

André Guilherme Kunitz

**MELITINA PROVENIENTE DO VENENO DE ABELHA:  
Processo de Purificação, Aplicação e Avaliação Econômica**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito à obtenção de grau de mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cíntia Soares  
Coorientador: Prof. Dr. Arioaldo Bolzan

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro Tecnológico  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kunitz, André Guilherme

Desenvolvimento de um processo de obtenção de melitina a partir do veneno de abelha / André Guilherme Kunitz ; orientadora, Cintia Soares ; coorientador, Ariovaldo Bolzan. - Florianópolis, SC, 2015.

p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Veneno de abelha. 3. Melitina. 4. Separação cromatográfica. 5. Nanopartículas lipídicas sólidas. I. Soares, Cintia . II. Bolzan, Ariovaldo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

## RESUMO

As abelhas são conhecidas por suas ferroadas e produção melífera, mas raramente são reconhecidas por uma determinada proteína benevolente em seu veneno chamada melitina. A melitina é um peptídeo hemolítico antimicrobiano amplamente conhecido pelos seus efeitos terapêuticos. O interesse nas propriedades medicinais, especialmente na propriedade anticancerígena da melitina, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Porém, visto que alguns dos constituintes do veneno de abelha podem apresentar ação deletéria, decorrente do seu potencial alergênico, faz-se necessária a obtenção de melitina com elevado grau de pureza para eficiente aplicação na área farmacêutica. O presente trabalho teve o objetivo principal de desenvolver um processo para obtenção de melitina em escala analítica visando a aplicação deste peptídeo em formulações farmacêuticas, produzindo, desta forma, produtos com elevada tecnologia e valor agregado. A utilização de técnicas robustas, como ultracentrifugação e filtração, permitiu eliminar a maioria dos componentes presentes no veneno, contendo, ao final, somente biomoléculas com propriedades físico-químicas semelhantes à melitina. A utilização destas técnicas, em conjunto com RP-HPLC, permitiu obter melitina com um alto grau de pureza em escala analítica. Dessa forma, foi elaborado um protocolo de purificação da melitina, alcançando-se uma pureza estimada maior que 85 %. A análise econômica do processo de purificação da melitina demonstrou a viabilidade econômica na implantação desta tecnologia. O menor custo específico ocorre com a ampliação da escala a partir de 100 vezes a escala analítica, no qual o custo encontrado, nas condições operacionais propostas, é inferior ao aplicado atualmente. Ainda, é possível otimizar o processo visando melhor rendimento. A elaboração de um sistema de entrega controlada da melitina a partir de nanopartículas lipídicas sólidas foi proposta neste trabalho. Os resultados obtidos até o momento mostram que é possível obter NLSs estáveis de ácido esteárico com potencial aplicabilidade para encapsulação de melitina. Para a comprovação de eficiência farmacológica desse sistema proposto, uma avaliação adequada é necessária.

**Palavras-chave:** apitoxina; melitina; separação cromatográfica; nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).



## ABSTRACT

Honeybees are famous for their stings and sugary residues, yet seldom do they gain recognition for a certain benevolent protein in their venom called melittin. Melittin is an antimicrobial hemolytic peptide widely known for its therapeutic remedies. Interest in the medicinal properties, especially the anticancer property of melittin, has increased tremendously in recent years. However, since some of bee venom constituents can have deleterious effects, because of its allergenic potential, it is necessary to obtain melittin with high purity for its effective application in the pharmaceutical field. This study had the main objective to develop a process for obtaining melittin in analytical scale aiming the pharmaceutical application of this peptide, producing thus products with high technology and added value. The use of robust techniques such as ultracentrifugation and filtration allowed to eliminate most of the components present in the venom, remaining in the sample after these steps, only biomolecules with similar features to melittin. The use of these techniques in conjunction with RP-HPLC allowed obtaining melittin with a high degree of purity on an analytical scale. Thus, we designed a purification protocol for melittin, achieving an estimated purity greater than 85 %. The economic analysis of the melittin purification process showed the economic viability of the implementation of this technology. The lower specific costs occur with the scale-up from 100 times the analytical scale, in which the costs found within the operating conditions proposed are lower than those currently marketed. It is still possible to optimize the process to better performance. The development of a delivery vehicle of melittin based on solid lipid nanoparticles was proposed in this paper. The results obtained so far show that it is possible to obtain stable NLSs of stearic acid with potential applicability for encapsulation of melittin. For demonstrating pharmacological effectiveness of this proposed system, more tests are needed.

**Key-words:** apitoxin, melittin, chromatographic separation, solid lipid nanoparticles (SLN).



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço especialmente aos professores Cíntia Soares e Ariovaldo Bolzan pela oportunidade, amizade, orientação, paciência e ajudarem na minha formação profissional e pessoal;

À minha família, pelo apoio e confiança;

Aos colegas André Zibetti e Alexsandra Valério pela amizade, apoio e auxílio técnico para que este trabalho fosse desenvolvido;

Aos colegas do LCP como um todo, pelas grandes amizades e pelo ótimo ambiente de trabalho;

Agradeço a UFSC e CAPES pelo apoio financeiro;

E todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Obrigado de coração a todos!





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da sequência de aminoácidos da melitina. Os resíduos hidrofóbicos estão representados pelos círculos em branco, os resíduos polares estão indicados pelos círculos em cinza, enquanto que os resíduos carregados positivamente estão representados pelos círculos em vermelho.....	32
Figura 2 - (a) Estrutura cristalina $\alpha$ -hélice da melitina; (b) Diagrama de roda helicoidal da melitina: aminoácidos polares e carregados positivamente estão representados em cinza e vermelho, respectivamente.....	33
Figura 3 - Representação da melitina na forma de: (a) tetrâmero (ocorrência natural) e (b) monômero.....	34
Figura 4 - Interação da melitina com eritrócitos.....	35
Figura 5 - Fármacos biotecnológicos em desenvolvimento por categoria terapêutica.....	45
Figura 6 - Cromatografia líquida em escala industrial.....	49
Figura 7 - Fracionamento de proteínas por ultracentrifugação.....	51
Figura 8 - Conceito da separação por cromatografia de permeação em gel ou exclusão de tamanho.....	52
Figura 9 - Esquema de operação de uma cromatografia em leito móvel simulado (SMB).....	62
Figura 10 - Representação dos gradientes de concentração em relação à posição da coluna.....	63
Figura 11 - Comparação da zona de separação entre cromatografia de uma única coluna e cromatografia em SMB.....	63
Figura 12 - Equipamento coletor de apitoxina composto de placas coletoras e gerador de pulsos.....	66
Figura 13 – Metodologias desenvolvidas para purificação da melitina baseadas em diferentes gradientes de solvente.....	69
Figura 14 - (a) fluxograma do processo e (b) esquema de preparação das nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico.....	72
Figura 15 - Exemplo de três diferentes escalas de colunas utilizadas em desenvolvimento de processos de separação.....	75
Figura 16 – Imagens (a), (b) e (c) demonstram o procedimento de coleta do veneno bruto utilizando-se estímulos elétricos (placa coletora). Imagens (d) e (e) são referentes ao procedimento de raspagem da apitoxina. Imagem (f) demonstra a apitoxina coletada armazenada. ....	81
Figura 17 – Espectro de massas MALDI-TOF do veneno bruto.....	82
Figura 18 – Solução após a ultracentrifugação.....	83

Figura 19 – a) Cromatograma obtido do fracionamento da apitoxina por meio da técnica de GPC (G1 = Fração 1; G2 = Fração 2; G3 = Fração 3). b) Frações obtidas do veneno de abelha bruto por meio de cromatografia de permeação em gel referente ao trabalho de CHEN et al. (2006).....	84
Figura 20 – Varredura dos espectros UV-vis das frações G1, G2 e G3.	85
Figura 21 – Espectro de massas realizado em MALDI-TOF das frações G1 (a), G2 (b) e G3 (c).....	85
Figura 22 - Cromatogramas (RP-HPLC) obtidos da análise do veneno bruto recém-coletado: (a) Método 1A; (b) reanálise da amostra após 4 dias utilizando o Método 1A; (c) Método 1B. ....	88
Figura 23 – Cromatogramas (RP-HPLC) obtidos da análise da apitoxina recém-coletada (melitina destacada em vermelho): (a) Método 2; (b) Método 3. ....	91
Figura 24 – Cromatogramas (RP-HPLC) obtidos da injeção do veneno bruto para as metodologias 4 (a), 5 (b) e 6 (c). ....	92
Figura 25 – Efeito da seletividade e eficiência sobre a resolução dos picos em RP-HPLC.....	93
Figura 26 – (a) Cromatogramas obtidos das análises do padrão de melitina para os métodos 4 (vermelho), 5 (amarelo) e 6 (preto); (b) ampliação dos picos referentes a melitina obtidos pelas três metodologias.....	94
Figura 27 – Frações coletadas da injeção de apitoxina utilizando o Método 6.....	97
Figura 28 – Análise de espectrometria de massas MALDI-TOF das frações F1, F2, F3, F4. ....	98
Figura 29 – Comparação da análise de massas MALDI-TOF do padrão de melitina e da melitina obtida pelo método desenvolvido. ....	100
Figura 30 – Fluxograma do processo de purificação desenvolvido. ...	101
Figura 31 – Cromatogramas (RP-HPLC) da avaliação da estabilidade da melitina frente ao aumento de temperatura: $t_0$ (azul); $t = 30$ min (roxo) e $t = 60$ min (preto). (a) sobreposição dos cromatogramas $t_0$ , $t_1$ e $t_2$ . (b) sobreposição dos dos cromatogramas $t_0$ , $t_1$ e $t_2$ referentes ao composto desconhecido.....	103
Figura 32 - Cromatogramas (RP-HPLC) da avaliação da estabilidade da melitina frente ao período de armazenagem. $t_0$ (laranja); $t_1 = 15$ dias (verde) e $t_2 = 30$ dias (preto). (a) sobreposição dos cromatogramas $t_0$ , $t_1$ e $t_2$ . (b) sobreposição dos dos cromatogramas $t_0$ , $t_1$ e $t_2$ referentes aos compostos desconhecidos. ....	104

Figura 33 – Obtenção da melitina através de seguidas injeções sobrecarregadas no RP-HPLC e subsequente liofilização.....	105
Figura 34 - Gradiente de solvente e tempo de injeção utilizados para o <i>scale-up</i> . .....	108
Figura 35 - Comparação entre os COM estimados e o valor de melitina praticado no mercado. ....	111
Figura 36 - Distribuição dos custos integrantes no custo de manufatura da melitina pelas respectivas unidades de separação, onde FC é o custo fixo, GC são custos gerais, UC é o custo das utilidades, LC é custo da mão-de-obra, RMC é o custo da matéria-prima (solventes e fase estacionaria) e WTC é custo do tratamento de resíduos.....	112



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais componentes da apitoxina e seus efeitos biológicos.....	28
Tabela 2- Propriedades físicas e químicas exploradas nas técnicas utilizadas para purificação de proteínas. ....	49
Tabela 3 - Metodologias utilizadas no HPLC-analítico. ....	70
Tabela 4 - Colunas referentes a cada uma das escalas dos cenários avaliados.....	75
Tabela 5 - Custos da fase estacionaria (C-18) para cada uma das escalas. ....	76
Tabela 6 - Número de pessoal para operação de cada unidade. ....	77
Tabela 7 - Custo de bombeamento. ....	77
Tabela 8 - Tomada de preço da apitoxina comercializada em diferentes locais. ....	79
Tabela 9 - Tempos de retenção (Rt) obtidos para os picos referentes ao composto melitina para cada uma das metodologias desenvolvidas. ....	93
Tabela 10 - Medida do tempo para eluição do corante do detector até o ponto de coleta para diferentes vazões. ....	96
Tabela 11 - Medidas de potencial zeta e diâmetros de partícula das nanopartículas de ácido esteárico. ....	105
Tabela 12 - Bases econômicas e condições do processo de separação. ....	109
Tabela 13 - Custos diretos do processo de separação nos diferentes cenários. ....	110



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

	<b>Inglês</b>	<b>Português</b>
CEBIME		Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural
COM	Cost of Manufacturing	custo de manufatura
COX		Ciclo-oxigenase
Da	Dalton	Dalton
FCI	Fixed capital investment	capital fixo de investimento
GPC	Gel permeation chromatography	Cromatografia de permeação em gel
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography	Cromatografia líquida de alta pressão
IgE		Imunoglobulina E
IL		Interleucinas
LC	Labor Cost	Custo operacional
LCP		Laboratório de Controle de Processos
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser/desorption ionization time-of-flight mass spectrometry	
MCD	Mast-cell-degranulating	Desgranulador de matócitos
NLS		Nanopartícula lipídica sólida
NO	Nitric oxide	Óxido nítrico
PLA2	Phospholipase A2	Fosfolipase A2
RCM		Custo da matéria-prima
ROS	Reactive oxygen species	Espécies reativas e oxigênio
RP-HPLC	Reversed phase HPLC	HPLC de fase reversa
siRNA	small interfering RNA	
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alfa	Fator de necrose tumoral alfa
UC	Utility Cost	Custo de utilidades

WTC	Waste Treatment Cost	Custo do tratamento de resíduos
FPLC	Fast protein liquid chromatography	
SMB		
EC		Eletroforese capilar
CERMAT		Núcleo de Pesquisas em Materiais Cerâmicos e Compósitos
Dp		Diâmetro médio da partícula
PDI		Índice de Polidispersão
PZ		Potencial Zeta
$\alpha$		Seletividade
N		Eficiência
k'		Fator de retenção
Rt		Tempo de retenção
Rs		Resolução



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>1 OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
1.1 OBJETIVO GERAL .....	25
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
Dentre os objetivos específicos, destacam-se: .....	25
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>27</b>
2.1 COMPONENTES DA APITOXINA .....	27
2.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DA MELITINA .....	32
2.3 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E MECANISMOS DE AÇÃO DA MELITINA .....	34
<b>2.3.1 Atividade lítica</b> .....	<b>34</b>
<b>2.3.2 Efeito anti-inflamatório, anestésico e nociceptivo</b> .....	<b>36</b>
<b>2.3.3 Influências sobre a pressão arterial</b> .....	<b>39</b>
<b>2.3.4 Atividade anticancerígena</b> .....	<b>40</b>
<b>2.3.5 Epilepsia</b> .....	<b>43</b>
<b>2.3.6 HIV</b> .....	<b>43</b>
2.4 DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS PARA ENTREGA CONTROLADA DE FÁRMACOS CONTENDO MELITINA .....	45
2.5 PROTOCOLO PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS .....	48
<b>2.5.1 Etapas preliminares</b> .....	<b>50</b>
2.5.1.1 Extração .....	50
2.5.1.2 Precipitação .....	50
2.5.1.3 Ultracentrifugação .....	51
<b>2.5.2 Estratégias de purificação</b> .....	<b>51</b>
2.5.2.1 Cromatografia por exclusão de tamanho .....	52
2.5.2.2 Separação com base na carga ou hidrofobicidade .....	53

2.5.2.2.1	<i>Cromatografia de troca iônica</i> .....	53
2.5.2.2.2	<i>Cromatografia por afinidade</i> .....	53
2.5.2.2.3	<i>Cromatografia por imunoafinidade</i> .....	54
2.5.2.2.4	<i>Cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC)</i> .....	54
2.5.2.3	Liofilização .....	56
2.5.2.4	Ultrafiltração .....	57
2.6	SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA MELITINA .....	57
2.7	O PROCESSO DE LEITO MÓVEL SIMULADO (SMB) .....	60
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>65</b>
3.1	PRIMEIRA ETAPA: DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MELITINA PURIFICADA A PARTIR DA APITOXINA.....	65
3.1.1	Coleta do veneno bruto.....	65
3.1.2	Preparo de amostras .....	66
3.1.3	Caracterização da massa molecular por espectrometria MALDI-TOF .....	66
3.1.4	Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	67
3.1.5	Purificação da melitina em HPLC-analítico.....	67
3.1.5.1	Preparação das amostras para análise em HPLC-analítico .....	70
3.1.5.2	Coleta das frações encontradas em análise de HPLC-analítico.....	70
3.2	SEGUNDA ETAPA: ENCAPSULAMENTO DA MELITINA .	71
3.2.1	Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs)	71
3.2.2	Caracterização das nanopartículas .....	73
3.2.2.1	Diâmetro Médio (Dp) e Índice de Polidispersão (PDI).	73
3.2.2.2	Potencial Zeta (PZ) .....	73
3.3	TERCEIRA ETAPA: AVALIAÇÃO ECONÔMICA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO .....	73
3.3.1	Determinação das escalas dos cenários avaliados .....	74

<b>3.3.2 Determinação do custo da fase estacionária .....</b>	<b>75</b>
<b>3.3.3 Determinação do custo de manufatura (COM) .....</b>	<b>76</b>
3.3.3.1 Custos diretos .....	76
3.3.3.2 Custo operacional (LC) .....	76
3.3.3.3 Custo de utilidades (UC) .....	77
3.3.3.4 Custo da matéria-prima (RCM).....	78
3.3.3.5 Custo do tratamento de resíduos (WTC).....	78
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1 PRIMEIRA ETAPA: DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MELITINA PURIFICADA A PARTIR DA APITOXINA .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1.1 Coleta do veneno.....</b>	<b>81</b>
<b>4.1.2 Caracterização do veneno bruto .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1.3 Purificação do veneno bruto.....</b>	<b>83</b>
4.1.3.1 Etapas iniciais da purificação: preparação da amostra ...	83
4.1.3.2 Isolamento da melitina .....	83
4.1.3.3 Purificação refinada do veneno bruto utilizando equipamento de RP-HPLC .....	88
4.1.3.4 Avaliação da pureza da melitina obtida pelo Método 6	95
<b>4.1.4 Considerações sobre a primeira etapa.....</b>	<b>101</b>
<b>4.2 SEGUNDA ETAPA: ENCAPSULAMENTO DA MELITINA</b>	<b>102</b>
<b>4.2.1 Avaliação da estabilidade da melitina .....</b>	<b>102</b>
<b>4.2.2 Produção de melitina em escala analítica.....</b>	<b>104</b>
<b>4.2.3 Preparação de NLSs contendo melitina .....</b>	<b>105</b>
<b>4.2.4 Considerações sobre a segunda etapa.....</b>	<b>106</b>
<b>4.3 TERCEIRA ETAPA: AVALIAÇÃO ECONÔMICA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO .....</b>	<b>107</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>115</b>
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	116
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>117</b>



## INTRODUÇÃO

A necessidade de medicamentos e tratamentos mais específicos e eficazes tem forçado os pesquisadores a procurar soluções alternativas em campos mais ortodoxos. Neste sentido, diversas pesquisas têm focado na produção de fármacos que utilizam como matéria-prima recursos biológicos. A investigação de compostos bioativos provenientes da natureza e a consequente formulação de novos produtos terapêuticos é uma atividade conhecida como bioprospecção e, segundo a Organização Mundial de Saúde, nos últimos anos resultou em diversos compostos farmacêuticos provenientes tanto de pesquisas com plantas, quanto de animais.

Toxinas de origem animal têm sido alvo de inúmeras pesquisas de bioprospecção pelo fato de que essas toxinas representam um recurso valioso e pouco explorado de componentes bioativos, os quais podem auxiliar na cura de doenças que não respondem às terapias atualmente disponíveis. Diversos organismos produzem toxinas como instrumento de defesa contra possíveis predadores. As ações fisiológicas são variadas, podendo imobilizar ou até matar a presa. Bem abaixo das doses agressivas, as toxinas podem ter ações fisiológicas desejáveis e até terapêuticas. Vários organismos venenosos do reino animal, os quais usam toxinas como instrumento de defesa, tais como répteis, peixes, anfíbios e mamíferos, estrelas do mar, ouriços do mar, caramujos, polvos, aracnídeos, insetos, miriápodes e alguns cnidários, são alvo de numerosos estudos em toxicologia pelo seu potencial biotecnológico e terapêutico. Nos EUA, dos 150 medicamentos vendidos sob prescrição médica atualmente em uso, 27 deles são de origem animal e suas respectivas comercializações geram bilhões de dólares anualmente (SANTOS et al., 2011).

A apitoxina, veneno produzido pela abelha *Apis mellifera*, é abundante em peptídeos biologicamente ativos. O uso da apitoxina com finalidades terapêuticas é muito antigo e veio da observação de que os apicultores recebiam muitas picadas e não apresentavam problemas de reumatismo. A utilização da picada deliberada de abelhas em humanos (chamado de apiterapia) é um método comumente empregado como terapia alternativa. De acordo com os praticantes da apiterapia, o veneno de abelha contém agentes anti-inflamatórios que aliviam a dor crônica e pode ser usado para tratar várias doenças, incluindo vários tipos de artrite, problemas neurológicos, tais como a esclerose múltipla, dor lombar, dor de cabeça e enxaqueca, e doenças da pele (tais como eczema, psoríase e herpes) (ACS, 2008). No entanto, a apiterapia possui

limitações devido a ação deletéria provocada por alguns componentes presentes na apitoxina, atribuídos, principalmente, às enzimas fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) e hialuronidase, podendo causar efeitos colaterais em pacientes alérgicos (ORSOLIC, 2012).

Nos últimos anos, devido à comprovação científica de alguns dos seus efeitos terapêuticos, atribuídos principalmente ao composto majoritário da apitoxina, a melitina, a procura por esse composto tem aumentado em diversos países, elevando a cotação da apitoxina no mercado internacional (MAIA, 2002). No entanto, apesar do porte do setor apícola nacional, a participação brasileira neste mercado tem-se mantido muito aquém de suas potencialidades.

Dentre os constituintes da apitoxina, a melitina (fração correspondente a aproximadamente 50 % em massa do veneno seco) tem atraído grande atenção devido ao seu potencial farmacológico comprovado ao longo dos anos. Algumas de suas propriedades medicinais relatadas são:

- estimula a hipófise-adrenal na liberação catecolaminas e corticol, o que lhe confere efeito anti-inflamatório que alivia a dor crônica (LEE et al., 2005);
- possui amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo capaz de combater diversos patógenos (WEINBERG, 2001);
- age no sistema cardiovascular, provocando contração dos músculos lisos e do músculo cardíaco. Promove, deste modo, a contração dos capilares e diminuição da pressão arterial (MARSH e WHALER, 1980);
- atua no sistema nervoso central, bloqueando a transmissão de impulsos nervosos, o que provoca um efeito anestésico (LEE et al., 2001);
- tem sido aplicada na elaboração de formulações cosméticas destinadas à recuperação do tecido epidérmico, porém sem comprovação de sua eficácia. Suspeita-se que ela interaja sinergicamente com as fibras do colágeno. Desta forma, a melitina tem sido apontada como uma potencial substituta da toxina botulínica no tratamento cosmético facial (TRILIVAS, 2001);
- inibe o crescimento tumoral via estimulação de resposta imunológica (ATTIA et al., 2008; LIU et al., 2008), bem como pela necrose de tecido tumoral e indução da apoptose (WANG et al., 2009). Diversos tipos de câncer, incluindo leucemia e câncer de rins, pulmões, fígado, próstata, mamas e bexiga, têm

sido identificados como alvos para ação da melitina (SON et al., 2007);

A melitina possui um grande potencial farmacológico. Porém, visto que os demais constituintes da apitoxina podem apresentar ação deletéria, decorrentes do seu potencial alergênico, faz-se necessária a obtenção de melitina com elevado grau de pureza para sua eficiente aplicação na área farmacêutica. Todos esses compostos bioativos estão presentes na forma de misturas complexas no veneno, sendo sua separação e purificação uma tarefa difícil e, por sua vez, dispendiosa. Este processo constitui um problema tecnológico importante, o qual deve ser superado de modo a viabilizar a aplicação técnica e econômica da melitina.

O interesse nas propriedades medicinais, especialmente na propriedade anticancerígena da apitoxina e de seu constituinte majoritário, a melitina, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Isso se deve ao fato de que nas últimas décadas o número de pacientes diagnosticados com câncer e sua consequente mortalidade tiveram um aumento expressivo, criando, assim, enormes problemas de ordem clínica e econômica. A incidência crescente de tumores levou a necessidade de explorar novos fármacos e novas estratégias para o tratamento desta doença em particular. Atualmente, os cientistas estão somando esforços para encontrar uma cura para esta doença, pois, embora a terapia prescrita (sob a forma de cirurgia, radioterapia e quimioterapia) auxilie no combate da doença, os resultados ainda são pouco satisfatórios. O desenvolvimento de fármacos anticancerígenos eficientes bem como novas alternativas no tratamento de tumores são alguns dos principais desafios da ciência moderna (GAJSKI e GARAJVRHOVAC, 2013).

A melitina é um candidato em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos devido ao seu amplo espectro de propriedades líticas. Embora citotóxica para um largo espectro de células tumorais, esse peptídeo também apresenta toxicidade para células normais. Portanto, o seu potencial terapêutico não pode ser alcançado sem um sistema de entrega adequado. Tal fato pode ser superado através de ensaios utilizando nanopartículas, as quais possuem a capacidade de fornecer de forma segura uma quantidade significativa de melitina por via intravenosa, possibilitando a destruição de células tumorais de forma seletiva (PAN et al., 2011).

Ainda que seja possível encontrar na literatura referências que relatam o processo de obtenção de melitina a partir da apitoxina (CHEN

et al., 2006; JI et al., 1996; YE et al., 2000), grande parte dos estudos publicados são pouco descritivos e visam, principalmente, a avaliação do perfil peptídico do veneno, o que acaba tornando o processo de separação lento e oneroso. Estudos acerca da eficiente obtenção de melitina a partir do veneno bruto para posteriores aplicações ainda são escassos. Há, também, falta de informação na literatura no que diz respeito a sistemas de armazenagem/liberação de melitina através de nanopartículas, sendo esta uma área recentemente explorada, com pouquíssimos trabalhos publicados (SOMAN et al., 2009; PAN et al., 2011; HOOD et al., 2013).

Esta pesquisa pauta-se na valorização da biodiversidade nacional para a obtenção de produtos com elevada tecnologia e valor agregado. Nesse sentido, o presente trabalho propõe a busca por novas estratégias de obtenção de melitina com elevada pureza a partir do veneno bruto da abelha visando viabilizar sua aplicação tecnológica. Cabe ressaltar que essa etapa é fundamental para proposta da pesquisa em um âmbito global: a obtenção de formulações que utilizem a melitina como princípio ativo para o tratamento de doenças, dadas as propriedades do bioativo extensivamente comprovadas, partindo do veneno de abelha bruto. Para isso, também foram realizados estudos de viabilidade econômica do processo produtivo desenvolvido e propostos sistemas de armazenagem para liberação controlada de melitina *in vivo* inéditos.

Deve-se salientar ainda que o projeto está inserido em um contexto estratégico para o país, somando esforços para o fortalecimento da indústria de bioprocessos nacional. Reconhecidamente, nosso país apresenta carência de recursos humanos qualificados, além de tecnologias próprias, para o processamento de bioativos amplamente disponíveis na nossa fauna e flora. Desta forma, constata-se a recorrente necessidade de importação de produtos processados, muitas vezes a partir dos nossos próprios recursos naturais, para a utilização em aplicações farmacêuticas e médicas, por exemplo. A presente proposta contribui, portanto, para que esse cenário possa ser modificado.



## 1 OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo de obtenção de melitina a partir do veneno bruto da abelha *Apis mellifera*, com alto grau de pureza e economicamente atrativo, visando a preparação de nanopartículas lipídicas sólidas para liberação controlada deste peptídeo.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentre os objetivos específicos, destacam-se:

- investigar as técnicas de fracionamento capazes de purificar com eficiência satisfatória a melitina obtida a partir do veneno bruto de abelha;
- identificar as etapas relevantes e necessárias no processo de purificação da melitina;
- avaliar e elaborar um protocolo de purificação da melitina em escala analítica rápido e simplificado;
- obter melitina na forma sólida com elevado grau de pureza a partir do protocolo de purificação proposto para aplicar em pesquisas consequentes;
- realizar pesquisas envolvendo a melitina, obtida pelo processo de purificação proposto, no desenvolvimento de sistemas particulados de armazenagem e liberação de fármacos.
- propor o escalonamento do processo desenvolvido;
- verificar a viabilidade econômica da implementação de uma cadeia produtiva de melitina purificada em escalas piloto e comercial.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 COMPONENTES DA APITOXINA

A apitoxina, veneno produzido pela abelha *Apis mellifera*, compõe-se, principalmente, de peptídeos e enzimas, quase todos fisiologicamente ativos. A apitoxina é sintetizada na glândula de veneno das abelhas operárias e de abelhas-rainhas. A partir de uma mistura de secreções ácidas e básicas é formada uma secreção ácida com pH entre 4,5 e 5,5, a qual é armazenada em suas bolsas de veneno. Esse veneno é uma mistura complexa que contém moléculas orgânicas simples, proteínas, peptídeos e outros elementos bioativos, como carboidratos e lipídeos (ORSOLIC, 2012).

Por se tratar de um poderoso anti-inflamatório não-esteroidal, a apitoxina tem sido usada há séculos na medicina oriental para aliviar a dor e tratar doenças inflamatórias crônicas (ORSOLIC, 2012). Também tem sido usada em condições clínicas, tais como artrite, reumatismo e doenças de pele (eczema, psoríase e herpes) (ACS, 2008; SON et al., 2007). Recentemente, outras propriedades benéficas da apitoxina também foram descobertas, destacando-se: radioproteção (proteção contra os efeitos nocivos da radiação) (GAJSKI e GARAJ-VRHOVAC, 2009), antimutagênico (reduz a taxa de mutação) (VARANDA, MONTI e TAVARES, 1999), antinociceptiva (redução da capacidade de perceber a dor) (BEAK et al., 2006) e, nos últimos anos, efeitos anticancerígenos (GAJSKI e GARAJ-VRHOVAC, 2013). Logo, a apitoxina tem apresentado potencial como possível composto terapêutico.

Na Tabela 1 encontram-se relacionados seus principais componentes, agrupados por faixas de peso molecular e seus respectivos efeitos biológicos. Observa-se que os componentes com peso molecular abaixo de 1.000 Da consistem, principalmente, de pequenos peptídeos e monoaminas. Na faixa entre 1.000 e 10.000 Da encontram-se numerosos polipeptídeos, com amplo predomínio da melitina. Acima de 10.000 Da ocorrem diversas enzimas, com amplo predomínio da fosfolipase A<sub>2</sub><sup>1</sup> (PLA<sub>2</sub>). No total, a apitoxina contém cerca de 20 substâncias ativas.

---

<sup>1</sup>As fosfolipases pertencem a uma grande família de enzimas que realizam a clivagem de fosfolipídios da membrana celular em ácidos graxos e lisofosfolipídios. A fosfolipase A<sub>2</sub> é uma enzima envolvida no processo inflamatório. A fosfolipase A<sub>2</sub> catalisa a hidrólise do 2º ácido graxo do fosfolipídeo de membranas celulares, liberando ácido araquidônico e iniciando a via metabólica do ácido araquidônico, importantíssima no processo inflamatório.

Tabela 1 - Principais componentes da apitoxina e seus efeitos biológicos.

Classe	Componente	Massa molar (Da)	% do veneno seco	Efeito fisiológico
Enzimas	Hialuronidase	41000	2%	Ataca seletivamente polímeros do ácido hialurônico presente no tecido conjuntivo; aumenta a permeabilidade capilar; tem efeitos sobre a resposta imune e a difusão pelo tecido; antigênica; catalisa a hidrólise de proteínas, permitindo assim a penetração do veneno para o tecido; dilata os vasos sanguíneos e aumenta a sua permeabilidade, causando um aumento da circulação sanguínea; alergênico.
	Fosfolipase A2	20000	12%	Citotóxica contra células cancerosas; efeitos inflamatórios; efeitos antitumorais; destrói fosfolípidos e dissolve a membrana celular; reduz a coagulação do sangue e a pressão sanguínea; é o alérgeno mais forte e, assim, o componente mais prejudicial do veneno.
Peptídeos	Adolapina	11500	1%	Inibição da atividade da PLA2 e COX; atividade anti-inflamatória; inibe as enzimas específicas do cérebro ciclooxigenase e lipooxigenase; diminui inflamações de reumatismo, diminui a dor; inibe a agregação de eritrócitos; relativamente baixa toxicidade.  Principal componente biologicamente ativo; aumenta a atividade de PLA2; citotóxica contra células cancerosas; efeitos anti-inflamatórios e antiarrítmicos; possui atividade sobre membranas, diminuindo a tensão superficial; anti-inflamatório em doses muito pequenas; estimula os músculos lisos; aumenta a permeabilidade capilar aumentando a circulação sanguínea e redução da pressão arterial, reduz a coagulação do sangue, imunostimulante e imunossupressora; radioproteção influencia o sistema nervoso central; anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, antiviral; doses mais elevadas são inflamatórias e hemolítica.
	Melitina	2847	50%	
	Peptídeo MCD	2500	3%	Efeito anti-inflamatório e analgésico; liberação de histamina (baixa dose); inibição da liberação de histamina (dose elevada); efeito antialérgico; ação lítica em mastócitos, liberando histamina, serotonina, e heparina; aumenta a permeabilidade capilar; estimula o sistema nervoso central.
	Tertiapina	2500	0,1%	
	Cardiopep	2500	<0,7%	Peptídeos, com um papel incerto na ação fisiológica do veneno; efeitos antirradiação; cardiopep tem efeitos antiarrítmicos.
	Apamina	2027	3%	Inibição dos canais ativados por Ca <sup>2+</sup> e K <sup>+</sup> ; efeito citotóxico contra o câncer; efeito nociceptivo; propriedades anti-inflamatórias; estimula a liberação de cortisona, ação antiserotonina; imunossupressor, estimula o sistema nervoso central em doses muito pequenas; doses mais elevadas são neurotóxicas.
Aminas	Histamina, dopamina, noradrenalina, neurotransmissores	<500	<1%	Dilata os vasos sanguíneos, aumentando a permeabilidade dos capilares sanguíneos e aumenta a circulação sanguínea; estimula os músculos lisos; alergênicos.

Fonte: adaptado de ORSOLIC, 2012.

O conhecimento da composição e mecanismo de ação do veneno de abelha não havia sido estabelecido até os anos 1970 devido à indisponibilidade de métodos adequados de análise. Deste modo, até essa época, todos os efeitos da apitoxina haviam sido atribuídos à atividade da enzima fosfolipase. O desenvolvimento de técnicas, tais como eletroforese, cromatografia, filtração por permeação em gel, em combinação com análises farmacológicas e bioquímicas, permitiu a

identificação adequada de todos os componentes ativos do veneno de abelha (LIMA e BROCHETTO-BRAGA, 2003). A investigação dos componentes presentes na apitoxina tem sido realizada a bastante tempo, sendo o trabalho desenvolvido por Habermann (1972) um dos primeiros nessa linha. Desde então, diversos estudos têm sido realizados a respeito da caracterização dos componentes da apitoxina, bem como de seus mecanismos de ação (SON et al., 2007). Muitos destes componentes foram isolados e caracterizados e as suas estruturas primárias foram determinadas por técnicas bioquímicas (LIMA e BROCHETTO-BRAGA, 2003). Son et al. (2007) relataram que o veneno de abelha contém uma variedade de peptídeos, incluindo a melitina, a apamina, a adolapina e o peptídeo MCD, enzimas (PLA<sub>2</sub> e hialuronidase), aminas biologicamente ativas (histamina e epinefrina) e componentes não peptídicos, os quais têm uma variedade de propriedades farmacêuticas.

O emprego da apitoxina na terapia alternativa como um potente anti-inflamatório se deve ao fato de que este composto pode modificar as funções do sistema imunológico do corpo e contribuir para o aumento da produção de cortisol, que por sua vez tem atividade anti-inflamatória. Esta estimulação da produção de cortisol é o que confere à apitoxina o potencial de tratamento para artrite e reumatismo (SON et al., 2007). Estudos recentes relataram uma variedade de mecanismos de funcionamento para o efeito antiartrítico e anti-inflamatório da apitoxina e seus constituintes. A diminuição da atividade das enzimas ciclo-oxigenase<sup>2</sup>(COX-2) e PLA<sub>2</sub> e a diminuição dos níveis de interleucinas<sup>3</sup> IL-1 e IL-6, óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alfa<sup>4</sup> (TNF- $\alpha$ ) e espécies reativas e oxigênio<sup>5</sup> (ROS) está associada com o efeito antiartrítico da melitina.

Além da melitina, outros componentes presentes na apitoxina possuem potencial terapêutico. A adolapina também apresenta propriedades anti-inflamatórias. Os efeitos de adolapina são devido, presumivelmente, à sua capacidade de inibir o sistema de síntese de

---

<sup>2</sup>Enzima responsável pela formação de importantes medidores biológicos chamados prostanóides. A inibição farmacológica da COX pode causar alívio aos sintomas da inflamação e da dor.

<sup>3</sup>As interleucinas possuem várias funções, a maioria delas está envolvida na ativação dos linfócitos e na indução da divisão de outras células.

<sup>4</sup>Citocinas capaz de provocar a morte de células (apoptose) tumorais e que possuem uma vasta gama de ações pró-inflamatórias.

<sup>5</sup>São compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, HO).

prostaglandina por meio de propriedades inibitórias da COX. Esse peptídeo ainda apresenta efeitos analgésicos e antifebril (SON et al., 2007).

Em contraste à melitina, a apamina possui um modo de ação altamente específico. Esse peptídeo exerce influência sobre as membranas pós-sinápticas do sistema nervoso central e periférico. Mostrou-se que a apamina é um bloqueador de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ . Inibiu significativamente tanto a contração induzida da traqueia quanto a liberação de histamina a partir de tecidos pulmonares, sugerindo que este composto reduz a inflamação alérgica das vias respiratórias através de um efeito estabilizador dos mastócitos (SON et al., 2007).

O peptídeo desgranulador de mastócitos (MCD - *mast-cell-degranulating*) tem forte influência sobre as alergias, distúrbio este que afeta aproximadamente 20 % da população. A sua atividade biológica é variada. Em concentrações muito baixas, é o composto natural mais potente a promover a liberação de histamina através da desgranulação dos mastócitos. Por outro lado, em concentrações mais altas, apresenta o comportamento inverso, possui uma atividade antialérgica através da inibição da liberação de histamina proveniente de mastócitos. Supõe-se que essa ambiguidade esteja relacionada com a interação do peptídeo com a imunoglobulina E (IgE), que esta associada a reações alérgicas (SON et al., 2007).

Em contrapartida, alguns dos componentes da apitoxina podem apresentar ação deletéria. Dentre eles destacam-se as enzimas que, devido à sua faixa de massa molecular, são potencialmente alergênicas. As mais destacadas na literatura são a  $\text{PLA}_2$ , a hialuronidase e a fosfatase ácida.

Fosfolipase A2 ( $\text{PLA}_2$ ) é o nome atribuído a todas as enzimas capazes de retirar, por meio de hidrólise, o ácido graxo situado na posição 2 da molécula de lecitina e substratos similares (fosfodiácilgliceróis), substâncias largamente presentes nas membranas celulares. Esta enzima está naturalmente presente em todos os seres vivos, sendo que os pesos moleculares, as estruturas químicas e as funções paralelas a ela associadas variam acentuadamente conforme o organismo produtor, acarretando os mais diversos espectros de efeitos fisiológicos. Dependendo da origem, a  $\text{PLA}_2$  pode acarretar efeitos anticoagulantes e inflamatórios. No entanto, estas ações tóxicas estão relacionadas a porções da molécula distintas do centro ativo responsável pela atividade enzimática (NICOLAS et al., 1997). Na apitoxina existem duas estruturas de  $\text{PLA}_2$ , ambas com peso molecular da ordem de

11.000 Da e estruturas bem caracterizadas (MAIA, 2002). Usualmente considera-se o teor médio de 12 % mas, segundo Schumacher, Egan e Tanner (1996), as concentrações podem variar de 1,8 a 27,4 % m/m, sendo geralmente maiores nas abelhas africanas que nas europeias. Em pequenas doses, a PLA<sub>2</sub> da apitoxina não apresenta danos, exceto para pessoas alérgicas. Em doses elevadas (por exemplo, associadas a centenas de picadas simultâneas) ocorrem efeitos tóxicos associados à inibição da agregação de plaquetas (HAKALA et al., 1999; WATALA e KOWALCZYK, 1990), necroses nas células do músculo esquelético (OWNBY et al., 1997) e do pâncreas (MOSSNER et al., 2000).

A hialuronidase é uma enzima facilitadora da difusão de líquidos. Esta, age despolimerizando reversivelmente o ácido hialurônico existente ao redor das células do tecido conjuntivo, reduzindo temporariamente a viscosidade desse tecido e tornando-o mais permeável à difusão de líquidos. Com isso, propicia a difusão dos demais componentes do veneno (MAIA, 2002).

A fosfatase ácida da apitoxina é considerada o principal alergênico em 18% dos pacientes alérgicos (KETTNER et al., 1999). Esta enzima está associada à liberação de histamina dos basófilos humanos, além de produzir inflamação e ardor na pele (MAIA, 2002).

Son e colaboradores (2007) demonstraram que diversos estudos experimentais e clínicos evidenciaram que a terapia com veneno de abelha pode ser usada como um tratamento alternativo para várias doenças, tais como artrite, dor, e câncer. De fato, já é possível encontrar produtos elaborados para essas finalidades, tais como cremes tópicos para aliviar dores, inflamações e combater o reumatismo. No entanto, várias preocupações surgem a respeito do uso da apitoxina *in natura*. A via de injeção, a dose, o sistema de entrega e, principalmente, os efeitos colaterais precisam ser considerados com cuidado antes do tratamento clínico com apitoxina.

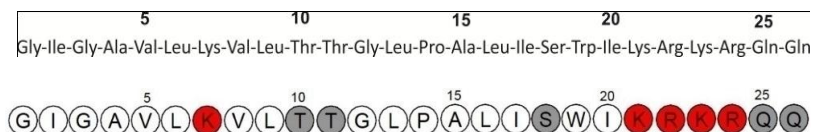
A aplicação terapêutica da apitoxina já foi amplamente comprovada. Não se trata de uma opção desprovida de riscos, mas existem recursos tecnológicos para que sejam amplamente minimizados. Os componentes mais alergênicos da apitoxina são as enzimas com peso molecular acima de 10.000 Da e os de interesse terapêutico são cadeias com peso molecular entre 2.000 e 3.000 Da, além de outros ainda menores. Partindo desta premissa, pode-se conseguir uma drástica redução da alergenicidade do veneno de abelha mediante técnicas de fracionamento por peso molecular, como a cromatografia em coluna, a diálise e a ultrafiltração.

Sob a óptica financeira, a apitoxina é uma fonte valiosa, cujo aproveitamento está muito abaixo de suas potencialidades, apesar da posição de destaque já ocupada pela apicultura brasileira no mercado mundial, principalmente através da própolis. Isto se deve às dificuldades ainda encontradas no Brasil para o fracionamento adequado da apitoxina e, até mesmo, para o fornecimento de garantias de autenticidade e pureza do produto.

## 2.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DA MELITINA

A melitina ( $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$ ) é o principal componente do veneno de abelha e representa, aproximadamente, 50 % da massa do veneno seco. É formada a partir de sua precursora, a promelitina, durante a sua síntese na abelha e formilada em uma fase posterior, ainda dentro do organismo da abelha. Constitui-se em um peptídeo catiônico com 26 resíduos de aminoácidos (conforme pode ser observado na Figura 1) e sua massa molar é de 2847,5 Da. A melitina possui uma extremidade amino-terminal, composta, predominantemente, por aminoácidos hidrofóbicos (resíduos 1-20) e uma extremidade carboxi-terminal composta, principalmente, por aminoácidos hidrofílicos (resíduos 21-26). O peptídeo tem uma carga líquida positiva de  $z = 5$  devido à presença de três lisinas e duas argininas. Quatro desses resíduos formam um cluster (-KRKR) na extremidade carboxi-terminal. A lisina-7 (K-7) está incorporada na região amino-terminal (hidrofóbica) do peptídeo. Em particular, a distribuição assimétrica de aminoácidos não-polares e polares produz uma estrutura anfifílica quando o peptídeo adota a conformação  $\alpha$ -hélice (KLOCEK e SEELIG, 2008).

Figura 1- Representação esquemática da sequência de aminoácidos da melitina. Os resíduos hidrofóbicos estão representados pelos círculos em branco, os resíduos polares estão indicados pelos círculos em cinza, enquanto que os resíduos carregados positivamente estão representados pelos círculos em vermelho.



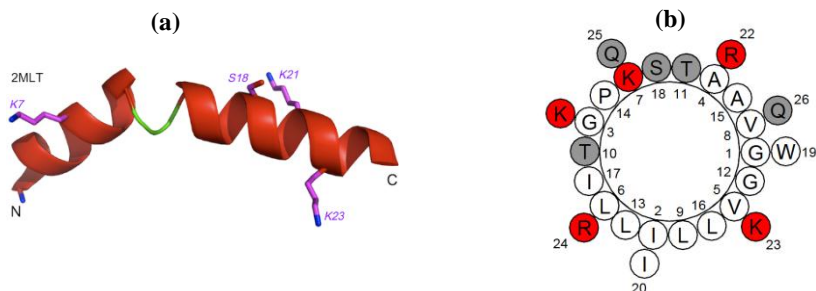
Fonte: adaptado de Klocek e Seelig (2008).

Rex e Schwarz (1998) determinaram a estrutura cristalina da melitina em solução aquosa por análise de raios X, com alta resolução de 2 Å, conforme pode ser observado na Figura 2a. Cada molécula é



composta por dois segmentos  $\alpha$ - helicoidais com uma inclinação devido à presença da prolina na posição 14. Por conseguinte, a forma geral é chamada de "haste dobrada".

Figura 2 - (a) Estrutura cristalina  $\alpha$ -hélice da melitina; (b) Diagrama de roda helicoidal da melitina: aminoácidos polares e carregados positivamente estão representados em cinza e vermelho, respectivamente.



Fonte: (a) adaptado de Rex e Schwarz (1998); (b) adaptado de Klocek e Seelig (2008).

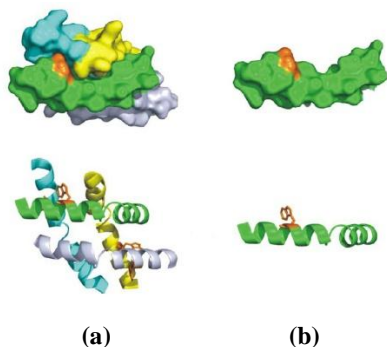
Embora a melitina contenha uma elevada proporção de aminoácidos hidrofóbicos, apresenta alta solubilidade em água e solubilidade moderada em metanol. Além disso, é muito sensível às condições da solução e pode adotar diferentes conformações e estados de agregação em solução aquosa: é amplamente desestruturada em água, mas forma uma  $\alpha$ -hélice ao ligar-se a membranas lipídicas (BECHINGER e LOHNER, 2006).

Em baixa concentração e baixa força iônica a melitina ocorre, principalmente, como um monômero com conformação de hélice aleatória. Todavia, quando a concentração do peptídeo e/ou a concentração de sal é aumentada, ocorre agregação em um tetrâmero de estrutura de  $\alpha$ -hélice (Figura 3) (LADOKHIN e WHITE, 2001; MONETTE e LAFLEUR, 1995; SHAI, 2002).

O pH da solução aquosa também influencia os estados conformacionais do peptídeo, o qual se apresenta na forma de tetrâmero nas concentrações em que se encontram dentro dos sacos de venenos das abelhas. Quando nesta conformação, provoca a despolarização das terminações nervosas, causando dor. Quay e Condie (1983) observaram modificação da conformação da melitina para um tetrâmero a pH elevado, apesar da concentração e da força iônica da solução serem mantidas a um nível baixo. Em concentração mínima necessária para o rompimento celular, ela se encontra na forma monomérica. Dessa forma, os estudos têm mostrado que a auto-associação/agregação do

peptídeo é um processo complexo e depende da concentração do mesmo e das propriedades da solução, tais como força iônica e o pH (KLOCEK e SEELIG, 2008).

Figura 3 - Representação da melitina na forma de: (a) tetrâmero (ocorrência natural) e (b) monômero.



Fonte: WEINBERG (2011).

A melitina é conhecida por exercer uma variedade de efeitos sobre as membranas celulares. Ela induz alterações estruturais das membranas, tais como a formação de poros, fusão, e formação de vesículas. Estas alterações morfológicas nas membranas podem ser atribuídas à capacidade que esse peptídeo possui de induzir a secreção de hormônios, além da habilidade de agregar proteínas nas membranas plasmáticas e alterar o potencial de membranas. Ademais, a melitina estimula diversas enzimas, incluindo a proteína-G, a proteína-quinase C, a adenilato-ciclase, as fosfolipases C2 e D e, principalmente, a PLA<sub>2</sub>, aumentando em até cinco vezes a sua atividade (ORSOLIC, 2012). As habilidades da melitina de modificar membranas celulares e estimular enzimas são responsáveis por conferir diversas de suas propriedades terapêuticas.

## 2.3 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E MECANISMOS DE AÇÃO DA MELITINA

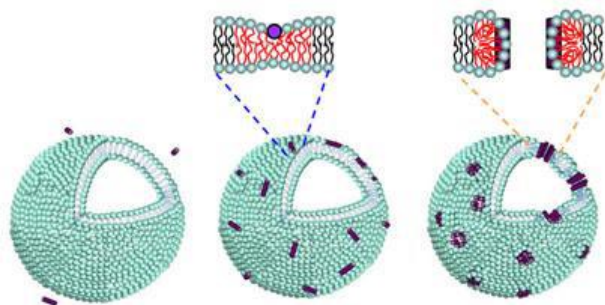
### 2.3.1 Atividade lítica

Este peptídeo é uma molécula anfótera devido à disposição específica dos aminoácidos na cadeia. Esse caráter anfifílico confere uma ação lítica à melitina, agindo como um detergente natural de elevada atividade interfacial. Embora seja solúvel em água como um

monômero ou tetrâmero, este polipeptídeo rapidamente se incorpora nas membranas naturais e sintéticas. Sua baixa especificidade, no entanto, permite que a mesma interaja com todas as membranas lipídicas (HOSKIN e RAMAMOORTHY, 2008). Esse atributo permitiu que a mesma fosse usada como um peptídeo modelo adequado para o monitoramento de interações lipídeo-proteína em membranas celulares (RAGHURAMAN e CHATTOPADHYAY, 2007), tornando-a o composto mais importante para esse tipo de estudo.

A base da ação lítica é a ruptura física e química da estrutura da membrana, resultando na formação de poros e em um profundo comprometimento da barreira de permeabilidade da célula (YANG et al., 2001). Os atributos tóxicos da melitina advêm justamente de suas propriedades hemolíticas, uma vez que a mesma promove ruptura dos eritrócitos logo após o contato com essas células, como esquematizado na Figura 4. No entanto, apesar de potencialmente tóxica para células eucariótica e procariótica, a melitina apresenta-se como um peptídeo com amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo capaz de combater diversos patógenos.

Figura 4 - Interação da melitina com eritrócitos.



Fonte: WEINBERG (2011).

Desta forma, mostrou-se que a melitina exerce efeitos inibitórios sobre a *Borrelia burgdorferi*, bactéria que causa a doença de Lyme (LUBKE e GARON, 1997). Também foi observado que a melitina mata leveduras *Candida albicans* (KLOTZ et al., 2004) e suprime infecções causadas pelas bactérias *Mycoplasma hominis* e *Chlamydia trachomatis* (LAZAREV et al., 2005). Um estudo de Asthana, Yadav e Ghosh (2004) demonstrou que é possível manter a atividade bactericida da melitina e modular sua atividade hemolítica substituindo-se alguns

resíduos de aminoácidos na cadeia. Neste estudo foram substituídas as leucinas 6 e 13 por alaninas, dando origem a dois novos peptídeos gerados a partir da melitina. Esses peptídeos mutantes apresentaram menor permeabilidade em membranas zwitteriônicas, porém, em vesículas lipídicas carregadas negativamente a permeabilidade se manteve inalterada. Ademais, a atividade antimicrobiana permaneceu a mesma nos novos peptídeos.

A interação melitina-lipídeo tem sido estudada extensivamente a fim de determinar a natureza dessa interação. No entanto, até o momento, o mecanismo molecular de atuação da melitina não foi completamente elucidado. Muitas evidências apontam que diferentes mecanismos ocorrem em distintas situações, conferindo, assim, uma gama de efeitos desse peptídeo. Estudos indicam que interações hidrofóbicas, e também eletrostáticas, estão envolvidas na ligação melitina-lipídeo. Ademais, mostrou-se que a melitina natural possui maior afinidade por membranas carregadas negativamente que por membranas zwitteriônicas (WEINBERG, 2011).

O colesterol também possui fortes influências sobre a atividade lítica da melitina. O colesterol presente nas células eucarióticas acaba por induzir uma formação compactada da membrana lipídica, reduzindo a capacidade de ligação entre peptídeos e a membrana. Além disso, o resíduo de aminoácido triptofano presente na melitina tem a capacidade de formar um complexo bastante estável com a molécula de colesterol. Os eritrócitos, que são um alvo natural da melitina, são ricos em moléculas de colesterol (WEINBERG, 2011).

Foi demonstrado que o colesterol reduz a atividade lítica da melitina. A concentração necessária para romper 50% das células analisadas foi 3 vezes menor em eritrócitos empobrecidos em colesterol do que em eritrócitos de controle. O  $LD_{50}$ <sup>6</sup> para a ruptura induzida pela melitina em eritrócitos normais foi de aproximadamente 0,67  $\mu$ M, enquanto em eritrócitos empobrecidos, o  $LD_{50}$  foi de apenas 0,21  $\mu$ M (RAGHURAMAN e CHATTOPADHYAY, 2005).

### **2.3.2 Efeito anti-inflamatório, anestésico e nociceptivo**

Além de sua poderosa atividade lítica e antibactericida, a melitina possui muitas outras propriedades terapêuticas. Sua propriedade anti-inflamatória é amplamente conhecida e a séculos é usada para tratar

---

<sup>6</sup>Em toxicologia, dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) é a dose necessária de uma dada substância ou tipo de radiação para matar 50% de uma população em teste.

diversas condições clínicas (ACS, 2008). A inibição de diversos aspectos da resposta inflamatória é de grande interesse. Apesar da grande variedade de classes farmacológicas e fármacos que têm sido usadas como analgésicos e anti-inflamatórios por décadas, existe uma busca contínua por novas alternativas, tanto pela baixa eficácia quanto pelos efeitos colaterais devido ao uso prolongado dos remédios tradicionais.

As terapias atuais utilizam-se de anti-inflamatórios não-esteroidais (aspirina, ibuprofeno e fenilbutazona) e esteróides (cortisona, prednisona e dexametasona). Todas elas têm efeitos colaterais acentuados devido à necessidade de tratamento permanente. Em especial, os fármacos esteroidais podem acarretar em impotência, edema, queda da resposta imunológica, crescimento excessivo dos cabelos e irregularidades cardíacas, além de úlceras e problemas renais. Pelo emprego da apitoxina, vários pesquisadores já demonstraram que é possível reverter a evolução da doença sem ocorrência de efeitos colaterais. (MAIA, 2002)

Outro aspecto importante na terapia contra inflamações e artrites empregando-se veneno de abelha é a via de injeção. Diversos estudos têm mostrado a relevância da acupuntura combinada com a apiterapia no tratamento de doenças (LEE et al., 2005). Os resultados sugerem que o local da aplicação das agulhas tem forte influência sobre o tratamento e que a acupuntura combinada com o veneno de abelha apresenta resultados muito mais satisfatórios (LEE et al., 2004).

Em um estudo realizado por Son e colaboradores (2007), dez pacientes diagnosticados com reumatismo receberam tratamento através de acupuntura combinada com veneno de abelha duas vezes por semana durante 3 meses. O estudo mostrou melhora notável em 2 pacientes, boa melhora em 5 casos e melhora efetiva em 2 casos.

Ainda no mesmo estudo foi reportado o extenso mecanismo anti-artrítico e anti-inflamatório da melitina através da redução da atividade das enzimas COX-2 e PLA<sub>2</sub> e dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, NO e ROS. Além disso, outros trabalhos comprovaram que a melitina inibe o edema (CHANG e BLIVEN, 1979) e a nocicepção (LEE et al., 2001), bem como sinais inflamatórios em ratos (LEE et al., 2005) e a inflamação articular em coelhos (THOMSEN et al., 1984). Finalmente, observou-se que o veneno de abelha reduz a produção de mediadores inflamatórios de artrite em modelos animais (LEE et al., 2005).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos induzidos pelo veneno da abelha.

Foi demonstrado, por exemplo, que o mesmo inibe a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), enzima responsável pela formação de importantes mediadores biológicos chamados prostanóides (a inibição farmacológica das COXs pode causar alívio aos sintomas de inflamação e dor), bem como a produção de citocinas inflamatórias e do óxido nítrico (NO), induzida por diferentes estímulos inflamatórios. Foi ainda reportado que a melitina aumentou a produção de cortisol em macacos e cães, um efeito que pode também contribuir para a sua atividade anti-inflamatória (MERLO et al., 2011).

Além da poderosa atividade anti-inflamatória, a melitina também apresenta atividade analgésica. É sabido que a picada de abelha inicialmente produz dor e hiperalgesia (sensibilidade exagerada a dor ou sensação elevada a estímulos dolorosos). Porém, há muitas evidências de que a melitina apresenta efeito anestésico sobre inflamações. Como dito anteriormente, o veneno de abelha tem sido usado para aliviar a dor e tratar doenças inflamatórias crônicas. Injeções subcutâneas de melitina através de acupuntura têm sido usadas para produzir um potente efeito analgésico.

Kwon et al. (2001) relataram um efeito anti-nociceptivo de injeções de veneno de abelha em um ponto de acupuntura específica (ponto Zusanli) em pacientes com artrite crônica. Em comparação com uma injeção num ponto não acupunturístico, o veneno de abelha reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela artrite. Isto sugere que uma injeção de melitina diretamente num ponto de acupuntura pode produzir um efeito anti-nociceptivo potente.

Os efeitos anti-inflamatórios e anti-nociceptivos do veneno da abelha e da melitina em uma reação inflamatória localizada também têm sido relatados por Lee et al. (2001). Em animais normais, uma injeção de veneno de abelha no membro posterior resultou num ligeiro aumento no nível de expressão da proteína c-Fos<sup>7</sup> na medula espinhal, sem produzir qualquer comportamento nociceptivo detectável ou hiperalgesia. Em seguida, um pré-tratamento com veneno de abelha antes da injeção de carragenina suprimiu o edema da pata e a hiperalgesia térmica provocada pela carragenina. Estes resultados sugerem que o pré-tratamento com melitina tem efeitos anti-nociceptivos e anti-inflamatórios contra a dor inflamatória induzida pela

---

<sup>7</sup>Está envolvida em mecanismos celulares importantes, incluindo a proliferação celular, diferenciação e sobrevivência. Foi descoberto que a proteína c-Fos contribui para a indução da apoptose.

carragenina. Logo, isto também sugere que a melitina pode ser útil no tratamento da dor e edema associado às doenças inflamatórias crônicas.

O mecanismo preciso da ação anti-nociceptiva da melitina ainda não foi completamente elucidado, mas vários mecanismos têm sido propostos. Na revisão literária de Son e colaboradores (2007), diversos desses possíveis mecanismos estudados são descritos.

### **2.3.3 Influências sobre a pressão arterial**

Com o tratamento secular de bursites, artrites, tendinites e reumatismo, logo surgiu o interesse de se investigar a interferência da melitina sobre o sistema cardiovascular. Estudos mostraram que o veneno de abelha bruto produzia uma resposta hipotensiva em gatos, ratos e sapos. (MARSH E WHALER, 1980)

Marsh e Whaler (1980) investigaram mais profundamente o efeito do veneno sobre o sistema cardiovascular. No estudo, os efeitos cardiovasculares do veneno de abelha e seus principais constituintes, melitina e PLA<sub>2</sub> foram monitorados ao serem injetados em ratos anestesiados e em corações de ratos isolados. Injeções do veneno bruto (5-20 µg) paralisaram os corações isolados irreversivelmente em 30-60 s. Nos animais anestesiados, o veneno bruto causou dois efeitos contrários de acordo com o nível de repouso dos ratos. Nos animais com uma pressão sanguínea média de 95/67 mmHg, o veneno (0,5 mg/kg) causou um aumento de cerca de 20 mmHg em 30 s; em animais com uma pressão sanguínea média de 138/112 mmHg, o veneno (0,7 mg/kg) causou uma queda acentuada. Em ambos os casos, a pressão arterial voltou aos níveis de pré-injeção após 5 min. A maioria desses efeitos foi atribuída ao constituinte principal do veneno, a melitina. Esta, paralisou irreversivelmente o coração isolado em 37-64 s usando-se uma quantidade de 20-40 µg, enquanto a PLA<sub>2</sub> não produziu qualquer efeito. Este estudo mostrou que a melitina é uma potente cardiotoxina.

Mais recentemente, e de uma forma mais aprofundada, os mesmos resultados foram corroborados por Kang et al. (2008). Em ratos anestesiados, a pressão arterial média, pressão sistólica, pressão de pulsação foram reduzidos pela injeção do veneno, mesmo que o batimento cardíaco tenha aumentado. As alterações apresentaram uma dependência direta com a dose injetada. Foi mostrado que o veneno de abelha induz depressão cardiovascular, diminuindo a pressão cardíaca e aumentando a concentração de magnésio ionizado no sangue.

Em contrapartida, outro estudo realizado em ratos com pressão arterial normal e ratos com pressão arterial baixa induzida por choque

hemorrágico, mostrou que a melitina aumenta a pressão arterial e reverte a hipotensão em situações de choques hemorrágicos. Verificou-se que a injeção de melitina em condições normais e hipotensas de pressão arterial produz respostas, aumentando os níveis de adrenalina, noradrenalina e vasopressina no plasma e aumenta a atividade da renina (enzima que regula a pressão arterial) (YALCIN e SAVCI, 2007).

### 2.3.4 Atividade anticancerígena

Um dos primeiros estudos a indicar o possível efeito antitumoral do veneno de abelha foi o de McDonald, Li e Mehta (1979). O grupo examinou as possíveis propriedades antitumorais do veneno de abelha estudando a mortalidade de apicultores profissionais. Analisando-se os obituários, os autores estabeleceram a causa de morte entre os apicultores e comparou-os com os da população em geral. O estudo mostrou que a incidência de mortalidade por câncer nos apicultores que foram expostos ao veneno durante a vida de trabalho era ligeiramente inferior do que na população em geral. Além disso, a mortalidade por câncer de pulmão foi significativamente mais baixa nos apicultores em comparação com a população. Em contrapartida, a mortalidade por outras doenças era igual ao resto da população em geral. O estudo sugeriu que o veneno de abelha poderia possuir efeito quimioterápico.

Depois disso, um grande número de estudos demonstrou propriedades antitumorais do veneno e, em particular, do seu principal constituinte, a melitina. Relatórios recentes apontam para vários mecanismos responsáveis pela citotoxicidade do veneno em diferentes tipos de células cancerosas, tais como: alterações do ciclo celular, efeito sobre a proliferação e/ou inibição do crescimento tumoral e indução de apoptose ou necrose do tecido tumoral. Comprovadamente, a melitina apresentou atividade anticancerígena *in vivo* e *in vitro* em um largo espectro de células cancerosas, tais como em tumores de rins, pulmões, fígado, próstata, mamas e bexiga, além de células leucêmicas, melanoma<sup>8</sup> e osteossarcoma<sup>9</sup> (GAJSKI e GARAJ-VRHOVAC, 2013; ORSOLIC, 2012).

---

<sup>8</sup>Melanoma é um tipo de câncer que atinge o tecido epitelial, mais especificamente a os melanócitos presentes na camada basal da epiderme. Representa 5% dos tipos de câncer da pele, sendo o mais grave.

<sup>9</sup>Osteossarcoma é o tipo mais comum de tumor ósseo maligno. O tumor ocorre preferencialmente na região da metástase óssea de ossos tubulares longos. Cinquenta por cento dos casos ocorrem próximos aos joelhos. Se propaga rapidamente para os pulmões e, com menos frequência, para outros órgãos.



O carcinoma é o tipo de câncer mais comum nos seres humanos, podendo surgir em praticamente todos os tecidos do corpo. Chama-se de carcinoma o câncer que se origina de um tecido epitelial, ou seja, o tecido que recobre a pele e a maioria dos órgãos. Mostrou-se que a melitina inibe a proliferação de células de carcinoma e o crescimento tumoral *in vivo*. A inibição do crescimento tumoral pela melitina foi relacionada com a estimulação da resposta imunitária celular (ORSOLIC, 2012). A indução da apoptose<sup>10</sup>, necrose e quebra das células tumorais foram considerados possíveis mecanismos pelos quais a melitina inibe o crescimento tumoral. Embora alguns estudos demonstraram claramente que a melitina possui efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos, os mecanismos precisos responsáveis por estes efeitos em células tumorais ainda são desconhecidos.

O processo em que células cancerosas se disseminam pela corrente sanguínea e formam sub-populações de células malignas em outros locais diferentes e/ou distantes do local de origem, denomina-se metástase. Esta capacidade de invadir tecidos adjacentes agrava muito a situação da doença e dificulta a evolução de cura, sendo a principal causa de morte em pacientes com câncer. Em um artigo recente, Liu et al. (2008) demonstraram que a melitina inibe a metástase de células tumorais em ratos através da redução da movimentação e migração das células cancerígenas. O autor sugere que a melitina é um potencial agente terapêutico para o câncer primário de fígado (carcinoma hepatocelular), bem como um agente anti-metastático.

A maioria dos peptídeos líticos produzidos pelos insetos, anfíbios e mamíferos têm uma estrutura anfipática, que se liga preferencialmente e se insere em membranas celulares carregadas negativamente. Células eucarióticas normais possuem um baixo potencial de membrana, ao contrário das membranas celulares de células procarióticas e cancerosas que possuem um grande potencial de membrana. Por essa razão, muitos peptídeos líticos rompem seletivamente as membranas de células cancerígenas, ao invés de atacar células normais.

De acordo com Gajski e Garaj-Vrhovac (2013), a melitina é um composto interessante para o tratamento quimioterápico de câncer, pois as células cancerosas têm menos probabilidade de desenvolver resistência a um formador de poros em membranas. A combinação de um fármaco quimioterapêutico em conjunto com a melitina pode ser

---

<sup>10</sup> Apoptose: conhecida como "morte celular programada", é um tipo de autodestruição celular. A apoptose pode realizar quatro funções básicas: esculpir estruturas, eliminar estruturas, regular a quantidade de células e eliminar células defeituosas.

sinérgica, reduzindo desse modo a dose terapêutica necessária dos dois componentes (HUI, LEUNG e CHEN, 2002). Embora as potenciais aplicabilidades da melitina como um agente quimioterapêutico contra o câncer têm sido reconhecidas, a rápida degradação do peptídeo na corrente sanguínea e a sua atividade lítica de baixa especificidade celular constituem desafios significativos (PAN et al., 2011).

O principal aspecto negativo da quimioterapia tradicional contra o câncer está relacionado com as altas concentrações de agentes terapêuticos que acabam causando graves efeitos colaterais. Melhorar a eficácia e a especificidade de quimioterápicos através de sistemas de armazenagem e liberação de fármacos é um objetivo chave. Neste sentido, nanopartículas abrem novas fronteiras para o tratamento contra o câncer. Partículas em escala nanométrica podem atuar como um veículo de entrega de fármacos de combate ao câncer, adentrando na vasculatura do tumor, permitindo acesso direto à célula cancerosa.

Tumores possuem vasos sanguíneos anormais com diversas má formações, muitas ramificações e elevada tortuosidade. Estes vasos sanguíneos são passíveis de vazamento devido a anormalidades na membrana. Isto resulta em aumento da permeabilidade e permite a passagem de moléculas através da parede dos vasos para o interstício envolta das células cancerígenas. Os espaços entre as células endoteliais proveniente de má formação nos vasos sanguíneos possuem tamanhos que variam de 100 a 780 nm dependendo do tipo de tumor. Em contraste, as junções endoteliais de vasos normais apresentam tamanhos entre 5 a 10 nm. Encontrando-se uma maneira de direcionar nanocápsulas contendo fármacos para estas aberturas em tumores, é possível entregar altas concentrações de fármaco diretamente nas células cancerígenas, diminuindo a toxicidade em tecidos normais e consequentemente, os efeitos colaterais.

Soman et al. (2009) desenvolveram uma estratégia específica para sintetizar um veículo de entrega para peptídeos citolíticos em nanoescala. Os autores incorporaram melitina na monocamada externa de uma nanopartícula lipídica de perfluorocarbono. A farmacocinética favorável deste sistema de entrega permitiu a acumulação de melitina em tumores *in vivo* e uma drástica redução do crescimento tumoral, sem quaisquer sinais evidentes de toxicidade em células normais. A incorporação de melitina em nanopartículas prolonga o tempo de circulação do peptídeo, permitindo, assim, uma maior probabilidade de acumulação no tumor e em alvos específicos, como em locais de

angiogênese<sup>11</sup>. Essas nanopartículas de perfluorocarbono, portanto, representam o primeiro de uma classe de veículos de entrega à base de lipídeos exclusivos para melitina e outros peptídeos citolíticos com amplo espectro de atividade antitumoral que pode ser explorado para a terapia anticâncer.

### **2.3.5 Epilepsia**

A epilepsia é uma doença neural em que a pessoa apresenta repetidas convulsões devido a uma enorme perturbação da comunicação elétrica entre os neurônios no cérebro, levando à liberação temporária de energia excessiva. É uma condição clínica motivada pela hiper excitação de neurônios, causada pela interrupção no fluxo de íons de cálcio, sódio e potássio. Na epilepsia, a atividade excessiva da S100B, uma proteína que se liga ao cálcio, tem sido observada em todo o processo de desenvolvimento de epilepsia e é um importante regulador deste processo (VERMA, SINGH e SMITA, 2013).

A interação da melitina com a proteína S100B foi observada na presença e na ausência de cálcio por Baudier et al. (1987), os quais relataram que as mudanças conformacionais induzidas na S100B, pelo complexo formado com a melitina, altera drasticamente a afinidade da proteína por cálcio.

Em outro estudo, Verma, Singh e Smita (2013) analisaram a interação da melitina com S100B usando várias abordagens computacionais. O estudo previu as exatas alterações na conformação da S100B causadas pelo complexo formado com a melitina, indicando que essas alterações inibem os centros reativos da proteína de se ligarem ao  $Ca^{2+}$ . Os resultados apontam que a melitina ajuda na manutenção do equilíbrio iônico, inicialmente desbalanceado, devido à elevada atividade da proteína S100B. Esse estudo também suporta a hipótese de que a melitina tem potencial para interromper o funcionamento da S100B e que, portanto, pode ser um promissor agente terapêutico para o tratamento de epilepsia no futuro.

### **2.3.6 HIV**

Apesar de recentes avanços no tratamento de combate ao HIV-1, ainda existe uma necessidade de desenvolvimento de agentes virucidas

---

<sup>11</sup> Angiogênese: termo usado para descrever o mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes.

tópicos que impeçam a infecção inicial. A melitina livre consegue inibir a infecção por HIV-1 através de sua atividade lítica, rompendo o envólucro lipídico do vírus. Porém, devido a sua baixa especificidade, a melitina também é tóxica para as células endoteliais, como as da vagina. (HOOD et al., 2013)

No entanto, a melitina formulada como uma nanopartícula parece ser totalmente inerte contra células vaginais *in vitro* e ainda mantém sua toxicidade contra vírus. A inércia das nanopartículas de melitina frente a células normais *in vivo* também foi demonstrada, mesmo realizando-se múltiplas administrações intravenosas consecutivas que excedem 50 % da dose letal aceita para melitina livre (SOMAN et al., 2009). Diferentemente do envólucro lipídico do vírus, as células normais têm uma maior área de superfície de membrana lipídica e podem rapidamente reparar defeitos na membrana. Além disso, a carga viral (RNA) está sob tensão muito maior do que o conteúdo das células normais e é, portanto, mais sensível à ruptura. Combinadas, essas diferenças podem explicar a disparidade entre a toxicidade celular e viral apresentadas no estudo.

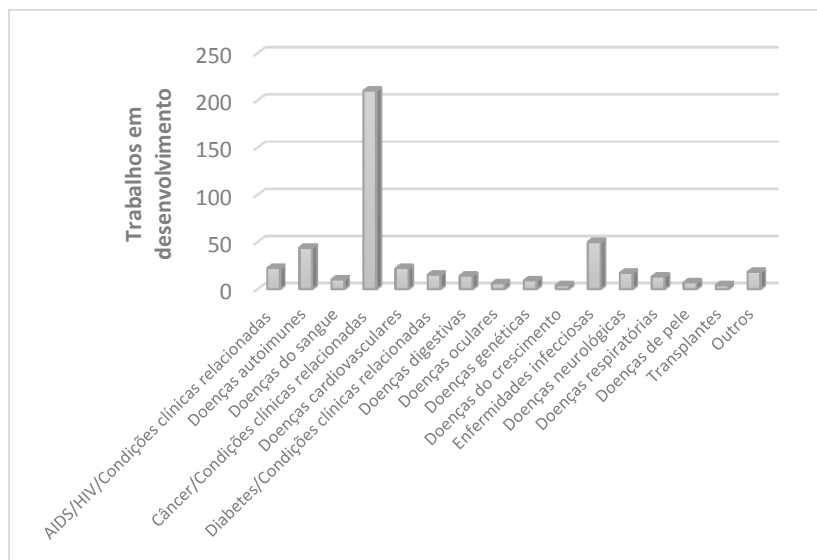
Com base nesta constatação, Hood et al. (2013) sugeriram a elaboração de uma emulsão de nanopartículas carregadas com melitina como agente virucida tópico a ser aplicado na vagina com a finalidade de combater a infecção inicial do vírus do HIV-1. A melitina livre e as nanopartículas carregadas com melitina foram testadas a fim de verificar suas citotoxicidade e habilidade de inibir a infecção pelo vírus. Como esperado, a melitina livre apresentou toxicidade em células normais, bem como também inibiu a infecção viral. Em contrapartida, as nanopartículas anti-HIV inibiram a infecção pelo vírus, sem apresentar qualquer toxicidade em células normais.

Além disso, as nanopartículas apresentam a vantagem de ter como alvo uma propriedade física, desintegrando o envólucro lipídico do vírus, sendo uma das primeiras tecnologias a permitir de fato eliminar o vírus no tratamento contra o HIV. Em contraste, a maioria dos medicamentos anti-HIV somente inibem a capacidade do vírus em se replicar, não apresentando efeito sobre a infecção inicial e, em alguns casos, o vírus encontra maneiras de contornar os fármacos e continuar se reproduzindo. Ainda de acordo com os autores, as nanopartículas de melitina atacam as membranas virais de forma indiscriminada. Portanto, este conceito não está limitado ao HIV. Muitos vírus, como a hepatite B e C, contam com o mesmo tipo de envólucro de proteção e seriam vulneráveis às nanopartículas de melitina.

## 2.4 DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS PARA ENTREGA CONTROLADA DE FÁRMACOS CONTENDO MELITINA

O número crescente de novas tecnologias de origem biotecnológica, tais como anticorpos, hormônios e vacinas com grande potencial terapêutico, faz do estudo de sistemas de entrega de proteínas uma importante área de pesquisa. De acordo com um relatório da PhRMA (*Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*), foram identificados 418 novos medicamentos biotecnológicos para mais de 100 doenças, incluindo câncer, doenças infecciosas, doenças auto-imunes, AIDS/HIV e outras condições clínicas relacionadas (Figura 5). Estes medicamentos estão em testes clínicos em humanos ou sob revisão pela FDA (*Food and Drug Administration*) (TAUZIN, 2006). Contudo, o potencial terapêutico de fármacos de origem proteica, bem como a sua aplicação clínica, é muitas vezes dificultada por obstáculos à sua entrega bem sucedida *in vivo*.

Figura 5 - Fármacos biotecnológicos em desenvolvimento por categoria terapêutica.



Fonte: Adaptado de Almeida e Souto (2007).

Por serem moléculas altamente vulneráveis, proteínas normalmente apresentam um curto tempo de meia-vida *in vivo* devido à

degradação por enzimas, seja no local de administração ou em seu caminho para o local de ação farmacológica.

Independentemente da via de administração, muitas das proteínas terapêuticas não possuem as propriedades físico-químicas necessárias para serem absorvidas e alcançar ou entrar nas células alvo, necessitando, assim, de sistemas de entrega que visam superar essas limitações, melhorando o desempenho dessas fármacos. Com essa finalidade, sistemas particulados de armazenagem, tais como lipossomos, microesferas, micelas e nanopartículas estão atualmente em desenvolvimento (ALMEIDA e SOUTO, 2007).

Em biomedicina, o uso de RNAs de interferência (conhecidos como siRNA – *small interfering RNA*) têm sido usados para desativar ou incapacitar genes defeituosos de se replicar, inibindo, assim, sua expressão genética. Empresas farmacêuticas em todo o mundo têm focado suas pesquisas nesta tecnologia com perspectivas de desenvolver terapias para infecções virais e câncer.

Esta tecnologia se depara com as mesmas dificuldades dos fármacos de origem proteica. As principais barreiras que impedem o sucesso das terapias baseadas em siRNA compreendem a pobre absorção celular e a instabilidade de siRNA livre. Sua elevada massa molar (14 kDa) e a alta carga superficial também impedem a passagem do siRNA através da membrana celular para atingir o compartimento citoplasmático onde o siRNA atua. Essas características, combinadas com sua baixa meia-vida (de somente 10 min), requerem a encapsulação do siRNA.

Tradicionalmente, os sistemas de encapsulação usados, tais como lipídeos catiônicos e polímeros, apresentam alta eficiência, mas também apresentam elevada citotoxicidade. Neste contexto, Hou et al. (2013) desenvolveram nanopartículas baseadas na habilidade da melitina de romper membranas, podendo, dessa maneira, contribuir para um sistema de entrega de siRNA eficiente. A melitina foi modificada para interagir com o siRNA e diminuir a toxicidade da proteína frente às células normais. A melitina modificada exibiu a capacidade de interagir com o siRNA eletrostaticamente e formar nanopartículas. As nanopartículas resultantes apresentaram entrega eficiente de siRNA em citoplasmas com subsequente degradação específica da sequência de mRNA e a diminuição de expressão genética numa variedade de tipos de células. Além disso, elas não apresentaram quaisquer sinais de toxicidade *in vitro* para as células testadas, incluindo células endoteliais primárias

humanas. O estudo validou a estratégia proposta pelo autor de utilizar a melitina como um agente de entrega de siRNA de modo eficiente.

A entrega de genes é o processo de introdução de um DNA estranho em células hospedeiras. É uma das etapas necessárias para a terapia gênica e a modificação genética. A entrega de genes para o sistema nervoso central é uma abordagem promissora para o tratamento de uma ampla gama de desordens, cujo tratamento possui poucas alternativas atualmente. Por exemplo, a entrega de fatores tróficos (uma molécula que estimula neurônios e permite que recebam nutrição adequada para que cresçam e se desenvolvam) pode reduzir a deterioração celular que acompanha a lesão da medula espinhal, acidente vascular cerebral ou doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson. Os métodos de entregas podem ser divididos em sistemas virais e não virais. (KAMIMURA et al., 2011)

Sistemas virais utilizam a habilidade do vírus de injetar DNA em células hospedeiras. Um gene que se deseja entregar é empacotado num vírus cuja replicação é deficiente. No entanto, sistemas virais só podem entregar pequenas partes do DNA.

Os vetores sintéticos, tais como polímeros catiônicos, oferecem versatilidade, segurança e custo relativamente baixo para a fabricação em larga escala em comparação com os seus homólogos virais. Em contrapartida, possuem baixa eficiência de entrega *in vivo*.

Melitina e análogos de melitina foram incorporados em formulações não virais para aumentar significativamente a eficiência de entrega *in vitro* (BETTINGER et al., 2001; OGRIS et al., 2001). Também há um relatório da aplicação *in vivo* desses sistemas funcionalizados com melitina (ROZEMA et al., 2007).

Schellinger et al. (2013) demonstraram a síntese e a caracterização de copolímeros em blocos contendo melitina e avaliaram a melhora na entrega de genes por esse sistema. A incorporação de melitina no polímero resultou em uma morfologia mais compacta, aumento da capacidade de ligação do DNA e entrega melhorada dos genes estudados em células neurais. Um aumento significativo na expressão de luciferase em cérebros de ratos foi alcançado usando o copolímero modificado com melitina. Em geral, a incorporação da melitina melhorou a eficiência da entrega de genes transportados por vetores poliméricos *in vivo*. Assim, os copolímeros em bloco contendo melitina descritos neste trabalho são um sistema promissor para a entrega de genes.

Notadamente, as habilidades da melitina de romper membranas lipídicas têm sido utilizadas para melhorar a eficiência de sistemas de entrega de fármacos. Assim sendo, a melitina tem se mostrado ser um composto de elevado potencial para o desenvolvimento de novos fármacos alternativos para tratar condições clínicas diversas. Além disso, comprovou-se outras de suas propriedades terapêuticas, como o alívio da dor crônica e inflamações. Esses fatos justificam a proposta desse trabalho em desenvolver um processo de obtenção de melitina, frente a necessidade dessa substância para os mais diversos estudos e elaboração de fármacos.

## 2.5 PROTOCOLO PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS

A purificação de proteínas consiste em uma série de processos destinados a isolar uma ou algumas proteínas a partir de uma mistura complexa, geralmente células, tecidos ou até mesmo organismos completos. O isolamento de uma proteína a partir de uma mistura é geralmente um processo muito trabalhoso. As etapas de separação comumente exploram as diferenças no tamanho entre as proteínas, propriedades físico-químicas, afinidade de ligação e atividade biológica.

Os métodos utilizados na purificação de proteínas podem ser divididos em métodos analíticos e preparativos. A distinção não é exata, mas o fator decisivo é a quantidade de proteína a ser purificada. Métodos analíticos têm como objetivo detectar e identificar uma proteína numa mistura, ao passo que os métodos preparativos objetivam produzir grandes quantidades de proteínas para outros fins, tais como biologia estrutural ou uso industrial (Figura 6).

Peptídeos e proteínas, na maioria das vezes, ocorrem naturalmente em quantidades muito pequenas. Grandes quantidades de material de partida são necessárias a fim de se obter uma quantidade razoável do material desejado puro. Várias técnicas de separação diferentes são aplicadas em sequência para se atingir um grau elevado de pureza. No início de um protocolo de purificação bioquímica, geralmente tem-se uma quantidade grande de material de partida contendo elevada concentração de impurezas. Consequentemente, o componente alvo se apresenta numa forma muito diluída. Neste estágio de captura do componente alvo, os objetivos principais são reduzir o volume da amostra e eliminar a maioria dos contaminantes brutos. Nesta fase, técnicas de alta capacidade (no que diz respeito à quantidade de



material processado) e baixa resolução são empregadas, tais como a ultracentrifugação, a microfiltração e a cromatografia por permeação em gel.

Figura 6 - Cromatografia líquida em escala industrial.



Fonte: MERCK MILIPORE.

Nas etapas posteriores do protocolo de purificação, utilizam-se técnicas com maiores resoluções que removem os contaminantes com características semelhantes as do composto desejado. Para esta fase, normalmente utilizam-se diversos tipos de cromatografia de alta resolução. Na Tabela 2 são apresentadas as técnicas mais comumente utilizadas num protocolo de purificação.

Tabela 2- Propriedades físicas e químicas exploradas nas técnicas utilizadas para purificação de proteínas.

<b>Método de fracionamento</b>	<b>Propriedade física/química</b>
Ultracentrifugação	Densidade
Cromatografia por exclusão de tamanho	Raio de Stokes
Focalização isoeétrica/eletroforese	Ponto isoeétrico
Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
Cromatografia de fase reversa	Hidrofobicidade
Cromatografia de troca iônica	Carga
Cromatografia de afinidade	Interações biomoleculares específicas
Eletroforese em gel	Raio de Stokes

Fonte: ISSAQ et al. (2002).

## 2.5.1 Etapas preliminares

### 2.5.1.1 Extração

Dependendo da fonte, a proteína tem de ser solubilizada. Isso é realizado através da quebra de tecidos ou das células que a contêm. Para tanto, vários métodos são utilizados: sonicação, homogeneização por alta pressão, filtração ou permeabilização por solventes orgânicos. No caso de venenos provenientes de insetos, antigamente a extração era realizada esmagando-se uma grande quantidade de insetos e, em seguida, solubilizando-a em solvente orgânico ou aquoso, criando-se um mosto contendo o veneno. Essa metodologia foi utilizada até o surgimento dos estímulos elétricos em 1963, induzindo a picada dos insetos, o qual tornou possível coletar o veneno de forma mais refinada e com baixíssima mortalidade de insetos. Essa tecnologia permitiu abreviar as demais etapas preliminares necessárias para isolamento de proteínas, uma vez que o veneno coletado já é uma mistura de proteínas e não possui nenhuma matriz contendo-o. Além disso permitiu coletar uma grande quantidade de material. Somente em 1981 é que esta técnica foi adaptada para a coleta de venenos de abelhas, vespas e formigas (himenópteros) (ESKRIDGE et al., 1981). Atualmente, a técnica de estímulos elétricos é aplicada para a produção em escala comercial de veneno bruto de diversos insetos da ordem Hymenoptera (APIHEALTH, 2014).

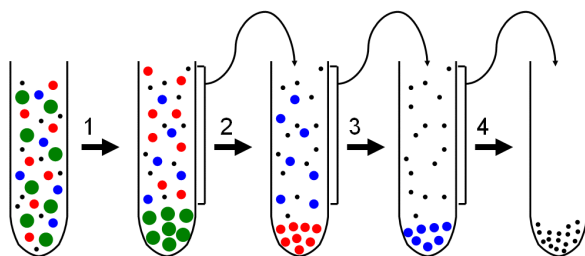
### 2.5.1.2 Precipitação

Na purificação de proteínas em larga escala, um passo comum para isolar proteínas é a precipitação com sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A precipitação com sulfato de amônio separa proteínas alterando as suas solubilidades, em um processo conhecido como *salting-out*, no qual a elevada força iônica da solução reduz a solubilidade das proteínas até o ponto em que elas precipitam. Uma vez que as proteínas diferem em suas solubilidades em elevada força iônica, o *salting-out* é um procedimento muito útil para ajudar na purificação de uma dada proteína. O procedimento é realizado adicionando-se quantidades crescentes de sulfato de amônio e recolhendo-se as diferentes frações de proteína precipitada. O sulfato de amônio pode ser removido posteriormente por diálise ou *desalting*. As proteínas precipitadas formam agregados suficientemente grandes para serem visíveis a olho nu. Uma vantagem deste método é que ele pode ser executado de forma barata e em grandes volumes.

### 2.5.1.3 Ultracentrifugação

A centrifugação é um processo que utiliza a força centrífuga para separar misturas de partículas de diferentes densidades ou massas suspensas num líquido dentro de um tubo. Quando as suspensões de partículas são rotacionadas em uma centrífuga, podem formar um aglomerado na parte inferior do tubo (chamado de *pallet* ou sedimento), que é enriquecida em partículas de maior massa. Partículas menos compactadas permanecem na maior parte no líquido chamado "sobrenadante". Tanto o *pallet* quanto o sobrenadante podem ser recolhidos, caso contenham a proteína de interesse. Em alguns casos, sucessivas centrifugações, variando-se o tempo e a velocidade de centrifugação, podem ser aplicadas para a completa separação de diferentes partículas em uma mistura, conforme é ilustrado na Figura 7 (LEBOWITZ, LEWIS e SCHUCK, 2002).

Figura 7 - Fracionamento de proteínas por ultracentrifugação.



Fonte: o autor.

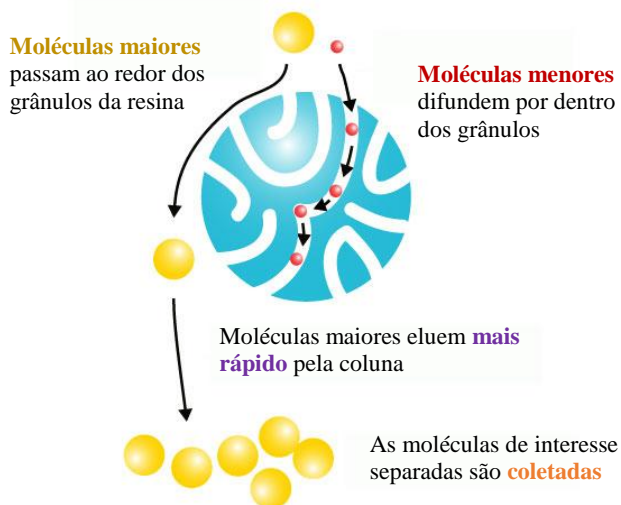
### 2.5.2 Estratégias de purificação

Normalmente, um protocolo de purificação de proteína contém um ou mais passos de cromatografia. O procedimento básico na cromatografia é fluir a solução contendo a proteína através de colunas preenchidas com diferentes fases estacionárias. Diferentes proteínas interagem de forma diferenciada com o material da coluna e podem, assim, serem separadas pelo tempo necessário para passagem pela coluna, ou pelas condições necessárias para dessorver a proteína da fase estacionária da coluna. Normalmente, as proteínas são detectadas ao saírem da coluna pela sua absorbância em 280 nm. Muitos métodos cromatográficos diferentes podem ser empregados.

### 2.5.2.1 Cromatografia por exclusão de tamanho

A cromatografia pode ser usada para separar proteínas em solução utilizando géis porosos. Esta técnica é conhecida como cromatografia por exclusão de tamanho ou cromatografia de permeação em gel (GPC). A cromatografia de permeação em gel é uma das principais técnicas utilizadas para purificação de proteínas. Ela tem como objetivo capturar a proteína de interesse, separando-a dos demais componentes e concentrando-a para posteriores processos mais refinados de purificação. O princípio é que as moléculas menores precisam atravessar um volume maior de uma matriz porosa. Conseqüentemente, as proteínas de uma determinada gama de tamanho irão exigir um volume variável de eluente antes de serem recolhidos na outra extremidade da coluna. Os analitos menores podem entrar nos poros mais facilmente e, portanto, demoram mais tempo para eluir, aumentando o seu tempo de retenção. Por outro lado, analitos maiores perdem pouco ou nenhum tempo nos poros e são eluídos rapidamente, conforme pode ser visto na Figura 8. Todas as colunas têm uma gama de massas molares que podem ser separadas.

Figura 8 - Conceito da separação por cromatografia de permeação em gel ou exclusão de tamanho.



Nesse tipo de experimento, o eluente é geralmente agrupado em diferentes tubos de ensaio na saída da coluna. Todos os tubos de ensaio que não contém nenhum vestígio mensurável das proteínas a serem separadas são descartados. A solução restante é, assim, da proteína de interesse, bem como de quaisquer outras proteínas de tamanho semelhante.

#### 2.5.2.2 Separação com base na carga ou hidrofobicidade

##### 2.5.2.2.1 *Cromatografia de troca iônica*

Cromatografia de troca iônica separa compostos de acordo com a natureza e grau da sua carga iônica. A coluna a ser utilizada é selecionada de acordo com seu tipo e força de carga. A resina de troca iônica é uma matriz insolúvel em água na forma de pequenos grânulos fabricada a partir de um substrato de polímero orgânico. A matriz é funcionalizada para que apresente sítios reativos que permitem a troca de íons. O aprisionamento de proteínas carregadas nesses sítios reativos ocorre com concomitante liberação de outros íons. Por esse fato, o processo é chamado de troca iônica. As resinas de troca aniônica possuem uma carga positiva e são usadas para reter e separar compostos carregados negativamente, enquanto que as resinas de troca catiônica têm uma carga negativa e são utilizados para separar as moléculas carregadas positivamente.

Antes da separação, um tampão é bombeado através da coluna para equilibrar os íons nos sítios ativos. Após a injeção da amostra, as moléculas de soluto competem pela posição nos sítios da resina com os íons do tampão. O comprimento de retenção para cada soluto depende da força de sua carga. Os compostos mais fracamente carregados irão eluir primeiro, seguidos por aqueles com cargas sucessivamente mais fortes. Devido à natureza do mecanismo de separação, o pH, tipo de tampão, a concentração de tampão, bem como a temperatura, desempenham papéis importantes no controle da separação (MEYER, 2013).

##### 2.5.2.2.2 *Cromatografia por afinidade*

A cromatografia por afinidade é uma técnica de separação baseada na conformação molecular, que frequentemente utiliza resinas altamente específicas. Estas resinas possuem ligantes inseridos em suas superfícies, que são específicos para os compostos a serem separados. Na maioria das vezes, estes ligantes funcionam de uma maneira semelhante à das interações anticorpo-antígeno. Este sistema de "chave

e fechadura" entre o ligante e seu composto alvo torna a técnica altamente específica, frequentemente gerando um único pico no cromatograma, enquanto todo o resto da amostra não é retido e passa livremente pela coluna (MEYER, 2013).

Uma técnica comum desse tipo de cromatografia, chamada de *metal binding*, envolve a manipulação de uma sequência de 6 a 8 histidinas no extremo N ou C-terminal da proteína. O poli-histidina liga-se fortemente a íons de metal bivalentes, tais como níquel e cobalto. A proteína pode ser passada através de uma coluna contendo íons de níquel imobilizados, que se liga à poli-histidina modificada. Todas as proteínas não marcadas passam através da coluna. A proteína pode ser eluída da coluna com imidazol, o qual compete com a poli-histidina pelo sítio na coluna. Também pode ser realizado uma diminuição no pH (geralmente para 4,5), o que diminui a afinidade da poli-histidina pela resina. Embora este procedimento seja comumente utilizado para a purificação de proteínas recombinantes modificadas, também pode ser utilizado para proteínas naturais com uma afinidade inerente para cátions divalentes (LOUGHRAN e WALLS, 2011).

#### 2.5.2.2.3 Cromatografia por imunoafinidade

Cromatografia por imunoafinidade utiliza a ligação de um anticorpo na proteína alvo de modo a purificar seletivamente a proteína específica. O procedimento envolve a imobilização de um anticorpo no material da coluna, o qual se liga seletivamente à proteína, enquanto o resto da mistura flui através da coluna. A proteína selecionada pode ser eluída por alteração do pH ou força iônica. Uma vez que este método não envolve a modificação da proteína, como no método *metal binding*, esse tipo de cromatografia pode ser utilizado em proteínas de fontes naturais (MEYER, 2013).

#### 2.5.2.2.4 Cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC)

A cromatografia depende das interações químicas entre moléculas do soluto e os ligantes enxertados em uma matriz de cromatografia. Ao longo dos anos, muitos tipos diferentes de ligantes foram imobilizados em suportes de cromatografia para a purificação de biomoléculas, explorando uma variedade de propriedades bioquímicas que variam de carga elétrica até afinidade biológica. Uma adição importante para a gama de técnicas de adsorção para cromatografia analítica e preparativa de biomoléculas tem sido cromatografia de fase reversa, em que a ligação do soluto da fase móvel a um hidrocarboneto

n-alquilo ou aromático imobilizado na coluna ocorre através de interação hidrofóbica.

A cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) tem sido amplamente utilizada em aplicações analíticas e preparativas na área de separação e purificação bioquímica. As moléculas que possuem algum grau de caráter hidrofóbico, tais como proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos, podem ser separadas por cromatografia de fase reversa com excelente recuperação e resolução. Cromatografia preparativa de fase reversa tem sido usada em aplicações que vão desde micropurificação de fragmentos de proteína para a sequenciação até o escalonamento de processos de purificação de produtos proveniente de proteínas recombinantes<sup>12</sup>.

O mecanismo de separação em RP-HPLC depende da interação hidrofóbica entre a molécula de soluto na fase móvel e o ligante hidrofóbico imobilizado, ou seja, a fase estacionária. A natureza da interação hidrofóbica é um assunto muito debatido (DORSEY e COOPER, 1994). É assumido que a interação é o resultado de um efeito entrópico favorável. As condições iniciais da fase móvel utilizadas na cromatografia de fase reversa são, via de regra, aquosas, o que indica um elevado grau de organização da água em torno das moléculas de soluto e do ligante imobilizado. Como o soluto se liga ao ligante hidrofóbico imobilizado, a região hidrofóbica exposta ao solvente é minimizada. Por conseguinte, o grau de estrutura organizada da água é diminuído, correspondendo a um aumento na entropia do sistema. Desta forma, é vantajoso, do ponto de vista energético para as porções hidrofóbicas, isto é, ligante e soluto, se associarem (SEIDEMANN, 1962).

A distribuição de soluto entre as duas fases depende das propriedades de ligação do meio, da hidrofobicidade do soluto e da composição da fase móvel. Inicialmente, as condições experimentais são concebidas para favorecer a adsorção de soluto da fase móvel para a fase estacionária. Subsequentemente, a composição da fase móvel é modificada para favorecer a dessorção do soluto a partir da fase estacionária de volta para a fase móvel. Neste caso, a adsorção é considerada um estado de equilíbrio extremo, onde a distribuição de moléculas de soluto está essencialmente 100 % na fase estacionária. Por outro lado, a dessorção é um estado de equilíbrio extremo onde o soluto está distribuído 100% na fase móvel.

---

<sup>12</sup>São proteínas produzidas artificialmente a partir de genes clonados. Isto é, advém da técnica de DNA recombinante.

A cromatografia de fase reversa de biomoléculas em geral usa um gradiente de eluição ao invés de uma eluição isocrática. Enquanto biomoléculas adsorvem fortemente à superfície de uma matriz de fase reversa sob condições aquosas, a dessorção da matriz ocorre em uma faixa muito estreita e específica de concentração do solvente orgânico. Além disso, uma amostra biológica típica geralmente contém uma grande mistura de biomoléculas com uma gama diversificada de afinidades à fase estacionária. Sendo assim, o único método prático para a separação em fase reversa de amostras biológicas complexas é, portanto, a eluição em gradiente (BOYSEN e HEARN, 2001).

O primeiro passo no processo cromatográfico é equilibrar a coluna com as condições de fase móvel iniciais adequados de pH, força iônica e polaridade (hidrofobicidade da fase móvel). A polaridade da fase móvel é controlada pela adição de modificadores orgânicos, tais como a acetonitrila. Agentes de pareamento iônico, tais como ácido trifluoroacético, podem também ser apropriados. A polaridade da fase móvel inicial (geralmente referida como fase móvel A) deve ser baixa o suficiente para dissolver o soluto parcialmente hidrofóbico e ainda suficientemente elevada para assegurar a ligação do soluto na matriz cromatográfica.

Embora a hidrofobicidade de uma molécula seja difícil de quantificar, a separação de solutos que variam ligeiramente nas propriedades hidrofóbicas é facilmente alcançada por RP-HPLC. Devido a um excelente poder de resolução, RP-HPLC se tornou uma técnica indispensável para a separação de alto desempenho de biomoléculas complexas.

A técnica de cromatografia de fase reversa permite uma grande flexibilidade em separações, de modo que o pesquisador pode escolher reter o soluto de interesse na fase estacionária, permitindo que os contaminantes passem livremente através da coluna, ou reter os contaminantes, permitindo que o soluto passe livremente. Geralmente, é mais apropriado reter o soluto de interesse porque o soluto dessorvido elui da coluna cromatográfica em um estado concentrado.

No final de uma purificação de proteínas, a proteína tem de ser concentrada. Para isso, existem diferentes métodos, que serão discutidos a seguir.

### 2.5.2.3 Liofilização

Se a solução não contém qualquer outro componente solúvel além da proteína em questão, a proteína pode ser liofilizada. Isto é



comumente realizado após uma corrida no HPLC. Esta técnica remove todos os componentes voláteis, restando apenas as proteínas.

#### 2.5.2.4 Ultrafiltração

A ultrafiltração concentra uma solução de proteína utilizando membranas permeáveis seletivas. A função da membrana é permitir que a água e as moléculas pequenas passem, enquanto a proteína é retida. A solução por ser forçada contra a membrana por uma bomba mecânica, por pressão, ou por centrifugação.

### 2.6 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA MELITINA

Para se obter as propriedades biomedicinais e bioquímicas excepcionais da melitina, a mesma precisa ser aplicada com elevado grau de pureza. Para tanto, a melitina pode ser produzida sinteticamente ou obtida através da purificação do veneno de abelha. A produção de peptídeos sintéticos é altamente reprodutível e rápida, mas é contrabalanceada por elevados custos operacionais e de produção. Por outro lado, a purificação do veneno de abelha é onerosa pela sua elevada heterogeneidade e presença de outros peptídeos, principalmente da apamina.

Um dos primeiros estudos reportados na literatura sobre a purificação da melitina foi o trabalho de Maulet et al. (1980). A metodologia proposta pelo autor consistiu em três etapas: cromatografia de permeação em gel utilizando Sephadex G-50<sup>®</sup> para a captura da melitina; cromatografia de troca catiônica para uma purificação refinada; cromatografia de permeação em gel utilizando Sephadex G-25<sup>®</sup> para o *desalting*<sup>13</sup>.

Como discutido anteriormente, dependendo das condições da solução, a melitina pode formar um tetrâmero. As condições do experimento foram tais que a melitina eluiu pelas colunas na forma tetramérica, apresentando massa molar de 12.000 Da. Essa abordagem permitiu separar a melitina da apamina (2.039 Da) com eficiência. Entretanto, a fração contendo melitina apresentou contaminação pelo componente alergênico PLA<sub>2</sub> (18.500 Da).

Na segunda etapa da purificação, nomeada pelo autor de cromatografia de troca catiônica na ausência de uréia, a agregação

---

<sup>13</sup>Termo utilizado para designar a remoção de sal e outras moléculas menores das soluções contendo proteínas.

tetramérica da melitina causou um alargamento dos picos de eluição, não permitindo a separação adequada da melitina de outros componentes catiônicos ( $n^{\circ}$ -formil melitina, produtos de peptídeos degradados presentes no veneno e enzima PLA<sub>2</sub>). Por essa razão, os autores elaboram uma nova metodologia, realizando a cromatografia de troca catiônica utilizando como eluente uma solução de 4,0 mol/L de uréia. Nessas condições, foram obtidas três frações, as quais os autores identificaram como sendo  $N^{\circ}$ -formil melitina (fração 1), melitina purificada (fração 2) e peptídeos degradados (fração 3). A fração 2 foi posteriormente eluída numa coluna de GPC contendo como fase estacionária Sephadex G-25<sup>®</sup> e, em seguida, liofilizada. A metodologia de purificação elaborada pelo autor, apesar de obter elevado grau de pureza, acaba sendo dispendiosa e onerosa objetivando um processo em escalas maiores.

Outro estudo precursor no isolamento da melitina foi o trabalho de Dotimas et al. (1987). O veneno bruto foi processado em cromatografia de permeação em gel com Sephadex G-50<sup>®</sup> e em cromatografia de fase reversa (RP-HPLC). O grupo reportou um método de dois estágios para o isolamento simultâneo de secapina, peptídeo MCD e apamina. Em contraste, trabalhos anteriores focavam no isolamento de somente um componente do veneno. Este novo método focou em capturar a melitina na forma tetramérica na primeira etapa de exclusão por tamanho, capturando-se a melitina com massa de 12.000 Da, que se encontra distante da faixa de massa molecular dos peptídeos de interesse (aproximadamente 2.000 Da). Em seguida, procedeu-se com a purificação da apamina, secapina e peptídeo MCD em RP-HPLC. O foco do método desenvolvido foi separar apamina, secapina e peptídeo MCD (livres de melitina e PLA<sub>2</sub> como contaminantes) para análise de suas estruturas. Apesar do enfoco do trabalho não objetivar a obtenção da melitina com elevado grau de pureza, este estudo, assim como os demais, dá indicativos das estratégias a serem adotadas para a obtenção da melitina pura.

Um trabalho que convém mencionar é o estudo de Pacáková et al. (1995). Os autores compararam a eficiência na análise dos componentes do veneno bruto entre as técnicas de RP-HPLC e eletroforese capilar (EC). Os resultados mostraram que ambas as técnicas, EC e RP-HPLC, podem ser usadas para diferenciar apitoxinas de diferentes origens. Entretanto, a identificação individual dos componentes é barrada pela falta de soluções padrões. Ademais, os autores verificaram que a cromatografia de permeação em gel pode ser usada para a caracterização

grosseira do veneno bruto, mas a baixa eficiência na separação não permite a quantificação dos componentes. Os resultados em RP-HPLC foram satisfatórios para os autores usando eluição em modo gradiente. Comparado com o método em RP-HPLC, o método utilizando EC é mais rápido, apresenta melhor eficiência e menor custo de operação. Além disso, a precisão e os limites de detecção são maiores para a metodologia em EC do que em RP-HPLC. A maior vantagem de se utilizar EC em comparação com RP-HPLC é a maior resolução, permitindo a quantificação dos componentes do veneno bruto até mesmo em casos que o RP-HPLC falha.

Com o objetivo de identificar os componentes ativos da apitoxina que produzem sinais inflamatórios e dor, Chen et al. (2006) desenvolveram um processo de dois estágios para a purificação dos componentes presentes no veneno bruto. Foram empregadas as técnicas de GPC em conjunto com RP-HPLC para isolamento e purificação refinada de quatro componentes do veneno bruto. A metodologia desenvolvida obteve sucesso em isolar e purificar a melitina, a apamina e a enzima PLA<sub>2</sub>. Apesar do método se mostrar competente na purificação da melitina, é um método que acaba tendo um tempo de processamento elevado, devido ao caráter de purificação simultânea de mais de um componente. Para o desenvolvimento de um processo de produção de melitina em escalas maiores, o fator tempo deve ser levado em consideração, visando à redução dos custos de manufatura.

Recentemente, Nguyen et al. (2015) reportaram ter utilizado um equipamento de FPLC (*fast protein liquid chromatography*) equipado com colunas de permeação em gel Bio-Gel® P-10 para efetuar a purificação da melitina. De acordo com os próprios autores, a metodologia desenvolvida foi suficiente para obter melitina para seus estudos. Entretanto, a eficiência na separação não foi de 100 %, estando a fração correspondente a melitina purificada “contaminada” com o peptídeo apamina. Apesar da menor eficiência, através desse método foi possível obter melitina em um tempo relativamente curto, sendo a fração correspondente à melitina isolada recolhida numa faixa de tempo de 7 a 12 min. Além do processo de purificação, também foi elaborado um método inédito de análise usando voltametria de pulso diferenciado, que fornece resultados analíticos precisos e rápidos que podem ser empregados para a caracterização das frações purificadas. Apesar dos resultados obtidos, os autores deixaram claro a necessidade de se

desenvolver métodos eficientes, baratos e rápidos para a purificação de melitina.

São encontrados muitos estudos na literatura a respeito do isolamento e purificação da melitina, porém, conforme foi discutido, todos são voltados para a caracterização de sua função, estrutura, bem como o estudo de suas interações bioquímicas. A grande maioria dos estudos reportados na literatura a respeito da purificação de melitina partindo-se do veneno bruto de abelha segue nessa linha. Estudos sobre a purificação de melitina para posteriores aplicações farmacêuticas são escassos. Nos trabalhos sobre aplicação farmacêutica da melitina, a proteína com elevado grau de pureza utilizada geralmente é adquirida junto a grandes fornecedores de insumos a altos custos ou em casos raros a melitina é sintetizada pelos próprios autores (TOSTESON et al., 1987).

## 2.7 O PROCESSO DE LEITO MÓVEL SIMULADO (SMB)

Atualmente o uso de técnicas de cromatografia preparativa para produção de substâncias de alta pureza é bem estabelecido. Além dos clássicos processos descontínuos de eluição em batelada, diferentes conceitos para separação cromatográfica têm sido desenvolvidos. Um importante desenvolvimento nessa área é, por exemplo, o processo contínuo de leito móvel simulado (*Simulated Moving Bed* – SMB).

Toda a base para o desenvolvimento de um processo de separação de misturas complexas, como a purificação de proteínas, passa pela cromatografia. A partir dessa técnica pode-se fazer estimativas do potencial econômico e viabilidade de obtenção de um determinado produto. Na indústria, para separações em larga escala, essa técnica é utilizada como primeiro passo na avaliação de um processo de separação, seja ele na determinação analítica para validação do método, como análises quantitativas, seja ele para ensaios em escala piloto para agregação de valor em produtos farmacêuticos. Com o constante desenvolvimento de novas técnicas separativas hoje potencializado pela busca de produtos de fontes naturais, e não mais impulsionado pela busca de rotas de síntese (na área de produtos naturais), volta-se a atenção para tais técnicas. O SMB veio com o intuito de suprimir os custos operacionais das técnicas de separação cromatográfica realizadas em batelada (ZIBETTI, 2012).

O SMB é utilizado para separar um composto químico ou uma classe de compostos químicos e produzir uma quantidade significativa

do material purificado a um custo menor do que poderia ser obtido utilizando cromatografia simples em batelada. O processo é bastante complexo, porém traz a vantagem de produzir grandes quantidades de material altamente purificado a um custo muito reduzido. As reduções de custos são resultado de: utilização de uma menor quantidade de fase estacionária; taxa de produção alta e contínua e redução de energia e de solventes utilizados. A disposição de válvulas e colunas, que são utilizadas para prolongar a fase estacionária indefinidamente, permite que cargas muito elevadas de solutos possam ser processadas. Dessa maneira, é possível alcançar um desempenho econômico viável para o processo produtivo.

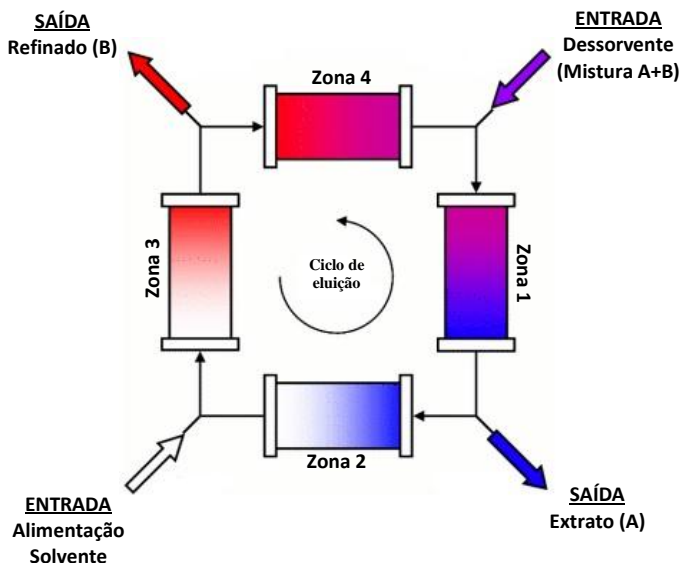
O SMB emula uma separação em contracorrente onde a fase móvel flui na direção oposta à da fase estacionária. A fase estacionária é representada por colunas individuais ligadas em série e a fase móvel é representada por correntes de alimentação de solvente e dessorvente (dá-se esse nome à mistura a ser purificada) e correntes de saída do extrato e do produto refinado. Válvulas entre as colunas são sistematicamente comutadas abertas ou fechadas em intervalos de tempo (tempo de comutação) para introduzir as correntes de entrada e retirar correntes de saída entre as zonas de separação, o que simula o movimento em contracorrente das colunas (Figura 9). A separação ocorre devido à interação diferencial dos componentes da mistura alimentada com o material da coluna. Componentes que interagem mais fortemente com o material da coluna são denominadas de “extrato” ou “componente lento”, ao passo que os componentes com menor interação são chamados de “refinado” ou “componente rápido”. Ajustando-se as taxas de fluxo, o tempo de comutação, bem como a composição do dessorvente, um ciclo é estabelecido no qual alimentação e dessorvente são adicionados continuamente e produtos altamente purificados são continuamente recuperados, como pode ser visto na Figura 10 (AMALGAMATED RESEARCH).

O fluxo em contracorrente criado pelo SMB permite uma utilização extremamente eficiente de fases estacionárias e móveis. Em sistemas de uma única coluna, a separação ocorre em uma pequena fração da coluna em cada batelada, com o restante da coluna não executando nenhuma outra função além de ser ocupada por solvente, podendo até mesmo acabar alargando as bandas. Com SMB, uma série de pequenas colunas é utilizada em vez de uma coluna grande. Tipicamente, 50-70% de fase sólida está envolvida na zona de separação, enquanto o resto do material da coluna é preparado para o

próximo ciclo de purificação (Figura 11). Além disso, SMB fornece um comprimento "infinito" do leito da coluna sem os custos associados à obtenção, operação e manutenção de grandes colunas individuais (SEMBABIO). Através disso, o SMB oferece:

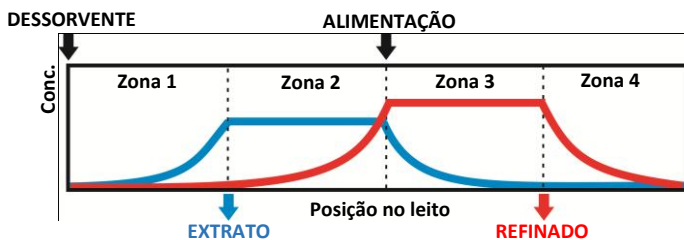
- maior produtividade - até 20 vezes maior que sistemas em batelada;
- maior recuperação e pureza;
- menor consumo de solvente;
- maiores partículas de fase estacionária e pressões mais baixas;
- escalonável de miligramas para toneladas de produto purificado;
- processo contínuo.

Figura 9 - Esquema de operação de uma cromatografia em leito móvel simulado (SMB).



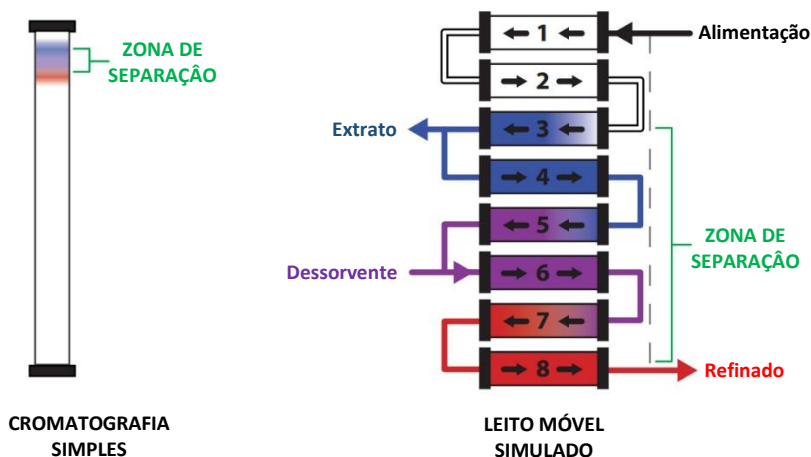
Fonte: o autor.

Figura 10 - Representação dos gradientes de concentração em relação à posição da coluna.



Fonte: o autor.

Figura 11 - Comparação da zona de separação entre cromatografia de uma única coluna e cromatografia em SMB.



Fonte: SembaBio.

Os inconvenientes do SMB são: o elevado custo de investimento em comparação com as operações em batelada, uma maior complexidade, e custos de manutenção mais elevados. Mas estes inconvenientes são efetivamente compensados pelo maior rendimento e um consumo muito inferior de solvente, bem como uma produtividade muito maior em comparação com as separações em batelada.

A utilização do SMB tem crescido com constância na indústria farmacêutica nos últimos anos. Esse processo se mostrou extremamente eficiente e economicamente atrativo para a separação de compostos quirais com elevado grau de pureza para aplicações terapêuticas.

Entretanto, apesar da adoção dessa técnica no cenário industrial, pouca informação a respeito da engenharia econômica da construção e operação desse processo objetivando a produção comercial de um produto que gere lucro é divulgado (PYNNONEN, 1998). Ainda, segundo Pynnonen (1998), pouquíssima informação a respeito dos custos envolvidos em qualquer separação cromatográfica está disponível.

Nos últimos 30 anos, diversos trabalhos têm objetivado a obtenção desse peptídeo benevolente, melitina. Entretanto, conforme foi revisado, grande parte desses trabalhos tem visado estudar sua estrutura, interações e propriedades farmacológicas. Agora, após a extensa ratificação do potencial farmacêutico da melitina, justifica-se a procura por um processo produtivo desse peptídeo. Neste trabalho, buscamos estudar e esclarecer todas as operações relevantes no processo de separação e purificação da melitina a partir do veneno de abelha bruto, com a finalidade de se levantar os parâmetros de projeto para proposição de um processo de produção em escala comercial.



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho foi dividido em três etapas. A primeira etapa consistiu no desenvolvimento de um processo de obtenção de melitina a partir do veneno bruto de abelha para futuras aplicações farmacêuticas. Na segunda etapa avaliou-se a formulação de nanopartículas lipídicas sólidas com a finalidade de desenvolver um veículo de entrega estável para fármacos a base de melitina. Por fim, elaborou-se uma avaliação econômica com a finalidade de se verificar a viabilidade da implementação do processo produtivo de melitina.

#### **3.1 PRIMEIRA ETAPA: DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MELITINA PURIFICADA A PARTIR DA APITOXINA**

##### **3.1.1 Coleta do veneno bruto**

A coleta do veneno ocorreu através de estímulos elétricos. Para tal, foi utilizado um coletor de apitoxina disponível comercialmente, representado na Figura 12. O equipamento é composto por um gerador de pulsos, dez placas coletoras, uma bateria e um carregador de baterias.

Durante a extração do veneno, a abelha é induzida a ferroar a placa coletora através de choques elétricos. Tal técnica apresenta a vantagem de não levar o animal ao óbito, pois o mesmo não perde seu "ferrão". Em particular, o aparelho utilizado neste estudo tem capacidade para atender dez colmeias simultaneamente.

O gerador de pulsos é alimentado por uma bateria de pequeno porte, capaz de gerar um potencial de 12 V e uma corrente de 2 A. Um único gerador de pulsos é capaz de atender as dez colmeias simultaneamente. A placa coletora, alimentada pelo gerador de pulsos, possui estrutura de acrílico com varetas para condução de corrente elétrica construídas em aço inox (para que não haja contaminação do produto).

O apiário utilizado para a coleta do veneno localiza-se no município de Brusque, no estado de Santa Catarina. Cada colmeia recebeu uma placa coletora que extrai, aproximadamente, 100 mg de veneno. O tempo total de coleta em que as placas permaneceram ligadas foi de 20 min. Depois de coletado, o veneno de abelha foi raspado das placas e acondicionado em frasco âmbar e, em seguida, estocado a temperatura de -20 °C.

Figura 12 - Equipamento coletor de apitoxina composto de placas coletoras e gerador de pulsos.



Fonte: O autor.

### 3.1.2 Preparo de amostras

Em âmbito global dos procedimentos experimentais, a preparação das amostras foi realizada da seguinte maneira: a apitoxina bruta foi solubilizada em solução de acetonitrila a 20%. Em seguida, esse extrato foi centrifugado a 13.500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana de nylon de 45  $\mu\text{m}$ , dando origem ao material de partida para os estudos. Em casos específicos, houve pequenas mudanças no modo de preparo, que são descritas na metodologia de cada técnica utilizada.

### 3.1.3 Caracterização da massa molecular por espectrometria MALDI-TOF

As massas moleculares das proteínas estudadas nesse trabalho foram determinadas pela técnica de MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser/desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) disponibilizado pelo CEBIME (Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural) localizado na UFSC. A metodologia utilizada seguiu como base os ensaios descritos no trabalho de Matysiak et al. (2011). As análises foram realizadas num espectrômetro de MALDI-TOF-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) com calibração externa (faixa de massa 800-3.200 Da). Para os ensaios, 1  $\mu\text{L}$  da amostra foi misturada com 3  $\mu\text{L}$  de uma solução saturada de matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL em TFA a 0,1% em 1:1 de acetonitrila/água). Em seguida, 2  $\mu\text{L}$  da mistura foram depositadas na placa alvo de MALDI (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e deixou-se cristalizar à temperatura ambiente. Os espectros foram adquiridos usando voltagem de aceleração de 20 kV em modo refletor positivo. A

lista de picos foram obtidos utilizando FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics).

### **3.1.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC)**

Para essa etapa, cerca de 200 mg de veneno de abelha bruto foram dissolvidos em solução de 0,05 mol/L de ácido acético (REAGEN) e, então, centrifugados a 13.500 rpm por 5 min (Centribio). O precipitado foi descartado e o sobrenadante alimentado em uma coluna de cromatografia de permeação em gel. A coluna cromatográfica foi montada com coluna de vidro C 16/70 (GE Healthcare Life Sciences) contendo gel cromatográfico Sephadex® G-10 (GE Healthcare Life Sciences). O gel foi pré-equilibrado com solução tampão de acetato de amônio (REAGEN) com concentração 0,05 mol/L. Uma taxa de eluição de 0,5 mL/min foi aplicada à coluna e a fase móvel foi coletada em tubos de ensaio (5 mL/tubo) na saída do equipamento. Procedeu-se, então, o monitoramento das amostras coletadas através de equipamento de espectrofotometria UV (280 nm).

### **3.1.5 Purificação da melitina em HPLC-analítico**

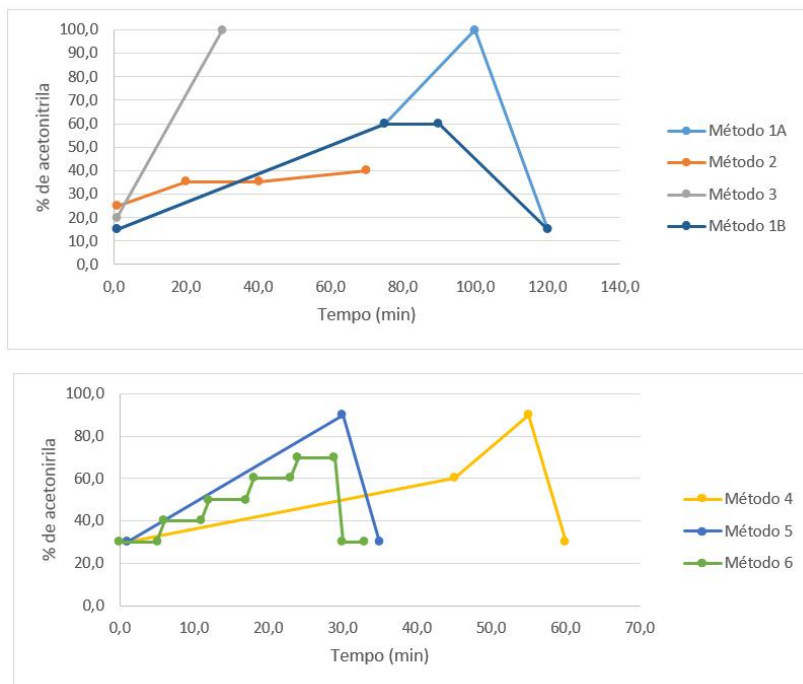
Paralelamente à separação em GPC, também foi realizada a purificação da apitoxina bruta diretamente no equipamento de RP-HPLC. O estudo compreendeu vários ensaios exploratórios, partindo-se de metodologias encontradas na literatura no qual foram avaliados os perfis peptídicos do veneno. Os parâmetros das metodologias desses estudos serviram de parâmetros iniciais para esse trabalho. De modo a evitar uma descrição exaustiva de todos os testes realizados, somente algumas observações importantes foram elucidadas. A maioria dos ensaios foram realizados de modo a obter uma boa separação e resolução do pico de melitina para, em seguida, explorar uma metodologia no qual fosse possível obter um pico de melitina com elevado grau de pureza no menor tempo de análise possível. Dessa forma, foi necessário um exaustivo desenvolvimento e ajustes nas metodologias a fim de melhorar os parâmetros da análise RP-HPLC utilizados nesse trabalho.

Os ensaios exploratórios basicamente consistiram em manter-se os mesmo solventes A e B e modificar apenas o gradiente do solvente pois, de acordo com a literatura (Reversed Phase Chromatography), é o único parâmetro que tem forte influência sobre a eficiência de separação.

A separação analítica de biomoléculas grandes é insensível a mudanças no parâmetro de vazão. Dessa maneira, a vazão foi mantida em 1,0 mL/min para todas as análises. Em contrapartida, a temperatura pode ter profundos efeitos sobre a separação, uma vez que um aumento na temperatura reduz a viscosidade da fase móvel, alterando o processo de separação. O transporte de massa do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária é um processo controlado pela difusão. Assim, a diminuição da viscosidade do solvente geralmente acarreta em um transporte de massa mais eficiente e, conseqüentemente, uma melhor resolução na separação. Porém, considerando-se o escalonamento do processo, o uso de sistemas de elevação de temperatura da coluna cromatográfica resultaria em uma elevação considerável no custo de manufatura do bioativo. Assim, optou-se por utilizar uma temperatura próxima à ambiente. Fixou-se 25 °C para esse parâmetro em todas as metodologias desenvolvidas.

Para os testes foram utilizados os seguintes solventes: solvente A – ácido trifluoroacético 0,01 % em água ultrapura ( $pH = 2,1$ ) e solvente B – acetonitrila. Os ensaios exploratórios iniciais em RP-HPLC consistiram em avaliar as diferenças na separação dos componentes alterando-se a concentração do modificador orgânico no solvente de maneira abrupta, com a rápida elevação da concentração do modificador orgânico, bem como de modo lento, com mudanças bem sutis no gradiente de solvente. Os resultados obtidos desses ensaios seriam um indicativo da metodologia a ser adotada. Na Figura 13 são mostrados alguns dos gradientes de solventes testados nos ensaios preliminares.

Figura 13 – Metodologias desenvolvidas para purificação da melitina baseadas em diferentes gradientes de solvente.



Fonte: o autor.

A separação e purificação do veneno bruto foram realizadas em HPLC-analítico (Shimadzu LC20A Prominence) equipado com um injetor automático (Shimadzu SIL-20AC). O método utilizado nesse equipamento está descrito na Tabela 3. Foi utilizada uma coluna de fase-reversa C-18 (Phenomenex, 250 mm × 4,16 mm, 5 µm) e uma pré-coluna C-18 (Varian Pursuit MetaGuard, 15 mm × 4,6 mm, 5 µm). Os solventes utilizados foram água ultra pura 18,2 MΩ.cm acidificada com ácido trifluoracético (Reagen) e acetonitrila (Chromasolv®) como modificador orgânico. Todos os solventes foram filtrados antes das análises de HPLC, empregando-se filtro Nylon 0,45 µm. Os cromatogramas foram monitorados no comprimento de onda de 280 nm.

Tabela 3 - Metodologias utilizadas no HPLC-analítico.

<b>Equipamento</b>	Shimadzu (LC-20A Prominence); injetor automático (Shimadzu SIL-20AC)															
<b>Coluna</b>	Phenomenex C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu$ m)															
<b>Pré-coluna</b>	Varian Pursuit MetaGuard C-18 (15 mm x 4,6 mm, 5 $\mu$ m)															
<b>Vol. injeção</b>	10 $\mu$ L															
<b>Vazão</b>	1,0 mL/min															
<b>Solvente A</b>	Água + Ácido Trifluoroacético 0,01%															
<b>Solvente B</b>	Acetonitrila															
<b>Método</b>	<b>1A</b>			<b>1B</b>			<b>2</b>			<b>3</b>						
<b>Condições (B)</b>	1,0	min	15,0	%	1,0	min	15,0	%	1,0	min	25,0	%	1,0	min	20,0	%
	75,0	min	60,0	%	75,0	min	60,0	%	20,0	min	35,0	%	30,0	min	100,0	%
	100,0	min	100,0	%	90,0	min	60,0	%	40,0	min	35,0	%				
	120,0	min	15,0	%	120,0	min	15,0	%	70,0	min	40,0	%				
<b>Método</b>	<b>4</b>			<b>5</b>			<b>6</b>									
<b>Condições (B)</b>	1,0	min	30,0	%	1,0	min	30,0	%	0,0	min	30,0	%	18,0	min	60,0	%
	45,0	min	60,0	%	30,0	min	90,0	%	5,0	min	30,0	%	23,0	min	60,0	%
	55,0	min	90,0	%	35,0	min	30,0	%	6,0	min	40,0	%	24,0	min	70,0	%
	60,0	min	30,0	%					11,0	min	40,0	%	29,0	min	70,0	%
									12,0	min	50,0	%	30,0	min	30,0	%
								17,0	min	50,0	%	33,0	min	30,0	%	

Fonte: o autor.

### 3.1.5.1 Preparação das amostras para análise em HPLC-analítico

Solubilizou-se em um microtubo de 1,5 mL 10 mg do veneno bruto coletado em 1 mL de solução de acetonitrila a 20 %. A amostra foi então centrifugada a 13500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana de nylon de 45  $\mu$ m.

### 3.1.5.2 Coleta das frações encontradas em análise de HPLC-analítico

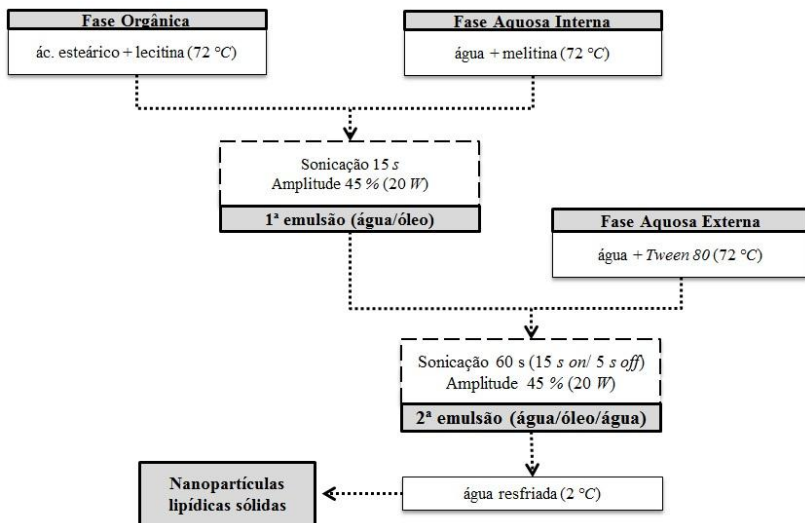
Para coletar as frações encontradas nas análises em RP-HPLC, realizou-se um experimento a fim de determinar o tempo necessário para a coleta das frações. A metodologia experimental está descrita no item 4.1.3.3. Para vazão de 1 mL/min, o tempo fixado para a coleta de componentes foi de 23 s após a detecção do componente no detector do equipamento.

## 3.2 SEGUNDA ETAPA: ENCAPSULAMENTO DA MELITINA

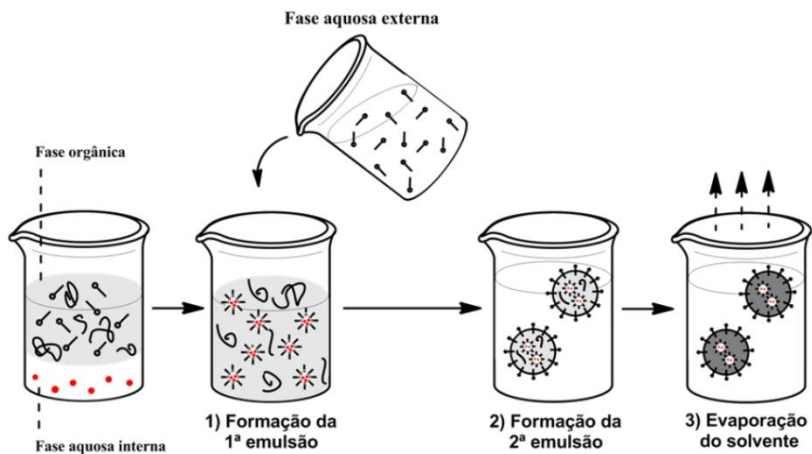
### 3.2.1 Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs)

A técnica de fusão/dupla emulsificação foi baseada na proposta de Reithmeier, Herrmann e Gopferich (2001). A primeira emulsão (água em óleo) foi preparada a partir da emulsificação de 0,6 mL de água destilada contendo 2 mg de melitina (obtida através do veneno coletado e purificado pelo processo de purificação desenvolvido nesse trabalho) em 1,8 g de ácido esteárico (Vetec, puro) fundido a 72 °C na presença de 0,018 g do surfactante lecitina (Alfa Aesar) e utilizando uma sonda de ultrassom acoplada a uma ponteira (Fischer Scientific, Ultrasonic Dismembrator Model 500, 400 W com ponta de 1/8'') durante 15 s com uma amplitude de 45 % (20 W). Em seguida, 18 mL de água destilada e 0,18 g de surfactante polioxietileno-20-sorbitano monooleato (Tween 80, Vetec), à mesma temperatura do ácido esteárico fundido, foi adicionada à primeira emulsão e sonicada durante 60 s em um regime de pulso de 15 s de sonicação e 5 s de pausa, com amplitude de 45 %, levando à formação da segunda emulsão (água em óleo em água). Para promover a rápida solidificação do lipídeo, a dupla emulsão foi adicionada à 90 mL de água destilada resfriada a 2 °C sob agitação. Na Figura 14 é apresentado o fluxograma e esquema de preparação do processo de preparação da dupla emulsão de nanopartículas lipídicas sólidas via fusão/dupla emulsificação.

Figura 14 - (a) fluxograma do processo e (b) esquema de preparação das nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico.



(a)



(b)

Fonte: o autor.



### 3.2.2 Caracterização das nanopartículas

#### 3.2.2.1 Diâmetro Médio (Dp) e Índice de Polidispersão (PDI)

O diâmetro médio (em intensidade) e índice de polidispersão das nanopartículas, que fornecem informações acerca da largura da distribuição dos tamanhos de partícula, foram determinados através da técnica de Espectroscopia de Correlação de Fótons ou Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (ângulo do feixe incidente de 173° e comprimento de onda do laser de 633nm), da Malvern Instruments, alocado no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC. As leituras foram feitas a 20 °C a partir de uma alíquota das miniemulsões sem prévia diluição.

#### 3.2.2.2 Potencial Zeta (PZ)

O potencial zeta foi determinado através da técnica de anemometria de laser doppler associada à microeletroforese utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS 3600, da Malvern Instruments, alocado no Núcleo de Pesquisas em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT) da UFSC. As leituras foram realizadas a 25 °C a partir de uma alíquota das miniemulsões diluídas na razão volumétrica de 1:5 em água destilada.

### 3.3 TERCEIRA ETAPA: AVALIAÇÃO ECONÔMICA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO


Na segunda etapa do trabalho foram realizadas análises econômicas dos processos estudados. Os custos foram dolarizados (3,50 R\$/US\$) para futuras comparações e publicação. Para o processo de separação dos compostos bioativos, foi realizada uma avaliação econômica do custo de manufatura da melitina. Os custos avaliados envolveram desde investimentos em equipamentos, custos operacionais e de gestão, aquisição de matérias-primas e seu processamento. As tecnologias envolvidas nesse processamento dizem respeito somente à etapa de purificação, realizada em equipamento de RP-HPLC. A avaliação foi baseada em uma metodologia desenvolvida por Turton et al. (2012) e utilizada nos trabalhos de Zibetti (2012), Rosa e Meireles (2005) e Pynnonen (1998), que considera o custo de manufatura como uma função do que ele chama de custos diretos (que dependem diretamente da produção e suas quantidades) e indiretos, como os custos

fixos (envolvendo a depreciação dos equipamentos, taxas e seguros) e ainda os custos gerais (dos quais fazem parte os custos administrativos dos diferentes setores, como o de vendas, pesquisa e desenvolvimento).

### **3.3.1 Determinação das escalas dos cenários avaliados**

De modo a obter um aumento de escala bem sucedido foi mantida a cinética (tamanho de partícula, porosidade, química da fase estacionária, temperatura, fase móvel) e a dinâmica (altura do leito, velocidade do fluxo, densidade da coluna empacotada) equivalentes entre as colunas utilizadas em escala laboratorial com as das plantas avaliadas. Esses objetivos foram alcançados utilizando, na avaliação, fase estacionária e fase móvel idênticas, com as mesmas altura de leito, velocidade linear do fluxo, composição química da fase estacionária, condições de alimentação e gradientes. Para lidar com o aumento do volume de injeção em escala piloto, o procedimento mais comumente utilizado é o aumento do volume da coluna com o aumento do seu diâmetro. Isso mantém o tempo de residência do produto constante e evita possíveis problemas de estabilidade do produto final (quando for o caso). A Figura 15 mostra um esquema com três tamanhos diferentes de coluna que são comumente utilizados em escala laboratorial, piloto e comercial. Assim, para essa análise econômica foram levantados vários cenários de operação, baseados nos resultados obtidos na escala analítica. Dessa forma, tentou-se manter uma previsão dos custos envolvidos de maneira simples e básica. Na avaliação econômica da purificação da melitina, foram selecionados três escalas de processo, sendo elas, analítica, piloto e comercial, referentes ao modo de operação em HPLC-batelada com injeção pulsada (injeção sequencial a cada intervalo de tempo de 15 min) e ainda, o modo de operação SMB.

Figura 15 - Exemplo de três diferentes escalas de colunas utilizadas em desenvolvimento de processos de separação.



<b>COLUNA</b>			
<b>Escala</b>	Preparativa	Planta piloto	Comercial
<b>Dimensão</b>	8 cm × 2,6 cm	25cm × 20 cm	50 cm × 20 cm
<b>Volume</b>	40 mL	10 L	40 L

Fonte: o autor.

Na Tabela 4 estão referenciadas as escalas, volumes das colunas utilizadas, número de colunas utilizadas no processo, número de trocas da fase estacionária por ano e o diâmetro de partícula. Como base para as escalas foi proposta a escala piloto 100 vezes a escala analítica e a comercial 10.000 vezes a escala analítica e, em modo SMB, aproximadamente 21.000 vezes.

Tabela 4 - Colunas referentes a cada uma das escalas dos cenários avaliados.

	<b>Volume da coluna (mL)</b>	<b>Nº de colunas</b>	<b>Trocas (ano)</b>	<b>D<sub>p</sub> (µm)</b>
Análítica	14,3	3	2	5
Piloto	4.300	1	1	10
Comercial	71.500	2	1	15
SMB	145.000	8	1	320

Fonte: o autor.

### 3.3.2 Determinação do custo da fase estacionária

A correlação entre o tamanho de partícula e o seu custo foi determinada por Pynnonen (1998) para diversas fases estacionárias, incluindo fases reversas C-18 (utilizada na purificação da melitina) para uma faixa de diâmetro de 5 a 900 µm, avaliada nos períodos entre 1972 e 1998. A equação utilizada para obtenção do custo (US\$/g) da fase estacionária segue como:

$$Custo \left( \text{US} \$/g \right) = 3623 \times (D_p)^{-1,675} \quad (1)$$

Na Tabela 5 são apresentados os custos da fase estacionária C-18 calculada com base na Equação (1), em US\$/g, e seu respectivo custo anualizado.

Tabela 5 - Custos da fase estacionaria (C-18) para cada uma das escalas.

	$D_p$ ( $\mu\text{m}$ )	US\$/g	US\$/ano
Analítica	5	244,51	11.244,64
Piloto	10	76,57	176.482,47
Comercial	15	38,83	2.975.886,08
SMB	320	0,23	143.405,20

Fonte: o autor.

### 3.3.3 Determinação do custo de manufatura (COM)

A determinação do custo de manufatura (COM) da melitina via técnica de RP-HPLC foi realizada utilizando a metodologia proposta por Turton et al. (2012). Dessa forma, o COM foi calculado como:

$$COM = 0,180 \times FCI + 2,73 \times LC + 1,23 \times (RMC + WTC + UC) + DEP \quad (2)$$

onde *FCI* é o investimento inicial, *LC* é o custo operacional, *RMC* é o custo da matéria-prima, *WTC* é o custo do tratamento de resíduos, *UC* é o custo de utilidades e *DEP* é a depreciação (10 % do FCI).

#### 3.3.3.1 Custos diretos

A maioria dos processos de separação envolvendo cromatografia possui seus maiores custos identificados como custos operacionais, custos com a fase estacionária, com o empacotamento de colunas e custos de bombeamento. Os custos de bombeamento foram estimados com base no consumo elétrico dos motores elétricos das bombas para cada uma das unidades de separação. Para os efluentes, apenas a acetonitrila foi considerada no custo de manufatura e a água não foi contabilizada. O custo da fase estacionária foi estimado pela Equação (2).

#### 3.3.3.2 Custo operacional (LC)

O custo operacional envolve a mão-de-obra utilizada na unidade de separação, embora normalmente esses tipos de unidades sejam altamente automatizadas, ficando a mão-de-obra especializada necessária apenas no monitoramento durante um período do

processamento. Dessa forma, foi considerado um operador em cada turno de trabalho, nos três turnos diários, durante 330 dias por ano e um especialista durante dois turnos diários. Foi estimado um valor de 3,80 US\$/h, considerando um total de 7.920 h operacionais no ano para os operadores e de 12,00 US\$/h para o técnico especialista, em um total de 5.280 h anuais. Para cada uma das unidades segue, na Tabela 6, o perfil operacional estimado. Convém salientar que foi considerado somente o pessoal necessário para suprir a demanda do processo de purificação.

Tabela 6 - Número de pessoal para operação de cada unidade.

Capacidade da unidade	Pessoal	
	[operadores]	[técnico]
Analítica	-	1
Piloto	1	1
Comercial	2	1
SMB	4	2

Fonte: o autor.

### 3.3.3.3 Custo de utilidades (UC)

O custo das utilidades são as despesas envolvidos na operação dos equipamentos da planta industrial, envolvendo os gastos energéticos no tempo de funcionamento. Foi determinado o consumo energético de bombas comerciais com capacidades (vazão e pressão) semelhantes às requeridas por cada unidade no período total de seu funcionamento (5400 h) e, dessa forma, estimado o custo com base no valor da energia elétrica na região (US\$ 0,16). O custo de bombeamento pode ser verificado na Tabela 7.

Tabela 7 - Custo de bombeamento.

Potência (CV)	Pressão (bar)	Vazão (L/min)	Eficiência (%)	Consumo (kW)	Nº de bombas	Custo (US\$)
1	10	10	80	0,92	1	\$ 794,88
5	50	30	70	5,26	1	\$ 4.542,17
20	250	31	70	21,03	3	\$ 54.506,06
20	250	31	80	18,40	3	\$ 47.692,80

Fonte: o autor.

#### 3.3.3.4 Custo da matéria-prima (RCM)

O custo da matéria-prima refere-se à aquisição da apitoxina, do seu transporte, dos solventes utilizados no processo, do custo da fase estacionária, bem como de qualquer pré-processamento necessário para a preparação da amostra a ser purificada. De acordo com pesquisa de mercado, foram encontrados valores variados para apitoxina (Tabela 8). Dessa maneira, o custo da matéria-prima e do pré-processamento das amostras não foram contabilizados, tendo em vista que uma mudança no local de instalação da unidade de produção ou do fornecimento da apitoxina acarretaria em uma drástica mudança no valor do Custo de Manufatura.

#### 3.3.3.5 Custo do tratamento de resíduos (WTC)

No processo de separação por cromatografia, os resíduos gerados são os solventes. Dessa forma, os custos de tratamentos de resíduos foram os do processo de recuperação de solvente por evaporação.

Tabela 8 - Tomada de preço da apitoxina comercializada em diferentes locais.

<b>Tomada de preços</b>	<b>Quant.</b>	<b>Reais</b>	<b>Dólares</b>
Venono bruto no Brasil	1 g	R\$ 80,00	\$ 280,00
	1 kg	R\$ 80.000,00	\$ 280.000,00
Venono bruto no exterior	1 g	R\$ 350,00	\$ 1.225,00
	1 kg	R\$ 350.000,00	\$ 1.225.000,00
Venono bruto Sigma-Aldrich	100 mg	R\$ 2.367,00	\$ 8.284,50
	1 kg	R\$ 23.670.000,00	\$ 82.845.000,00
Melitina HPLC 85 %, Sigma-Aldrich	1 mg	R\$ 437,00	\$ 1.529,50
	1 kg	R\$ 437.000.000,00	\$ 1.529.500.000,00

Fonte: PRODAPYS, PHARMA NECTAR, SIGMA-ALDRICH.





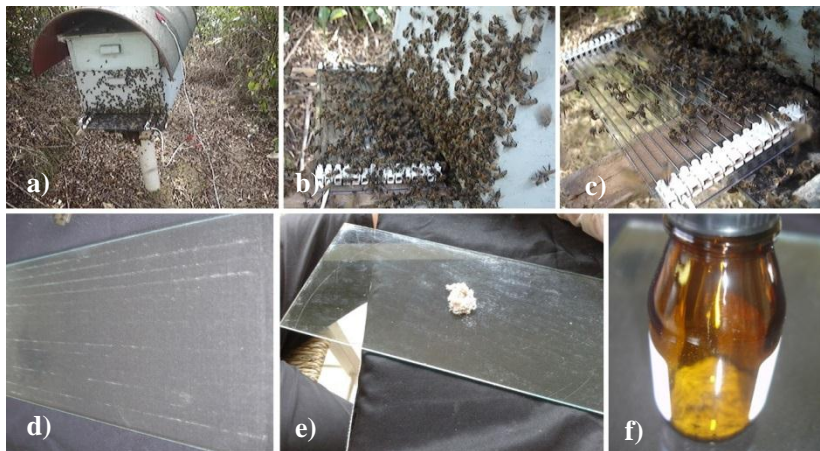
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PRIMEIRA ETAPA: DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MELITINA PURIFICADA A PARTIR DA APITOXINA

#### 4.1.1 Coleta do veneno

Para a primeira etapa do trabalho, a obtenção do veneno foi procedida utilizando-se as placas coletoras. A quantidade de veneno obtida de cada placa variou entre 50-120 mg, dependendo da estação do ano em que o veneno foi colhido (é conhecido que no inverno coleta-se menos veneno devido à maior inatividade das abelhas nesse período), bem como da quantidade de população de abelhas de cada colmeia. A Figura 16 mostra o processo realizado para se coletar o veneno.

Figura 16 – Imagens (a), (b) e (c) demonstram o procedimento de coleta do veneno bruto utilizando-se estímulos elétricos (placa coletora). Imagens (d) e (e) são referentes ao procedimento de raspagem da apitoxina. Imagem (f) demonstra a apitoxina coletada armazenada.



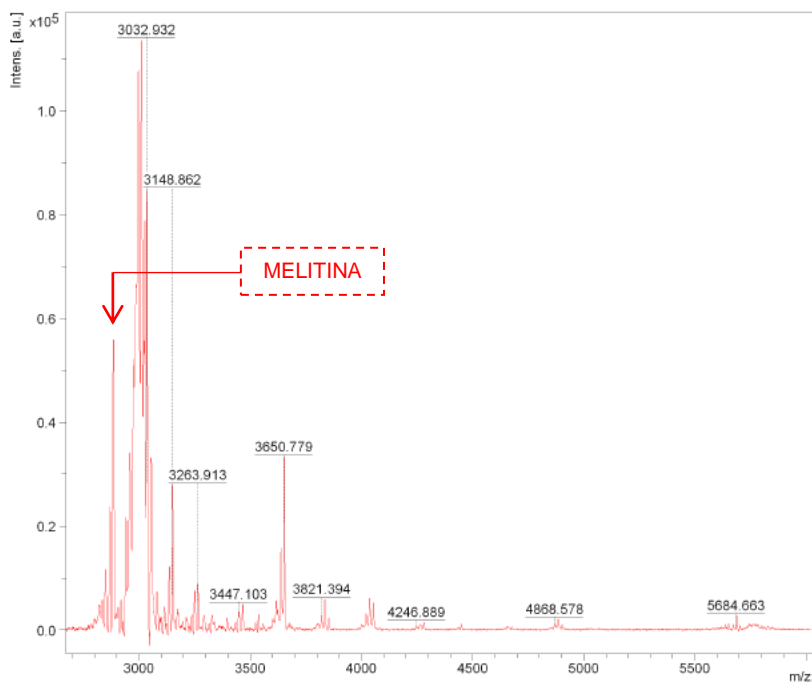
Fonte: o autor.

#### 4.1.2 Caracterização do veneno bruto

A amostra foi preparada conforme descrito no item 3.1.2 e foi analisada pela técnica de MALDI-TOF, cujos resultados são demonstrados na Figura 17. Devido à metodologia utilizada no equipamento, o qual foi ajustado para uma faixa de massa molar de 1.000 a 3.000 Da, com a finalidade de se observar contaminantes no

processo de purificação da melitina, a faixa observável ficou restrita a 1.000 – 6.000 Da devido à matriz e calibrantes utilizados. Dessa maneira, não foi possível observar se as enzimas de alta massa molar estavam presentes no sobrenadante após a centrifugação e filtração. Os resultados obtidos nesse estudo do veneno bruto especificamente não são precisos, mas dão uma noção de que há diversos componentes presentes no veneno bruto com massas molares próximas a da melitina (~ 2.847 Da). A identificação dos componentes não foi realizada nesta etapa, pois não foi encontrada nenhuma referência na literatura para comparação com os valores obtidos. Considerando que a determinação do perfil peptídico do veneno coletado não faz parte do objetivo do trabalho e que a composição do veneno é bastante susceptível à região em que é coletada, bem como às sazonalidades (MATYSIAK et al., 2011), prosseguiu-se com o trabalho objetivando apenas a identificação da melitina e a avaliação do seu grau de pureza.

Figura 17 – Espectro de massas MALDI-TOF do veneno bruto.



Fonte: o autor

### 4.1.3 Purificação do veneno bruto

#### 4.1.3.1 Etapas iniciais da purificação: preparação da amostra

A preparação das amostras foi realizada conforme descrito no item 3.1.2. A Figura 18 mostra a apitoxina após a centrifugação, no qual é possível observar 3 fases distintas: o sedimento no fundo do tubo, o sobrenadante e outra fração não solubilizada na parte superior do tubo. O sobrenadante coletado para as análises apresenta micropartículas que ficam retidas no filtro de nylon após a filtração.

Figura 18 – Solução após a ultracentrifugação.



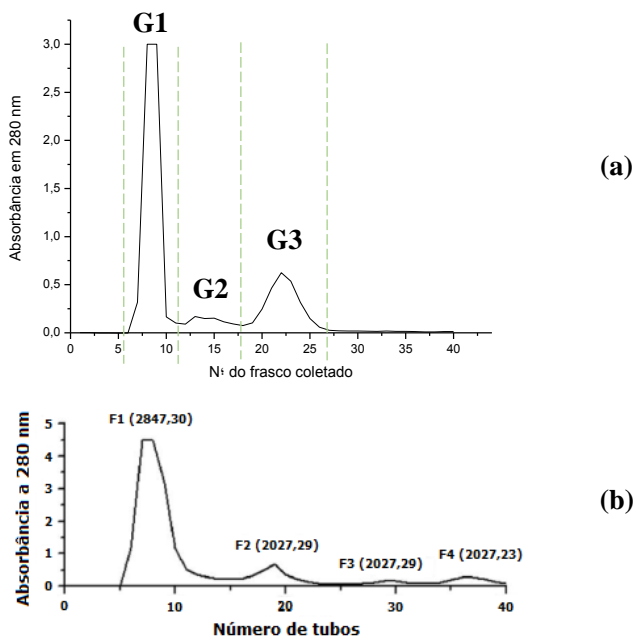
Fonte: o autor.

Como será observado no decorrer do trabalho, as análises realizadas apresentam apenas peptídeos de massa molar na faixa de 800 a 3.000 Da. Nenhuma das enzimas alergênicas é observada nos experimentos. Com base no exposto, supõem-se que estas enzimas, bem como outros peptídeos de alto peso molecular, estão presentes no sedimento ou na fração não solubilizada. Dessa maneira, julga-se que a centrifugação e a filtração são etapas importantes e essenciais no processo de purificação.

#### 4.1.3.2 Isolamento da melitina

Para esta etapa, 200 mg de amostra de apitoxina preparada conforme o item 3.1.4 foi injetado na coluna de cromatografia por permeação em gel (GPC). Alíquotas de 5 mL foram recolhidas em tubos de ensaio na saída da coluna e suas absorvâncias foram medidas em 280 nm. A Figura 19 mostra o cromatograma obtido desse experimento para três diferentes amostras de veneno bruto.

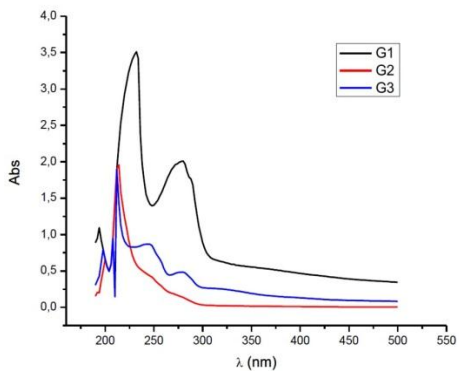
Figura 19 – a) Cromatograma obtido do fracionamento da apitoxina por meio da técnica de GPC (G1 = Fração 1; G2 = Fração 2; G3 = Fração 3). b) Frações obtidas do veneno de abelha bruto por meio de cromatografia de permeação em gel referente ao trabalho de CHEN et al. (2006).



Fonte: (a) o autor; (b) CHEN et al. (2006).

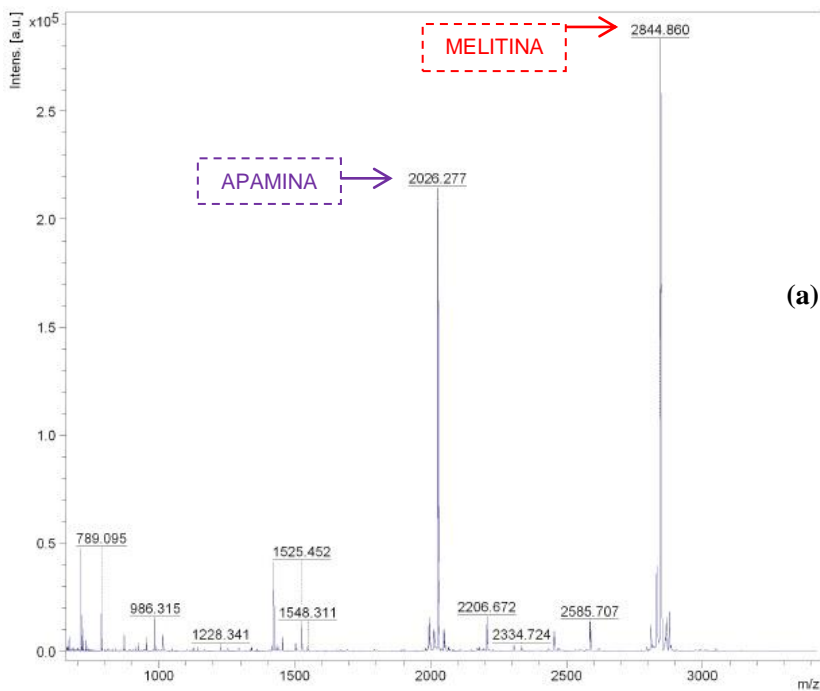
A coluna de GPC construída (conforme a metodologia descrita no item 3.1.4) demonstrou uma boa separação para esse nível de refinamento, isolando três grandes grupos. Os resultados obtidos são similares aos encontrados na literatura para esse tipo de separação por Chen et al. (2006). Doravante, as três frações obtidas (nomeadas G1, G2 e G3) foram caracterizadas por espectros UV-vis e espectroscopia de massas MALDI-TOF. Os espectros obtidos estão ilustrados nas Figuras 20 e 21. Os espectros UV-Vis mostram uma absorbância elevada em 215 nm para as três frações. Esse parâmetro foi utilizado nos experimentos seguintes.

Figura 20 – Varredura dos espectros UV-vis das frações G1, G2 e G3.



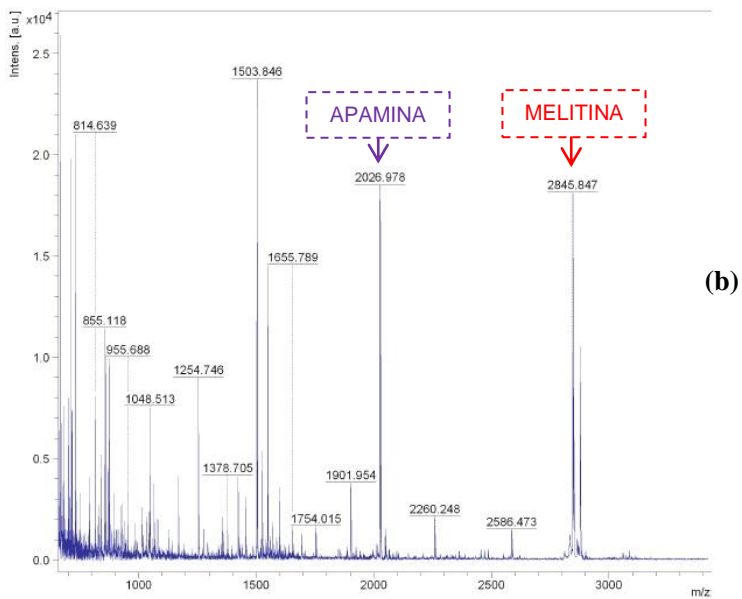
Fonte: o autor.

Figura 21 – Espectro de massas realizado em MALDI-TOF das frações G1 (a), G2 (b) e G3 (c).

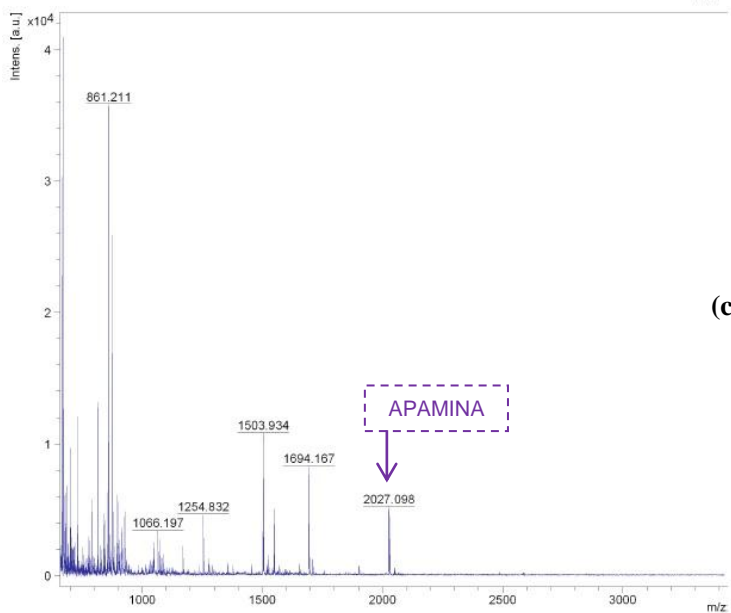


(a)

Figura 21 – Continuação.



(b)



(c)

Fonte: o autor.

Analisando-se os espectros de massa em conjunto com o cromatograma é possível afirmar que a maior parte da melitina ( $m/z \approx 2.846$ ) encontra-se na fração G1, tendo em vista a elevada absorbância dessa fração em comparação com a fração G2. Porém, a melitina isolada em G1 também possui outros componentes com massa molar próximo ao da melitina. O principal “contaminante” nessa fração é a apamina ( $m/z \approx 2.027$ ) identificada através de MALDI-TOF. É importante ressaltar que a fração G1 possui uma maior quantidade de componentes com peso molecular acima de 2.000 Da. A fração G2 possui uma variedade de componentes na faixa entre 1.000 a 2.000 Da. E, por fim, a fração G3 é rica no componente com massa molar  $m/z \approx 861$ . Isso indica que a coluna de GPC foi eficiente em isolar diferentes grupos de componentes de acordo com sua faixa de massa molar. Três grandes grupos foram separados. O Grupo 1, com massa molar  $\geq 2.000$  Da. O Grupo 2, com massa molar entre 1.000 e 2.000 Da e o Grupo 3  $\leq 1.000$  Da, além de alguns outros componentes como a apamina. O peptídeo apamina está presente nas 3 frações e provavelmente é responsável pela absorbância em 280 nm no UV-vis das frações G2 e G3. Convém salientar que qualquer pico nos espectros de massa MALDI-TOF com valores de  $m/z = 855, 1.254, 1.503$  e  $1.694$  são referentes ao calibrante utilizado na análise.

A título de comparação, está ilustrado na Figura 19b o experimento realizado por Chen et al. (2006). Os resultados obtidos neste trabalho em comparação com a literatura são muito parecidos. Obteve-se uma fração inicial que corresponde majoritariamente à melitina e subsequentes frações referentes à apamina. Apesar de ocorrer a separação, a melitina obtida não possui elevado grau de pureza por se tratar de uma etapa de isolamento, como já era esperado por ser uma etapa com baixo nível de refinamento. Um passo subsequente de purificação da fração G1 seria necessário para atingir o objetivo proposto.

Visto que após a centrifugação e a filtração da amostra o sobrenadante coletado injetado na coluna de GPC não exibiu as enzimas de altas massas moleculares como era esperado observar, julgou-se essa como uma etapa desnecessária no processo de purificação. O processo de centrifugação e filtração acaba atuando como uma etapa de captura e concentração da proteína alvo melitina, substituindo a etapa de GPC. O pré-processamento combinando centrifugação e filtração demonstrou ter o mesmo efeito que uma coluna de GPC, com a vantagem de ser uma operação menos onerosa.

Como a etapa de GPC não trouxe resultados expressivos no processo de separação, optou-se por realizar a completa separação da melitina da apamina diretamente no equipamento de RP-HPLC, tendo em vista que o custo de manufatura do processo escalonado seria reduzido ao excluir-se uma etapa do processo.

#### 4.1.3.3 Purificação refinada do veneno bruto utilizando equipamento de RP-HPLC

A preparação da amostra da apitoxina foi realizada de acordo com o item 3.1.5.1. Em seguida, 20  $\mu\text{L}$  da amostra preparada foram injetados no RP-HPLC utilizando-se os métodos 1A, 1B, 2 e 3. Os cromatogramas obtidos destes ensaios estão ilustrados na Figura 22.

Figura 22 - Cromatogramas (RP-HPLC) obtidos da análise do veneno bruto recém-coletado: (a) Método 1A; (b) reanálise da amostra após 4 dias utilizando o Método 1A; (c) Método 1B.

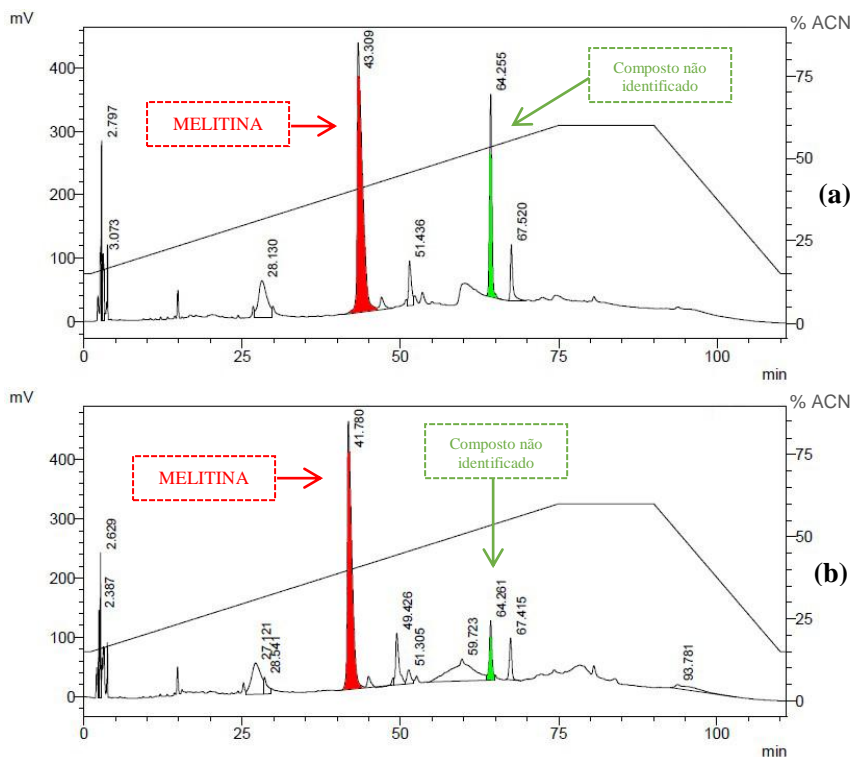
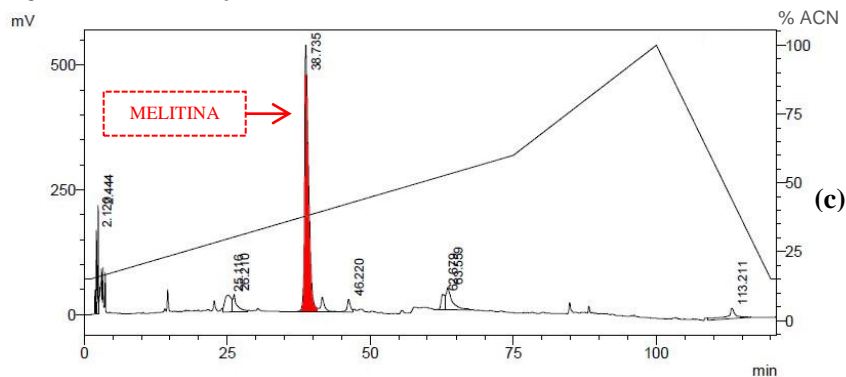




Figura 23 – Continuação.



Fonte: o autor.

É interessante notar que o Método 1A, que possui um gradiente tênue com lenta adição de modificador orgânico, separou diversos componentes na injeção da amostra do veneno bruto. O tempo de retenção ( $R_t$ ) para a melitina utilizando o Método 1A foi de 42 min. Posteriormente, foi corroborado, utilizando o padrão de melitina, que esse pico corresponde à melitina.

A mesma amostra injetada foi reanalisada após 4 dias. O cromatograma está ilustrado na Figura 23(b). É possível observar o desaparecimento do pico com tempo de retenção 64,255 min. Isso pode corresponder à degradação de algum componente do veneno bruto. O mesmo efeito é observado em outras etapas do trabalho e será discutido posteriormente.

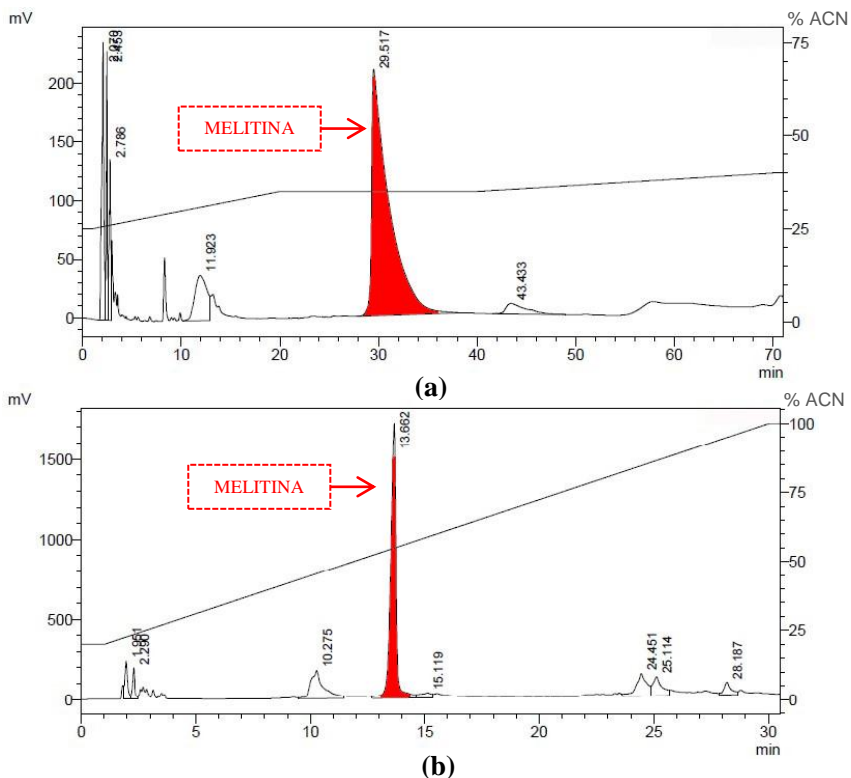
O Método 1B (Figura 23c) difere do Método 1A (Figura 23a) na elevação da concentração de acetonitrila aos 75 min para 100 %. Este artifício foi utilizado para verificar se ainda existia algum componente que não foi desorvido da coluna. Assim, reduziu-se ainda mais a polaridade do eluente aumentando-se a concentração de acetonitrila na fase móvel. Não foi verificada nenhuma ocorrência de compostos depois da faixa de 60 a 100 % de acetonitrila na fase móvel.

Apesar da boa separação dos componentes, este método possui um elevado tempo de análise e separação da melitina, que não seria aplicável em um escalonamento do processo. Buscou-se então elaborar metodologias que proovessem a separação da melitina em um curto tempo de análise.

Os Métodos 2 e 3 consistiram em avaliar o efeito da inclinação da rampa de solvente na separação da melitina. Para isso, desenvolveu-se

metodologias com rápida alteração da concentração de modificador orgânico, ou seja, rápido aumento na apolaridade do eluente (Método 2), bem como uma alteração vagarosa e branda na apolaridade do solvente (Método 3). Os cromatogramas obtidos para essas metodologias estão ilustrados na Figura 23. O tempo de retenção para melitina no Método 2 foi de 29,517 min e para o Método 3 foi de 13,662 min. Além disso, observou-se que o Método 3 resultou em um pico com boa resolução para a melitina, enquanto que no Método 2 ocorreu uma deformação do pico da melitina, indicando que esta sofre uma dessorção lenta após atingir o equilíbrio com a fase móvel. Isso ocorre devido ao gradiente isocrático a qual foi submetida na faixa entre 20 e 40 min do método. Esses testes indicaram que para se obter uma boa resolução para o pico da melitina, deve-se submetê-la a um gradiente de solvente com inclinação significativa. A partir disso, novas metodologias foram elaboradas com a finalidade de se otimizar essa etapa.

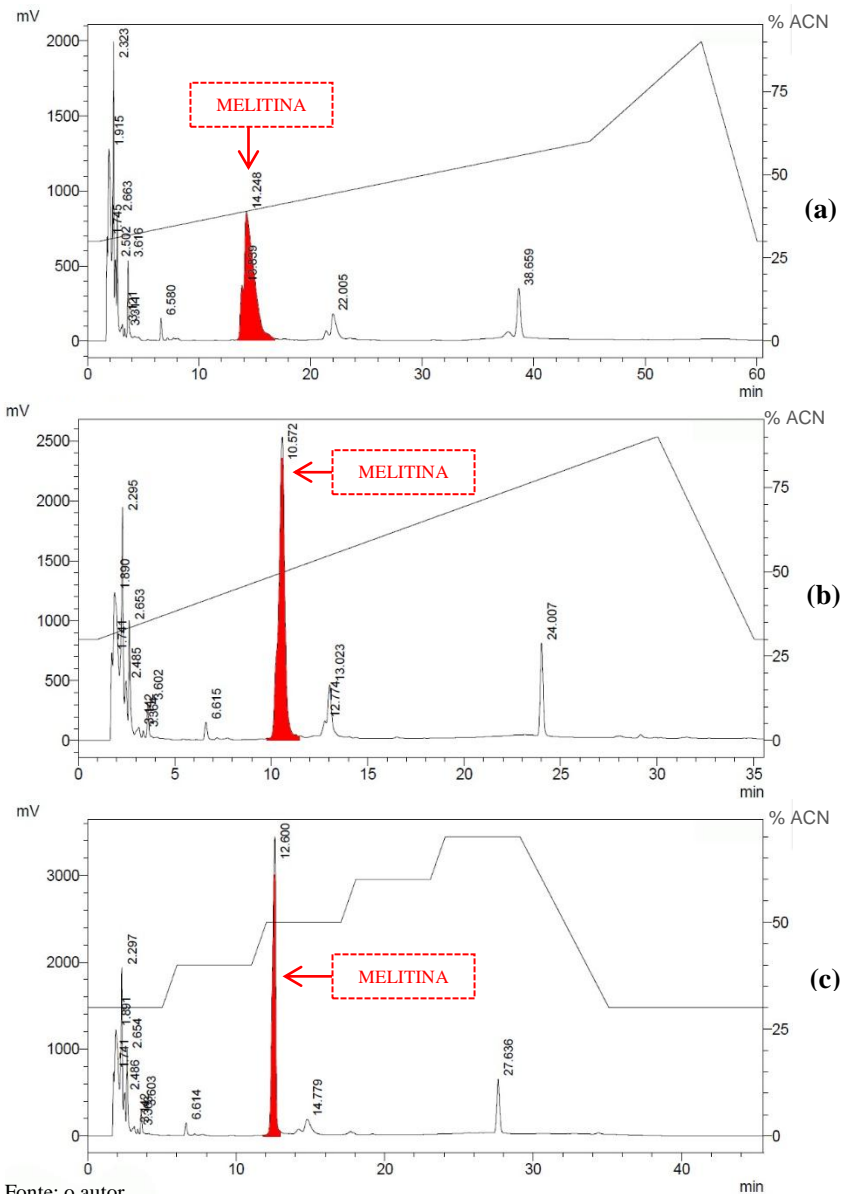
Figura 23 – Cromatogramas (RP-HPLC) obtidos da análise da apitoxina recém-coletada (melitina destacada em vermelho): (a) Método 2; (b) Método 3.



Fonte: o autor.

As novas metodologias desenvolvidas com base nos estudos iniciais foram denominadas Método 4, 5 e 6 (Figura 24). Os cromatogramas obtidos da injeção no RP-HPLC do veneno bruto para essas metodologias são apresentados na Figura 25. Na Tabela 9 estão listados os tempos de retenção obtidos para o pico de melitina referente a cada método.

Figura 24 – Cromatogramas (RP-HPLC) obtidos da injeção do veneno bruto para as metodologias 4 (a), 5 (b) e 6 (c).



Fonte: o autor.

Tabela 9 - Tempos de retenção ( $R_t$ ) obtidos para os picos referentes ao composto melitina para cada uma das metodologias desenvolvidas.

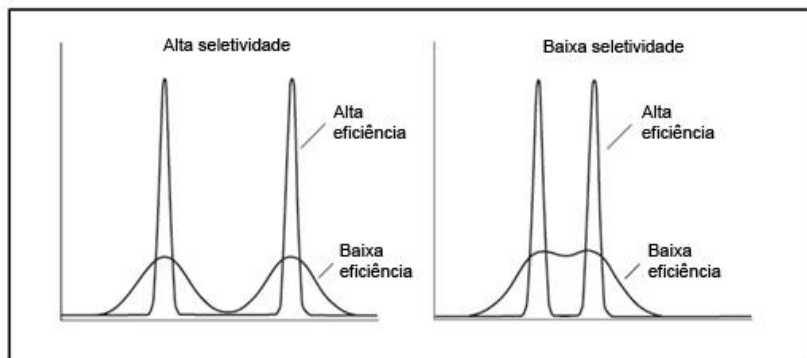
Metodologia	$R_t$ (min)
Método 4	14,284
Método 5	10,572
Método 6	12,600

Fonte: o autor.

Pelos cromatogramas, é possível observar que a melitina desorve da coluna numa concentração de solvente similar para todas as metodologias. As concentrações variam de 40 a 50 % de acetonitrila em água acidificada. Considerando o atraso que ocorre desde a fixação da concentração pelas bombas até o equilíbrio da coluna, pode-se afirmar que a adsorção da melitina ocorre quando se atinge uma concentração em torno de 40% de acetonitrila. A partir dessa concentração, a melitina corre livremente pela coluna, sem interagir com a fase móvel.

A Figura 25 ilustra graficamente o conceito de seletividade ( $\alpha$ ) e eficiência ( $N$ ) para separações em RP-HPLC. Esses conceitos foram utilizados para avaliar a qualidade da separação nos Métodos 4, 5 e 6. Para que se tenha uma boa separação, é mandatório que se obtenha uma boa seletividade e eficiência.

Figura 25 – Efeito da seletividade e eficiência sobre a resolução dos picos em RP-HPLC.



Fonte: Adaptado de Reversed Phase Chromatography, 1999.

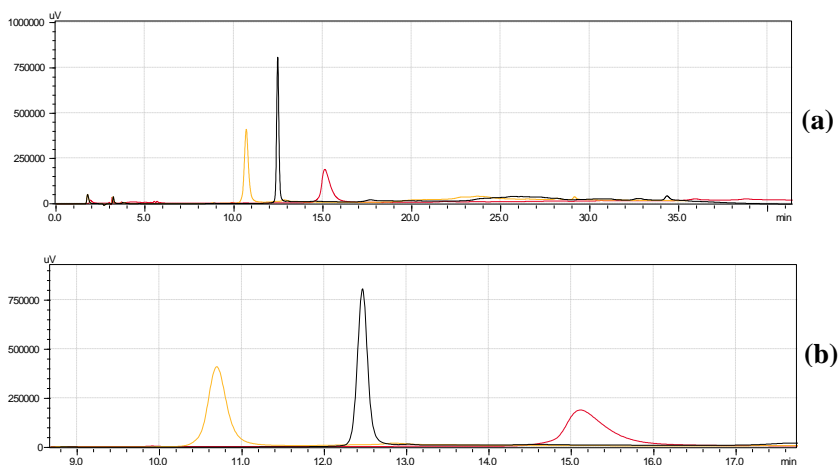
O Método 4 demonstrou uma ótima seletividade, porém, a eficiência obtida nesse método é baixa, tendo em vista a forma do pico

referente a melitina, a qual apresenta uma grande largura. Em contrapartida, o Método 5 apresentou boa seletividade e eficiência.

É importante salientar que entre os métodos desenvolvidos quanto menor a inclinação do gradiente de solvente, uma maior seletividade é obtida. Em compensação, perde-se em eficiência. Para contornar essa problemática, desenvolveu-se o Método 6, no qual a variação do gradiente de solvente é realizada em degraus ou *steps*. O objetivo do desenvolvimento dessa metodologia foi o de alcançar uma boa seletividade com as faixas lineares do solvente e, além disso, uma boa eficiência com a mudança abrupta de concentração do modificador orgânico nos *steps* do gradiente. O Método 6 testado também demonstrou boa eficiência e seletividade.

Para uma melhor avaliação da separação da melitina entre os métodos desenvolvidos, foram testadas essas mesmas metodologias. Porém, dessa vez, utilizou-se o padrão de melitina (SIGMA-ALDRICH, 98 %). A sobreposição dos cromatogramas obtidos para a avaliação da separação é demonstrada na Figura 26.

Figura 26 – (a) Cromatogramas obtidos das análises do padrão de melitina para os métodos 4 (vermelho), 5 (amarelo) e 6 (preto); (b) ampliação dos picos referentes a melitina obtidos pelas três metodologias.



Fonte: o autor.

A resolução ( $R_s$ ) é o método mais simples para quantificar a separação obtida entre duas moléculas do soluto. Esta relação simples pode ser expandida para demonstrar a correlação entre  $R_s$  e três

parâmetros fundamentais de uma separação cromatográfica. Os parâmetros que contribuem para a resolução dos picos são a seletividade ( $\alpha$ ), a eficiência ( $N$ ) e do fator de retenção ( $k'$ ).

Considerando-se o  $R_t$ ,  $R_s$ ,  $\alpha$  e  $N$ , o Método 6 foi eleito por demonstrar, na média, os melhores valores para esses três parâmetros.

O consumo de solvente nesse método foi de 1 mL/min em gradiente de acetonitrila:água (33 mL total da mistura por batelada), onde a demanda de etanol para os 33 min de corrida foi de, aproximadamente, 15 mL. Ou seja, para esse gradiente foi utilizado, em média, 0,45 mL/min de acetonitrila. Esses dados serviram de base para a avaliação econômica desse processo de separação em outras escalas.

#### 4.1.3.4 Avaliação da pureza da melitina obtida pelo Método 6

A fim de se verificar a pureza da melitina obtida pelo Método 6, bem como identificar os demais picos presentes no cromatograma, foi necessário desenvolver uma metodologia de coleta para o equipamento de RP-HPLC, uma vez que o mesmo não possui um coletor de frações. A proposta foi utilizar um composto traçante de forma a contabilizar o tempo em que esse componente apresentasse uma resposta no detector até a visualização de sua saída na tubulação do equipamento (similar a um tempo de residência), onde é possível coletar a amostra. Dessa maneira, optou-se por utilizar o corante azul de metileno, monitorando sua passagem pelo detector UV-vis em 670 nm. O tempo que o corante demorou a fluir do detector até a saída do equipamento foi cronometrada em diferentes vazões, as quais estão reportadas na Tabela 10. Assim, elaborou-se um sistema de coleta de amostras para o equipamento, tornando possível a coleta das frações de amostras injetadas para posteriores análises.

Tabela 10 - Medida do tempo para eluição do corante do detector até o ponto de coleta para diferentes vazões.

Vazão (mL/L)	Medida	Tempo (s)	Média (s)
0,80	1	27	
0,80	2	27	28
0,80	3	30	
1,00	1	23	
1,00	2	23	23,3
1,00	3	24	
1,00	4	23	
1,20	1	15	
1,20	2	18	
1,20	3	20	18,4
1,20	4	20	
1,20	5	19	

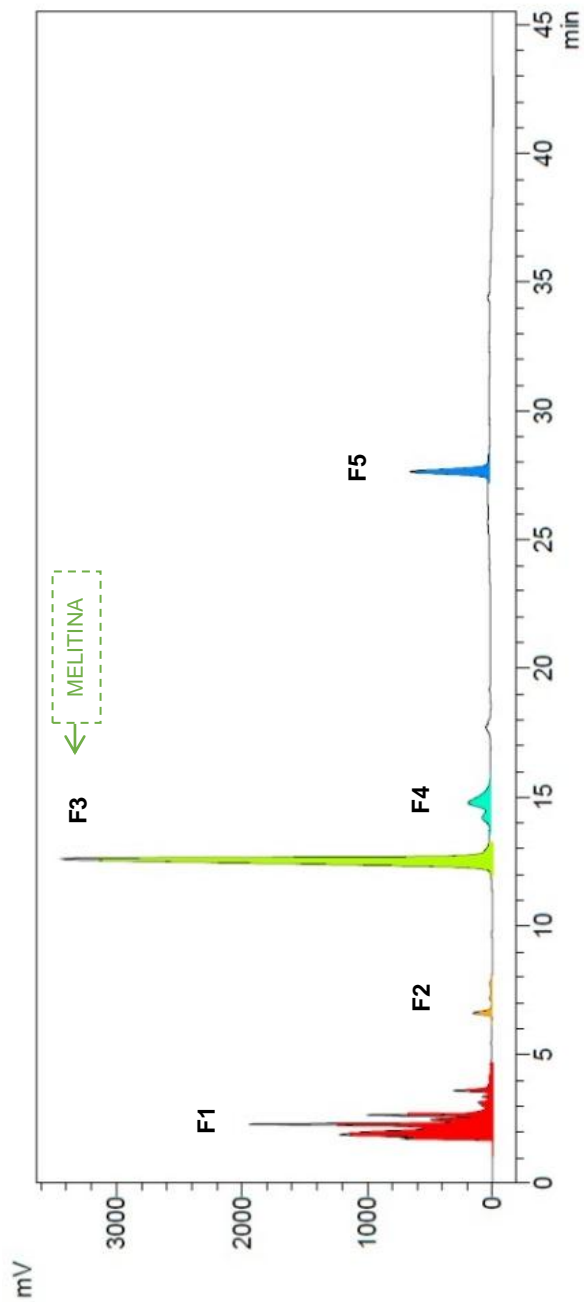
Fonte: o autor.

Doravante, foi preparada uma solução de 5 mg/mL de apitoxina com subsequente ultracentrifugação a 13.500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro de nylon 45 µm. A amostra preparada foi injetada no equipamento de RP-HPLC utilizando-se o Método 6. Cinco injeções sucessivas foram realizadas a fim de tornar possível a coleta de uma quantidade suficiente para posteriores análises. Foram coletadas as frações de cada pico do cromatograma. Não foi contabilizada a quantidade recuperada. Os segmentos coletados estão ilustrados no cromatograma da Figura 27.

Cada fração foi analisada por espectrometria de massa MALDI-TOF, com exceção da fração F5, a qual apresentou degradação (ocorreu desaparecimento do pico) durante o processo de coleta, não sendo possível identificar esse componente. Os resultados estão ilustrados na Figura 28.

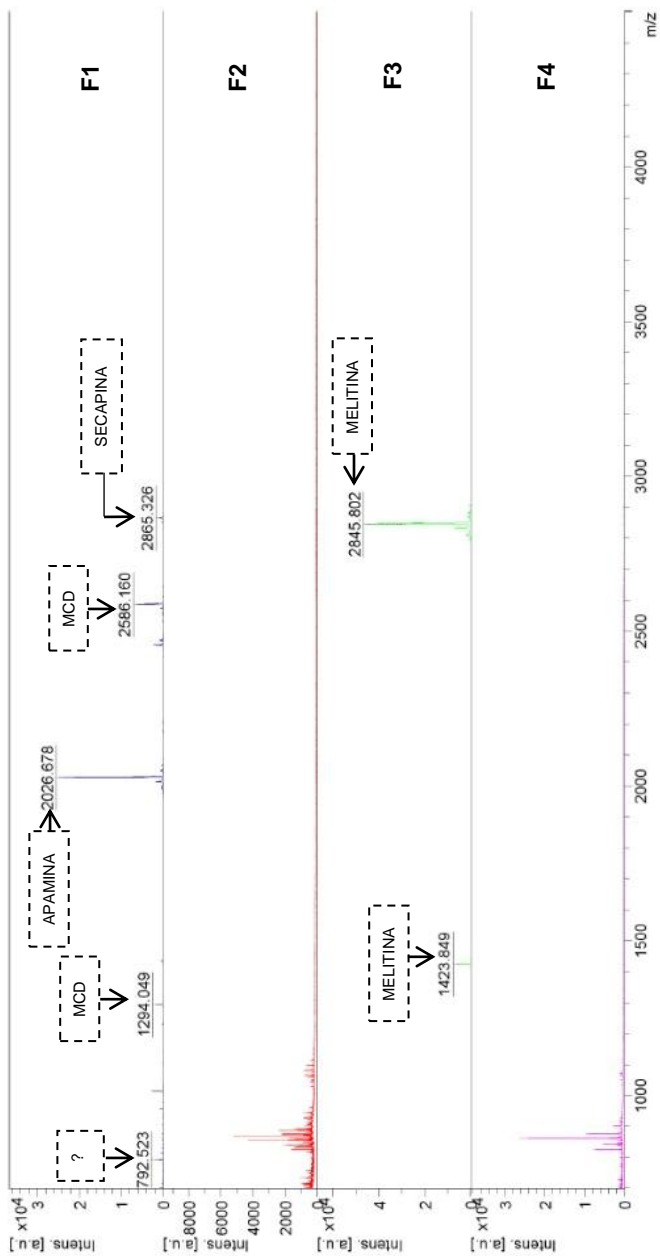


Figura 27 – Frações coletadas da injeção de apitoxina utilizando o Método 6.



Fonte: o autor.

Figura 28 – Análise de espectrometria de massas MALDI-TOF das frações F1, F2, F3, F4.

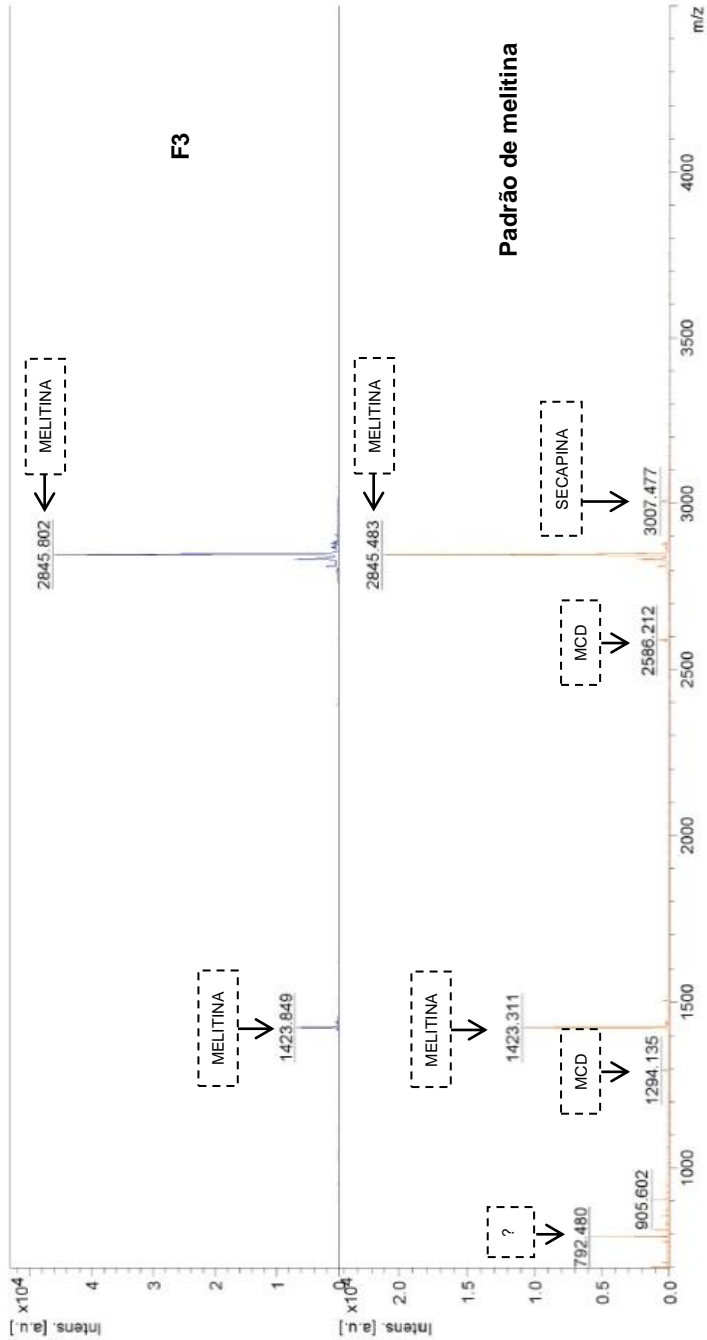


Fonte: o autor.

A identificação dos compostos foi realizada comparando-se a massa obtida com as massas reportadas na literatura (MATYSIAK et al., 2011). Na fração F1, os picos de maior intensidade, com  $m/z = 2.026,678$ , são correspondentes ao peptídeo apamina. A segunda maior intensidade, com  $m/z = 2.586,160$ , corresponde ao peptídeo MCD. O pico  $m/z = 1.294,049$  também corresponde ao peptídeo MCD, onde  $z = 2$ . O pico com  $m/z = 2.865,326$  corresponde a um precursor da secapina. Não foi possível identificar o pico de menor massa,  $m/z = 792,523$ . Muitos compostos presentes na apitoxina possuem massas moleculares próximas a este valor, bem como dos picos obtidos nas frações F2 e F4. Estes sinais podem corresponder a fosfolípidos,  $\alpha$ -aminoácidos, procaminas A e B ou ácido  $\gamma$ -aminobutírico.

A fração F3 demonstrou o sucesso no isolamento da melitina com elevado grau de pureza, uma vez que nenhum outro pico, além da melitina, foi encontrado no espectro dessa fração, levando em conta a alta sensibilidade desse equipamento. A massa do pico  $m/z = 2.845,802$  corresponde exatamente ao que é reportado na literatura para esse composto. O pico  $m/z = 1.423,849$  é referente à detecção da melitina com  $z = 2$ . Ademais, foi realizada a espectrometria de massas do padrão de melitina e comparado com a fração F3, a melitina isolada pela metodologia desenvolvida. Os resultados estão ilustrados na Figura 29. É possível observar que o padrão de melitina apresenta picos correspondentes a outros compostos, incluindo o peptídeo MCD, o mesmo composto com  $m/z = 792$  separado na fração F1 da metodologia desenvolvida que não foi possível identificar, e outros dois compostos com  $m/z = 905$  e  $3007$ . De acordo com a massa molecular reportada na literatura, o composto com  $m/z = 3.007$  é possivelmente o peptídeo secapina (MATYSIAK et al., 2011). Convém ressaltar que todas essas impurezas presentes no padrão de melitina foram removidas com sucesso na metodologia desenvolvida, obtendo-se melitina com elevado grau de pureza na fração F3.

Figura 29 – Comparação da análise de massas MALDI-TOF do padrão de melitina e da melitina obtida pelo método desenvolvido.

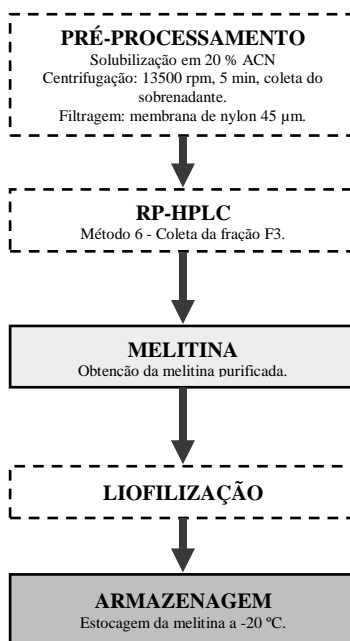


Fonte: o autor.

#### 4.1.4 Considerações sobre a primeira etapa

Pode-se observar que as etapas iniciais de preparação da amostra, mais especificamente a centrifugação e a filtração, atuam como etapas importantes no processo de separação, eliminando/separando componentes que conhecidamente estão presentes na apitoxina, e que não foram identificados nas etapas subsequentes de separação. Em contrapartida, a etapa de GPC não apresenta benefícios reais para a purificação da melitina e pode ser descartada do processo. O processo de obtenção de melitina com alto grau de pureza pode ser alcançado somente com as etapas de centrifugação/filtração com subsequente purificação em RP-HPLC. O fluxograma do processo de purificação desenvolvido é mostrado na Figura 30.

Figura 30 – Fluxograma do processo de purificação desenvolvido.



Fonte: o autor.

Também foi possível diagnosticar que ocorre degradação de um componente específico não identificado do veneno bruto. Foi observado que a degradação desse componente tem início logo após a coleta, tendo

em vista a diminuição dos picos referentes a esse composto nos cromatogramas das Figura 23a e 23b. Esse mesmo composto corresponde à fração F5 da Figura 27. A degradação continua por até uma semana após a coleta do veneno e ocorre mesmo com estocagem a -20 °C. Uma análise mais aprofundada sobre esse tópico é discutida na segunda etapa do trabalho.

## 4.2 SEGUNDA ETAPA: ENCAPSULAMENTO DA MELITINA

O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar a formulação de nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) via técnica de fusão/dupla emulsão, com a finalidade de se desenvolver um sistema de entrega estável para a melitina.

### 4.2.1 Avaliação da estabilidade da melitina

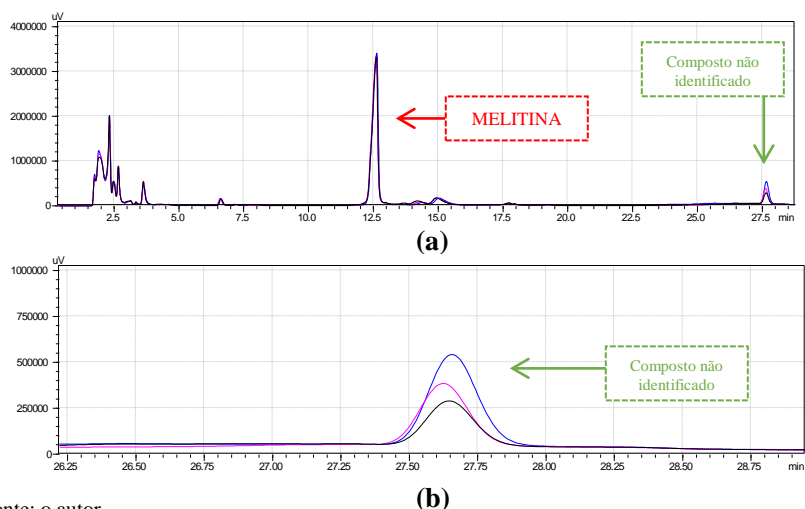
Tendo em vista a etapa de fusão no processo de preparação dessas nanopartículas, foi necessário avaliar a estabilidade térmica da melitina. Para isso, elaborou-se uma análise que consistiu em aquecer em banho-maria uma amostra do veneno bruto até 80 °C durante uma hora. Alíquotas do veneno foram recolhidas ao longo do tempo e injetadas em RP-HPLC para averiguar se houve alteração no pico referente à melitina. A Figura 31 mostra os resultados obtidos para esse experimento.

Foi observado ao longo do experimento um progressivo aumento da coloração amarela na amostra analisada. Os cromatogramas comparativos mostram a sobreposição exata da maioria dos picos, inclusive o pico referente à melitina, indicando que não houve degradação da melitina e, portanto, ela poderia ser aquecida até 80 °C na etapa de fusão na preparação de nanopartículas sem maiores problemas. Todavia, ocorreu uma diminuição do pico com  $R_t = 28$  min ao longo do período de aquecimento. Isto provavelmente indica a degradação deste composto, bem como pode explicar o aumento da coloração amarela da amostra. Há grandes possibilidades que esse seja o mesmo composto não identificado nos experimentos do item 4.1.3.3.

Também foi avaliada a estabilidade da melitina quanto ao aspecto da armazenagem. Um teste semelhante ao anterior do veneno bruto foi realizado. Desta vez, a amostra foi estocada a 5 °C durante o período de um mês. Alíquotas da amostra foram injetadas em RP-HPLC ao longo desse período. A Figura 32 mostra o resultado desse experimento. Novamente é possível notar que ocorre a sobreposição da

maioria dos picos, havendo uma pequena alteração no pico da melitina no que se refere ao tempo de retenção. Porém, a resolução e as áreas dos picos são mantidas, indicando que não houve degradação da melitina durante o período de estocagem. Igualmente ao teste anterior, e também como foi analisado no experimento do item 4.1.3.2, ocorre a degradação de algum componente do veneno bruto logo após sua coleta. É possível observar uma drástica redução na altura e na área do pico ao longo do experimento até o quase completo desaparecimento. Os resultados desses dois testes, bem como o do item 4.1.3.2, indicam que existe um composto muito instável presente no veneno bruto, o qual sofre degradação logo após a coleta da apitoxina. Devido a essa característica, não foi possível identificar esse composto via técnica de espectrometria de massa. Possivelmente esse componente sofre oxidação pela presença de ar ou luz, como é o caso de diversas moléculas de origem biológica.

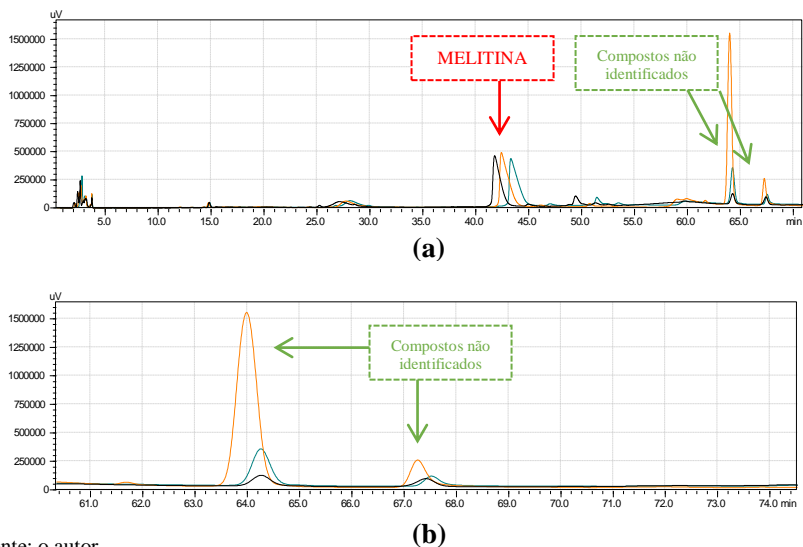
Figura 31 – Cromatogramas (RP-HPLC) da avaliação da estabilidade da melitina frente ao aumento de temperatura:  $t_0$  (azul);  $t = 30$  min (roxo) e  $t = 60$  min (preto). (a) sobreposição dos cromatogramas  $t_0$ ,  $t_1$  e  $t_2$ . (b) sobreposição dos dos cromatogramas  $t_0$ ,  $t_1$  e  $t_2$  referentes ao composto desconhecido.



Fonte: o autor.

Comprovada a estabilidade da melitina, pode-se prosseguir para as próximas etapas da elaboração de um sistema de armazenagem para a melitina. Assim, deu-se início à produção de melitina com elevado grau de pureza e a preparação de NLSs contendo melitina.

Figura 32 - Cromatogramas (RP-HPLC) da avaliação da estabilidade da melitina frente ao período de armazenagem.  $t_0$  (laranja);  $t_1 = 15$  dias (verde) e  $t_2 = 30$  dias (preto). (a) sobreposição dos cromatogramas  $t_0$ ,  $t_1$  e  $t_2$ . (b) sobreposição dos dos cromatogramas  $t_0$ ,  $t_1$  e  $t_2$  referentes aos compostos desconhecidos.



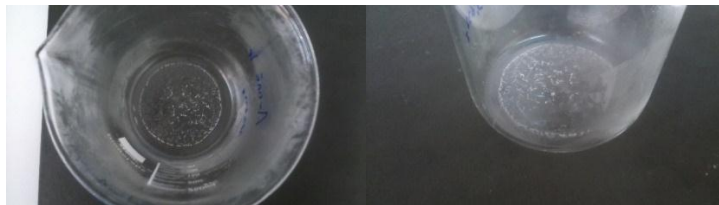
Fonte: o autor.

#### 4.2.2 Produção de melitina em escala analítica

Para a produção de pequenas quantidades de melitina, em escala analítica por cromatografia, utilizou-se uma coluna analítica com a injeção "sobrecarregada" (em termos de análise), ou seja, em concentrações superiores as normalmente utilizadas em escala analítica. Seguidas injeções de 100  $\mu$ L da amostra de apitoxina foram realizadas no RP-HPLC utilizando-se o Método 6. A fração F3 de cada corrida cromatográfica foi coletada de maneira análoga à realizada no item 4.1.3.3. Obteve-se, dessa forma, uma solução concentrada de melitina. Essa solução foi então liofilizada de modo a se obter a melitina na forma sólida. A Figura 33 mostra a melitina após ser liofilizada, a qual foi posteriormente utilizada na preparação de nanopartículas lipídicas sólidas.



Figura 33 – Obtenção da melitina através de seguidas injeções sobrecarregadas no RP-HPLC e subsequente liofilização.



Fonte: o autor.

#### 4.2.3 Preparação de NLSs contendo melitina

A preparação das nanopartículas seguiu a metodologia descrita no item 3.2.1. Diversos testes foram realizados alterando-se parâmetros, como as massas dos reagentes e potência de sonicação, de modo a se identificar um tamanho de partícula entre 300 e 400 nm. Primeiramente, as NLSs foram preparadas e caracterizadas sem a adição de melitina. Em seguida, a melitina foi adicionada na fase aquosa interna durante o preparo. Medidas de tamanho de partícula e potencial zeta foram realizadas como forma de caracterização, as quais estão reportadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Medidas de potencial zeta e diâmetros de partícula das nanopartículas de ácido esteárico.

Experimento	Nanopartícula	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro médio de Partículas (nm)	Índice de Polidispersão
1	Branco	$-38,5 \pm 1,3$	$408,0 \pm 6,6$	$0,282 \pm 0,021$
	Melitina	$-33,8 \pm 0,3$	$422,3 \pm 6,2$	$0,242 \pm 0,003$
2	Branco	$-38,6 \pm 0,3$	$330,2 \pm 4,4$	$0,183 \pm 0,015$
	Melitina	$-34,8 \pm 1,1$	$399,3 \pm 4,3$	$0,266 \pm 0,020$
3	Branco	$-34,1 \pm 0,9$	$301,5 \pm 0,9$	$0,215 \pm 0,030$
	Melitina	$-36,0 \pm 0,7$	$337,5 \pm 2,5$	$0,208 \pm 0,019$

Fonte: o autor.

Analisando-se os dados é possível verificar que os sistemas preparados resultaram em miniemulsões estáveis com partículas na escala nanométrica. Há um aumento médio de aproximadamente 39,7 nm no diâmetro das partículas quando estas são preparadas com a adição

de melitina na fase aquosa interna. Este aumento no tamanho da partícula é um forte indicativo de que a melitina está aprisionada no interior da fase aquosa ou mesmo na interface da fase aquosa com a camada lipídica.

Conforme citado no item 3.2.2.2, um valor elevado de potencial zeta é importante para uma boa estabilidade físico-química do sistema coloidal, uma vez que grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação das partículas. Como pode ser observado na Tabela 11, todas as amostras avaliadas apresentaram módulo do potencial zeta superior a 30 mV, atendendo ao pré-requisito para uma boa estabilidade da dispersão. Testes a respeito da estabilidade da dispersão não foram realizados, porém, visualmente, a dispersão permaneceu estável, sem ocorrer precipitação, pelo período de um mês, até serem descartadas.

#### **4.2.4 Considerações sobre a segunda etapa**

Testes iniciais demonstraram que a melitina apresenta estabilidade suficiente para suportar o processo de preparação de NLSs via técnica de fusão/dupla emulsão, além de não sofrer degradação quando armazenada em solução a 5 °C por um período de 30 dias, indicando que formulações de fármacos contendo melitina podem ser elaborados e manterem suas atividades pelo período de pelo menos 30 dias.

Além disso, foi comprovado que a metodologia de separação e purificação desenvolvida fornece melitina com elevado grau de pureza. Entretanto, devido à escala analítica do processo, a quantidade de melitina obtida é baixa, requerendo várias injeções para se obter uma quantidade necessária para aplicações posteriores.

Os testes iniciais do encapsulamento da melitina com o propósito de se obter um sistema de armazenagem e liberação do fármaco mostraram uma estabilidade satisfatória do sistema. Ademais, as medições do diâmetro da partícula são um bom indicativo de que de fato ocorreu o encapsulamento da proteína. Todavia, não é possível uma análise somente por esse parâmetro para verificar se a melitina está de fato contida na nanopartícula, bem como o local específico onde ficou retida. O estudo nessa etapa limitou-se a verificar a possibilidade de se utilizar a técnica de encapsulamento via fusão/dupla emulsão, o qual, de acordo com os resultados obtidos, parece promissor. O estudo acabou sendo limitado por entraves como tempo, pouca quantidade de proteína isolada e a falta de equipamentos adequados para a realização de análises e preparo da dispersão. Porém, tem-se a intenção de dar

continuidade a esse estudo realizando testes mais aprofundados a fim de se verificar a eficiência no encapsulamento da melitina.

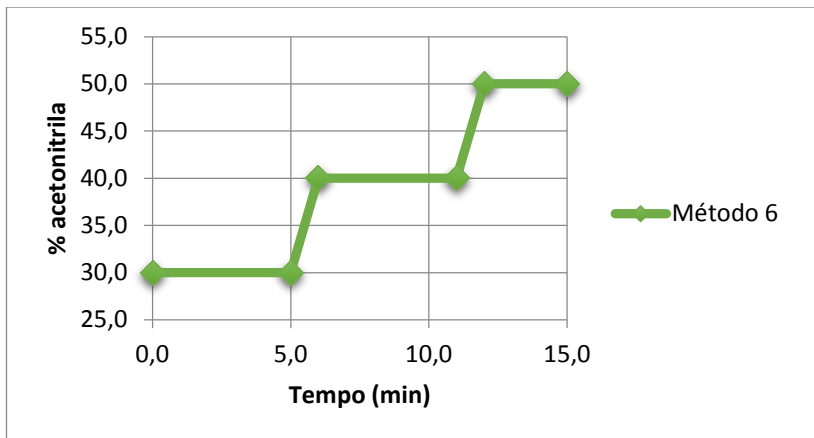
#### 4.3 TERCEIRA ETAPA: AVALIAÇÃO ECONÔMICA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO

Para a avaliação do custo de manufatura da melitina, foi considerado somente a etapa do processo que corresponde à separação cromatográfica. Os custos correspondentes ao material necessário para o pré-processamento, aquisição e transporte da matéria-prima e custos operacionais dessas etapas não foram considerados.

Um escalonamento foi realizado transpondo-se dados da metodologia desenvolvida no processo de menor escala para uma escala apropriada às necessidades produtivas. Convém ressaltar que conforme pode ser observado no item 4.1.3.3 (Figura 27), após 15 min decorridos da metodologia desenvolvida, já é possível obter melitina purificada. Por essa razão, foi definido o tempo de injeção como sendo de 15 min. A descrição da metodologia escolhida para o *scale-up* está descrita na Figura 34.

A Tabela 12 contém as condições operacionais para cada um dos cenários estimados. Para a produção de pequenas quantidades de melitina, em escala analítica por cromatografia pulsada, optou-se pelo uso de uma coluna analítica com a injeção "sobrecarregada" (em termos de análise), ou seja, em concentrações superiores as normalmente utilizadas em escala analítica. Manteve-se a mesma concentração de extrato na alimentação (100 g/L), salvo para o modo de operação SMB que suporta concentração mais elevada na injeção.

Os custos diretos constituintes do custo de manufatura (COM) foram determinados e estão apresentados na Tabela 13. Pode-se observar a redução no custo de manufatura com o aumento de escala em HPLC-batelada. Mesmo assim, o modo de operação em SMB continua sendo o mais econômico (1.504,03 US\$/kg), em conformidade com o que é discutido na literatura (PYNNONEN, 1998; ROSA e MEIRELES, 2005).

Figura 34 - Gradiente de solvente e tempo de injeção utilizados para o *scale-up*.

Fonte: o autor.

Para os cenários avaliados, nas condições citadas, os valores do quilograma de melitina produzida são bastante inferiores aos valores comercializados. O valor da embalagem de 1 mg de melitina obtido da apitoxina, com 85 % de pureza, custa para o consumidor final, em média, US\$ 124,86, ou seja, US\$ 124.857.142,86 /kg (valores obtidos na revenda da Sigma Aldrich Brasil - 2015). Cabe ressaltar que não foi possível obter valores comercialmente praticados para as quantidades superiores (em kg).

Dessa maneira, é possível comparar o valor comercialmente praticado da melitina purificada com os valores estimados pela avaliação econômica do processo desenvolvido. Essa comparação pode ser visualizada na Figura 35. Observa-se que todos os cenários estimados possuem COM abaixo do valor do quilograma da melitina comercializado. Cabe ressaltar que a avaliação econômica levou em conta somente a etapa cromatográfica do processo de purificação e não considera os custos do pré-processamento da amostra nem os custos da matéria-prima, como também não considera os custos envolvidos na comercialização de um produto. Logo, conclui-se que, para produzir e comercializar a melitina através do processo proposto, os valores do COM seriam maiores do que os expostos na Figura 35.

Tabela 12 - Bases econômicas e condições do processo de separação.

<b>CONDIÇÕES DO PROCESSO</b>	<b>UNID.</b>	<b>ANALÍTICA</b>	<b>PILOTO</b>	<b>COMERCIAL</b>	<b>SMB</b>
Concentração da alimentação	g/L	100	100	100	750
Pureza da alimentação	%	70%	70%	70%	70%
Recuperação	%	90%	90%	90%	90%
Volume de injeção	mL	0,1	10	1000	
Período de injeção	min	15	15	15	
Vazão de solvente	mL/min	1	100	10000	5200
Vazão da alimentação					1000
Horas diárias	h	24	24	24	24
n° de injeções/dia	-	96	96	96	
Volume injetado por dia	mL/dia	9,6	960	96000	1440000
Massa extrato injetada por dia	g/dia	0,96	96	9600	1080000
Massa de composto por dia	g/dia	0,00672	0,672	67,2	7560

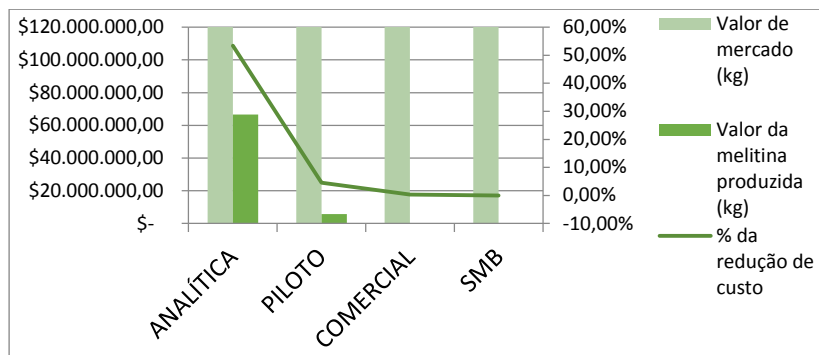
Fonte: o autor.

Tabela 13 - Custos diretos do processo de separação nos diferentes cenários.

	<b>ANALÍTICA</b>	<b>PILOTO</b>	<b>COMERCIAL</b>	<b>SMB</b>	
Investimento inicial (FCI)	100.000,00	500.000,00	1.000.000,00	1.400.000,00	[US\$]
<b>Custos</b>					
Custos fixos e gerais (FC+GC)	18.000,00	90.000,00	180.000,00	252.000,00	[US\$/ano]
Custo de utilidades (UC)	794,88	21.575,31	685.000,00	720.000,00	[US\$/ano]
Custo de mão de obra (LC)	9.504,00	45.936,00	123.552,00	247.104,00	[US\$/ano]
Custo de matéria-prima (RMC)	63.516,64	676.482,47	3.975.886,08	1.143.405,20	[US\$/ano]
Custo de tratamento de resíduos (WTC)	-	5.000,00	11.000,00	15.000,00	[US\$/ano]
Depreciação (10 % do FCI)	10.000,00	50.000,00	100.000,00	140.000,00	[US\$/ano]
COM da melitina (anual)	133.049,09	1.130.166,35	6.363.716,84	3.337.032,32	[US\$/ano]
Produção anual de melitina (kg)	0,00	0,20	20,00	2.245,32	[kg/ano]
COM da melitina/kg produzido	66.663.205,83	5.662.609,98	318.849,05	1.504,03	[US\$/ano]

Fonte: o autor.

Figura 35 - Comparação entre os COM estimados e o valor de melitina praticado no mercado.



	ANALÍTICA	PILOTO	COMERCIAL	SMB
Valor de mercado (kg)	\$124.857.142,86	\$124.857.142,86	\$124.857.142,86	\$124.857.142,86
Valor da melitina produzida (kg)	\$66.663.205,83	\$5.662.609,98	\$318.784,05	\$1.504,03
% da redução de custo	46,60%	95,46%	99,74%	99,98%

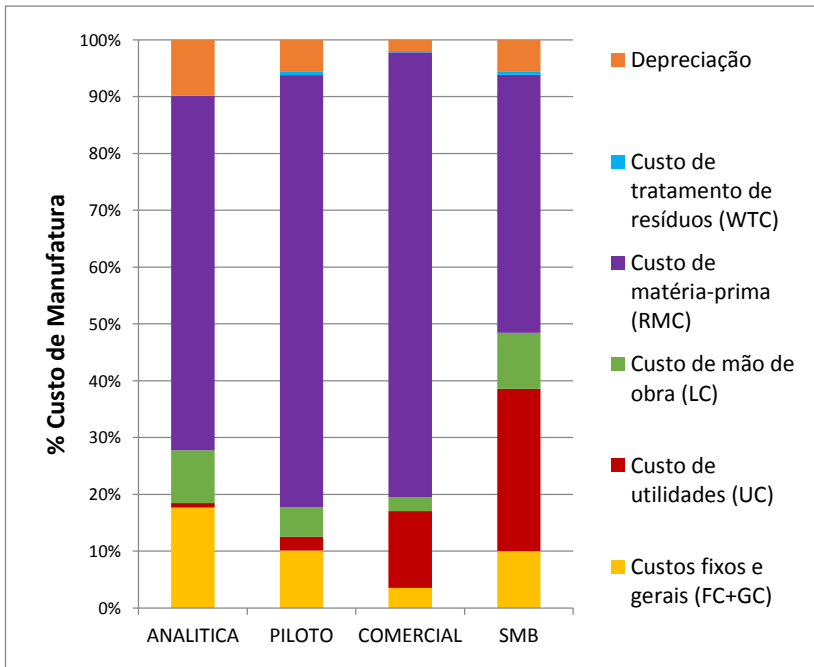
Fonte: o autor.

Pode-se observar na Figura 36 que o custo de manufatura da melitina em escala analítica é distribuído entre os custos indiretos (fixos e gerais) e diretos, como matéria-prima (solventes e fase estacionária) e mão-de-obra. Com o aumento da escala para os processos em HPLC-batelada, observa-se que os custos dominantes se voltam para a matéria-prima (solventes e fase estacionária). Para o processo em modo SMB, o COM é dominado pelos custos de utilidades além do custo de matéria-prima. O incremento no custo de utilidade ao aumentar-se a escala do processo é compreensível (nos cenários comercial e SMB), visto que quanto maior a unidade produtiva, maior o consumo de energia. Para os processos em HPLC-batelada, a maior parte do COM é oriunda do custo matéria-prima (RCM), nesse caso, a fase estacionária das colunas utilizadas. Em modo SMB há uma grande redução da influência do RCM no COM. Isso se deve ao fato de que uma planta de SMB, em comparação ao HPLC-batelada, requer menos fase estacionária, utiliza partículas maiores a um menor custo e consome menos solvente.

É importante salientar que a estimativa econômica do custo de manufatura utilizado proposto por Turton (2012), Equação (2), englobou os custos indiretos, fixos e gerais, e diretos, onde a taxa de depreciação (10 % do FCI) foi agregada ao custo final. Essa análise ainda serve,

portanto, para trazer atenção ao potencial comercial dos processos químicos que podem ser desenvolvidos no país, com possível rentabilidade, embora seja necessário um mercado com interesse no produto. Convém ressaltar o potencial farmacológico e cosmético dos produtos obtidos nesses processos, de acordo com diversos estudos já citados nesse trabalho. Além disso, a aproximação do COM é válida dentro de uma perspectiva industrial, onde se existe uma estrutura já esta montada e esse processo é passível de ser estruturado dentro de uma cadeia comercial. A partir dessa análise, são necessárias ainda estudos de otimização, que vêm ao encontro do desenvolvimento de um processo economicamente viável e competitivo internacionalmente.

Figura 36 - Distribuição dos custos integrantes no custo de manufatura da melitina pelas respectivas unidades de separação, onde FC é o custo fixo, GC são custos gerais, UC é o custo das utilidades, LC é custo da mão-de-obra, RMC é o custo da matéria-prima (solventes e fase estacionaria) e WTC é custo do tratamento de resíduos.



Fonte: o autor.

Dessa forma, no conjunto, o beneficiamento e a obtenção do composto bioativo melitina se mostram economicamente e



tecnologicamente viáveis, dentro das condições aqui propostas, servindo como estímulo ao desenvolvimento comercial para obtenção de produtos de alto valor agregado.



## 5 CONCLUSÃO

O ensaio com ultracentrifugação e filtração demonstrou que o objetivo específico de se utilizar técnicas robustas com baixa resolução para capturar e concentrar a melitina foi alcançado. Com o conjunto destas duas técnicas foi possível eliminar a maioria dos componentes presentes na apitoxina, contendo, ao final, somente biomoléculas com características semelhantes à melitina, como a apamina, na amostra recolhida, bem como a própria melitina. Através da etapa de RP-HPLC foi possível obter melitina com um altíssimo grau de pureza em escala analítica, separando com eficiência a melitina da apamina em um curto tempo de análise, alcançando, também, o objetivo específico de se desenvolver um método rápido e simplificado.

Verificou-se que a técnica de GPC cumpriu o mesmo propósito da centrifugação associada à filtração, capturando e concentrando a melitina. Entretanto, tendo em vista o maior custo operacional dessa técnica frente as técnicas mais simples de centrifugação e filtração, optou-se por excluir a técnica de GPC ao se elaborar o protocolo de purificação da melitina. Ao final, de forma a simplificar e reduzir custos no futuro escalonamento do processo, as técnicas selecionadas para o processo de purificação foram somente a centrifugação associada à filtração e a purificação refinada em cromatografia em fase reversa.

Na segunda etapa do trabalho, no qual foi analisada a viabilidade de encapsulamento da melitina através de NLSs, a melitina demonstrou ter estabilidade térmica suficiente para suportar o processo de fusão do lipídeo. Ademais, a caracterização das nanopartículas formuladas indica a provável encapsulação do peptídeo, tendo em vista o aumento no diâmetro das partículas. Os resultados obtidos até o momento mostram que é possível obter NLSs estáveis de ácido esteárico com potencial aplicabilidade para encapsulação de melitina. Para a comprovação de eficiência farmacológica desse sistema proposto, mais testes são necessários.

Por fim, a análise econômica do processo de obtenção e purificação da melitina demonstra a viabilidade econômica na implantação dessa tecnologia. Os menores custos específicos ocorrem com a ampliação da escala a partir de 100 vezes a escala analítica, no qual os custos encontrados, dentro das condições operacionais propostas, são inferiores aos comercializados atualmente. Além disso, ainda é possível otimizar o processo visando um melhor rendimento.

O custo específico da melitina obtida através de SMB na avaliação econômica demonstra a necessidade de um maior

aprofundamento técnico sobre esse processo de purificação, visto que é especialmente atrativo economicamente.

Todavia, para o processo produtivo ser aplicável em qualquer uma das escalas, é imprescindível uma estrutura de fornecimento da matéria-prima regular, ou produção própria, em grandes quantidades, o qual é dificilmente encontrado no Brasil, tendo em vista que a grande maioria dos apicultores brasileiros ainda não trabalha com a produção de apitoxina. Para tanto, um extenso trabalho de parceria junto às associações de apicultores seria necessário para garantir o fornecimento da matéria-prima.

## 5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- avaliar a utilização de solventes verdes, como o etanol no processo de purificação;
- estudar o empacotamento de colunas em escala piloto e verificar sua performance na separação da melitina;
- verificar se o peptídeo foi eficientemente encapsulado nas nanopartículas;
- mimetizar condições fisiológicas e estudar o perfil de liberação de melitina das NLSs;
- verificar a ocorrência de degradação de células cancerígenas frente a aplicação de NLSs contendo melitina;
- incorporar o ácido fólico na segunda emulsão na formulação das NLSs de modo a direcionar as nanopartículas aos tumores.

## REFERÊNCIAS

ACS. Apitherapy. 2008. Disponível em: <  
[http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/complementa  
ryandalternativemedicine/pharmacologicalandbiologicaltreatment/apithe  
rapy](http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/complementa<br/>ryandalternativemedicine/pharmacologicalandbiologicaltreatment/apithe<br/>rapy)>. Acesso em: 04/10/2015.

ALMEIDA, A. J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. 6, p. 478-90, Jul 10 2007.

AMALGAMATED RESEARCH, What is simulated moving bed chromatography? Disponível em:  
<<http://www.arifractal.com/images/files/What-is-SMB-chromatography.pdf>>. Acesso em 11/12/2015

APIHEALTH. Disponível em: <  
<http://www.apihealth.com/Science/Bee+Venom+Collection.html>>.  
Acesso em: 04/10/2015.

ASTHANA, N.; YADAV, S. P.; GHOSH, J. K. Dissection of Antibacterial and Toxic Activity of Melittin: A LEUCINE ZIPPER MOTIF PLAYS A CRUCIAL ROLE IN DETERMINING ITS HEMOLYTIC ACTIVITY BUT NOT ANTIBACTERIAL ACTIVITY. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55042-55050, 2004.

ATTIA, W. Y. et al. The anti-tumor effect of bee honey in Ehrlich ascite tumor model of mice is coincided with stimulation of the immune cells. **Egypt J Immunol**, v. 15, n. 2, p. 169-83, 2008.

BAEK, Y. H. et al. Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (Apipuncture) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: Mediation by  $\alpha$ 2-Adrenoceptors. **Brain Research**, v. 1073-1074, n. 0, p. 305-310, 2006.

BAUDIER, J. et al. Comparison of S100b protein with calmodulin: interactions with melittin and microtubule-associated tau proteins and inhibition of phosphorylation of tau proteins by protein kinase C. **Biochemistry**, v. 26, n. 10, p. 2886-93, 1987.

BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1529-1539, 2006.

BETTINGER, T. et al. Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 18, p. 3882-91, 2001.

BOYSEN, R. I.; HEARN, M. T. HPLC of peptides and proteins: standard operating conditions. **Curr Protoc Mol Biol**, v. Chapter 10, p. Unit 10.13, 2001.

CHANG, Y. H.; BLIVEN, M. L. Anti-Arthritic Effect of Bee Venom. **Agents and Actions**, v. 9, n. 2, p. 205-211, 1979.

CHEN, Y. N. et al. Effects of bee venom peptidergic components on rat pain-related behaviors and inflammation. **Neuroscience**, v. 138, n. 2, p. 631-640, 2006.

DORSEY, J. G.; COOPER, W. T. Retention Mechanisms of Bonded-Phase Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 17, p. 857A-867A, 1994.

DOTIMAS, E. M. et al. Isolation and structure analysis of bee venom mast cell degranulating peptide. **Biochim Biophys Acta**, v. 911, n. 3, p. 285-93, 1987.

ESKRIDGE, E. M. et al. Adaptation of the electrical stimulation procedure for the collection of vespid venoms. **Toxicon**, v. 19, n. 6, p. 893-7, 1981.

GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVAC, V. Radioprotective Effects of Honeybee Venom (*Apis mellifera*) Against 915-MHz Microwave Radiation-Induced DNA Damage in Wistar Rat Lymphocytes: In Vitro Study. **International Journal of Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 88-98, March 1, 2009.

GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVAC, V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 36, n. 2, p. 697-705, 2013.

HABERMANN, E. Bee Wasp Venoms. **Science**, v. 177, n. 4046, p. 314-&, 1972.

HAKALA, J. K. et al. Lipolytic modification of LDL by phospholipase A(2) induces particle aggregation in the absence and fusion in the presence of heparin. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 19, n. 5, p. 1276-1283, 1999.

HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1-3, p. 210-216, 2008.

HOOD, J. L. et al. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. **Antivir Ther**, v. 18, n. 1, p. 95-103, 2013.

HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1778, n. 2, p. 357-375, 2008.

HOU, K. K. et al. Melittin derived peptides for nanoparticle based siRNA transfection. **Biomaterials**, v. 34, n. 12, p. 3110-9, 2013.

ISSAQ, H. J. et al. Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. **Electrophoresis**, v. 23, n. 17, p. 3048-61, 2002.

JI, Y. H. et al. Two neurotoxins (BmK I and BmK II) from the venom of the scorpion *Buthus martensi* Karsch: purification, amino acid sequences and assessment of specific activity. **Toxicon**, v. 34, n. 9, p. 987-1001, 1996.

KAMIMURA, K. et al. (2011). "Advances in Gene Delivery Systems". **Pharm Med** 25 (5): 293-306.

KANG, H. S. et al. The cardiovascular depression caused by bee venom in Sprague-Dawley rats associated with a decrease of developed pressure in the left ventricular and the ratio of ionized calcium/ionized magnesium. **Am J Chin Med**, v. 36, n. 3, p. 505-16, 2008.

KETTNER, A. et al. IgE and T-cell responses to high-molecular weight allergens from bee venom. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, n. 3, p. 394-401, 1999.

KLOCEK, G.; SEELIG, J. Melittin interaction with sulfated cell surface sugars. **Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 2841-2849, 2008.

KLOTZ, S. A. et al. Inhibition of Adherence and Killing of *Candida albicans* with a 23-Mer Peptide (Fn/23) with Dual Antifungal Properties. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4337-4341. 2004.

KWON, Y. B. et al. Antinociceptive effects of bee venom acupuncture (apipuncture) in rodent animal models: a comparative study of acupoint versus non-acupoint stimulation. **Acupunct Electrother Res**, v. 26, n. 1-2, p. 59-68, 2001.

LADOKHIN, A. S.; WHITE, S. H. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1514, n. 2, p. 253-260, 2001.

LAZAREV, V. N. et al. Effect of induced expression of an antimicrobial peptide melittin on *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* infections in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 2, p. 946-950, 2005.

LEBOWITZ, J.; LEWIS, M. S.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. **Protein Science**, v. 11, n. 9, p. 2067-2079, 2002.

LEE, J. D. et al. Anti-inflammatory Effect of Bee Venom on Type II Collagen-Induced Arthritis. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 32, n. 03, p. 361-367, 2004.

LEE, J. D. et al. An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 79-84, 2005.



LEE, J. H. et al. Bee venom pretreatment has both an antinociceptive and anti-inflammatory effect on carrageenan-induced inflammation. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 3, p. 251-259, 2001.

LIMA, P. R. D.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 9, p. 149-162, 2003.

LIU, S. J. et al. Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway. **Hepatology**, v. 47, n. 6, p. 1964-1973, 2008.

LOUGHRAN, S. T.; WALLS, D. Purification of poly-histidine-tagged proteins. **Methods Mol Biol**, v. 681, p. 311-35, 2011.

LUBKE, L. L.; GARON, C. F. The Antimicrobial Agent Melittin Exhibits Powerful In Vitro Inhibitory Effects on the Lyme Disease Spirochete. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. Supplement 1, p. S48-S51, July 1, 1997.

MAIA, A. B. **O potencial terapêutico da apitoxina**. Mensagem Doce. APACAME 2002.

MARSH, N. A.; WHALER, B. C. The effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) venom and two of its constituents, melittin and phospholipase A<sub>2</sub>, on the cardiovascular system of the rat. **Toxicon**, v. 18, n. 4, p. 427-35, 1980.

MATYSIAK, J. et al. Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal**, v. 54, n. 2, p. 273-8, 2011.

MAULET, Y. et al. Purification and chemical characterization of melittin and acetylated derivatives. **Biochim Biophys Acta**, v. 625, n. 2, p. 274-80, Oct 21 1980.

MCDONALD, J. A.; LI, F. P.; MEHTA, C. R. Cancer mortality among beekeepers. **J Occup Med**, v. 21, n. 12, p. 811-3, 1979.

MERCK MILIPORE. Disponível em:

<<http://www.merckmillipore.com/>>. Acessado em: 28/10/2015.

MERLO, L. A. et al. Effects induced by *Apis mellifera* venom and its components in experimental models of nociceptive and inflammatory pain. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 764-771, 2011.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. Wiley, 2013. ISBN 9781118681343.

MONETTE, M.; LAFLEUR, M. Modulation of Melittin-Induced Lysis by Surface-Charge Density of Membranes. **Biophysical Journal**, v. 68, n. 1, p. 187-195, 1995.

MOSSNER, J. et al. Role of various phospholipases A(2) and inhibitors in the pathogenesis and prevention of pancreatic acinar cell necrosis - Studies with isolated rat pancreatic acini. **International Journal of Pancreatology**, v. 27, n. 1, p. 29-38, 2000.

NGUYEN, H. V. et al. The Electrochemical and Statistical Evaluation of Isolation of Mellitin and Apamin from Honey Bee (*Apis Mellifera*) Venom. **Int. J. Electrochem. Sci.**, 10 (2015) 1249 – 1260.

NICOLAS, J.-P. et al. Localization of Structural Elements of Bee Venom Phospholipase A2 Involved in N-type Receptor Binding and Neurotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 11, p. 7173-7181, March 14, 1997.

OGRIS, M. et al. Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors. **J Biol Chem**, v. 276, n. 50, p. 47550-5, 2001.

ORSOLIC, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer Metastasis Rev**, v. 31, n. 1-2, p. 173-94, 2012.

OWNBY, C. L. et al. Melittin and phospholipase A(2) from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. **Toxicon**, v. 35, n. 1, p. 67-80, 1997.

PACÁKOVÁ, V. et al. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components. **Journal of Chromatography A**, v. 700, n. 1–2, p. 187-193, 1995.

PAN, H. et al. Cytolytic peptide nanoparticles (‘NanoBees’) for cancer therapy. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 3, n. 3, p. 318-327, 2011.

PHARMA NECTAR. Disponível em: < <http://pharmanectar.com.br/>>. Acesso em: 26/10/2015.

PhRMA (**Pharmaceutical Research and Manufacturers of America**) Disponível em: < <http://www.phrma.org/profiles-reports>>. Acesso em: 04/10/2015.

PRODAPYS. Disponível em: < <http://www.prodapys.com.br/>>. Acesso em: 26/10/2015.

PYNNONEN, B. Simulated moving bed processing: escape from the high-cost box. **Journal of Chromatography A**, v. 827, n. 2, p. 143-160, 1998.

QUAY, S. C.; CONDIE, C. C. Conformational Studies of Aqueous Melittin - Thermodynamic Parameters of the Monomer Tetramer Self-Association Reaction. **Biochemistry**, v. 22, n. 3, p. 695-700, 1983.

RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Cholesterol inhibits the lytic activity of melittin in erythrocytes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 134, n. 2, p. 183-189, 2005.

RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Orientation and dynamics of melittin in membranes of varying composition utilizing NBD fluorescence. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 4, p. 1271-1283, 2007.

REITHMEIER, H.; HERRMANN, J.; GOPFERICH, A. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. **J Control Release**, v. 73, n. 2-3, p. 339-50, 2001.

Reversed Phase Chromatography. Disponível em: <  
<http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/ReversePhase/AmershamRPCManual.pdf>>. Acesso em: 11/08/2015.

REX, S.; SCHWARZ, G. Quantitative studies on the melittin-induced leakage mechanism of lipid vesicles. **Biochemistry**, v. 37, n. 8, p. 2336-2345, 1998.

ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1-2, p. 235-240, 2005.

ROZEMA, D. B. et al. Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 32, p. 12982-7, 2007.

SANTOS, L. et al. A new scenario of bioprospecting of Hymenoptera venoms through proteomic approach. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, 2011.

SCHELLINGER, J. G. et al. Melittin-grafted HPMA-oligolysine based copolymers for gene delivery. **Biomaterials**, v. 34, n. 9, p. 2318-26, 2013.

SCHUMACHER, M. J.; EGEN, N. B.; TANNER, D. Neutralization of bee venom lethality by immune serum antibodies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 2, p. 197-201, 1996.

SEIDEMANN, J. Tanford, Ch.: Physical Chemistry of Macromolecules. (Physikalische Chemie von Makromolekülen.) John Wiley & Sons, Inc., New York-London 1961, 710 S., 312 Abb., Ganzleinen S 135,-. **Starch - Stärke**, v. 14, n. 12, p. 480-480, 1962.

SEMBABIO. Disponível em: <  
[http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/SimulatedMovingBedChromat/Semba\\_OctaveSystemBrochure.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/SimulatedMovingBedChromat/Semba_OctaveSystemBrochure.pdf)>. Acesso em: 04/10/2015.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 66, n. 4, p. 236-248, 2002.

SOMAN, N. R. et al. Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 9, p. 2830-2842, 2009.

SON, D. J. et al. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 115, n. 2, p. 246-270, 2007.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/>>. Acesso em 26/10/2015.

TAUZIN, B. Report: Biotechnology Medicines in Development. 2006.

THOMSEN, P. et al. Inhibitory Effect of Honey Bee Venom on Immune-Complex Mediated Leukocyte Migration into Rabbit Knee-Joints. **Agents and Actions**, v. 14, n. 5-6, p. 662-666, 1984.

TOSTESON, M. T. et al. Solid-phase synthesis of melittin: purification and functional characterization. **Biochemistry**, v. 26, n. 21, p. 6627-31, 1987.

TRILIVAS, R. Is Bee Venom Nature's Botox?, 2011. Disponível em: < <http://www.allure.com/beauty-trends/blogs/daily-beauty-reporter/2011/08/is-bee-venom-natures-botox.html> >. Acesso em: 04/10/2015.

TURTON, R. et al. **Analysis, Synthesis and Design of Chemical Processes**. Pearson Education, 2012. ISBN 9780132618731.

VARANDA, E. A.; MONTI, R.; TAVARES, D. C. Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct-and indirect-acting mutagens. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 19, n. 6, p. 403-413, 1999.

VERMA, N. K., M.; SINGH, K. P.; SMITA, S. . Structural and Dynamic Insights into S100B Protein Activity Inhibition by Melittin for the Treatment of Epilepsy. **IJCA Proceedings on National Seminar on Application of Artificial Intelligence in Life Sciences 2013**, v. NSAAALS, n. 1, p. 55-60, 2013.

WANG, C. et al. Melittin, a Major Component of Bee Venom, Sensitizes Human Hepatocellular Carcinoma Cells to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Apoptosis by Activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and Inhibiting I kappa B alpha Kinase-NF kappa B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 6, p. 3804-3813, 2009.

WATALA, C.; KOWALCZYK, J. K. Hemolytic Potency and Phospholipase-Activity of Some Bee and Wasp Venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology**, v. 97, n. 1, p. 187-194, 1990.

WEINBERG, M. Applying Melittin's Structure to Inhibit the Proliferation of Tumor Cells. 2011. Disponível em: <  
[http://cosmos.ucdavis.edu/archives/2011/cluster8/WEINBERG\\_MARIS\\_A.pdf](http://cosmos.ucdavis.edu/archives/2011/cluster8/WEINBERG_MARIS_A.pdf)>. Acesso em: 02/08/2013.

YALCIN, M.; SAVCI, V. Cardiovascular effects of centrally injected melittin in hemorrhaged hypotensive rats: the investigation of peripheral mechanisms. **Neuropeptides**, v. 41, n. 6, p. 465-75, 2007.

YANG, L. et al. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 3, p. 1475-1485, 2001.

YE, J. G. et al. Purification, cDNA cloning and function assessment of BmK abT, a unique component from the Old World scorpion species. **Febs Letters**, v. 479, n. 3, p. 136-140, 2000.

ZIBETTI, A. W. **Desenvolvimento de um processo de separação de compostos bioativos de Rosmarinus officinalis**. 2012.