

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

EVELIN CAMPOS VERDOLIN BRANDÃO

**FRACIONAMENTO DE MELITINA A PARTIR DA APITOXINA POR
ULTRAFILTRAÇÃO COM ESCOAMENTO TANGENCIAL**

**BELO HORIZONTE - MG
2019**

EVELIN CAMPOS VERDOLIN BRANDÃO

**FRACIONAMENTO DE MELITINA A PARTIR DA APITOXINA POR
ULTRAFILTRAÇÃO COM ESCOAMENTO TANGENCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Linha de Pesquisa: Processo de separação
Orientador (a): Dr^a. Kátia Cecília de Souza Figueiredo

BELO HORIZONTE – MG
2019

B817f	<p>Brandão, Evelin Campos Verdolin. Fracionamento de melitina a partir da apitoxina por ultrafiltração com escoamento tangencial [recurso eletrônico] / Evelin Campos Verdolin Brandão. - 2019. 1 recurso online (xvi, 72 f. : il., color.) : pdf.</p> <p>Orientadora: Kátia Cecília de Souza Figueiredo.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.</p> <p>Bibliografia: f. 65-72.</p> <p>Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.</p> <p>1. Engenharia química - Teses. 2. Abelha - Teses. 3. Fosfolipase A2 - Teses. 4. Planejamento experimental - Teses. 5. Ultrafiltração. - Teses. 6. Veneno - Teses. I. Figueiredo, Kátia Cecília de Souza. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 66.0 (043)</p>
-------	---



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

***“FRACIONAMENTO DE MELITINA A PARTIR DA
APITOXINA POR ULTRAFILTRAÇÃO COM
ESCOAMENTO TANGENCIAL ”***

Evelin Campos Verdolin Brandão

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos à obtenção do título de **MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA**.

**Número^a TESE (DISSERTAÇÃO) APROVADA EM 24 DE MÊS DE ABRIL 2019
POR:**

.....
Prof. Dr. Eduardo Coutinho de Paula DESA/UFMG

.....
Profa. Dra. Viviane Santos Birchall DEQ/UFMG

.....
Msc. Júlio César Moreira Brito SRVO/FUNED

.....
Prof. Dr.
Orientador – Kátia Cecília de Souza Figueiredo DEQ/UFMG

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por toda força, disposição e coragem que me ofereceu para alcançar meus objetivos.

Extensivos agradecimentos as pessoas que fazem parte da minha vida. A minha mãe Iracy, por nunca ter medido esforços para que eu alcançasse os meus propósitos e por sempre me incentivar e torcer pelas minhas conquistas. Ao meu pai em memória, que mesmo estando em outro plano sei que está sempre torcendo por mim e me mostrando o caminho certo a ser seguido. Ao meu namorado Caleu, por ter dado carinho e atenção em um dos momentos mais importantes na realização do trabalho...Te Amo! Aos meus amigos, em especial Bruna, Raíssa, Sayeny e Vinícius Vivas, por estarem sempre do meu lado me incentivando, apoiando. E toda minha família, em especial a minha Tia Itacy, pelos conselhos e cuidado incondicionais e ao Tio Marcos por sempre torcer por mim.

Meu reconhecimento vai também para a minha orientadora Dra. Kátia Figueiredo pela oportunidade que me proporcionou de realizar esta pós-graduação e também pelas instruções e acompanhamento. Ao meu coorientador Júlio Brito que sempre solicito me instruiu e mesmo nas dificuldades sempre acreditou no meu potencial.

Expresso meu obrigado à FUNED por ter disponibilizado seus laboratórios para as análises e execução desse projeto. Ao pessoal técnico e aos estagiários, especialmente Vivian, Laurenice, Rânia, Paula, Lívia, Vera, Lídia, Ana, Thaís, Vinícius e Iago, pelo apoio e laço de amizade criado durante estes dois anos. Vocês tornaram meus dias de trabalho mais divertidos e agradáveis.

A todos os amigos da Pós e do Grupo de pesquisa, pela colaboração e pelos momentos e encontros alegres e enriquecedores que passamos juntos.

Meus agradecimentos dirigem igualmente a todos aqueles que acreditaram no meu potencial, e que de alguma forma contribuíram ou simplesmente confiaram em mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e à Universidade Federal de Minas Gerais.

À CAPES, agradeço pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de mestrado.

“Unfortunately, there is no such membrane which can separate happiness and sorrow of our life”. T. Matsuura

RESUMO

A apitoxina, veneno da abelha, vem sendo utilizada há anos como medicamento para várias doenças inflamatórias. Os benefícios desse veneno provêm, principalmente, da melitina, que se encontra junto a outros componentes da apitoxina com alto potencial alergênico - fosfolipase A₂ (PLA₂) e hialuronidase, por exemplo. Assim, a separação da melitina é importante por ser um produto almejado no âmbito farmacêutico e cosmético, além do seu alto valor agregado. Portanto, uma ultrafiltração com escoamento tangencial e membrana comercial de celulose regenerada de 10 kDa foi utilizada como método de separação, objetivando alcançar uma concentração de permeado para a redução na concentração dos compostos alergênicos. Na primeira etapa, um planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central foi realizado visando investigar os efeitos da concentração da apitoxina e a variação da pressão aplicada no fluxo de permeado, na recuperação da melitina e na rejeição a PLA₂, na qual definiu-se a melhor condição de trabalho: menor concentração – 1,0 mg/mL – e a maior pressão – 1,5 bar. Com essa definição, a segunda etapa foi desenvolvida avaliando o declínio do fluxo durante a ultrafiltração, os mecanismos de incrustação presentes no processo por meio do modelo de Hermia modificado sendo, posteriormente, efetuada uma limpeza química após finalizados todos os experimentos. Os resultados obtidos mostraram uma recuperação média de melitina de 70% e rejeição de 99% de PLA₂. O declínio de fluxo foi causado em sua maioria pelo *fouling* devido à atuação de vários mecanismos, sem uma definição mais precisa. A limpeza química mostrou uma recuperação no fluxo de 91,69% e remoção da resistência de 94,10%. Portanto, tem-se que a ultrafiltração com escoamento tangencial pode ser uma opção atrativa para o fracionamento de melitina a partir da apitoxina.

Palavras-chave: Ultrafiltração, melitina, fosfolipase A₂, planejamento fatorial, veneno de abelha.

ABSTRACT

Apitoxin, bee venom, has been used for years as a medicine for various inflammatory diseases. The benefits of this venom are mainly provided by melittin, which is present with other high allergenic potential components, phospholipase A₂ (PLA₂) and hyaluronidase, for example. Thereby, the separation of melittin from apitoxin becomes feasible, since it is a desired product in the pharmaceutical and cosmetic industries also has a high added value. Hence, ultrafiltration with a tangential flow and commercial membrane of regenerated cellulose of 10 kDa was used as a separation method, in order to reach a concentration of permeate with the smallest fraction of these allergenic compounds. In the first step, a 2² factorial design with triplicate at the central point was performed to investigate the effects of apitoxin concentration and pressure difference on permeate flow, melittin recovery, and PLA₂ rejection, in which was defined the optimal working condition: lower concentration - 1.0 mg / mL - and the highest pressure - 1.5 bar. Based on these results, the second step was carried out to evaluate the flux decline during ultrafiltration and the incrustation mechanisms present in the process using the modified Hermia model. Hereafter, a chemical cleaning was performed after completing all experiments. As a result, the permeate flux decline was mostly caused by fouling because of several mechanisms acting without a more precise definition. The membrane cleaning depicted a recovery of 91.69% in the permeate flux and reduce 94.10% of resistance. Finally, it may be concluded that ultrafiltration using tangential flow has been an attractive option for the separation of melittin from apitoxin.

Keywords: Ultrafiltration, melittin, phospholipase A₂, factorial design, bee venom.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da sequência dos resíduos de aminoácidos de fosfolipase A ₂ presente na apitoxina.	24
Figura 2 - Representação estrutura química da hialuronidase presente na apitoxina....	24
Figura 3 - Representação da sequência dos resíduos de aminoácidos da apamina presente na apitoxina	25
Figura 4 - Representação da sequência de aminoácidos da Melitina presente na apitoxina.	25
Figura 5 - Formas estruturais da melitina (a) tetramérica e (b) monomérica.....	26
Figura 6 - Mecanismos de filtração: a) frontal e b) tangencial.....	30
Figura 7 - Comportamento do declínio do fluxo do permeado quando comparado a filtração da água pura com a filtração envolvendo a presença de polarização de concentração e do fouling.....	34
Figura 8 - Fase fluida adjacente à membrana e seu perfil de concentrações em estado estacionário.....	35
Figura 9 - Ilustração do comportamento dos quatro tipos de incrustações representadas pelo modelo de Hermia: (a) bloqueio completo, (b) bloqueio intermediário, (c) bloqueio padrão e (d) formação de torta.....	36
Figura 10 – Foto do sistema de recirculação total (esquerda) e seu respectivo diagrama utilizado para ultrafiltração (direita).....	39
Figura 11 - Curva de calibração do padrão de fosfolipase A ₂	47
Figura 12 - Curva de calibração do padrão de melitina.	47
Figura 13 - Cromatograma da solução de apitoxina de 1,0 mg/mL. Bandas de absorção da melitina e da PLA ₂ indicado pelas setas.	48
Figura 14 - Cromatograma do permeado obtido pela ultrafiltração da solução de apitoxina de 1,0 mg/mL. Bandas de absorção da melitina e da PLA ₂ indicado pelas setas.	48
Figura 15 - Cromatograma da solução de apitoxina de 1,0 mg/mL para a primeira corrida. Bandas de absorção da melitina e da PLA ₂ indicado pelas setas.....	49
Figura 16 - Cromatograma do permeado obtido pela primeira ultrafiltração da solução de apitoxina de 1,0 mg/mL. Bandas de absorção da melitina e da PLA ₂ indicado pelas setas.	50

Figura 17 - Comportamento do fluxo de permeado dos experimentos propostos no planejamento com seus respectivos valores de concentração de apitoxina e a diferentes pressões. T = 25 °C. Re = 10,75 – Escoamento laminar.	51
Figura 18 - Gráfico da análise de massa de melitina recuperada em função da porcentagem de recuperação. T = 25°C. ΔP = 1,5 bar. Re = 7,17 – Escoamento laminar.	58
Figura 19 - Fluxo normalizado em função do tempo para as três corridas realizadas. T = 25°C. ΔP = 1,5 bar. Re = 7,17 – Escoamento laminar	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais constituintes da apitoxina, suas respectivas massas molares, bem como a porcentagem em relação a concentração da sua massa seca.	22
Tabela 2 - Equações representativas dos mecanismos de incrustações apresentados pelo Modelo de Hermia modificado.	37
Tabela 3 - Dados técnicos e operacionais da membrana de ultrafiltração.	39
Tabela 4 - Condições experimentais e os níveis de cada variável.	40
Tabela 5 - Permeabilidade hidráulica (L_p) fornecida pelo fabricante e calculada experimentalmente.	46
Tabela 6 - Resposta das variáveis dependentes do planejamento experimental da ultrafiltração de apitoxina. $T = 25^\circ\text{C}$. $Re = 10,75$ – Escoamento laminar.	52
Tabela 7 - Valor do efeito estimado da concentração de apitoxina, pressão do sistema e interação entre eles para variável resposta J_p	53
Tabela 8 - Valor do efeito estimado da concentração de apitoxina, pressão do sistema e interação entre eles para variável resposta $RecM$	53
Tabela 9 - Valor do efeito estimado da concentração de apitoxina, pressão do sistema e interação entre eles para variável resposta $RejF$	54
Tabela 10 – Tendências das variáveis independentes de acordo com as suas respectivas variáveis respostas.	55
Tabela 11 - Dados referente ao declínio do fluxo para as três corridas.	59
Tabela 12 - Coeficiente de determinação obtido para cada mecanismo de incrustação das três corridas.	60
Tabela 13 - Dados do fluxo e da resistência removida após a limpeza da membrana. .	61
Tabela 14 - Dados da recuperação da melitina e da rejeição da PLA2.	62

LISTA DE SIGLAS

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CR – Celulose regenerada
CtPt – Ponto Central
Da – Dalton
EC – Eletroforese Capilar
ECZ – Eletroforese Capilar Zona
FUNED – Fundação Ezequiel Dias
kDa – kilo Dalton
MWCO – *molecular weight cut off*
nm – nanômetro
PC – Polarização de concentração
PDA – Detector de Arranjo de Diodo
PSM – Processo de separação com membranas
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
 X_1 – Variável independente para concentração de apitoxina
 X_2 – Variável independente para a diferença de pressão
Y – Variável dependente
 μm – micrômetro

LISTA DE SIMBOLOS

ΔP	Diferença de pressão	[Bar]
A_m	Área efetiva da membrana	[m ²]
C_A	Concentração na alimentação	[mg/mL]
C_{Ab}	Concentração de soluto no seio da solução	[mg/mL]
C_{Am}	Concentração de soluto na superfície da membrana	[mg/mL]
C_{ap}	Concentração de apitoxina	[mg/mL]
C_P	Concentração no permeado	[mg/mL]
DF	Declínio do fluxo	[%]
DIF	Declínio Irreversível do fluxo	[%]
DRF	Declínio Reversível do fluxo	[%]
F_0	Estatística F	[]
FR	Fluxo recuperado	[%]
J_0	Fluxo de permeado inicial	[L/m ² .h]
J_{0calc}	Fluxo inicial calculado	[L/m ² .h]
J_{0exp}	Fluxo inicial experimental	[L/m ² .h]
J_{Ai}	Fluxo inicial da água	[L/m ² .h]
J_{AO}	Fluxo de água para a membrana usada pela primeira vez	[L/m ² .h]
J_{LA}	Fluxo de água após a limpeza da membrana com água	[L/m ² .h]
J_{LQ}	Fluxo de água após a limpeza química da membrana	[L/m ² .h]
J_P	Fluxo de permeado	[L/m ² .h]
J_{SA0}	Fluxo inicial da solução de apitoxina	[L/m ² .h]
J_{SAf}	Fluxo final da solução de apitoxina	[L/m ² .h]
k	Coefficiente de transferência de massa	[]
L_p	Permeabilidade hidráulica	[L/m ² .h.bar]
p	Valor de p	[]
PR	Porcentagem de Recuperação	[%]
R^2	Coefficiente de determinação	[]
Re	Número de Reynolds	[]
Rec	Recuperação	[%]
RecM	Recuperação de Melitina	[%]
Rej	Rejeição	[%]
RejF	Rejeição de fosfolipase A ₂	[%]

R_F	Resistência devido ao <i>fouling</i>	[1/m]
R_L	Resistência após a limpeza	[1/m]
R_M	Resistência da membrana	[1/m]
RR	Resistência removida	[%]
t	Tempo	[h]
V_0	Volume inicial da solução	[L]
V_P	Volume de Permeado	[L]

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVO	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 APITOXINA.....	22
3.1.1 Fosfolipase A₂	23
3.1.2 Hialuronidase	24
3.1.3 Apamina	25
3.1.4 Melitina	25
3.2 PROCESSO DE SEPARAÇÃO DA MELITINA.....	27
3.2.1 Técnicas cromatográficas	27
3.2.2 Eletroforese	28
3.2.3 Processo de separação por membrana	30
3.2.3.1 Ultrafiltração.....	31
3.2.3.2 Fatores limitantes na transferência de massa adjacente à membrana	33
3.2.3.2.1 Modelo de Hermia adaptado.....	35
4. METODOLOGIA	38
4.1 PREPARO DA SOLUÇÃO	38
4.2 CARACTERÍSTICAS DA MEMBRANA	38
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	40
4.3.1 Primeira etapa – Planejamento experimental	40
4.3.2 Segunda etapa – Execução da condição ótima	41
4.4 PROCEDIMENTO DE LIMPEZA QUÍMICA DA MEMBRANA	43
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E PRODUTOS OBTIDOS.....	44
4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 PERMEABILIDADE HIDRÁULICA DA MEMBRANA	46
5.2 ANÁLISE DA CLAE	46
5.3 PRIMEIRA ETAPA	51
5.3.1 Ultrafiltração da solução de apitoxina	51
5.3.2 Planejamento experimental	52

5.4 SEGUNDA ETAPA.....	57
5.4.1 Ultrafiltração da apitoxina	57
5.4.3 Avaliação da eficiência da limpeza química da membrana	61
5.4.4 Análise da CLAE	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	65

1. INTRODUÇÃO

A apiterapia tem por definição o uso de produtos produzidos pelas abelhas com fins medicinais como mel, pólen, própolis, geleia real e veneno. Esta terapia tem sido praticada há milhares de anos em diversas civilizações. Dados históricos mostram que na antiguidade os egípcios, gregos e chineses já usavam esses produtos, provenientes da abelha, para tratamento de enfermidades (ALI, 2012).

Em específico, a apitoxina, veneno da espécie de abelha *Apis mellifera*, é composta quimicamente de enzimas, peptídeos e amins. Assim, estudos mostram que ele é utilizado para o tratamento de diversas doenças, como artrite (HYE et al., 2004), câncer (RADY et al., 2017), esclerose múltipla (MIRSHAFIEY, 2007) e doença de Parkinson (AWAD et al., 2017), além de atenuar a infectividade do HIV-1 (HOOD et al., 2013), por exemplo.

A melitina é a molécula mais abundante na apitoxina, constituindo cerca de 50% em sua massa seca, com fórmula química $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$ e massa molar igual a 2,84 kDa. Este peptídeo é composto por 26 resíduos de aminoácidos com uma sequência caracterizada por GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (GLÄTTLI; CHANDRASEKHAR; VAN GUNSTEREN, 2006)

Os benefícios da melitina classificam-na como um produto de alto valor agregado para as indústrias farmacêuticas e cosméticas. Por exemplo, um único miligrama de melitina com pureza acima de 85% vale em torno de US\$ 62,60 (MILIPORE SIGMA, 2019). No entanto, este peptídeo está presente na apitoxina em conjunto com outros compostos de alto potencial alergênico, como a fosfolipase A₂ (PLA₂) e a hialuronidase (MÜLLER e HELBLING, 2013). Por conseguinte, a separação dos mesmos, em sua maioria, torna o processo muito oneroso, necessitando de mais etapas para chegar a um produto final com tamanha pureza (TEOH; RYU; LEE, 2017).

Assim, os processos de separação dos componentes da apitoxina vêm sendo estudados e aprimorados com o passar do tempo. Pesquisas pioneiras mostram o uso de filtração em gel, tais como as colunas Sephadex G-25 e G-50 acompanhadas por cromatografia de troca iônica em Sephadex C-25 (BANKS et al., 1981; MAULET; BRODBECK; FULPIUS, 1982). A utilização de cromatografia líquida rápida de proteína equipada com uma coluna de permeação em gel foi estudada por Nguyen e colaboradores (2015), na qual se obteve melitina com a presença de apamina – neurotoxina que causa efeitos cardioestimulantes (NGUYEN, et al., 2015). Em um estudo recente, Teoh e

colaboradores (2017) reportam a purificação da melitina a partir de um único passo, utilizando resinas de cromatografia de troca catiônica (TEOH; RYU; LEE, 2017). Todavia, o uso dos métodos cromatográficos eleva os custos de produção e torna complexo o seu escalonamento industrial e consequente comercialização desse produto a um preço mais acessível, o que faz dele um processo pouco rentável.

Embora pouco mencionada na literatura quando comparada as outras técnicas mencionadas anteriormente, a ultrafiltração com membrana polimérica é um método eficiente para separar componentes com uma grande variação de massa molar (NOBLE e STERN, 2003), como é o caso da melitina, com 2,84 kDa, e os outros compostos alergênicos com massa molar entre 19-50 kDa. Além disso, a ultrafiltração é muito vantajosa quando se deseja concentrar, purificar e/ou fracionar biomoléculas em solução aquosa, uma vez que não utiliza aditivos químicos, as temperaturas de operação são relativamente baixas e, em muitos casos a força motriz necessária para o funcionamento do processo é apenas a diferença de pressão entre a alimentação e o permeado (MULDER, 1996; HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Todos esses fatores favorecem a não desnaturação, degradação ou desativação das macromoléculas em estudo (ZYDNEY, 2010).

Portanto, a ultrafiltração é um processo com grande potencial, por ter menores custos em escala industrial quando comparada à cromatografia (LIGHTFOOT; MOSCARIELLO, 2004). Ademais, por meio da ultrafiltração, a melitina concentrada e sem as enzimas alergênicas, fração de alta aplicação biotecnológica frente a diversas patologias, poderá ser um produto mais viável economicamente, já que os recursos utilizados oneram menos a operação comparado com outros processos tais como cromatografia líquida.

À luz dessa hipótese, o objetivo principal desta pesquisa foi fracionar a melitina da apitoxina usando um sistema de ultrafiltração tangencial. Ela foi realizada, simultaneamente, no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e na Fundação Ezequiel Dias (FUNED), buscando melhorias nas condições de trabalhos realizados previamente (BRITO, 2015; TEMPONI et al., 2015).

Brito (2015), pioneiros no grupo de estudo, utilizaram concentrações altas – na faixa de 10 até 50 g/L de apitoxina com intervalos de 5 g/L entre cada amostra – e a ultrafiltração frontal com agitação, sistema comercial Amicon®. Buscando otimizar este processo, Temponi e colaboradores (2015) usaram condições com menores concentrações – 0,5 a 1,5 g/L – e uma cela de acrílico de fluxo tangencial, cuja hidrodinâmica favoreceu

a não deposição de soluto na superfície da membrana. Por fim, para a presente dissertação, um novo sistema de ultrafiltração tangencial foi projetado, em aço inox 317 L (grau farmacêutico), pelo grupo. As menores concentrações foram mantidas, no entanto a análise da seletividade foi realizada com auxílio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os experimentos foram divididos em duas etapas, sendo a primeira responsável pela determinação da condição ótima de trabalho e a segunda o desenvolvimento e análise dessa condição, visando obter parâmetros para escalar industrialmente este processo.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve como objetivo geral desenvolver o processo de fracionamento da melitina, em soluções de baixas concentrações, a partir do veneno da *Apis mellifera* (apitoxina) por meio de um sistema de ultrafiltração com escoamento tangencial usando membrana comercial de celulose regenerada de 10kDa.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Os objetivos específicos destacam-se a seguir:

- ✓ Obter uma fração com a redução da fosfolipase A₂ e a hialuronidase e maior concentração de apitoxina por meio da ultrafiltração com uma membrana comercial de celulose regenerada de 10 kDa em um sistema com escoamento tangencial;
- ✓ Avaliar o efeito da concentração de apitoxina e da diferença de pressão em relação ao fluxo e à seletividade a partir de um modelo estatístico;
- ✓ Analisar as soluções de apitoxina e de permeado por meio da cromatografia líquida de alta eficiência visando a quantificação de melitina e fosfolipase A₂;
- ✓ Avaliar condições de declínio do fluxo de permeado e os mecanismos de incrustações, bem com as condições de recuperação do fluxo a partir da limpeza da membrana.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 APITOXINA

A apitoxina é o nome dado ao veneno produzido pelas abelhas europeias e armazenado em suas glândulas abdominais como medida de defesa. Este consiste em um líquido transparente de pH entre 4,5 a 5,5 que se cristaliza em temperatura ambiente (ALI, 2012) e ao ser injetado, ele causa inflamação na região afetada, efeito coagulante, além de uma resposta imune do corpo (CORNARA et al., 2017).

Existem aproximadamente 20 substâncias com diversas atividades biológicas e farmacológicas, incluindo peptídeos, enzimas e outros elementos bioativos na apitoxina (ALI, 2012). Os principais constituintes estão demonstrados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Principais constituintes da apitoxina, suas respectivas massas molares, bem como a porcentagem em relação a concentração da sua massa seca.

Classe	Componentes	Massa Molar (Da)	% Mássica Seca
Enzimas	Fosfolipase A ₂	19000	12
	Hialuronidase	45000-50000	2
Peptídeos	Adolapamina	11500	2
	Melitina	2840	50
	Peptídeo MCD	2588	2
	Secapina	2660	0,5
	Apamina	2036	2 – 3
	Tertiapina	2000	0,5
Aminas	Histamina	111	1
	Dopamina	153	1
	Adrenalina	169	1

Fonte: Adaptado Oršolić (2012).

Os primeiros relatos de caráter científico dos benefícios da apitoxina aconteceram com o australiano Philip Terčar, que ao ser picado por um enxame de abelhas observou que suas dores nas articulações haviam diminuído (BOGDANOV, 2016). Com isso, em 1888, acredita-se que ele tenha publicado o primeiro livro sobre a aplicação do veneno de abelha no tratamento de pacientes com reumatismo (CHEN; LARIVIERE, 2010). No entanto, as caracterizações das substâncias presente na apitoxina foram sendo feitas a partir de 1950, quando as técnicas cromatográficas e as eletroforéticas foram se desenvolvendo (PACÁKOVÁ et al., 1995). Assim, Habermann (1954) realizou um dos

primeiros estudos acerca da identificação desses componentes (HABERMANN, 1972). Outras pesquisas investigaram os mecanismos de ação de cada composto e, como consequência, os benefícios dessa terapia alternativa para o tratamento de várias doenças, tais como as inflamatórias crônicas, incluindo artrite, reumatismo e dores na coluna (CHEN; LARIVIERE, 2010; HYE et al., 2004; SOBRAL et al., 2016), a esclerose múltipla (MIRSHAFIEY, 2007), imunoterapia (CORNARA et al., 2017), Parkinson (AWAD et al., 2017) e câncer (ORŠOLIĆ, 2012; RADY et al., 2017; SON et al., 2007).

Utilizando como exemplo a artrite, doença que afeta cerca de 0,5 a 1,0% da população mundial de adultos, e especificamente o Brasil, dados mostram que cerca de 1,3 milhão de brasileiros são afetados por essa doença (COSTA et al., 2014). Dependendo do tratamento, cada paciente gera um gasto médio anual em torno de R\$ 30.000,00 (SILVA et al., 2018) resultando em uma despesa de 140 milhões de reais com medicamentos, diagnósticos e terapias correspondendo a 10,4% dos recursos alocados à saúde pública (CARIAS et al., 2011).

Alguns dos compostos da apitoxina mais relevantes dentro dos estudos científicos serão descritos em maior detalhamento, mostrando principalmente sua estrutura e como eles atuam dentro do nosso corpo.

3.1.1 Fosfolipase A₂

Também conhecida pela sigla PLA₂, a fosfolipase A₂ é uma enzima que constitui de 10 a 12% da massa seca do veneno, possui massa molar de aproximadamente 19kDa e efeito anti-inflamatório (ALI, 2012). Caracterizada por ser o alergênico mais forte dentre os componentes do veneno de abelha, ela ataca os fosfolipídios presente na membrana celular, diminuindo a coagulação e a pressão sanguínea (ORŠOLIĆ, 2012).

Sua estrutura consiste em uma cadeia simples com 128 resíduos de aminoácidos, como mostrado na Figura 1.

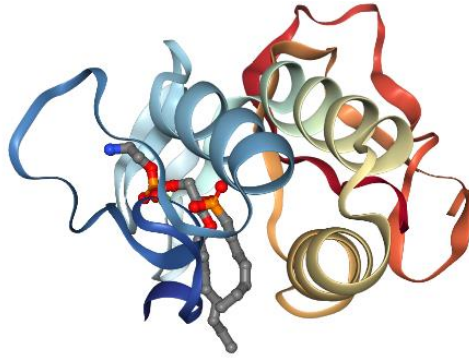


Figura 1 - Representação da sequência dos resíduos de aminoácidos de fosfolipase A₂ presente na apitoxina.
Fonte: RCSB PDB (rcsb.org) ID 1POC (2019a)

Exceto para as pessoas alérgicas a PLA₂, uma pequena dose não apresenta danos à saúde, porém quando a pessoa é submetida a várias picadas ocorrem efeitos toxicológicos que podem ser letais (BANKS; SHIPOLINI, 1986).

3.1.2 Hialuronidase

A hialuronidase compõe 1 a 3% da apitoxina e possui massa molar em torno de 45 kDa (ALI, 2012). Essa enzima tem um caráter alergênico, além de ser facilitadora na difusão de líquidos. Está associada a hipersensibilidade e a ocorrência de reação anafilática à picada de abelha. Ela ataca os polímeros de ácido hialurônico presente no tecido conjuntivo, catalisa a hidrólise de proteínas permitindo a diminuição da viscosidade do tecido e assim a penetração do veneno para o mesmo (BANKS; SHIPOLINI, 1986). A estrutura molecular da hialuronidase é mostrada na Figura 2 a seguir:

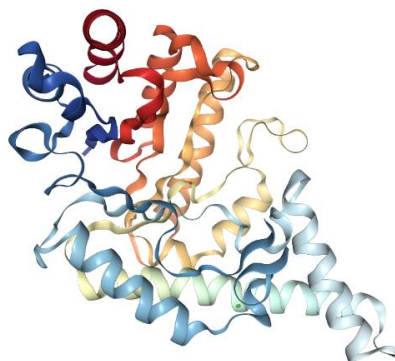


Figura 2 - Representação estrutura química da hialuronidase presente na apitoxina.
Fonte: RCSB PDB (rcsb.org) ID 1FCQ (2019b)

3.1.3 Apamina

Peptídeo de baixa massa molar, próximo a 2 kDa, contendo 18 resíduos de aminoácidos fortemente interligados pela presença de duas ligações dissulfeto, ilustrada na Figura 3:

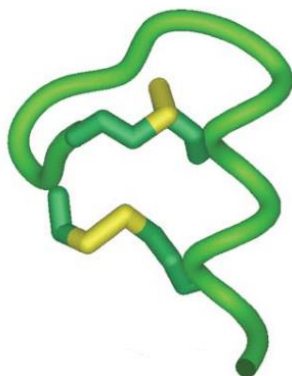


Figura 3 - Representação da sequência dos resíduos de aminoácidos da apamina presente na apitoxina
Fonte: (NICOLLI et al., 2006).

A ação tóxica do seu mecanismo de ataque é bem específica, exercendo bloqueio de canais de Ca^{2+} e K^{+} presentes no sistema nervoso central, sistemas musculares e cardiovascular (CORNARA et al., 2017).

Segundo Ali (2012), apamina aumenta a produção de cortisol pela glândula suprarrenal, componente do sistema endócrino e localizada acima do rim.

3.1.4 Melitina

A melitina possui massa molar de 2,84 kDa e compõe cerca de 50% da massa seca da apitoxina, sendo o principal componente do veneno de abelha (HABERMANN, 1972). Possui 26 resíduos de aminoácidos representados na Figura 4 (BANKS e SHIPOLINI, 1986).

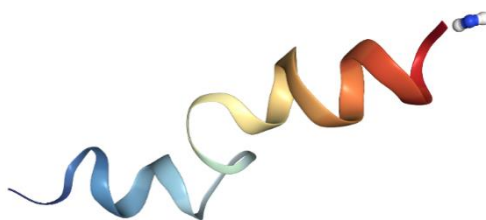


Figura 4 - Representação da sequência de aminoácidos da Melitina presente na apitoxina.
Fonte: RCSB PDB (rcsb.org) ID 1BH1 (2019c)

Desempenha atividade anti-inflamatória, antiartrítica, anticancerígena, antibacteriana, antiviral e antifúngica (ORŠOLIĆ, 2012). Ela também pode desencadear a ruptura da parede das células musculares, células tronco, leucócitos, entre outros, sendo mais agravada na presença da fosfolipase A₂ (STRONG; WADSWORTH, 2000). Habilidades como a modificação da membrana celular e estimulação de enzimas, como a fosfolipase, faz com que a melitina tenha diversas propriedades terapêuticas (KUNITZ, 2015). Na revisão escrita por Cornara e colaboradores (2017), eles descrevem, por meio de pesquisas recentes, como a melitina passou a ser um produto de interesse para as indústrias de biotecnologia devido a estas atividades biológicas distintas (CORNARA et al., 2017).

Dependendo de várias condições do meio, a melitina pode sofrer modificações em sua conformação. Variáveis como concentração, pH, temperatura, força iônicas são fatores que fazem com que a melitina seja encontrada na forma tetramérica ou monomérica. Segundo Shai (2002), a melitina é um monômero quando se encontra em concentrações e força iônica baixas (SHAI, 2002), em contrapartida, quando está em altas concentrações e na presença de grande quantidade de íons, a melitina tende a aglomerar e adquirir a conformação tetramérica (BANKS e SHIPOLINI, 1986). Quay e Condie (1983) chegaram nessa mesma conclusão ao analisarem a cinética de equilíbrio das formas tetraméricas e monoméricas (QUAY; CONDIE, 1983). Por fim, Terra e colaboradores (2007) enfatizaram que em diferentes condições fisiológicas, como no plasma, a melitina se encontra na conformação monomérica (TERRA; GUIMARÃES; VERLI, 2007). Portanto, vários fatores devem ser analisados ao mesmo tempo, para manter a estabilidade da molécula (MIURA, 2012). A Figura 5 ilustra as estruturas da melitina tetramérica e monomérica, respectivamente.

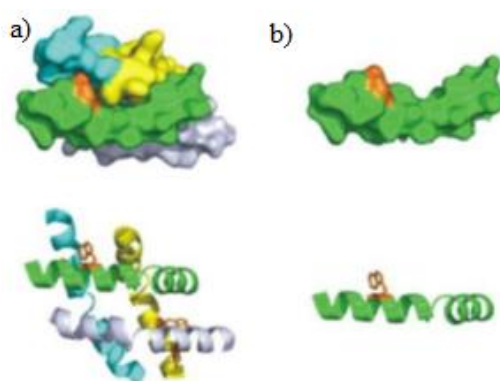


Figura 5 - Formas estruturais da melitina (a) tetramérica e (b) monomérica
Fonte: KUNITZ (2015).

A melitina na sua forma tetrâmera se torna uma estrutura ligeiramente globular, com uma maior massa e tamanho, o que pode impactar processos de separação, como a ultrafiltração, por exemplo.

3.2 PROCESSO DE SEPARAÇÃO DA MELITINA

Até meados da década de 50, os efeitos da apitoxina no organismo eram explicados apenas pela atividade da enzima fosfolipase e hialuronidase. Quando, em 1954, Habermann, um dos cientistas precursores nessa área, identificou a melitina (HABERMANN, 1954). Todo potencial biológico e terapêutico da melitina fez com que ela se tornasse um produto desejado pelas indústrias farmacêuticas e de cosmético. Assim, com o maior desenvolvimento das técnicas de separação, como a eletroforese, cromatografia e processos com membranas em concomitante com as análises bioquímicas mais eficientes, estudiosos iniciaram suas pesquisas de identificação mais detalhada dos componentes da apitoxina. A seguir, serão explicitadas algumas técnicas utilizadas para a separação da melitina a partir da apitoxina, juntamente com alguns estudos relevantes nessa área.

3.2.1 Técnicas cromatográficas

O processo de separação usando a cromatografia consiste, basicamente, em um método físico-químico capaz de separar componentes de uma mistura que possui diversos analitos similares. Esse método permite a permeação dessa mistura por coluna ou prato (fase estacionária) sendo que, para cada componente haverá um tempo de eluição e concentrações específicas dos solventes (fases móveis) (MEYER, 2004). Portanto, durante a passagem da mistura há uma migração dos componentes por entre as fases, que acontece devido à interação existente entre elas. Por conta disso, algumas substâncias permanecem por mais tempo na fase estacionária e outras conseguem permear mais rapidamente, saindo primeiro do sistema. Devido à essa variação no tempo de saída, ocorrerá a separação dos componentes, principalmente de pequenas moléculas como proteínas e carboidratos. Esta técnica é denominada cromatografia de exclusão por tamanho (COSKUN, 2016).

A separação dos macrocomponentes, por estarem presentes em uma mistura complexa, é, geralmente, processada por meio da cromatografia líquida com colunas de

resinas empacotadas em que a fase móvel é eluída a altas pressões. Processo comum para amostras que possuem maior instabilidade térmica e não são voláteis (MEYER, 2004; COSKUN, 2016).

Nesse contexto, desde o início dos estudos sobre a apitoxina, na tentativa de separar e identificar os compostos presentes no veneno, a cromatografia vem sendo utilizada. Em 1976, Gauldie e colaboradores (1976) ao identificarem em outros estudos que os compostos não estavam sendo realmente purificados decidiram realizar essa operação utilizando as colunas de cromatografia Sephadex G-50 SF, G-25 SF e SE-C25 em três etapas para conseguir obter a melitina (GAULDIE et al., 1976). Já em 1982, Maulet e colaboradores utilizaram a cromatografia de permeação em gel junto com a cromatografia de troca iônica e o tratamento com sulfitólise e com brometo de cianogênio para eliminação da fosfolipase e obtenção de melitina com alto grau de pureza (MAULET; BRODBECK; FULPIUS, 1982). Em todos os estudos referentes à purificação da melitina, a complexidade do processo é ressaltada, sendo assim, ainda são publicados vários estudos que empregam mais de uma etapa para obtenção da melitina com alto grau de pureza (CHEN et al., 2006; CHOI; KWON; CHOI, 2006; NGUYEN et al., 2015). Em contrapartida, Teoh e seus colaboradores (2017) propuseram a purificação da melitina com apenas uma etapa usando uma resina de coluna cromatográfica de troca iônica (TEOH; RYU; LEE, 2017). Para um rendimento de 93% de melitina, as condições foram: resina catiônica forte e tampão fosfato de sódio de pH 6,0. De acordo com os autores, este rendimento foi o maior quando comparado aos resultados encontrados na literatura até o momento em que o mesmo foi publicado.

3.2.2 Eletroforese

Durante a década de 50 e início da década de 60, a eletroforese foi um relevante método para fracionamento e extração de proteínas (JASON, 2011). Essa técnica foi descoberta por Arne Tiselius durante a década de 30 (NOBEL MEDIA AB, 2019) e tem como princípio a migração de moléculas ou partículas carregadas através de uma matriz, após a aplicação de um campo elétrico. Devido à diferença entre o tamanho e as cargas das moléculas analisadas, a velocidade dessa migração é diferenciada entre elas e por isso haverá a separação de cada uma em posições divergentes na matriz (RUDGE; MONNIG, 2000).

Essa técnica de separação tem se tornado cada vez mais usual quando se trata de proteínas. Isso acontece porque ela é rápida, barata, de fácil execução e possui um resultado com boa resolução. Os géis de poliacrilamida e de agarose são os mais utilizados para eletroforese de proteínas, sendo o primeiro, o predominante. O gel de agarose é usado para identificar proteínas maiores que 800 kDa, já o gel de poliacrilamida é mais estável mecânico e quimicamente, usado para proteínas com tamanhos menores. Além disso, o gel de poliacrilamida é mais claro quando comparado com o da agarose, assim as bandas são mais fáceis de serem visualizadas (JASON, 2011). O dodecil sulfato de sódio (SDS) é normalmente utilizado com o gel poliacrilamida (SDS – PAGE) como um surfactante iônico que solubiliza e desnatura as proteínas. O SDS – PAGE permite a separação de moléculas de acordo com o seu tamanho ou massa molar (RUDGE; MONNIG, 2000).

No que tange à purificação e identificação dos componentes da apitoxina, a eletroforese foi utilizada como método de separação. Em seu trabalho em 1954, Habermann descreve que os pesquisadores F. G. Fischer e W.P. Nvumann conseguiram isolar uma fração do que eles chamaram de melitina através da eletroforese juntamente com a cromatografia (HABERMANN, 1954). Ao verificar que o método de purificação da melitina necessitava de várias etapas, Qi e colaboradores (1994) decidiram purificar a melitina mediante uma etapa: eletroforese capilar de zona (ECZ) (QI et al., 1994). A ECZ foi processada com capilar não revestido e pH baixo para diminuir ou eliminar a adsorção de proteínas presentes no veneno de abelha na parede dos capilares. Como resultado, eles verificaram que o método se mostrou mais eficiente, com alta produtividade e rapidez, principalmente quando comparado com métodos realizados por meio da CLAE. Já Pacáková e colaboradores (1995) trabalharam com o objetivo de comparar a CLAE com a eletroforese capilar (EC) para a determinação de alguns componentes do veneno de abelha (PACÁKOVÁ et al., 1995). Eles também confirmaram que a EC é uma análise mais rápida, mais satisfatória e com baixo custo comparada com o CLAE. Estudos mais recentes (GUERRA et al., 2016; LI et al., 2013; PEIREN et al., 2005) mostraram como a eletroforese bidimensional é eficiente, ágil e econômica na identificação dos componentes da apitoxina.

3.2.3 Processo de separação por membrana

Os processos de separação por membranas (PSM) vêm sendo destacados dentre os processos clássicos devido, principalmente, à simplicidade na operação, menor custo energético e disponibilidade de separação sem necessidade de condições extremas, como alta temperatura, pH e mudanças de fase (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

A membrana é definida como uma fina barreira cujo objetivo é controlar o fluxo de permeação de uma ou mais espécies químicas através de sua estrutura (BAKER, 2004). Essa permeação ocorre devido a uma força motriz que atua sobre os componentes da alimentação (MULDER, 1996).

Essas filtrações envolvendo membranas são geralmente realizadas com escoamento frontal ou tangencial em relação à superfície da membrana. Na filtração frontal (*dead end*), o fluxo escoar em direção normal a sua superfície, permitindo a deposição do soluto e formação de uma torta (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006; JASON, 2011). Todavia, na filtração tangencial, também chamada de *cross-flow*, o escoamento é paralelo à área superficial da membrana, enquanto o permeado flui transversalmente à mesma (NOBLE; STERN, 2003). A Figura 6 ilustra como estes dois tipos de filtração acontecem na prática.

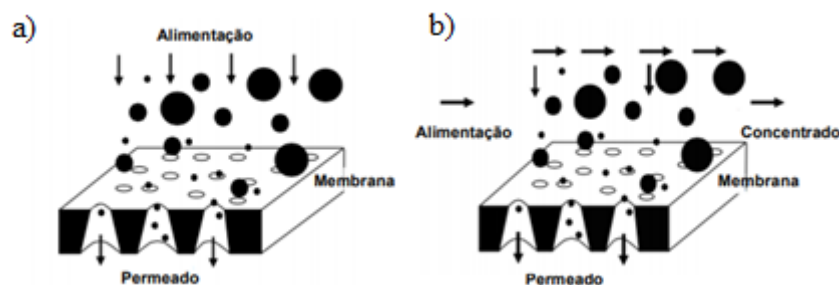


Figura 6 - Mecanismos de filtração: a) frontal e b) tangencial
Fonte: CABRAL (2015).

A forma de determinar a eficiência e a *performance* de uma membrana é descrita pela sua seletividade e fluxo de permeação (MULDER, 1996). Deste modo, o fluxo de permeado (J_P) é calculado de acordo com a seguinte Equação 1:

$$J_P = \frac{1}{A_m} \frac{dV_P}{dt} \quad (1)$$

Onde V_P é o volume do permeado, A_m a área efetiva da membrana e t o tempo no qual coletou-se o permeado.

Já a seletividade foi definida por meio do coeficiente de determinação quando se trata de processos que envolvem pressão como força motriz, que é o caso da ultrafiltração (CABRAL, 2015). A fórmula se resume, basicamente, entre a relação da concentração da espécie de interesse na alimentação (C_A) e no permeado (C_P), conforme Equação 2:

$$Rej = \frac{C_A - C_P}{C_A} = \left(1 - \frac{C_P}{C_A}\right) \cdot 100 \quad (2)$$

Assim, conclui-se que a recuperação de um dado soluto de interesse é obtida pela Equação 3:

$$Rec = \left(\frac{C_P}{C_A}\right) \cdot 100 \quad (3)$$

O PSM sendo implementado, gradualmente, em processos industriais, como purificação, fracionamento e concentração de diversos tipos de materiais (NOBLE; STERN, 2003). Os principais processos empregados industrialmente nos dias de hoje são a microfiltração, a ultrafiltração, a osmose inversa e a eletrodíálise (DA SILVA BIRON; DOS SANTOS; ZENI, 2018).

Um outro aspecto vantajoso é que muitos processos usando membranas não necessitam de aditivos químicos e, no caso da ultrafiltração, microfiltração e osmose inversa, somente a pressão é necessária como força motriz (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Cada processo de separação envolvendo membranas é classificado de acordo com a força motriz aplicada, a fase da amostra alimentada, o permeado e o tamanho dos poros da membrana (BAKER, 2004).

Quando se trata de compostos macromoleculares, como aqueles presentes na apitoxina, dentre os PSM, a ultrafiltração se encaixa como um dos principais métodos de fracionamento, concentração e separação. Por toda essa importância, a ultrafiltração, incluindo os seus princípios e aplicações, será ressaltada nessa revisão bibliográfica.

3.2.3.1 Ultrafiltração

De acordo com Mulder (1996), o processo de ultrafiltração utiliza membranas com poros entre $5 \mu\text{m} - 1 \text{nm}$ para a retenção de macromoléculas e coloides presentes em solução (MULDER, 1996).

O primeiro registro do uso da ultrafiltração é datado de 1906, quando Bechhold inventou o termo durante um estudo sobre as características dos poros das membranas feitas de papel filtro com ácido acético e nitrato de celulose (ZYDNEY, 2000). Um outro importante marco histórico desse processo de separação foi o desenvolvimento da membrana de acetato de celulose por Loeb e Sourirajan, em 1963 (BAKER, 2004). A partir de então, várias outras membranas de diferentes materiais e funções foram criadas sendo utilizadas até hoje nas indústrias e pesquisas (BAKER, 2004).

As membranas de ultrafiltração possuem limite de exclusão molar ou *molecular weight cut-off* (MWCO) entre 1 e 1000 kDa, e em sua maioria, são anisotrópicas/assimétricas (CHERYAN, 1998). Essas possuem uma fina camada (pele) com poros muito pequenos responsáveis pela seletividade da membrana e logo abaixo dessa camada encontram-se os poros com diâmetro maiores que servem de suporte para a pele (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Elas são comumente usadas para a separações biológicas, como proteínas, por exemplo (JASON, 2011).

Dentre as diversas membranas poliméricas existentes, as membranas de celulose possuem alta versatilidade, uma vez que elas são formadas por moléculas lineares e bastante inflexíveis, características essenciais para aplicação de ultrafiltração e osmose inversa. Em específico, a membrana de celulose regenerada (CR) é mais estável, bastante hidrofílica e biocompatível (CHERYAN, 1998; JASON, 2011).

No caso da ultrafiltração, a filtração tangencial é normalmente utilizada, pois permite que as partículas, retidas na superfície da membrana, sejam removidas pela força de arraste do escoamento melhorando substancialmente o fluxo do processo (ZYDNEY, 2000). Assim, é possível alcançar um equilíbrio entre a quantidade de soluto que se difunde da membrana para a solução de alimentação e a quantidade de soluto que é levado até a membrana (BAKER, 2004).

Em linhas gerais, o uso da ultrafiltração possui diversas vantagens como, por exemplo, a capacidade de fracionamento, baixo consumo de energia e operação em uma ampla faixa de temperatura (JÖNSSON; TRÄGÅRDH, 1990). Todas essas características fazem com que a ultrafiltração se torne um processo estratégico quando se trata de escalonamento industrial.

Diante das vantagens e da ampla utilização de processos envolvendo membranas de ultrafiltração para separações biológicas, estudos acerca da purificação ou fracionamento dos componentes da apitoxina começaram a ser desenvolvidos. Uma das primeiras patentes encontradas a fim de separar os compostos alergênicos usando a

ultrafiltração com membranas de fibra oca de 10 kDa foi desenvolvida na FUNED (ALVES et al., 2011). Outra patente publicada por Shen e colaboradores mostra a utilização de membranas de 10 e 30 kDa para o fracionamento da melitina (SHEN et al., 2014). A partir de então, várias pesquisas nesse ramo foram sendo desenvolvidas.

Lee e colaboradores (2014) investigaram diferentes condições de pressão (20, 30, 40 psi) concentração (10, 2, 1 mg/mL) e *cut off* de membranas (5, 10, 30 kDa) com auxílio de uma célula Amicon com agitação (modelo 8200) fornecido pela Millipore, visando a remoção da PLA2 (LEE et al., 2014). Para a análise dos benefícios do veneno de abelha sem PLA2, uma outra pesquisa foi desenvolvida também utilizando a ultrafiltração com célula Amicon com agitação (modelo 8400) e, em seguida, foram feitos vários testes - anti-inflamação, inibição de elastase e metaloproteinases de matriz e proliferação celular - para verificar a eficácia desse permeado sem PLA2 para produtos cosméticos (LEE et al., 2015). Em seu artigo, Brito e colaboradores (2015) também realizaram a ultrafiltração em uma célula Amicon com agitação, usando membrana de celulose regenerada de 10 kDa. Ele analisou o efeito da pressão (50 a 400 kPa), da concentração (10, 90, 50 mg/mL) e da rotação (180 a 960 rpm) na separação dos componentes alergênicos presentes na apitoxina, objetivando um permeado contendo em sua maior parte a melitina (BRITO et al., 2018). Temponi e colaboradores (2015), buscando melhoramento do trabalho apresentado por Brito e colaboradores, realizaram a ultrafiltração em uma célula de acrílico, onde o escoamento da solução de apitoxina foi transversal. Além disso, eles analisaram como a pressão e a concentração afetavam o fluxo do permeado e a sua seletividade em relação a melitina (TEMPONI et al., 2015).

3.2.3.2 Fatores limitantes na transferência de massa adjacente à membrana

O fator preponderante que dificulta o processo de separação com membrana ser amplamente utilizado, causando prejuízo ao processo, é o declínio do fluxo de permeado (VAN DEN BERG; SMOLDERS, 1990). Esse fenômeno está diretamente ligado ao tipo de membrana utilizado e a solução de alimentação empregada no processo (MULDER, 1996).

O declínio do fluxo inicia-se no momento em que há o aumento da concentração de espécies retidas próximas à superfície da membrana e, baseado na Lei de Fick, o soluto tende a retornar ao seio da solução, fenômeno denominado polarização de concentração

(PC) (NOBLE; STERN, 2003). Esse fenômeno é intrínseco do processo, porém reversível (FIELD, 2010).

De acordo com Baker (2004), a PC ocorre nos primeiros instantes do processo com a formação de uma primeira camada gel. Após esse período, caso o fluxo continue decaindo lentamente, uma segunda camada gel se forma por meio da consolidação das partículas da concentração de polarização. Esse fenômeno é chamado *fouling*, sendo ele muito complicado de ser controlado.

O *fouling* também pode ser formado em outras três condições: mediante a adsorção, quando o soluto ou partículas interagem com a superfície da membrana, podendo ocorrer mesmo sem a presença da força motriz (pressão); pela deposição de partículas na superfície da membrana, também chamada de formação de torta; e pelo bloqueio de poros pelas partículas ou solutos que podem obstruir os poros da membrana parcialmente ou completamente, gerando um declínio considerável no fluxo (FIELD, 2010).

Todo esse comportamento do fluxo de permeado em relação ao tempo e a incrustação a qual a membrana é submetida está ilustrada na Figura 7 abaixo.

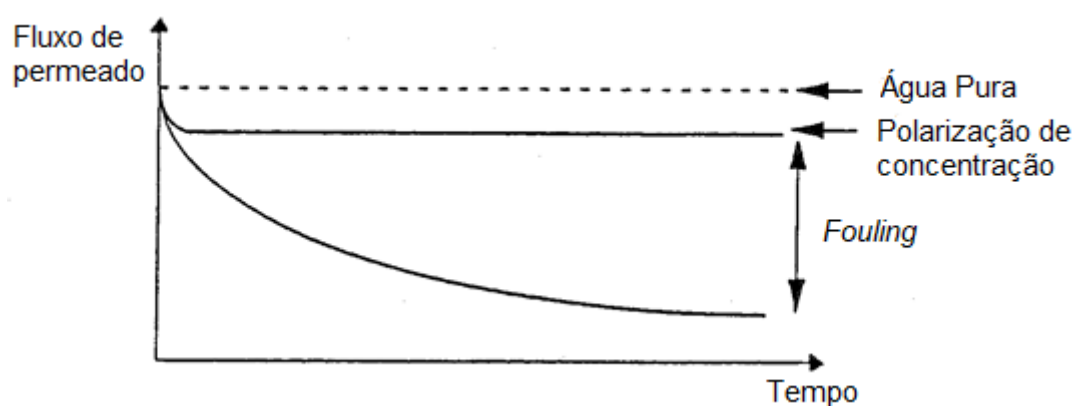


Figura 7 - Comportamento do declínio do fluxo do permeado quando comparado a filtração da água pura com a filtração envolvendo a presença de polarização de concentração e do fouling. Fonte: Adaptado MULDER (1996).

Analisando a PC, observa-se que o fluxo ao atingir o estado estacionário é menor do que o fluxo original. Essa diminuição ocorre devido à resistência extra criada ao se formar a camada de polarização. Essa resistência é inerente do PSM, sendo capaz de ser revertida quando a membrana passa por um processo de limpeza química ou física, dependendo do que está sendo ultrafiltrado (LEWIS; GRANDISON, 1996).

A situação descrita pela Figura 8 retrata o efeito da concentração da camada formada próxima à superfície da membrana em estado estacionário. Sabendo que C_{Ab} , C_{Am} e C_{Ap} são a concentração do soluto no seio da solução (bulk), na superfície da membrana e no permeado, respectivamente, e δ indica a espessura da subcamada laminar (MULDER, 1996).

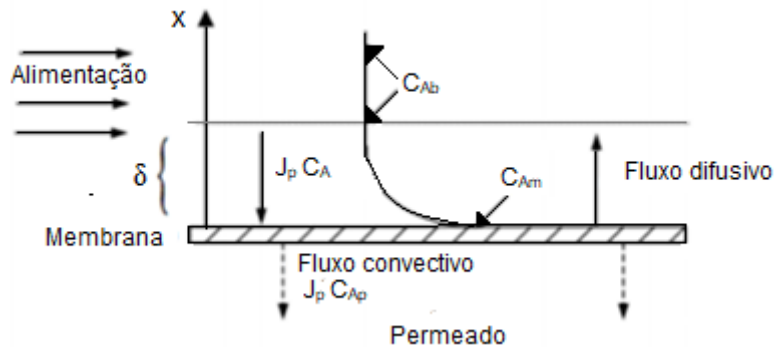


Figura 8 - Fase fluida adjacente à membrana e seu perfil de concentrações em estado estacionário
Fonte: Adaptado MULDER (1996).

Vale salientar que a PC é bastante influenciada por alguns fatores de processos que favorecem a convecção do soluto na direção da membrana, são eles: a pressão elevada, temperatura, natureza e altas concentrações de soluto, além das baixas velocidades de circulação da solução alimentadora (JÖNSSON; TRÄGÅRDH, 1990). Sendo assim, algumas alternativas para a diminuição desse efeito da camada polarizada seriam: aumentar a velocidade de alimentação, gerando aumento da turbulência do fluido na subcamada, e diminuir a pressão do sistema (CHERYAN, 1998; BAKER, 2004).

Ao retratar o *fouling*, a Figura 7 mostra uma curva onde o declínio se mantém durante o processo, estado pseudoestacionário. Esta queda acontece devido à resistência adicional, somado a resistência da membrana e de polarização de concentração, que aparece devido à incrustação na superfície e/ou nos poros da membrana que modificam a sua estrutura e as suas condições de separação (LEWIS; GRANDISON, 1996). Quando formado na superfície da membrana, o *fouling* pode ser amenizado a partir do aumento da turbulência do escoamento, da limpeza regular da membrana, ou da utilização de membranas hidrofílica ou carregada ionicamente. Se o *fouling* for interno, ou seja, quando o soluto se agrega nos poros da membrana, a incrustação normalmente é irreversível ou, caso haja, a membrana passa por um tratamento químico mais rigoroso (SHI et al., 2014).

3.2.3.2.1 Modelo de Hermia adaptado

Com o propósito de analisar os mecanismos de incrustação devido ao *fouling*, Hermia (1982) desenvolveu um modelo matemático empírico para filtração frontal (HERMIA, 1982). Para ser aplicado em filtrações tangenciais, modificações foram realizadas em seu modelo (FIELD et al., 1995). Essa adaptação se fez necessária por causa da velocidade do fluxo dessa filtração na superfície da membrana, também denominada de transferência de massa de transporte de retorno (JARUSUTTHIRAK; MATTARAJ; JIRARATANANON, 2007).

Nesse modelo, equações são propostas para os quatro principais mecanismos de incrustações estabelecidos: bloqueio completo, bloqueio intermediário, bloqueio padrão e formação de torta (HERMIA, 1982). Resumidamente, conforme Figura 9, o bloqueio completo ocorre quando as moléculas do soluto são maiores que os poros da membrana e bloqueiam a sua entrada por eles, havendo a formação de uma monocamada na sua superfície. O bloqueio intermediário tem um comportamento parecido com o anterior, porém o soluto possui tamanho semelhante aos poros. Conseqüentemente, o poro pode ou não ser bloqueado por completo, além de considerar a probabilidade da molécula de soluto depositar sobre aquelas já estabelecidas previamente. Já no bloqueio padrão existe a permeação da molécula por entre os poros, adsorvendo e diminuindo o seu raio de permeação. E por fim, a formação de torta se caracteriza na deposição de moléculas maiores, comparadas ao tamanho dos poros da membrana, formando uma grande camada, por estarem em maior quantidade, dificultando ainda mais a filtração (CORBATÓN-BÁGUENA; ÁLVAREZ-BLANCO; VINCENT-VELA, 2015).

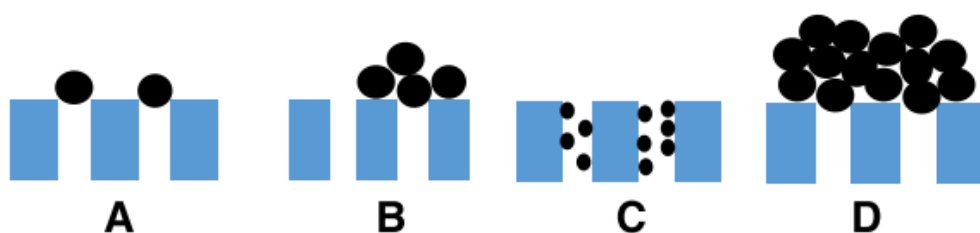


Figura 9 - Ilustração do comportamento dos quatro tipos de incrustações representadas pelo modelo de Hermia: (a) bloqueio completo, (b) bloqueio intermediário, (c) bloqueio padrão e (d) formação de torta. Fonte: Adaptado AGHAJANI et al. (2018).

A Tabela 2 mostra as equações lineares que representam cada mecanismo de incrustação. Os dados de fluxo ao longo do tempo que geram uma reta com o coeficiente de determinação (R^2) mais próximo de 1 é considerado o modelo dominante no dado

período indicado (AGHAJANI et al., 2018). Sendo J_0 o fluxo inicial do permeado e k a constante do modelo.

Tabela 2 - Equações representativas dos mecanismos de incrustações apresentados pelo Modelo de Hermia modificado.

Modelos	Equações
Bloqueio completo	$\ln(J_p) = \ln(J_0) - k.t$
Bloqueio intermediário	$J_p^{-1} = J_0^{-1} + k.t$
Bloqueio padrão	$J_p^{-\frac{1}{2}} = J_0^{-\frac{1}{2}} + k.t$
Formação de torta	$J_p^{-2} = J_0^{-2} + k.t$

Fonte: FIELD et al. (1995).

Legenda: J_p – Fluxo de permeado; J_0 – Fluxo de permeado inicial; k – Coeficiente de transferência de massa; t – Tempo.

4. METODOLOGIA

4.1 PREPARO DA SOLUÇÃO

A apitoxina fornecida pela FUNED foi, previamente, coletada estimulando a abelha com choques elétricos ao entrar na colmeia. Esse choque, de até três volts, faz com que as abelhas liberem um pequeno volume de veneno na placa de vidro, sem que venham a óbito (BENTON; MORSE; STEWART, 1963).

O tratamento da apitoxina foi feito na própria FUNED, onde ela foi pesada e solubilizada em água ultrapura (Milli-Q). Em uma membrana de polietersulfona com 0,22 µm, as soluções de veneno foram pré-filtradas para remover pequenos detritos, como cera de abelha e pólen remanescente, e em seguida liofilizados. Por fim, todo o material liofilizado foi refrigerado -20 ° C para uso posterior.

Na primeira etapa, as soluções foram preparadas com veneno liofilizado solubilizado em tampão fosfato de sódio de pH 5,5, o mesmo valor do pH da apitoxina, resultando em concentrações: 10, 5,5 e 1,0 mg/mL. Estas condições foram definidas de acordo com a literatura (ALI, 2012; BRITO et al., 2018).

Na segunda etapa, a apitoxina liofilizada foi solubilizada em água MilliQ derivando a solução de concentração igual a 1,0 mg/mL, já pré-estabelecida.

4.2 CARACTERÍSTICAS DA MEMBRANA

A membrana de celulose regenerada comercial foi escolhida para a ultrafiltração da apitoxina pelo seu caráter hidrofílico, sendo amplamente utilizada para o processo de separação envolvendo proteínas (JASON, 2011). Ressalta-se, também, que trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa - Brito e colaboradores (2018) e Temponi e colaboradores (2015) - usaram essa membrana e obtiveram ótimos resultados na ultrafiltração da apitoxina.

O uso da membrana hidrofílica com *cut-off* igual a 10 kDa se fez devido à diferença entre massa molar dos compostos alergênicos 19-50 kDa e a melitina, peptídeo de interesse, 2,84 kDa. A Tabela 3 contém as informações técnicas e as características operacionais da membrana.

Tabela 3 - Dados técnicos e operacionais da membrana de ultrafiltração.

Material	Cut-off (kDa)	Permeabilidade da água (kg/m ² .h/psi)	Fabricante	Condições operacionais		
				pH	Pressão máxima (psi)	Temperatura máxima (°C)
Celulose regenerada	10	4.2	Millipore Corporation	3 - 13	70	50

Fonte: Brito (2015).

A membrana foi previamente mergulhada em água destilada por duas horas, com troca do solvente a cada trinta minutos visando à remoção da camada de glicerina que protege os poros do colapso. Em seguida, a membrana foi transferida para o sistema de permeação, exemplificado na Figura 10.

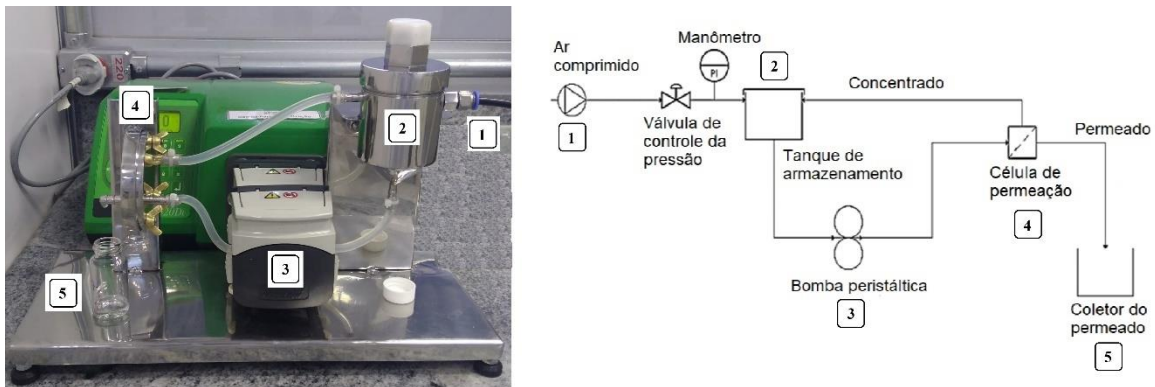


Figura 10 – Foto do sistema de recirculação total (esquerda) e seu respectivo diagrama utilizado para ultrafiltração (direita).

Fonte: Temponi et al. (2015).

O sistema foi alimentado com água destilada e com pelo menos a máxima pressão de operação (1,5 bar), de modo que essa pressão exercida pelo líquido adense os poros da membrana, compactando-a mecanicamente até se obter um fluxo estacionário.

Após atingir esse fluxo, a permeabilidade hidráulica (L_p) da membrana foi calculada pela Equação 4.

$$L_p = \frac{J_p}{\Delta P} \quad (4)$$

Onde J_p é o fluxo de permeado e ΔP é a diferença de pressão entre a alimentação e o permeado.

A permeabilidade hidráulica à água pura é o parâmetro mais simples de caracterização de uma membrana que, resumidamente, corresponde à inclinação da reta formada pela variação do fluxo de permeação da água em relação à diferença de pressão exercida sobre a membrana (NOBLE; STERN, 2003).

Para o presente estudo, as pressões utilizadas para o cálculo de L_p variaram de 0,5 a 1,5 bar.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Primeira etapa – Planejamento experimental

O planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central foi utilizado na primeira etapa para analisar a influência das variáveis pressão e concentração de apitoxina, em relação ao fluxo de permeado, à rejeição da PLA2 e à recuperação de melitina durante ultrafiltração. Adotar o ponto central gera uma proteção contra a curvatura que pode vir a acontecer em planejamento fatorial de dois níveis (MONTGOMERY; RUNGER, 2012).

A Tabela 4 ilustra esse planejamento experimental e a combinação dos níveis superiores (+), inferiores (-) e o ponto central para concentrações de apitoxina na solução (Cap) e a ΔP utilizada no sistema.

Tabela 4 - Condições experimentais e os níveis de cada variável.

Experimentos	C_{AP} (mg/mL)	ΔP (bar)
1	1,0 (-)	0,5 (-)
2	1,0 (-)	1,5 (+)
3	10,0 (+)	0,5 (-)
4	10,0 (+)	1,5 (+)
5	5,5 (0)	1,0 (0)
6	5,5 (0)	1,0 (0)
7	5,5 (0)	1,0 (0)

Fonte: Próprio autor.

Soluções de 50 mL foram preparadas nas devidas concentrações. Cada experimento foi realizado de forma aleatória seguindo os critérios das combinações dos níveis.

Nessa primeira etapa, a entrada de gás foi conectada a um ar comprimido para controlar a pressão no tanque, sendo essa monitorada por um manômetro. O tanque de armazenamento foi preenchido com 50 mL de solução de apitoxina que foi bombeada para a célula por meio de uma bomba peristáltica de 60 rpm. Finalmente, o permeado foi

coletado em uma proveta graduada e a cada minuto o volume foi anotado. Com esses valores, o fluxo de permeado foi calculado mediante método volumétrico dado pela Equação 1.

As análises dos resultados obtidos pelo delineamento foram feitas utilizando *software* MiniTab®, considerando o nível de confiança de 95%. A resposta dos modelos codificados ao serem analisadas a pressão e a concentração de apitoxina teve como resultado geral a seguinte Equação 5:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1x_1 + \beta_{22}x_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 \quad (5)$$

Tem-se Y como a variável dependente ou resposta, x são as independentes codificadas – x₁ é a concentração de apitoxina e x₂ é a pressão – e β são os coeficientes de regressão. As variáveis respostas utilizadas nesse experimento foram: fluxo de permeado, rejeição de PLA2 e recuperação de melitina, os dois últimos obtidos pela análise cromatográfica.

Ao final de todos os experimentos, limpou-se todo o sistema com álcool e a membrana com água ultrapura. Amostras das soluções de permeado, concentrado e da apitoxina foram armazenadas e refrigeradas a -20 °C para posteriores análises da CLAE.

4.3.2 Segunda etapa – Execução da condição ótima

Após a realização da primeira etapa, a melhor condição de trabalho para recuperação de melitina foi definida – 1,0 mg/mL e 1,5 bar - assim, iniciou-se a segunda etapa.

Nessa fase, algumas modificações no processo foram realizadas, buscando melhorar o rendimento e a eficiência. A primeira modificação foi a utilização de gás nitrogênio ao invés de ar comprimido. Essa troca aconteceu devido ao fato de o ar comprimido trazer impurezas pelas suas instalações que afetaram os dados no CLAE na primeira etapa.

A modificação seguinte foi a solubilização da apitoxina em água ultrapura MilliQ, ao contrário da primeira etapa, que utilizou tampão fosfato de sódio pH 5,5. Essa mudança ocorreu, pois o trabalho de Silva e colaboradores (2019), realizado em concomitância com a primeira etapa, mostrou que a água teve um efeito mais significativo na recuperação da melitina e na rejeição da PLA2.

A última alteração foi a diminuição da rotação de 60 para 40 rpm. Na primeira etapa a condição experimental 1,0 mg/mL e 1,5 bar alcançou um fluxo mais elevado e, conseqüentemente, o volume da solução permeou por completo antes do tempo estabelecido. Assim, a redução da rotação diminuiu o fluxo de permeado causando um contato mais efetivo entre a membrana e a solução de apitoxina, em um maior intervalo de tempo. Com essas condições – menor velocidade do fluxo e maior pressão – a polarização de concentração fica mais atenuada (CABRAL, 2015), o que favorece a rejeição da PLA2 (SILVA et al., 2019) e a permeação da melitina.

Todas as corridas foram feitas com a mesma membrana e em iguais condições de pressão e concentração, portanto elas não serão chamadas como triplicatas, pois a cada experimento a membrana se encontrava em uma nova condição. Por outra forma, a membrana é um sistema dinâmico e ao filtrar uma solução, sua superfície e seus poros sofrem com incrustações que influenciam as próximas etapas.

Antes de iniciar as três corridas, uma solução de apitoxina de concentração 1mg/mL foi permeada a pressão de 1,5 bar para definir o tempo de batelada ideal para a recuperação da melitina.

Definido esse tempo, iniciaram-se as três corridas. Antes de ser acoplada ao sistema, a membrana foi limpa com jatos de água ultrapura (MilliQ) e durante aproximadamente 15 minutos, permeou-se água ultrapura (MilliQ) por todo sistema antes e depois da ultrafiltração da solução de apitoxina, para a limpeza dos solutos presentes na superfície da membrana que causam o declínio do fluxo.

A entrada de gás foi conectada a um cilindro de nitrogênio contendo um manômetro. Uma nova bomba peristáltica foi utilizada para bombear a solução de apitoxina, o que possibilitou diminuir a vazão para 40 rpm, buscando um melhor desempenho.

Durante a ultrafiltração da solução de apitoxina, o permeado foi coletado em frasco, já pesado, a cada 5 minutos até completar 40 minutos de operação. Para o cálculo do volume, foi considerada apenas a densidade da água, por ser uma solução de concentração diluída.

Com esses valores, foi possível fazer o estudo da permeação da solução de apitoxina em relação ao declínio do fluxo (DF), como mostrado pela Equação 6.

$$DF = \left(\frac{J_{Ai} - J_{SA}}{J_{Ai}} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

Onde o fluxo inicial da água é dado por J_{Ai} e o fluxo final da solução de apitoxina dado por J_{SA} .

Ademais, os declínios do fluxo gerado pela polarização de concentração, o reversível, e aquele causado pelo *fouling*, o irreversível, também foram passíveis de estudo. A Equação 7 expressa o declínio reversível do fluxo (DRF) e a Equação 8 o declínio irreversível do fluxo (DIF).

$$DRF = \left(\frac{J_{LA} - J_{SA}}{J_{Ai}} \right) \cdot 100 \quad (7)$$

$$DIF = \left(\frac{J_{Ai} - J_{LA}}{J_{Ai}} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

Tem-se que J_{LA} representa o fluxo de água após a limpeza da membrana com água.

Visando identificar qual tipo de incrustação atuante durante a ultrafiltração, as equações do modelo de Hermia adaptado para sistema tangencial foram calculadas e analisadas.

4.4 PROCEDIMENTO DE LIMPEZA QUÍMICA DA MEMBRANA

Para a limpeza química da membrana, utilizou-se a solução alcalina do surfactante dodecil sulfato de sódio – SDS - (Merck), ideal para a remoção de compostos orgânicos (JÖNSSON; TRÄGÅRDH, 1990). A medida da concentração desse produto foi a mesma usada por Silva e colaboradores (2019), uma vez e meia a concentração micelar crítica, equivalendo a 12,3 mM.

Anteriormente à limpeza química, permeou-se água ultrapura MilliQ pelo sistema. Em seguida, a solução preparada de SDS foi permeada pela membrana. Por fim, permeou-se novamente água ultrapura MilliQ para análise do fluxo recuperado (FR) e resistência removida (RR). O permeado foi coletado durante 10 minutos de operação do sistema.

Para o cálculo do FR e RR, foram utilizadas as seguintes Equações 9 e 10 (MADAENI; ROSTAMI; RAHIMPOUR, 2010):

$$FR(\%) = \left(\frac{J_{LQ}}{J_{A0}} \right) \cdot 100 \quad (9)$$

$$RR(\%) = \left(\frac{R_F - R_L}{R_F} \right) \cdot 100 \quad (10)$$

Tem-se que J_{LQ} é o fluxo da água após a limpeza química da membrana, J_{A0} é o fluxo de água quando a membrana foi usada pela primeira vez. Já R_F é a resistência devido ao *fouling* e R_L a resistência depois da limpeza.

Para o cálculo de R_F é necessário saber a resistência intrínseca da membrana (R_m) dada pela Equação 11, Lei de Darcy, onde ΔP é a pressão do sistema e μ a viscosidade da água:

$$R_m = \frac{\Delta P}{\mu \cdot J_{A0}} \quad (11)$$

Agora R_F consegue ser calculado a partir da Equação 12 em que o J_{LA} é o fluxo da água após a membrana ter sido permeada pela solução.

$$R_F = \frac{\Delta P}{\mu \cdot J_{LA}} - R_m \quad (12)$$

Já R_L é determinada pela Equação 13:

$$R_L = \frac{\Delta P}{\mu \cdot J_{LQ}} - R_m \quad (13)$$

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E PRODUTOS OBTIDOS

4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Anterior a análise, os padrões de PLA2 e melitina foram preparados por meio de um CLAE preparativo, a partir da apitoxina. Os cromatogramas obtidos mostraram bandas de absorção características de cada componente.

Para a análise cromatográfica das amostras coletadas durante a ultrafiltração, tanto da primeira etapa quanto da segunda, foi realizada a CLAE, nas mesmas condições feitas por Haghi(HAGHI; HATAMI; MEHRAN, 2013) e colaboradores (2013) (HAGHI; HATAMI; MEHRAN, 2013). Essas análises foram realizadas na FUNED.

Para isso, utilizou-se o equipamento da Waters® composto de um detector de arranjo de diodo (PDA) e um detector de fluorescência. A fase móvel foi composta por acetonitrila (Merck) – eluente A – e solução 0,4% de ácido fosfórico - grau CLAE (Fluka) ultrapura (MilliQ) – eluente B. A fase estacionária consistiu de uma coluna C₁₈ SGE® de 4,6 mm de diâmetro, 250 mm de comprimento e tamanho de partícula de 5 µm. O fluxo se manteve 1,0 mL/min, a temperatura 25° C e o gradiente de eluição de A igual a 5–52% em 15 minutos, 52–80% em 5 minutos e 80 – 100% em 5 minutos. O comprimento de onda do detector foi de 220 nm e o volume de injeção de 20 e 50 µL.

A curva analítica determinada para a identificação das concentrações de melitina e PLA2 estão demonstradas pelas Equações 14 e 15 a seguir, respectivamente.

$$Y_{MEL} = 15.618.174,81.X_{MEL} - 2.042.721,83 \quad (14)$$

$$Y_{PLA2} = 15.895.298,79.X_{PLA2} - 2.903.535,79 \quad (15)$$

Tomando-se Y_{MEL} e Y_{PLA2} como a área da curva obtida no cromatogramas e X_{MEL} e X_{PLA2} como as concentrações pré-determinadas para a fabricação da curva, são elas: 1,000; 0,802; 0,604; 0,406; 0,208; 0,010 para melitina e 1,000; 0,801; 0,602; 0,403; 0,204; 0,005 para PLA2.

A fim de calcular a rejeição da PLA2 e a recuperação da melitina com os dados encontrados na CLAE, foram utilizadas a Equação 2 e 3, respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com intuito de melhor esclarecer os resultados obtidos, esse capítulo está dividido em: caracterização da membrana a partir dos dados da permeabilidade hidráulica, resultados das análises da cromatografia e o processo de ultrafiltração na primeira e segunda etapa.

5.1 PERMEABILIDADE HIDRÁULICA DA MEMBRANA

A permeabilidade hidráulica foi obtida a partir da Equação 2. Comparando a L_p calculada e a fornecida pela MERCK[®], Tabela 5, o valor encontrado foi muito próximo daquele indicado pelo fabricante, confirmando a boa qualidade da membrana.

Tabela 5 - Permeabilidade hidráulica (L_p) fornecida pelo fabricante e calculada experimentalmente.

Lp (L/m ² .bar.h)	
Experimental	59,2
MERCK [®]	61,1

Fonte: Brito (2015).

5.2 ANÁLISE DA CLAE

A CLAE foi realizada para quantificar a recuperação da melitina e a rejeição de PLA2.

As curvas de calibração de padrões confeccionadas para a determinação da concentração de melitina e PLA2 estão ilustradas nas Figuras 11 e 12. Os gráficos mostram que o modelo se ajusta aos valores observados, sendo o coeficiente de determinação (R^2) próximo a 1,0.

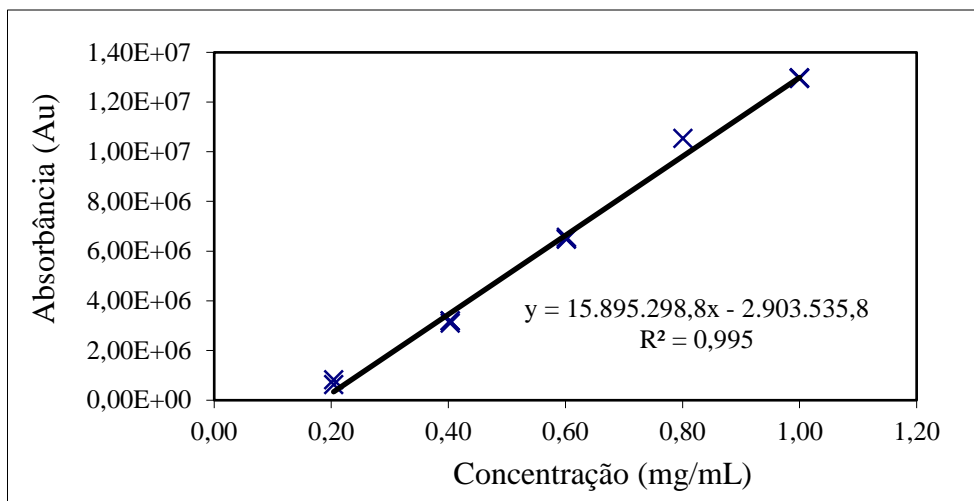


Figura 11 - Curva de calibração do padrão de fosfolipase A₂.
 Fonte: Próprio autor.

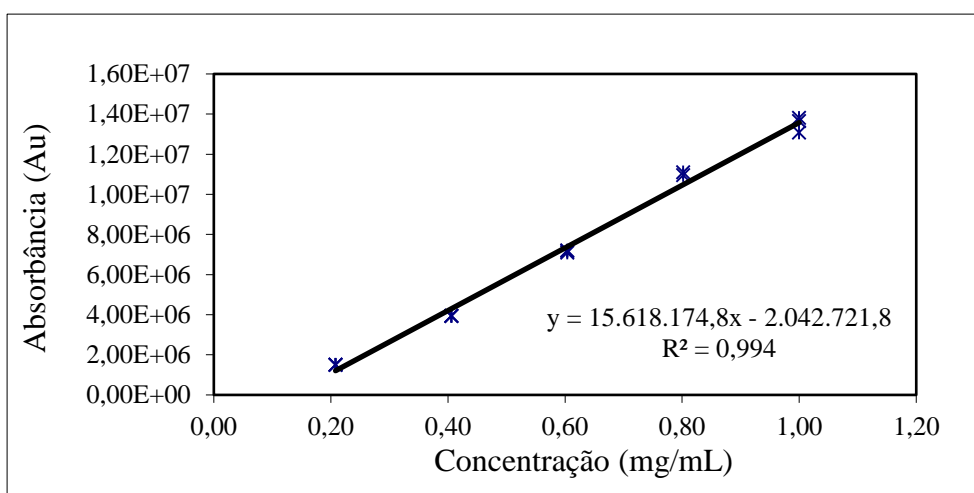


Figura 12 - Curva de calibração do padrão de melitina.
 Fonte: Próprio autor.

Os cromatogramas apresentados nas Figuras 13 e 14 foram obtidos após a realização da ultrafiltração nas condições propostas da primeira etapa. As amostras escolhidas foram a solução de apitoxina 1 mg/mL e o seu respectivo permeado, obtido com uma permeação sob pressão aplicada de 1,5 bar. Além disso, os cromatogramas dos padrões de melitina e PLA2 foram representados no mesmo gráfico para comparação.

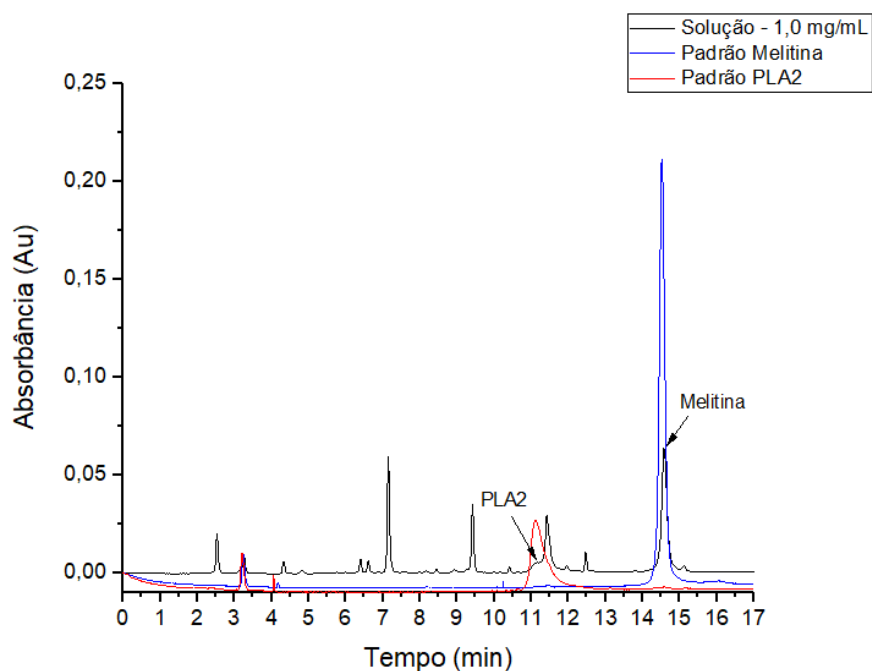


Figura 13 - Cromatograma da solução de apitoxina de 1,0 mg/mL. Bandas de absorção da melitina e da PLA2 indicado pelas setas.

Fonte: Próprio autor.

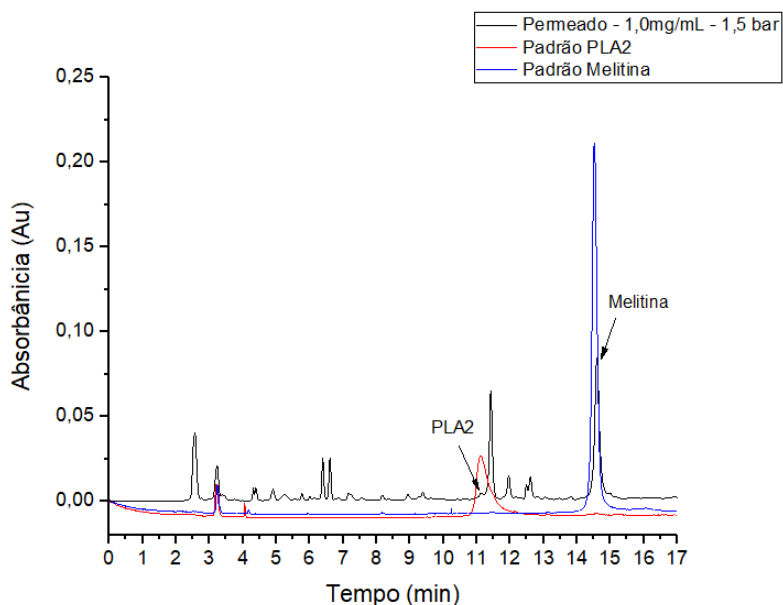


Figura 14 - Cromatograma do permeado obtido pela ultrafiltração da solução de apitoxina de 1,0 mg/mL. Bandas de absorção da melitina e da PLA2 indicado pelas setas.

Fonte: Próprio autor.

Os tempos de retenção encontrados por Haghi e colaboradores (2013), trabalho referência para a realização da CLAE, para a PLA2 e a melitina foram 10,3 e 13,3 minutos, na devida ordem. Para esse trabalho, o tempo encontrado para as bandas de absorção da PLA2 foi de aproximadamente 11,1 minutos e da melitina, em torno de 14,5 minutos. Esse pequeno avanço dos tempos de retenção pode ser explicado por diversos

fatores como o uso de equipamentos diferentes, incluindo coluna, solventes e aparelhos de detecção (MEYER, 2004), além das amostras de veneno e do efeito matriz.

Outras bandas não identificadas são observadas nos cromatogramas, indicando a presença de outros componentes na apitoxina ou impurezas carregadas do processamento do veneno. Importante salientar que, uma dessas bandas prejudicou a análise da área da PLA2, uma vez que seu tempo de retenção foi bem próximo ao tempo encontrado para o padrão desse componente. A fim de obter maior clareza nas análises e evitar esses picos indesejáveis, optou-se pela mudança do gás de pressurização do sistema, de ar comprimido para gás de nitrogênio.

A análise cromatográfica para a segunda etapa ocorreu nas mesmas condições de operação da primeira. Porém, com as mudanças citadas anteriormente, os resultados foram mais favoráveis. Isso permitiu a obtenção de cromatogramas mais claros e limpos, sem a presença de bandas indesejáveis, como podem ser visto nas Figuras 15 e 16.

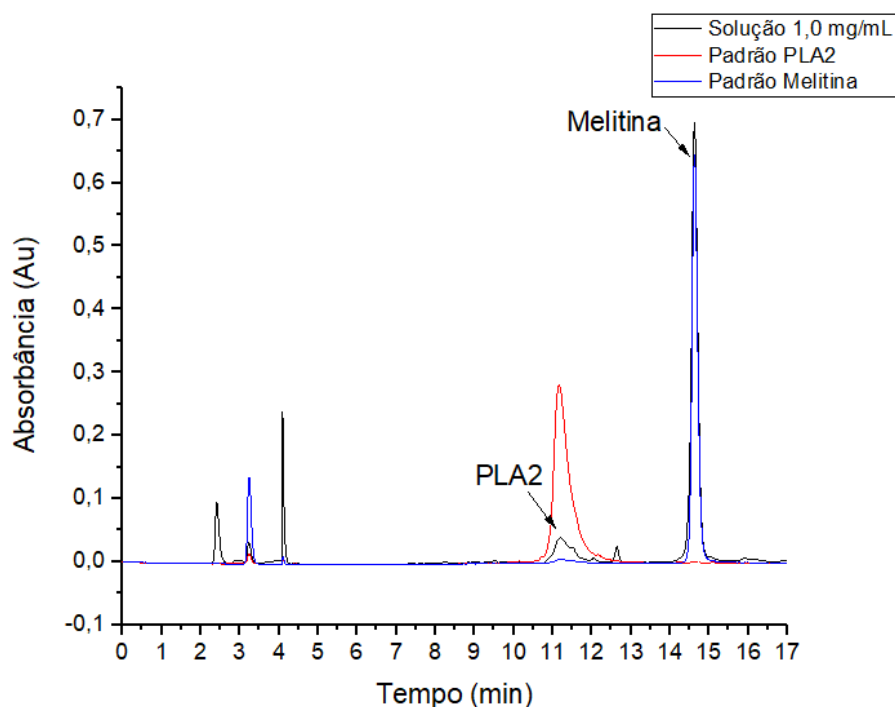


Figura 15 - Cromatograma da solução de apitoxina de 1,0 mg/mL para a primeira corrida. Bandas de absorção da melitina e da PLA2 indicado pelas setas.

Fonte: Próprio autor.

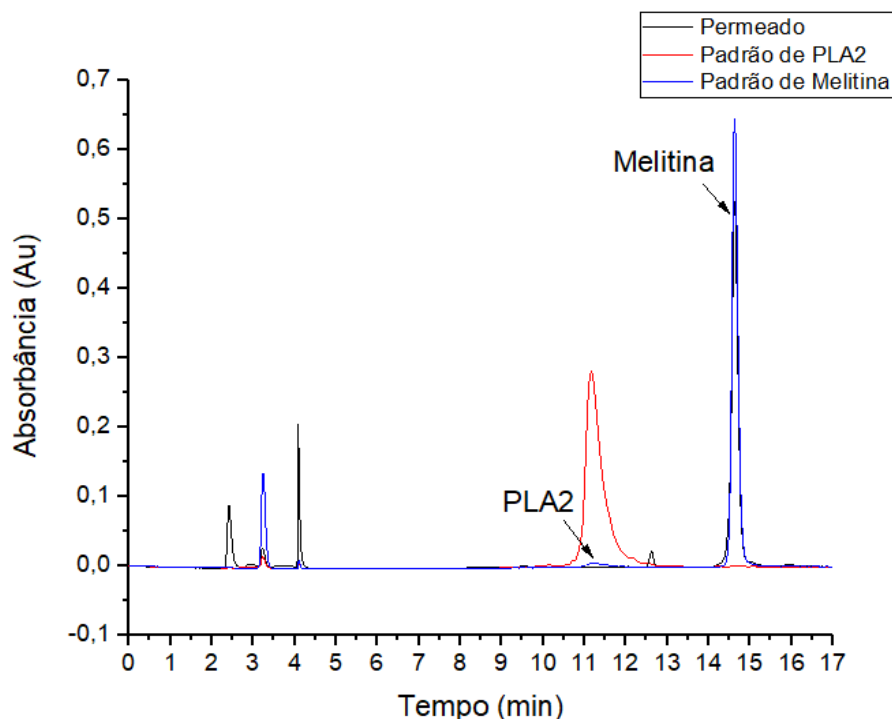


Figura 16 - Cromatograma do permeado obtido pela primeira ultrafiltração da solução de apitoxina de 1,0 mg/mL. Bandas de absorção da melitina e da PLA2 indicado pelas setas.
 Fonte: Próprio autor.

Observou-se que a banda de absorção relacionada à PLA2 ficou mais destacada, sem a presença das impurezas da primeira etapa. Assim, as análises foram mais precisas tanto para a rejeição desse alergênico quanto para a recuperação da melitina.

Ainda comparando os cromatogramas da primeira e segunda etapa, observou-se o aparecimento de três bandas entre os tempos de 2 a 5 minutos no permeado e na solução de alimentação, tanto nas amostras quanto nos padrões. Elas não foram identificadas, mas pode-se deduzir que, provavelmente, são compostos de baixa massa molar presentes na apitoxina que permearam pela membrana, por exemplo, aminas e peptídeos com massas moleculares menores que a melitina ou, ainda, outras impurezas.

Os valores para a recuperação da melitina e rejeição da fosfolipase A₂ calculados a partir das áreas serão mostrados posteriormente durante as etapas do processo de ultrafiltração.

5.3 PRIMEIRA ETAPA

5.3.1 Ultrafiltração da solução de apitoxina

Os valores de fluxo do permeado obtidos na primeira etapa foram calculados a partir da Equação 1 e apresentados em função do tempo, como mostra a Figura 17.

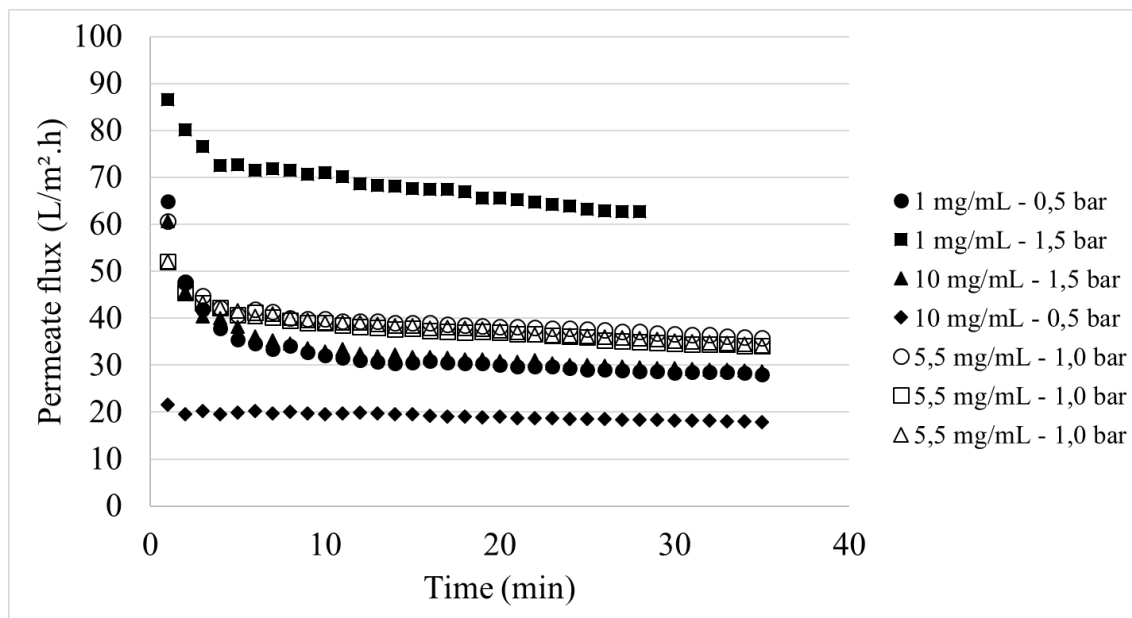


Figura 17 - Comportamento do fluxo de permeado dos experimentos propostos no planejamento com seus respectivos valores de concentração de apitoxina e a diferentes pressões. T = 25 °C. Re = 10,75 – Escoamento laminar.

Fonte: Próprio autor.

Como geralmente observado nos PSM, o fluxo de permeado sofreu um declínio rápido durante o estágio inicial, que pode ser explicada pelo efeito da polarização por concentração, e depois atingiu um valor aproximadamente constante, conforme esperado nos sistemas em que o escoamento da alimentação é tangencial à membrana (BAKER, 2004).

O experimento realizado com concentração de 1 mg/mL e pressão de 1,5 bar teve de ser finalizado antes do tempo previsto de 35 minutos, pois a condição de alta pressão e baixa concentração fez com que a solução permeasse quase que totalmente durante 30 minutos. No experimento com concentração de 10 mg/mL e pressão de 0,5 bar, o fluxo se manteve quase constante durante todo o tempo, uma vez que a utilização da mesma membrana durante todo o experimento, resultou em um acúmulo dos efeitos da polarização de concentração e do *fouling*, no crescimento da espessura dessa camada na superfície da membrana e, conseqüentemente, na resistência total (SONG, 1998;

TEMPONI et al., 2015). Além disso, no decorrer da filtração, houve um aumento da concentração da solução, fazendo com que a pressão não fosse suficiente para vencer essas resistências e o fluxo se manteve constante.

5.3.2 Planejamento experimental

Para a realização da análise de variância da ultrafiltração da apitoxina, a variável dependente, fluxo de permeado, foi calculada pela Equação 1 considerando o tempo de 25 minutos, pois nesse tempo, o fluxo próximo ao constante já havia sido atingido na maioria dos experimentos. A rejeição de PLA2 e a recuperação de melitina foram calculadas pelas Equações 2 e 3, a partir dos dados obtidos na CLAE. Assim, a Tabela 6 mostra os resultados de fluxo de permeado (J_p), recuperação de melitina (RecM) e rejeição de PLA2 (RejF) em função das variáveis concentração de apitoxina na alimentação e diferença de pressão aplicada à membrana para cada experimento.

Tabela 6 - Resposta das variáveis dependentes do planejamento experimental da ultrafiltração de apitoxina. T = 25°C. Re = 10,75 – Escoamento laminar.

Experimentos	C_{ap} (mg/mL)	ΔP (bar)	Fluxo do permeado (L/m ² .h)	Recuperação de melitina (%)	Rejeição da PLA2 (%)
1	1,00	0,50	29,10	8,01	90,22
2	1,00	1,50	63,23	10,92	89,16
3	10,00	0,50	18,53	1,83	98,56
4	10,00	1,50	29,96	0,78	99,02
5	5,50	1,00	37,59	1,86	97,76
6	5,50	1,00	36,03	1,91	97,11
7	5,50	1,00	36,20	1,86	97,85

Fonte: Próprio autor.

Legenda: Cap – Concentração de apitoxina

Para o fluxo de permeado, houve um aumento de mais de três vezes, quando se compara o maior e o menor valor. Essa variação pode ser explicada pela condição dinâmica do processo, como a quantidade de vezes que a membrana foi reutilizada até aquele dado momento, já que os experimentos foram realizados aleatoriamente por ser um planejamento estatístico.

Para o caso da recuperação da melitina, os valores foram ainda mais discrepantes, 14 vezes maior quando comparados os experimentos 2 e 4. Isso evidencia como as altas concentrações desfavorecem a passagem da melitina, uma vez que nesta condição é

favorecida a sua conformação tetramérica, aumentando o tamanho da molécula, assim impedindo a sua permeação (BANKS; SHIPOLINI, 1986). Além disso, todos os valores, em geral, foram baixos para essa recuperação de melitina proveniente da apitoxina. Brito e colaboradores (2018) ao realizarem a ultrafiltração frontal, condição menos favorável, atingiram uma recuperação de 58,6% para solução de 1 mg/mL de apitoxina, na pressão de 2,2 bar e misturador da solução com rotação de 750 rpm (BRITO et al., 2018). Isso mostra que algumas variáveis precisavam ser modificadas, procurando alcançar melhores resultados para os experimentos com menor concentração de apitoxina.

Ao se tratar da rejeição da PLA2, verifica-se que os valores foram próximos e altos, com uma média de 95,67%, mostrando que a ultrafiltração conseguiu bloquear grande parte desse alergênico. A literatura mostra que a incrustação formada na superfície da membrana corrobora com a retenção da PLA2 durante o processo (SILVA et al., 2019). Esse valor foi maior quando se compara com os estudos de Brito e colaboradores (2018), 59,9%, para as mesmas condições apresentadas previamente. Mesmo a ultrafiltração frontal sendo uma condição mais favorável para incrustação na superfície da membrana e, conseqüentemente, para a retenção da PLA2, o fator agitação pode ter prejudicado a estrutura da molécula, reduzindo-a, e assim podendo ser encontrada no permeado em maior quantidade, porém inativa (BRITO et al., 2018).

Após o cálculo realizado com o auxílio do software Minitab®, as análises estatísticas obtidas por meio de um modelo quadrático utilizando um intervalo de confiança de 95% estão ilustradas nas Tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7 - Valor do efeito estimado da concentração de apitoxina, pressão do sistema e interação entre eles para variável resposta Jp.

R ² = 0,9987; α = 0,05					
Fonte	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F ₀	p
C _{ap}	1	480,20	480,20	657,59	0,002
Pressão	1	518,92	518,92	710,60	0,001
C _{ap} *Pressão	1	128,74	128,74	176,30	0,006
Curvatura	1	3,36	3,36	4,60	0,16
Erro	2	1,46	0,73	-	-
Total	6	1132,69	-	-	-

Fonte: Próprio autor.

Tabela 8 - Valor do efeito estimado da concentração de apitoxina, pressão do sistema e interação entre eles para variável resposta RecM.

R ² = 0,9999; α = 0,05					
Fonte	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F ₀	p
C _{ap}	1	66,58	66,58	68689,01	0

Pressão	1	0,87	0,87	902,08	0,001
Cap*Pressão	1	3,93	3,93	4052,86	0
Curvatura	1	21,11	21,11	21778,30	0
Erro	2	0,0019	0,001	-	-
Total	6	92,49	-	-	-

Fonte: Próprio autor.

Tabela 9 - Valor do efeito estimado da concentração de apitoxina, pressão do sistema e interação entre eles para variável resposta RejF.

R ² = 0,9976; α = 0,05					
Fonte	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F ₀	p
Cap	1	26,29	26,29	400,27	0,002
Pressão	1	13,48	13,48	205,22	0,005
Cap*Pressão	1	10,34	10,34	157,46	0,006
Curvatura	1	5,11	5,11	77,78	0,013
Erro	2	0,13	0,066	-	-
Total	6	55,34	-	-	-

Fonte: Próprio autor.

Pode-se observar que os coeficientes de determinação (R²) foram de 99,87%, 99,99% e 99,76% indicando que os modelos quadráticos representaram adequadamente a relação entre os efeitos e as respostas desejadas, J_p, RecM e RejF.

Para que a variável seja considerada estatisticamente significativa, o valor de p deve estar abaixo de 0,05. De acordo com as Tabela 7, 8 e 9, as análises de variância indicaram que ambos os fatores apresentam efeitos principais significativos, bem como a interação entre eles. Para a curvatura tem-se p-valor superior a 0,05 para o fluxo de permeado, significando que não há evidências de curvatura na região de exploração. Contudo, o p-valor da curvatura para rejeição de PLA2 e recuperação de melitina foram menores que 0,05, indicando que pelo menos um fator tem relação curva com a resposta (MONTGOMERY; RUNGER, 2012).

Os modelos matemáticos foram construídos a partir dos coeficientes de regressão para J_p, RecM e RejF. Ressalta-se que os termos referentes à curvatura foram representados no modelo para a RecM e RejF, pois o efeito de curvatura teve caráter significativo na análise de variância. As Equações 16, 17 e 18 apresentam os modelos resultantes e a Tabela 10 resume as tendências de fator em relação as respectivas variáveis resposta, de acordo com o modelo gerado:

$$J_P = (35,2 \pm 0,8) - (11,0 \pm 0,8).Cap + (11,4 \pm 0,8).\Delta P - (1,40 \pm 0,8).Cap.\Delta P \quad (16)$$

$$\text{RecM} = (5,38 \pm 0,03) - (4,08 \pm 0,03) \cdot \text{Cap} + (0,47 \pm 0,03) \cdot \Delta P - (0,99 \pm 0,03) \cdot \text{Cap} \cdot \Delta P - (3,51 \pm 0,03) \cdot \text{Ct.Pt} \quad (17)$$

$$\text{RejF} = (96,2 \pm 0,2) + (2,6 \pm 0,2) \cdot \text{Cap} + (1,8 \pm 0,2) \cdot \Delta P - (1,6 \pm 0,2) \cdot \text{Cap} \cdot \Delta P + (1,7 \pm 0,2) \cdot \text{Ct.Pt} \quad (18)$$

Tabela 10 – Tendências das variáveis independentes de acordo com as suas respectivas variáveis respostas.

Variável resposta	Cap	ΔP	Cap. ΔP
Jp	↓	↑	↓
RecM	↓	↑	↓
RejF	↑	↑	↓

Onde Cap é concentração de apitoxina na solução, ΔP a diferença de pressão, Cap. ΔP a interação entre esses dois fatores e Ct.Pt o ponto central referente à curvatura.

Analisando a Equação 16, o aumento da pressão aplicada através da membrana tem relação direta com o fluxo, já que esta variável é a força motriz do processo. Por outro lado, o aumento da concentração de apitoxina na solução de alimentação afeta inversamente o fluxo de permeado. A interação entre as variáveis também apresentou efeito negativo, mas com menor significância quando comparada à concentração e a pressão aplicada à membrana analisadas isoladamente.

Considerando os dados da ultrafiltração, a influência indireta da concentração sobre o fluxo é confirmada pela análise das soluções 1,0 e 10,0 mg/mL na pressão de 0,5 bar: 28,1 e 17,8 L/m².h, respectivamente. Ao analisar a relação direta da pressão com o fluxo, tem-se os experimentos de pressão de 0,5 para 1,5 bar à concentração constante de 10 mg/mL, onde observa-se o aumento do fluxo final de 17,8 para 28,7 L/m².h.

Estudos presentes na literatura com ultrafiltração de apitoxina também chegaram nesse mesmo resultado (BRITO et al., 2018; TEMPONI et al., 2015). Em sua dissertação, Pereira (2009) também obteve esse mesmo comportamento em relação ao fluxo de permeado e a influência da pressão de soro de leite para produção de concentrado proteico. Já em relação a concentração da solução, Pereira (2009) cita o trabalho de Chollangi e Hossain (2007)¹, no qual os pesquisadores concluíram que o aumento da

¹ CHOLLANGI, A.; HOSSAIN, M. M. **Separation of proteins and lactose from dairy wastewater**. Chemical Engineering and Processing. v. 46, p. 398 – 404, 2007.

concentração da solução tem efeito negativo no fluxo de permeado (CHOLLANGI; HOSSAIN, 2007 apud PEREIRA, 2009).

Retomando a Equação 17, tem-se que a recuperação de melitina está diretamente influenciada pela pressão e inversamente pela concentração. Sendo assim, a partir do modelo, conclui-se que a condição para maximizar a recuperação de melitina é a maior pressão e a menor concentração. Vale ressaltar também que o fator Cap tem uma influência muito maior na recuperação da melitina do que ΔP , quando se analisa os coeficientes que multiplicam cada fator. Essa discrepância pode ser vista mais claramente pelos dados na Tabela 6, em que o aumento da concentração gerou uma diminuição da recuperação de melitina de até 14 vezes, comparando-se o maior e o menor valor. Acerca da mudança na pressão, não teve uma mudança tão expressiva, reduzindo em torno de duas vezes o valor de recuperação dentre os experimentos.

No que diz respeito à concentração, já era esperado essa relação, uma vez que trabalhos como de Brito e colaboradores (2018), Temponi e colaboradores (2015) e Quay e Condie (1983), por exemplo, relatam que a diluição da solução de apitoxina corrobora com a não agregação da molécula de melitina e, conseqüentemente, a não formação do tetrâmero (BRITO et al., 2018; QUAY; CONDIE, 1983; TEMPONI et al., 2015).

A rejeição de PLA2, a uma pressão mais elevada, pode ser observada na Equação 18. Nela, o aumento da pressão e da concentração da apitoxina são fatores diretamente proporcionais que favorecem a rejeição. De acordo com Brito e colaboradores (2018), a distribuição dos diâmetros dos poros da mesma membrana utilizada nesse trabalho mostrou estar acima do valor ideal para membranas de ultrafiltração, o que pode favorecer a passagem de moléculas com massa molar maiores que 10 kDa. Com isso, o aumento dessas variáveis permite um maior acúmulo de partículas na superfície da membrana, auxiliando no bloqueio dos poros e dificultando a passagem de moléculas maiores, como a PLA2 (BRITO et al., 2018)

Embora cada uma das variáveis atue de forma independente, a interação entre elas, tanto para a RecM quando para a RejF, possuem índices relevantes e negativos. Ou seja, o aumento simultâneo dos dois parâmetros leva a uma menor rejeição da PLA2 e recuperação da melitina. Em vista disso, espera-se que haja o aumento de apenas uma das variáveis, para atingir o resultado mais próximo do ideal.

Esses índices significativos do efeito combinado e também o efeito da curvatura presente nessas duas variáveis dependentes são resultado da instabilidade de processos envolvendo peptídeos e enzimas que são mais sensíveis a variações de parâmetros do

sistema. Em alguns casos, essas macromoléculas podem sofrer conformações em sua estrutura, como já citado, a formação de tetrâmeros no caso da melitina, quadriplicando o seu tamanho (QUAY; CONDIE, 1983; TERRA; GUIMARÃES; VERLI, 2007), ou sofrer algum tipo de desnaturação, como é o caso da enzima PLA2 que pode diminuir o seu tamanho quando se quebra as pontes de dissulfeto (BRITO et al., 2018).

A partir dessas análises, decidiu-se trabalhar com as condições do experimento 2, ou seja, 1 mg/mL e pressão 1,5 bar. Essa escolha deveu-se à maior recuperação da melitina, levando em consideração as mudanças em parâmetros a serem realizadas para a segunda etapa.

5.4 SEGUNDA ETAPA

Para a segunda etapa, algumas modificações foram realizadas no processo da ultrafiltração, visando obter uma maior recuperação da melitina e maior rejeição à fosfolipase A₂, como descrito na metodologia.

5.4.1 Ultrafiltração da apitoxina

Em primeiro momento, uma ultrafiltração foi realizada para identificar o tempo ideal de cada batelada, buscando obter melhor seletividade da melitina. Por conseguinte, processou-se um volume de 50 mL da solução de apitoxina na condição ótima até que essa permeasse completamente pela membrana. Para essa análise, os dados foram apresentados em termos da porcentagem de recuperação (PR) de melitina dado pela Equação 19:

$$PR = \frac{V_p}{V_0} \cdot 100 \quad (19)$$

Em que V_p é o volume de permeado e V_0 o volume inicial da solução, igual a 50 mL.

A Figura 18 apresenta o gráfico da recuperação em relação à quantidade de melitina recuperada.

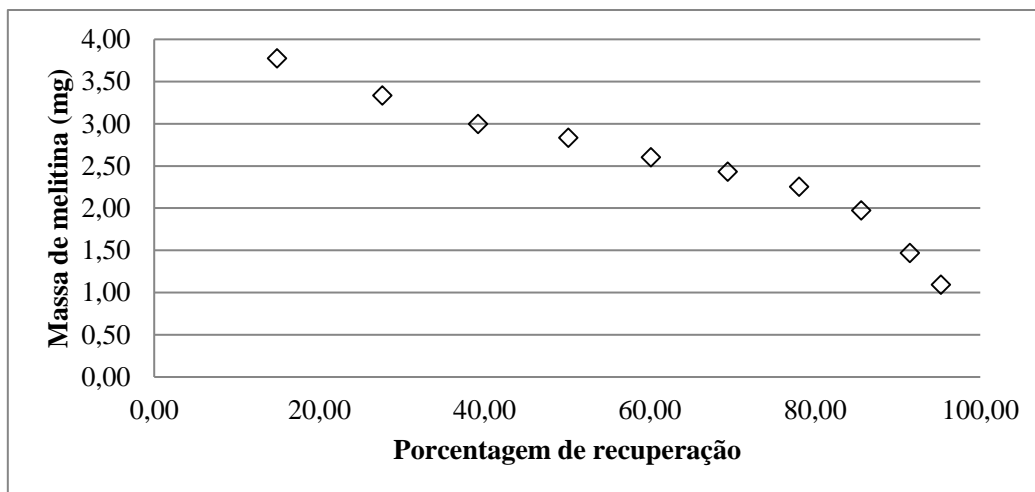


Figura 18 - Gráfico da análise de massa de melitina recuperada em função da porcentagem de recuperação. T = 25°C. $\Delta P = 1,5$ bar. Re = 7,17 – Escoamento laminar.

Fonte: Próprio autor.

De acordo com a Equação 19, a porcentagem de recuperação equivale ao volume de permeado que foi gerado com o passar do tempo, em relação ao volume inicial de solução de apitoxina utilizada. Assim, com as amostras coletadas de tempos em tempos foi possível verificar que houve uma diminuição da massa de melitina recuperada, conforme mostrado no gráfico. Esse declínio pode ser explicado pela resistência extra proveniente da PC e do *fouling*, diminuindo o fluxo de permeado e, conseqüentemente, a massa de melitina permeada (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; CHERYAN, 1998; FIELD, 2010). Ademais, outros fatores podem ser citados, como o aumento da viscosidade do concentrado com o tempo e a pressão osmótica decorrente do acúmulo de partículas na superfície da membrana (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011).

Próximo aos 80% há uma diminuição da massa de melitina, pois nesse instante iniciou o aparecimento de bolhas devido ao baixo volume de concentrado recirculado no sistema. Vale ressaltar que, o tanque de armazenamento possui um volume máximo de 75 mL, por isso optou-se por um volume inicial de 50 mL, o que gerou as bolhas após o processo se desenvolver por 40 minutos. Essas bolhas também podem ser geradas, pois as proteínas são moléculas anfipáticas, facilitando a formação das mesmas. A partir disso, todas as três corridas foram feitas por um período de até 40 minutos.

Definido o tempo, as três corridas foram processadas nas condições experimentais – 1,5 bar e 1 mg/mL. Cabe destacar que o início e o final de todas as corridas, água ultrapura MilliQ foi permeada pela membrana.

Assim, os resultados estão mostrados na Figura 19, onde é apresentado a normalização do fluxo do permeado inicial (J/J_0) em função do tempo.

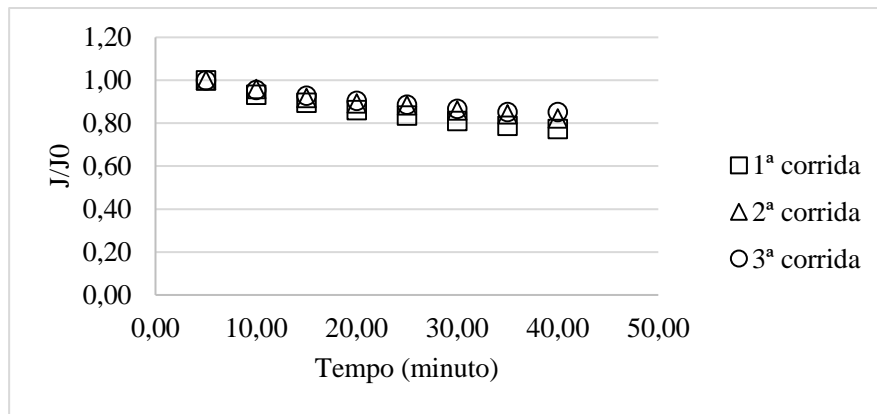


Figura 19 - Fluxo normalizado em função do tempo para as três corridas realizadas. T = 25°C. ΔP = 1,5 bar. Re = 7,17 – escoamento laminar

Fonte: Próprio autor.

Pela análise deste gráfico, os fluxos das três corridas obtiveram comportamentos aproximados, mostrando que houve poucos desvios na realização das ultrafiltrações, tendo a mesma tendência de reprodutibilidade.

Vale destacar que a normalização do fluxo é necessária já que a membrana é um sistema dinâmico e cada teste foi realizado com a mesma amostra de membrana, porém, possivelmente influenciada pela permeação da solução anterior.

A Tabela 11 detalha a análise do declínio desse fluxo e melhor entendimento de qual mecanismo está mais atuante no decorrer do experimento a partir das Equações 6, 7 e 8.

Tabela 11 - Dados referente ao declínio do fluxo para as três corridas.

Testes	Fluxo (L/m ² .h)				Declínio		
	J _{Ai}	J _{SA0}	J _{SAf}	J _{LA}	DF	DRF	DIR
1ª Corrida	51,95	38,13	29,50	37,11	43,21	14,64	28,57
2ª Corrida	37,59	31,11	25,61	27,71	31,87	5,57	26,29
3ª Corrida	27,39	23,39	19,95	20,34	27,19	1,45	25,74

Fonte: Próprio autor.

Legenda: J_{Ai} – Fluxo inicial de água; J_{SA0} – Fluxo inicial da solução de apitoxina; J_{SAf} - Fluxo final da solução de apitoxina; J_{LA} – Fluxo de água após a permeação da solução de apitoxina; DF = Declínio do fluxo; DRF – Declínio reversível do fluxo; DIR – Declínio irreversível do fluxo.

Os resultados obtidos mostram que a maior influência no declínio de fluxo está associada ao *fouling*, uma vez que os valores do DIR são os maiores em todos os casos contribuindo, de forma significativa, para esse declínio. Isso também é evidenciado ao comparar os fluxos referentes à limpeza e ao fluxo da água permeada na membrana no início de cada corrida. Há uma redução de cerca de 30% desses fluxos mesmo depois da membrana ser lavada com água, corroborando com a afirmativa que o *fouling* é o principal causador do declínio do fluxo.

Esses resultados vão ao encontro de estudos presentes na literatura. Shi e colaboradores (2014), por meio de uma revisão bibliográfica sobre *fouling* e limpeza de membranas, retratam a adsorção de proteínas na superfície e nos poros das membranas como a principal preocupação das empresas farmacêuticas e alimentícias (SHI et al., 2014). Por essas macromoléculas terem um alto potencial adsorptivo e causarem incrustações, a limpeza da membrana contendo proteínas pode ser complicada e até mesmo inviável para recuperar o fluxo da membrana (CUI, 2005).

Procurando entender o mecanismo de incrustação, um estudo mediante o uso do modelo de Hermia (HERMIA, 1982) adaptado para sistema *cross flow* (FIELD et al., 1995) foi realizado de acordo com as equações expressas na Tabela 2. Como resultado, a Tabela 12 apresenta os R^2 obtidos para cada uma das corridas, o valor do fluxo inicial experimental (J_{0exp}) e o calculado (J_{0cal}).

Tabela 12 - Coeficiente de determinação obtido para cada mecanismo de incrustação das três corridas.

Mecanismos de incrustação	Corrida 1 $J_{0exp} = 38,13$		Corrida 2 $J_{0exp} = 31,11$		Corrida 3 $J_{0exp} = 23,39$	
	R^2	J_{0cal}	R^2	J_{0cal}	R^2	J_{0cal}
Bloqueio completo	0,9697	38,42	0,9695	31,38	0,9495	23,45
Bloqueio intermediário	0,9812	38,76	0,9775	31,55	0,9577	23,53
Bloqueio padrão	0,9758	38,58	0,9737	31,46	0,9538	23,50
Formação de torta	0,9898	39,16	0,9839	31,70	0,9648	23,57

Fonte: Próprio autor.

Legenda: J_{0exp} – Fluxo inicial calculado; J_{0cal} - Fluxo inicial experimental.

Conforme descrito na Tabela 12, o modelo com melhor precisão de ajuste para os três casos foi a formação de torta, quando se compara o valor de R^2 . Para esse caso, as partículas com maior tamanho que os poros se alojam na superfície da membrana formando camadas (FIELD, 2010). No caso da apitoxina, componentes como a hialuronidase (50 kDa) e a fosfolipase A₂ (19 kDa) possuem tamanhos maiores que os poros da membrana (~10 kDa). Essa torta funciona como uma resistência adicional provocando o declínio do fluxo do permeado (SHI et al., 2014).

No entanto, quando são analisados os dados do J_{0exp} e J_{0cal} , observa-se que há um maior desvio para a formação de torta do que para os outros efeitos. Isso indica que há outros mecanismos atuando conjuntamente durante a ultrafiltração e o mesmo não pode ser definido precisamente. A efeito de comparação, estudos anteriores envolvendo

ultrafiltração de proteínas, incluído albumina e whey, e analisando os dados a partir do modelo de Hermia modificado mostram que os mecanismos dominantes do processo foram a formação de torta e o bloqueio completo dos poros (AGHAJANI et al., 2018; CORBATÓN-BÁGUENA; ÁLVAREZ-BLANCO; VINCENT-VELA, 2015).

5.4.3 Avaliação da eficiência da limpeza química da membrana

A limpeza química da membrana foi executada buscando recuperar, total ou parcialmente, a permeabilidade da mesma. Para isso, utilizou-se o SDS, surfactante aniônico que possui significativa eficiência nas limpezas de membranas para incrustações de natureza orgânica.

Para a avaliação da eficiência da limpeza foram realizados os cálculos a partir das Equações 9-13. Os dados encontrados estão apresentados na Tabela 13:

Tabela 13 - Dados do fluxo e da resistência removida após a limpeza da membrana.

J_{A0} (L/m ² .h)	J_{LA} (L/m ² .h)	J_{LQ} (L/m ² .h)	$R_M \times 10^{12}$ (1/m)	$R_F \times 10^{12}$ (1/m)	$R_L \times 10^{11}$ (1/m)	FR (%)	RR (%)
62,26	24,55	57,08	8,65	13,30	7,84	91,69	94,10

Fonte: Próprio autor.

Legenda: J_{A0} – Fluxo de água para membrana usado pela primeira vez; J_{LA} – Fluxo de água após a limpeza da membrana com água; J_{LQ} – Fluxo de água após a limpeza química da membrana; R_M – Resistência da membrana; R_F – Resistência devido ao *fouling*; R_L – Resistência após a limpeza; FR – Fluxo recuperado; RR – Resistência removida.

Avaliando a eficiência do processo de limpeza pelos valores de fluxo recuperado (FR) e resistência removida (RR), observou-se que o fluxo teve uma expressiva recuperação após a remoção das enzimas, peptídeos e outros compostos da apitoxina presentes na superfície da membrana.

Esses dados corroboram com o estudo de Madaeni e colaboradores (2010) que analisaram diversos surfactantes para limpeza de membranas de polietersulfona contendo soro de leite, incluindo os aniônicos, catiônicos e não aniônicos. Os autores relataram que o processo químico envolvendo o SDS mostrou uma recuperação do fluxo de 99% na sua concentração micelar crítica. Esse fenômeno é decorrente da interação do surfactante com estrutura interna da proteína, desnaturando-a e gerando uma redução na interação hidrofóbica dela com a superfície da membrana, sendo possível a remoção da torta formada. Ademais, eles mostraram também que para concentrações acima de 8 mM de SDS, como é o caso desse trabalho – 12,5 mM – a eficiência de limpeza permanece constante.

5.4.4 Análise da CLAE

Os valores de recuperação da melitina e da rejeição da PLA2 foram determinadas a partir das Equações 2 e 3 e os resultados são representados na Tabela 14.

Tabela 14 - Dados da recuperação da melitina e da rejeição da PLA2.

Corrida	Melitina			Fosfolipase A ₂		
	C _A (mg/mL)	C _P (mg/mL)	Rec (%)	C _A (mg/mL)	C _P (mg/mL)	Rej (%)
1	0,65	0,51	77,99	0,26	0,18	99,24
2	0,60	0,45	75,70	0,27	0,18	99,00
3	0,61	0,37	59,10	0,27	0,18	99,10

Fonte: Próprio autor.

Para a recuperação da melitina, os resultados mostraram-se significativos, variando de 59 a 78%. Essa grande variação ocorreu, provavelmente, pelo *fouling*, que vai se acumulando no decorrer das corridas e impede a passagem da melitina. Por isso, a necessidade de procedimentos de limpeza da membrana durante a ultrafiltração da apitoxina.

A respeito da rejeição da PLA2 alcançou valores expressivos igual e acima de 99%. Comparando com os estudos percursos realizados por Brito e colaboradores (2018), ao realizar a ultrafiltração frontal com pressão de 220 kPa e agitação de 750 rpm, os autores alcançaram uma recuperação da melitina de 58,6% e uma rejeição da PLA2 de 59,9%. Já Shen e colaboradores (201) concluíram que quando se utiliza membrana de 10 kDa, não há presença de PLA2, contendo 4% ou mais de apamina e 50% ou mais de melitina.

Esses dados mostram que o fracionamento da melitina em relação ao principal composto alergênico foi obtido, atingindo valores expressamente significativos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento desse projeto de fracionamento da melitina a partir da apitoxina trouxe, em uma primeira etapa, o planejamento fatorial da ultrafiltração, no qual a pressão aplicada à membrana e a concentração de apitoxina na solução foram as variáveis independentes. E como variáveis dependentes, o fluxo de permeado, a recuperação de melitina e a rejeição da PLA2 foram utilizados. A partir da obtenção do ponto ótimo dado pelo planejamento, a segunda etapa foi realizada por meio da análise do processo da ultrafiltração, ou seja, foram verificados o declínio do fluxo de permeado, o mecanismo de incrustação atuante, a limpeza química da membrana após os experimentos e a recuperação da melitina e rejeição da PLA2.

Portanto, os dados coletados durante a ultrafiltração na primeira fase mostraram um fluxo de permeado com o comportamento já esperado. Houve uma diminuição do fluxo seguido por uma estabilização com o passar do tempo devido à polarização de concentração e ao *fouling*. Os resultados obtidos a partir da cromatografia mostraram uma recuperação de melitina com porcentagem de 10%, porém com valores favoráveis para a rejeição da PLA2, até 99%. Com isso, alguns parâmetros foram modificados para a segunda etapa deste trabalho.

No que tange os modelos matemáticos obtidos a partir da análise de variância, conclui-se que o fluxo de permeado mostrou um comportamento diretamente proporcional à diferença de pressão e inversamente com a concentração de apitoxina. Esse mesmo comportamento foi observado para a recuperação de melitina. No caso da rejeição de PLA2 foi favorecida pelo aumento tanto da diferença de pressão quando da concentração de apitoxina. Diante dessas análises, a segunda etapa foi realizada com a condição ótima: ΔP igual a 1,5 bar e C_{ap} igual a 1,0 mg/mL.

Para a segunda etapa, concluiu-se que a razão entre os fluxos de permeado pelo fluxo inicial para as corridas realizadas tiveram uma normalização. Uma análise mais precisa do declínio desse fluxo mostrou que, em sua maioria, ele está associado ao *fouling* – entre 25 a 28%. Porém, quanto à análise do mecanismo de incrustação, feita a partir do modelo de Hermia adaptado para a ultrafiltração tangencial, não houve a determinação de um modelo dominante. Isso se deve à proximidade dos coeficientes de regressão, além dos valores de J_{0cal} e J_{0exp} alcançarem significativos desvios.

A limpeza da membrana com SDS gerou resultados significativos quanto à recuperação do fluxo da membrana e remoção da resistência, sendo 91 e 94%, respectivamente.

Por fim, para esta segunda etapa, as análises no CLAE mostraram-se significativamente melhores em relação à recuperação da melitina, variando entre 59 e 78%. Esse aumento se fez, provavelmente, pelas modificações realizadas para essa etapa. Quanto à faixa de variação da recuperação de melitina, isso pode ser explicado pela presença de incrustação na superfície da membrana no decorrer da realização das três corridas. Para a rejeição da PLA2, os resultados foram significativamente superiores quando se compara aos valores encontrados para a condição na primeira etapa, de 89% para 99%.

Logo, o fracionamento da melitina dos compostos alergênicos presentes na apitoxina se mostrou bastante satisfatório utilizando a ultrafiltração *cross flow* com membrana comercial de celulose regenerada de 10 kDa.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como perspectiva de continuação deste trabalho há de salientar:

1. Estudo mais aprofundado sobre a análise de variância da recuperação da melitina e da rejeição da PLA2 em relação à ΔP e concentração de apitoxina;
2. Realizar uma análise econômica do processo para verificar a viabilidade do processo em escala industrial;
3. Analisar de forma mais criteriosa o produto obtido e suas possíveis aplicações no âmbito farmacêutico;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAJANI, M; RAHIMPOUR, A.; AMANI, H. TAHERZADEH, M. J. Rhamnolipid as new bio-agent for cleaning of ultrafiltration membrane fouled by whey. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 5, p. 272–280, 2018.

ALI, M. Studies on Bee Venom and Its Medical Uses. **International Journal of Advancements in Research**, v. 1, p. 1–15, 2012.

ALVES, E. M.; HENEINE L. G. D.; PESQUERO, J. L.; MERLO, L. D. A. **Composição farmacêutica contendo fração de apitoxina e uso**. Depósito: 7 out. 2009. Concessão: 14 abr. 2011.

AWAD, K.; ABUSHOUK, A. I.; ABDELKARIM, A. H.; MOHAMMED, M.; NEGIDA, A.; SHALASH, A. S. Bee venom for the treatment of Parkinson's disease: How far is it possible? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 295–302, 2017.

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

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. v. 278, p. 381–386, 2011.

BANKS, B. E. C.; DEMPSEY, C. E.; PEARCE, F. L.; VERNON, C. A. WHOLLEY, T. E. New methods of isolating bee venom peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 116, n. 1, p. 48–52, 1981.

BANKS, B. E. C.; SHIPOLINI, R. A. Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom. In: **Venoms of the hymenoptera**. London: Academic Press Inc. (London) Ltd., p. 329–415, 1986.

BENTON, A. W.; MORSE, R. A.; STEWART, J. D. Venom collection from honey bees. **Science**, v. 142, n. 3589, p. 228–230, 1963.

BRITO, J. C. M. **Fracionamento do veneno da *apis mellifera* utilizando membranas de ultrafiltração de celulose regenerada de 10 kda** 2015. 104f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

BRITO, J. C. M.; BASTOS, E. M. A. F.; HENEINE, L. G. D.; FIGUEIREDO, K. C. F. Fractionation of *Apis mellifera* venom by means of ultrafiltration: Removal of phospholipase A₂. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 229–236, 2018.

BOGDANOV, S. **The Bee Venom Book**. Switzerland: e-book Bee Product Science, 2016.

CABRAL, S. R. **Otimização da ultrafiltração em modo de diafiltração para redução do teor de lactose em concentrados proteicos**. 2015. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2015.

CARIAS, C. M.; VIEIRA, F. S.; GIODANO, C. V.; ZUCCHI, P. Medicamentos de dispensação excepcional: Histórico e gastos do ministério da saúde do Brasil. **Revista de Saude Publica**, v. 45, n. 2, p. 233–240, 2011.

CHEN, J.; LARIVIERE, W. R. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 2, p. 151–183, 2010.

CHEN, V.; LI, H. LI, D.; TAN, S.; PETRUS, H. B. Cleaning strategies for membrane fouled with protein mixtures. **Desalination**, v. 200, n. 1–3, p. 198–200, 2006.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. 1 ed. Lancaster: Taylor & Francis Routledge, 1998.

CHOI, Y. C.; KWON, K. R.; CHOI, S. H. Purification of peptide components including Melittin from bee venom using gel filtration chromatography and propionic acid/urea polyacrylamide gel electrophoresis. **J Korean Pharmacoacupunct Inst.**, v. 9, p. 105–112, 2006.

CORBATÓN-BÁGUENA, M. J.; ÁLVAREZ-BLANCO, S.; VINCENT-VELA, M. C. Fouling mechanisms of ultrafiltration membranes fouled with whey model solutions. **Desalination**, v. 360, p. 87–96, 2015.

CORNARA, L.; BIAGI, M.; XIAO, J.; BURLANDO, B. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUN, p. 1–20, 2017.

COSKUN, O. Separation Tecniques: CHROMATOGRAPHY. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156–160, 2016.

COSTA, J. D.; ALMEIDA, A. M.; JUNIOR, A. A. G.; CHERCHIGLIA, M. L.; ANDRADE, E. I. G.; ACURCIO, F. A. Treatment of rheumatoid arthritis in the Brazilian Unified National Health System: expenditures on infliximab compared to synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs, 2003-2006. **Cadernos De Saúde Pública**, v. 30, n. 2, p. 283–295, 2014.

CUI, Z. Protein separation using ultrafiltration – an example of multi-scale

complex systems. **China particuology**, v. 3, n. 6, p 343-348, 2005.

DA SILVA BIRON, D.; DOS SANTOS, V.; ZENI, M. Overview Membranes Separations The. In: BERGMANN, C. P. **Ceramic Membranes Applied in Separation Processes**. 1. ed. Porto Alegre: Springer International Publishing AG, p. 91, 2018.

FIELD, R. Fundamentals of Fouling. **Membrane Technology**, v. 4, p. 1–23, 2010.

FIELD, R. W.; WU, D.; HOWELL, J. A.; GUPTA, B. B. Critical flux concept for microfiltration fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 100, p. 259–272, 1995.

GAULDIE, J.; HANSON, J. M.; RUMJANEK, F. D.; SHIPOLINI, R. A.; VERNON, C. A. The Peptide Components of Bee Venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 369–376, 1976.

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, n. 3, p. 255–267, 2006.

GUERRA, Y. P.; ECHEVERRI, J. B.; DÍAZ, J. P.; TREJOS, E. D.; ROTH LISBERGER, S. Análisis proteómico del veneno de la abeja africanizada: comparación de métodos de extracción. **Acta Biológica Colombiana**, v. 21, n. 3, p. 619, 2016.

HABERMANN, E. Zur Pharmakologie des Melittin. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv for Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 222, n. 1–2, p. 173–175, 1954.

HABERMANN, E. Bee and Wasp Venoms. **Science**, v. 177, p. 314–322, 1972.

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

HAGHI, G.; HATAMI, A.; MEHRAN, M. Qualitative and quantitative evaluation of melittin in honeybee venom and drug products containing honeybee venom. **Journal of Apicultural Science**, v. 57, n. 2, p. 37–44, 2013.

HERMIA, J. Constant pressure blocking filtration laws - application to power-law non-newtonian fluids. **Transactions of the institution of chemical engineers**, v. 60, p. 183-187, 1982.

HOOD, J. L.; JALLOUK, A. P; CAMPBELL, N.; RATNER, L.; WICKLINE, S. A. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. **Antiviral Therapy**, v. 18, n. 1, p. 95–103, 2013.

HYE, J. P.; LEE, S. H.; SON, D. J.; OH, K. W.; KIM, K. H.; SONG, H. S.; KIM, G. J. K.; OH, G. T.; YOON, D. Y.; HONG, J. T. Antiarthritic effect of bee venom: Inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF- κ B through interaction with the p50 subunit. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 11, p. 3504–3515, 2004.

JARUSUTTHIRAK, C.; MATTARAJ, S.; JIRARATANANON, R. Influence of inorganic scalants and natural organic matter on nanofiltration membrane fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 287, n. 1, p. 138–145, 2007.

JASON, J. C. **Protein Purification**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

JÖNSSON, A. S.; TRÄGÅRDH, G. Ultrafiltration applications. **Desalination**, v. 77, p. 135–179, 1990.

KUNITZ, A. G. **Melitina proveniente do veneno de abelha: Processo de Purificação, Aplicação e Avaliação Econômica**. 2015. 126f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

LEE, H.; PYO, M. J.; BAE, S. K.; HEO, Y.; KIM, C. G.; KANG, C.; KIM, E. Improved therapeutic profiles of PLA free bee venom prepared by ultrafiltration method. **Toxicological Research**, v. 31, n. 1, p. 33–40, 2015.

LEE, J.-Y.; KIM, I. K.; LEE, J. S.; KIM, E. K.; KIM, C-G. Effect of concentration, pressure, and cut-off size on removing phospholipase A 2 in bee venom by ultrafiltration. **Analytical Science and Technology**, v. 27, n. 6, p. 277–283, 2014.

LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. **Separation processes in the food and biotechnology industries: principles and applications**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 1996.

LI, R.; ZHANG, L.; FANG, Y.; HAN, B.; LU, X.; ZHOU, T.; FENG, M.; LI, J. Proteome and phosphoproteome analysis of honeybee (*Apis mellifera*) venom collected from electrical stimulation and manual extraction of the venom gland. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, 2013.

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

MADAENI, S. S.; ROSTAMI, E.; RAHIMPOUR, A. Surfactant cleaning of ultrafiltration membranes fouled by whey. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 2, p. 273–283, 2010.

MAULET, Y.; BRODBECK, U.; FULPIUS, B. W. Purification from bee venom of melittin devoid of phospholipase A2 contamination. **Analytical Biochemistry**, v. 127, n. 1, p. 61–67, 1982.

MERCK MILIPORE. Disponível em: <<http://www.merckmillipore.com/>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

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

MILIPORE SIGMA. 2019. Melittin from honey bee venom $\geq 85\%$ (HPLC). Disponível em <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m2272?lang=en®ion=US>. Acesso em 2 fev. 2019

MIRSHAFIEY, A. Venom therapy in multiple sclerosis. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 3, p. 353–361, 2007.

MIURA, Y. NMR studies on the monomer-tetramer transition of melittin in an aqueous solution at high and low temperatures. **European Biophysics Journal**, v. 41, n. 7, p. 629–636, 2012.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. 2 ed. Amsterdam: Kluwer Academic Publisher, 1996.

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

NGUYEN, H.V.; HEGER, Z.; KOMINKOVA, M.; MICHALEK, P.; GUMULEC, J.; GURAN, R.; PRIDAL, A.; FERNANDEZ, C.; HYNEK, D.; ADAM, V.; KIZEK, R. The Electrochemical and Statistical Evaluation of Isolation of Mellitin and Apamin from Honey Bee (*Apis Mellifera*) Venom. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10 (2), p. 1249 – 1260, 2015.

NICOLL, A.; WESTON, C. J.; CURETON, C.; LUDWIG, C.; DANCEA, F.; SENCER, N.; SMART, O. S.; GÜNTHER, U. L.; ALLEMANN, R. K. De novo design of a stable N-terminal helical foldamer. **Organic & biomolecular chemistry**. v. 3, p. 4310-5, 2006.

NOBLE, R. D.; STERN, S. A. **Membrane separation technology: Principle and Applications**. 3 ed. Amsterdam: Elsevier Science B. V, 2003.

NOBEL MEDIA AB. MLA style: Arne Tiselius – Facts. 2019. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1948/tiselius/facts/>>. Acesso em 3 fev. 2019.

ORŠOLIĆ, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, n. 1–2, p. 173–194, 2012.

PACÁKOVÁ, V.; ŠTULÍK, K.; HAU, P. T.; JELÍNEK, I.; VINŠ, I.; SÝKORA, D. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components. **Journal of Chromatography A**, v. 700, n. 1–2, p. 187–193, 1995.

PEIREN, N.; VANROBAEYS, F.; DE GRAAF, D. C.; DEVREESE, B.; BEEUMEN, J. V.; JACOBS, F. J. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1752, n. 1, p. 1–5, 2005.

PEREIRA, I. D. O. **Análise e otimização do processo de ultrafiltração do soro de leite para produção de concentrado proteico**. 62 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2009.

QI, S.; ZHU, T.; ZHAO, T.; FANG, X.; SUN, Y. Purity control of different bee venom melittin preparations by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 658, n. 2, p. 397–403, 1994.

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

RADY, I.; SIDDIQUI, I. A.; RADY, M.; MUKHTAR, H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 407, n. 13, p. 16–31, 2017.

RCSB PDB (rcsb.org) of PDB ID 1POC (ROSE et al. (2018) NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. **Bioinformatics** doi:10.1093/bioinformatics/bty419), 2019a.

_____ . ID 1FCQ (ROSE et al. (2018) NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. **Bioinformatics** doi:10.1093/bioinformatics/bty419), 2019b.

_____ . ID 1BH1 (ROSE et al. (2018) NGL viewer: web-based molecular

graphics for large complexes. **Bioinformatics** doi:10.1093/bioinformatics/bty419), 2019c.

RUDGE, S. R.; MONNIG, C. A. Electrophoresis techniques. **Separation and Purification Methods**, v. 29, n. 1, p. 129–148, 2000.

SHAI, Y. Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides. **Biopolymers (Peptide Science)**, v. 66, n. Wiley Periodicals, Inc, p. 236–248, 2002.

SHEN, C. S. et al. **Preparation method for isolated, purified bee venom having allergic components isolated**. Depósito: 7 jun. 2013. Concessão: 11 dez. 2014.

SHI, X.; TAL, G.; HANKINS, N. P.; GITIS, V. Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 1, p. 121–138, 2014.

SILVA, G. D.; ANDRADE, E. I. G.; ALMEIDA, A. M.; JÚNIOR, A. A. G.; ACURCIO, F. A. Perfil de gastos com o tratamento da Artrite Reumatoide para pacientes do Sistema Único de Saúde em Minas Gerais, Brasil, de 2008 a 2013. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 4, p. 1241–1253, 2018.

SILVA, R. I.; BRANDÃO, E. C. V.; BRITO, J. C. M.; FIGUEIREDO, K. C. S. Analysis of fouling mechanisms and membrane cleaning during ultrafiltration of bee venom. **Separation Science and Technology**. 2019. DOI: 10.1080/01496395.2019.1577455.

SOBRAL, F.; SAMPAIO, A.; FALCÃO, S.; QUEIROZ, M. J. R. P.; CALHELHA, R. C.; VILAS-BOAS, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 94, p. 172–177, 2016.

SON, D. J.; LEE, J. W.; LEE, Y. H.; SONG, H. S.; LEE, C. K.; HONG, J. T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 115, n. 2, p. 246–270, 2007.

SONG, L. Flux decline in crossflow microfiltration and ultrafiltration. - LIANFA SONG.pdf. v. 139, p. 183–200, 1998.

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.

TEMPONI, G. M.; SANTOS, P. V. A.; SANTOS, T. M.; VICTOR C. G. **Apitoxin fractionation using ultrafiltration membranes**. 84 f. Dissertação (Trabalho de conclusão de curso) - Departamento de Engenharia química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

TEOH, A. C. L.; RYU, K. H.; LEE, E. G. One-step purification of melittin derived from *Apis mellifera* bee venom. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 84–91, 2017.

TERRA, R. M. S.; GUIMARÃES, J. A.; VERLI, H. Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 25, n. 6, p. 767–772, 2007.

VAN DEN BERG, G. B; SMOLDERS C. A. Flux decline in ultrafiltration process. **Desalination**, v. 77, p. 101-133, 1990.

ZYDNEY, A. L. Membrane Bioseparations. In: **MEMBRANE SEPARATIONS**. Newark: Academic Press, 2000. v. Iip. 1748–1755.