanho molecular; (2) Padrão fosfolipase A₂; (3) Padrão de Melitina; (4) Concentrado 1,0 mg/mL – 0,5 bar; (5) Concentrado 1,0 mg/mL – 1,5 bar; (6) Permeado 1,0 mg/mL- 0,5 bar; (7) Permeado 1,0 mg/mL – 1,5 bar; (8) Solução 1,0 mg/mL; (9) Concentrado 10 mg/mL – 0,5 bar; (10) Concentrado 10 mg/mL – 1,5 bar; (11) Permeado 10,0 mg/mL – 0,5 bar; (12) Permeado 10,0 mg/mL – 1,5 bar; (13) Solução 10,0 mg/mL; (14) Solução 5,5 mg/mL; (15) Concentrado 5,5 mg/mL – 1,0 bar; (16) Concentrado 5,5 mg/mL – 1,0 bar; (17) Concentrado 5,5 mg/mL – 1,0 bar; (18) Permeado 5,5 mg/mL – 1,0 bar; (19) Permeado 5,5 mg/mL – 1,0 bar; (20) Permeado 5,5 mg/mL – 1,0 bar.

As análises em SDS - PAGE indicaram que a UF foi eficaz em relação à separação da PLA₂, coerente com os estudos realizados por Lee *et al.* (2015). As colunas 4,5,9,10,15,16,17 representam os concentrados de todos os experimentos realizados onde a banda de fosfolipase A₂ aparece claramente, exceto na banda 16 que possui uma cor azul muito clara. No entanto, a banda de melitina também é revelada nessas colunas, o que significa que a recuperação de melitina não foi completa. Uma hipótese para explicar isso é a formação de tetrâmero pelo peptídeo, ou ainda alguma interação mais forte entre a melitina e algum outro componente retido pela membrana. Por outro lado, a separação da PLA₂ é confirmada quando se verifica as colunas de permeado 6,7,11,12,18,19,20, onde não se revela nenhuma faixa da mesma, apenas de melitina. Esta análise está sendo completada com auxílio de cromatografia líquida para quantificar o teor de melitina e PLA₂ nas diversas frações.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

4. CONCLUSÃO

A separação da melitina através da UF utilizando membrana comercial mostrou um resultado satisfatório ao separar a melitina do principal composto alergênico presente no veneno de abelha, fosfolipase A₂, como visto na eletroforese em gel. A análise de variância do fluxo de permeado demonstrou uma relação direta com a pressão exercida sobre o sistema e inversa com a concentração da solução utilizada.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapemig, Capes e ao CNPq pelo auxílio no desenvolvimento desta pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

- ABDU AL-SAMIE, M.; ALI, M. Studies on Bee Venom and Its Medical Uses. *Int. J. of Adv. in R & T*, Cairo, v. 1, p. 1-15, 2012.
- BANKS, B. E. C.; DEMPSEY, C. E.; PEARCE, F. L.; VERNON, C. A.; WHOLLEY, T. E. New Methods of Isolating Bee Venom Peptides. *Anal Biochem.*, London, v. 116, p. 228–230, 1981.
- BRITO, J. C. M. Fracionamento do Veneno da *Apis mellifera* utilizando membranas de ultrafiltração de celulose regenerada de 10 kDa, Belo Horizonte, 2015.
- HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. *Processos de Separação com Membranas: Escola piloto em Engenharia Química*, Rio de Janeiro: e-papers, 2006.
- LEE, H.; MIN-JUNG, P.; SEONG, K. B.; YUNWI, H.; KIM, C. G.; KANG, C.; KIM, E. Improved Therapeutic Profiles of PLA₂-Free Bee Venom Prepared by Ultrafiltration Method. *Toxic. Research.* v. 31, p. 33-40, 2015.
- MIRSHAFIEY, A. Venom therapy in multiple sclerosis. *Neuropharm.* v. 53 (3), p. 353-361, 2007.
- MÜLLER, U. R.; HELBLING, A. Update on Hymenoptera Venom Allergy with Special Aspects of Diagnostics and Therapy. *Allergo J Int.*, Cologne, Alemanha, v. 22 (4), p. 265–273, 2013.
- TEOH, A. C. L.; RUY, K-H; LEE, E. G. One-step purification of melittin derived from *Apis mellifera* bee venom. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 27(1), p. 84–91, 2017.