

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE ENGENHARIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

Júlio César Moreira de Brito

**FRACIONAMENTO DO VENENO DA *Apis mellifera***  
**UTILIZANDO MEMBRANAS DE ULTRAFILTRAÇÃO DE**  
**CELULOSE REGENERADA DE 10 KDA**

Minas Gerais - Brasil  
Fevereiro de 2015

Júlio César Moreira de Brito

**FRACIONAMENTO DO VENENO DA *Apis mellifera*  
UTILIZANDO MEMBRANAS DE ULTRAFILTRAÇÃO DE  
CELULOSE REGENERADA DE 10 KDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Processos de Separação.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Kátia Cecília de Souza Figueiredo  
Co-orientador: Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine

Belo Horizonte

Departamento de Engenharia Química da UFMG  
2015

## AGRADECIMENTOS

Iniciar agradecendo a Deus, que colocou todas as pessoas abaixo citadas em meu caminho, além de me dar saúde e condições para desenvolver esse trabalho. Agradeço a toda minha família, minha mãe, meu pai, meus irmãos e minha tia Maria das Graças que estiveram presentes em minha vida me apoiando nessa caminhada.

Ao meu co-orientador Dr. Luiz Guilherme pela orientação, conselhos e total apoio e à minha orientadora Dra. Kátia Cecília de Souza Figueiredo pela orientação, paciência e disponibilidade. Ambos foram os maiores e mais importantes pilares para o sucesso deste projeto. Também, à Dra. Esther pela confiança, apoio e incentivo.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UFMG, em especial às professoras Tânia e Vanessa, secretárias Alessandra e Shirley e a técnica Ilda da Metalurgia. Sempre prestativas e atenciosas. Às minhas colegas de laboratório da Engenharia Química pelos momentos de descontração e desabafos. Também aos meus colegas da pós-graduação, em especial o Estevão e Layane.

Aos colegas de trabalho da Funed pelo apoio e suporte durante a execução do trabalho, agradeço ao Dr. Ricardo Dias do Laboratório de Enterotoxinas, Dra. Márcia Helena e a Jaqueline do Serviço de Bioquímica de Proteínas de Venenos Animais, Cláudia do Serviço de Química - Divisão de Vigilância Sanitária e ao Sr. Maurício Abreu da Divisão de Imunobiológicos.

Ao pessoal do serviço de manutenção e de calibração da Funed pela ajuda quando necessária para manutenção dos equipamentos e empréstimo, em especial a Sara. Todos os colegas de trabalho do Laboratório de Imunologia Aplicada, em especial Isabela Canhas, Thais Teles, Érica de Carvalho e Girlane pela ajuda, treinamento e momentos de descontração.

Aos meus amigos Nicholas Miller, Thais Moura, Cristine Araújo, Rafael Defendi, Simone Lima e Leandro Rocha pelo apoio, companheirismo e amizade.

Aos funcionários do SABE como a Morgana e Denise e também da Simone do SDC e Claudete da DI que me auxiliaram junto à Fapemig. Atuando nessa interface Funed/Fapemig todas vocês possibilitam a muitos servidores da Funed obterem títulos de mestres e doutores.

Gostaria também de agradecer à Funed, à Fapemig, à UFMG e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFMG.

## EPÍGRAFE

“O que prevemos raramente ocorre;  
o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2.1 Propriedades terapêuticas da apitoxina</b> .....	19
<b>2.2 Composição química da apitoxina</b> .....	20
2.2.1 Melitina .....	21
2.2.2 Fosfolipase A <sub>2</sub> .....	23
2.2.3 Peptídeo MCD .....	23
2.2.4 Apamina .....	24
2.2.5 Hialuronidase .....	24
<b>2.3 Processos utilizados no fracionamento da apitoxina</b> .....	24
2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	25
2.3.2 Eletroforese em Gel .....	26
2.3.3 Espectrofotometria de massa .....	26
2.3.4 Ultrafiltração .....	27
<b>2.4 Modelos para Transferência de Massa e Interface da Membrana</b> .....	30
2.4.1 Modelo do filme .....	31
<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	34
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	34
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
<b>4.1 Obtenção da apitoxina</b> .....	35
<b>4.2 Preparo da amostra</b> .....	35
<b>4.3 Caracterização da membrana</b> .....	36
4.3.1 Determinação da permeabilidade hidráulica das membranas .....	37
4.3.2 Fisissorção de N <sub>2</sub> .....	37
4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura .....	38
4.3.4 Experimento de rejeição – MWCO .....	39
<b>4.4 Determinação das propriedades de transporte das membranas</b> .....	39
4.4.1 Estudo do efeito da pressão de operação .....	40
4.4.2 Avaliação do efeito do aumento da concentração na alimentação .....	40
4.4.3 Caracterização das condições hidrodinâmicas .....	41
4.4.4 Testes de longa duração .....	41
4.4.5 Determinação da rejeição da melitina e fosfolipase A <sub>2</sub> .....	42
<b>4.5 Caracterização do Produto</b> .....	43
4.5.1 Eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) .....	43
4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE .....	43
4.5.3 Dosagem atividade fosfolipásica A <sub>2</sub> .....	44

4.5.4	Espectrometria de massa .....	44
<b>4.6</b>	<b>Tratamento Estatístico das Curvas Padrões .....</b>	<b>45</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>		<b>46</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização da membrana .....</b>	<b>46</b>
5.1.1	Determinação da permeabilidade hidráulica das membranas .....	46
5.1.2	Fisissorção de N <sub>2</sub> .....	47
5.1.3	Microscopia eletrônica de varredura, MEV .....	48
5.1.4	Experimento de rejeição – MWCO.....	53
<b>5.2</b>	<b>Determinação das propriedades de transporte das membranas.....</b>	<b>54</b>
5.2.1	Estudo do efeito da pressão de operação.....	54
5.2.2	Avaliação do efeito do aumento da concentração na alimentação.....	56
5.2.3	Caracterização das condições hidrodinâmicas.....	58
5.2.4	Teste de longa duração .....	59
<b>5.3</b>	<b>Caracterização do Produto .....</b>	<b>61</b>
5.3.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	61
5.3.2	Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.....	65
5.3.3	Espectroscopia de UV-visível para dosagem atividade fosfolipásica A2.....	68
5.3.4	Espectrometria de massa .....	70
<b>CONCLUSÃO .....</b>		<b>72</b>
<b>SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....</b>		<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>74</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>80</b>
Anexo A – Resultado do teste de umidade por Karl Fisher. ....		80
Anexo B – Laudo de análise do teste fisissorção de N <sub>2</sub> .....		81
Anexo C – Tratamento Estatístico para a Curva Padrão de Dextrana.....		88
Anexo D – Tratamento Estatístico para a Curva Padrão de Fosfolipase.....		93
Anexo E – Tratamento Estatístico para a Curva Padrão de Melitina. ....		99

## RESUMO

O veneno da *Apis mellifera* é uma mistura de diversos peptídeos e carboidratos cujos principais compostos são: melitina, fosfolipase A<sub>2</sub>, apamina, secapina, tertiapina, adolapina, peptídeo MCD, hialuronidase e fosfomonoesterases. Alguns destes componentes associados e/ou isolados apresentam atividades farmacológicas e seu uso na terapêutica vem aumentando nos últimos anos. Porém algumas de suas substâncias apresentam alergenicidade, o que o torna um composto com elevado potencial alergênico. A melitina e a fosfolipase A<sub>2</sub> são os peptídeos mais presentes no veneno e ambos podem representar aproximadamente 70% da sua massa seca. As enzimas fosfolipase A<sub>2</sub> (19 kDa), hialuronidase (38 kDa) e fosfomonoesterase (38 kDa) são as substâncias mais alergênicas presentes no veneno e estas apresentam uma massa molecular muito superior à da grande maioria dos peptídeos presentes no veneno, como a melitina (2,84 kDa). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi obter uma fração com uma menor concentração destes componentes mais alergênicos utilizando a ultrafiltração com membrana de celulose regenerada de 10 kDa. Os resultados indicaram uma permeabilidade hidráulica de aproximadamente 70% do valor apontado pelo fabricante da membrana e com valores da fisissorção da membrana confirmando os resultados obtidos na microscopia eletrônica de varredura. Os parâmetros de processos foram estabelecidos tendo fluxos limites de permeado do veneno apresentado valores de 115, 85 e 50 kg/m<sup>2</sup>.h para as concentrações de 10, 30 e 50 g/L. Na concentração de apitoxina de 1 g/L o produto permeado foi caracterizado e apresentou uma melhor permeação para a melitina, cerca de 60%, e uma maior retenção para a fosfolipase A<sub>2</sub>, cerca de 60%. A enzima fosfolipase A<sub>2</sub> presente no permeado apresentou-se de forma inativa. Desta forma, a ultrafiltração mostrou-se um processo potencial para ser utilizado na redução dos maiores alergênicos da apitoxina.

**Palavras-Chave:** apitoxina, fosfolipase A<sub>2</sub>, melitina, membrana, ultrafiltração.

## ABSTRACT

The venom from *Apis mellifera* is a mixture of several peptides and carbohydrates whose main compounds are melittin, phospholipase A<sub>2</sub>, apamin, secapin, tertiapin, adolapin, MCD peptide, hyaluronidase and fosfomonoesterases. Some of these components have pharmacological applications and their use in therapy has been increasing in recent years. At the same time, some of these components have allergenicity, and their presence can result in compounds with high allergenic potential. Melittin and phospholipase A<sub>2</sub> are the most numerous peptides present in *Apis mellifera* venom and together may constitute approximately 70% of its dry weight. Phospholipase A<sub>2</sub> e (19 kDa), hyaluronidase (38 kDa) and phosphomonoesterase (38 kDa) are the most allergenic substances present and each has a molecular mass greater than the great majority of peptides present in the venom, such as melittin (2.84 kDa). A reduction of the prevalence of these allergenic compounds was obtained using ultrafiltration with 10 kDa membranes of regenerated cellulose. These membranes showed a hydraulic permeability value 30% below the levels defined by the membrane manufacturer. The values obtained in N<sub>2</sub> physisorption corroborated the results of the images obtained using scanning electron microscopy. Established process parameters tested limited flows to bee venom of 115, 85 and 50 kg/m<sup>2</sup>.h for concentrations of 10, 30 and 50 g/L respectively. The apitoxin concentration of 1 g/L was measured and showed a better permeability for melittin, approximately 60%, and a better retention of phospholipase A<sub>2</sub>, at approximately 60%. The phospholipase A<sub>2</sub> present in the permeate showed no activity, evidence of a possible denaturation of this enzyme due to its passage through the membrane pores. This experiment showed ultrafiltration to be an effective technique for the reduction of major apitoxin allergens.

**Keywords:** apitoxin, phospholipase A<sub>2</sub>, melittin, membrane, ultrafiltration.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estrutura e conformação da melitina sendo (a) Estrutura Cristalina, (b) 120 mM Cl <sup>-</sup> e pH 7,0 – 2 ns e (c) 120 mM Cl <sup>-</sup> e pH 7,0 – 4 ns .....	21
Figura 02 – Conformação da melitina em diversos meios, a saber: (a) Forma Cristalina, e as demais em água com as seguintes condições: (b) pH 7 e Cl <sup>-</sup> 50 mM; (c) pH 7 e SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 50 mM; (d) pH 7 e Cl <sup>-</sup> 1,2 M; (e) pH 7 e SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 1,2 M; (f) pH 11 e SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 50 mM .....	22
Figura 03 – Ação catalítica da fosfolipase A <sub>2</sub> . A Fosfolipase A <sub>2</sub> retira hidroliticamente o resíduo de ácido graxo C <sub>2</sub> de um fosfolípídeo, gerando o lisofosfolípídeo correspondente. As ligações hidrolisadas por outros tipos de fosfolipases, que são nomeadas de acordo com suas especificidades .....	23
Figura 04 – Representação do efeito de polarização de concentração .....	28
Figura 05 – Efeito da pressão sobre o fluxo em água pura, uma solução macromolecular e a formação do gel .....	29
Figura 06 – Ilustração mostrando o efeito da concentração de polarização e as principais variáveis envolvidas em uma membrana de ultrafiltração .....	31
Figura 07 – Esquema do sistema de ultrafiltração utilizado .....	40
Figura 08 – Teste de permeabilidade hidráulica realizado na membrana de celulose regenerada, massa molar de corte de 10 kDa .....	47
Figura 09 - Resultado da distribuição de tamanho de poros, de acordo com o teste fisissorção de N <sub>2</sub> .....	48
Figura 10 – Imagens da pele da membrana Millipore® de celulose regenerada obtidas por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 50.000 vezes .....	49
Figura 11 – Imagens da seção transversal da membrana Millipore® de celulose regenerada obtida por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 1.000 vezes.....	50
Figura 12 – Imagens da seção transversal da membrana Millipore® de celulose regenerada obtida por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 2.500 vezes.....	50
Figura 13 – Imagens da análise da pele em seção transversal da membrana Millipore® de celulose regenerada obtida por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 5.000 vezes.....	51

Figura 14 – Imagens da análise da pele em seção transversal da membrana Millipore® de celulose regenerada obtida por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 30.000 vezes.....	52
Figura 15 – Imagens da análise da pele em seção transversal da membrana Millipore® de celulose regenerada obtida por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 50.000 vezes.....	53
Figura 16 – Curva padrão da Dextrana de massa 10 kDa medida em espectrofotômetro utilizando a técnica do ácido sulfúrico concentrado.....	54
Figura 17 – Fluxo de permeado de apitoxina nas concentrações de 10, 30 e 50 mg/mL em função da diferença de pressão realizado em membrana de celulose regenerada, massa molar de corte de 10 kDa e velocidade de 750 rpm .....	56
Figura 18 – Fluxo permeado em função das concentrações de apitoxina, membrana de celulose regenerada 10 kDa, com $\Delta P$ de 220 kPa, velocidade de 750 rpm.....	57
Figura 19 – Fluxo permeado em função das concentrações de apitoxina em massa percentual utilizando membrana de celulose regenerada 10 kDa, com $\Delta P$ de 220 kPa, velocidade de 750 rpm.....	57
Figura 20 – Fluxos de permeado em função da velocidade rotacional da célula de agitação realizado em membrana de celulose regenerada 10 kDa, com $\Delta P$ de 220 kPa, concentração de alimentação de 30 g/L da apitoxina.....	58
Figura 21 – Fluxos de água Milli-Q em função da pressão, realizado em membrana de celulose regenerada 10 kDa, com velocidade 750 rpm, de 220 kPa. Membrana incrustada foi utilizada por 400 minutos, solução de alimentação com concentração de 30 g/L da apitoxina.....	60
Figura 22 – Variação do fluxo de permeado da solução aquosa de apitoxina 30 g/L em função do tempo, realizado em membrana de celulose regenerada 10 kDa, com velocidade 750 rpm, de 220 kPa. Onze dos quatorze níveis apresentaram elevado desvio em suas triplicatas.....	60
Figura 23 – Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 16%, tampão de corrida tris-tricina, 180 V e 40 A. Aplicado 40 $\mu$ g de amostras do veneno bruto, do permeado e do retido da ultrafiltração. Sem a presença de padrões.....	61
Figura 24 – Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 16%, tampão de corrida tris-tricina, 180V e 40 A. Foi utilizado marcador com as seguintes massas moleculares: 1,060 kDa (I); 3,496 kDa (II); 6,5 kDa (III); 14,2 kDa (IV); 17 kDa (V); 26,6 kDa (VI). Aplicado 20 $\mu$ L de amostras do permeado da apitoxina: Primeira, Segunda, Terceira, Quarta e Quinta ultrafiltração .....	62

Figura 25 – Ilustração mostrando uma proteína em sua forma globular sendo retida pela membrana e a mesma proteína desnaturada, na forma linear permeando pela membrana .....	63
Figura 26 – Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 16%, tampão de corrida tris-tricina, 180 v e 40 A. O gel foi corado em <i>Comassie Blue</i> por uma hora. Foi utilizado marcador com as seguintes massas moleculares: 1,060 kDa (I); 3,496 kDa (II); 6,5 kDa (III); 14,2 kDa (IV); 17 kDa (V); 26,6 kDa (VI).....	64
Figura 27 – Curva padrão da melitina no espectrofotômetro com 18 pontos; 6 níveis, 3 réplicas por nível .....	65
Figura 28 – Curva padrão da fosfolipase no espectrofotômetro com 18 pontos; 6 níveis, 3 réplicas por nível .....	65
Figura 29 – Cromatograma dos padrões de melitina e fosfolipase A <sub>2</sub> . A linha azul mostra a leitura da absorbância feita em ultravioleta 220nm. A linha pontilhada mostra o gradiente decrescente em concentração da solução aquosa de ácido fosfórico 0,5% e crescente para acetonitrila.....	66
Figura 30 – Cromatograma da Apitoxina mostrando na linha azul os picos de absorbância da melitina e da fosfolipase A <sub>2</sub> , em seus volumes de retenção, conforme determinado pelos respectivos padrões....	66
Figura 31 – Cromatograma do permeado da ultrafiltração da apitoxina com a concentração do líquido de alimentação de 1g/L.....	67
Figura 32 – Gráfico com as absorbâncias de apitoxina permeada, apitoxina bruta e fosfolipase A <sub>2</sub> padrão.....	69
Figura 33 – Espectros de massas: I - padrão de melitina com o valor da massa de 2.845,88 Da e amostras dos principais picos apresentados pelo permeado da apitoxina no cromatógrafo líquido de alta eficiência nos volumes de retenção aproximados de: II – 24,5 mL; III – 15 mL e IV – 18 mL e respectivos valores da massa 2.845,747; 2.586,441 e 2.026,936 Da.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constituintes típicos encontrados na apitoxina bruta, com suas respectivas massas molares e concentração percentual na apitoxina seca, classificados pelo valor de sua massa molecular .....	20
Tabela 2 – Informações técnicas da membrana de celulose regenerada de 10 kDa .....	36
Tabela 3 – Resumo dos testes realizados na membrana de ultrafiltração com as variáveis, respectivas faixas de avaliação e seus intervalos .....	41
Tabela 4 – Valores das massas dos permeados da apitoxina após a ultrafiltração .....	42
Tabela 5 – Valores percentuais da melitina e fosfolipase obtidos pelo doseamento via CLAE dos permeados em cinco ultrafiltrações e diluições sequenciais do produto retido .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

BET – Brunauer, Emmett, Teller;

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência;

Funed – Fundação Ezequiel Dias;

IgE – imunoglobulinas tipo E;

IUPAC – “International Union of Pure and Applied Chemistry”;

Da – Unidade de massa, Dalton;

MALDI-TOF – matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight mass spectrometer;

MCD – mast cell degranulation;

mM – milimolar;

MWCO – molecular weight cut off;

nm – unidade de distância, nanômetros;

ns – unidade de tempo nano segundo;

ODS – octadecilsilano;

PBS – tampão fosfato salina;

PDB – protein data bank;

pH – potencial hidrogeniônico;

SDS-PAGE – gel de poliacrilamida em dodecilsulfato de sódio;

SEM – Sociedade Europeia de Membranas;

SUS – sistema único de saúde;

UHMW – ultra high molecular weight.

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\Delta P$  – diferença de pressão;

$\mu L$  – unidade de média de volume microlitros;

cc/g – centímetro cúbico por grama;

$\eta_T$  – viscosidade dinâmica (Pa.s);

$\delta$  – espessura da camada adjacente à membrana (m);

$k$  – coeficiente de transferência de massa;

$\Delta t$  – variação do tempo (h);

$A$  – área efetiva da membrana ( $m^2$ );

$C_A$  – concentração da substância na solução de alimentação (g/l);

$C_b$  - concentração de soluto na alimentação (g/l);

$C_{gel}$  - concentração onde se tem o início da formação da camada gel (g/l);

$C_m$  - concentração de soluto na interface da alimentação-membrana (g/l);

$C_p$  concentração de soluto no permeado (g/l);

$Ca^{2+}$  – íon cálcio;

$Cl^-$  – íon cloreto;

$D$  – coeficiente de difusão do soluto em água ( $m^2/s$ );

$J$  – fluxo ( $l.m^{-2}.h^{-1}$ );

$J_{max}$  – platô do fluxo através da membrana ( $l.m^{-2}.h^{-1}$ );

$J_w$  – fluxo da água ( $l.m^{-2}.h^{-2}$ )

$J_v$  – fluxo permeado (m/s);

$K_d$  – constante de equilíbrio para reversão da melitina monômero para tetrâmero;

$K^+$  – íon potássio;

$L_p$  – permeabilidade;

NaCl – cloreto de sódio;

$P$  – pressão aplicada;

$P_0$  – pressão de saturação do gás utilizado;

$P_{rel}$  – função relativa da pressão ( $P/P_0$ );

$Q$  – quantidade de permeado (l);

$R^2$  – coeficiente de correlação;

$R$  – coeficiente de rejeição do permeado;

$R^*$  – coeficiente de rejeição do retido;

$R_m$  – resistência da membrana ( $m^{-1}$ );

$SO_4^{2-}$  – Íon Sulfato;

$t$  – tempo (h);

$V$  – volume do ultrafiltrado (l).

## INTRODUÇÃO

A artrite é uma inflamação crônica, que atinge as articulações, preferencialmente a membrana sinovial, podendo levar à destruição óssea e cartilaginosa provocando deformações e comprometendo o movimento das articulações (LEE, *et al.*, 1995).

Afeta em torno de 2 milhões de brasileiros, sendo predominante entre as mulheres. O tratamento farmacoterapêutico usual ocorre por meio do uso de drogas químicas associadas ou não aos anticorpos monoclonais (LAURINDO *et al.*, 2004; BRENOL *et al.*, 2007).

O tratamento desta patologia crônica está entre as quatro da lista do SUS com o maior impacto sobre o orçamento na saúde pública brasileira. Entre os anos de 2000 a 2007, a despesa do Governo Brasileiro com medicamentos, diagnósticos e terapias para o tratamento da artrite representaram valores acima de 140 bilhões de reais, o que corresponde a 10,4% dos recursos destinados à saúde no país (CARIAS *et al.*, 2011).

O veneno da *Apis mellifera* (apitoxina) é utilizado há milhares de anos para o tratamento de diversas enfermidades no tratamento da artrite e já conta com diversos trabalhos publicados na literatura que também relatam o seu potencial anti-inflamatório, analgésico e estimulante do sistema imunológico levando à formação de células multinucleadas, tais como: monócitos, macrófagos, linfócitos T e B (GROSSO e FIGUEREDO, 2001; EUN *et al.*, 2010; POBLETE *et al.*, 2011; MERLO *et al.*, 2011; MOUSAVI *et al.*, 2012). A apitoxina também aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos, reduz a volemia, a pressão arterial, o débito cardíaco e a quantidade de proteínas presentes no plasma (GROSSO e FIGUEREDO, 2001).

A apitoxina é uma mistura de proteínas, enzimas e carboidratos que contém como principais compostos melitina, apamina, secapina, tertiapina, adolapina, peptídeo MCD, fosfolipase A<sub>2</sub>, hialuronidase, fosfomonoesterases e lisofosfolipases (DONG *et al.*, 2007).

Estudos em pacientes alérgicos ao veneno de abelha demonstraram que a fosfolipase A<sub>2</sub>, a fosfomonoesterase e a hialuronidase são os maiores alergênicos presentes na apitoxina (MÜLLER e HELBLING, 2013).



Um estudo sobre a alergenicidade dos constituintes do veneno de abelhas e vespas realizado na Suíça, em 2011, com 121 pacientes alérgicos a abelhas e vespas, apontou que aproximadamente 78,3% destes pacientes apresentaram IgE específica para a fosfolipase A<sub>2</sub> recombinante (MÜLLER *et al.*, 2012). Este resultado é um indicativo de que a presença desta proteína na apitoxina eleva o risco dos pacientes que já foram picados por abelhas, a desenvolverem uma crise alérgica.

A redução da concentração destes alergênicos pode ser realizada por técnicas cromatográficas, centrifugação e por processos de separação com membranas utilizando a ultrafiltração, pois há uma considerável variação no valor das massas molares dos peptídeos. As membranas são ideais para o fracionamento de misturas, soluções e suspensões em que há espécies de tamanho e natureza químicas diferentes (HABERT *et al.*, 2006).

Segundo a IUPAC e a Sociedade Europeia de Membranas (EMS), as membranas de ultrafiltração possuem poros com diâmetros de 2 a 50 nm (KOOPS, 1995).

Portanto, nos processos de separação por membranas, a ultrafiltração é a mais indicada para o fracionamento de proteínas, por apresentar uma faixa de tamanho de poros que abrange grande parte das proteínas e peptídeos conhecidos. Além disso, estes processos são modulares, o que representa uma vantagem significativa em comparação a outros processos de separação de proteínas no que se refere ao seu escalonamento (BAKER, 2012).

Os processos de separação por membranas são geralmente conduzidos em temperatura ambiente, podendo assim ser utilizados para o fracionamento de misturas que contenham substâncias termolábeis, uma vez que não requerem o uso de temperaturas e pH elevados (HABERT *et al.*, 2006).

O desenvolvimento dos processos de separação que envolvem membranas sintéticas e suas aplicações industriais é considerado relativamente recente, mesmo que tais processos venham sendo estudados há mais de um século. Estes processos já vêm sendo utilizados em diversas áreas, tais como: médica, biotecnológica, tratamento de água, nas indústrias químicas e alimentícias (HABERT *et al.*, 2006).

É importante utilizar um modelo de operação que descreva com precisão o comportamento do processo de purificação para que os riscos técnicos, inerentes ao projeto, mesmo que para um novo processo, sejam minimizados (GROTE *et al.*, 2011).

Neste trabalho, foi investigada a utilização de membranas comerciais de ultrafiltração para o fracionamento da apitoxina visando à obtenção de uma fração contendo concentrações reduzidas dos principais alergênicos, tais como: fosfolipase A<sub>2</sub> (19 kDa), hialuronidase (38 kDa) e a fosfomonoesterase (55 kDa).

A meta consiste no desenvolvimento de um novo ativo biológico farmacêutico que apresente maior segurança e menor caráter alergênico para o tratamento da artrite e outras patologias.

Este trabalho também iniciou uma parceria entre o Grupo de Pesquisa Separação através de Membranas Poliméricas do Departamento de Engenharia Química da UFMG com o Serviço de Imunologia Aplicada da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias. Espera-se que esta parceria se consolide e permita o desenvolvimento de outras pesquisas e projetos voltados para a purificação de proteínas e peptídeos de interesse farmacológico.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Propriedades terapêuticas da apitoxina

A apitoxina é o produto obtido da secreção das glândulas abdominais (glândulas do veneno) das abelhas armazenada no interior da bolsa de veneno. A sua apresentação comercial deve estar na forma cristalina e ter umidade máxima de 3% em massa (BRASIL, 2001).

Sendo uma toxina de grande interesse médico, apresenta-se como um bioproduto promissor no tratamento de diversas patologias. Estudos apontaram que os componentes da apitoxina apresentaram um efeito hipoglicemiante por aumentarem a secreção de insulina devido à redução da inflamação das ilhotas de *Langerhans* no pâncreas e também uma redução da taxa de colesterol em ratos com diabetes induzida por aloxano (MOUSAVI *et al.*, 2012).

Ratos transgênicos que exibiam neurodegeneração motora e que foram tratados com apitoxina mostraram uma melhora na atividade motora e aumento da média de sobrevivência de 18% em comparação ao grupo controle. Houve redução dos níveis de expressão do marcador de microglia (estimulante da neurodegeneração) e fosfo-p38 MAPK (estimulante da inflamação) na medula espinhal e no tronco cerebral, o que aponta a apitoxina como um potencial agente terapêutico com efeitos anti-neuroinflamatórios em modelo animal (EUN *et al.*, 2010).

O efeito anti-inflamatório da apitoxina sobre a prostaglandina E<sub>2</sub> (indutor de respostas inflamatórias e que eleva a permeabilidade vascular, a temperatura corpórea e a sensibilidade à dor) foi testada em pacientes com enfermidades bucais e apresentou uma redução 3,7 vezes maior desta substância em comparação ao grupo de pacientes que não recebeu a apitoxina (POBLETE *et al.*, 2011).

A apitoxina, sua fração contendo peptídeos de massa molar menor que 10 kDa e a melitina apresentaram atividades analgésica e anti-inflamatória em ratos induzidas pelo formaldeído. Estas inibiram a transmissão nervosa até o sistema nervoso central e, assim, reduziram a excitabilidade dos receptores nociceptivos e impediram a ação e a produção de diferentes mediadores inflamatórios (MERLO *et al.*, 2011). A fração contendo peptídeos de massa molar menor que 10 kDa apresentou uma atividade semelhante às drogas anti-inflamatórias, porém diferente daquelas que atuam no sistema nervoso central (MERLO *et al.*, 2011).

Essa ação de analgesia da apitoxina, sua fração contendo peptídeos de massa molar menor que 10 kDa e da melitina não resultou de uma ativação não específica dos mecanismos endógenos anti-nociceptivos, mas da ação de diferentes componentes que inibem especificamente o processamento nociceptivo, tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. Isto implica em mecanismo bioquímico envolvido entre receptores, enzimas, apitoxina e seus componentes no processo de analgesia (MERLO *et al.*, 2011).

## 2.2 Composição química da apitoxina

A apitoxina contém uma variedade de peptídeos incluindo melitina, apamina, adolapina e o peptídeo MCD. Ela também contém enzimas, como, por exemplo, a fosfolipase A<sub>2</sub> e a hialuronidase; bem como outras substâncias, conforme apresentado na Tabela 1. Para os ferormônios bem como a fosfomonoesterase não foram encontrados valores percentuais na composição da apitoxina.

Tabela 1- Constituintes típicos encontrados na apitoxina bruta, com suas respectivas massas molares e concentração percentual na apitoxina seca, classificados pelo valor de sua massa molecular – Adaptado de LARIVIERE e MELZACK (1996) e SILVA *et al.*, (2008).

<b>Componentes</b>	<b>Massa Molecular (Da)</b>	<b>% Mássica Apitoxina Seca</b>
Histamina	111	1
Ferormônios	185	...
Dopamina	153	1
Adrenalina	169	1
r-ácido aminobutírico	189,64	0,13 - 1
Aminoácidos	100 - 200	1
Fosfolipídeos	100 - 400	5
Oligopeptídeos	100 - 1000	14
Carboidratos	307,14	1,5
Tertiapina	2.000	0,5
Apamina	2.036	2 a 3
Peptídeo MCD	2.588	2
Secapina	2.660	0,5
Melitina	2.840	50
Minimida	6.000	2 - 3
Inibidor Protease	9.000	0,8
Adolapina	11.500	1
Fosfolipase A <sub>2</sub>	19.000	12
Lisofosfolipase	22.000	1
Hialuronidase	45.000 - 50.000	2
Fosfatase ácida	49.000	...
Fosfomonoesterase	55.000	1
α-Glicosidase	170.000	0,6

### 2.2.1 Melitina

A melitina é um peptídeo básico de 26 aminoácidos, possui massa molar igual a 2,84 kDa, sequência GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ, em hélice e carga global de +4 em sua porção carboxi-terminal (GLÄTTLI *et al.*, 2006, WANG e POLAVARAPU, 2003).

Está presente em uma concentração de aproximadamente 50% da massa seca de apitoxina e pode desencadear a lise de uma ampla variedade de células, como células musculares, leucócitos e células tronco o que pode levar, por exemplo, à liberação de histamina e de outros componentes intracelulares para o tecido circundante. Estudos apontam que a lise celular é reforçada quando a melitina é apresentada em conjunto com a fosfolipase A<sub>2</sub> (HIDER, 1988; STRONG e WADSWORTH, 2000; YI-RU *et al.*, 2011).

A estrutura cristalográfica deste peptídeo foi depositada no *Protein Data Bank* (PDB), sob o número 2MLT. Dados de estudos bioquímicos apontaram que a estrutura helicoidal e o estado de agregação dependem da concentração de peptídeos, da força iônica, do pH e da natureza dos íons no meio aquoso. A estrutura tetramérica não é estável no plasma sanguíneo, sendo a estrutura monomérica a mais ativa (TERRA, 2007).

Na Figura 01, tem-se a representação da formação e ruptura da estrutura tetramérica da melitina. O peptídeo cristalizado apresenta-se na forma de tetrâmero (a) e quando está em solução de íons cloreto a 120 mM e pH 7, observa-se a ruptura desta estrutura devido à mudança da conformação e estrutura do peptídeo, que se separam nos primeiros 2 nano segundos (b) com o distanciamento das cadeias após 4 nano segundos (c).

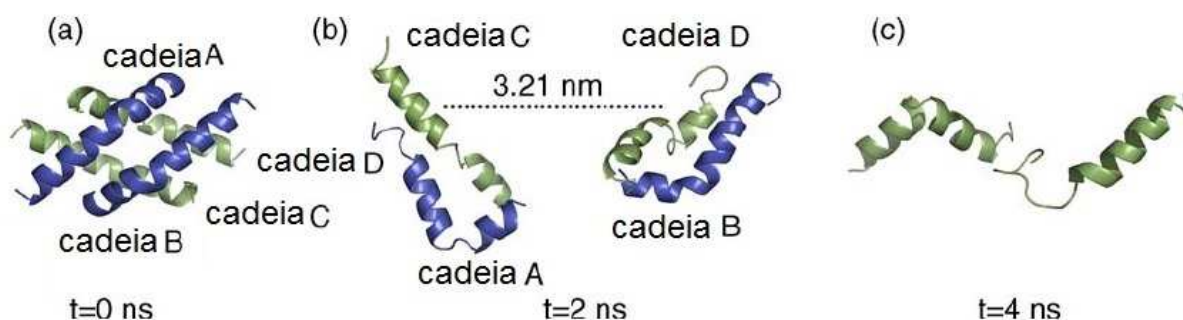


Figura 01 – Estrutura e conformação da melitina sendo (a) Estrutura Cristalina, (b) 120 mM Cl<sup>-</sup> e pH 7,0 – 2 ns e (c) 120 mM Cl<sup>-</sup> e pH 7,0 – 4 ns. Adaptado de TERRA (2007).

Mesmo tendo uma cadeia contendo poucos aminoácidos, a melitina apresenta diferentes conformações que variam de acordo com o meio onde está presente, Figura 02. Assim, em função das propriedades do meio, pode haver formação de estruturas oligoméricas e, portanto, impactar no processo de purificação, principalmente em processos de separação por membranas.

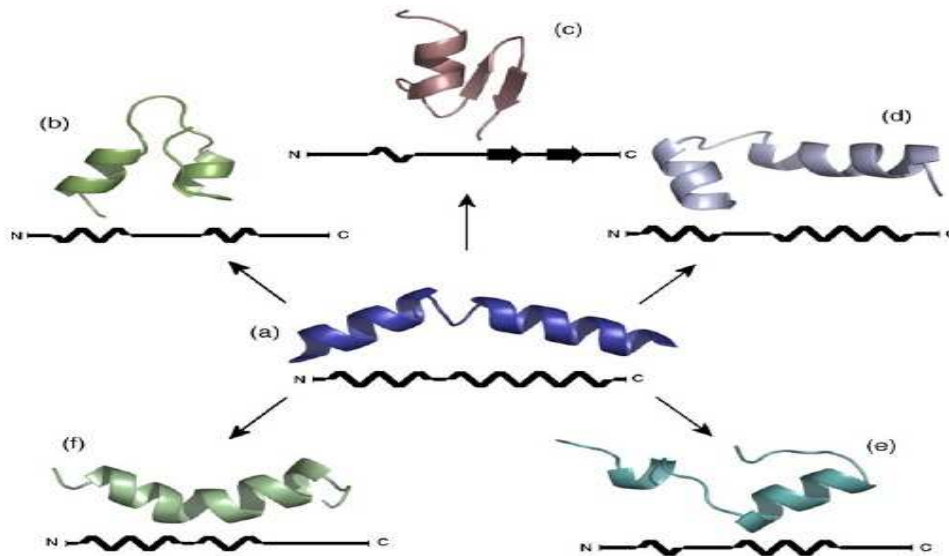
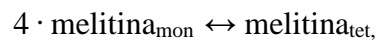


Figura 02 – Conformação da melitina em diversos meios, a saber, (a) forma cristalina, e as demais em água com as seguintes condições: (b) pH 7 e Cl<sup>-</sup> 50 mM; (c) pH 7 e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 50 mM; (d) pH 7 e Cl<sup>-</sup> 1,2 M; (e) pH 7 e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 1,2 M; (f) pH 11 e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 50 mM. Adaptado de TERRA (2007).

Segundo QUAY e CONDIE (1983), a melitina tende a desagregar à medida que se reduz a sua concentração no meio apresentando a cinética em que há um equilíbrio entre a melitina monomérica e a tetramérica, conforme a reação química abaixo, com a sua constante de equilíbrio demonstrada nas Equações 1 e 2:



$$K_d = [\text{melitina}_{\text{mon}}]^4 / [\text{melitina}_{\text{tet}}] \quad (1)$$

Sendo  $K_d$  (constante de equilíbrio para reversão da melitina monômero para tetrâmero) e que pode ser também expressa em função da melitina total:

$$[\text{melitina}]_{\text{tot}} = [\text{melitina}_{\text{tet}}] + [\text{melitina}_{\text{mon}}]^4 / K_d \quad (2)$$

Uma solução de melitina a 10,6 g/L em tampão fosfato a 0,001 M, pH 7,15 na temperatura de 23 °C apresenta um valor de  $K_d$  de  $2,5 \times 10^{-11}$  (QUAY e CONDIE, 1983).

## 2.2.2 Fosfolipase A<sub>2</sub>

A fosfolipase A<sub>2</sub> é um polipeptídeo de cadeia simples contendo 128 resíduos de aminoácidos, 4 pontes dissulfeto e com um carboidrato anexado em sua estrutura (LIMA E BROCHETO-BRAGA, 2003). É uma substância largamente distribuída em tecidos de mamíferos bem como diferentes tipos de venenos. Esta enzima catalisa a hidrólise de fosfolipídios, conforme Figura 03, sendo classificada, de acordo com o sítio de hidrólise, em A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C e D (FULY *et al.*, 1997).

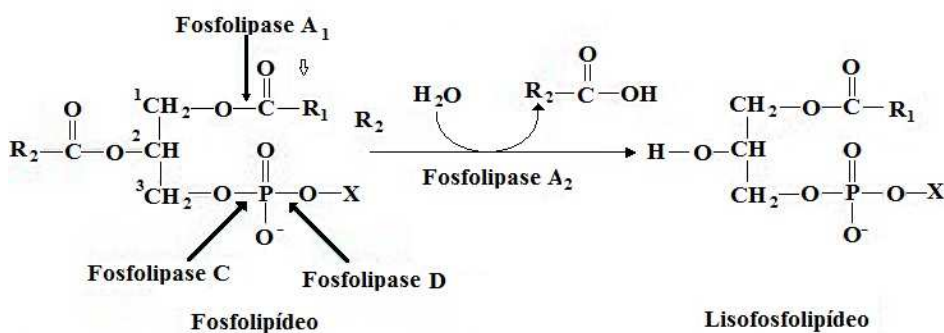


Figura 03 – Ação catalítica da fosfolipase A<sub>2</sub>. A fosfolipase A<sub>2</sub> retira hidroliticamente o resíduo de ácido graxo C<sub>2</sub> de um fosfolipídeo, gerando o lisofosfolipídeo correspondente. As ligações hidrolisadas por outros tipos de fosfolipasases, que são nomeadas de acordo com suas especificidades. Adaptado de VOET e VOET (2013).

Ela provoca a clivagem dos fosfolipídios de membrana, induzindo a formação de poros e a respectiva lise celular, sendo específica para a posição 2 da cadeia de glicerol de fosfolipídios, levando à formação de lisolecitina e ácidos graxos. Os principais fosfolipídios que são substratos para essa enzima são: fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina (VOET e VOET, 2013).

## 2.2.3 Peptídeo MCD

O peptídeo de degranulação de mastócitos, MCD, é formado por 22 resíduos de aminoácidos e contém duas pontes dissulfeto, que possui atividade anti-inflamatória e efeito analgésico e que, em baixa dose, induz a liberação de histamina, porém, em altas doses, age como um antialérgico inibindo a liberação desta enzima (LIMA E BROCHETO-BRAGA, 2003; GOODMAN, *et al.*, 2006; DONG *et al.*, 2007).

#### 2.2.4 Apamina

A apamina é um peptídeo formado por 18 resíduos de aminoácidos e que desempenha atividade na inibição do canal de  $\text{Ca}^{2+}$  ativado por  $\text{K}^+$  presentes em neurônios, músculo liso, esquelético e cardíaco, levando a espasmos musculares, convulsões, vasoconstrição e taquicardia. Também é um agente com efeito citotóxico em células tumorais e com propriedades anti-inflamatórias e nociceptivas (LIMA E BROCHETO-BRAGA, 2003; GOODMAN, *et al.*, 2006; DONG *et al.*, 2007).

#### 2.2.5 Hialuronidase

Outro alergênico conhecido é a enzima hialuronidase que hidrolisa o ácido hialurônico no tecido alvo, aumentando a permeabilidade nos vasos sanguíneos, e, por esta razão as hialuronidases são denominadas fatores de espalhamento (HIDER, 1988; KUDO *et al.*, 1993; STRONG e WADSWORTH, 2000; KING e SPANGFORT, 2000).

### 2.3 Processos utilizados no fracionamento da apitoxina

Estudos demonstraram que os componentes da apitoxina que são responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios e analgésicos podem ser extraídos em frações de solventes aquosos. Sugere-se que a fração purificada em membrana de ultrafiltração, que apresenta massa molecular de corte abaixo de 10 kDa, contenha a maioria dos compostos constituintes da apitoxina que são responsáveis pela ação analgésica ao nível do sistema nervoso periférico (YOUNG *et al.*, 2002). Isso se dá pois esta aumenta o metabolismo dos tecidos lesionados favorecendo a eliminação dos agentes tóxicos e também por ligar-se à fosfolipase  $\text{A}_2$  e assim inibir a sua atividade na liberação do ácido araquidônico, substância envolvida no processo inflamatório e na artrite reumatoide (YOUNG *et al.*, 2002).

A purificação, isolamento e/ou retirada de compostos da apitoxina são descritos há mais de décadas utilizando-se a filtração em gel ou colunas de Sephadex G-25 e G50 acompanhadas de cromatografia de troca iônica em Sephadex C-25 (BANKS *et al.*, 1981 e MAULET *et al.*, 1982). A centrifugação é uma técnica que é citada, porém com a finalidade de preparo de amostra (JINHUI *et al.*, 2010).



A ultrafiltração foi a técnica menos utilizada no processo de purificação da apitoxina nos artigos pesquisados.

### 2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é um processo de separação no qual a amostra é distribuída entre duas fases no leito cromatográfico (coluna ou placa). Uma fase é a estacionária, enquanto a outra passa através do leito cromatográfico. A fase estacionária é um material tensoativo sólido, poroso, em forma de partículas pequenas ou um filme fino de líquido. A fase móvel pode ser um líquido ou um gás. Se tratando de um líquido, o processo é conhecido como cromatografia líquida (MEYER, 2004).

A cromatografia líquida que utiliza colunas empacotadas com resinas onde a fase móvel é eluída sobre elevadas pressões é conhecida como cromatografia líquida de alta eficiência.

Esta pode ser classificada quanto à fase em normal ou reversa. Ela também pode ser classificada quanto à fase móvel de troca iônica, exclusão molecular, afinidade/imunoafinidade e partição/adsorção.

A cromatografia de exclusão por tamanho é o processo em que a separação ocorre pela classificação da massa da molécula. A fase estacionária é composta de resina porosa que favorece a entrada por difusão de moléculas com menor raio hidrodinâmico para dentro de seus poros, ficando estas moléculas retidas em um maior tempo no interior da resina. As substâncias com maior raio hidrodinâmico não irão se difundir completamente dentro desta resina e serão as primeiras a serem eluídas da coluna (MEYER, 2004).

Cromatografia em fase reversa é o termo usado para descrever o estado em que a fase estacionária é menos polar do que a fase móvel. A fase estacionária onde o octadecilsilano (ODS), um n-alcano com 18 átomos de carbono, está quimicamente ligado à sílica porosa ou micropartículas cerâmicas, é a fase estacionária mais utilizada, conhecida como C18 (HEARN *et al.*, 1988; MEYER, 2004).

### 2.3.2 Eletroforese em Gel

A eletroforese em gel é uma técnica simples, facilmente reproduzível que separa proteínas de acordo com a sua massa molecular. Por esta técnica, é possível obter informações sobre a massa molecular e a carga da proteína, bem como se a mesma está pura (HAMES e RICKWOOD, 1990). O gel de poliacrilamida – dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) é um dos mais utilizados para proteínas e peptídeos.

O detergente SDS se liga aos aminoácidos da proteína fornecendo uma carga negativa para a proteína. Então a amostra é colocada em um gel de poliacrilamida e estes são imersos em um tampão e submetidos a uma corrente elétrica. A proteína que foi carregada negativamente migra para o eletrodo de carga positiva e a malha do gel possibilita a separação das proteínas. As que tiverem uma menor massa terão maior mobilidade e tendem a concentrar mais próximas da base do gel (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Geralmente é utilizando um padrão comercial com proteínas de massas moleculares conhecidas para que seja feita a comparação com as amostras e dimensionar os valores de massa aproximados de cada banda após a coloração do gel.

### 2.3.3 Espectrofotometria de massa

A espectroscopia de massas é um método de identificação de substâncias desconhecidas ou confirmação de sua identidade por meio da razão massa/carga. É possível utilizar baixas quantidades de amostra, da ordem de picogramas, para identificar e sequenciar biomoléculas, biopolímeros, drogas, poluentes, entre outros.

Esta técnica consiste em incidir moléculas ionizadas da substância a ser analisada em um campo elétrico e posteriormente em campo magnético. Ao passar pelo campo elétrico, as moléculas ionizadas sofrerão a ação de uma força elétrica e serão aceleradas dependendo de sua massa. Na região com campo magnético, as moléculas ionizadas sofrem deflexões em suas trajetórias dependendo de sua velocidade inicial nesta região e de sua carga.

Desta forma, os campos elétrico e magnético separam os íons em função de sua massa-carga. O conjunto de íons separados é chamado de espectro de massa. A ionização das moléculas pode ser realizada por meio de um feixe de elétrons, íons ou laser que incide sobre a amostra (LEHNINGER *et al.*, 2002; JINHUI *et al.*, 2010).

#### 2.3.4 Ultrafiltração

Por ser um processo que opera em temperaturas e pressões relativamente baixas e não exigir o uso de aditivos químicos, a ultrafiltração é comumente utilizada quando se deseja concentrar, purificar e fracionar biomoléculas (ZYDNEY, 2000). Esta técnica, além de ser aplicada para concentração de proteínas, também é utilizada para a troca de tampões e diálise, substituindo, em algumas ocasiões, a cromatografia de exclusão por tamanho, técnica que implica em maiores custos em uma escala industrial se comparada com a ultrafiltração (LIGHTFOOT e MOSCARIELLO, 2004).

A alta retenção de proteína é obtida através de uma membrana porosa em função do tamanho das proteínas, embora estudos tenham demonstrado o potencial de explorar tanto o tamanho quanto as interações eletrostáticas entre as proteínas e a membrana para processos aprimorados de ultrafiltração (MEHTA e ZYDNEY, 2005).

Membranas de ultrafiltração são geralmente estruturas anisotrópicas e têm uma camada de superfície ou pele fina e porosa que está apoiada sobre um substrato microporoso muito mais aberto. A camada superficial finamente porosa realiza a separação; o substrato microporoso proporciona resistência mecânica (BAKER, 2012).

As membranas de ultrafiltração são caracterizadas pelo diâmetro nominal de corte (*molecular weight cut off*, MWCO) que corresponde à massa molecular da amostra que apresenta 95% de rejeição. Apresentam poros assimétricos e operam com diferença de pressão variando de 100 a 1.000 kPa (MULDER, 1996).

A diferença de pressão, pressão de operação ou pressão através da membrana ( $\Delta P$ ) é a diferença entre a pressão de entrada e a pressão de saída do permeado. A definição do valor da pressão de operação de um processo de separação é fundamental para que se possa obter uma maior vida útil da membrana utilizada (HABERT *et al.*, 2006).

Para um solvente puro, inerte em relação à membrana e não se tendo deformação da membrana em função da pressão, o seu fluxo através da membrana estará diretamente associado ao valor do diferencial de pressão. Traçando um gráfico do fluxo em função do diferencial de pressão teremos uma reta onde o valor de sua inclinação resulta na permeabilidade hidráulica da membrana (HABERT *et al.*, 2006).

O fluxo de água pura nas membranas de ultrafiltração, em média, é dez vezes superior ao da solução contendo as macromoléculas a serem separadas (BAKER, 2012). A redução deste fluxo pode ser causada por vários fatores: polarização de concentração, adsorção, a formação da camada de gel e bloqueio dos poros (ZHOU, 2010).

Um ponto fundamental para se determinar o desempenho das membranas de ultrafiltração é a polarização de concentração. Esta é causada pelo acúmulo de matéria na superfície da membrana que leva à formação de um gradiente de concentração de soluto em solução ou de partículas em suspensão junto à superfície da membrana (BAKER, 2012). Na Figura 04 está indicada a zona de polarização e também indicados os fluxos no processo de ultrafiltração.

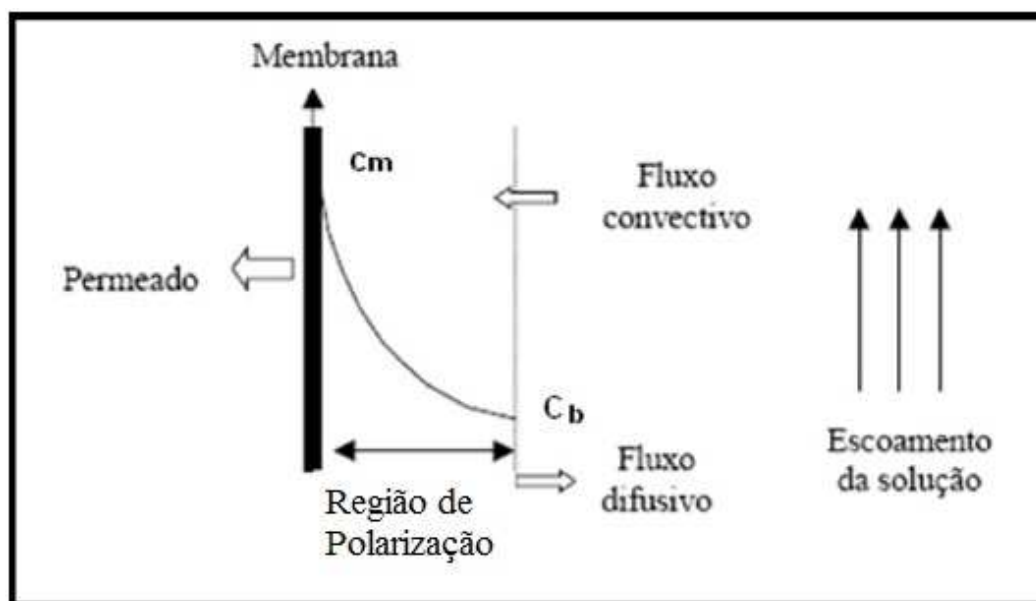


Figura 04 – Representação do efeito de polarização de concentração. Adaptada de BAKER (2004).

A polarização de concentração é um processo reversível e pode ser minimizada com alterações dos parâmetros operacionais, como: temperatura, agitação, concentração da corrente de alimentação e diferença de pressão, sendo este importante para avaliar o desempenho do processo de ultrafiltração (BAKER, 2012). Porém, na prática, é observado um declínio no fluxo, mesmo com o valor da pressão mantido constante (MULDER, 1996).

A incrustação é um fenômeno de redução do fluxo, irreversível, resultando na queda da produtividade do processo de purificação e na respectiva vida útil da membrana, sendo assim, um dos maiores problemas associados aos processos de purificação com membranas, e que geralmente se dá por interações físico-químicas entre a membrana e os vários componentes presentes no fluido de alimentação (MULDER, 1996; KIM *et al*, 1991).

Durante a ultrafiltração de proteínas, são observados diferentes tipos de incrustação na superfície da membrana. Este processo pode ser iniciado pela supersaturação de moléculas de proteína na entrada dos poros devido ao elevado fluxo convectivo, Figura 05. Nisto implica a importância de se conhecer e controlar as condições de operação na ultrafiltração (KIM *et al.*, 1991). Nela é possível acompanhar o aumento do fluxo nas pressões  $p_1$  até a  $p_4$  com a respectiva formação da camada gel para uma solução macromolecular. No ponto  $p_3$  é atingido o fluxo limite a partir do qual os sucessivos aumentos de pressão não mais contribuem para o aumento do fluxo na membrana e sim para o aumento da camada gel.

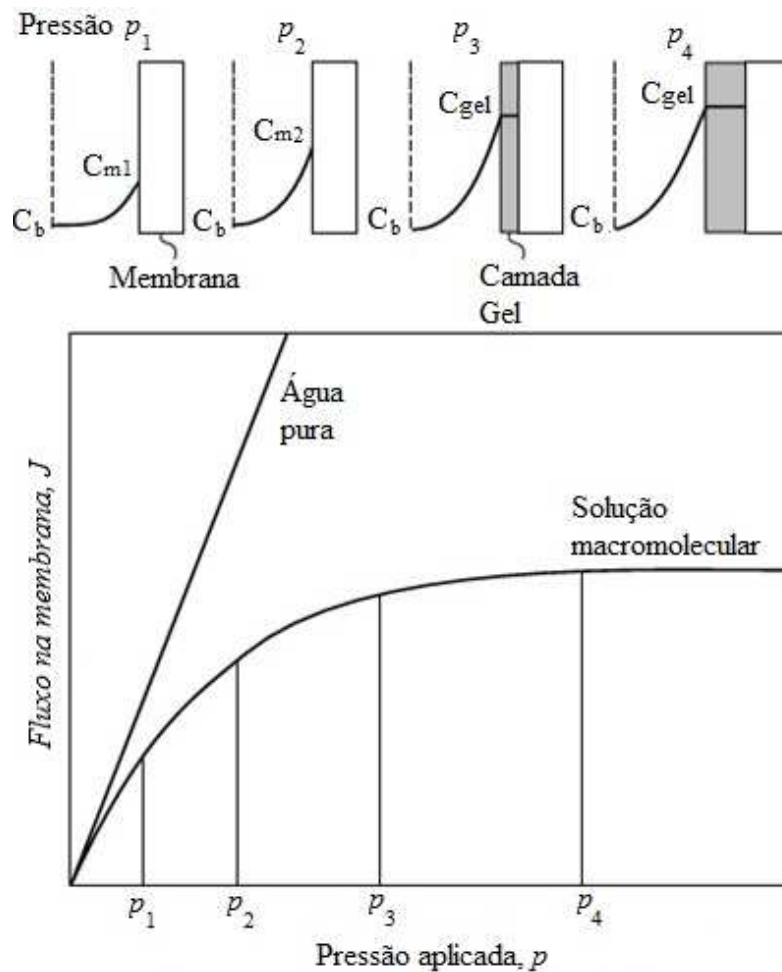


Figura 05 – Efeito da pressão sobre o fluxo em água pura e uma solução macromolecular e a formação do gel. Adaptado de BAKER (2004).

Atualmente, há modelos matemáticos capazes de descrever os processos de incrustação. Conhecendo suas causas e as condições operacionais ótimas necessárias para minimizá-las, tem-se uma redução da energia gasta e também das manutenções do processo, o que o torna economicamente mais competitivo (VELA *et al.*, 2012).

#### 2.4 Modelos para Transferência de Massa e Interface da Membrana

Quando se trabalha com membranas, uma variável que se busca quantificar é o seu fluxo (J) que é a massa ou volume de uma substância que permeia em uma área de membrana definida, em um determinado tempo. O fluxo volumétrico é expresso em L/m<sup>2</sup>.h e pode ser calculado pela Equação 3 (MULDER, 1996).

$$J = \frac{dV}{dt} \frac{1}{A} \quad (3)$$

Sendo: J o fluxo, em L/m<sup>2</sup>.h; V o volume do permeado, em L; t o tempo, em horas e A a área da membrana, em metros quadrados.

Outra variável importante e que impacta no volume de permeado é a pressão que representa a força motriz para operação do sistema. Utilizando a diferença entre a pressão aplicada na alimentação e aquela aplicada no filtrado ( $\Delta P$ ), em Pa, a viscosidade dinâmica,  $\eta_T$ , em Pa.s, e a resistência da membrana,  $R_m$ , em m<sup>-1</sup>, o fluxo (J), em m<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>.s ou m/s, pode ser escrito pela lei modificada de Darcy, apresentada na Equação 4 (WIESNER E APTEL, 1996).

$$J = \frac{\Delta P}{\eta_T R_m} \quad (4)$$

Substituindo a resistência da membrana pelo inverso da permeabilidade da hidráulica,  $L_p$ , onde  $L_p/\eta_T$  é o eficiente de permeabilidade da água, temos o fluxo de água apresentado na Equação 5.

$$J_W = \frac{L_p \Delta P}{\eta_T} \quad (5)$$

A permeabilidade hidráulica da membrana ( $L_p$ ) isolada é apresentada na Equação 6 onde  $\Delta P$ .

$$L_p = \frac{\eta_T J_W}{\Delta P} \quad (6)$$

### 2.4.1 Modelo do filme

Trabalhando com modelagem do fluxo independente da pressão, Michaels, em 1968, propôs a primeira teoria que explicava os mecanismos de transferência de massa e que ficou conhecida como modelo do filme (GROTE *et al*, 2011). O modelo do filme explica a transferência de massa na membrana com o surgimento de gradiente de concentração do soluto e que foi designado como efeito de polarização de concentração.

O efeito de polarização aponta que a uma distância  $\delta$  da superfície da membrana na solução de alimentação tem-se a menor concentração,  $C_b$  e, próximo à superfície da membrana, a concentração é máxima,  $C_m$  (GROTE *et al*, 2011), conforme Figura 06.

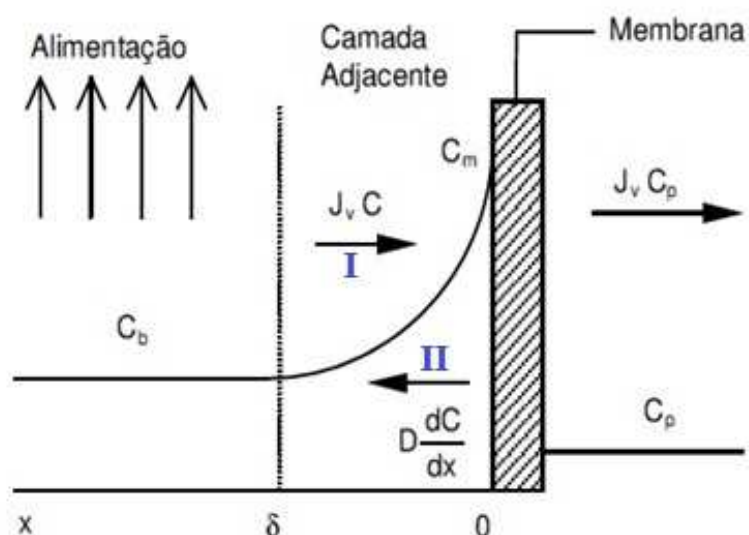


Figura 06 – Ilustração mostrando o efeito da concentração de polarização e as principais variáveis envolvidas em uma membrana de ultrafiltração. Adaptado de BAKER (2004).

No processo de ultrafiltração, tem-se o fluxo convectivo do soluto em direção à membrana, número I da Figura 06. Com o aumento da concentração de solutos próximos à membrana aumenta-se o fluxo difusivo, número II, em sentido contrário à membrana e este pode ser calculado pela lei de Fick, que corresponde à segunda parcela do primeiro membro da Equação 4. No estado estacionário, em que o transporte convectivo é igual à soma do fluxo de permeado com o transporte difusivo, tem-se a Equação 7 (GROTE *et al*, 2011):

$$J_v C + D \frac{dC}{dx} = J_v C_p \quad (7)$$

Integrando a Equação 6 e considerando as condições de contorno:  $X=0, C = C_m$ ;  $X = \delta, C = C_b$ , obtém-se a Equação 8:

$$\frac{C_m - C_P}{C_b - C_P} = \exp\left(\frac{J_V \delta}{D}\right) \quad (8)$$

$C_m, C_b$  e  $C_P$  são as concentrações de soluto (g/L), respectivamente, na interface da membrana, na alimentação e no permeado,  $J_V$  é o fluxo volumétrico (m/s),  $\delta$  é a espessura da camada adjacente à membrana (m) e  $D$  é o coeficiente de difusão do soluto em água (m<sup>2</sup>/s).

A razão entre o coeficiente de difusão e a espessura da camada adjacente é conhecida como coeficiente de transferência de massa,  $k$ , (m/s), mostrado na Equação 9.

$$k = \frac{D}{\delta} \quad (9)$$

Considerando os coeficientes de rejeição do permeado,  $R$ , e do concentrado,  $R'$ , temos as Equações 10 e 11:

$$R = \frac{C_m}{C_b} \quad (10)$$

$$R' = 1 - \frac{C_P}{C_m} \quad (11)$$

Substituindo as Equações 9, 10 e 11 na Equação 8, tem-se a Equação 12, que está no módulo de polarização de concentração ou a Equação 13 em função da rejeição do permeado:

$$\frac{C_m}{C_b} = \frac{\exp\left(\frac{J_V}{k}\right)}{R' + (1 - R') \exp\left(\frac{J_V}{k}\right)} \quad (12)$$

$$R = \frac{R'}{R' + (1 - R') \exp\left(\frac{J_V}{k}\right)} \quad (13)$$

Considerando que todo o soluto fique retido na membrana,  $C_P = 0$  e  $R' = 1$ , tem-se a Equação 14, que está explícita em relação ao módulo de polarização de concentração ou a Equação 15, explícita para o fluxo (GROTE *et al.*, 2011):

$$\frac{C_m}{C_b} = \exp\left(\frac{J_V}{k}\right) \quad (14)$$

$$J_V = k \ln\left(\frac{C_m}{C_b}\right) \quad (15)$$



A razão  $C_m/C_b$  é chamada de módulo de polarização de concentração. Dois fatores estão correlacionados com essa polarização e são o fluxo,  $J_v$ , e o coeficiente de transferência de massa,  $k$ , como podem ser visto na Equação **15**. Este modelo possibilita a compreensão do sistema de ultrafiltração e seu dimensionamento para que este atenda ao rendimento desejado.

O coeficiente de transferência de massa pode ser obtido experimentalmente através da Equação **16**, onde  $J_{max}$  é o platô do fluxo através da membrana e  $C_{gel}$  é a concentração onde se tem o início da formação da camada gel (BAKER, 2012):

$$k = - \frac{J_{max}}{\ln C_b - \ln C_{gel}} \quad (16)$$

## **OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho consiste em avaliar o processo de ultrafiltração para fracionamento da apitoxina utilizando membrana de celulose regenerada de 10 KDa.

### **3.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos são destacados abaixo:

- Caracterização das propriedades morfológicas da membrana comercial de celulose regenerada com diâmetro nominal de corte de 10 kDa;
- Definição das condições operacionais do processo de ultrafiltração da apitoxina utilizando membrana comercial de celulose regenerada com diâmetro nominal de corte de 10 kDa;
- Caracterização do fluxo e do coeficiente de rejeição em função da concentração de alimentação e a diferença de pressão;
- Investigação do produto permeado, quanto à presença das proteínas e dos peptídeos presentes com massa molar acima de 10 KDa;
- Definição de métodos de análise da apitoxina e o seu permeado;
- Quantificação da melitina e fosfolipase A<sub>2</sub> presentes tanto na apitoxina quanto em seu permeado da ultrafiltração.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção da apitoxina

A apitoxina utilizada foi adquirida da Cooperativa Nacional de Apicultura (Conap) lote AP012. Esta foi coletada de acordo com o protocolo de *Benton*. Resumidamente, uma caixa de madeira contendo uma base plana com fios de cobre ou aço esticados foi colocada na entrada da colmeia de forma que as abelhas passassem pela placa e encostassem nos fios ao entrar na colmeia. Estes foram eletrificados de modo a aplicar 33 volts nas abelhas. As abelhas responderam com picadas na superfície do vidro, liberando a apitoxina (BENTON *et al.*, 1963).

A apitoxina cristalizou-se sobre a placa de vidro e então foi raspada. O produto obtido foi armazenado em um freezer a -20 °C (JINHUI *et al.*, 2010).

Os requisitos normativos de qualidade da apitoxina bem como o teste de identidade foram avaliados com o propósito de utilização dessa como insumo farmacêutico. Estes requisitos incluem características macroscópicas, físico-químicas (umidade, teor proteico, fosfolipase A<sub>2</sub>) e microscópicas (BRASIL, 2001).

A Farmacopéia Brasileira não contém nenhuma monografia específica para análise da Apitoxina, mas ela preconiza no item V.4.2.3 a “Determinação de água em drogas vegetais” e aponta o método azeotrópico indicado para amostras que possuem substâncias voláteis. Assim, o método volumétrico de Karl Fisher foi realizado em triplicata utilizando balança analítica (Mettler Toledo AE 163), titulador (Metrohm 787 KF Titrimo) e os reagentes: metanol P.A. (Marca Panreac, lote 217139), reagente de Karl Fisher (Marca Fluka, lote SZBD1010V) e água Milli-Q (BRASIL, 2010).

### 4.2 Preparo da amostra

Uma amostra de apitoxina cristalizada em pó foi pesada, dissolvida em água purificada e teve seu pH corrigido para o valor 7 utilizando solução de hidróxido de sódio 10 molar. Esta suspensão foi transferida para agitadores para tubos tipo *vortex* durante 5 minutos, obtendo-se uma solução de concentração 50 mg/mL da apitoxina (JINHUI *et al.*, 2010).

A suspensão foi microfiltrada em uma membrana de celulose regenerada de 0,45 µm para remoção de particulados e esta é armazenada a 4 °C (JINHUI *et al.*, 2010).

Embora a Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001, aponte a técnica de Bradford a ser utilizada para quantificação de proteínas, ela não foi escolhida neste trabalho, uma vez que mais da metade da apitoxina é constituída de peptídeos com massa molar abaixo de 3 kDa. Desta forma, o método escolhido foi o de Lowry por ser mais sensível para pequenos peptídeos e que estão nesta faixa limite (LUCARINI e KILIKIAN, 1999).

Neste trabalho, o método de Lowry foi utilizado para avaliação e correção das concentrações de apitoxina na alimentação. O teste consiste em misturar ácido fosfórico, molibdato e tungstato, que é chamado de reagente de Folin Ciocalteu. Essa solução junto com Cu<sup>+2</sup>, catalisador, e os aminoácidos cromógenos, tais como, tirosina e triptofano, leva à formação de um composto que possui absorção na região do visível, 750 nm (POMORY, 2008).

### 4.3 Caracterização da membrana

A ultrafiltração foi realizada em membranas de celulose regenerada com massa molar de corte (*MWCO*) de 10 kDa (Millipore®) lote C7PN23329. Esse valor referente ao corte da membrana foi escolhido após análise da massa molar dos componentes da apitoxina, principalmente dos principais alergênicos e também porque a Fundação Ezequiel Dias possui interesse na fração da apitoxina que contém os componentes com massa molar abaixo de 10 kDa.

Tabela 2- Informações técnicas da membrana de celulose regenerada de 10 kDa (Millipore, 2008).

<i>Cut off</i>	10 kDa.
<b>Material da Pele</b>	Celulose regenerada
<b>Material da camada suporte</b>	Polietileno UHMW
<b>Retenção de Dextrana</b>	90% até 5 kDa
<b>Espessura da pele</b>	130 µm
<b>Permeabilidade do ar</b>	0 a 70 psi
<b>Permeabilidade da água</b>	4,2 kg/m <sup>2</sup> .h /psi
<b>Faixa de pH</b>	2 a 13
<b>Temperatura máxima de operação</b>	80 °C

Foi utilizado sistema de célula agitada (Amicon<sup>®</sup> Ultra - 4 Millipore<sup>®</sup> Corporation, MA) de 4 mL.

Todas as membranas, antes do uso, foram submersas em água deionizada por duas horas para a retirada da camada de proteção em glicerina, sendo essa água trocada a cada 30 minutos. Foi utilizada uma balança analítica (Gehaka) para coleta da massa dos produtos permeados.

#### 4.3.1 Determinação da permeabilidade hidráulica das membranas

Após a lavagem da membrana, conforme o item 4.3, foi determinada a permeabilidade hidráulica. A célula de agitação contendo a membrana e água Milli-Q foi pressurizada em diferentes pressões, entre 49 a 392 kPa, e o fluxo foi determinado medindo a massa de água permeada em intervalo de tempo de 5 minutos. O fluxo de água foi calculado utilizando a Equação 17.

$$J_W = \frac{Q}{A(\Delta t)} \quad (17)$$

Onde  $J_W$  é o fluxo da água, em  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $Q$  é a quantidade de permeado, em kg,  $\Delta t$  é o tempo, em h, e  $A$  é a área efetiva da membrana, em  $\text{m}^2$ . Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente.

A permeabilidade hidráulica da membrana ( $L_p$ ) está apresentada na Equação 6.

$$L_p = \frac{\eta_T J_W}{\Delta P} \quad (6)$$

#### 4.3.2 Fisissorção de $\text{N}_2$

A fisissorção de  $\text{N}_2$  é uma técnica empregada para determinar o tamanho e a distribuição de tamanho de poros nas membranas. É determinada pela função relativa da pressão ( $P_{\text{rel}}$ ), sendo a razão entre a pressão aplicada ( $P$ ) e a pressão de saturação do gás utilizado ( $P_0$ ) (MULDER, 1996).

O experimento foi conduzido à temperatura de ebulição do N<sub>2</sub>, na pressão de 100 kPa. O volume total dos poros foi determinado pela quantidade de gás adsorvido próximo da pressão de saturação. A dessorção ocorreu quando a pressão foi reduzida, a partir da pressão de saturação. (MULDER, 1996).

As membranas após serem lavadas, conforme o item 4.3, foram imersas por uma hora em cada um dos solventes nessa ordem: água, etanol, diclorometano e hexano para eliminar uma possível contração dos poros em função de uma mudança brusca na polaridade do solvente. A pele foi retirada da membrana e cortada em amostras menores.

A amostra foi degaseificada e desumidificada numa câmara de vácuo a 75 °C, durante 14 horas (SAIBUATONG *et al.*, 2010). Essa temperatura foi mantida por uma manta térmica que envolve a célula de amostra, a qual é semelhante a um longo tubo de vidro de ensaio onde foi alojado o material para análise.

Após o resfriamento até a temperatura ambiente, retirou-se a célula de amostra de dentro da câmara de vácuo e mediu-se a massa. Depois, a amostra foi inserida na câmara de análise e mergulhada num banho de nitrogênio líquido, em que a temperatura registrada foi de -195,7 °C. Em seguida, o processo consistiu em admitir pequenas quantidades de N<sub>2</sub> em etapas até que se atingisse o equilíbrio.

A partir dos dados de volume de adsorvato e das pressões coletadas, foi possível calcular, a partir da equação de BET (Brunauer, Emmet, Teller), a área superficial da membrana.

O teste de fisissorção de N<sub>2</sub> foi feito no Departamento de Engenharia Metalúrgica da Escola de Engenharia da UFMG utilizando Quantachrome NovaWin version 10.01.

#### 4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das membranas, ou seja, o tamanho e a forma dos poros, foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Os ensaios foram realizados no Centro de Microscopia da UFMG. As membranas foram preparadas com a retirada da glicerina bem como imersas em uma sequência de solventes em ordem decrescente de polares, conforme descrito no item 4.3.2. A pele da membrana foi retirada e cortada em amostras menores.

A fratura das amostras da pele da membrana ocorreu após imersão em nitrogênio líquido, a fim de manter intacta a seção transversal dos filmes. Estas amostras foram fixadas no porta-amostra e recobertas com uma fina película de ouro (metalizador Bal-Tec, modelo MD20) antes de serem levadas ao equipamento. Foram realizadas imagens tanto da superfície das membranas quanto da seção transversal com HV de 20 kV e aproximações de 1.000 a 50.000 vezes.

#### 4.3.4 Experimento de rejeição – MWCO

Foi utilizado dextrana massa 10 kDa (Sigma-Aldrich lote BCBM2424V), espectrofotômetro (Shimadzu, modelo 1601), ácido sulfúrico (PA 95% a 97% - Merck, Lote: K44311931). Foram preparadas três soluções de dextrana, experimento feito em triplicata independentes, na concentração de 0,10 g/L. Parte das soluções foram diluídas para construção de uma curva padrão e o restante foi utilizado no teste de rejeição, sendo ultrafiltrado em célula agitada e esta foi mantida a velocidade de agitação de 750 rpm, temperatura ambiente, 25 °C e pressão de 220 kPa.

Foi utilizado o método de ácido sulfúrico – UV onde 1 mL da solução contendo a dextrana foi rapidamente misturada com 3 mL de ácido sulfúrico concentrado em um tubo de ensaio.

O tubo de ensaio foi agitado em um *vórtex* por 30 segundos e, então, resfriado em banho de gelo por 3 minutos. Após esse tempo, a solução teve sua absorbância determinada a 315 nm no espectrofotômetro. A solução de referência foi preparada da mesma forma, porém a solução de proteínas foi substituída por água Milli-Q (ALBALASMEH, *et al*, 2012).

#### **4.4 Determinação das propriedades de transporte das membranas**

As propriedades de transporte medidas foram o fluxo permeado e o coeficiente de rejeição da membrana. Estas foram determinadas por meio da permeação de uma solução contendo apitoxina através da membrana, mostrado na Figura 07. Antes da realização destas foi avaliada a compactação nas membranas após a remoção da camada de glicerina. Para isso foram comparadas o valor do fluxo obtido na membrana a ser utilizada com o fluxo definido na permeabilidade hidráulica no valor de  $\Delta P$  de 220 kPa, e as membranas de 3,46 cm<sup>2</sup> de área não apresentaram valores significativos de variação de fluxo, o que aponta para uma não compactação destas na pressão utilizada.

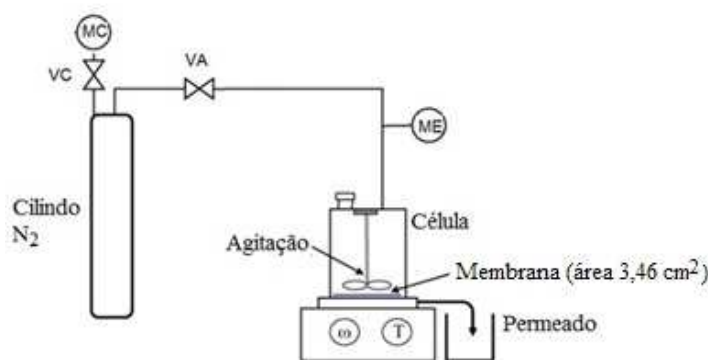


Figura 07 – Esquema do sistema de ultrafiltração utilizado. VC é a válvula do cilindro, VA é a válvula do sistema de ultrafiltração, ME é o manômetro calibrado, w o regulador da agitação e T regulador da temperatura.

#### 4.4.1 Estudo do efeito da pressão de operação

A determinação do fluxo permeado foi realizada medindo o volume do permeado obtido em função do tempo, em uma célula com área da membrana conhecida. As membranas utilizadas foram previamente lavadas, de acordo com item 4.3.

Os testes foram realizados em triplicata, temperatura ambiente, 25 °C, e as concentrações das soluções de apitoxina testadas foram de: 50 g/L, 30 g/L e 10 g/L. A pressão do sistema foi variada de 49 a 392 kPa com intervalos de 49 kPa. A velocidade de agitação no interior da célula foi mantida constante, a 750 rpm.

#### 4.4.2 Avaliação do efeito do aumento da concentração na alimentação

Para avaliar o efeito do aumento da concentração de apitoxina na alimentação foram testadas 9 amostras, em triplicata, de diferentes concentrações, da faixa de 10 até 50 g/L de apitoxina em intervalos de 5 g/L entre cada amostra.

A pressão foi mantida em 225 kPa e a velocidade de agitação no interior da célula foi mantida constante, a 750 rpm. Todo o experimento foi realizado em temperatura ambiente, 25 °C, tendo como produto medido a massa de permeado obtida. Para cada concentração testada uma nova solução de apitoxina era produzida para que a concentração da alimentação testada fosse mantida.



#### 4.4.3 Caracterização das condições hidrodinâmicas

A velocidade de rotação da solução na célula de permeação foi estudada medindo o fluxo de permeado em função da velocidade rotacional da célula de agitação. A pressão foi mantida a 220 kPa. Foi utilizada uma solução de apitoxina de 30 g/L na alimentação e foram coletadas amostras do produto permeado. Os testes foram realizados em triplicada. A velocidade foi variada na faixa de 180 a 960 rpm, com intervalos de 130 rpm.

#### 4.4.4 Testes de longa duração

Para avaliar a incrustação e a polarização de concentração, uma membrana de celulose regenerada de 10 kDa, previamente lavada conforme item 4.3, teve sua permeabilidade hidráulica determinada com água Milli-Q, conforme item 4.3.1. Essa membrana foi mantida em operação, com a pressão e velocidade de agitação constantes em 220 kPa e 750 rpm.

O teste foi conduzido em temperatura ambiente, 25 °C e amostras do permeado foram coletadas a cada 30 minutos para avaliar o fluxo do permeado. Após 395 minutos foi determinada uma nova permeabilidade hidráulica na membrana utilizada. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os parâmetros utilizados nos ensaios para a determinação das propriedades de transporte das membranas estão resumidos na Tabela 03.

Tabela 3 – Resumo dos testes realizados na membrana de ultrafiltração com as variáveis, respectivas faixas de avaliação e seus intervalos.

Teste	Variável	Faixa	Intervalo
<b>Pressão de operação</b>	Pressão (kPa)	49-392	49
	Concentração (g/L)	10-50	20
<b>Aumento da concentração na alimentação</b>	Concentração (g/L)	10-50	5
<b>Condições hidrodinâmicas</b>	Vel. de Agit. (rpm)	180-960	≈ 130
<b>Teste de longa duração</b>	Pressão (kPa)	49-392	49
	Estado	Nova/Usada	-
	Tempo (min.)	5-395	30

#### 4.4.5 Determinação da rejeição da melitina e fosfolipase A<sub>2</sub>

O estudo foi conduzido na célula de agitação com as membranas previamente lavadas, conforme o item 4.3, em triplicata, temperatura ambiente, 25 °C, pressão e velocidade mantidas constantes a 220 kPa e 750 rpm. Foram realizados dois experimentos, um utilizando uma solução de apitoxina de 1 g/L com uma única etapa de ultrafiltração.

O outro experimento foi realizado com uma solução de apitoxina com concentração inicial de 50 g/L, onde foram feitas 5 ultrafiltrações em uma mesma amostra de apitoxina. Em cada ultrafiltração, o produto retido era ressuspensionado em água Milli-Q em um mesmo volume do seu respectivo permeado. Estes apresentaram os valores expostos na Tabela 4:

Tabela 4 – Valores das massas dos permeados da apitoxina após a ultrafiltração.

Ultrafiltração	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta	Quinta
Massa	8,3 g	8,4 g	8,6 g	8,8 g	9,0 g

Os testes foram realizados em triplicata, em temperatura ambiente, 25 °C, e a pressão foi mantida em 225 kPa.

Para o cálculo do coeficiente de rejeição, foram identificadas e quantificadas as espécies de interesse tanto na alimentação quanto no permeado. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada na identificação e determinação da concentração de melitina e fosfolipase A<sub>2</sub> na amostra de apitoxina.

Também foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio para avaliar a presença ou ausência destes componentes.

Os principais componentes da apitoxina tiveram sua rejeição (R) calculada de acordo com a Equação 18.

$$R(\%) = \left[ 1 - \frac{C_p}{C_A} \right] \times 100\% \quad (18)$$

Onde C<sub>p</sub> e C<sub>A</sub> são as concentrações da substância no permeado e na solução de alimentação, respectivamente.

## 4.5 Caracterização do Produto

### 4.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para análise dos componentes do veneno e do permeado foi utilizada a técnica de eletroforese tris-tricina com gel 16% de poliacrilamida. As amostras aplicadas ficaram sujeitas à eletroforese a 180 V (volts), 70 ampères, por duas horas.

Foram aplicados aproximadamente 40µg de proteína das amostras testadas e foi utilizado um padrão de eletroforese de baixa massa molecular (Sigma-Aldrich) M3546, lote #SLBK3308V, com os seguintes tamanhos em Dalton: 1.060; 3.496; 6.500; 14.200; 17.000 e 26.600.

Também foi utilizado o padrão melitina e fosfolipase A<sub>2</sub> da Sigma-Aldrich. Todas as amostras e padrões foram preparados utilizando o tampão de amostra Sigma-Aldrich. O gel foi revelado em corante *comassie blue* por uma hora.

### 4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

Na cromatografia foi utilizada acetonitrila (Merck, Lote I631830212, pureza 99,9%), ácido fosfórico (J.T.Baker, 7664-38-2, pureza 86,2), bem como coluna cromatográfica – C18 Waters® de 4,6 mm de diâmetro, 100 mm de comprimento, tamanho de partícula de 5 µm (Waters® USA), além dos padrões melitina M4171 lote #032M4780V (Sigma-Aldrich) e fosfolipase A<sub>2</sub> de veneno de abelhas P9279 lote #073M4009V (Sigma-Aldrich).

Foi realizada cromatografia líquida de fase reversa para detecção e quantificação dos peptídeos melitina e fosfolipase A<sub>2</sub> com as seguintes condições de operação: acetonitrila como eluente A e solução aquosa de ácido fosfórico 0,4% como eluente B, com os gradientes de eluição de B: 95-48% em 15 minutos, 48-20% em 5 minutos e 20-0% em 5 minutos, nessa sequência. O volume de amostra aplicada foi de 100 µL. O comprimento de onda do detector foi de 220 nm (HAGHI *et al*, 2013).

As amostras foram ultrafiltradas em temperatura ambiente, 25 °C, pressão de 225 kPa e velocidade de agitação de 750 rpm.

A concentração dos dois peptídeos foi determinada a partir das curvas analíticas da Equação **19** para a melitina e **20** para a fosfolipase A<sub>2</sub>, que foram construídas com base nos resultados da área da curva (y) em mAU.mL de concentrações (x) conhecidas (0; 0,025; 0,5; 0,075; 0,1; 0,125 e 0,15 g/L<sup>-1</sup>). Foram feitas análises da amostra da apitoxina solubilizada em água ultrafiltrada.

$$y_m = 1290,4x_m - 5,0245 \quad (19)$$

$$y_f = 1132,1x_f - 19,651 \quad (20)$$

#### 4.5.3 Dosagem atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>

Uma gema de ovo sem a pele foi homogeneizada em 100 mL de solução salina 0,9% NaCl (suspensão estoque). Essa solução estoque foi diluída 10 vezes em solução salina 0,9% (suspensão de uso).

Foram adicionados 1 mL da suspensão de uso e 4,9 mL de salina 0,9% em um tubo de ensaio. Este foi colocado em banho maria a 41°C por 5 minutos e então determinada sua absorvância em espectrofotômetro UV-visível (Pharmacia LKB-Ultrospec III) a 900 nm.

Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de amostra na concentração de 1mg/mL em PBS 0,01%, solução com pH ajustado para 7 e composta por NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O. Foram efetuadas medidas nos tempos 0, 5, 10 e 15 minutos.

#### 4.5.4 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa foi realizada no equipamento BRUKER autofles III TOF/TOF 200. Foram aplicados 0,5µL das amostras e da matriz contendo padrão de calibração de peptídeo de 1000 a 4000 Da (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha, lote 11.206195.350001) e padrão de calibração de proteínas I de 3000 a 25.000 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha, lote 09.206355.384001) em poços da placa do equipamento.

A placa, depois de seca, foi colocada dentro do equipamento e este emitiu um laser que pulverizou a matriz liberando a amostra.

As moléculas se moveram em virtude de suas diferenças de potencial e suas massas foram analisadas de acordo com o tempo que levaram para percorrer um determinado percurso (tempo de voo). O controle de instrumentos, aquisição e processamento de dados foram realizados com o *software Flex Control 3.3*.

#### **4.6 Tratamento Estatístico das Curvas Padrões**

Foram construídas curvas padrões para determinar a massa de dextrana, melitina e fosfolipase A<sub>2</sub> para os experimentos de rejeição. Essas curvas foram avaliadas nos seguintes testes: se os dados obedeceram à curva normal (teste de Ryan-Joiner) apresentando o p-valor acima de 0,05. Se a variâncias dos resíduos não ficaram diferentes (teste de Brown-Forsythe). Também verificado se não ocorreu desvio de linearidade (ANOVA) entre as comparações das análises e sem autocorrelação (teste de Durbin-Watson). Também se houve homocedasticidade, isto é, homogeneidade da variância dos resíduos (teste de Levene). A exclusão de *outliers* foi realizada utilizando o teste do resíduo padronizado Jackknife e não ultrapassando 22,2% de exclusões (HORWITZ, 1995). As curvas padrões e tratamentos estatísticos foram efetuados utilizando o programa Microsoft Excel<sup>®</sup> versão 2013.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apitoxina apresentou-se na forma de pó e seu valor de umidade foi de 11,49% com desvio padrão de 0,113%. O laudo de análise completo está presente no Anexo A. Esse valor ficou acima do limite preconizado pela Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 200, máximo 3% (BRASIL, 2001). Portanto, os cálculos das massas de apitoxina nos testes realizados neste trabalho levaram e conta a diferença no valor de umidade.

### 5.1 Caracterização da membrana

#### 5.1.1 Determinação da permeabilidade hidráulica das membranas

Foram realizados ensaios com as membranas utilizando água Milli-Q com o propósito de avaliar sua integridade, permeabilidade e resistência mecânica (compactação das membranas). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 8.

Os pontos apresentaram um comportamento linear, com um valor de  $R^2$  elevado. Com o valor obtido para a inclinação da reta, foi possível determinar a permeabilidade hidráulica da membrana ( $L_p$ ), igual a  $0,4259 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ .

Comparando este resultado com o valor de permeabilidade hidráulica apresentado na Tabela 2 convertido para Pascal,  $0,609 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ , observa-se que o valor encontrado é de aproximadamente 70% do valor apresentado pelo fornecedor. Tal diferença pode ser explicada pela variabilidade do processo de produção das membranas e aponta para uma necessidade em se caracterizar a membrana que será utilizada nos processos de purificação e produção de produtos biológicos de interesse farmacêutico.

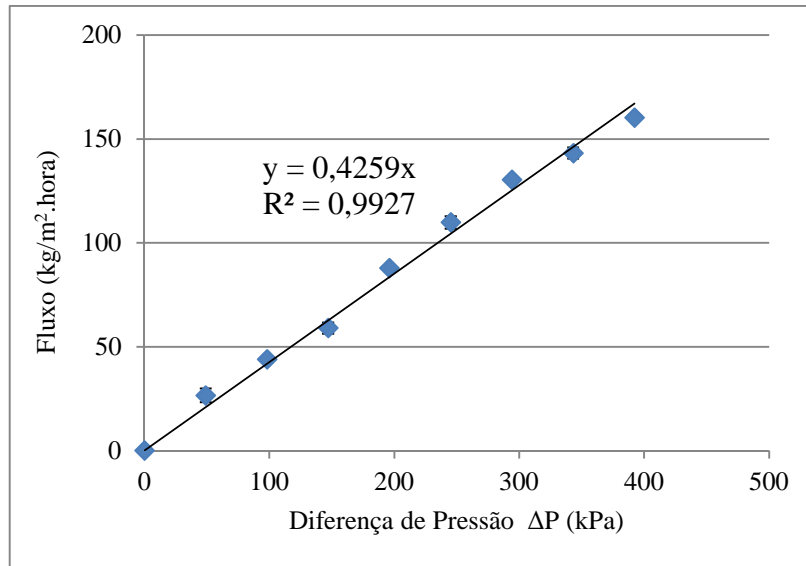


Figura 08 – Teste de permeabilidade hidráulica realizado na membrana de celulose regenerada, massa molar de corte de 10 kDa, com água purificada, a 25 °C. Foram medidos 18 pontos, 6 níveis com 3 réplicas por nível.

### 5.1.2 Fisissorção de N<sub>2</sub>

Os resultados obtidos para a distribuição de tamanho de poros são apresentados na Figura 9, que descreve a curva do diâmetro do poro em função do volume do poro da pele da membrana seca, utilizando a técnica de fisissorção de N<sub>2</sub>. Observou-se que a membrana analisada apresentou uma distribuição de diâmetros de poros de 3,7 a 124 nm. A amostra analisada apresentou uma área superficial de 30 m<sup>2</sup>/g, com 0,212 cm<sup>3</sup>/g de volume de poro e 22,141 nm de diâmetro médio de poro. O laudo de análise completo está presente no Anexo B.

Segundo a Sociedade Europeia de Membranas (EMS), as membranas de ultrafiltração possuem poros com diâmetros de 2 a 50nm (KOOPS, 1995), portanto a variação do diâmetro de poros da membrana analisada estava acima deste valor. Já o valor médio da distribuição de poros ficou abaixo da metade desta faixa, valor esperado uma vez que se trata de membranas com baixo valor *cut off*.

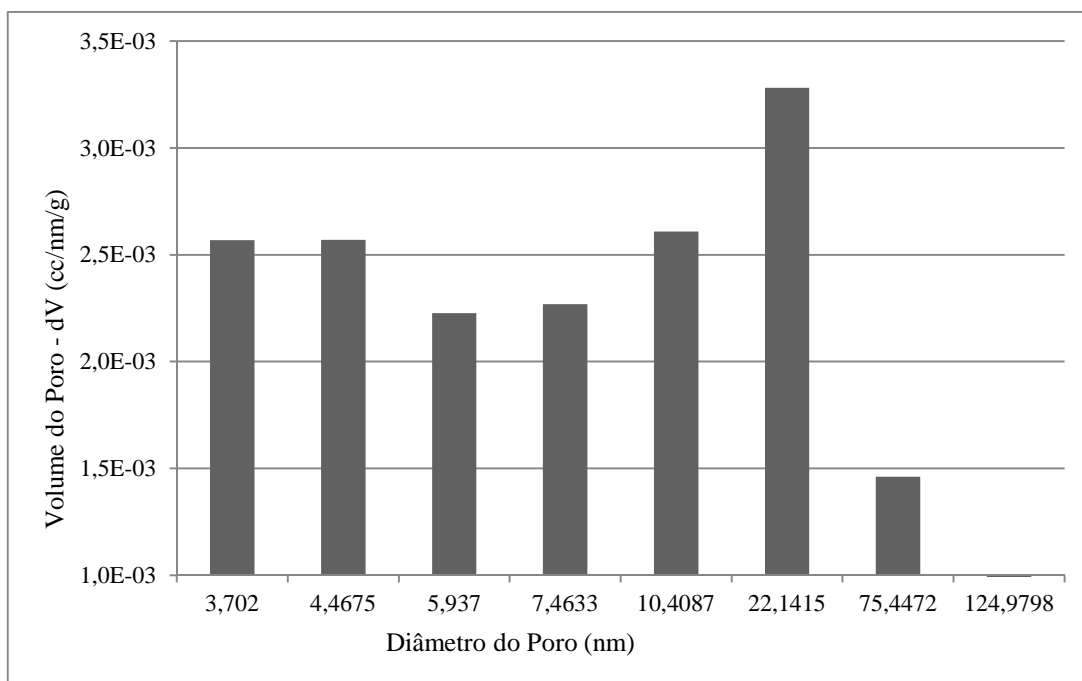


Figura 09 – Resultado da distribuição de tamanho de poros, de acordo com o teste fisissorção de N<sub>2</sub>.

### 5.1.3 Microscopia eletrônica de varredura, MEV

As imagens de MEV da superfície da pele das membranas não mostraram poros, conforme Figura 10, mesmo utilizando ampliações diferentes. É possível que tenha havido um fechamento dos poros na superfície da membrana pelo efeito da tensão superficial. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que a membrana, após seca, pode ter sido exposta à umidade do ar, o que foi suficiente para promover a contração dos poros, levando a um aumento da densidade da estrutura.

As estrias observadas na Figura 10, com ampliação de 50.000x, podem ter surgido após a secagem da membrana, após a retirada da glicerina, conforme metodologia de preparo da membrana e/ou durante o processo de metalização pelo ouro, onde suas partículas podem ter aglomerado, não formando uma película homogênea.



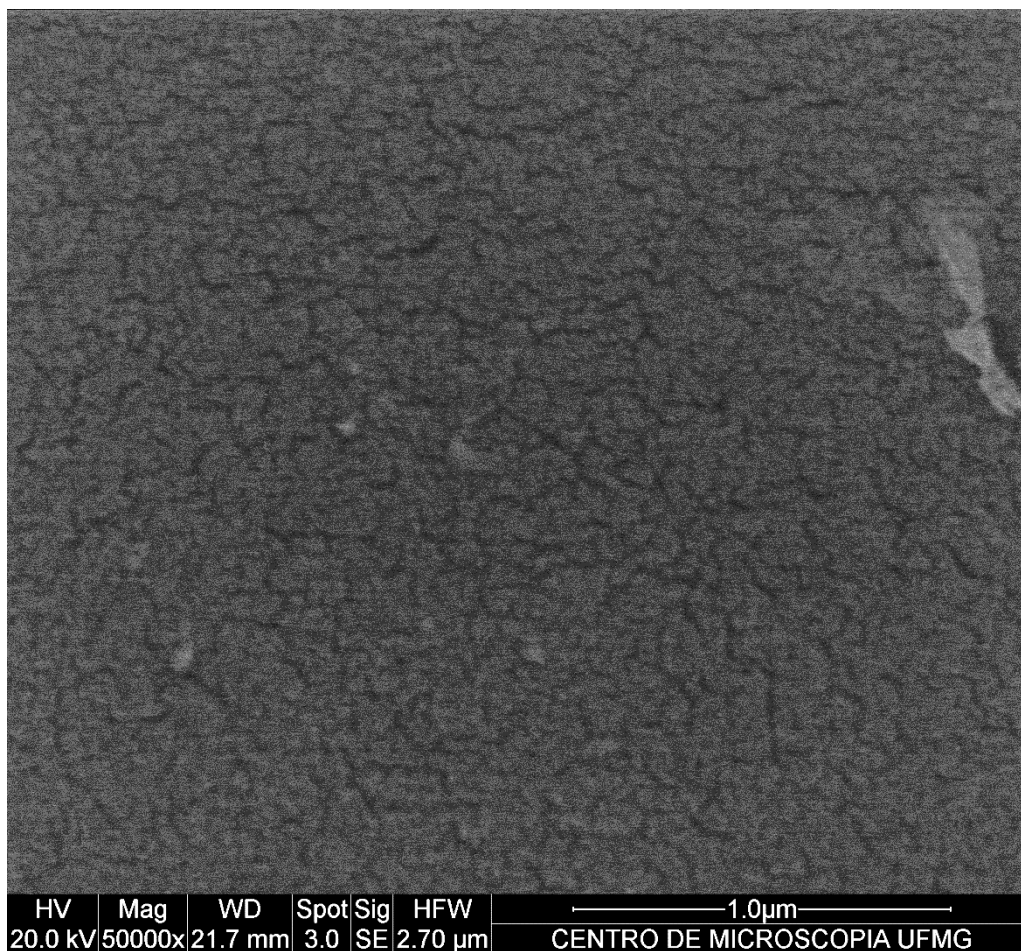


Figura 10 – Imagens da pele da membrana Millipore® de celulose regenerada obtidas por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 50.000 vezes.

As imagens de corte transversal apresentaram bons resultados se comparadas com as imagens da superfície das membranas, uma vez em que nessas foi possível visualizar os poros da pele da membrana. Nas ampliações de 1.000 e 2.500 vezes, Figuras 11 e 12 respectivamente, a espessura da pele e a junção da pele com a camada de suporte é mais visível.

A pele apresentou um valor de aproximadamente 50μm de espessura, conforme determinado pelo *software* IMAGE J. Ainda na Figura 13, podem ser vistas pequenas estrias em todas as imagens que provavelmente surgiram pelo processo de criofratura durante a preparação da amostra e/ou da própria porosidade da membrana.

Também é possível distinguir a pele da camada de suporte, o que permite classificar a membrana como anisotrópica.

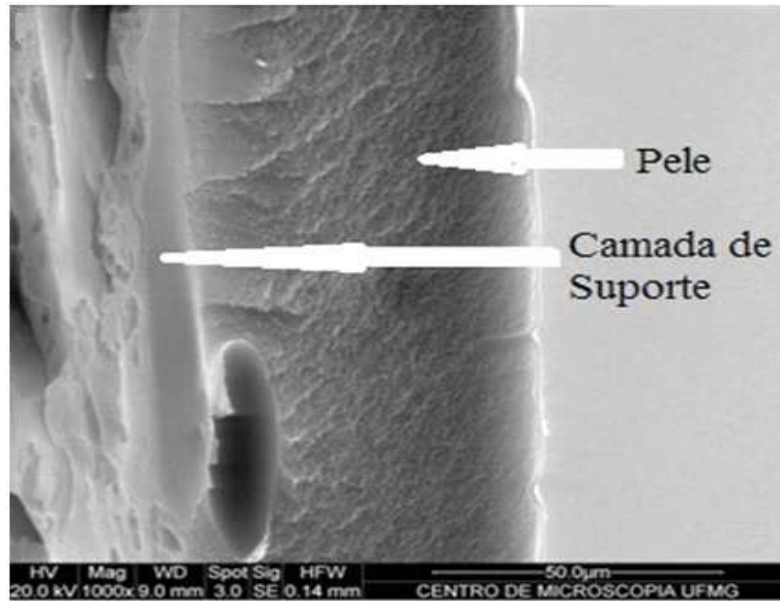


Figura 11 – Imagens da seção transversal da membrana Millipore® de celulose regenerada obtida por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 1.000 vezes.

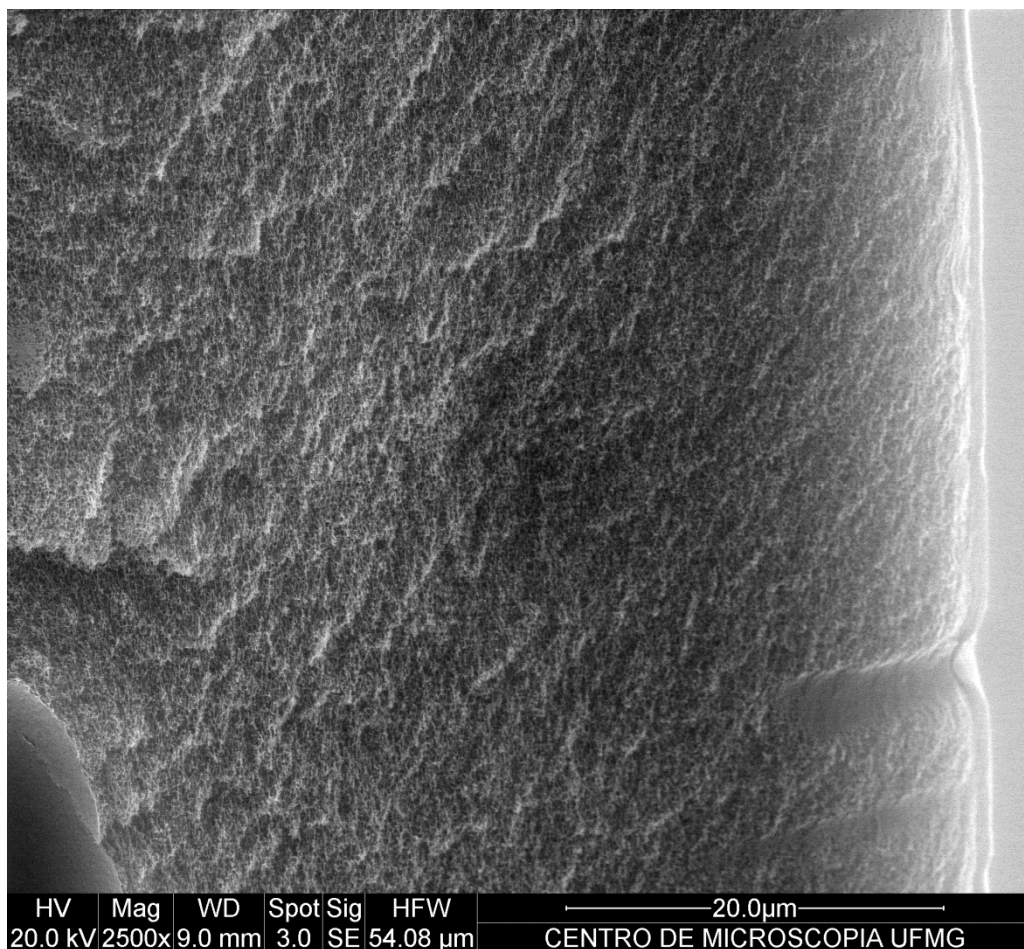


Figura 12 – Imagens da seção transversal da membrana Millipore® de celulose regenerada obtida por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 2.500 vezes.

Como as membranas são comercializadas com uma camada de glicerina, este glicerol foi retirado com água purificada, durante a preparação da amostra e a membrana passou por uma troca sucessiva de solventes com polaridades decrescentes para que as fibras tivessem sua polaridade reduzida e assim evitar o efeito de tensão superficial, que poderia levar ao fechamento dos poros.

Após seca, a superfície da membrana que estava em contato com o ar pode ter sofrido com esse efeito, uma vez que as moléculas de água e de gases tais como nitrogênio e oxigênio podem ter sido adsorvidas pelas fibras da superfície da membrana e, devido à tensão superficial, provocaram o colapso dos poros. Isso explica o possível fechamento dos poros presentes na superfície da membrana e pode ter ocorrido como a membrana analisada.

A secagem é um ponto que necessita de extrema atenção e cuidado para manter a qualidade das membranas após o uso, uma vez que leva a redução da capacidade de ultrafiltração da membrana, se tratando de membranas reutilizadas, comprometendo a qualidade e desempenho do processo de ultrafiltração.

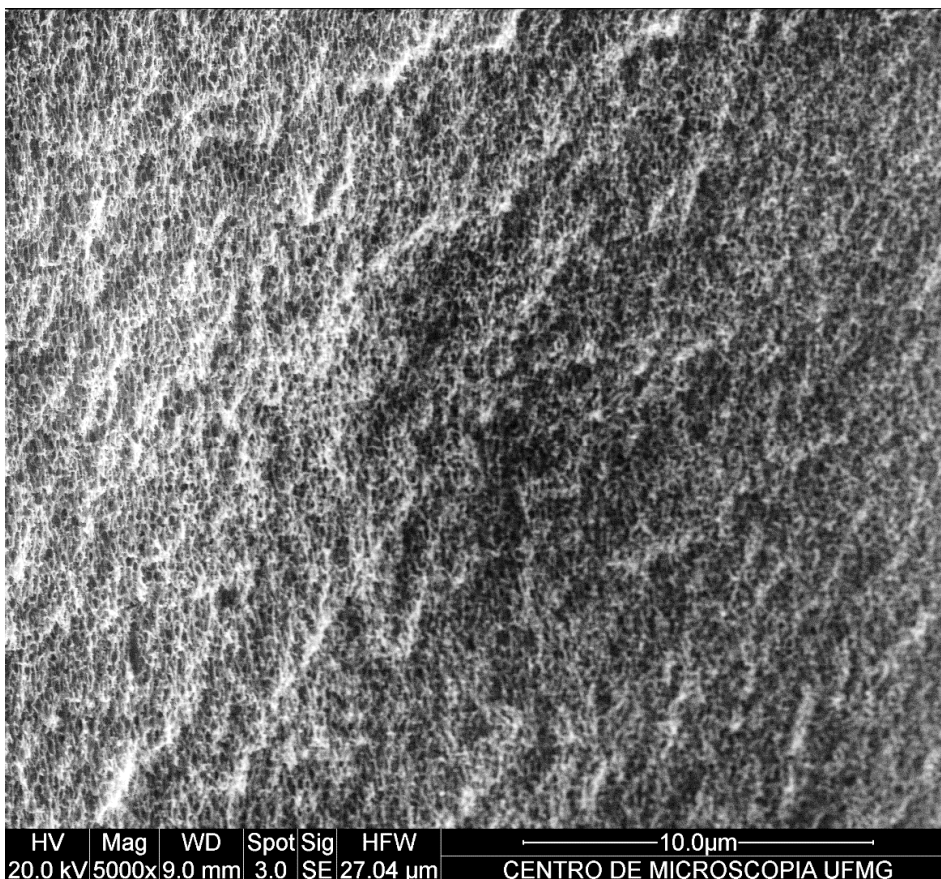


Figura 13 – Imagens da análise da pele em seção transversal da membrana Millipore® de celulose regenerada obtida por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 5.000 vezes.

Os poros da seção transversal da pele foram visualizados com mais detalhes nas Figura 13, 14 e 15 onde foram feitas imagens com ampliações de 5.000, 30.000 e 50.000 vezes. A Figura 14 apresentou estrias que podem ser devidas à criofratura. Nas Figuras 14 e 15 os poros e a matriz já podem ser vistos e se apresentam como uma estrutura irregular e esponjosa.

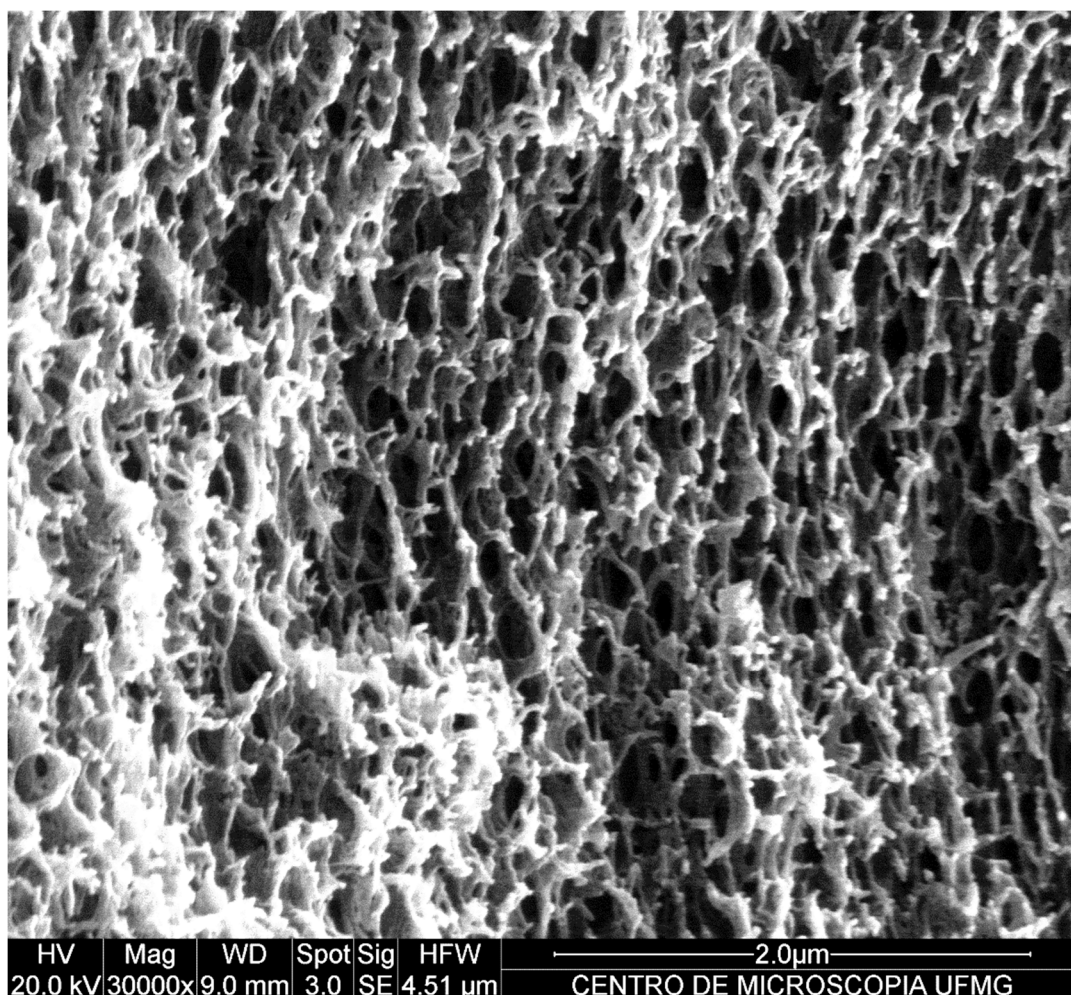


Figura 14 – Imagens da análise da pele em seção transversal da membrana Millipore® de celulose regenerada obtida por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 30.000 vezes.

Na Figuras 15, a matriz da pele pode ser vista com uma estrutura amorfa e formando poros irregulares. Nela pode ser visto indicados em círculos vermelhos poros de 10 nm, círculos azuis de 22nm e círculos roxos poros com diâmetro de 75nm.

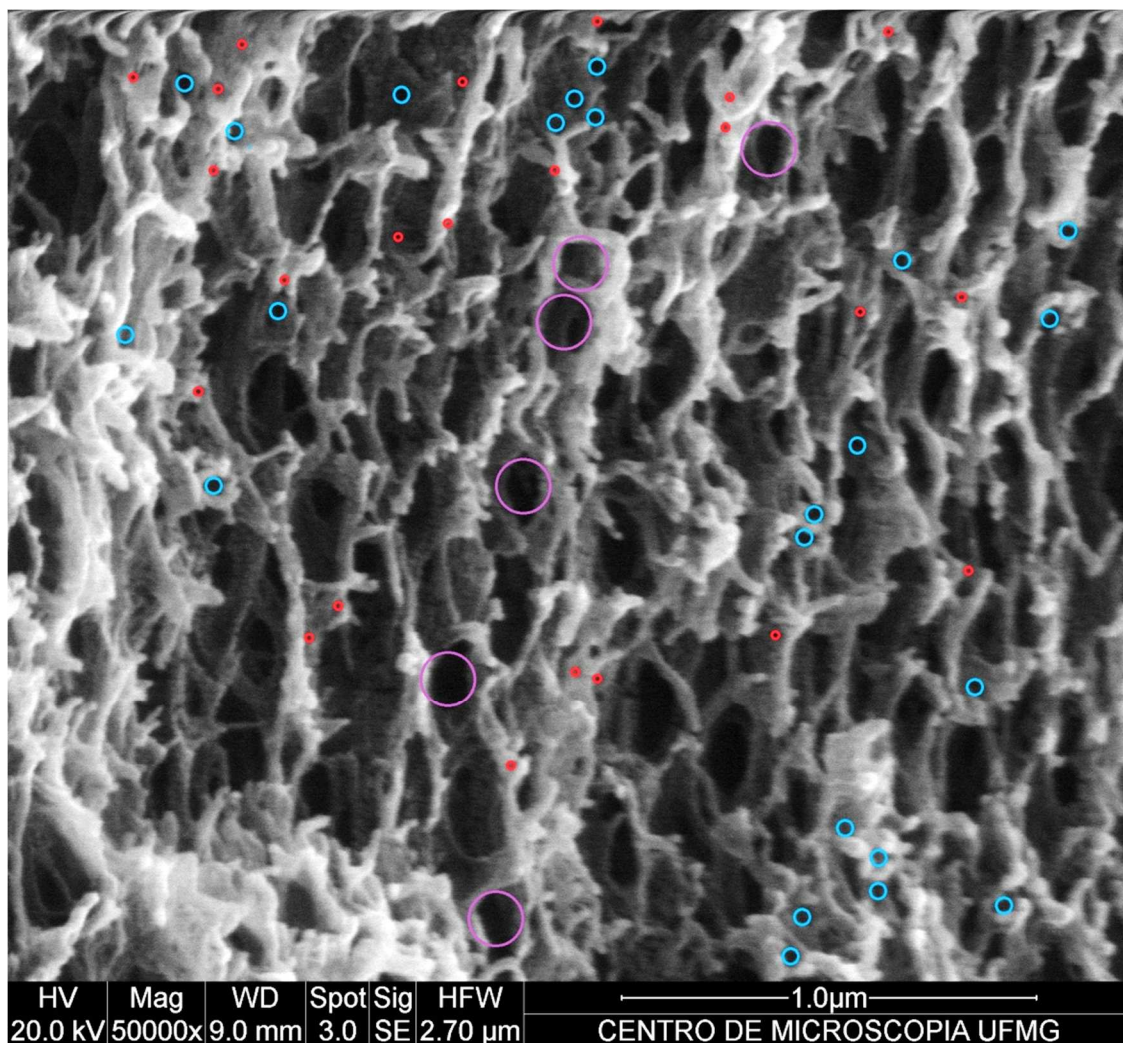


Figura 15 – Imagens da análise da pele em seção transversal da membrana Millipore® de celulose regenerada obtida por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 50.000 vezes. Os círculos vermelhos apontam para poros de aproximadamente 10 nm, os azuis 22 nm e os roxos 75 nm.

#### 5.1.4 Experimento de rejeição – MWCO

Para o teste de rejeição onde se utilizou a dextrana, quantificada pela técnica do ácido sulfúrico concentrado e espectroscopia no ultravioleta. A curva padrão está apresentada na Figura 16. O seu tratamento estatístico e está detalhado nos Anexo C.

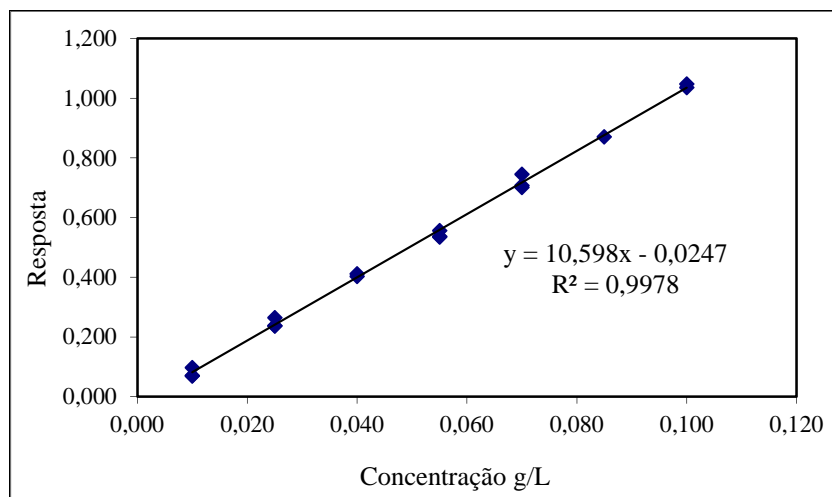


Figura 16 – Curva padrão da Dextrana de massa 10 kDa medida em espectrofotômetro utilizando a técnica do ácido sulfúrico concentrado.

No teste de rejeição da dextrana, o permeado apresentou uma concentração de 0,023 g/L com desvio de 0,0056g/L de dextrana. Isso representa uma taxa de rejeição de 77% para a dextrana de massa molar 10 kDa.

Segundo dados do manual da membrana, Tabela 2, a retenção da dextrana de até 5 kDa é de 90% para a membrana em questão (MILLIPORE, 2008).

Uma vez que foi utilizada uma dextrana com uma massa molar maior e foi obtida uma retenção menor do que a padronizada no manual e com uma massa molar menor, o resultado indicou uma grande variabilidade quanto ao tamanho de poros para essa membrana, e indica a necessidade de que se realize testes para avaliar e certificar os parâmetros oferecidos pelo fabricante da membrana.

## 5.2 Determinação das propriedades de transporte das membranas

### 5.2.1 Estudo do efeito da pressão de operação

O fluxo permeado foi avaliado em função da alteração da diferença de pressão e para isso foram utilizadas três soluções com diferentes concentrações da apitoxina, 50g/L, 30g/L e 10g/L, Figura 17. Em todos os casos, observou-se que o aumento da diferença de pressão entre a alimentação e o permeado promoveu um aumento do fluxo, seguida por uma estabilização do mesmo.

Não foi detectado efeito da compactação na membrana até o limite de 400 kPa, uma vez que os valores do fluxo encontrados nestas pressões não variaram de forma significativa aos valores encontrados na permeabilidade hidráulica.

Neste ponto, conhecido como pressão de processo, aumentos na pressão não levarão ao aumento do fluxo através da membrana. Isso pode ser explicado pelo fato de que o fluxo convectivo através da membrana é compensado pelo fluxo difusivo do soluto, devido à polarização de concentração.

A solução com menor concentração de apitoxina apresentou maiores valores de fluxo permeado do que as demais, o que era esperado uma vez que o aumento na concentração de alimentação provoca um aumento na polarização de concentração a que a membrana está submetida, reduzindo assim o fluxo. Já a solução com maior concentração de apitoxina apresentou um menor fluxo de permeado para as mesmas diferenças de pressão, conforme esperado.

Para a concentração de 30 g/L, o valor de  $\Delta P$  se estabilizou a uma pressão de 315 kPa. Esta estabilização se deu no momento em que o fluxo convectivo se igualou com o difusivo. Portanto, os demais testes utilizando ultrafiltração foram executados a uma pressão de 220 kPa o que representa um valor de 70% do maior valor de  $\Delta P$  encontrado.

As curvas da Figura 17 se assemelham com a curva de solução de macromoléculas apresentada na Figura 05, onde os valores de fluxo elevam mais rapidamente com o aumento dos primeiros valores de pressão, porém tendem a atingir um ponto máximo e isto é devido ao efeito de polarização de concentração (BAKER, 2012).

Experimentos de permeação em membranas de ultrafiltração de 10 kDa com soro do leite e com velocidade de alimentação de 0,47 m/s apresentaram um valor de fluxo máximo abaixo de 40 L/m<sup>2</sup>.h (MARCEDO, *et al.*, 2011), valor este que próximo do encontrado com experimento com apitoxina de maior concentração, 50 g/L.

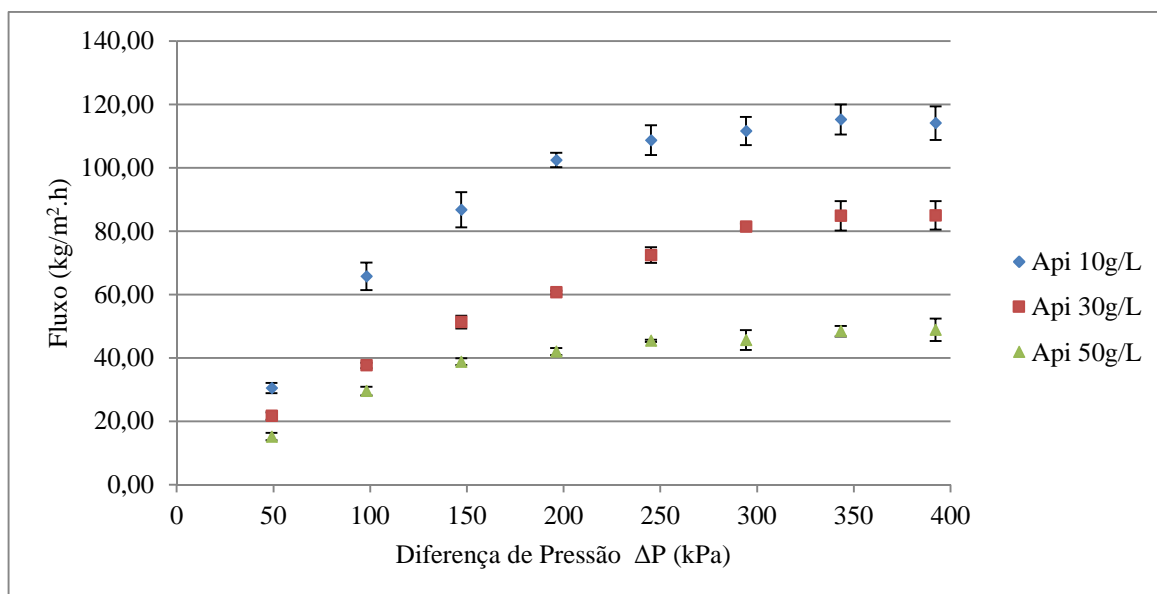


Figura 17 – Fluxo de permeado de apitoxina nas concentrações de 10, 30 e 50 mg/mL em função da diferença de pressão realizado em membrana de celulose regenerada, massa molar de corte de 10 kDa e velocidade de 750 rpm.

### 5.2.2 Avaliação do efeito do aumento da concentração na alimentação

Com o aumento da concentração de apitoxina na alimentação, tem-se a redução do fluxo de permeado, mantendo constantes a pressão e a velocidade de agitação, conforme exposto na Figura 18 Isto era esperado uma vez que o fluxo do permeado em um sistema com polarização de concentração é a diferença entre o fluxo convectivo do solvente no sentido de atravessar a membrana e o fluxo difusivo do soluto em direção ao seio da solução.

Como o fluxo convectivo é mantido constante e o difusivo aumenta à medida que a concentração de apitoxina aumenta, Equação 3, observa-se uma redução do fluxo de permeado. A tendência de queda do fluxo com o aumento da concentração é bastante definida pela Figura 18. Os pontos de concentração 35, 40, 45 e 50 g/L apresentaram um maior valor de desvio padrão, de acordo com as variações locais da diferença de concentração entre o seio da solução e a interface alimentação/membrana.



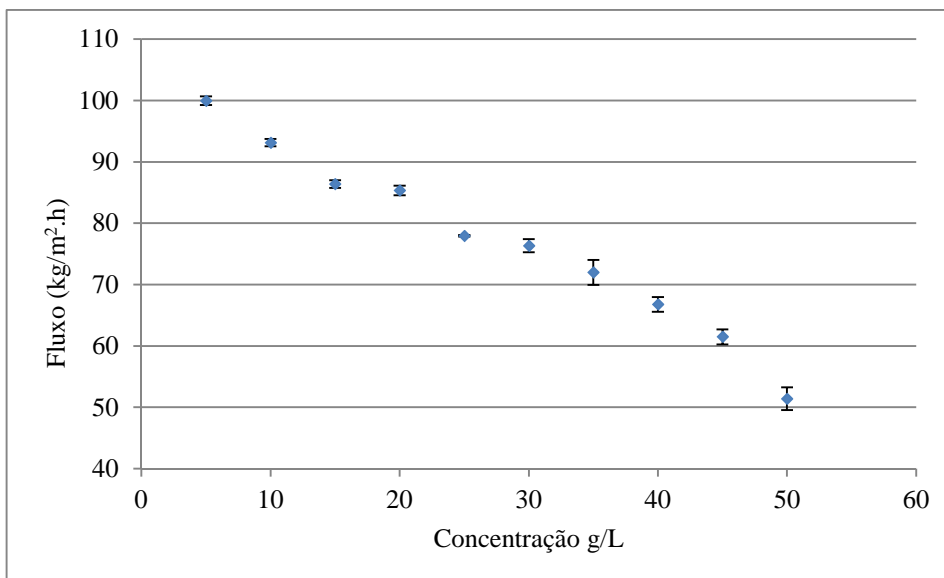


Figura 18 – Fluxo permeado em função das concentrações de apitoxina, membrana de celulose regenerada 10 kDa, com  $\Delta P$  de 220 kPa, velocidade de 750 rpm.

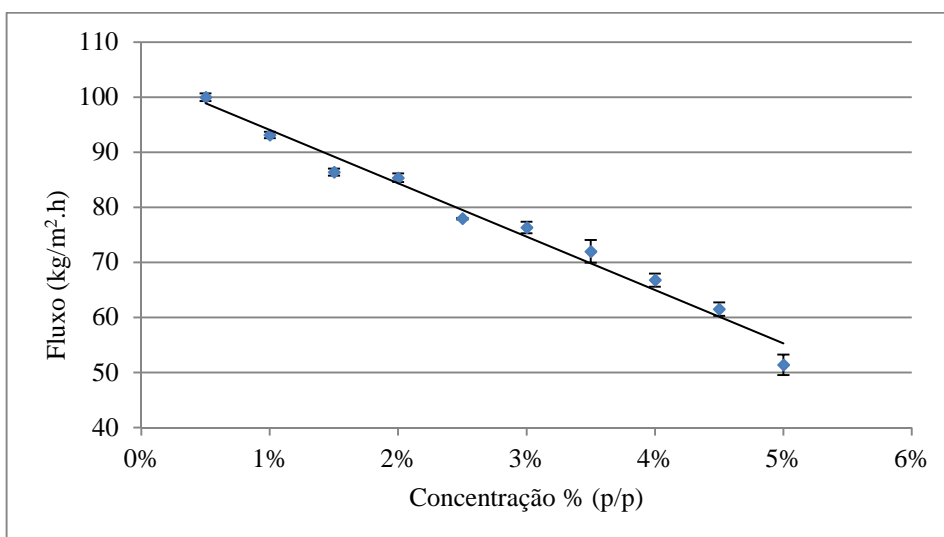


Figura 19 – Fluxo permeado em função das concentrações de apitoxina em massa percentual utilizando membrana de celulose regenerada 10 kDa, com  $\Delta P$  de 220 kPa, velocidade de 750 rpm. Equação da reta

$$Y_{m\%} = -968,06x_F + 103,69 \quad (21)$$

Extrapolando o valor do fluxo para zero na Equação 19,  $R^2$  0,9791, se obtém o valor 10,71% (p/p) que representa a concentração na camada gel, Figura 19. Considerando a concentração na alimentação da apitoxina em 5% foi calculado o valor do coeficiente de transferência de massa da apitoxina de 0,03 m/s a um  $\Delta P$  de 220 kPa, velocidade de 750 rpm, em temperatura ambiente e utilizando a Equação 14.

### 5.2.3 Caracterização das condições hidrodinâmicas

A velocidade de rotação da solução na célula de permeação impactou diretamente sobre o fluxo de permeado, conforme pode ser visualizado na Figura 20. Observou-se que o aumento da velocidade de rotação provocou um aumento no fluxo, conforme esperado. Este resultado evidencia que o aumento da velocidade de rotação promove uma redução da espessura da camada polarizada,  $\delta$ , uma vez que aumentou a turbulência do fluido no filme, diminuindo consequentemente a extensão da polarização de concentração (BAKER, 2012). Desta forma, foi verificado que um aumento na velocidade de rotação de 180 para 960 aumentou o fluxo permeado em mais de 100%.

Para velocidade de rotação acima de 750 rpm, observou-se a formação de grande quantidade de espuma dentro da célula de permeação Amicon<sup>®</sup>, uma vez que a proteína tem características surfactantes, com regiões polares e apolares, o que favoreceu a entrada de ar no sistema, com estabilização das bolhas, especialmente com a agitação em altas taxas.

Nessas elevadas velocidades, a mangueira do permeado apresentou a presença de bolhas, o que contribuiu para o valor mais elevado do desvio para os pontos com velocidade acima de 750 rpm.

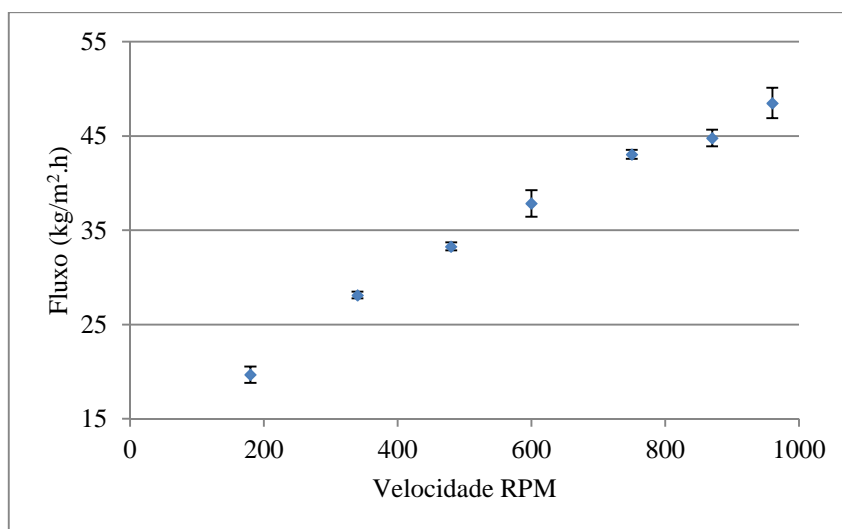


Figura 20 – Fluxos de permeado em função da velocidade rotacional da célula de agitação realizado em membrana de celulose regenerada 10 kDa, com  $\Delta P$  de 220 kPa, concentração de alimentação de 30 g/L da apitoxina.

#### 5.2.4 Teste de longa duração

O estudo da robustez da membrana foi realizado simulando um processo contínuo de uso. Na Figura 21 são apresentados os valores de fluxo de água pura de uma membrana nova e outra usada em função da diferença de pressão aplicada. Observou-se que o valor da permeabilidade hidráulica em função da diferença de pressão reduziu aproximadamente 27% com um desvio padrão de 10%, para a condição de 400 kPa. Os pontos com o maior valor da pressão foram os que apresentaram uma maior diferença dos valores. Uma vez que a queda da permeabilidade foi pequena é possível que tenha ocorrido o processo de adsorção de peptídeos e outros componentes orgânicos presentes na apitoxina. Assim, levando a uma baixa redução da permeabilidade hidráulica da membrana.

Os valores dos desvios padrões dos pontos foram pequenos e somente ponto da membrana usada com valor de fluxo de 24,71 kg/m<sup>2</sup>.h não acompanhou a proporcionalidade de crescimento dos demais pontos.

A Figura 22 mostra um gráfico onde o fluxo permeado da solução aquosa de apitoxina 30 g/L apresenta uma redução com o tempo durante o processo de ultrafiltração. Uma vez que o experimento aconteceu em um maior tempo, a membrana pode ter sido um adsorvente para as proteínas presentes em solução e, portanto, o seu fluxo de apitoxina permeada foi reduzindo durante o tempo, tendo a maior taxa de redução nos primeiros 100 minutos de uso.

Este comportamento é típico de um sistema onde a polarização de concentração está ocorrendo, mas não a incrustação, já que o fluxo permeado estabilizou em torno de 300 min. Caso estivesse havendo sempre redução progressiva do fluxo, a incrustação da membrana estaria caracterizada (HABERT *et al.*, 2006).

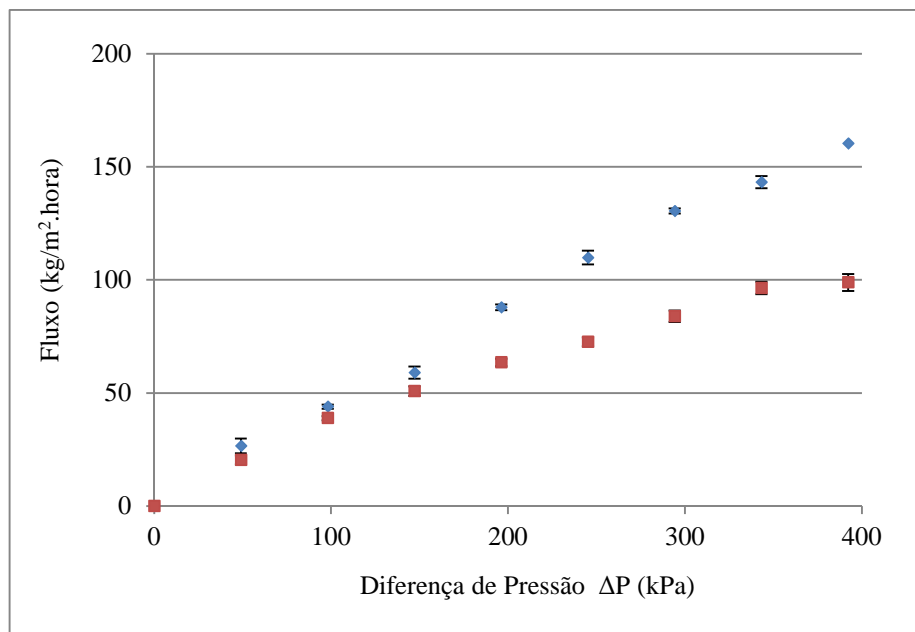


Figura 21 – Fluxos de água Milli-Q em função da pressão, realizado em membrana de celulose regenerada 10 kDa, com velocidade 750 rpm, de 220 kPa. Membrana usada, quadrado vermelho, foi utilizada por 400 minutos, solução de alimentação com concentração de 30 g/L da apitoxina. Membrana nova está representada pelo losango azul.

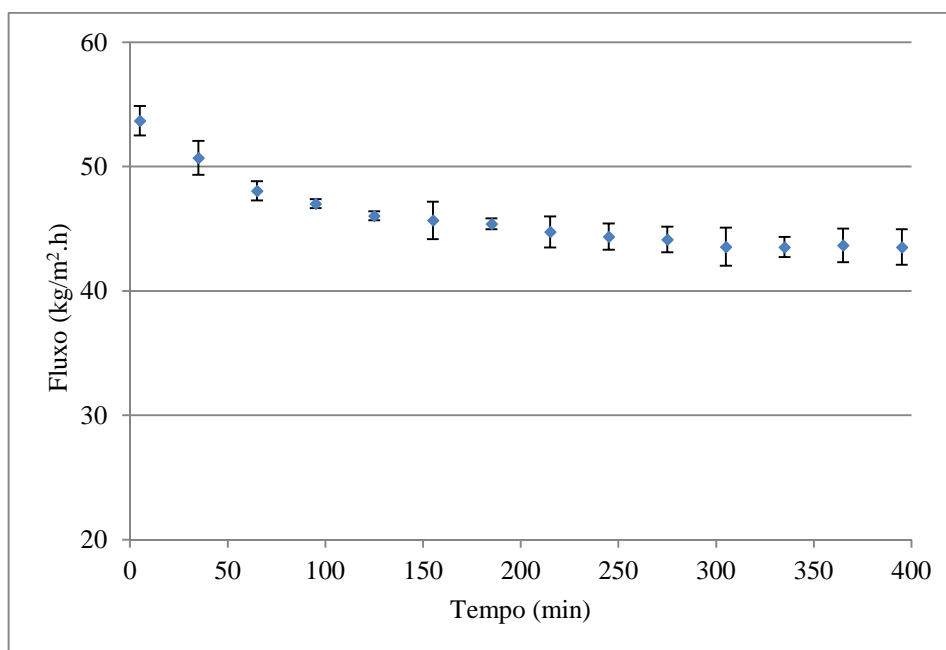


Figura 22 – Variação do fluxo de permeado da solução aquosa de apitoxina 30 g/L em função do tempo, realizado em membrana de celulose regenerada 10 kDa, com velocidade 750 rpm, de 220 kPa. Onze dos quatorze níveis apresentaram elevado desvio em suas triplicatas.

## 5.3 Caracterização do Produto

### 5.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para avaliação tanto do veneno quanto do produto permeado e retido da ultrafiltração foi feita uma eletroforese, conforme apresentado na Figura 23. Nesse resultado, observa-se a retenção significativa das bandas I, II, III e IV, correspondentes às proteínas que possuem maiores massas moleculares. Desta forma, foi possível verificar que as proteínas de maior massa molar foram retidas pela membrana de ultrafiltração. As bandas V e VI foram observadas tanto no permeado quanto no retido (concentrado), o que indica que estas proteínas permearam pela membrana, mas uma quantidade significativa permaneceu retida. A banda VII apareceu apenas no permeado, indicando que ela apresentou baixa retenção na membrana.

Uma vez que para a eletroforese em gel da Figura 23 não foram utilizados padrões de massa molar conhecida, não foi possível estimar os valores de massa molar das respectivas bandas, apenas a presença ou ausência de determinadas bandas no veneno, permeado e retido.

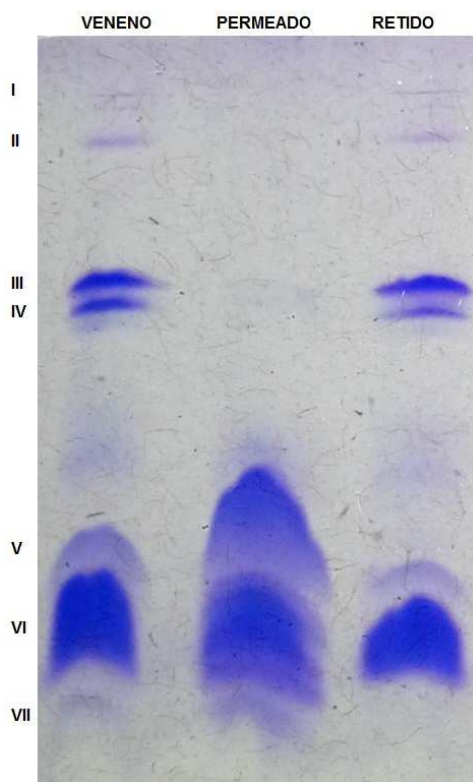


Figura 23 – Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 16%, tampão de corrida tris-tricina, 180 V e 40 A. Aplicado 40 µg de amostras do veneno bruto, do permeado e do retido da ultrafiltração. Sem a presença de padrões.

No estudo de rejeição da melitina e fosfolipase A<sub>2</sub>, observou-se que no permeado na primeira ultrafiltração, Figura 24, apareceu uma banda com massa ligeiramente acima do valor de 1,060 kDa podendo representar a apamina e/ou peptídeo MCD bem como outra banda próximo de 17 kDa sendo esta provavelmente a fosfolipase A<sub>2</sub>.

Na segunda, além das bandas vistas no primeiro, uma banda entre 1,060 kDa e 3,496 kDa foi detectada, sendo esta possivelmente a melitina. Essa banda aumentou de intensidade na terceira e quarta ultrafiltração e a banda para a fosfolipase A<sub>2</sub> reduziu a intensidade.

Isso aponta que fosfolipase ficou mais presente nos produtos permeados da primeira e na segunda ultrafiltração. Os peptídeos menores ficaram mais concentrados nos permeados da primeira, com exceção da melitina que teve sua concentração aumentada partir da segunda ultrafiltração.

Como a melitina forma uma estrutura tetrâmera estável e ela se rompe com a redução da concentração de proteínas presentes na solução, à medida que o produto retido foi sendo diluído, uma maior quantidade de melitina teve a cinética favorecida para a melitina livre e, portanto, permeou pela membrana.

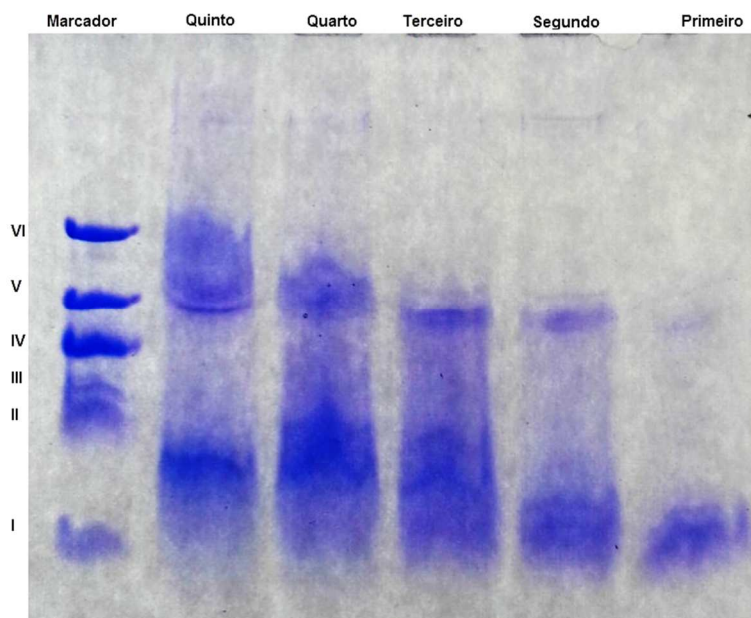


Figura 24 – Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 16%, tampão de corrida tris-tricina, 180V e 40 A. Foi utilizado marcador com as seguintes massas moleculares: 1,060 kDa (I); 3,496 kDa (II); 6,5 kDa (III); 14,2 kDa (IV); 17 kDa (V); 26,6 kDa (VI). Aplicado 20 µL de amostras do permeado da apitoxina: Primeira, Segunda, Terceira, Quarta e Quinta ultrafiltração.

A fosfolipase A<sub>2</sub> pode ter tido sua conformação secundária e terciária alteradas por estar solução aquosa, perdendo suas ligações dissulfeto. Assim, deixou de ser uma estrutura globular e mudou para uma estrutura linear e assim passou com maior facilidade pela membrana, conforme ilustrado na Figura 25. Esta hipótese poderia ser comprovada por meio de testes de dicroísmo circular, mas foge ao escopo do presente trabalho. A presença da fosfolipase A<sub>2</sub> no permeado era esperada considerando os resultado obtido no experimento de rejeição com a dextrana 10 kDa, onde 23% da massa deste carboidrato permeou pela membrana.

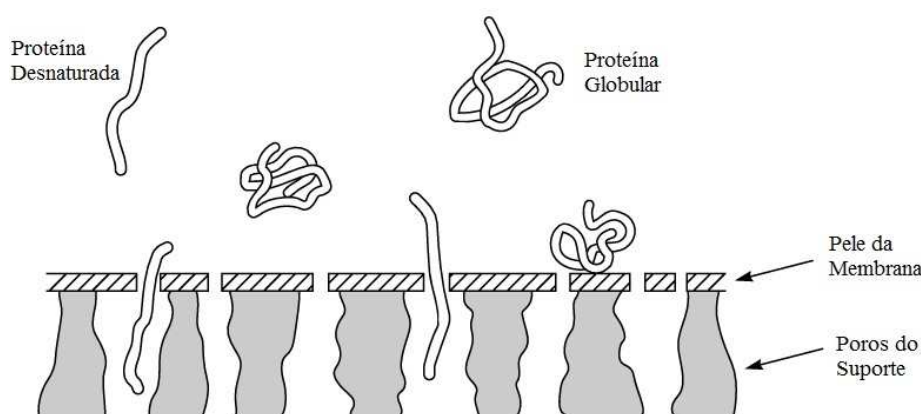


Figura 25 – Ilustração mostrando uma proteína em sua forma globular sendo retida pela membrana e a mesma proteína desnaturada, na forma linear permeando pela membrana (BAKER,2004).

Para o teste de rejeição de uma única ultrafiltração da solução de apitoxina com baixa concentração, 1 g/L, velocidade de agitação de 750 rpm e pressão de 220 kPa, os resultados de eletroforese em gel são apresentados na Figura 26.

Observou-se uma banda menor que 1,060 kDa, e outra banda ligeiramente maior que 1,060 kDa, o que pode representar a apamina e peptídeo MCD que são peptídeos de menor massa molar em comparação com a melitina e outros de maiores massas molares.

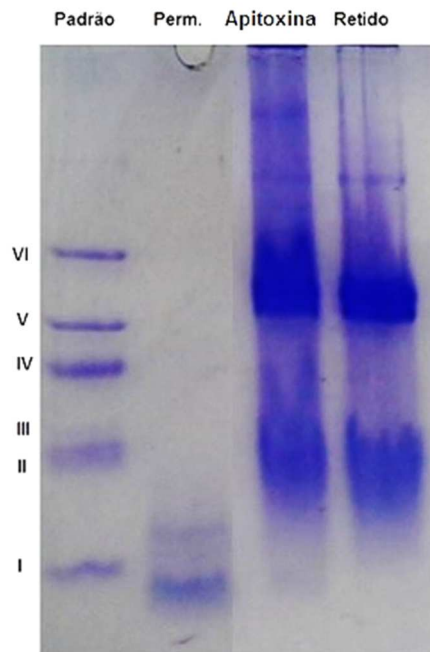


Figura 26 – Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 16%, tampão de corrida tris-tricina, 180 v e 40 A. O gel foi corado em *Comassie Blue* por uma hora. Foi utilizado marcador com as seguintes massas moleculares: 1,060 kDa (I); 3,496 kDa (II); 6,5 kDa (III); 14,2 kDa (IV); 17 kDa (V); 26,6 kDa (VI). Aplicado 20 $\mu$ L da apitoxina permeada, apitoxina bruta e apitoxina retida na ultrafiltração.

Na alimentação e no concentrado há uma banda maior que 17 kDa, sendo esta provavelmente a fosfolipase A<sub>2</sub> e outra ligeiramente menor que 3,496 kDa indicativo da melitina.

A membrana de celulose regenerada reteve os grandes peptídeos e proteínas, uma vez que no gel não foram detectadas bandas maior que 6,5 kDa. Este resultado indicou que a membrana foi eficiente em separar as substâncias com massa molecular maior que 10 kDa. Porém, no concentrado as bandas ficaram muito coradas, o que indica grande presença de proteínas, indício de uma baixa recuperação, uma vez que aproximadamente metade da apitoxina é constituída de melitina, e esta ficou em sua grande maioria retida na membrana.

Avaliando o gel, observou-se que o permeado não apresentou uma quantidade detectável de fosfolipase A<sub>2</sub> e também de melitina, provavelmente devido à pequena concentração destes no permeado se comparado com outros peptídeos. Isso foi confirmado tanto na alimentação quanto no concentrado, que apresentaram bandas de coloração intensa nas regiões próximas às massas destes compostos.



### 5.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

A identificação e o doseamento de melitina bem como de fosfolipase A<sub>2</sub> foram realizados pela construção de curvas padrões suas respectivas equações da reta, conforme apresentado nas Figuras 27 e 28, respectivamente. Os seus tratamentos estatísticos estão detalhados nos Anexos D e E.

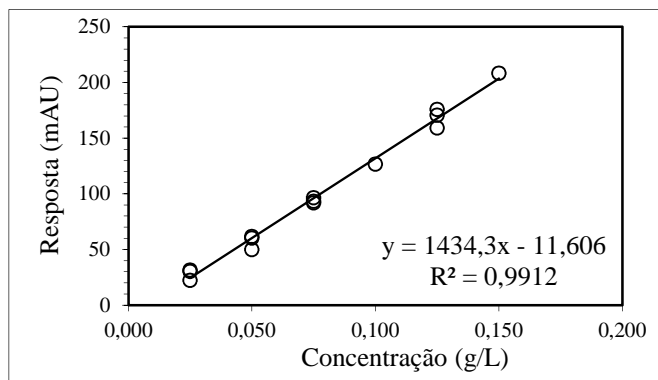


Figura 27 – Curva padrão da melitina no espectrofotômetro com 18 pontos; 6 níveis, 3 réplicas por nível.

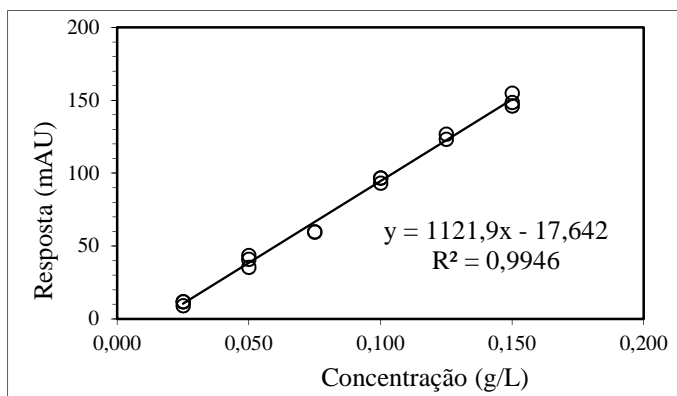


Figura 28 – Curva padrão da fosfolipase no espectrofotômetro com 18 pontos; 6 níveis, 3 réplicas por nível.

Na Figura 29 tem-se um cromatograma onde podem ser visto o pico dos padrões de fosfolipase A<sub>2</sub> e da melitina. A fosfolipase A<sub>2</sub> apresentou um volume de retenção, 20,17mL, menor que o da melitina, 23,78 mL e mesmo ambos estando na mesma concentração, a altura e área do pico da melitina foram superiores ao da fosfolipase A<sub>2</sub>.

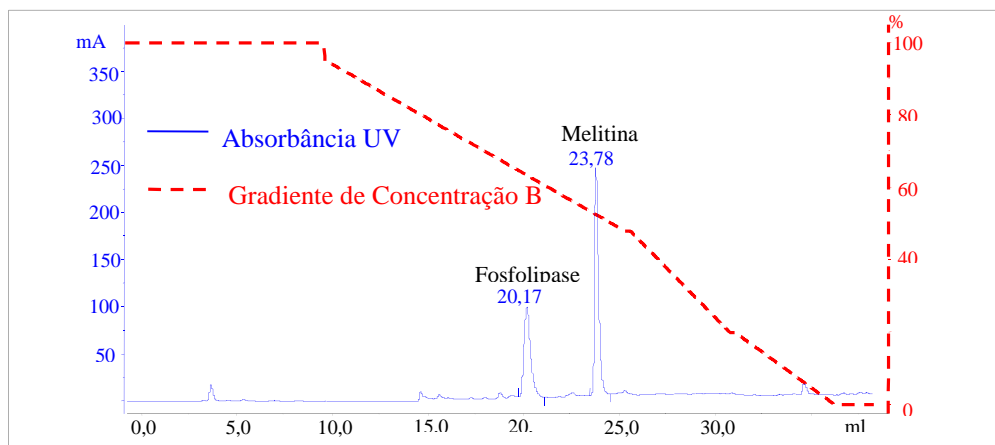


Figura 29 – Cromatograma dos padrões de melitina e fosfolipase A<sub>2</sub>. A linha azul mostra a leitura da absorbância feita em ultravioleta 220nm. A linha pontilhada mostra o gradiente decrescente em concentração da solução aquosa de ácido fosfórico 0,5% e crescente para acetonitrila.

Na apitoxina analisada (alimentação), a fosfolipase A<sub>2</sub> apresentou um volume de retenção, 20,16 mL, menor que o da melitina, 23,37 mL, de acordo com os padrões destas duas macromoléculas apresentadas na Figura 29. Mesmo ambas estando na mesma concentração, a altura e respectiva área da melitina foram superiores ao da fosfolipase A<sub>2</sub>, provavelmente devido à sensibilidade do detector.

As respectivas concentrações percentuais, em função da massa do veneno seco foram de 61,14% de melitina e 15,36% de fosfolipase A<sub>2</sub>. Os valores estão acima do valor esperado, uma vez que a concentração média destas substâncias são respectivamente 50 e 12% (LARIVIERE e MELZACK, 1996) e SILVA *et al.*, (2008).

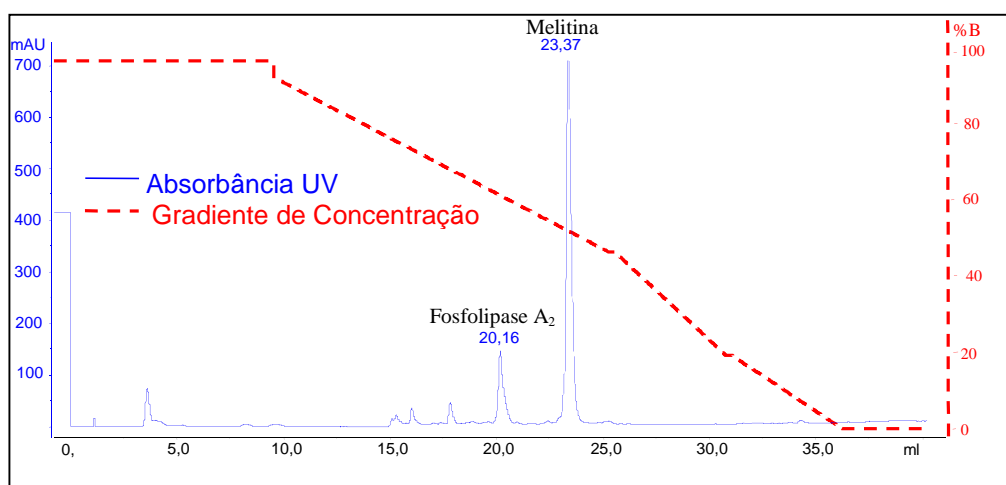


Figura 30 – Cromatograma da Apitoxina mostrando na linha azul os picos de absorbância da melitina e da fosfolipase A<sub>2</sub>, em seus volumes de retenção, conforme determinado pelos respectivos padrões.

Foram realizadas ultrafiltrações com a apitoxina na concentração de 50 g/L e 30 g/L, a fim de quantificar o coeficiente de rejeição das macromoléculas. Entretanto, o permeado apresentou uma recuperação, quantidade de produto que estava presente na alimentação e que permeou pela membrana, de aproximadamente 7%, muito abaixo do esperado. Isso pode ser justificado devido à capacidade da melitina em formar tetrâmeros, principalmente quando está em grande concentração (QUAY e CONDIE, 1983).

Foi então realizada uma ultrafiltração da apitoxina em uma concentração de 1 g/L, e o resultado está apresentado na Figura 31.

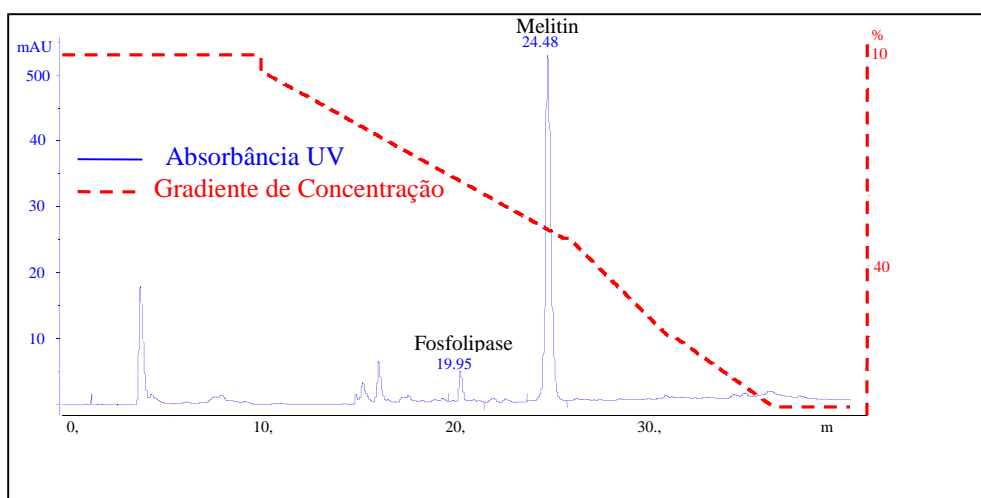


Figura 31 – Cromatograma do permeado da ultrafiltração da apitoxina com a concentração do líquido de alimentação de 1g/L.

O permeado apresentou uma taxa de recuperação de 58,6% para a melitina e uma rejeição de 59,9% para a fosfolipase A<sub>2</sub>.

Devido a cinética da reação de rompimento do tetrâmero da melitina ligada fortemente à concentração de proteínas na solução (QUAY e CONDIE, 1983), uma solução mais diluída como a de 1 g/L apresentou maior concentração da melitina livre e ela passou facilmente pelos poros da membrana.

Esta estrutura tetramérica apresenta um volume maior do que a massa de quatro melitinas aglomeradas de forma globular e com núcleo denso, pois se organiza de forma espacial tetraédrica com um centro oco, conforme mostrado na Figura 1. Portanto, era esperado que este tetrâmero não permeasse pelos poros da membrana sendo necessário obter uma solução menos concentrada para elevar o valor  $K_d$ , Equação 1, e assim aumentar a concentração da melitina monomérica em solução. Entretanto, a hipótese de formação do tetrâmero da melitina não foi investigada.

O ponto negativo de se ter com soluções com baixas concentrações é trabalhar com grandes volumes de líquido e dificuldade e maior custo para sua concentração.

Foram realizadas ultrafiltrações seriadas, lavando o produto retido com o mesmo volume do respectivo permeado, partindo de uma solução inicial de 50 g/L e obtendo no final uma solução de 10 g/L.

Tabela 5 - Valores percentuais da melitina e fosfolipase obtidos pelo doseamento via CLAE dos permeados em cinco ultrafiltrações e diluições sequenciais do produto retido.

	1ª Ultra	2ª Ultra	3ª Ultra	4ª Ultra	5ª Ultra
Melitina	1,59% ± 0,11	2,98% ± 0,54	7,34% ± 1,25	8,06% ± 1,66	4,31% ± 0,03
Fosfolipase A <sub>2</sub>	8,65% ± 0,45	2,53% ± 0,45	1,21% ± 0,45	> 1%	> 1%
Rejeição Fosf.	35%	47%	46%	...	...
Rejeição Mel.	97%	94%	86%	83%	81%

Como pode ser visto na Tabela 5, onde nas duas primeiras linhas tem-se a concentração de melitina e fosfolipase A<sub>2</sub> no permeado e as duas últimas linhas a rejeição destas, que ficou no retido da membrana.

À medida que foram feitas as lavagens com água Milli-Q, no mesmo quantitativo em massa do produto permeado, teve-se a redução do valor da rejeição da melitina. Isto se deu com a redução gradual da concentração da melitina e outros componentes da apitoxina no líquido de alimentação uma vez que permearam pela membrana, ou seja, a força motriz (concentração de melitina na alimentação) para a permeação da melitina foi decrescendo ao longo dos testes.

A rejeição da fosfolipase A<sub>2</sub> foi maior na segunda ultrafiltração em termos percentuais, e na primeira ultrafiltração em massa. Na quarta e quinta ultrafiltração, ela apresentou um valor de rejeição muito pequeno, Isto se explica uma vez que uma maior quantidade desta já havia permeado nas duas primeiras ultrafiltrações.

### 5.3.3 Espectroscopia de UV-visível para dosagem atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>

Na dosagem da atividade da fosfolipase A<sub>2</sub>, os fosfolipídios de membrana contidos na gema do ovo sofrem digestão enzimática e assim valor da absorbância cai. Foi verificado que tanto o padrão de fosfolipase A<sub>2</sub> quanto a apitoxina bruta apresentaram atividade, tendo o padrão apresentado uma atividade maior que o veneno, uma vez que este contém a enzima purificada.

Também para ambos a digestão dos fosfolipídios foi maior dos primeiros dez minutos tendendo a reduzir após esse tempo. Isso é explicado pela curva de saturação da cinética enzimática de Michaelis-Menten, onde a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração de substrato (LEHNINGER E NELSON, 2002), Figura 32.

No permeado, a fosfolipase A<sub>2</sub> não apresentou a atividade significativa, como mostrado no gráfico, tendo a curva dele reduzido de forma gradual. Isso pode ter se dado por uma possível desnaturação desta enzima com possível quebra de suas pontes dissulfeto o que propiciou uma redução de seu volume e a permeação pelos poros da membrana. O que mostra um resultado animador, uma vez que a esta enzima ao passar pela membrana já não se encontrava em sua forma ativa e, portanto inócua para o organismo humano.

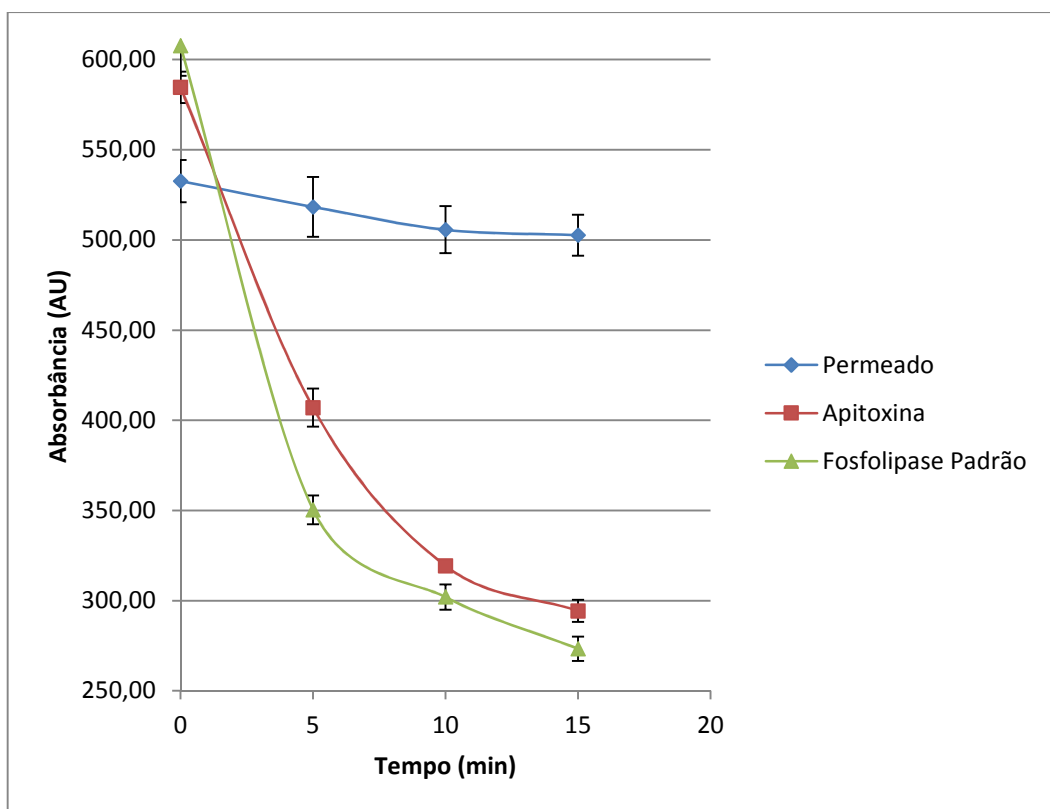


Figura 32 – Gráfico com as absorvâncias de apitoxina permeada, apitoxina bruta e fosfolipase A<sub>2</sub> padrão.

#### 5.3.4 Espectrometria de massa

Os dados obtidos no espectro de massas apontam para a presença de peptídeos com massa molar menor do que a da melitina presentes no permeado. Segundo dados da literatura sobre os constituintes da apitoxina e suas massas molares, pode-se concluir que os compostos presentes em II, III e IV da Figura 32 são respectivamente a melitina, o peptídeo MCD e a apamina. Eles apresentam o mesmo valor de massa teórico e apresentaram significativa pureza nos *pools* de amostra durante a corrida no CLAE.

Na análise de espectrometria de massa do primeiro pico do cromatograma do retido, para o volume de retenção aproximado de 4 mL, da Figura 32 não foram identificados valores de massa acima de 1 kDa. O que aponta uma ausência de peptídeos ou proteínas nesse *pool* coletado. Isso ocorreu porque este não se ligou à coluna C18, pois saiu durante o ciclo de lavagem inicial da membrana com água e ácido fosfórico, Figura 34.

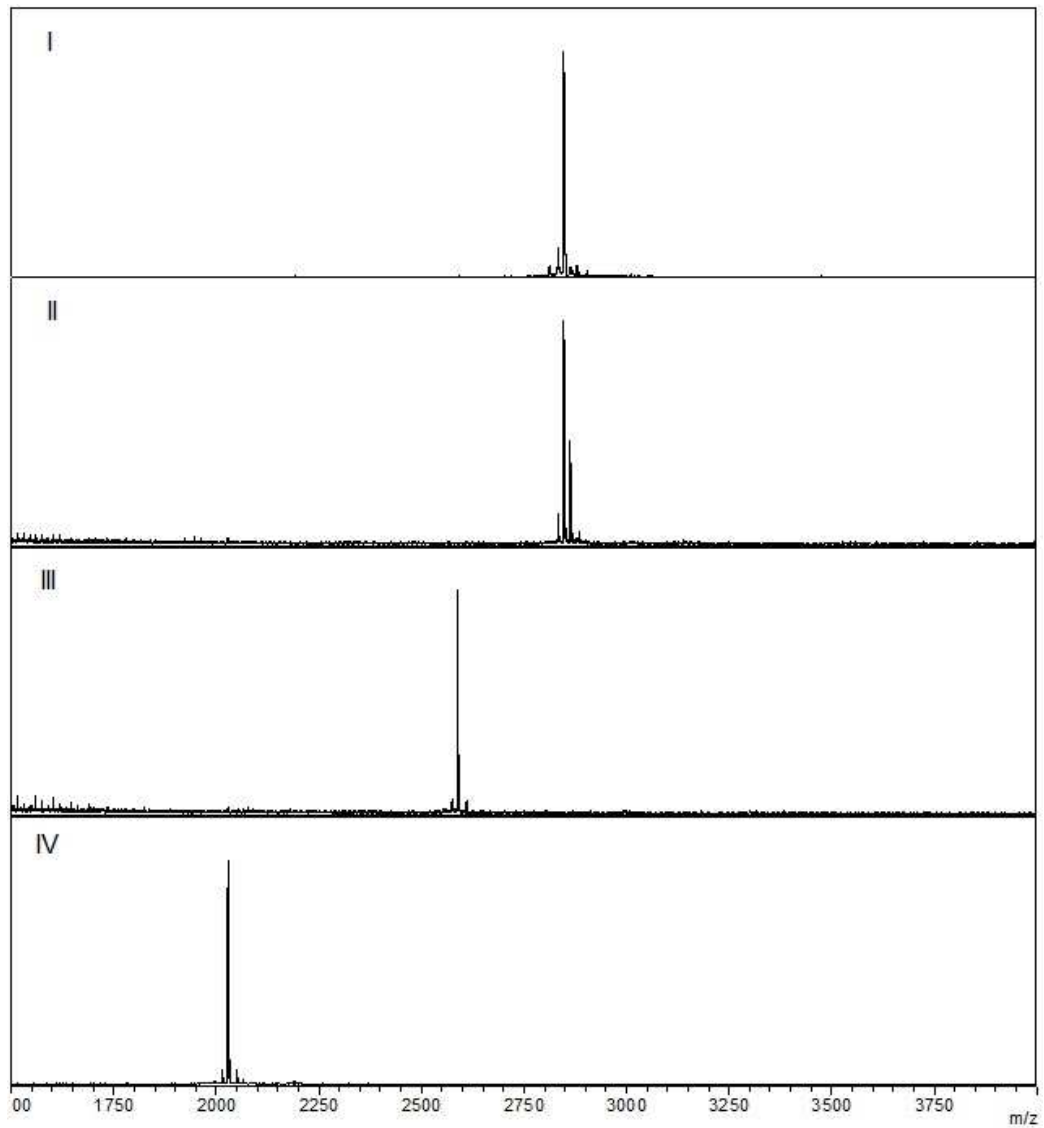


Figura 33 – Espectros de massas: I - padrão de melitina com o valor da massa de 2.845,88 Da e amostras dos principais picos apresentados pelo permeado da apitoxina no cromatógrafo líquido de alta eficiência nos volumes de retenção aproximados de: II – 24,5 mL; III – 15 mL e IV – 18 mL e respectivos valores da massa 2.845,747; 2.586,441 e 2.026,936 Da.

## CONCLUSÃO

A ultrafiltração apresentou um bom desempenho a uma pressão de 220 kPa e velocidade de agitação de 750 rpm. A redução dos agentes imunogênicos foi acima de 50% para a fosfolipase A<sub>2</sub>, substância mais alergênica, em apenas uma única permeação. Também foi verificada uma ausência de atividade desta enzima após passagem pelos poros da membrana, indicando uma possível ruptura das pontes de dissulfeto e a desnaturação desta proteína. Fato de grande impacto positivo na segurança do produto permeado.

Na eletroforese, pôde se ver uma baixa quantidade de fosfolipase A<sub>2</sub> e também de outras substâncias com massa molar acima de 10 kDa. Esta enzima foi detectada e dosada com mais precisão na cromatografia em fase reversa bem como a melitina, que foi escolhida como um marcador de qualidade no permeado.

A melitina apresentou uma elevada retenção, fato não esperado devido à massa do peptídeo ser três vezes menor do que o poro da membrana. Porém, conforme investigado na literatura, este peptídeo tem a capacidade de se aglomerar e formar estruturas tetraméricas estáveis que se desfazem somente com a redução da concentração de sais e proteínas em um pH próximo da neutralidade. Dessa forma, a concentração de 1 mg/mL obteve um melhor desempenho para um processo de ultrafiltração, onde se tem uma passagem gradual da melitina na membrana e o deslocamento do equilíbrio cinético para a ruptura da estrutura tetramérica e formação dos peptídeos não ligados.

Nas análises de espectrometria de massa do permeado não foram identificadas substâncias com massa semelhante à da fosfolipase A<sub>2</sub> nem das demais enzimas mais alergênicas, sendo identificadas apenas massas molares semelhantes à da melitina, peptídeo MCD e apamina.

Portanto, a ultrafiltração com membranas de 10 kDa demonstrou ser uma técnica simples e eficaz para a redução de componentes alergênicos da apitoxina. Necessita, porém ser mais estudada, principalmente quando se trata da melitina tetramérica.



## SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Avaliando as questões levantadas durante a realização deste estudo, as seguintes alternativas são sugeridas para trabalhos posteriores:

- a) Investigar a solução de alimentação através da utilização de diferentes tampões com distintas concentrações afim de preservando a sua estrutura secundária e terciária da fosfolipase A<sub>2</sub> o que poderá elevar a sua retenção na membrana;
- b) Avaliar o potencial zeta da melitina e fosfolipase A<sub>2</sub> na permeação membrana;
- c) Utilizar membrana de ultrafiltração de 10 kDa de outros materiais tais como polietersulfona e polisulfona bem como outras técnicas como a diafiltração afim de se obter uma melhor retenção da fosfolipase A<sub>2</sub> e maior permeação da melitina;
- d) Purificação da melitina, fosfolipase A<sub>2</sub>, apamina e peptídeo MCD utilizando membranas de ultrafiltração associadas com a cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando membranas de fase reversa e/ou afinidade;
- e) Elaboração e validação de uma metodologia analítica para análise da apitoxina afim de facilitar o registro do insumo em órgãos reguladores como a Agência Nacional de Vigilância Sanitário e Ministério da Agricultura e Pecuária.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, Estados Unidos, v. 97, p. 253–261, 2013.

BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**, 2. ed. California: John Wiley & Sons, 2004.

BANKS, B. E. C.; DEMPSEY, C. E.; PEARCE, F. L.; VERNON, C. A.; WHOLLEY, T. E. New Methods of Isolating Bee Venom Peptides. **Anal. Biochemistry**, London, v. 116, p. 228–230, 1981.

BENTON, A. W.; MORSE, R. A.; STEWART, J. D. Venom Collection from Honey Bees. **Science**, New York, v. 142, p. 228–230, 1963.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

BRASIL. Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Anexo I. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 jan. 2001. Seção 1, p. 18.

BRENOL, C. V.; MONTICIELO, O. A.; XAVIER, R. M.; BRENOL, J. C. T. Artrite Reumatóide e Aterosclerose. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, Porto Alegre, v. 53(5), p. 465-470, 2007.

CARIAS, C. M.; VIEIRA, F. S.; GIORDANO, C. V.; ZUCCHI, P. Medicamentos de Dispensação Excepcional: Histórico e Gastos do Ministério da Saúde do Brasil, **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 45, p. 233-240, 2011.

DONG, J. S.; JAE, W. L.; YOUNG, H. L.; HO, S. S.; CHONG, K. L.; JIM, T. H. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology & Therapeutics**. Oxford, England, v. 115, 246-270, 2007.

EUN, J. Y.; JING, H. J.; SANG, M. L.; SUN, C. Y.; HYE, S. H.; MYEOG, S. L.; SUN-MI, C. Bee Venom Attenuates Neuroinflammatory Events and Extends Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis Models. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 7, 69-81, out. 2010.

FULY, A. L.; MACHADO, O. L.; ALVES, E. W.; CARLINI, C. R. Mechanism o inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* (Bursmaster) snake venom. **Thrombosis and Haemostrasis**, v. 78, 1372-1380, 1997.

GLÄTTLI, A.; CHANDRASEKHAR, I.; VAN GUNSTEREN, W. F.; A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in a phospholipid bilayer. **European Biophysics Journal**, v. 35, 255-267, Dez. 2006.

GROSSO, G. S.; FIGUEREDO, C. R. S. Characteristics and Properties of the *Apis mellifera* Apitoxin as Therapeutic Potential; Use and Limits. **Apiacta**, Bucharest, Romania, v. 3, 2001. Disponível em: <[http://www.apimondiafoundation.org/cgi-bin/index.cgi?sid=&zone=cms&action=search&categ\\_id=220&search\\_ordine=descriere](http://www.apimondiafoundation.org/cgi-bin/index.cgi?sid=&zone=cms&action=search&categ_id=220&search_ordine=descriere)>. Acesso em: 15 mai. 2014.

GOODMAN, L.S.; BRUNTON, L.L.; LAZO J.S. **Goodman e Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1.821 p. 2006.

GROTE, F.; FRÖHLICH, H.; STRUBE, J. Intrgration of Ultrafiltration Unit Operations In Biotechnology Process Desigh. **Chemical Engineering Technology**, Alemanha, v. 34, n. 5, 673-687, 2011.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas: Escola piloto em Engenharia Química**, Rio de Janeiro: e-papers, 2006.

HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach**. ed. 2. Oxford: IRL Press, 1990.

HAGHI, G.; HATAMI, A.; MEHRAN, M. Qualitative and quantitative evaluation of melittin in honey venom and drug products containing honey-bee venom. **J. Apic Sci. Iran**. v. 57(2), p. 37-44. 2013.

HEARN, M. T.; AGUILAR, M. I.; MANT, C. T.; HODGES, R. S. Hight-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. LXXXV. Evaluation of the use of hydrophobicity coefficients for the prediction of peptide elution profiles. **J. Chromatogr.** PubMed PMID: 3384884. eng. v. 438(2), p. 197-210. 1988.

HORWITZ, W. Protocol for the design conduct and interpretation of method performance studies. **Pure Applied Chemistry**, Londres, v. 67. p. 331-343, 1995.

HIDER, R. C. Honeybee venom: A Rich Source of Pharmacologically Active Peptides. **Pergamon Press**, Londres, v. 12. n. 2, p. 60-65, 1988.

JINHUI, Z.; JING, Z.; SUXIA, Z.; JIANZHONG, S.; YITAO, Q.; XIAOFENG, X.; YI, L.; LIMING, W.; JINZHEN, Z.; FANG, C.; LANZHEN, C.; Quantification of Melittin and Apamin in Bee Venom Lyophilized Powder from *Apis mellifera* by Liquid Chromatography-diode Array Detector-tandem Mass Spectrometry. **Analytical Biochemistry**, Londres, v. 404, p. 171-178, Maio 2010.

KIM, K. J.; FANE, A. G.; FELL, C. J. D.; JOY, D. C. Fouling Mechanism of Membranes During Protein Ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 68, p. 79-91, Nov. 1991.

KING, T. P.; SPANGFORT, M. D. Structure and Biology of Stinging Insect Venom Allergens. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basileia, Alemanha, v. 123, p. 99-106, 2000.

KOOPS, G. H. Nomenclature and Symbols in Membrane Science and Technology. **European Society of Membrane Science and Technology**, Holanda, Enscheda, 1995.

KUDO, I.; MURAKAMI, M.; HARA, S.; INOUE, K. Mammalian non-pancreatic phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 177, p. 217-231, 1993.

LARIVIERE, W. R.; MELZACK, R. The Bee Venom Test: a new tonic-pain test. **Pain**, Washington, v. 66, p. 271-277, Jan. 1996.

LAURINDO, I. M. M.; XIMENES, A. C.; LIMA, F. A. C.; PINHEIRO, G. R. C.; BATISTELLA, L. R.; BERTOLO, M. B.; ALENCAR, P.; XAVIER, R. M.; GIOGI, R. D. N.; CICONELLI, R. M.; RADOMINSKI, S. C.; Artrite Reumatóide: Diagnóstico e Tratamento. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 435-442, dez. 2004.

LEE, D. M., WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. **Lancet**. v. 358, p.903-911, Set. 2001.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3ed. São Paulo: Savier, 2002.

LIGHTFOOT, E. N.; MOSCARIELLO, J. S. Bioseparations. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova York, v. 87, p. 259-273, Mar. 2004.

LIMA, P. R. de; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis** [online], Botucatu, v. 9, p. 149–162, 2003.

LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V.; Comparative **study of Lowry and Bradford methods: interfering substances**. 85 Biotechnology Techniques, Vol. 13, p. 149-154, Holanda, 1999.

MAULET, Y.; BRODBECK, U.; FULPIUS, B. W. Purification from Bee Venom of Melittin Devoid of Phospholipase A2 Contamination. **Analytical Biochemistry**, Londres, v. 127, p. 61-67, mai. 1982.

MARCEDO, A.; DUARTE, E; PINHO, M. The role of concentration polarization in ultrafiltration of ovine cheese whey. **Journal of Membrane Science**, Portugal, v. 381, p. 34-40, Jul. 2011.

MEHTA, A.; ZYDNEY, A. L. Permeability and Selectivity Analysis for Ultrafiltration Membranes. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 249, p. 245-249, Nov. 2005

MERLO, A. L.; BASTOS, L. F. S.; GODIN, A. M.; ROCHA, L. T. S.; NASCIMENTO, Jr. E. B.; PAIVA, A. L. L.; MORAES-SANTOS, T.; ZUMPANO, A. A. C.; BASTOS, E. M. A. F.; HENEINE, L. G. D.; COELHO, M. M. Effects Induced by *Apis mellifera* Venom and its Components in Experimental Models of Nociceptive and Inflammatory Pain. **Toxicon**, Oxford, v. 57, p. 764-711, Fev. 2011.

MEYER, V. R. **Practical High-performance Liquid Chromatography**. 5. ed. Suíça: John Wiley & Sons Ltd, 2004.

MILLIPORE. Ultrafiltration Membranes: Ultrafiltration membranes for macromolecule processing. Estados Unidos, 2008. 5 p. Disponível em:< [http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/MILLIPORE\\_UltrafiltrationMembranes.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/MILLIPORE_UltrafiltrationMembranes.pdf) >. Acesso em 19 de janeiro de 2015.

MOUSAVI, S. M.; IMANI, S.; HAGHIGHI, S.; MOUSAVI, S. E.; KARIMI, A. Effect of Iranian Honey Bee (*Apis mellifera*) Venom on Blood Glucose and Insulin in Diabetic Rats. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, Teerã, v. 6(2), p. 136-143, Dec. 2012.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1996.

MÜLLER, U. R.; HELBLING, A. Update on Hymenoptera Venom Allergy with Special Aspects of Diagnostics and Therapy. **Allergo J. Internat.**, Cologne, Alemanha, v. 22 (4), p. 265–273, 2013.

MÜLLER, U. R.; SHMID-GRENDELMEIER, P.; HAUSMANN, O.; HELBLING, A. IgE to Recombinant Allergens Api m1, Ves v1 and Ves v5 Distinguish Double Sensitization from Crossreaction in Venom Allergy. **Allergy**, Bonn, Alemanha, v. 67, p. 1069–1073, 2012.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, K. Y. **Princípios de Bioquímica**, 4. ed. São Paulo: Savier, 2006.

POBLETE, W. F.; CARRASCO, C. G. N.; ARIAS, A. B. Efecto antiinflamatorio de apitoxina de *Apis mellifera* sobre prostaglandina E2 del fluido crevicular gingival de pacientes con y sin enfermedad periodontal, sometidos a apiterapia: ensaio preliminar. **Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral**. Santiago, Chile, v. 4(2), p. 64-68, 2011.

POMORY, C.M. Color development time of the lowry protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 378, p. 216-217, 2008.

QUAY, S. C.; CONDIE, C. C.; Conformation Studies of Aqueous Melittin: Thermodynamic Parameters of the Monomer-Tetramer Self-Association Reaction. **Biochemistry**. California, USA. V. 22, p. 695- 700, 1983.

SAIBUATONG, O.; PHISALAPHONG, M. Novo Aloe vera – Bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**. V. 79, p. 455-460, 2010.

SILVA, T. C.; MOURA, S. P; RAMOS. H. R.; ARAUJO, O. S; BUENO DA COSTA, M. H. Design of a modern liposome and bee venom formulation for the traditional VIT-venom immunotherapy. **Journal of Liposome Res**. V. 18, p. 353-368, 2008.

STRONG, P. N.; WADSWORTH, J. D. F. Pharmacologically Active Peptides and Proteins from Bee Venom. In: **Methods and Tools in Biosciences and Medicine: Animal toxins**. Rochat, H.; Martin-Eauclaire, M. F. (Eds) Birkhauser, Verlag, Basel, Suíça, p. 128-135, 2000.

TERRA, R. M.; GUIMARÃES, J. A.; VERLI, H.; Structural and functional behavior of biologic active monomeric melittin. **J. of Mol. Graphics and Modelling**. Brasil, v. 25, p. 767-772, 2007.

VELA, M. C. V.; URIPE, B. C.; BLANCO, S. A.; GARCIA, J. L.; Analysis of an ultrafiltration model: Influence of operation conditions. **Desalination**. Espanha, v. 284, p. 14-21, 2012.

VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

YI-RU, D.; YOUNG, X.; ZHUO-MIN, L.; JING, D.; FANG, X.; HAN, F.; YAN, W.; STRONG, J. A.; JUN-MING, Z.; JUN, C. Melittin Activates TRPV1 Receptors in Primary Nociceptive Sensory Neurons via the Phospholipase A<sub>2</sub> Cascade Pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 408, p 32-37, abr. 2011.

YOUNG, B. K.; HYE, J. L.; HO, J. H.; WOUNG, C. M.; SUNG, K. K.; OK, B. Y.; BEITZ, A. J.; JANG, H. L. The Water-soluble Fraction of Bee Venon Produces Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects on Rheumatoid Arthritis in Rats. **Life Science**, v. 71, p. 191-204, Jan. 2002.

WANG, F.; POLAVARAPU, P. L. Conformational Analysis of Melittin in Solution Phase: Vibrational Circular Dichroism Study. **Biopolymers**, v. 70, p. 614-619, Nov. 2003.


WIESNER, M. R.; APTEL, P. **Water Treatment Membrane Process**, 1. ed. New York: John Wiley & Sons, 2004.

ZHOU, N. **Parametric Study of Ultrafiltration Membrane System & Development of Fouling Control Mechanis**. 2010. 85 f. Thesis (Master of Science in Engineering) – Purdue University, Hammond, Indiana, 2010.

ZYDNEY, A. L. Membrane bioseparations. Membrane separations. Academic **Press**, Estados Unidos, 2000. Disponível em: <https://murdercube.com/files/Chemistry/Crystalization,%20Purification,%20Separation/Encyclopedia%20of%20Separation%20Science/Level%20II%20-%20Methods%20and%20Instrumentation/MEMBRANCE%20SEPARATIONS/Membrane%20Bioseparations.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2014.

# ANEXOS

## Anexo A – Resultado do teste de umidade por Karl Fisher.



<b>TÍTULO: DETERMINAÇÃO DE ÁGUA PELO MÉTODO DE KARL FISCHER VOLUMÉTRICO</b>		<b>NÚMERO: DI-DCQ-048-FM-0024</b>	
---	--	-----------------------------------	--

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA			
DATA: <u>13/01/15</u>	Nº PROTOCOLO: <u>0030115</u>		
PRODUTO: <u>Apiterxina CONAP</u>	LOTE: <u>AP012 APO12</u>		
* ETAPA DA AMOSTRA: <input type="checkbox"/> INTERMEDIÁRIO <input type="checkbox"/> GRANEL <input type="checkbox"/> INTERMEDIÁRIO DE EMBALAGEM <input type="checkbox"/> TERMINADO			
ORIGEM: <input type="checkbox"/> UNIDADE I <input type="checkbox"/> UNIDADE II <input type="checkbox"/> UNIDADE III <input checked="" type="checkbox"/> OUTRO: <u>DPD</u>			

DETERMINAÇÃO DE ÁGUA POR KARL FISCHER VOLUMÉTRICO			
Data: <u>13/01/15</u>	Início: <u>15:00</u>	Término: <u>15:30</u>	Tempo total (h): <u>0,50</u>
MÉTODO UTILIZADO: DI-DCQ-048-MET-0206 REVISÃO: <u>01</u>			
ESPECIFICAÇÃO: <input checked="" type="checkbox"/> INFORMATIVO <input type="checkbox"/> MÁXIMO _____ % <input type="checkbox"/> OUTRO _____			
Fator de correção da solução de Karl Fisher (Fc) = <u>4,8295</u>			
$P_{11} = \underline{55482}$	$P_{F1} = \underline{55265}$	$V_1 = \underline{5,190}$	% de água <sub>1</sub> = $\frac{V_1 \times Fc \times 100}{(P_{11} - P_{F1})} = \underline{11,55\%}$
$P_{12} = \underline{55473}$	$P_{F2} = \underline{55267}$	$V_2 = \underline{4,845}$	% de água <sub>2</sub> = $\frac{V_2 \times Fc \times 100}{(P_{12} - P_{F2})} = \underline{11,36\%}$
$P_{13} = \underline{55506}$	$P_{F3} = \underline{55280}$	$V_3 = \underline{5,457}$	% de água <sub>3</sub> = $\frac{V_3 \times Fc \times 100}{(P_{13} - P_{F3})} = \underline{11,56\%}$
% de água = % de água <sub>1</sub> + % de água <sub>2</sub> + % de água <sub>3</sub> = $\frac{11,55 + 11,36 + 11,56}{3} = \underline{11,49\%}$			DPR (%) = <u>0,98</u>

**LEGENDA**  
*P<sub>i</sub>*: peso da nacele ou seringa com a amostra (g)  
*DPR* = desvio padrão relativo  
*Fc*: Fator de correção da solução de Karl Fisher  
*P<sub>i</sub>*: peso da nacele ou seringa vazias (g)  
*V*: Volume gasto da solução de Karl Fischer (mL)

OBSERVAÇÕES	
* Etapa da amostra: <u>toxina, teste segundo procedimento SFC2</u>	

EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	
<input checked="" type="checkbox"/> Balança Mettler Toledo AE 163 – TAG BALFQ-03A	Próxima calibração: <u>-1.07.15</u>
<input type="checkbox"/> Balança Mettler Toledo XS 205 DU – TAG BALFQ-01A	Próxima calibração: <u>-1-1-</u>
<input type="checkbox"/> Balança Sartorius TE 214 S – TAG BALFQ-05A	Próxima calibração: <u>-1-1-</u>
<input type="checkbox"/> Titulador Metrohm 633/E485 – TAG TITFQ-01A	Próxima calibração: <u>-1-1-</u>
<input checked="" type="checkbox"/> Titulador Metrohm 787 KF Titrimo – TAG TITFQ-02A	Próxima calibração: <u>-1.02.15</u>
<input type="checkbox"/> Outro	Próxima calibração: <u>-1-1-</u>

REAGENTES / SOLUÇÕES UTILIZADAS				
Reagente / solução	Marca	Lote	Validade	Responsável
Metanol PA	<u>Pamtec</u>	<u>217139</u>	<u>01/2016</u>	<u>Anel</u>
Reagente de Karl Fischer	<u>Fluka</u>	<u>SZB3D10101</u>	<u>23/03/2016</u>	<u>Anel</u>
Água purificada	<u>NA</u>	<u>NA</u>	<u>13/01/15</u>	<u>Anel</u>

RESULTADO: <input type="checkbox"/> APROVADO <input type="checkbox"/> REPROVADO <input checked="" type="checkbox"/> INFORMATIVO		
<u>Anel</u> ANALISTA	<u>Deiane Lima</u> CONFERIDO POR	<u>13, 01, 15</u> DATA

Revisão 01	12/04/2013	Página 1 de 1
------------	------------	---------------

**Emitido via SE Suite**



Anexo B – Laudo de análise do teste fisissorção de N<sub>2</sub>.

Quantachrome NovaWin - Data Acquisition and Reduction  
for NOVA Instruments  
©1994-2007, Quantachrome Instruments  
version 10.01



<b>Analysis</b>		<b>Report</b>	
Operator: lida	Date: 2014/11/28	Operator: lida	Date: 11/28/2014
Sample ID: HM292112014	Filename:	C:\QCdata\Physisorb\isttn_A_20141128_1.qps	
Sample Desc:	Comment:	Validação	
Sample weight: 0.3187 g	Sample Volume: 0 cc		
Outgas Time: 14.0 hrs	Outgas Temp: 110.0 C		
Analysis gas: Nitrogen	Bath Temp: 77.3 K		
Press. Tolerance: 0.100/0.100 (ads/des)	Equil time: 180/180 sec (ads/des)	Equil timeout: 360/360 sec (ads/des)	
Analysis Time: 373.8 min	End of run: 2014/11/28 12:15:26	Instrument: Nova Station A	
Cell ID: 0			

**MBET summary**

Slope =	104.159
Intercept =	1.300e+00
Correlation coefficient, r =	0.999929
C constant =	81.116
Surface Area =	33.023 m <sup>2</sup> /g

**Multi-Point BET**

Relative Pressure [P/Po]	Volume @ STP [cc/g]	1 / [ W((Po/P) - 1) ]	Relative Pressure [P/Po]	Volume @ STP [cc/g]	1 / [ W((Po/P) - 1) ]
5.19740e-02	6.4615	6.7886e+00	1.78737e-01	8.8029	1.9781e+01
7.62660e-02	7.0775	9.3337e+00	2.04312e-01	9.1546	2.2442e+01
1.01647e-01	7.5857	1.1935e+01	2.53525e-01	9.8348	2.7631e+01
1.27486e-01	8.0308	1.4557e+01	2.79295e-01	10.1867	3.0438e+01
1.53162e-01	8.4244	1.7178e+01	3.04613e-01	10.5514	3.3217e+01

**Single Point Surface Area**

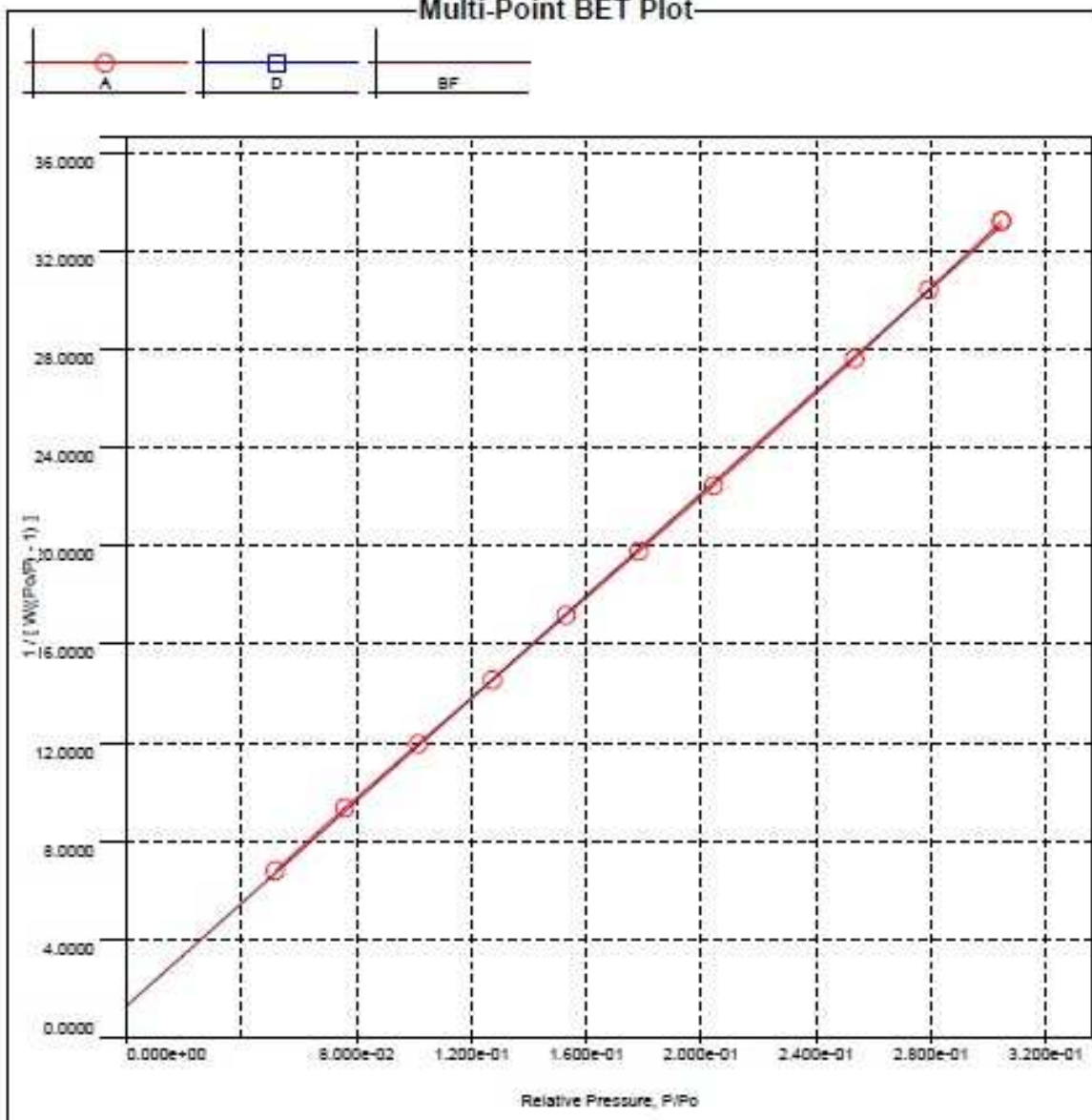
Relative Pressure [P/Po]	Volume @ STP [cc/g]	1 / [ W((P/Po) - 1) ]	Slope	Surf. Area [m <sup>2</sup> /g]
3.04613e-01	10.5514	3.3217e+01	109.0473	31.9358

**Analysis**  
Operator: lida  
Sample ID: HM292112014

Date: 2014/11/28  
Filename:

**Report**  
Operator: lida  
Date: 11/28/2014  
C:\QCdata\Physisorb\istn\_A\_20141128\_1.qgs

### Multi-Point BET Plot



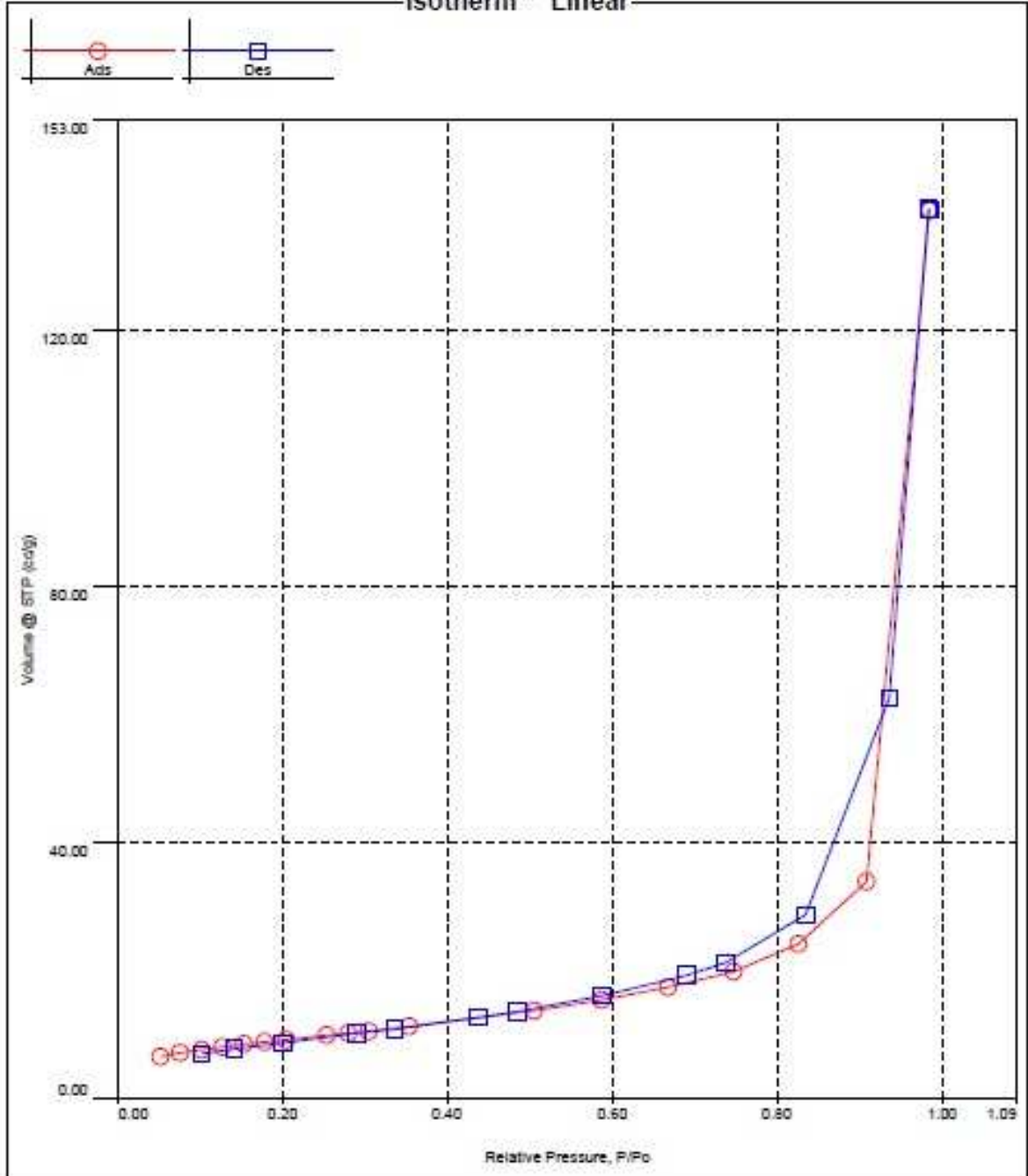
**Analysis**  
Operator: lida  
Sample ID: HM292112014

Date: 2014/11/28  
Filename:

**Report**  
Operator: lida  
C:\QCdata\Physisorb\istn\_A\_20141128\_1.qps

Date: 11/28/2014

Isotherm \* Linear

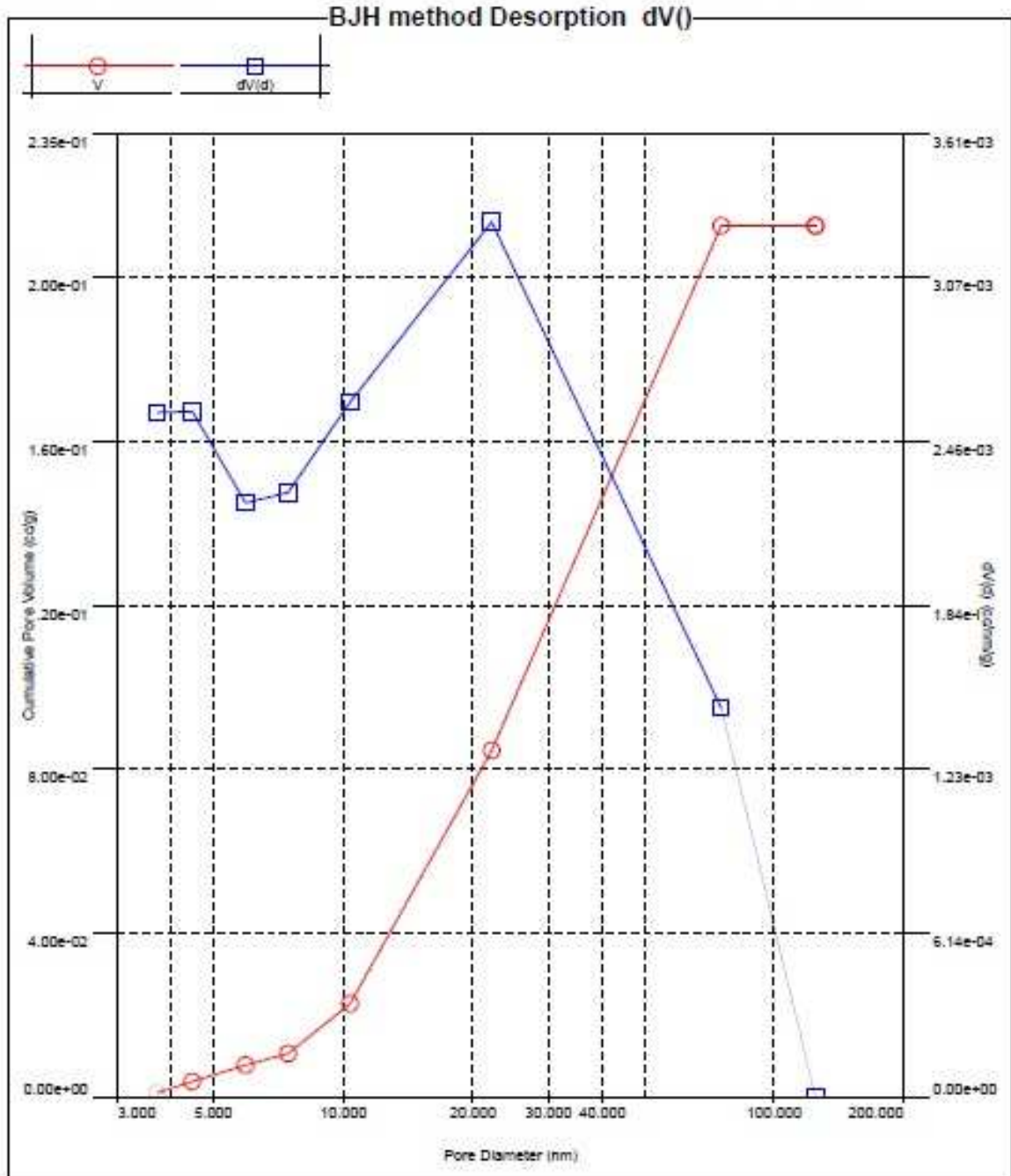


**Analysis**  
Operator: lida  
Sample ID: HM292112014

Date: 2014/11/28  
Filename:

**Report**  
Operator: lida  
C:\QCdata\Physisorb\stn\_A\_20141128\_1.q6

Date: 11/28/2014



**Analysis**  
Operator: lida  
Sample ID: HM292112014

Date: 2014/11/28  
Filename:

**Report**  
Operator: lida  
C:\QCdata\Physisorb\sttn\_A\_20141128\_1.qps

Date: 11/28/2014

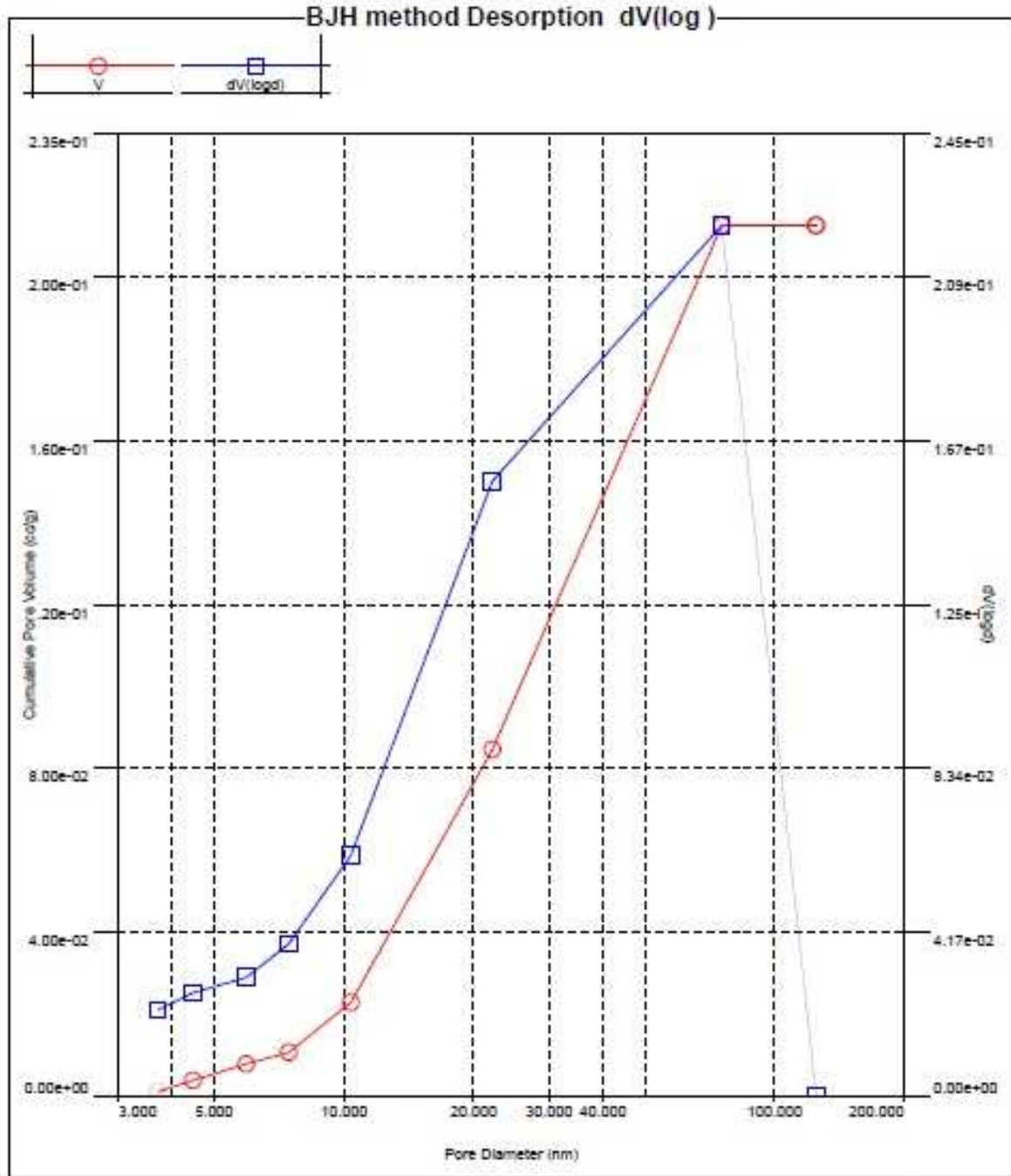
BJH Pore Size Distribution Desorption

Diameter [nm]	Pore Volume [cc/g]	Pore Surf Area [m <sup>2</sup> /g]	dV(d) [cc/nm/g]	dS(d) [m <sup>2</sup> /nm/g]	dV(logd) [cc/g]	dS(logd) [cc/g]
3.7020	1.0304e-03	1.1133e+00	2.5691e-03	2.7760e+00	2.1878e-02	2.3639e+01
4.4675	3.9350e-03	3.7140e+00	2.5705e-03	2.3015e+00	2.6301e-02	2.3549e+01
5.9370	7.9648e-03	6.4290e+00	2.2275e-03	1.5008e+00	3.0214e-02	2.0366e+01
7.4633	1.0766e-02	7.9410e+00	2.2689e-03	1.2161e+00	3.8901e-02	2.0849e+01
10.4087	2.2909e-02	1.2600e+01	2.6086e-03	1.0025e+00	6.1467e-02	2.3622e+01
22.1415	6.4666e-02	2.3757e+01	3.2818e-03	6.9288e-01	1.5671e-01	2.6310e+01
75.4472	2.1288e-01	3.0554e+01	1.4604e-03	7.7426e-02	2.2190e-01	1.1765e+01
124.9798	2.1288e-01	3.0554e+01	0.0000e+00	0.0000e+00	0.0000e+00	0.0000e+00

**Analysis**  
Operator: lida  
Sample ID: HM292112014

Date: 2014/11/28  
Filename:

**Report**  
Operator: lida  
Date: 11/28/2014  
C:\QCdata\Physisorb\sttn\_A\_20141128\_1.qps



**Analysis**  
Operator: lida  
Sample ID: HM292112014

Date: 2014/11/28  
Filename:

**Report**  
Operator: lida  
Date: 11/28/2014  
C:\QCdata\Physisorb\istrn\_A\_20141128\_1.qps

### BJH desorption summary

Surface Area = 30.554 m<sup>2</sup>/g  
Pore Volume = 0.213 cc/g  
Pore Diameter Dv(d) = 22.141 nm

### Volume/Area summary

#### Surface Area Data

MultiPoint BET.....	3.302e+01 m <sup>2</sup> /g
BJH method cumulative desorption surface area.....	3.055e+01 m <sup>2</sup> /g
DH method cumulative desorption surface area.....	3.130e+01 m <sup>2</sup> /g
NLDFT cumulative surface area.....	2.905e+01 m <sup>2</sup> /g

#### Pore Volume Data

Total pore volume for pores with Diameter less than 130.62 nm at P/Po = 0.985074.....	2.149e-01 cc/g
BJH method cumulative desorption pore volume.....	2.129e-01 cc/g
DH method cumulative desorption pore volume.....	2.089e-01 cc/g
HK method cumulative pore volume.....	2.039e-02 cc/g
SF method cumulative pore volume.....	2.044e-02 cc/g
NLDFT method cumulative pore volume.....	7.686e-02 cc/g

#### Pore Size Data

Average pore Diameter.....	2.603e+01 nm
BJH method desorption pore Diameter (Mode Dv(d)).....	2.214e+01 nm
DH method desorption pore Diameter (Mode Dv(d)).....	2.214e+01 nm
HK method pore Diameter (Mode).....	4.315e-01 nm
SF method pore Diameter (Mode).....	4.523e-01 nm
NLDFT pore Diameter (Mode).....	3.047e+01 nm

### Average PoreSize data

Average pore Diameter = 2.60280e+01 nm

### Total Pore Volume data

#### Total Pore Volume

Total pore volume = 2.149e-01 cc/g for  
pores smaller than 130.6 nm (Diameter)  
at P/Po = 0.98507

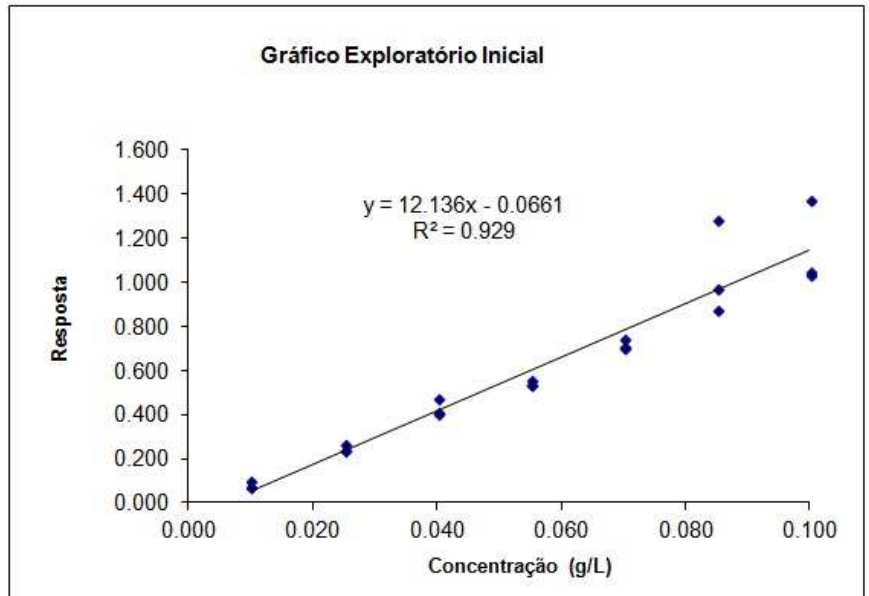
Anexo C – Tratamento Estatístico para a Curva Padrão de Dextrana.

TESTE DE LINEARIDADE

Analito **Dextrana (g/L)**

Tabela de dados originais

Pontos	Concentração	Resposta
1	0.010	0.0706
2	0.010	0.0697
3	0.010	0.0974
4	0.025	0.2649
5	0.025	0.2385
6	0.025	0.2368
7	0.040	0.4038
8	0.040	0.4692
9	0.040	0.4126
10	0.055	0.5371
11	0.055	0.5564
12	0.055	0.5355
13	0.070	0.7015
14	0.070	0.7083
15	0.070	0.7452
16	0.085	0.9690
17	0.085	1.2856
18	0.085	0.8717
19	0.100	1.0483
20	0.100	1.3694
21	0.100	1.0366



Teste do Resíduo Padronizado Jackknife - Outliers

Pontos	$x_i$	$y_i$	$e_i$	$J_{ei}$	$r_i$	$h_i$	Macros p/ deletar outlier	Resumo dos resultados
1	0.0100	0.0706	-0.01	-0.742	-0.754	0.169	1	Outliers
2	0.0100	0.0697	-0.01	-0.808	-0.817	0.169	2	
3	0.0100	0.0974	0.02	1.157	1.144	0.169	3	
4	0.0250	0.2649	0.02	1.802	1.681	0.101	4	
5	0.0250	0.2385	0.00	-0.113	-0.117	0.101	5	Normalidade
6	0.0250	0.2368	0.00	-0.225	-0.233	0.101	6	Conclusão para $\alpha = 0,05$
7	0.0400	0.4038	0.00	0.298	0.308	0.065	7	Req = 0.98593
8	0.0400	0.4126	0.01	0.889	0.896	0.065	8	Segue a Normal
9	0.0400	0.4126	0.01	0.889	0.896	0.065	9	Auto-correlação
10	0.0550	0.5371	-0.02	-1.454	-1.403	0.061	10	Conclusão para $\alpha = 0,05$
11	0.0550	0.5564	0.00	-0.113	-0.117	0.061	11	Não há auto autocorrelação
12	0.0550	0.5355	-0.02	-1.583	-1.509	0.061	12	
13	0.0700	0.7015	-0.02	-1.061	-1.056	0.087	13	Homogeneidade de variância
14	0.0700	0.7083	-0.01	-0.584	-0.597	0.087	14	Há homocedascidade
15	0.0700	0.7452	0.03	2.102	1.897	0.087	15	
16	0.0850	0.9690	0.00	-0.298	-0.308	0.145	16	Desvio de linearidade
17	0.0850	0.8717	0.00	-0.298	-0.308	0.145	17	A regressão é significativa
18	0.0850	0.8717	0.00	-0.298	-0.308	0.145	18	$p < 0,001$
19	0.1000	1.0483	0.01	0.974	0.976	0.235	19	
20	0.1000	1.3694	0.00	0.109	0.112	0.235	20	Não há desvio de linearidade
21	0.1000	1.0366	0.00	0.109	0.112	0.235	21	$p > 0,05$

n =	17	J crítico	2.145	t crítico	2.131	crítico	0.235
Número de outliers retirados: <b>4</b>							



Teste de Ryan-Joiner - Normalidade dos resíduos

Pontos	$p_i$	$q_i$	$e_i$
1	0.0362	-1.7962	-0.02
2	0.0942	-1.3153	-0.02
3	0.1522	-1.0272	-0.02
4	0.2101	-0.8059	-0.01
5	0.2681	-0.6185	-0.01
6	0.3261	-0.4507	-0.01
7	0.3841	-0.2948	0.00
8	0.4420	-0.1458	0.00
9	0.5000	0.0000	0.00
10	0.5580	0.1458	0.00
11	0.6159	0.2948	0.00
12	0.6739	0.4507	0.00
13	0.7319	0.6185	0.01
14	0.7899	0.8059	0.01
15	0.8478	1.0272	0.02
16	0.9058	1.3153	0.02
17	0.9638	1.7962	0.03

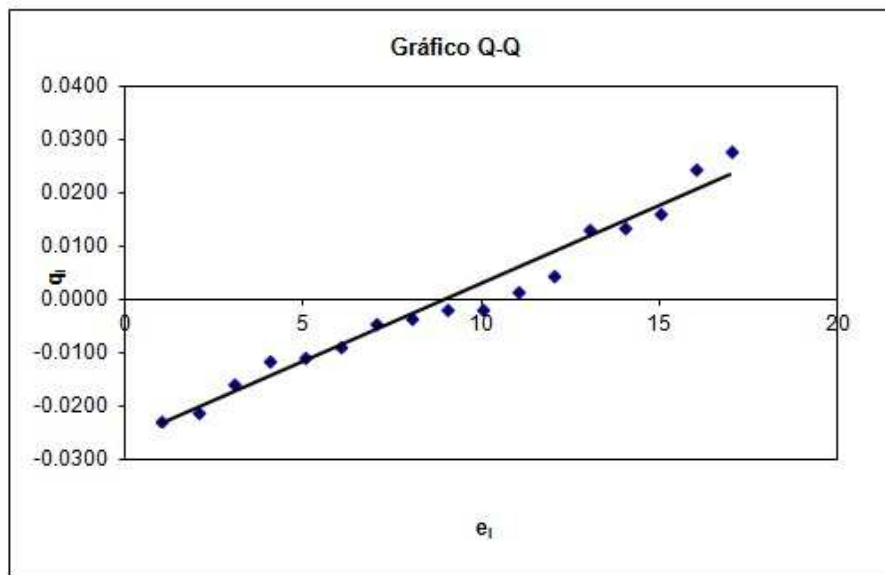
Req = 0.9859  
 Desvio da Normal :  $p > 0,10$   
 Conclusão  
 Os resíduos seguem a Normal

Valores Críticos de R		$S_{nn}$	0.2269
$R_{critico} (\alpha: 0,10) = 0.9549$		$S_{pp}$	0.0
$R_{critico} (\alpha: 0,05) = 0.9437$		$S_{nn}$	14.7097
$R_{critico} (\alpha: 0,01) = 0.9192$		$R_{pp}$	0.9859

Conclusão para  $\alpha = 0,05$   
 Não há evidência para rejeitar  $H_0$   
 Segue a Normal

Hipóteses

$H_0$ : os resíduos seguem a distribuição Normal  
 $H_a$ : os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade

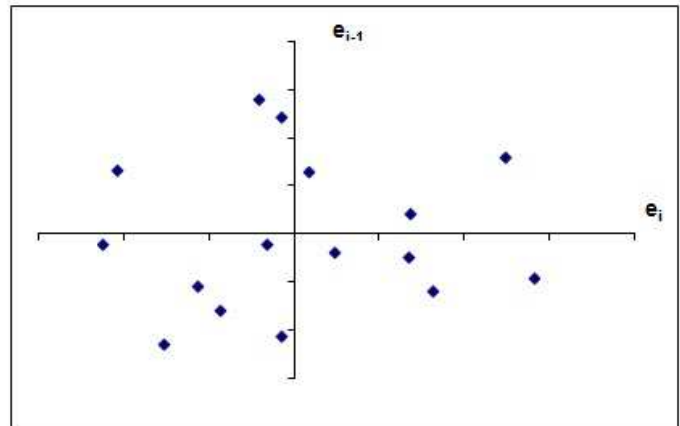


Max	Min
0.03	-0.02
1.80	-1.80

Teste de Durbin-Watson - Independência dos resíduos

Pontos	$e_i$	$e_{i-1}$	$e_i - e_{i-1}$
1	-0.01		
2	-0.01	-0.01	0.00
3	0.02	-0.01	0.03
4	0.02	0.02	0.01
5	0.00	0.02	-0.03
6	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.01
9	0.01	0.00	0.01
10	-0.02	0.01	-0.03
11	0.00	-0.02	-0.02
12	-0.02	0.00	-0.02
13	-0.02	-0.02	0.01
14	-0.01	-0.02	0.01
15	0.03	-0.01	0.04
18	0.00	0.03	-0.03
19	0.01	0.00	0.02
21	0.00	0.01	-0.01

Gráfico de Durbin-Watson ( $e_i$  x  $e_{i-1}$ )



Valor de $e_i$	
Max	Mín
0.03	-0.02

Hipóteses

$H_0$ : não há autocorrelação entre os resíduos (Há independência)

$H_a$ : há autocorrelação entre os resíduos (Não há independência)

$d = 1.844559881$

$\alpha = 0.05$

Correlação Positiva	$d_L$	Não conclusivo	$d_U$	Não há correlação	$4-d_U$	Não conclusivo	$4-d_L$	Correlação Negativa
	1.13		1.38049805		2.6195019		2.87	

$\alpha = 0.025$

Correlação Positiva	$d_L$	Não conclusivo	$d_U$	Não há correlação	$4-d_U$	Não conclusivo	$4-d_L$	Correlação Negativa
	1.01		1.25165443		2.7483456		2.99	

$\alpha = 0.01$

Correlação Positiva	$d_L$	Não conclusivo	$d_U$	Não há correlação	$4-d_U$	Não conclusivo	$4-d_L$	Correlação Negativa
	0.87		0.89278441		3.1072156		3.13	

Teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado - Homoscedasticidade dos resíduos

**Ho: As variâncias dos desvios não são diferentes (Há homoscedasticidade)**

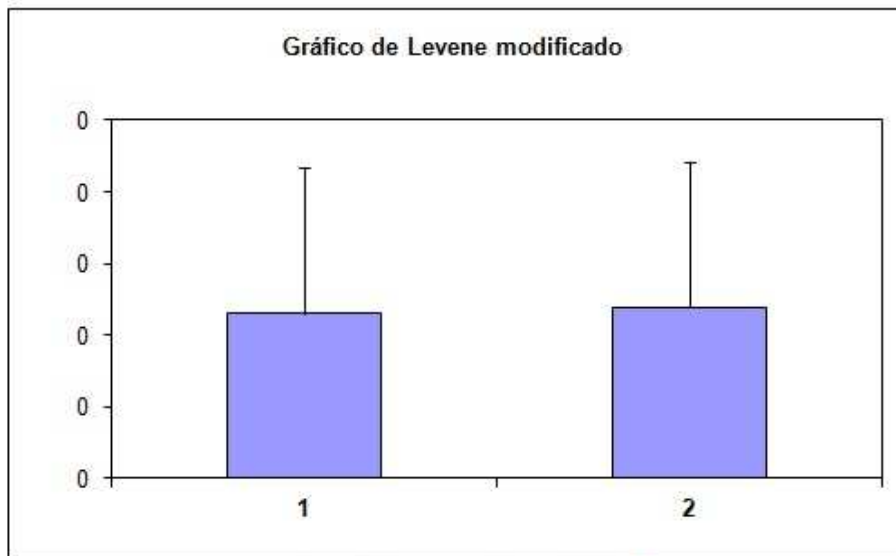
**Ha: As variâncias dos desvios são diferentes (Há heteroscedasticidade)**

Grupo k=1		Grupo k=2	
$e_{1j}$	$e_{2j}$	$ d_1 $	$ d_2 $
-0.01	-0.02	0.0089	0.0142
-0.01	-0.01	0.0098	0.0074
0.02	0.03	0.0179	0.0295
0.02		0.0264	
0.00		0.0000	
0.00	0.00	0.0017	0.0030
0.00	0.01	0.0064	0.0147
0.01	0.00	0.0152	0.0030
-0.02		0.0193	
0.00		0.0000	
-0.02		0.0209	

Estatística	Grupo k=1	Grupo k=2
$n_k$	11	6
$e_k$ (mediana)	-1.8E-03	-1.4E-03
$d_k$ (média)	1.15E-02	1.19E-02
$SQD_k$	8.24E-04	5.03E-04
$s_n^2$	8.84E-05	
$t_L$	-9.42E-02	
p	0.926171	
tcritico	2.131449536	

**Conclusão**

**Não há evidência para rejeitar Ho**  
**Há homoscedasticidade**



Grupo 1	Grupo 2	$t^*EP$
0.0	0.0	0.0

## MMQO ou Análise de Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$ )

Estimativas dos parâmetros, seus desvios, significância e intervalos de confiança

Estatísticas da regressão	
$R^2$	0.99778
$n$	17

Estatísticas auxiliares	
$S_{xy}$	1.52E-01
$S_{xx}$	1.44E-02
$S_{yy}$	1.62E+00
$t_{critica}$	2.131
$J_{critica}$	2.145

Coefficiente	Valor	s (EP)	Stat t	p	IC 95% inf	IC 95% sup
Linear (a)	-0.0247	0.0074				
Angular (b)	10.598	0.12921				

## ANOVA - Teste do desvio da linearidade e significância da regressão

FV	GL	SQ	QM	F	p	Sign.	$F_{critico}$
Regressão	1	1.61E+00	1.61E+00	6727.78	2.58E-21	$p < 0,001$	4.543077
Resíduo	15	3.60E-03	2.40E-04				
Desvio da l	5	1.12E-03	2.25E-04	0.908	5.13E-01	$p > 0,05$	3.325835
Entre níveis	6	1.62E+00					
Erro puro	10	2.48E-03	2.48E-04				
Total	16	1.62E+00					

### Hipóteses

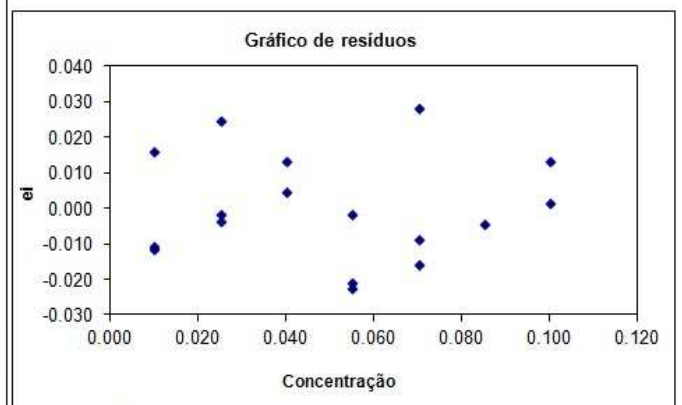
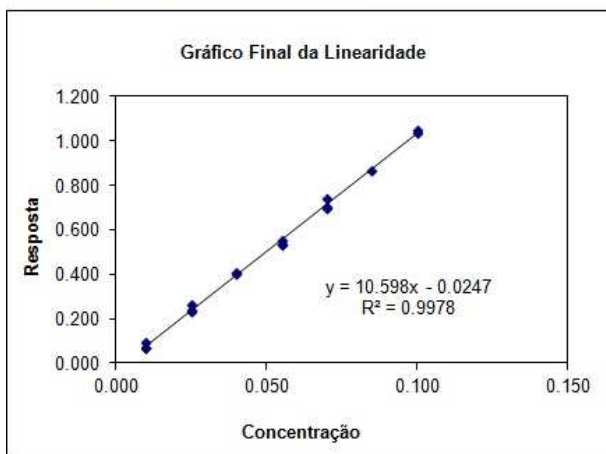
$H_0$ : a regressão não é significativa

$H_a$ : a regressão é significativa

### Conclusão

A regressão é significativa  $p < 0,001$

Não há desvio de linearidade  $p > 0,05$

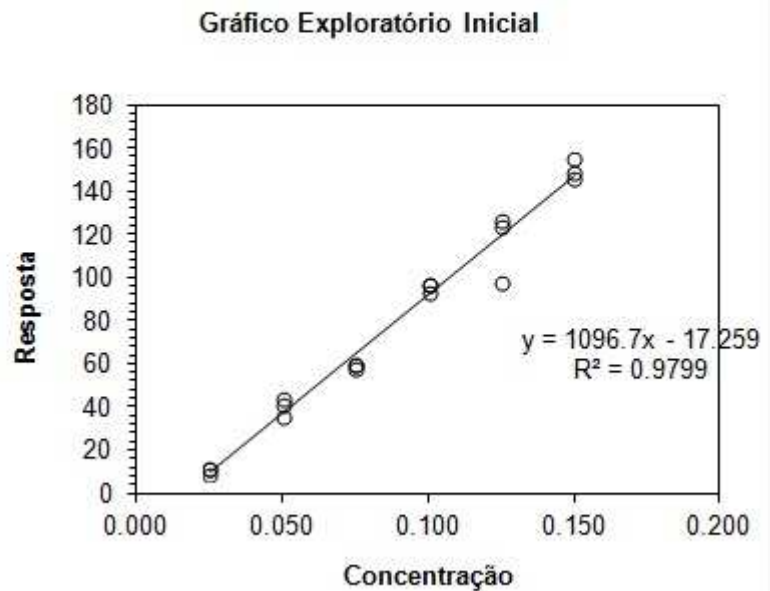


Anexo D – Tratamento Estatístico para a Curva Padrão de Fosfolipase.

Fosfolipase A<sub>2</sub> - verificação de linearidade (n = 18; 6 níveis; 3 replicatas por nível)

Tabela de dados originais

Pontos	Massa	Resposta
1	0.025	9.1024
2	0.025	11.6989
3	0.025	12.0566
4	0.050	35.6141
5	0.050	40.9772
6	0.050	43.7221
7	0.075	58.4546
8	0.075	59.7126
9	0.075	59.906
10	0.100	93.2963
11	0.100	96.8801
12	0.100	96.8801
13	0.125	97.8771
14	0.125	123.4976
15	0.125	127.0123
16	0.150	146.2788
17	0.150	148.7055
18	0.150	155.0162



Teste do Resíduo Padronizado Jackknife - Outliers

Pontos	Xi	Yi	ei	Jej
1	0.0	9	-1.30	-0.358
2	0.0	12	1.29	0.355
3	0.0	12	1.65	0.455
4	0.1	36	-2.84	-0.758
5	0.1	41	2.52	0.671
6	0.1	44	5.27	1.489
8	0.1	60	-6.79	-1.983
9	0.1	60	-6.60	-1.910
10	0.1	93	-1.25	-0.322
11	0.1	97	2.33	0.606
12	0.1	97	2.33	0.606
14	0.1	123	0.90	0.237
15	0.1	127	4.42	1.223
16	0.2	146	-4.37	-1.276
17	0.2	149	-1.94	-0.540
18	0.2	155	4.37	1.277

Macros para deletar outliers

Resumo dos Resultados

Outliers

No. deletado = 2

Normalidade

Req = 0.9759 p > 0,10  
Segue a Normal

Auto-correlação

Não há auto autocorrelação  
p > 0.10

Homogeneidade de variância

Há homocedasticidade  
p > 0,05

Desvio de linearidade

A regressão é significativa  
p < 0,001

Não há desvio de linearidade  
p > 0,05

O número de outliers deletados é

2

Teste de Ryan-Joiner - Normalidade dos resíduos (premissa para MMQO)

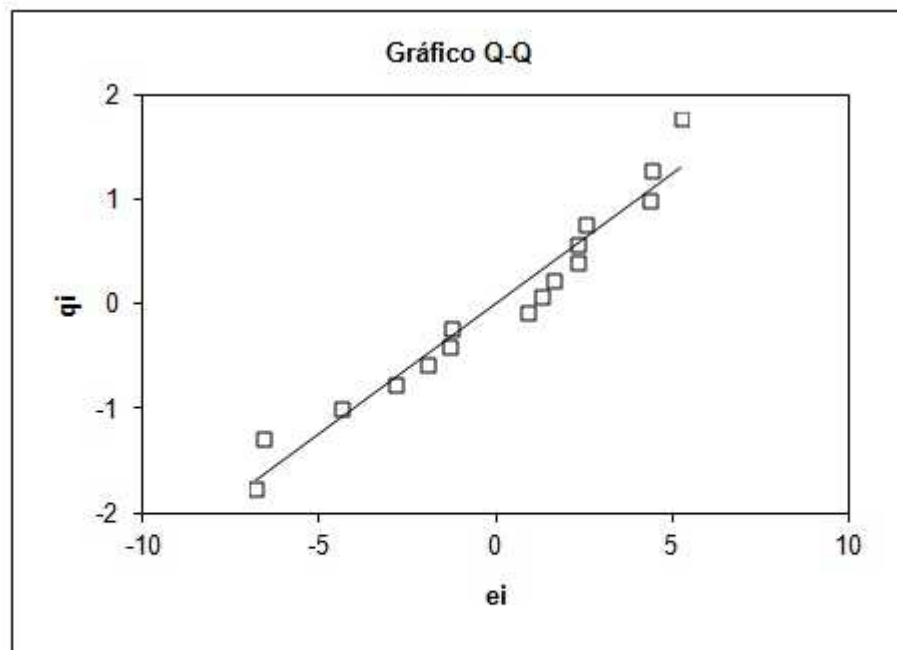
$n$	$p_i$	$q_i$	$e_i$
1	0.0385	-1.7688	-6.79
2	0.1000	-1.2816	-6.60
3	0.1615	-0.9882	-4.37
4	0.2231	-0.7618	-2.84
5	0.2846	-0.5692	-1.94
6	0.3462	-0.3957	-1.30
7	0.4077	-0.2335	-1.25
8	0.4692	-0.0772	0.90
9	0.5308	0.0772	1.29
10	0.5923	0.2335	1.65
11	0.6538	0.3957	2.33
12	0.7154	0.5692	2.33
13	0.7769	0.7618	2.52
14	0.8385	0.9882	4.37
15	0.9000	1.2816	4.42
16	0.9615	1.7688	5.27

Req = 0.9759	
Desvio da Normal : $p > 0,10$	
Conclusão	
Os resíduos seguem a Normal	

Valores Críticos de R	
Rcrit ( $\alpha$ : 0,10) = 0.9529	
Rcrit ( $\alpha$ : 0,05) = 0.9411	
Rcrit ( $\alpha$ : 0,01) = 0.9153	

Hipóteses

Ho: os resíduos seguem a distribuição Normal  
 Ha: os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade

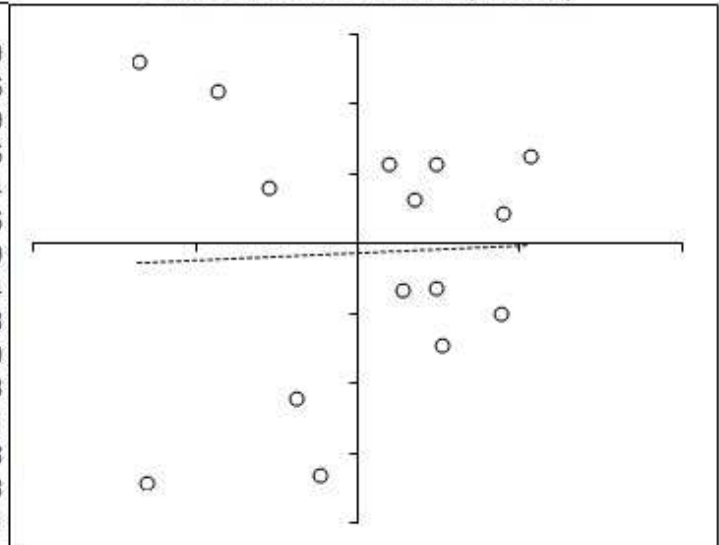


Max	Min
1.77	-1.77
5.27	-6.79

Teste de Durbin-Watson - Independência dos resíduos (premissa para MMQO)

Obser	$e_i$	$e_{i-1}$	$e_i - e_{i-1}$
1	-1.30		
2	1.29	-1.30	2.60
3	1.65	1.29	0.36
4	-2.84	1.65	-4.49
5	2.52	-2.84	5.36
6	5.27	2.52	2.74
8	-6.79	5.27	-12.06
9	-6.60	-6.79	0.19
10	-1.25	-6.60	5.34
11	2.33	-1.25	3.58
12	2.33	2.33	0.00
14	0.90	2.33	-1.43
15	4.42	0.90	3.51
16	-4.37	4.42	-8.78
17	-1.94	-4.37	2.43
18	4.37	-1.94	6.31

Gráfico de Durbin-Watson ( $e_i$  x  $e_{i-1}$ )



Max	Min
5.27	-6.79

Hipóteses

$H_0$ : não há autocorrelação entre os resíduos (Há independência)

$H_a$ : há autocorrelação entre os resíduos (Não há independência)

Conclusão

$d = 1.822$

Não há auto autocorrelação,  $p > 0.1$

$\alpha = 0.05$

Correlação Positiva	dL	Não conclusivo	dU	Não há correlação	4-dU	Não conclusivo	4-dL	Correlação Negativa
	1.11		1.37	1.822	2.63		2.89	

$\alpha = 0.025$

Correlação Positiva	dL	Não conclusivo	dU	Não há correlação	4-dU	Não conclusivo	4-dL	Correlação Negativa
	0.98		1.24	1.822	2.76		3.02	

$\alpha = 0.01$

Correlação Positiva	dL	Não conclusivo	dU	Não há correlação	4-dU	Não conclusivo	4-dL	Correlação Negativa
	0.84		1.09	1.822	2.91		3.16	

Teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado - Homogeneidade da variância dos resíduos

Hipóteses

**Ho: as variâncias dos resíduos não são diferentes (Há homocedasticidade)**  
**Ha: as variâncias dos resíduos são diferentes (Há heterocedasticidade)**

Grupo k=1	Grupo k=2	d1	d2	d1 *	d2 *
-1.3031	-1.2529	1.2983	2.8686	1.2983	2.8686
1.2934	2.3309	1.2983	0.7152	1.2983	0.7152
1.6511	2.3309	1.6560	0.7152	1.6560	0.7152
-2.8393		2.8345		2.8345	
2.5238	0.9004	2.5286	0.7152	2.5286	0.7152
5.2687	4.4151	5.2735	2.7995	5.2735	2.7995
	-4.3663		5.9819		
-6.7887	-1.9396	6.7839	3.5552	6.7839	3.5552
-6.5953	4.3711	6.5905	2.7555	6.5905	2.7555

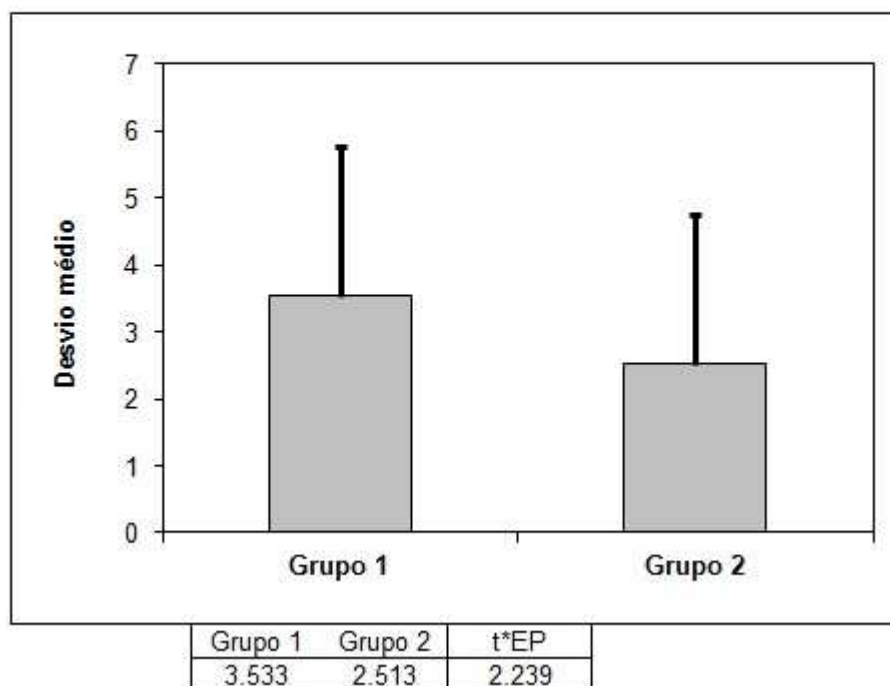
Estatística	Grupo k=1	Grupo k=2
nk	8	8
ek (mediana)	-4.9E-03	1.6E+00
dk (média)	3.53E+00	2.51E+00
SQDk	3.80E+01	2.31E+01
s2p	4.36E+00	
t <sub>L</sub>	0.977	
p	0.3453	p > 0,05

\*Corrigido para ocorrência de zero

Estatística	Grupo k=1	Grupo k=2
nk	8	8
ek (mediana)	-4.9E-03	1.6E+00
dk (média)	3.53E+00	2.02E+00
SQDk	3.80E+01	9.33E+00
s2p	3.38E+00	
t <sub>L</sub>	1.649	
p	0.1214	p > 0,05

Conclusão

**Não há evidência para rejeitar Ho**  
**Há homocedasticidade**





MMQO ou Análise de Regressão Linear (Modelo:  $Y = a + bX$ )

Estat. da Regressão	
$R^2$	0.9946188
$n$	16

Estat. auxiliares	
Sxy	3.50E+01
Sxx	3.12E-02
Syy	3.95E+04
tcrit 0,975	2.145
Jcrit 0,975	2.160

ANOVA da Regressão e do Desvio da Linearidade (Falta de Ajuste)

FV	GL	SQ	QM ou s2	F	p	Sign.	Fcrit
Regressão	1	3.93E+04	3.93E+04	2587.64	2.74E-17	$p < 0,001$	4.60011
Resíduo	14	2.13E+02	1.52E+01				
Desvio da l	4	1.18E+02	2.95E+01	3.114	6.61E-02	$p > 0,05$	3.47805
Ent.Níveis	5	3.94E+04					
Erro puro	10	9.47E+01	9.47E+00				
Total	15	3.95E+04					

Hipóteses

Ho: a regressão não é significativa

Ha: a regressão é significativa

Conclusão

A regressão é significativa  $p < 0,001$

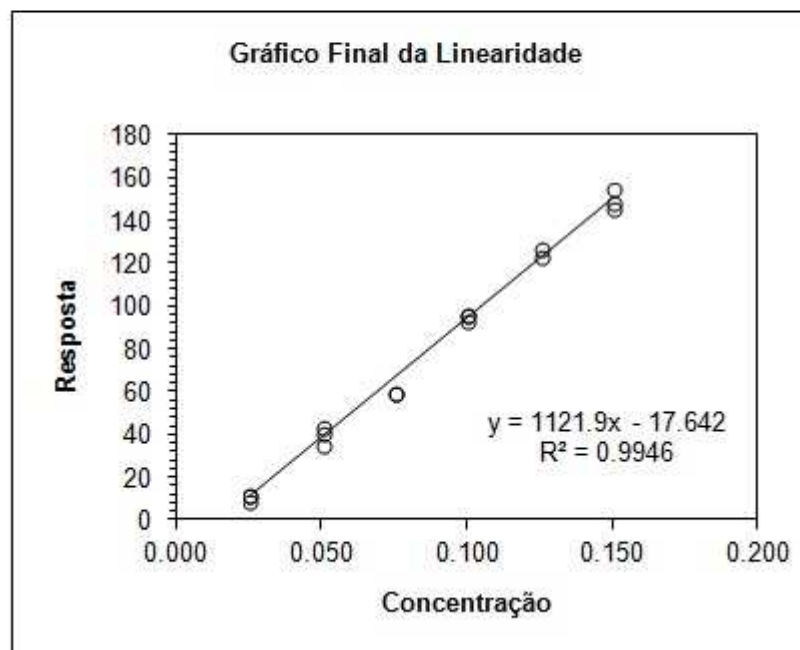
Não há desvio de linearidade  $p > 0,05$

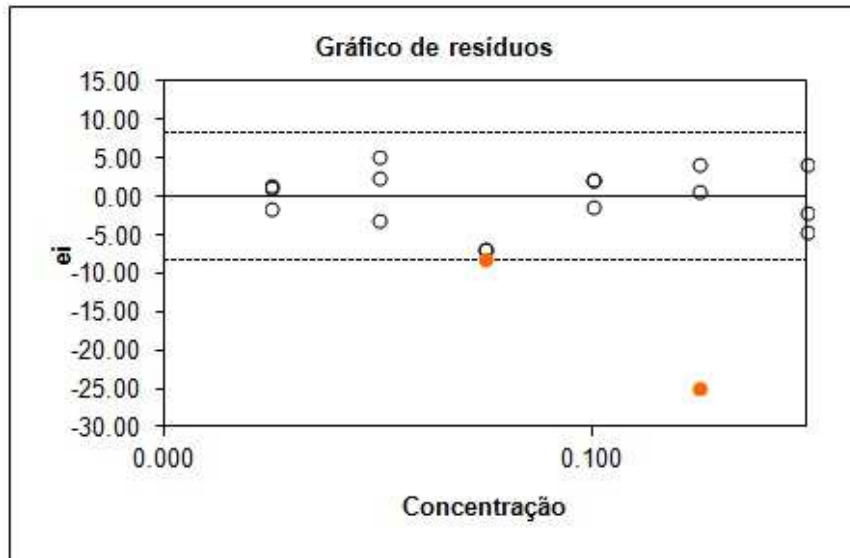
Ho: o modelo linear simples é correto (Não há desvio da linearidade)

Ha: o modelo linear simples não é correto (Há desvio da linearidade)

Estimativas dos parâmetros, desvios, significância e intervalos de confiança

Coefic.	Valor	s (EP)	Stat t	p	IC 95% inf	IC 95% sup
Linear	-17.6424	2.1310	-8.279	<b>9.17E-07</b>	-22.2130	-13.0718
Angular	1121.91640	22.05507	50.869	<b>3.87E-09</b>	1074.6130	1169.2198





Linhas do zero e do intervalo  $\pm t\sqrt{\{QMRes\}}$

X	Zero	B+	B-
0	0	8	-8
120	0	8	-8

Tabela de Outliers

X	Outlier
0.125	-24.72
0.075	-8.05

Tabela auxiliar para cálculo da Soma de Quadrado Entre Níveis

Nível	$\sum Y_k$	$nk$
1	33	3
2	120	3
3	120	2
4	287	3
5	251	2
6	450	3
Total	54460	15

$r_i$ : Resíduo Studentizado (Crit:  $t_{n-2GL}$ )

$h_i$ : Leverage (Crit:  $2p/n$ ;  $p=2$ )

$D_i$ : Distância de Cook (Crit:  $F_{50\%}$ )

Pontos	$r_i$	$h_i$	$D_i$
1	-0.371	0.188	0.016
2	0.368	0.188	0.016
3	0.470	0.188	0.026
4	-0.771	0.108	0.036
5	0.686	0.108	0.028
6	1.431	0.108	0.123
8	-1.804	0.068	0.118
9	-1.753	0.068	0.111
10	-0.333	0.068	0.004
11	0.619	0.068	0.014
12	0.619	0.068	0.014
14	0.245	0.108	0.004
15	1.199	0.108	0.087
16	-1.243	0.188	0.179
17	-0.552	0.188	0.035
18	1.245	0.188	0.179
V.Críticos	2.145	0.250	0.729

Outros testes para outliers

$$h_i = \frac{1}{n} + \frac{(X_i - \bar{X})^2}{S_{XX}}$$

Leverage

$$D_i = \frac{r_i^2}{p} \frac{h_i}{(1-h_i)}$$

Distância de Cook

$$r_i = e_i / s(e_i)$$

Resíduo studentizado

$$s(e_i) = s \sqrt{1-h_i}$$

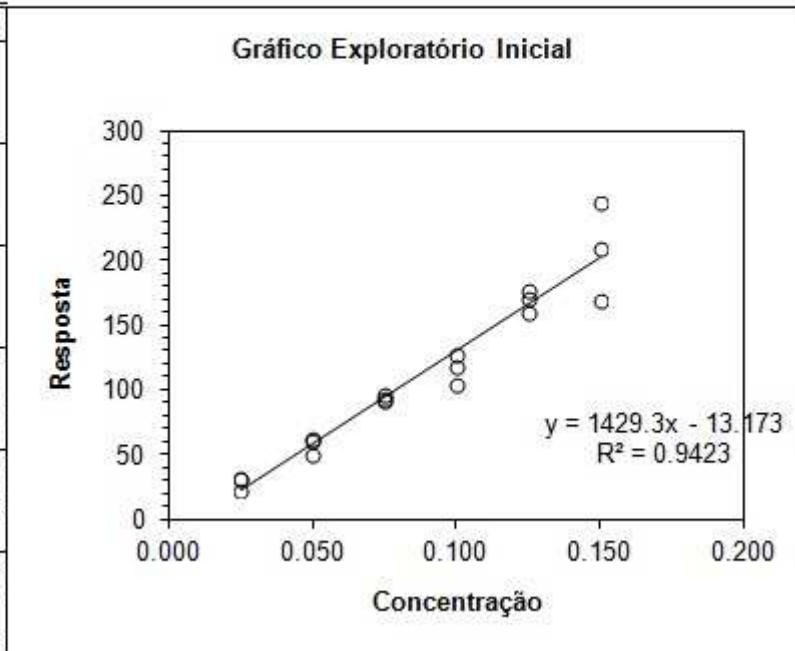
EP (resíduo)

Anexo E – Tratamento Estatístico para a Curva Padrão de Melitina.

**MELITINA - Verificação de linearidade (n = 18; 6 níveis; 3 replicatas por nível)**

Tabela de dados originais

Pontos	Conc.	Resposta
1	0.025	22.4167
2	0.025	31.507
3	0.025	30.5031
4	0.050	49.9984
5	0.050	60.3875
6	0.050	61.7721
7	0.075	93.3367
8	0.075	92.0226
9	0.075	96.5047
10	0.100	117.7877
11	0.100	126.7184
12	0.100	104.0001
13	0.125	175.7968
14	0.125	159.2452
15	0.125	170.6661
16	0.150	243.6023
17	0.150	208.5267
18	0.150	169.2096



Teste do Resíduo Padronizado Jacknife - Outliers					Macros para deletar outliers	Resumo dos Resultados	
Pontos	$X_i$	$Y_i$	$e_i$	$Je_i$		Outliers	
1	0.0	22	-1.84	-0.331	1	No. deletado = 4	
2	0.0	32	7.25	1.417	2		
3	0.0	31	6.25	1.193	3		
4	0.1	50	-10.11	-2.024	4		
5	0.1	60	0.28	0.047	5	Normalidade Req = 0.9898 $p > 0,10$ Segue a Normal	
6	0.1	62	1.66	0.285	6		
7	0.1	93	-2.63	-0.446	7		
8	0.1	92	-3.94	-0.676	8	Auto-correlação Não há auto autocorrelação $p > 0,10$	
9	0.1	97	0.54	0.090	9		
11	0.1	127	-5.11	-0.900	11	Homogeneidade de variância Há homocedasticidade $p > 0,05$	
12					12		
13	0.1	176	8.11	1.603	13		
14	0.1	159	-8.44	-1.683	14	Desvio de linearidade A regressão é significativa $p < 0,001$ Não há desvio de linearidade $p > 0,05$	
15	0.1	171	2.98	0.538	15		
17	0.2	209	4.99	1.011	17		
					18		
O número máximo de outliers deletados é					4		

Teste de Ryan-Joiner - Normalidade dos resíduos (premissa para MMQO)

$n$	$p_i$	$q_i$	$e_i$
1	0.0439	-1.7076	-10.11
2	0.1140	-1.2053	-8.44
3	0.1842	-0.8994	-5.11
4	0.2544	-0.6608	-3.94
5	0.3246	-0.4550	-2.63
6	0.3947	-0.2670	-1.84
7	0.4649	-0.0881	0.28
8	0.5351	0.0881	0.54
9	0.6053	0.2670	1.66
10	0.6754	0.4550	2.98
11	0.7456	0.6608	4.99
12	0.8158	0.8994	6.25
13	0.8860	1.2053	7.25
14	0.9561	1.7076	8.11

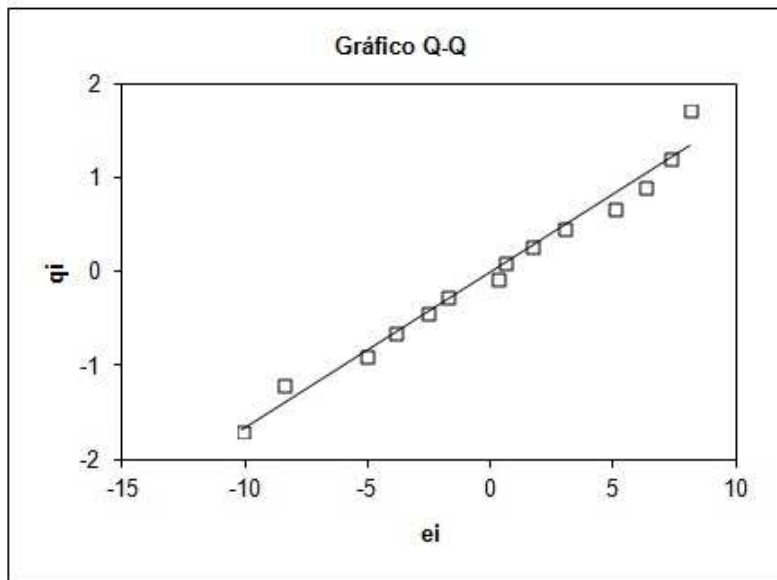
Req = 0.9898	
Desvio da Normal : $p > 0,10$	
Conclusão	
Os resíduos seguem a Normal	

Valores Críticos de R	
Rcrit ( $\alpha$ : 0,10) = 0.9481	
Rcrit ( $\alpha$ : 0,05) = 0.9351	
Rcrit ( $\alpha$ : 0,01) = 0.9061	

Hipóteses

$H_0$ : os resíduos seguem a distribuição Normal

$H_a$ : os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade

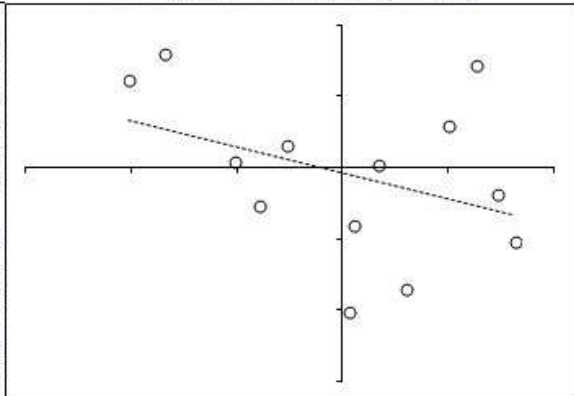


Max	Min
1.71	-1.71
8.11	-10.11

Teste de Durbin-Watson - Independência dos resíduos (premissa para MMQO)

Obser	$e_i$	$e_{i-1}$	$e_i - e_{i-1}$
1	-1.84		
2	7.25	-1.84	9.09
3	6.25	7.25	-1.00
4	-10.11	6.25	-16.36
5	0.28	-10.11	10.39
6	1.66	0.28	1.38
7	-2.63	1.66	-4.29
8	-3.94	-2.63	-1.31
9	0.54	-3.94	4.48
11	-5.11	0.54	-5.64
13	8.11	-5.11	13.22
14	-8.44	8.11	-16.55
15	2.98	-8.44	11.42
17	4.99	2.98	2.00

Gráfico de Durbin-Watson ( $e_i \times e_{i-1}$ )



Max	Min
8.11	-10.11

Hipóteses

Ho: não há autocorrelação entre os resíduos (Há independência)

Ha: há autocorrelação entre os resíduos (Não há independência)

Conclusão

$d = 2.660$

Não há auto autocorrelação,  $p > 0.1$

$\alpha = 0.05$

Correlação Positiva	dL	Não conclusivo	dU	Não há correlação	4-dU	Não conclusivo	4-dL	Correlação Negativa
	1.05		1.35		2.65	2.660	2.95	

$\alpha = 0.025$

Correlação Positiva	dL	Não conclusivo	dU	Não há correlação	4-dU	Não conclusivo	4-dL	Correlação Negativa
	0.92		1.22	2.660	2.78		3.08	

$\alpha = 0.01$

Correlação Positiva	dL	Não conclusivo	dU	Não há correlação	4-dU	Não conclusivo	4-dL	Correlação Negativa
	0.77		1.06	2.660	2.94		3.23	

MMQO ou Análise de Regressão Linear (Modelo:  $Y = a + bX$ )

<u>Estat. da Regressão</u>		<u>Estat. auxiliares</u>	
$R^2$	0.991236	Sxy	3.31E+01
		Sxx	2.31E-02
		Syy	4.79E+04
		tcrit 0,975	2.179
$n$	14	Jcrit 0,975	2.201

ANOVA da Regressão e do Desvio da Linearidade (Falta de Ajuste)

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM ou s2</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>Sign.</i>	<i>Fcrit</i>
Regressão	1	4.75E+04	4.75E+04	1357.27	1.03E-13	$p < 0,001$	4.747225
Resíduo	12	4.20E+02	3.50E+01				
Desvio da l	4	1.33E+02	3.33E+01	0.929	4.93E-01	$p > 0,05$	3.837853
Ent.Níveis	5	4.76E+04				Observar que o GL entre níveis está estabelecido para 6 níveis.	
Erro puro	8	2.87E+02	3.58E+01				
Total	13	4.79E+04					

<u>Hipóteses</u>	
<b>Conclusão</b>	<b>H<sub>0</sub>: a regressão não é significativa</b>
	<b>H<sub>a</sub>: a regressão é significativa</b>
<b>A regressão é significativa <math>p &lt; 0,001</math></b>	
<b>Não há desvio de linearidade <math>p &gt; 0,05</math></b>	<b>H<sub>0</sub>: o modelo linear simples é correto (Não há desvio da linearidade)</b>
	<b>H<sub>a</sub>: o modelo linear simples não é correto (Há desvio da linearidade)</b>

Teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado - Homogeneidade da variância dos resíduos (premissa para MMQO)

Hipóteses

<b>H<sub>0</sub>: as variâncias dos resíduos não são diferentes (Há homocedasticidade)</b>
<b>H<sub>a</sub>: as variâncias dos resíduos são diferentes (Há heterocedasticidade)</b>

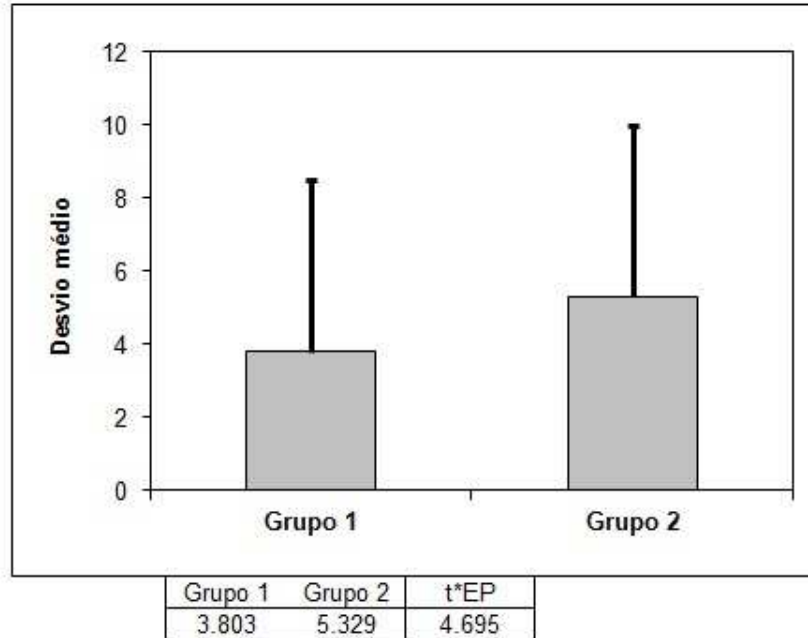
<u>Grupo k=</u>	<u>Grupo k=2</u>	<u> d1 </u>	<u> d2 </u>	<u> d1 *</u>	<u> d2 *</u>
-1.8353		2.1131		2.1131	
7.2550	-5.1068	6.9772	8.0900	6.9772	8.0900
6.2511		5.9733		5.9733	
-10.1113	8.1139	10.3891	5.1307	10.3891	5.1307
0.2778	-8.4377	0.0000	11.4209	0.2595	11.4209
1.6624	2.9832	1.3846	0.0000	1.3846	2.0029
-2.6307		2.9085		2.9085	
-3.9448	4.9861	4.2226	2.0029	4.2226	2.0029
0.5373		0.2595		0.2595	

<u>Estatística Grupo k= Grupo k=2</u>		
<i>nk</i>	9	5
ek (mediana)	2.8E-01	3.0E+00
dk (média)	3.80E+00	5.33E+00
SQDk	9.49E+01	8.42E+01
s2p	1.49E+01	
t <sub>L</sub>	-0.708	
<b>p</b>	<b>0.4924</b>	<b><math>p &gt; 0,05</math></b>

<u>*Corrigido para ocorrência de zero</u>		
<u>Estatística Grupo k=1 Grupo k=2</u>		
<i>nk</i>	9	5
ek (mediana)	2.8E-01	3.0E+00
dk (média)	3.83E+00	5.73E+00
SQDk	9.29E+01	6.61E+01
s2p	1.33E+01	
t <sub>L</sub>	-0.934	
<b>p</b>	<b>0.3685</b>	<b><math>p &gt; 0,05</math></b>

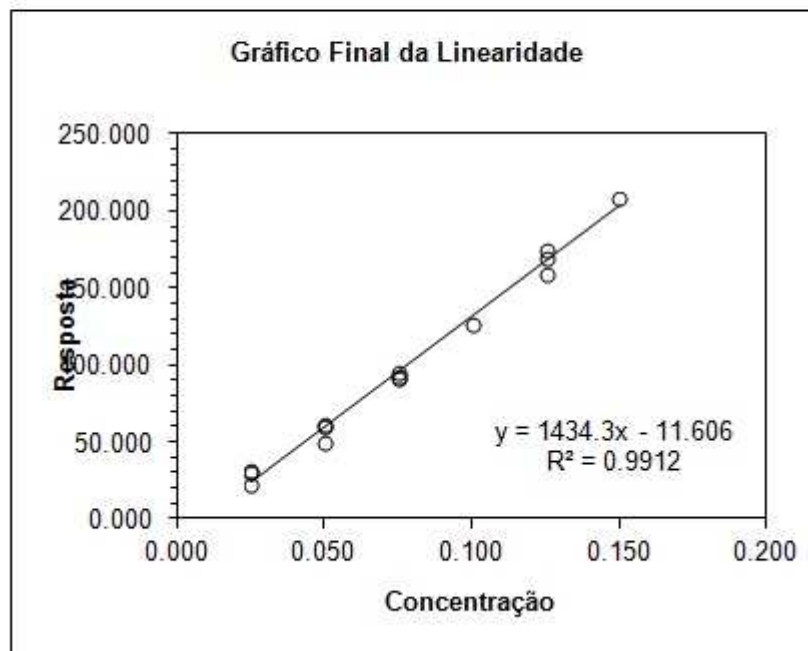
**Conclusão**

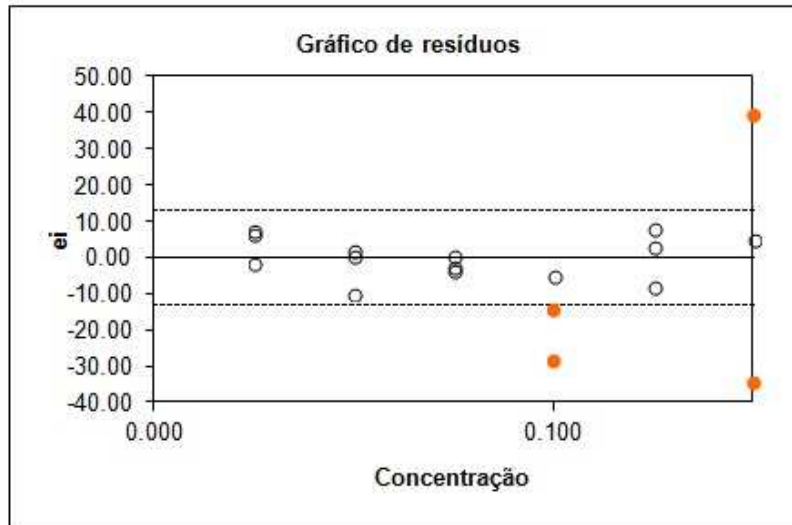
**Não há evidência para rejeitar  $H_0$   
Há homocedasticidade**



Estimativas dos parâmetros, desvios, significância e intervalos de confiança

Coefic.	Valor	s (EP)	Stat t	p	IC 95% inf	IC 95% sup
Linear	-11.6057	3.3817	-3.432	4.97E-03	-18.9737	-4.2377
Angular	1434.30881	38.93224	36.841	2.67E-08	1349.4827	1519.1349





Linhas do zero e do intervalo  $\pm t\sqrt{\{QMRes\}}$

X	Zero	B+	B-
0	0	13	-13
120	0	13	-13

Tabela de Outliers

X	Outlier
0.15	40.06
0.15	-34.33
0.1	-27.83
0.1	-14.04

Tabela auxiliar para cálculo da Soma de Quadrado Entre Níveis

Nível	$\Sigma Y_k$	$n_k$
1	84	3
2	172	3
3	282	3
4	127	1
5	506	3
6	209	1
Total	54460	15

$r_i$ : Resíduo Studentizado (Crit:  $t_{n-2, GL}$ )  
 $h_i$ : Leverage (Crit:  $2p/n$ ;  $p=2$ )  
 $D_i$ : Distância de Cook (Crit:  $F_{50\%}$ )

Pontos	$r_i$	$h_i$	$D_i$
1	-0.356	0.241	0.020
2	1.408	0.241	0.314
3	1.213	0.241	0.233
4	-1.835	0.132	0.257
5	0.050	0.132	0.000
6	0.302	0.132	0.007
7	-0.463	0.078	0.009
8	-0.695	0.078	0.020
9	0.095	0.078	0.000
11	-0.899	0.078	0.034
13	1.473	0.132	0.165
14	-1.532	0.132	0.179
15	0.541	0.132	0.022
17	0.967	0.241	0.148
V.Críticos	2.179	0.286	0.735

Outros testes para outliers

$$h_i = \frac{1}{n} + \frac{(X_i - \bar{X})^2}{S_{XX}}$$

Leverage

$$D_i = \frac{r_i^2}{p} \frac{h_i}{(1-h_i)}$$

Distância de Cook

$$r_i = e_i / s(e_i)$$

Resíduo studentizado

$$s(e_i) = s \sqrt{1-h_i}$$

EP (resíduo)