

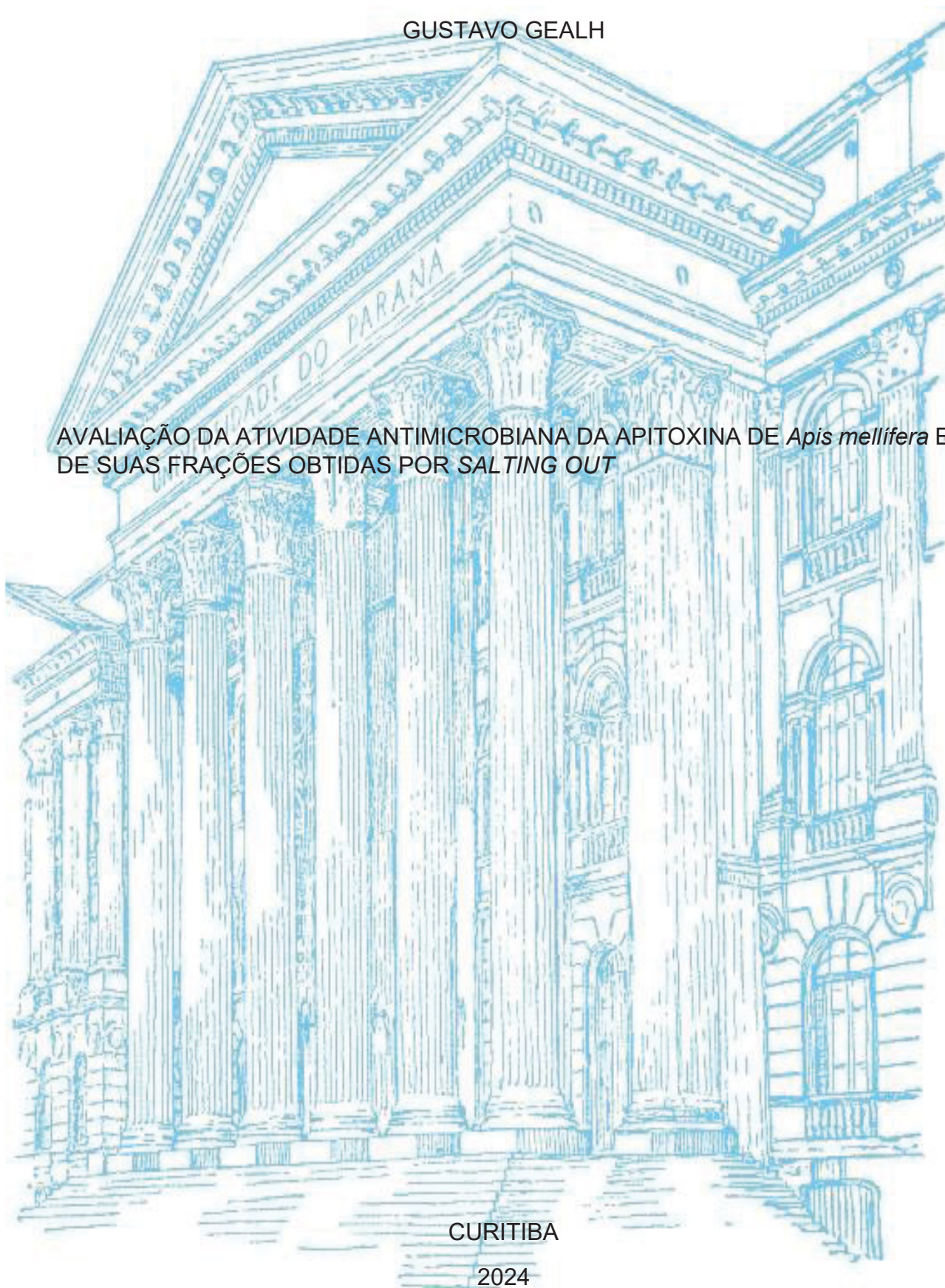
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO GEALH

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA APITOXINA DE *Apis mellifera* E
DE SUAS FRAÇÕES OBTIDAS POR *SALTING OUT*

CURITIBA

2024



GUSTAVO GEALH

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA APITOXINA DE *Apis mellifera* E
DE SUAS FRAÇÕES OBTIDAS POR *SALTING OUT*

Tese submetida ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Pedersen Voll

Co-orientador: Prof. Dra. Fernanda Bovo

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Gealh, Gustavo

Avaliação da atividade antimicrobiana da apitoxina de *apis mellifera* e de suas frações obtidas por *salting out*. / Gustavo Gealh. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Pedersen Voll

Coorientadora: Prof. Dra. Fernanda Bovo

1. Venenos de Abelhas – Uso terapêutico. 2. Enzimas. 3. Anti-inflamatórios. 4. Antioxidantes. 5. Antimicrobianos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Voll, Fernando Augusto Pedersen. IV. Bovo, Fernanda. V. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA QUÍMICA
- 40001016056P9

ATA Nº09

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA**

No dia dezessete de dezembro de dois mil e vinte e quatro às 08:30 horas, na sala Aplicativo Microsoft Teams, Plataforma Online, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese do doutorando GUSTAVO GEALH, intitulada: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA APITOXINA DE *Apis mellifera* E DE SUAS FRAÇÕES OBTIDAS POR SALTING OUT, sob orientação do Prof. Dr. FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), GRAZIELLE DE OLIVEIRA (null), ELISA PEREZ (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE), RAFAEL BRUNO VIEIRA (UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 16 de Dezembro de 2024.

Assinatura Eletrônica

16/12/2024 15:37:31.0

FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

16/12/2024 13:00:53.0

GRAZIELLE DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (null)

Assinatura Eletrônica

27/12/2024 14:46:53.0

ELISA PEREZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE)

Assinatura Eletrônica

20/12/2024 17:42:12.0

RAFAEL BRUNO VIEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA)

Rua Cel. Francisco Heráclito dos Santos, s/nº - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-3590 - E-mail: ppgeq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 418523

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 418523



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA QUÍMICA
- 40001016056P9

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de GUSTAVO GEALH intitulada: **AValiação da Atividade Antimicrobiana da Apitoxina de *Apis mellifera* e de suas frações obtidas por salting out**

, sob orientação do Prof. Dr. FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 16 de Dezembro de 2024.

Assinatura Eletrônica
16/12/2024 15:37:31.0
FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
16/12/2024 13:00:53.0
GRAZIELLE DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (null)

Assinatura Eletrônica
27/12/2024 14:46:53.0
ELISA PEREZ
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE)

Assinatura Eletrônica
20/12/2024 17:42:12.0
RAFAEL BRUNO VIEIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA)

Rua Cel. Francisco Heráclito dos Santos, s/nº - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-3590 - E-mail: ppgeq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 418523

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 418523

RESUMO

A apitoxina, ou veneno de abelha *Apis mellifera*, é um composto secretado por uma glândula abdominal das abelhas, contendo uma variedade de compostos bioativos, como enzimas e peptídeos, conhecidos por suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e antitumorais. A eficácia desse veneno já foi demonstrada tanto por ferroadas diretas quanto por injeções. Entretanto, essas formas de aplicação podem desencadear reações alérgicas, especialmente em pacientes sensíveis aos seus componentes, com destaque para as enzimas. O veneno utilizado para as extrações realizadas neste estudo apresentou 53,5% de melitina em sua composição, componente relevante para a atividade antimicrobiana. Neste estudo, buscou-se a separação dos componentes do veneno utilizando a técnica de *salting out*, seguida de diálise. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), visando identificar e quantificar os principais compostos bioativos e explorar seu potencial terapêutico, reduzindo o risco de reações alérgicas. As frações separadas também foram avaliadas quanto às propriedades antimicrobianas, destacando-se a fração obtida com 80% do limite de solubilidade de sulfato de amônio, que apresentou o melhor desempenho microbiano. Os resultados demonstraram que o processo de *salting out*, embora eficiente na obtenção de frações com diferentes composições, não foi totalmente eficaz na separação das enzimas. No entanto, a fração que apresentou melhor atividade antimicrobiana sugere um potencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Dessa forma, o estudo contribui para o avanço no conhecimento sobre a apitoxina e suas aplicações biomédicas, oferecendo perspectivas para pesquisas futuras voltadas à melhoria dos processos de purificação e avaliação clínica de seus componentes.

Palavras-chave: Veneno de abelha. apitoxina. peptídeos. enzimas. anti-inflamatório. antioxidante. antimicrobiano. *salting out*. diálise. HPLC.

ABSTRACT

Apitoxin, or bee venom (*Apis mellifera*), is a compound secreted by an abdominal gland of bees, containing a variety of bioactive compounds such as enzymes and peptides, known for their antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and antitumor properties. The efficacy of this venom has already been demonstrated through both direct stings and injections. However, these forms of application can trigger allergic reactions, especially in patients sensitive to its components, with emphasis on enzymes. The venom used for the extractions performed in this study contained 53.5% melittin in its composition, a relevant component for antimicrobial activity. In this study, the separation of venom components was pursued using the salting out technique, followed by dialysis. The obtained fractions were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) to identify and quantify the main bioactive compounds and explore their therapeutic potential while reducing the risk of allergic reactions. The separated fractions were also evaluated for their antimicrobial properties, with the fraction obtained with 80% ammonium sulfate solubility limit, as it exhibited the best microbial performance. The results demonstrated that while the salting out process was effective in obtaining fractions with different compositions, it was not entirely efficient in the separation of enzymes. Nevertheless, the fraction that exhibited the best antimicrobial activity suggests potential for the development of new therapeutic approaches. Thus, this study contributes to advancing knowledge about apitoxin and its biomedical applications, offering perspectives for future research and perspectives for improving purification processes and clinical evaluation of its components.

Keywords: bee venom. apitoxin. peptides. enzymes. anti-inflammatory. antioxidant. antimicrobial. salting out. dialysis. HPLC.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESTRUTURA DE SÍNTESE E EJEÇÃO DE APITOXINA DAS ABELHAS <i>Apis mellifera</i> 15
FIGURA 2	ESTRUTURA DA MELITINA EM α -HÉLICE E EM FORMA TETRAMÉRICA 17
FIGURA 3	INTERAÇÃO DA MELITINA COM A MEMBRANA CELULAR..... 18
FIGURA 4	AÇÃO DA APAMINA INIBINDO O FLUXO DE K^+ 19
FIGURA 5	A – ESTRUTURA DA APAMINA ; B – ESTRUTURA DO MCD..... 21
FIGURA 6	FLUXOGRAMA DE SEPARAÇÃO DA APITOXINA POR SALTING OUT 40
FIGURA 7	EQUIPAMENTO PARA EXTRAÇÃO DA APITOXINA 41
FIGURA 8	CÉLULA UTILIZADA NO PROCESSO DE SALTING OUT 43
FIGURA 9	CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA MELITINA 51
FIGURA 10	SOBREPOSIÇÃO CROMATOGRAMA DA AMOSTRA 04 COM O PADRÃO DA MELITINA 60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	AÇÃO FARMACOLÓGICA DA APAMINA PARA DIVERSAS DOENÇAS	20
TABELA 2	REAGENTES UTILIZADOS	37
TABELA 3	DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS PARA A ANÁLISE	50
TABELA 4	DADOS DE CONCENTRAÇÃO X ÁREA PARA MELITINA	51
TABELA 5	COMPONENTES AMOSTRA 01	52
TABELA 6	COMPONENTES AMOSTRA 02	52
TABELA 7	COMPONENTES AMOSTRA 03	53
TABELA 8	COMPONENTES AMOSTRA 04	53
TABELA 9	COMPONENTES AMOSTRA 05	54
TABELA 10	COMPONENTES AMOSTRA 06	54
TABELA 11	COMPONENTES AMOSTRA 07	55
TABELA 12	COMPONENTES AMOSTRA 08	55
TABELA 13	CONCENTRAÇÃO DE MELITINA NAS AMOSTRAS	56
TABELA 14	RESULTADO DA PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA PARA A APITOXINA PURA.....	57
TABELA 15	COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTI MICROBIANA ENTRE AS AMOSTRAS AVALIADAS	58
TABELA 16	CONTROLES DA AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA	59

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	14
2.1.	OBJETIVO GERAL	14
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1.	POLYPEPTIDEOS.....	16
3.1.1.	Melitina	16
3.1.2.	Apamina	18
3.1.3.	Peptídeo de degranulação de mastócitos (MCD)	20
3.1.4.	Tertiapina.....	21
3.1.5.	Secapina.....	22
3.1.6.	Adolapina.....	22
3.2.	ENZIMAS	23
3.2.1.	Fosfolipase A2 (PLA2).....	23
3.2.2.	Hialuronidase.....	23
3.3.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	24
3.4.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	25
3.5.	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	27
3.6.	EFEITOS ANTITUMORAIS	27
3.7.	TÉCNICA DE <i>SALTING OUT</i>	28
3.7.1.	Solubilidade das Proteínas.	29
3.7.2.	Efeito dos Íons	30
3.7.3.	Mecanismo de <i>salting out</i>	31
3.7.4.	Aplicações de <i>salting out</i>	32
3.8.	PROCESSOS DE DIÁLISE NA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	33
3.8.1.	Mecanismo de Diálise.....	34
3.8.2.	Aplicações da Diálise.....	35
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1.	MATERIAIS	37
4.1.1.	Apitoxina	37
4.1.2.	Padrão Melitina.....	38
4.1.3.	Sulfato de Amônio	38
4.1.4.	Membranas celulósica para Diálise	39

4.1.5.	Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC	39
4.2.	MÉTODOS EXPERIMENTAIS	40
4.2.1.	Preparo das amostras	40
4.2.2.	Preparação Membranas	41
4.2.3.	Extração <i>salting out</i>	42
4.2.4.	Liofilização	44
4.2.5.	Análise Antimicrobiana	44
4.2.5.1.	Reagentes	44
4.2.5.2.	Estirpes Bacterianas Utilizadas nos Ensaios Antimicrobianos	45
4.2.5.3.	Cultivo das Bactérias	47
4.2.5.4.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC).....	48
4.2.6.	Caracterização das amostras	48
5.	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	49
5.1.	RESULTADOS ANÁLISE HPLC.....	49
5.1.1.	Descrição das amostras	50
5.1.2.	Curva de calibração do padrão para Melitina.....	50
5.1.3.	Amostra 01	51
5.1.4.	Amostra 02	52
5.1.5.	Amostra 03	52
5.1.6.	Amostra 04	53
5.1.7.	Amostra 05	53
5.1.8.	Amostra 06	54
5.1.10.	Amostra 08	55
5.1.11.	Concentração de Melitina na amostra inicial	55
5.1.12.	Concentração de Melitina nas Amostras	56
5.2.	RESULTADOS ANÁLISE MICROBIANA	57
6.	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

A apiterapia é a prática terapêutica que utiliza produtos das abelhas da espécie *Apis mellifera*, como mel, própolis, pólen e apitoxina, para promover benefícios à saúde humana e animal (DIAZ et al., 2010). Dentre esses produtos, a apitoxina, ou veneno de abelha, desempenha um papel fundamental na defesa da colmeia contra invasores. Sua composição é uma mistura complexa de enzimas, peptídeos, aminas, carboidratos e lipídios, cujas interações bioquímicas desencadeiam uma série de reações no organismo (DANTAS, 2013).

A apitoxina tem grande relevância farmacológica devido à presença de componentes biologicamente ativos, como a fosfolipase A2 e a hialuronidase, responsáveis por diversas reações biológicas. Peptídeos como melitina, apamina, secapina e tertiapina apresentam propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antitumorais. Além disso, aminas biologicamente ativas, como histamina, dopamina e noradrenalina, contribuem para seus efeitos terapêuticos (ALVES, 2011).

O veneno de abelha possui agentes anti-inflamatórios que auxiliam no alívio da dor crônica e no tratamento de diversas doenças, incluindo artrites, enfermidades neurodegenerativas e condições dermatológicas, como eczema, psoríase e herpes. No entanto, seu uso apresenta limitações, uma vez que alguns componentes, especialmente as enzimas fosfolipase A2 (PLA2) e hialuronidase, podem desencadear reações alérgicas em indivíduos sensíveis (ORSOLIC, 2012).

A extração do veneno pode ser realizada por diferentes métodos. Um dos primeiros procedimentos descritos por Hilder (1988) consiste na coleta manual do veneno através do ferrão das abelhas, técnica suscetível a contaminação e economicamente inviável. Atualmente, o método mais utilizado emprega placas de vidro com fios condutores que emitem pulsos elétricos. As abelhas, ao pousarem sobre as placas, recebem o estímulo elétrico, liberam o veneno e, simultaneamente, emitem feromônios de alarme, estimulando outras abelhas a ferroarem a superfície, aumentando a eficiência da coleta (SILVA, 2014). Como o veneno exposto ao ambiente sofre a evaporação de seus componentes voláteis, a fração sólida remanescente é a que é coletada para uso (SILVA, 2014).

Dentre os componentes do veneno, destaca-se a melitina, que corresponde a aproximadamente 50% da massa do veneno seco. Esse polipeptídeo de 26 resíduos de aminoácidos tem demonstrado grande potencial terapêutico, incluindo

propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antitumorais (MOURELLE, 2011; DUFFY, 2020). A apamina, outro peptídeo relevante, influencia a transmissão sináptica e pode estimular a resposta anti-inflamatória do organismo (MAIA, 2002). Além disso, o peptídeo MCD promove a liberação de heparina e histamina, exercendo efeito anti-inflamatório e anticoagulante (MAIA, 2002).

Entre as enzimas presentes na apitoxina, a fosfolipase A2 representa cerca de 11% da composição do veneno e está associada a processos inflamatórios, interagindo com os fosfolipídios das membranas celulares e desencadeando a produção de prostaglandinas e leucotrienos (DOTIMAS; HIDER, 1987). A hialuronidase, por sua vez, facilita a disseminação dos demais componentes do veneno ao reduzir a viscosidade do preenchimento intercelular (DOTIMAS; HIDER, 1987). Além disso, a fosfatase ácida, embora presente em menor quantidade, é considerada um dos principais alérgenos da apitoxina (DANTAS, 2013).

A composição do veneno também inclui aminas biologicamente ativas, como ácido γ -aminobutírico, histamina, dopamina e noradrenalina, que desempenham papéis importantes na modulação da resposta inflamatória e vascularização (DIANA, 2014; DOTIMAS; HIDER, 1987; MAIA, 2020).

Diante da diversidade de componentes bioativos, a apitoxina apresenta um grande potencial para aplicações biomédicas. No entanto, para garantir maior segurança no uso terapêutico, é essencial compreender melhor os processos de extração e separação de seus constituintes, buscando minimizar efeitos adversos e ampliar suas aplicações clínicas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é realizar a separação dos componentes do veneno de abelha (apitoxina) através da técnica de *salting out*, com a finalidade de isolar os componentes alergênicos dos componentes farmacologicamente ativos. Este estudo visa não apenas a separação eficiente dos componentes, mas também a avaliação das propriedades antimicrobianas das frações obtidas. As frações serão analisadas para identificar potenciais aplicações terapêuticas que minimizem os riscos de reações alérgicas em pacientes sensíveis.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

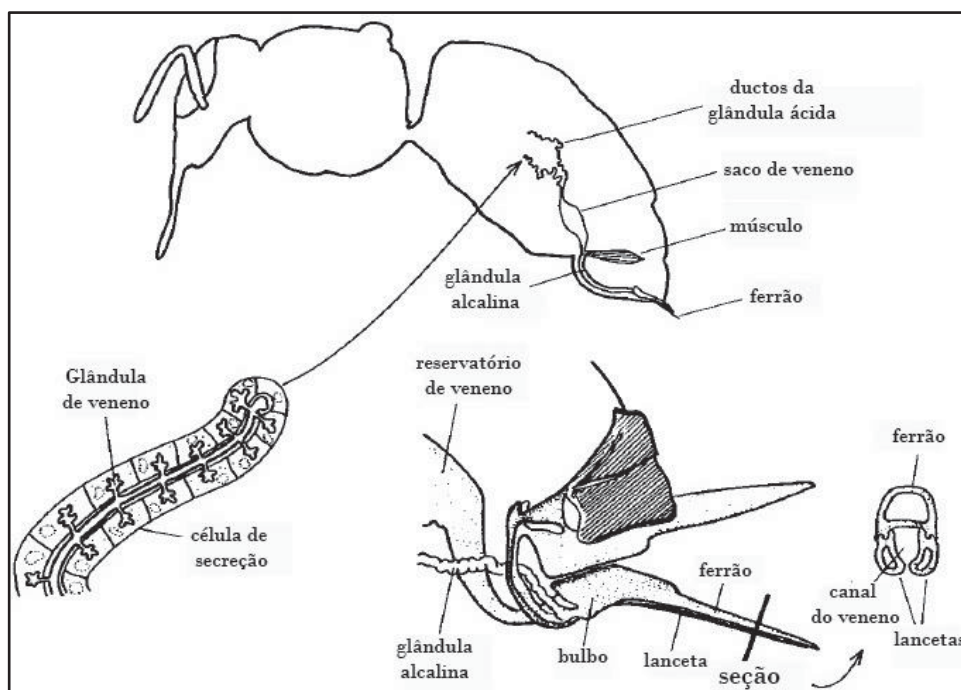
Para alcançar o objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- A) **Padronização da Técnica de *salting out*:** desenvolver o protocolo de *salting out* para garantir a separação eficiente dos componentes alergênicos e farmacológicos do veneno de abelha.
- B) **Realização da Diálise das Frações Separadas:** utilizar a diálise para purificar as frações obtidas, removendo impurezas e concentrando os compostos de interesse.
- C) **Análise Cromatográfica por HPLC com Detector UV-VIS:** analisar as frações obtidas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-VIS para identificar e quantificar os principais componentes bioativos.
- D) **Avaliação das Propriedades Antimicrobianas:** avaliar as propriedades antimicrobianas das frações através de testes de sensibilidade bacteriana, utilizando micro-organismos patogênicos de relevância clínica.
- E) **Identificação de Potenciais Aplicações Terapêuticas:** identificar as frações com maior potencial terapêutico e menor risco de causar reações alérgicas, sugerindo possíveis aplicações clínicas para o tratamento de doenças infecciosas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A apitoxina é sintetizada na glândula de veneno das abelhas operárias e das abelhas-rainhas, é uma mistura de secreções ácidas e básicas resultando em uma secreção de pH entre 4,5 e 5,5, a toxina é armazenada em uma bolsa de veneno que fica localizada junto ao intestino das abelhas, é uma mistura complexa composta de moléculas orgânicas simples, proteínas (enzimas), peptídeos, carboidratos e lipídios (ORSOLIC, 2012). A FIGURA 1 apresenta as partes fisiológicas que compõe a produção da apitoxina das abelhas *Apis mellifera*.

FIGURA 1 – ESTRUTURA DE SÍNTESE E EJEÇÃO DE APITOXINA DAS ABELHAS *Apis mellifera*



FONTE: Adaptado de Dotimas, Hider (1987).

As principais propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e antitumorais estão associadas aos polipeptídeos que constituem a apitoxina (ALVES, 2011). São moléculas formadas por resíduos de aminoácidos com sequenciamentos conhecidos e que apresentam elevado potencial para desenvolvimento de produtos terapêuticos (KUNITZ, 2015).

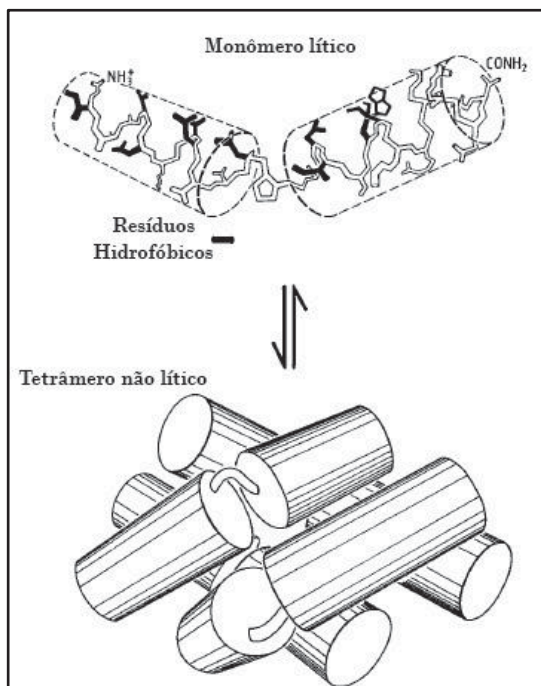
3.1. POLIPEPTIDEOS

3.1.1. Melitina

A melitina é o principal componente peptídico do veneno de abelha, responsável por grande parte de suas propriedades biológicas. Trata-se de um polipeptídeo fortemente básico, catiônico e linear, composto por 26 resíduos de aminoácidos, possui a fórmula molecular $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$ (HABERMANN, 1972). Este peptídeo é hidrossolúvel e interage com as membranas celulares por meio da inserção em sua bicamada lipídica, causando a desestabilização e ruptura da membrana, o que resulta em lise celular.

A melitina é conhecida por suas atividades hemolítica, anti-inflamatória e antimicrobiana. Sua ação antimicrobiana é particularmente eficaz contra uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de algumas espécies de fungos. A capacidade da melitina de formar poros na membrana celular é um dos principais mecanismos que explica sua atividade biológica, tornando-a um componente chave na toxicidade do veneno de abelha, bem como no potencial terapêutico do veneno em diversas aplicações biomédicas.

Os arranjos dos aminoácidos na molécula apresentam um posicionamento em forma cilíndrica α -helicoidal articulada no centro. As hélices são anfifílicas, ou seja, apresentam afinidade com a água de um lado e repulsão do outro lado, em certas condições as hélices formam tetrâmeros protegendo as superfícies hidrofóbicas da água, uma representação dessa estrutura está apresentada na FIGURA 2. No entanto a melitina tetramérica é não lítica e é neste formato que é armazenada no saco de veneno das abelhas. Porém quando diluído, o tetrâmero se dissocia produzindo o monômero que é altamente tensoativo e se divide em membranas, quando ocorre o contato de uma quantidade de moléculas de melitina dissolvidas com a membrana de uma célula, as moléculas da melitina agem como uma “cunha” rompendo o empacotamento de fosfolipídios das membranas das células, fazendo com que haja a lise celular (DOTIMAS, HIDER, 1987).

FIGURA 2 – ESTRUTURA DA MELITINA EM α -HÉLICE E EM FORMA TETRAMÉRICA

FONTE: Adaptado de Dotimas, Hider (1987).

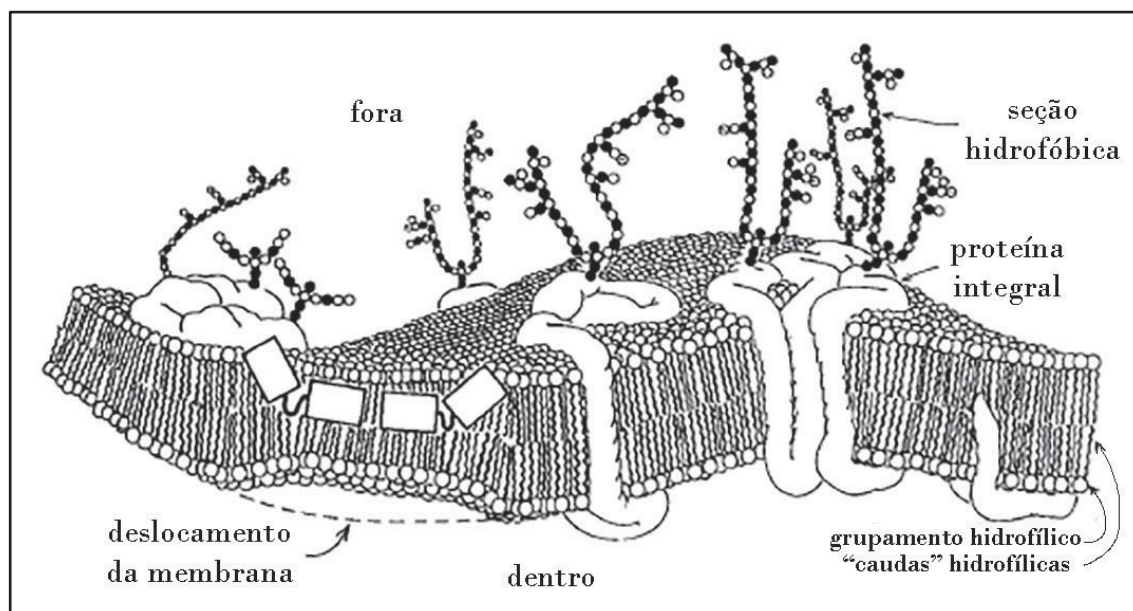
A melitina age em diversos tipos de células e membranas intracelulares, dessa forma, células musculares, fibroblastos e hepatócitos são suscetíveis a ação da melitina. Mesmo em concentrações sublíticas a melitina ainda é capaz de influenciar as células ativando a fosfolipase A2 que se encontra no conteúdo interno celular e é responsável pela geração de prostaglandinas (DOTIMAS, HIDER, 1987).

Estudos mais recentes associam a melitina a propriedades antimutagênicas (TAVARES, 1999), anticancerígenas e proteção celular contra os efeitos nocivos da radiação (GAJSKI, VRHOVAC, 2009).

A atividade citolítica é umas das características mais importantes da melitina, sendo a capacidade de conformar os poros nas membranas celulares. A melitina é atraída pelas membranas lipídicas de ânions pela seção hidrofóbica de cargas positivas, dessa forma a melitina faz inserções na membrana lipídica por meio das interações hidrofóbicas criando regiões deformadas na membrana onde a melitina desloca fosfolipídios e substitui suas posições produzindo poros transitórios. A combinação de um grande número de poros pode levar ao colapso da bicamada fosfolipídica, ocorrendo a lise da célula. Essa interação com as membranas celulares proporcionam as atividades biológicas da melitina, como antimicrobiana, antifúngica, atividade hemolítica e anticâncer (CARPENA, 2020).

Dotimas e Hilder (1987) já haviam descrito o processo de interação da melitina com as membranas celulares apresentando esse mecanismo de forma ilustrada conforme a FIGURA 3.

FIGURA 3– INTERAÇÃO DA MELITINA COM A MEMBRANA CELULAR



FONTE: Adaptado de Dotimas, Hider (1987).

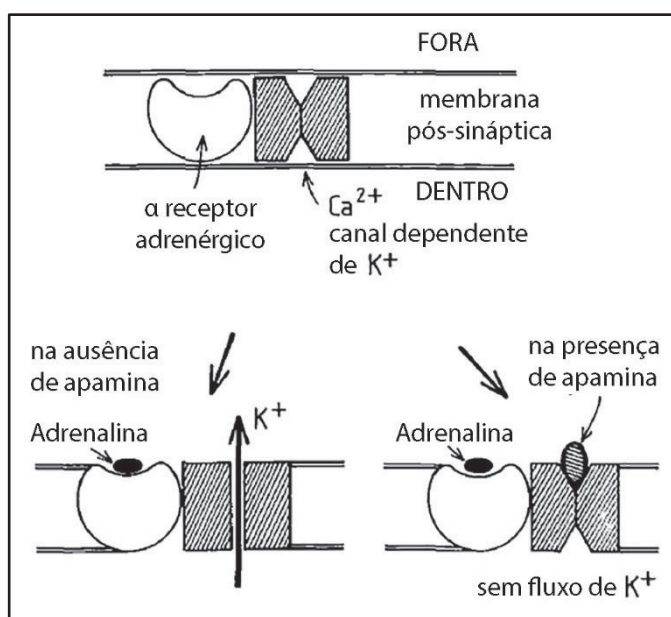
Memariani (2020) realizou estudos *in vitro* e *in vivo* apresentando um mecanismo de ação da melitina com os envelopes virais ou proteínas do capsídeo. A melitina associada a nanopartículas demonstrou a capacidade de inibir a infecciosidade das cepas virais de HIV, desativando o pacote viral (HOOD, 2013). A atividade antiviral da melitina não ocorre apenas nas cepas virais, mas também nas células hospedeiras evitando a infectividade, a melitina reduz a expressão do mRNA em vírus de RNA sem envelope reduzindo a quantidade de vírus necessária para produzir efeito citopático em 50% das células inoculadas (UDDIN, 2016).

3.1.2. Apamina

É um polipeptídeo neurotóxico formado por 18 resíduos de aminoácidos reticulados por duas ligações dissulfeto, apresenta a estrutura de conformação em α -hélice com alta estabilidade em diferentes valores de pH, é uma molécula permeável a parede hematoencefálica o que proporciona acesso ao Sistema Nervoso Central (CARPENA, 2020).

A apamina tem ação bloqueando os canais de Ca^{2+} K^{+} ativados, proporcionando atividade citotóxica e nociceptiva nos nervos, sendo um inibidor alostérico (FIGURA 4). Além disso, a apamina pode ativar os receptores M2 muscaríneos que são inibitórios dos terminais dos nervos motores reduzindo a transmissão neuromuscular. Essa característica de ação no SNC pode vincular a ação da apamina ao tratamento de diferentes doenças neurológicas (Gu, Han, Park 2020).

FIGURA 4 – AÇÃO DA APAMINA INIBINDO O FLUXO DE K^{+}



FONTE: Adaptado de Dotimas, Hider (1987).

A TABELA 1 apresenta os efeitos da apamina no tratamento de diversas doenças, evidenciando suas propriedades terapêuticas, como a modulação do sistema imunológico, a ação anti-inflamatória e o impacto neuroprotetor. A tabela organiza as informações por categoria de doença, incluindo condições neurológicas, inflamatórias e autoimunes, destacando os mecanismos de ação específicos, como a inibição de canais de potássio dependentes de cálcio e a regulação de citocinas pró-inflamatórias. Esses dados são fundamentais para compreender o potencial clínico da apamina e sua aplicação em abordagens terapêuticas inovadoras.

TABELA 1 - AÇÃO FARMACOLÓGICA DA APAMINA PARA DIVERSAS DOENÇAS

Doença	Modelo experimental	Ação biológica	Mecanismo molecular
Aterosclerose	- Célula THP-1 tratada com oxLDL - Injeção de LPS com dieta rica em gordura	Apoptose inibida	Via de sinalização NF-κB diminuída
Insuficiência Cardíaca	- Insuficiência cardíaca induzida por marcapasso	Aumento da duração do potencial de ação	bloqueio do canal SK
Fibrose hepática	- Célula AML12 tratada com TGF-β1 - Camundongos alimentado por DDC ou injeção de CCl4	Fibrose hepática suprimida	MAPK, Smad e TGF-β1 inibidos via de sinalização
Pancreatite	- Camundongos injetados com ceruleína	Produção atenuada de citocinas	Ativação de JNK suprimida
Doença de Alzheimer	- Camundongos transgênicos	Aquisição de memória aprimorada	Eficiência melhorada da sinalização nicotínica
Doença de Parkinson	- MPTP/injeção de probenecida em camundongos com DP	Estado hipercolinérgico para denervação DA	bloqueio do canal SK
Neurofibromatose	- Modelo de rato heterozigoto Nf1+/-	Aumento do potencial de membrana em célula pós-sináptica	bloqueio do canal SK
Dermatite atópica	- Célula HaCaT tratada com TNF-α/IFN-γ	Citocinas inflamatórias suprimidas	Via de sinalização JAK/STAT e NF-κB inibidos

FONTE: Gu. et al. (2020)

3.1.3. Peptídeo de degranulação de mastócitos (MCD)

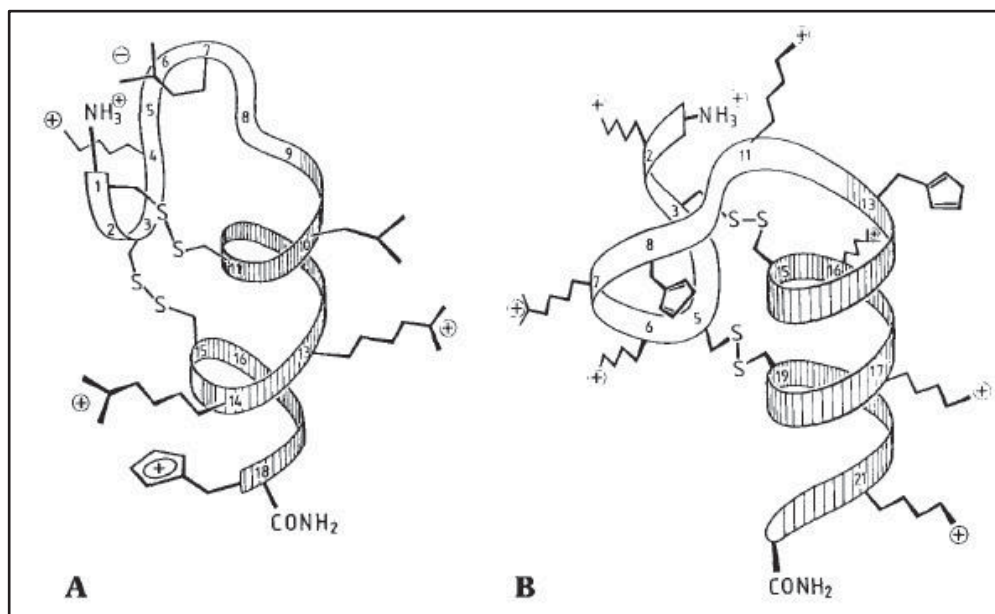
O MCD ou peptídeo 401 é um polipeptídeo fortemente catiônico formado por 22 resíduos de aminoácidos, possui uma estrutura secundária semelhante à apamina (FIGURA 5) com duas pontes dissulfeto que unem o aa 3 com 15 e o aa 5 com 19 (ZIAI, et al., 1990).

Em baixas concentrações, inferiores a 0,1 mg/mL, o MCD produz degranulação dos mastócitos fazendo com que haja liberação de histamina, gerando vermelhidão, inflamação e dor localizada no local da picada. Em altas concentrações o MCD atua como uma substância anti-inflamatória inibindo a liberação de histamina, o peptídeo MCD e IgE podem estabelecer complexos de dissulfeto, causando uma alteração conformacional na IgE inibindo a transmissão do sinal para o receptor (BUKU, PRICE, 2001).

Devido o MCD possuir uma estrutura secundária similar a apamina, pode atuar como uma neurotoxina bloqueando os canais de Ca^{2+} K^+ ativados que produzem um aumento da excitabilidade neural (CORNARA, et al., 2017).

A FIGURA 5 apresenta uma ilustração dos efeitos do MCD em relação a concentração.

FIGURA 5 – **A** – ESTRUTURA DA APAMINA ; **B** – ESTRUTURA DO MCD



FONTE: Adaptado de Dotimas, Hider (1987).

3.1.4. Tertiapina

É um polipeptídeo formado por 21 resíduos de aminoácidos com duas pontes dissulfeto que unem o aa Cys3 com Cys14 e o aa Cys5 com Cys18. A tertiapina bloqueia os canais retificadores de Potássio (Kir) presentes em células epiteliais, coração e SNC, esses canais são relacionados a disfunção do nó sinusal (SAD) (BIDAUD, et al., 2020).

A tertiapina possui em sua sequência de aa uma metionina que produz uma substância química que favorece a sua oxidação. Dessa forma, para evitar esse problema criou-se uma molécula sintética da tertiapina, a tertiapina-Q, onde a metionina foi alterada para glutamina que não produz alterações químicas e conserva todas as atividades biológicas da tertiapina (JIN, et al., 1999).

3.1.5. Secapina

A secapina é um polipeptídeo constituído por 25 resíduos de aminoácidos, contendo uma ponte dissulfeto que liga os aminoácidos 9 e 20 (MENG et al., 2012). Os estudos destinados a caracterizar as propriedades biológicas da secapina foram realizados utilizando sua forma sintetizada, a qual demonstrou uma forte neurotoxicidade, além de uma significativa atividade antimicrobiana (HOU et al., 2014).

Além disso, variantes isomorfas da secapina foram estudadas por suas propriedades bioativas específicas. O isomorfo secapina-1, que é um peptídeo semelhante à serina protease, mostrou atividades antifibrinolítica, antielastolítica e antimicrobiana. Por outro lado, a secapina-2 revelou efeitos hiperalgésicos e edematogênicos, sugerindo uma complexidade funcional significativa entre as diferentes formas do peptídeo (LEE et al., 2016).

3.1.6. Adolapina

A adolapina é um polipeptídeo básico composto por 103 resíduos de aminoácidos, reconhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. A principal ação anti-inflamatória da adolapina ocorre através do bloqueio da síntese de prostaglandinas, um dos mediadores primários da inflamação, o que é realizado pela inibição da atividade da ciclooxigenase, uma enzima crucial na via de produção de prostaglandinas (SHKENDEROV, 1982).

Além de sua função anti-inflamatória, a adolapina tem demonstrado efeitos analgésicos significativos. Um dos mecanismos propostos para esse efeito envolve a inibição da lipoxigenase em plaquetas humanas, uma enzima que contribui para a produção de leucotrienos, outros mediadores inflamatórios potentes. Adicionalmente, a adolapina é capaz de interagir com a fosfolipase A2 (PLA2), uma enzima que desempenha um papel central na cascata inflamatória, promovendo a liberação de ácidos graxos que servem de precursores para prostaglandinas e leucotrienos. A inibição da PLA2 pela adolapina, portanto, contribui para sua ampla gama de efeitos anti-inflamatórios e analgésicos (MOGA et al., 2018).

3.2. ENZIMAS

As enzimas presentes na apitoxina desempenham um papel fundamental em sua atividade biológica, estando envolvidas em diversos mecanismos de ação, incluindo efeitos citotóxicos e inflamatórios

3.2.1. Fosfolipase A2 (PLA2)

A fosfolipase A2 (PLA2) é uma enzima polipeptídica composta por 134 resíduos de aminoácidos, caracterizada pela presença de cinco ligações dissulfeto que estabilizam sua estrutura, conectando os aminoácidos 9-31, 30-70, 37-63, 61-95 e 105-113 (WELKER et al., 2011). PLA2s são enzimas amplamente distribuídas na natureza e foram classificadas em 16 grupos distintos, refletindo suas diferenças estruturais e funcionais. A PLA2 derivada das abelhas (bPLA2) pertence ao grupo III, que inclui enzimas dependentes de cálcio com atividade catalítica essencial. Este tipo de PLA2 possui um circuito de ligação de Ca^{2+} fortemente conservado, crucial para sua função, juntamente com uma díade catalítica composta por histidina e aspartato (DENNIS et al., 2011).

3.2.2. Hialuronidase

A hialuronidase é uma enzima constituída por aproximadamente 350 resíduos de aminoácidos, com destaque para a presença de uma ponte dissulfeto, a qual desempenha um papel crucial na manutenção de sua estrutura e função biológica (MARKOVIC-HOUSLEY, 2000). No contexto da apitoxina, sua principal função é facilitar a disseminação dos outros componentes do veneno nos tecidos-alvo. Esse processo é mediado pela degradação do ácido hialurônico, um polissacarídeo amplamente distribuído na matriz extracelular. A degradação do ácido hialurônico reduz a viscosidade dos tecidos, permitindo assim uma maior penetração dos compostos tóxicos do veneno. Devido a essa capacidade de facilitar a propagação do veneno nos tecidos, a hialuronidase é frequentemente referida como o "fator de disseminação".

Além dessa função primária, a hialuronidase desempenha outros papéis importantes na ação da apitoxina. Estudos indicam que ela contribui para a formação

de poros nas membranas celulares, resultando na ruptura das mesmas, o que pode potencializar os efeitos citotóxicos do veneno. Ademais, a hialuronidase está associada à desgranulação dos mastócitos, células que desempenham um papel crucial nas respostas alérgicas e inflamatórias. A ativação dos mastócitos leva à liberação de mediadores inflamatórios, como a histamina, exacerbando a resposta inflamatória local e facilitando a ação dos demais componentes da apitoxina (DOS SANTOS et al., 2018). Essas atividades adicionais ampliam o impacto global do veneno, tornando a hialuronidase uma enzima multifuncional e essencial para a eficácia do veneno de abelha.

3.2.3. Fosfatase ácida

A fosfatase ácida é uma enzima presente na apitoxina que catalisa a hidrólise de ésteres fosfóricos em meio ácido, estando envolvida em processos de degradação celular e modulação da resposta inflamatória. Sua ação pode favorecer a permeabilização de membranas e potencializar os efeitos de outros componentes do veneno. Além disso, essa enzima tem sido associada a reações alérgicas, incluindo anafilaxia (SFORCIN, J. M., et al, 2022)

3.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Alguns componentes do veneno de abelha apresentam notável atividade antioxidante, uma propriedade que está associada principalmente às concentrações de melitina, PLA2 e apamina. Esses compostos demonstram a capacidade de inibir a peroxidação lipídica e aumentar a atividade da superóxido dismutase (SOD), uma enzima chave na defesa antioxidante celular (SOBRAL et al., 2016). No entanto, a atividade antioxidante do veneno não se limita apenas a esses componentes. A vitelogenina, por exemplo, também exibe efeitos antioxidantes em células de mamíferos, atuando através de um mecanismo de proteção direta contra o estresse oxidativo e promovendo a proteção celular contra espécies reativas de oxigênio (PARK et al., 2018).

O estudo de SOBRAL et al. (2016) avaliou o potencial antioxidante do veneno de abelha utilizando diferentes métodos, como a atividade de eliminação de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), poder de redução, inibição do branqueamento de β -

caroteno e inibição das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Embora o estudo tenha confirmado o potencial antioxidante do veneno, ele não especifica quais compostos são os principais responsáveis por essa atividade.

SOMWONGIN et al. (2018) conduziram outro estudo, avaliando a capacidade antioxidante da apitoxina por meio de métodos como DPPH, redução férrica/poder antioxidante (FRAP) e o ensaio do ácido 20-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS). Esse estudo incluiu diferentes espécies de *Apis*, e todas as amostras, incluindo as de *Apis mellifera*, mostraram significativa inibição do DPPH, corroborando o potencial antioxidante do veneno de abelha.

KOCYIGIT et al. (2019) realizaram um estudo para avaliar a atividade antioxidante da apitoxina em ratos com artrite reumatoide (RA), medindo o estado antioxidante total do plasma (TAS), estado oxidante total (TOS) e o índice de estresse oxidativo (OSI). Os resultados mostraram que os ratos tratados com apitoxina apresentaram um aumento significativo nos níveis de TAS, juntamente com uma redução nos níveis de TOS e OSI, sem diferenças significativas entre as diferentes dosagens administradas.

3.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana do veneno de abelha é atribuída predominantemente à ação sinérgica de componentes-chave, especialmente a melitina e a fosfolipase A2 (PLA2). A melitina, que constitui aproximadamente 50% da composição do veneno, é um peptídeo altamente catiônico conhecido por sua capacidade de interagir com membranas celulares bacterianas. Ela atua inserindo-se na bicamada lipídica, formando poros que levam à desestabilização e eventual lise das células bacterianas. Esse mecanismo é eficaz contra uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de algumas espécies de fungos, devido à sua habilidade de perturbar estruturas membranares independentes de receptores específicos (AL-ANI et al., 2015).

A PLA2 complementa a ação da melitina através da hidrólise dos fosfolipídios presentes nas membranas celulares dos patógenos. Essa enzima catalisa a clivagem da ligação éster no sn-2 dos fosfolipídios, resultando na geração de ácidos graxos livres e lisofosfolipídios, os quais possuem propriedades detergentes que contribuem adicionalmente para a destruição da integridade da membrana celular bacteriana. A

combinação dessas ações resulta em um efeito bactericida mais potente do que o observado quando esses componentes atuam isoladamente.

Além desses componentes principais, estudos indicam que outros constituintes do veneno de abelha também contribuem para sua atividade antimicrobiana, sugerindo um efeito sinérgico complexo. Proteínas menores, peptídeos e enzimas presentes na apitoxina podem atuar em conjunto, potencializando a eficácia antimicrobiana por meio de múltiplos mecanismos, como a inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas, bem como a indução de respostas imunológicas no hospedeiro. Essa sinergia não apenas amplia o espectro de ação do veneno contra diversos patógenos, mas também pode reduzir a probabilidade de desenvolvimento de resistência microbiana (AL-ANI et al., 2015).

Além dos componentes antimicrobianos previamente mencionados, a secapina também demonstrou possuir efeitos antibacterianos e antifúngicos significativos. Segundo LEE et al. (2016), a secapina, um dos componentes menores da apitoxina, contribui para a eficácia geral do veneno devido à sua atividade antimicrobiana, ampliando o espectro de ação da apitoxina contra uma ampla gama de patógenos, incluindo tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, bem como diversas espécies de fungos.

A apitoxina, com destaque para a melitina, apresenta uma elevada capacidade de romper membranas celulares e interagir com moléculas superficiais das células. Esse mecanismo também está relacionado ao tratamento antiviral. WACHINGER et al. (1992) conduziram um estudo em que a apitoxina demonstrou a capacidade de inibir a replicação do vírus da estomatite vesicular fundido com proteína fluorescente verde (VSG-GFP) por meio de três abordagens distintas: pré-tratamento, co-incubação e pós-tratamento.

Além disso, UDDIN et al. (2016) demonstraram que a melitina possui efeitos antivirais significativos contra uma variedade de vírus, incluindo o vírus da influenza A (PR8), vírus da estomatite vesicular, vírus sincicial respiratório (RSV) e o vírus da herpes simplex (HSV). Notavelmente, a melitina também mostrou eficácia contra vírus que não possuem uma membrana viral, como o enterovírus-71 (EV-71) e o vírus coxsackie (H3).

3.5. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

LEE, BAE, 2016, apresentaram um estudo comprovando a atividade anti-inflamatória da melitina contra a acne vulgaris, neuroinflamação, esclerose lateral amiotrófica, aterosclerose, artrite e inflamação do fígado.

Em um estudo mais recente, JIN, et al., 2019, a apitoxina demonstrou ter atividade anti-inflamatória por aplicação via tópica contra dermatite atópica, esse efeito é causado por uma redução do nível de IgE, a liberação de citocinas e as atividades da quinase NF-kB e MAPK.

OTÓN, CARMONA, 2019 apresentam um estudo que demonstra que a artrite reumatóide (AR) é uma das patologias inflamatórias mais comuns, acometendo de 0,2 a 0,9% da população dependendo do país. Diversos estudos comprovam a eficácia da apitoxina no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, em um estudo mais recente, KOCYIGIT, et al., 2019, mostrou a ação da apitoxina em ratos com artrite induzida. O grupo que apresentou melhor resposta ao tratamento foram os ratos que receberam 2 mg / kg de apitoxina administrado por via subcutânea durante 15 dias, esta dosagem não afetou as funções do fígado e dos rins. Este grupo apresentou concentrações mais baixas de citocinas inflamatórias do que o controle positivo, esta ação pode estar relacionada ao fato de que a PLA2 é um dos principais agentes inflamatórios na AR e, como a melitina pode formar um complexo com a PLA2, pode causar a inibição da atividade pró-inflamatória da PLA2.

3.6. EFEITOS ANTITUMORAIS

Diversos estudos têm demonstrado que a apitoxina e seus componentes exibem uma notável atividade antitumoral, incluindo a inibição do crescimento celular, prevenção de metástases e indução controlada do apoptose em células tumorais (HO et al., 2010). De acordo com ORSOLIC (2010), os principais componentes da apitoxina que possuem atividade antitumoral são a melitina e a fosfolipase A2 (PLA2). A interação entre essas duas moléculas parece ser particularmente eficaz, amplificando a atividade antitumoral do veneno.

A melitina, em particular, é reconhecida como o componente mais citotóxico da apitoxina contra células tumorais. O primeiro estudo que evidenciou a atividade antitumoral da melitina foi conduzido por HAIT et al. (1985), no qual foi demonstrado

que a melitina pode induzir apoptose em células cancerosas. A melitina atua promovendo a formação de poros na membrana celular, o que resulta em desequilíbrio osmótico e morte celular. Além disso, a melitina tem a capacidade de interferir nas vias de sinalização celular que regulam a sobrevivência e proliferação das células tumorais, aumentando assim sua eficácia como agente antitumoral.

A interação sinérgica entre a melitina e a PLA2 também é um fator crucial para a amplificação da atividade antitumoral. A PLA2, ao hidrolisar os fosfolipídios das membranas celulares, facilita a penetração da melitina nas células, potencializando seus efeitos citotóxicos. Esse mecanismo de ação combinado não só causa danos diretos às células tumorais, mas também pode desencadear respostas imunes contra o tumor, tornando a apitoxina uma candidata promissora para terapias anticâncer.

3.7. TÉCNICA DE *SALTING OUT*

A técnica de *salting out* é amplamente reconhecida na purificação e fracionamento de proteínas devido à sua eficácia, simplicidade e aplicabilidade em diversos contextos bioquímicos. Esse método baseia-se na diminuição da solubilidade das proteínas em soluções aquosas pela adição de altas concentrações de sais, geralmente sulfato de amônio, o que provoca a precipitação das proteínas. O *salting out* aproveita a tendência das moléculas de água a interagir preferencialmente com os íons do sal adicionado, reduzindo a disponibilidade de moléculas de água para interagir com as proteínas. Como resultado, as interações hidrofóbicas dentro da proteína são favorecidas, levando à sua agregação e precipitação (DUONG-LY & GABELLI, 2014).

Uma das principais vantagens do *salting out* é o baixo custo dos sais utilizados, como o sulfato de amônio, que é altamente solúvel em água e permite alcançar forças iônicas elevadas necessárias para a precipitação proteica. Além disso, essa técnica não causa desnaturação das proteínas, preservando sua conformação nativa e atividade biológica, o que é essencial para aplicações subsequentes. A facilidade de escalonamento do processo para níveis industriais também contribui para sua viabilidade econômica, tornando-o uma escolha atrativa para a purificação de proteínas em larga escala (SOUZA, 2019).

Após a precipitação de proteínas pelo método de *salting out*, é comum que resíduos de sais permaneçam no precipitado. Para removê-los e garantir a pureza da

proteína final, técnicas como a diálise são frequentemente empregadas. A diálise utiliza uma membrana semipermeável que permite a passagem de pequenas moléculas, como íons de sal, enquanto retém moléculas maiores, como proteínas. Embora essa etapa adicional possa aumentar o tempo de processamento, o método de "*salting out*" continua sendo uma abordagem econômica e eficiente para a separação de proteínas, especialmente quando comparado a outras técnicas de purificação que demandam equipamentos mais sofisticados e apresentam custos operacionais mais elevados (ZAKOWICZ, 2024)

3.7.1. Solubilidade das Proteínas.

As proteínas são macromoléculas complexas que possuem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, as quais desempenham papéis fundamentais na determinação de suas estruturas e funções biológicas. Em soluções aquosas, as regiões hidrofílicas das proteínas interagem favoravelmente com as moléculas de água por meio de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. Essas interações estabilizam a proteína ao permitir que suas partes hidrofílicas permaneçam em contato com o ambiente aquoso, enquanto as regiões hidrofóbicas, que tendem a evitar a água, se enterram no interior da proteína, contribuindo para a formação de sua estrutura tridimensional estável (TIMASHEFF, 1992).

A técnica de *salting out* aproveita essas propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas para a purificação e fracionamento de proteínas. Esse método baseia-se na adição de altas concentrações de sais, como o sulfato de amônio, à solução proteica. À medida que a concentração de sal aumenta, as moléculas de água são atraídas pelos íons do sal, reduzindo sua disponibilidade para interagir com as proteínas. Isso faz com que as interações hidrofóbicas dentro da proteína se tornem mais proeminentes, levando à agregação e precipitação da proteína da solução. A eficácia dessa técnica é amplamente reconhecida devido à sua capacidade de separar proteínas com base em suas solubilidades em diferentes concentrações de sal, o que permite a purificação seletiva de proteínas desejadas (DUONG-LY & GABELLI, 2014).

O entendimento detalhado do mecanismo molecular por trás do *salting out* é essencial para a padronização de processos de purificação de proteínas, especialmente na indústria farmacêutica e biotecnológica. A capacidade de ajustar variáveis experimentais, como a concentração de sal e o pH da solução, é crucial para

maximizar a eficiência da separação e preservar a atividade biológica das proteínas purificadas. Além disso, o domínio dessa técnica abre possibilidades para o desenvolvimento de novas metodologias de separação, potencialmente mais seletivas e econômicas, com aplicações significativas na produção de bioprodutos e em pesquisas científicas (BURGESS, 2009).

A aplicação do *salting out* vai além da simples precipitação de proteínas, sendo frequentemente utilizada como uma etapa inicial em processos de purificação mais complexos. Em muitos casos, a proteína precipitada é submetida a outras técnicas, como cromatografia de troca iônica ou filtração em gel, para alcançar maior pureza. A combinação dessas técnicas permite a obtenção de proteínas altamente purificadas, essenciais para estudos estruturais e funcionais (WINGFIELD, 2001).

3.7.2. Efeito dos Íons

A presença de íons na solução é um fator crítico que pode modular significativamente a solubilidade das proteínas, um fenômeno amplamente explicado pelo efeito de Hofmeister. Este efeito categoriza os íons com base na sua capacidade de estabilizar ou desestabilizar proteínas em solução, influenciando as interações de solvatação das proteínas. Os íons presentes no sal competem com as proteínas pelas moléculas de água, impactando a formação da camada de solvatação. Íons que favorecem a estruturação da água, conhecidos como kosmotrópicos, tendem a estabilizar as proteínas e promover o efeito de "salting out", enquanto os íons que desestruturam a água, denominados caotrópicos, tendem a ter o efeito oposto, aumentando a solubilidade das proteínas (Debye & Hückel, 1923).

O efeito de Hofmeister é fundamental para entender como diferentes íons afetam a estabilidade e solubilidade das proteínas. Estudos realizados por Zhang e Cremer (2006) demonstraram que a capacidade dos íons de alterar a solubilidade das proteínas está fortemente relacionada à sua posição na série de Hofmeister. Íons kosmotrópicos, como o sulfato (SO_4^{2-}) e o amônio (NH_4^+), são eficazes em promover o "salting out" ao aumentar a estruturação da água ao redor das proteínas. Esse processo reduz a camada de solvatação, favorecendo a agregação e precipitação das proteínas. Por outro lado, íons caotrópicos, como o iodeto (I^-) e o tiocianato (SCN^-), tendem a desestabilizar a estrutura da água, resultando em um aumento da solubilidade das proteínas.

Quando sais como o sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) são adicionados à solução, os íons competem com as proteínas pelas moléculas de água, resultando em uma redução na camada de solvatação ao redor das proteínas. A concentração aumentada de íons leva a um aumento na força iônica da solução, o que diminui as interações eletrostáticas entre as proteínas e as moléculas de água. Sem uma camada de solvatação adequada, as proteínas tendem a se agregar e precipitar. Esse processo é particularmente favorecido por íons kosmotrópicos, que aumentam a estruturação da água, promovendo a agregação proteica (formação de micelas) (Lo Nostro & Ninham, 2012).

A compreensão desses fenômenos é essencial para a aplicação eficaz do "salting out" em protocolos de purificação de proteínas, onde a escolha do sal e a manipulação das condições de solvatação podem ser otimizadas para alcançar a precipitação seletiva de proteínas desejadas. Esses insights têm implicações significativas na bioquímica e na biotecnologia, permitindo o desenvolvimento de métodos de purificação mais precisos e eficientes.

3.7.3. Mecanismo de *salting out*

A introdução de sais, como sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), cloreto de sódio (NaCl) ou sulfato de sódio (Na_2SO_4), em processos de purificação de proteínas é realizada em etapas graduais. Esses sais são preferidos devido à sua alta solubilidade e eficácia no processo de "salting out", onde a solubilidade das proteínas é reduzida, resultando em sua precipitação a partir da solução.

Os íons presentes nos sais competem diretamente com as proteínas pelas moléculas de água, um fenômeno explicado por Arakawa e Timasheff (1985). Ao serem introduzidos na solução, os íons formam uma camada de solvatação ao redor de si, atraindo as moléculas de água e, assim, diminuindo a quantidade de água disponível para solvatar as proteínas. Esse efeito é fundamental para a desestabilização das proteínas em solução.

À medida que a concentração de sal na solução aumenta, a força iônica também se eleva, o que resulta em uma diminuição das interações eletrostáticas entre as proteínas e as moléculas de água. Essa redução na solvatação provoca o aumento das interações hidrofóbicas e outras forças intermoleculares entre as proteínas, levando à sua agregação e precipitação. Este processo de precipitação, conhecido

como desnatação, ocorre quando os agregados proteicos se tornam suficientemente grandes para se separar da solução. As proteínas precipitadas podem então ser isoladas por centrifugação (Cohn & Edsall, 1943).

A concentração de sal necessária para precipitar uma proteína específica varia de acordo com suas características individuais, permitindo assim a purificação seletiva de diferentes proteínas com base em suas solubilidades. Essa propriedade é explorada em diversas aplicações bioquímicas e biotecnológicas para a obtenção de proteínas de alta pureza.

3.7.4. Aplicações de *salting out*

A técnica de *salting out* é amplamente utilizada em várias etapas de processos bioquímicos relacionados à purificação, fracionamento e concentração de proteínas, devido à sua eficácia, versatilidade e viabilidade econômica.

- **Purificação de Proteínas:** A técnica de *salting out* é frequentemente empregada para purificar proteínas a partir de extratos celulares, uma vez que diferentes proteínas têm diferentes solubilidades em várias concentrações de sal. Ao ajustar a concentração de sal, é possível precipitar seletivamente as proteínas de interesse, separando-as das impurezas presentes no extrato. Essa técnica é essencial em etapas iniciais de purificação, proporcionando uma forma eficiente de remover grandes quantidades de contaminantes (Scopes, 1994).
- **Fracionamento de Proteínas:** Além de purificar proteínas, o *salting out* é usado para fracionar uma mistura complexa de proteínas, separando-as em diferentes frações com base em suas solubilidades. Ao adicionar sal em etapas, proteínas diferentes precipitam em momentos distintos, permitindo a obtenção de frações relativamente puras. Essa abordagem é particularmente útil quando se deseja isolar uma proteína específica de uma mistura complexa (Englard & Seifter, 1990).
- **Concentração de Proteínas:** O *salting out* também pode ser aplicado para concentrar proteínas a partir de soluções diluídas, facilitando as etapas subsequentes de purificação. Esse processo é especialmente importante quando as proteínas de interesse estão presentes em baixas concentrações, permitindo aumentar sua concentração antes de prosseguir para outras técnicas de purificação, como cromatografia (Scopes, 1994).

A escolha do sal é crítica para o sucesso do *salting out*, pois diferentes sais possuem diferentes capacidades de induzir a precipitação de proteínas. O sulfato de amônio é um dos sais mais comumente utilizados, devido à sua eficácia em promover o *salting out* sem desnaturar as proteínas, o que o torna ideal para muitas aplicações bioquímicas (Englard & Seifter, 1990).

Além disso, a solubilidade das proteínas e a eficiência do *salting out* podem ser influenciadas por fatores como temperatura e pH da solução. A padronização dessas condições experimentais é essencial para maximizar o rendimento e a pureza das proteínas precipitadas. Condições subótimas podem levar à precipitação incompleta ou à co-precipitação de impurezas, reduzindo a eficácia do processo (Scopes, 1994).

3.8. PROCESSOS DE DIÁLISE NA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A diálise é uma técnica essencial na bioquímica e biotecnologia, amplamente utilizada para a purificação, dessalinização e troca de tampões em soluções de proteínas. Esse processo baseia-se na difusão seletiva de solutos através de uma membrana semipermeável, permitindo a separação de moléculas com base em seu tamanho e peso molecular. A compreensão detalhada do mecanismo de diálise é essencial para a padronização de processos de purificação de proteínas, além de ser fundamental no desenvolvimento de novas metodologias para diversas aplicações bioquímicas.

As membranas usadas na diálise são escolhidas com base no tamanho de seus poros, o que determina quais moléculas podem atravessar a membrana. As proteínas e outras macromoléculas, que são maiores que os poros da membrana, são retidas, enquanto pequenas moléculas, como sais e tampões, podem se difundir livremente através da membrana. Essa seletividade torna a diálise uma ferramenta eficaz para remover impurezas de baixo peso molecular de soluções de proteínas, sem afetar as macromoléculas de interesse (Lodish et al., 2000).

O princípio básico da diálise é impulsionado pela difusão de solutos através da membrana, o que ocorre devido a um gradiente de concentração. As moléculas menores migram do lado de maior concentração para o lado de menor concentração até que o equilíbrio seja atingido. Esse processo é essencial em várias etapas de purificação, onde a remoção de sais ou outros solutos pequenos é necessária para

preparar proteínas para análises subsequentes ou aplicações específicas (Tobin et al., 2013).

Além disso, a diálise pode ser utilizada para trocar tampões em uma solução de proteínas, o que é fundamental para preparar amostras para determinadas condições experimentais. A eficiência da diálise pode ser otimizada ajustando fatores como o volume da solução, a área da membrana e o tempo de diálise, garantindo a remoção adequada de contaminantes e a manutenção da integridade das proteínas (Scopes, 1994).

3.8.1. Mecanismo de Diálise

O mecanismo de diálise ocorre através das seguintes etapas:

- **Preparação da Amostra:** A solução de proteína a ser dializada é cuidadosamente colocada dentro de um saco de diálise feito de uma membrana semipermeável. O tamanho de poro da membrana é selecionado com base no peso molecular das proteínas que se deseja reter, garantindo que apenas pequenas moléculas e íons possam atravessar a membrana, enquanto as proteínas maiores permanecem dentro do saco.
- **Imersão em Tampão:** O saco de diálise é então imerso em um grande volume de tampão dialítico. A escolha do tampão é crucial e deve ser compatível com a proteína em questão para manter sua atividade biológica e estabilidade. O tampão também deve ser capaz de equilibrar o pH e a força iônica adequados para a proteína, prevenindo a desnaturação durante o processo.
- **Difusão de Pequenos Solutos:** Durante a diálise, as pequenas moléculas e íons presentes na solução proteica começam a difundir-se através da membrana semipermeável em direção ao tampão externo. Este processo ocorre devido ao gradiente de concentração entre o interior do saco de diálise e o tampão, permitindo que os contaminantes de baixa massa molecular sejam removidos da solução proteica.
- **Troca de Tampão:** Para maximizar a eficiência da diálise, o tampão externo é frequentemente trocado várias vezes ao longo do processo. Isso mantém um gradiente de concentração favorável para a difusão contínua de pequenos solutos para fora do saco de diálise, acelerando a remoção de contaminantes indesejados.

- **Equilíbrio:** O processo de diálise é considerado completo quando o equilíbrio é atingido, ou seja, quando a concentração de pequenos solutos é praticamente igual em ambos os lados da membrana. Neste ponto, a maioria dos contaminantes de baixa massa molecular foi removida da solução proteica, resultando em uma amostra purificada e pronta para subseqüentes análises ou processos experimentais (Scopes, 1994).

3.8.2. Aplicações da Diálise

Os processos bioquímicos que podem ser aplicados a diálise são os seguintes:

- **Dessalinização de Proteínas:** Após processos como a precipitação por "salting out", as proteínas frequentemente permanecem em soluções com altas concentrações de sais. A diálise é uma técnica eficaz para remover esses sais, permitindo que as proteínas sejam transferidas para um tampão adequado para etapas subseqüentes de purificação ou análise. Este passo é crucial para evitar interferências nos processos bioquímicos subseqüentes (Scopes, 1994).
- **Troca de Tampões:** A diálise é amplamente utilizada para trocar o tampão em que a proteína está dissolvida, facilitando mudanças no pH ou na composição iônica da solução. Este processo é essencial para preparar proteínas para diferentes ensaios bioquímicos ou etapas de purificação, garantindo que as condições experimentais sejam adequadas para a estabilidade e atividade das proteínas (Burgess, 2009).
- **Remoção de Pequenos Contaminantes:** Durante a produção de proteínas recombinantes ou a purificação de extratos celulares, pequenas moléculas como reagentes não reagidos, metabólitos ou produtos de degradação podem estar presentes na solução proteica. A diálise permite a remoção eficiente desses contaminantes, resultando em uma preparação proteica mais pura, o que é fundamental para análises subseqüentes ou aplicações terapêuticas (Wingfield, 2001).
- **Concentração de Proteínas:** Embora não seja a aplicação mais comum, a diálise pode ser usada para concentrar proteínas ao remover solventes de baixa massa molecular, resultando em uma solução proteica mais concentrada. Este

processo é frequentemente realizado em combinação com outros métodos de concentração, como ultrafiltração, para otimizar a concentração da amostra (Wheelwright, 1991).

- **Purificação de Enzimas:** A diálise é uma técnica fundamental na purificação de enzimas, permitindo a remoção de inibidores ou cofatores indesejados. Isso possibilita a obtenção de enzimas em um estado mais puro e funcional, essencial para estudos de caracterização enzimática e aplicações industriais onde a atividade enzimática precisa ser preservada (Whitaker, 1994).
- **Preparação de Amostras para Cromatografia:** Antes de submeter amostras proteicas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (FPLC), a diálise é frequentemente usada para remover pequenos solutos que podem interferir na resolução cromatográfica ou danificar as colunas. Isso garante que as proteínas estejam em um tampão adequado e livre de contaminantes que possam comprometer a separação cromatográfica (Miller, 2010).

A diálise é uma técnica essencial na biotecnologia e bioquímica, com uma ampla gama de aplicações que incluem desde a dessalinização de soluções proteicas até a preparação de amostras para cromatografia. O conhecimento detalhado das aplicações e limitações da diálise é fundamental para otimizar processos de purificação e análise de proteínas, contribuindo significativamente para avanços na pesquisa científica e nas aplicações industriais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Neste tópico, são apresentados os materiais empregados nos experimentos realizados ao longo do estudo. São descritos os reagentes, soluções, equipamentos e demais insumos utilizados nos processos de extração, purificação e análise das amostras.

TABELA 2 – REAGENTES UTILIZADOS

REAGENTE	FORNCEDOR	GRAU DE PUREZA
Apitoxina	Gealh Produtos Apícolas	<i>in natura</i>
Padrão melitina	Merck	$\geq 85\%$
Sulfato de amônio	Labsynth	99%

FONTE: O Autor (2024)

4.1.1. Apitoxina

As amostras de apitoxina utilizadas neste estudo foram provenientes dos apiários da empresa Gealh Produtos Apícolas, localizada na região dos Campos Gerais, próxima à cidade de Ponta Grossa. A localização geográfica dos apiários pode influenciar a composição da apitoxina, considerando as condições ambientais da região.

A coleta da apitoxina foi realizada utilizando métodos padronizados, com equipamentos e técnicas desenvolvidas para minimizar impactos às colônias de abelhas. Dispositivos especializados foram empregados no processo de extração, com o objetivo de reduzir possíveis contaminações e preservar os componentes da amostra.

Após a coleta, as amostras foram armazenadas sob congelamento a -18°C . Esse procedimento foi utilizado para evitar alterações químicas e biológicas na apitoxina. Durante o transporte e o armazenamento, a manutenção da cadeia de frio foi seguida para evitar variações que pudessem comprometer a estabilidade do material.

A escolha das técnicas de coleta e armazenamento visou obter amostras com menor interferência externa, considerando sua posterior análise experimental. O controle da temperatura e das condições de armazenamento foi adotado para

minimizar a degradação dos compostos e possíveis processos oxidativos, buscando preservar as características bioativas da apitoxina para os estudos subsequentes.

4.1.2. Padrão Melitina

O padrão de melitina utilizado neste estudo foi adquirido da empresa *Merck*, possui um grau de pureza igual ou superior a 85%, conforme descrito por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Esta técnica é amplamente aceita e utilizada para garantir a precisão na determinação da pureza dos compostos.

O padrão de melitina é crucial como referência em ensaios analíticos e experimentais. O grau de pureza permite comparações precisas e confiáveis com as amostras de apitoxina coletadas, facilitando a identificação e quantificação da melitina nas amostras experimentais.

Utilizar um padrão com pureza conhecida e certificada é essencial para o controle de qualidade dos experimentos. Isso garante que as análises sejam reprodutíveis e que os resultados obtidos sejam cientificamente válidos.

4.1.3. Sulfato de Amônio

O sulfato de amônio utilizado neste estudo foi adquirido da empresa LABSYNTH, possui um grau de pureza de no mínimo 99%, com teor de metais pesados de 5 ppm, atendendo aos padrões analíticos exigidos para reagentes utilizados em pesquisa científica.

O sulfato de amônio é amplamente utilizado na precipitação de proteínas, um passo crucial para a purificação e concentração de proteínas específicas a partir de misturas complexas. Sua alta pureza assegura que não haja introdução de contaminantes que possam interferir nos resultados experimentais.

A aquisição do sulfato de amônio de padrão analítico, com 99% de pureza, da empresa LABSYNTH, assegura a alta qualidade dos reagentes utilizados neste estudo. A pureza elevada do sulfato de amônio é crucial para a eficácia dos procedimentos de precipitação de proteínas, garantindo a obtenção de resultados precisos e reprodutíveis nas análises subsequentes.

4.1.4. Membranas celulósica para Diálise

Para os procedimentos de diálise, utilizou-se uma membrana celulósica com porosidade de 1000 Daltons (Da). Essa escolha foi baseada na necessidade de remover pequenos solutos e contaminantes, enquanto retém moléculas maiores, como proteínas, dentro da membrana.

A membrana é fabricada a partir de celulose regenerada, um material amplamente utilizado em procedimentos de diálise devido à sua biocompatibilidade e eficiência na separação de solutos.

A porosidade de 1000 Da é adequada para reter moléculas de interesse que possuem massas moleculares superiores a esse valor, como por exemplo a melitina (2800 Da) e a apamina (2030 Da), enquanto permite a passagem de pequenas moléculas e íons, como o sulfato de amônio, garantindo uma diálise eficaz.

A utilização de membranas celulósicas com porosidade de 1000 Da proporciona uma diálise eficiente, essencial para a remoção de contaminantes e a concentração dos componentes bioativos das amostras de apitoxina. O pré-tratamento das membranas assegurou a eliminação de impurezas, garantindo a precisão e a reprodutibilidade dos resultados experimentais.

4.1.5. Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

O cromatógrafo utilizado para as análises qualitativas e quantitativas das amostras foi o modelo Agilent Technologies 1200 series com a seguinte configuração:

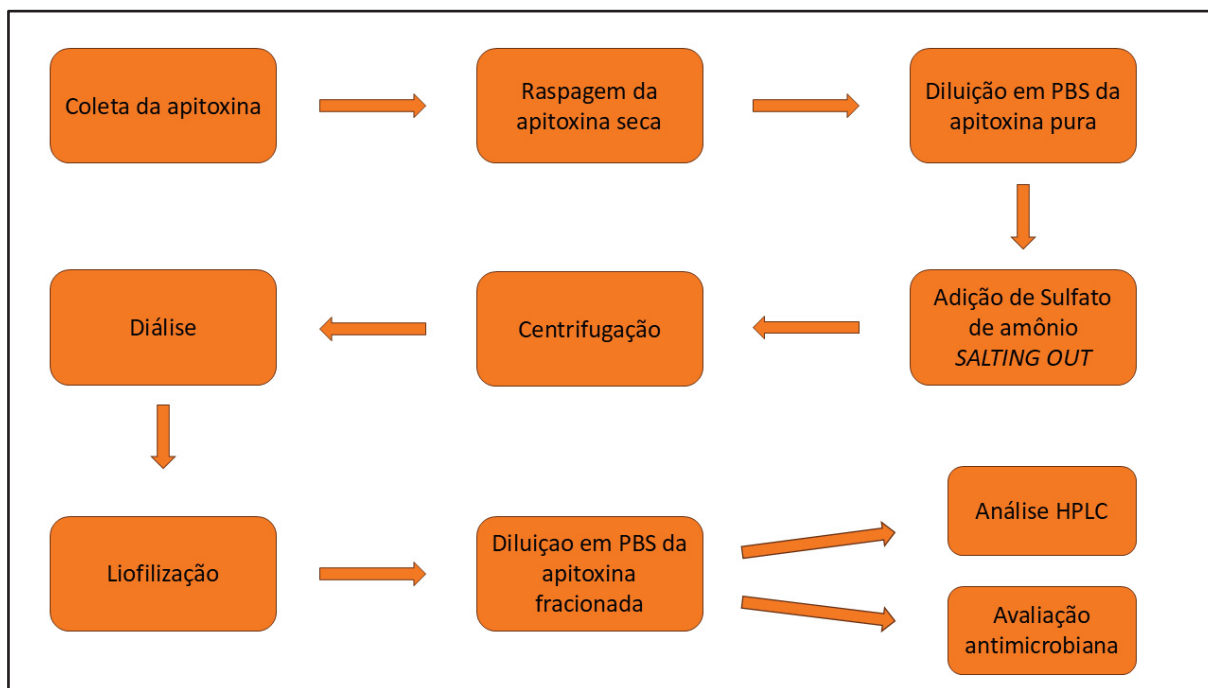
- Bomba quaternária;
- Injetor automático;
- Detector DAD;
- Coluna – KINETEX – 5 micrometros, C18 100 A 250 x 4,6 mm;
- Software: EZChrom Elite. Versão 3.3.1.

A fase móvel foi composta por 60% de ácido trifluoracético 0,1% e 40% de acetonitrila. O volume de amostra injetado foi de 10 µL e o intervalo do DAD de 190 a 400 nm, sendo coletados os comprimentos de onda de 230 e 280 nm.

4.2. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

A FIGURA 6 apresenta as etapas realizadas no processo de separação da apitoxina através de *salting out*.

FIGURA 6 – FLUXOGRAMA DE SEPARAÇÃO DA APITOXINA POR *SALTING OUT*



FONTE: O Autor (2024)

4.2.1. Preparo das amostras

O veneno seco foi cuidadosamente raspado da placa de coleta utilizando instrumentos esterilizados para evitar contaminações.

O veneno coletado foi imediatamente armazenado a uma temperatura de -18 °C. Essa temperatura foi escolhida para preservar as propriedades bioquímicas do veneno e prevenir a degradação de seus componentes ativos.

O veneno seco armazenado foi removido do congelador e imediatamente diluído na solução PBS previamente preparada, adicionando-se a quantidade de sulfato de amônio referente a cada amostra proposta.

As amostras foram armazenadas em alíquotas estéreis a -18 °C até o momento das análises, para minimizar a degradação e evitar múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento.

Manter o veneno seco e as amostras a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ é crucial para preservar sua integridade estrutural e funcional, garantindo a validade dos resultados experimentais. A escolha do PBS como solvente é devido à sua capacidade de manter um pH fisiológico estável e compatível com a maioria dos ensaios bioquímicos e biológicos.

O preparo adequado das amostras, incluindo a raspagem, armazenamento e diluição do veneno, é fundamental para garantir a precisão e a reprodutibilidade dos experimentos subsequentes.

A FIGURA 7 apresenta o equipamento de extração da apitoxina utilizado neste estudo.

FIGURA 7 – EQUIPAMENTO PARA EXTRAÇÃO DA APITOXINA



FONTE: O Autor (2024)

4.2.2. Preparação Membranas

As membranas celulósicas utilizadas podem conter contaminantes oriundos do processo de fabricação, tais como sulfuretos e metais pesados. Portanto, é essencial realizar um pré-tratamento das membranas para remover esses possíveis contaminantes antes do uso.

As bolsas de membrana foram fervidas por 10 minutos em um grande volume de bicarbonato de sódio 2% (m/v) e EDTA 1 mmol/L, ajustado para pH 8,0. Este tratamento visa remover impurezas e contaminantes inorgânicos, incluindo metais pesados, que podem ser complexados pelo EDTA.

Após a fervura inicial, as membranas foram lavadas cuidadosamente com água destilada para remover resíduos do bicarbonato de sódio e EDTA.

Em seguida, as membranas foram fervidas novamente por 10 minutos em EDTA 1 mmol/L. Esta etapa adicional de fervura assegura a remoção de quaisquer vestígios remanescentes de contaminantes que possam ainda estar presentes.

Após o segundo ciclo de fervura, as membranas foram resfriadas à temperatura ambiente. Em seguida, foram imersas em uma solução apropriada para manter a sua integridade e armazenadas a 4 °C até o momento de uso.

Antes de serem utilizadas para diálise, as membranas foram submetidas a uma lavagem final com água destilada para garantir que estejam livres de quaisquer resíduos do pré-tratamento.

A combinação de bicarbonato de sódio e EDTA foi escolhida devido à sua eficácia na remoção de contaminantes metálicos e inorgânicos, além de ser um procedimento padrão amplamente aceito. O pH 8,0 foi mantido durante o pré-tratamento para otimizar a atividade quelante do EDTA e assegurar a integridade das membranas celulósicas. A temperatura de armazenamento foi escolhida para preservar a integridade das membranas e prevenir o crescimento microbiano.

Este processo de pré-tratamento é essencial para garantir que as membranas celulósicas estejam adequadamente limpas e prontas para uso em experimentos de diálise, evitando assim a contaminação dos resultados experimentais.

4.2.3. Extração *salting out*

Após a diluição das amostras em PBS na concentração de 5 mg/mL, a solução foi colocada em uma célula com agitação controlada com temperatura de 20 °C e agitação de 1500 rpm. Em seguida, foi adicionado Sulfato de Amônio à solução até um limite de solubilidade inicial de 40%. Esta etapa resultou na precipitação de alguns componentes presentes na solução.

A mistura foi submetida a centrifugação, 2500 rpm (2000 g) por 15 minutos, o que permitiu a separação do sobrenadante e do precipitado. O precipitado foi então recolhido e diluído em uma solução apropriada antes de ser colocado em uma membrana para diálise. Paralelamente, uma alíquota do sobrenadante foi retirada e também submetida ao processo de diálise.

Para o restante do sobrenadante, o Sulfato de Amônio foi adicionado até atingir uma concentração de 80% do limite de solubilidade, promovendo a precipitação

de uma quantidade maior de componentes. Esta solução foi novamente centrifugada para separar o novo precipitado do sobrenadante. O precipitado obtido nesta etapa foi diluído e, em seguida, submetido à diálise pelo período de 24 horas. Além disso, uma nova alíquota do sobrenadante foi separada para diálise.

O processo de diálise foi essencial para a remoção do Sulfato de Amônio e outras pequenas moléculas da solução, garantindo que os componentes de interesse permanecessem em uma forma adequada para as análises subsequentes. A escolha da membrana de diálise e as condições de diálise foram otimizadas para maximizar a eficiência da remoção do sal, preservando a integridade dos componentes precipitados.

A escolha das concentrações de Sulfato de Amônio (40% e 80%) foi baseada em estudos preliminares, Krisna (2020), que indicaram essas saturações como pontos críticos para a precipitação diferencial dos componentes da amostra. No entanto, a abordagem utilizada neste estudo apresenta um caráter inovador ao combinar a precipitação fracionada com um processo de diálise estratégica, permitindo uma separação mais eficiente dos componentes e minimizando a perda de biomoléculas de interesse. Além disso, essa metodologia oferece uma alternativa economicamente viável para a purificação de biomoléculas, uma vez que utiliza reagentes de baixo custo, equipamentos amplamente disponíveis em laboratórios e um processo que pode ser escalonado sem necessidade de técnicas complexas ou dispendiosas.

FIGURA 8 – CÉLULA UTILIZADA NO PROCESSO DE SALTING OUT



FONTE: O Autor (2024)

4.2.4. Liofilização

Após a execução do processo de extração por *salting out*, as amostras foram submetidas à liofilização nas condições operacionais de -75 °C, <= 200 militor por 96 horas. Esse procedimento foi escolhido com o objetivo de converter as amostras em uma forma sólida, facilitando sua conservação e manuseio. A liofilização também é crucial para evitar a degradação de compostos sensíveis à temperatura ou ao processo de evaporação. Uma vez obtidas as amostras sólidas, estas foram cuidadosamente armazenadas até o momento de sua diluição nas concentrações previamente estabelecidas, permitindo a realização das análises propostas com maior precisão e reprodutibilidade. A escolha das concentrações foi baseada em ensaios preliminares e na literatura existente, assegurando que as condições experimentais fossem adequadas para a avaliação das atividades desejadas.

4.2.5. Análise Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das amostras foi avaliada por meio de testes microbiológicos padronizados. As amostras foram testadas contra microrganismos selecionados, seguindo as condições experimentais estabelecidas. A metodologia incluiu a preparação das suspensões microbianas, a aplicação das amostras e a mensuração da inibição do crescimento. Os procedimentos adotados seguem protocolos amplamente utilizados para a determinação da eficácia antimicrobiana de compostos bioativos.

4.2.5.1. Reagentes

Os reagentes utilizados nas análises microbiológicas desempenham um papel crucial na obtenção de resultados precisos e reprodutíveis. Para garantir a confiabilidade dos ensaios realizados, foram selecionados reagentes de alta qualidade, de fornecedores renomados, que atendem aos padrões internacionais para pesquisas científicas.

- **Caldo Mueller-Hinton e Ágar Mueller-Hinton:** Os meios de cultura Caldo Mueller-Hinton e Ágar Mueller-Hinton, fornecidos pela BBL-BD (Sparks, MD, USA), foram escolhidos por sua excelência na promoção do crescimento bacteriano durante os testes de susceptibilidade antimicrobiana. Esses meios são amplamente

reconhecidos por sua composição balanceada, que permite uma boa difusão dos agentes antimicrobianos, proporcionando condições ideais para a avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de apitoxina.

- **Sulfato de gentamicina:** O sulfato de gentamicina, adquirido da Amresco (Solon, OH, USA), foi utilizado como controle positivo nos ensaios antimicrobianos. Este antibiótico é conhecido por sua eficácia contra uma ampla gama de bactérias gram-negativas e foi selecionado para comparar a atividade antimicrobiana das amostras estudadas. A pureza e a potência do sulfato de gentamicina fornecido pela Amresco são garantidas por testes rigorosos de qualidade, assegurando a precisão dos resultados experimentais.
- **Ampicilina sódica:** A ampicilina sódica, obtida da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), foi utilizada tanto como controle positivo quanto como agente comparativo nas avaliações de susceptibilidade antimicrobiana. A ampicilina é um antibiótico beta-lactâmico eficaz contra uma variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas. A escolha da ampicilina sódica da Sigma Aldrich se baseou na confiabilidade e consistência dos produtos dessa marca, reconhecida globalmente no fornecimento de reagentes para pesquisas de alta qualidade.

Esses reagentes foram selecionados não apenas pela sua eficácia e qualidade, mas também pela sua relevância no contexto dos experimentos realizados. O uso desses padrões garante que os resultados obtidos sejam válidos e comparáveis com os dados disponíveis na literatura científica.

4.2.5.2. Estirpes Bacterianas Utilizadas nos Ensaios Antimicrobianos

Para a condução dos ensaios antimicrobianos, foram selecionadas doze estirpes bacterianas de referência da coleção American Type Culture Collection (ATCC). Essas estirpes foram escolhidas devido à sua relevância clínica e por serem amplamente utilizadas em estudos científicos, permitindo a comparação direta dos resultados obtidos com aqueles presentes na literatura. As estirpes foram classificadas em gram-positivas e gram-negativas, representando um amplo espectro de patógenos de importância médica.

Estirpes Gram-positivas:

As cinco estirpes gram-positivas selecionadas incluem duas variantes de *Staphylococcus aureus* e três de *Enterococcus spp.*. Essas bactérias são conhecidas por sua relevância em infecções hospitalares e por apresentarem resistência a múltiplos antibióticos, o que as torna modelos ideais para o estudo de novas abordagens terapêuticas.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538: Esta estirpe é um padrão para testes de desinfetantes e antimicrobianos, amplamente utilizada devido à sua sensibilidade conhecida a diversos agentes.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 33591: Representa uma estirpe resistente à meticilina (MRSA), sendo crucial para avaliar a eficácia de novos agentes contra cepas resistentes.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212: Estirpe sensível, utilizada como referência em testes de susceptibilidade antimicrobiana.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 51299: Estirpe resistente à vancomicina (VRE), importante para testar a eficácia de agentes antimicrobianos em infecções resistentes.
- *Enterococcus faecium* ATCC 6569: Outra estirpe de *Enterococcus*, frequentemente envolvida em infecções nosocomiais, escolhida para avaliar a atividade antimicrobiana em um contexto hospitalar.

Estirpes Gram-negativas:

As sete estirpes gram-negativas incluídas nos ensaios representam patógenos comuns, muitos dos quais são responsáveis por infecções graves e resistentes em ambientes hospitalares.

- *Escherichia coli* ATCC 25922: Uma estirpe padrão para testes de susceptibilidade, amplamente utilizada em estudos microbiológicos.
- *Escherichia coli* ATCC 35218: Estirpe conhecida por sua resistência a β -lactamases, importante para testar a atividade antimicrobiana frente a bactérias resistentes.
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883: Representa uma estirpe sensível, frequentemente utilizada como referência em testes de susceptibilidade antimicrobiana.

- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603: Uma estirpe produtora de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), crucial para avaliar a eficácia de agentes contra cepas resistentes.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853: Estirpe utilizada como padrão em testes de susceptibilidade devido à sua resistência intrínseca a vários antibióticos.
- *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606: Patógeno oportunista, frequentemente associado a infecções em ambientes hospitalares e resistente a múltiplos antibióticos.
- *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028: Esta estirpe é um modelo padrão para estudos de patogenicidade e susceptibilidade em enterobactérias.

Essas estirpes bacterianas foram mantidas em condições adequadas de armazenamento e manipuladas conforme protocolos estabelecidos para garantir a integridade e a viabilidade dos microrganismos ao longo dos experimentos. A seleção dessas estirpes visa abranger um espectro amplo de resistência e susceptibilidade, proporcionando uma avaliação abrangente da atividade antimicrobiana das amostras de apitoxina estudadas.

4.2.5.3. Cultivo das Bactérias

As estirpes bacterianas utilizadas nos ensaios antimicrobianos foram inicialmente armazenadas a -80°C , garantindo a preservação de suas características. Para os ensaios, as bactérias foram reativadas em ágar Mueller-Hinton, um meio amplamente utilizado para o cultivo de diversas bactérias e essencial para a realização de testes de susceptibilidade antimicrobiana.

As estirpes *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, conhecidas por sua resistência a β -lactamases de espectro estendido (ESBL), foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton suplementado com $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de antibiótico, garantindo a manutenção de suas características de resistência. A *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, resistente à vancomicina, foi cultivado em ágar Mueller-Hinton acrescido de $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ de vancomicina para assegurar a preservação de seu fenótipo resistente.

As culturas foram incubadas sob condições controladas de temperatura e umidade, e as colônias resultantes foram verificadas quanto à pureza e viabilidade

antes de serem usadas nos ensaios. Este processo cuidadoso assegura a reprodução fiel das características bacterianas, proporcionando resultados confiáveis nas análises antimicrobianas.

4.2.5.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC)

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) do veneno puro e das frações diluídas em PBS foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo, seguindo as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). As amostras foram diluídas sequencialmente em uma placa de 96 poços com fundo em U, com concentrações variando de 200 a 0,78 µg/mL. O inóculo bacteriano foi preparado a partir de uma cultura incubada overnight a 35 °C, ajustada para uma turbidez correspondente a 0,5 na escala de McFarland ($\sim 1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Esta suspensão foi então diluída 1:20 em solução salina ($\sim 5 \times 10^6$ UFC/mL), e 10 µL foram adicionados a cada poço. Gentamicina e ampicilina foram utilizados como controles positivos. As placas foram incubadas por 18 horas a 35 °C, e a MIC foi definida como a menor concentração de aditivo sem crescimento microbiano visível.

Para a Concentração Bactericida Mínima (MBC), 10 µL dos poços sem crescimento visível foram plaqueados em ágar Mueller-Hinton e incubados a 35 °C por 24 horas. A MBC foi definida como a menor concentração capaz de matar 99,9% das células bacterianas em relação ao inóculo inicial. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para avaliar o potencial bacteriostático ou bactericida dos aditivos, foi calculada a razão MBC/MIC. Uma razão MBC/MIC ≤ 4 indica que o aditivo é bactericida; valores maiores sugerem uma ação bacteriostática (PANKEY E SABATH, 2004).

4.2.6. Caracterização das amostras

A caracterização das amostras é uma etapa essencial para compreender os componentes presentes e suas respectivas quantidades. Neste estudo, as análises foram realizadas seguindo os métodos estabelecidos por Somwongin et al. (2018) e Klocek e Seelig (2008), utilizando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por arranjo de diodos (DAD) e espectrofotometria UV-VIS. Essas técnicas combinam precisão e sensibilidade, permitindo uma análise detalhada dos compostos bioativos presentes nas amostras.

As amostras foram preparadas conforme descrito nas seções anteriores, assegurando a precisão e a reprodutibilidade dos resultados. A HPLC-DAD foi escolhida para a separação e quantificação dos componentes devido à sua capacidade de detectar múltiplos comprimentos de onda simultaneamente, o que facilita a identificação de uma ampla gama de compostos. O sistema HPLC utilizado estava equipado com uma coluna C18 (250 mm x 4,6 mm) e um detector DAD. A fase móvel utilizada foi uma mistura de ácido trifluoracético 0,1% e acetonitrila (60:40, v/v), com um fluxo constante de 1 mL/min, garantindo uma eluição eficiente dos compostos.

A espectrofotometria UV-VIS foi utilizada para a análise quantitativa e qualitativa dos componentes, aproveitando a capacidade dos compostos químicos de absorver luz ultravioleta e visível. As amostras foram dissolvidas em solventes apropriados, como PBS ou água destilada, para atingir uma concentração ideal para a análise. As medições foram realizadas em uma faixa de comprimento de onda de 190 a 400 nm, abrangendo as regiões UV e visível. Para garantir a precisão das quantificações, foram preparadas curvas de calibração utilizando padrões de referência conhecidos para os principais componentes esperados nas amostras.

A quantificação dos componentes foi realizada com base na curva de calibração, comparando as áreas dos picos obtidos das amostras com o padrão de referência. A análise das amostras revelou informações cruciais sobre a composição química, permitindo a identificação e quantificação de componentes bioativos. Esses dados são fundamentais para a compreensão dos mecanismos de ação e para o potencial terapêutico dos extratos estudados, contribuindo significativamente para a validação científica do estudo.

5. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

5.1. RESULTADOS ANÁLISE HPLC

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foram realizadas para caracterizar os componentes presentes nas amostras obtidas após os processos de extração. Os cromatogramas gerados permitiram a identificação e a comparação dos perfis das frações analisadas, possibilitando avaliar a eficiência da separação e a presença de compostos específicos. Os resultados a seguir apresentam os tempos de retenção e intensidades dos picos observados, destacando as diferenças entre as frações e o veneno puro, bem como sua relação com a

atividade antimicrobiana identificada no estudo. O tempo de volume morto identificado foi de 1,54 min.

5.1.1. Descrição das amostras

As amostras preparadas para as análises subsequentes estão detalhadamente apresentadas na TABELA 3.

TABELA 3 - DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS PARA A ANÁLISE

Amostra	Descrição	Concentração [mg/mL]
1	Sobrenadante da extração com 40% do limite de solubilidade de NH_2SO_4	0,70
2	Precipitado da extração com 40% do limite de solubilidade de NH_2SO_4	
3	Sobrenadante da extração com 80% do limite de solubilidade de NH_2SO_4 adição parcial do sal	
4	Precipitado da extração com 80% do limite de solubilidade de NH_2SO_4 adição parcial do sal	
5	Sobrenadante da extração com 80% do limite de solubilidade de NH_2SO_4 adição direta do sal	
6	Precipitado da extração com 80% do limite de solubilidade de NH_2SO_4 adição direta do sal	
7	Amostra de BV puro diluído em solução PBS	
8	Amostra de BV puro diluído em água Miliq	

FONTE: O Autor (2024)

5.1.2. Curva de calibração do padrão para Melitina

A curva de calibração para a Melitina foi elaborada utilizando quatro diferentes concentrações, como detalhado na TABELA 4. Essa curva é fundamental para garantir a precisão das quantificações subsequentes, permitindo a correta determinação da concentração de melitina nas amostras analisadas. Cada ponto da curva reflete uma concentração específica, proporcionando uma base sólida para a extrapolação dos dados experimentais.

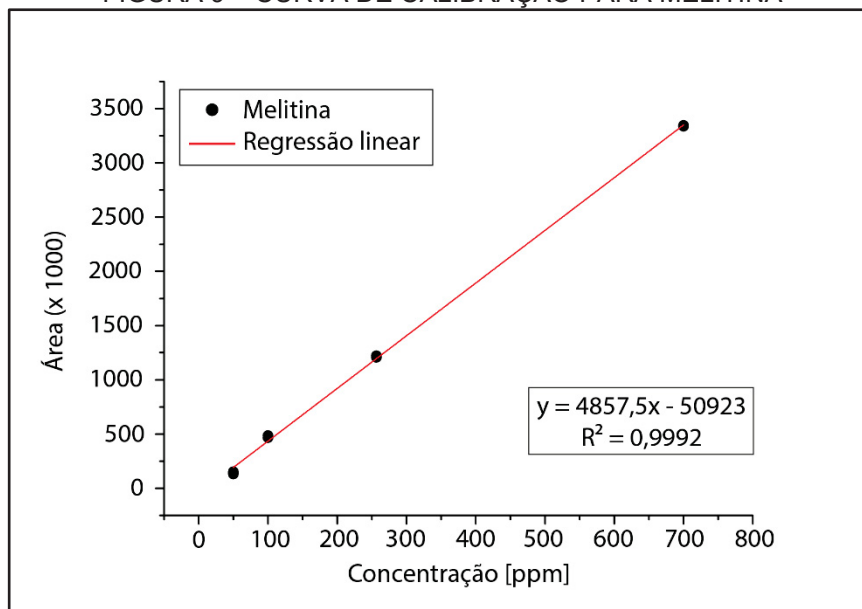
TABELA 4 – DADOS DE CONCENTRAÇÃO X ÁREA PARA MELITINA

Concentração [ppm]	Área		
	1	2	3
50	150842	143006	130382
100	485238	484627	464623
256	1205739	1206134	1221931
700	3343027	3343206	3337051

FONTE: O Autor (2024)

Os dados obtidos para as diferentes concentrações do padrão permitiram a plotagem dos pontos experimentais, resultando na estimativa da curva de calibração. Essa curva é fundamental para correlacionar as concentrações conhecidas com as respostas obtidas. A Figura 9 apresenta a distribuição dos pontos no gráfico, correspondentes às diferentes concentrações do padrão, evidenciando relação linear entre as variáveis analisadas.

FIGURA 9 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA MELITINA



FONTE: O Autor (2024)

5.1.3. Amostra 01

A análise realizada na amostra 01 revelou a presença de melitina, além de outros peptídeos com potencial para exercer atividade biológica significativa. Esses achados indicam a diversidade e a complexidade dos componentes presentes na

amostra, sugerindo que eles podem desempenhar papéis importantes em futuras investigações relacionadas à atividade biológica.

TABELA 5 – COMPONENTES AMOSTRA 01

DAD: 230 nm		
Tempo de retenção	Área	Área %
6,21	10084	2,68
7,69	297952	79,11
11,03	15133	4,02
16,07	6327	1,68
17,15	47119	12,51

FONTE: O Autor (2024)

5.1.4. Amostra 02

Na amostra 02, a análise cromatográfica não detectou a presença de melitina. No entanto, outros componentes foram identificados por seus tempos de retenção específicos. A ausência de picos correspondentes à melitina sugere que, se presente, esse componente está abaixo do limite de detecção dos métodos utilizados.

TABELA 6 - COMPONENTES AMOSTRA 02

DAD: 230 nm		
Tempo de retenção	Área	Área %
4,73	11827	54,89
5,12	9721	45,11

FONTE: O Autor (2024)

5.1.5. Amostra 03

A análise da amostra 03 detectou a presença de melitina, evidenciada por um pico específico no cromatograma correspondente ao seu tempo de retenção característico. No entanto, não foram identificados outros componentes que normalmente seriam esperados com base nos tempos de retenção observados em amostras similares. A ausência de picos adicionais sugere que, se presentes, esses componentes estão em concentrações muito baixas para serem detectados pelos métodos analíticos empregados. A baixa concentração de melitina observada pode ser atribuída à elevada concentração de sais na amostra, o que pode ter interferido na recuperação e na detecção eficiente desse peptídeo.

TABELA 7 - COMPONENTES AMOSTRA 03

DAD: 230 nm		
Tempo de retenção	Área	Área %
8,09	18986	100,00
FONTE: O Autor (2024)		

5.1.6. Amostra 04

A amostra 04 revelou uma concentração expressiva de melitina, identificada como o componente principal no cromatograma. Além disso, foram observados outros componentes em menores quantidades, representados por picos menos intensos, indicando a presença de substâncias em concentrações relativamente baixas em comparação à melitina. Essa composição é resultado da precipitação pelo processo de *salting out*, que favoreceu uma menor concentração de sais na amostra, contribuindo para uma recuperação mais eficiente da melitina e facilitando sua detecção como o componente majoritário.

TABELA 8 - COMPONENTES AMOSTRA 04

DAD: 230 nm		
Tempo de retenção	Área	Área %
6,46	18397	2,88
7,98	443034	69,41
8,93	15456	2,42
11,48	94981	14,88
17,99	66432	10,41
FONTE: O Autor (2024)		

5.1.7. Amostra 05

A amostra 05 apresentou um perfil cromatográfico semelhante ao da amostra 03, que corresponde ao sobrenadante do processo de *salting out*, mas com uma intensidade significativamente maior no pico correspondente à melitina, indicando uma maior concentração desse peptídeo. A diferença na composição entre as amostras pode estar relacionada à adição parcial de sulfato de amônio na fase 3, enquanto na fase 5 foi realizada a adição direta de 80% de sulfato de amônio. Essa variação nas condições de precipitação pode ter favorecido a retenção de diferentes compostos na amostra 05. Embora a amostra 03 não tenha revelado outros componentes, a amostra 05 exibiu picos adicionais, sugerindo a presença de substâncias em menores concentrações.

TABELA 9 - COMPONENTES AMOSTRA 05

DAD:230 nm		
Tempo de retenção	Área	Área %
5,01	49324,93	25,91
5,31	43177,46	22,68
8,05	62989,55	33,09
11,54	9576,42	5,03
15,013	6780,60	3,56
15,4	7561,04	3,97

FONTE: O Autor (2024)

5.1.8. Amostra 06

A amostra 06 apresentou um perfil cromatográfico semelhante ao da amostra 04, porém com menor intensidade nos picos correspondentes à melitina e aos outros componentes identificados. Esse padrão sugere que, embora os mesmos componentes estejam presentes, suas concentrações são inferiores às observadas na amostra 04. A diferença entre as duas amostras pode ser atribuída às condições do processo de *salting out*: na fase 4, houve adição parcial de sulfato de amônio, enquanto na fase 6 foi realizada a adição direta de 80% de sulfato de amônio, o que pode ter impactado a eficiência da precipitação e a recuperação dos compostos.

TABELA 10 - COMPONENTES AMOSTRA 06

DAD: 230 nm		
Tempo de retenção	Área	Área %
6,5	8222,4	1,8
8,1	264504,9	58,0
9,1	9406,1	2,1
11,5	92737,5	20,3
18,1	81025,5	17,8

FONTE: O Autor (2024)

5.1.9. Amostra 07

A amostra 07 representa o veneno puro que foi diluído em solução PBS, tampão comumente utilizado para estabilizar os componentes proteicos durante o processo de análise, a utilização do PBS visa manter a integridade das proteínas, minimizando possíveis degradações ou alterações que poderiam ocorrer em outras condições

TABELA 11 – COMPONENTES AMOSTRA 07

DAD: 230 nm					
Tempo de retenção	Área	Área %	Tempo de retenção	Área	Área %
3,35	5266,72	0,64	11,59	51856,42	6,29
5,32	109142,54	13,24	15,59	19740,00	2,39
6,51	19064,03	2,31	15,77	6729,40	0,82
8,06	512915,07	62,21	18,14	91834,78	11,14
9,11	7890,15	0,96			

FONTE: O Autor (2024)

5.1.10. Amostra 08

A amostra 08 corresponde à análise do veneno puro diluído em água Mili-Q. Essa preparação tem como objetivo avaliar o comportamento dos componentes do veneno em uma solução aquosa pura, permitindo a comparação com outras amostras submetidas a processos de extração ou fracionamento. Além disso, essa amostra foi utilizada para determinar a quantidade de melitina presente no veneno puro utilizado no estudo, servindo como referência para a quantificação desse peptídeo nas demais frações analisadas. O perfil cromatográfico obtido oferece uma importante referência sobre a integridade e a distribuição dos componentes na forma diluída do veneno.

TABELA 12 – COMPONENTES AMOSTRA 08

DAD:230 nm					
Tempo de retenção	Área	Área %	Tempo de retenção	Área	Área %
3,35	37875	1,76	6,49	44430	2,07
3,97	7680	0,36	7,87	1493792	69,56
4,53	9159	0,43	9,13	15490	0,72
4,66	11412	0,53	11,57	52579	2,45
4,99	8703	0,41	14,27	6408	0,30
5,33	25297	1,18	17,95	417723	19,45
5,59	16825	0,78			

FONTE: O Autor (2024)

5.1.11. Concentração de Melitina na amostra inicial

Para determinar a quantidade de melitina presente na amostra inicial, utilizou-se a amostra 8. Através da curva de calibração, pode-se estimar a concentração de melitina:

$$[Melitina] = \frac{(Área + 50923)}{4857,5}$$

$$[Melitina] = 0,318 \text{ mg/mL}$$

O padrão utilizado apresenta um grau de pureza de no mínimo 85%, com isso a quantidade de melitina estimada na amostra pode variar de 0,318 *mg/mL* a 0,37 *mg/mL*, o que corresponde a um intervalo de 45,5 % a 53,5 % de melitina no veneno puro utilizado para o estudo.

5.1.12. Concentração de Melitina nas Amostras

A concentração de melitina nas amostras foi determinada por meio da curva de calibração construída com o padrão de melitina. Através da curva foi possível quantificar a quantidade de melitina nas amostras, garantindo consistência nos resultados e possibilitando a comparação entre as frações. Para essa determinação utilizou-se o padrão com o valor de 85% de pureza. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 – CONCENTRAÇÃO DE MELITINA NAS AMOSTRAS

	1	2	3	4	5	6	7	8
Melitina [ppm]	81,41	0,00	16,74	115,04	26,94	73,65	131,24	374,12
Melitina %	12,2	0,0	2,5	17,2	4,0	11,0	19,6	53,5

FONTE: O Autor (2024)

A comparação entre as amostras 7 e 8 revelou uma diferença na concentração de melitina, provavelmente influenciada pelo meio de diluição utilizado. Enquanto ambas as amostras correspondem ao veneno puro, a amostra 7 foi diluída em solução PBS e a amostra 8 foi diluída em água Milli-Q. Os resultados indicaram que a concentração de melitina na amostra 7 foi de aproximadamente 40% menor em relação à amostra 8.

A presença de sais na solução PBS pode ter influenciado a detecção da melitina pelo HPLC, interferindo na retenção da molécula na coluna cromatográfica, na sua ionização ou na resposta do detector, o que pode ter impactado a quantificação final.

5.2. RESULTADOS ANÁLISE MICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana foi conduzida inicialmente utilizando uma amostra de veneno puro. Para a preparação da amostra, um grama de veneno foi dissolvido em um mL de solução PBS (tampão fosfato salino), garantindo assim uma concentração adequada para os testes subsequentes. Após a dissolução, foram realizadas microdiluições seriadas para obter diferentes concentrações da amostra. As amostras preparadas foram então adicionadas às culturas bacterianas para avaliar a eficácia antimicrobiana. Este procedimento envolveu a exposição das culturas bacterianas a várias concentrações do veneno puro para determinar a concentração mínima inibitória (MIC) necessária para inibir o crescimento bacteriano. Além disso, a metodologia empregada seguiu padrões de controle de qualidade para assegurar a precisão e a reprodutibilidade dos resultados. Os ensaios foram realizados em triplicata e incluíram controles positivos e negativos para validar a eficácia do procedimento e a integridade das culturas bacterianas.

A TABELA 14 não só demonstra a eficácia antimicrobiana do veneno puro em diferentes concentrações, mas também fornece uma visão sobre o potencial terapêutico de compostos derivados da apitoxina para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

TABELA 14 - RESULTADO DA PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA PARA A APITOXINA PURA

Cepas bacterianas	veneno total		
	MIC	MBC	MBC/MIC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	42	42	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	17	17	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 (produtora de β -lactamase)	12,5	12,5	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	17	17	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 (ESBL)	25	25	1
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	33	33	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8	8	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)	12,5	12,5	1
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	12,5	12,5	1
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 (VRE e HLAR)	17	17	1
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	8	8	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	8	8	1

FONTE: O Autor (2024)

MBC/MIC = de 1 a 4 - ação bactericida; acima de 4 - ação bacteriostática;

MIC = concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$);

MBC = concentração bactericida mínima ($\mu\text{g/mL}$);

β -lactamase = enzima que degrada antibióticos beta-lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas;

ESBL = β -lactamase de amplo espectro;

MRSA = *S. aureus* resistente à meticilina;

VRE = enterococo resistente à vancomicina;

HLAR = aminoglicosídeo de alto nível.

A TABELA 15 apresenta os resultados obtidos para as diferentes amostras submetidas aos processos de extração realizados neste estudo, incluindo o veneno puro e as frações extraídas por meio do processo de *salting out* com diferentes saturações de sulfato de amônio. As análises incluem a avaliação da eficácia antimicrobiana contra diversos micro-organismos.

Os resultados que apresentaram MIC maior que 200 $\mu\text{g/mL}$ não houve necessidade de realizar o MBC para a mesma amostra pois caracterizou a ausência de atividade, consequentemente não foi avaliado a relação MBC/MIC.

TABELA 15 – COMPARATIVO DA ATIVIDADE ANTI MICROBIANA ENTRE AS AMOSTRAS AVALIADAS

Cepas bacterianas	MBC/MIC						
	Apitoxina pura	Amostra					
		1	2	3	4	5	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	1	-	-	1,5	-	1,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	1	-	-	1	-	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 (produtora de β -lactamase)	1	1	-	-	1	-	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1	1	-	-	1	-	1,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 (ESBL)	1	1	-	-	1	-	1
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	1	2	-	-	1	-	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1	1,2	-	-	1	1	1,4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)	1	1,3	-	-	1	1	1,4
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1	1	-	-	1	1	1
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 (VRE e HLAR)	1	1,9	-	-	1	-	1,5
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	1	1	-	-	1	1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	1	1	-	-	1	1	1

FONTE: O Autor (2024)

No presente estudo, gentamicina e ampicilina foram empregadas como controles positivos para avaliar a eficácia antimicrobiana das amostras. A gentamicina, um aminoglicosídeo que atua predominantemente contra bactérias Gram-negativas, e a ampicilina, uma penicilina eficaz contra bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, foram selecionadas devido ao seu amplo espectro de ação e uso consolidado em testes microbiológicos.

TABELA 16 - CONTROLES DA AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA

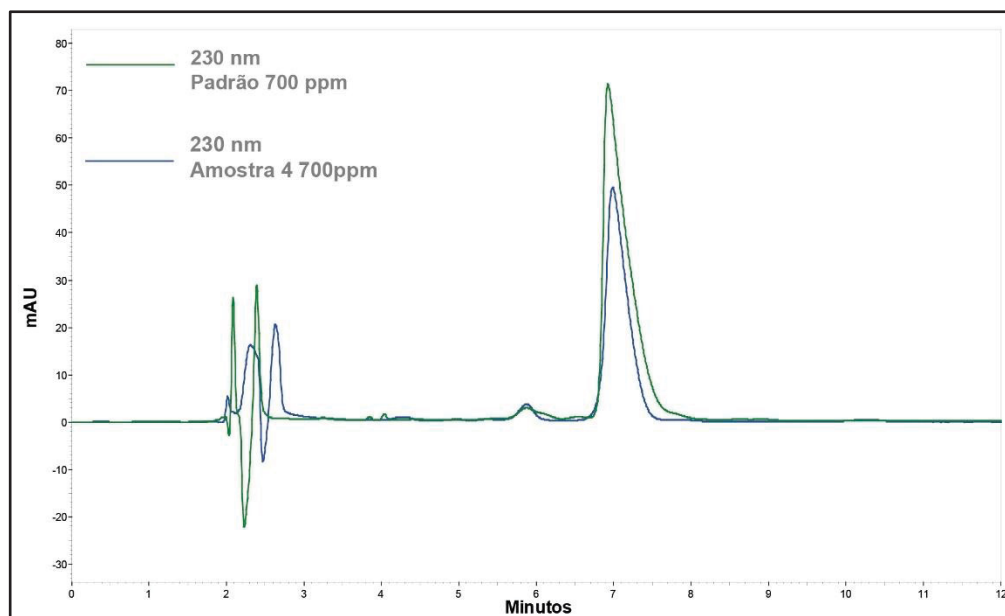
Cepas bacterianas	MIC	
	gentamicina	ampicilina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,5	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 (produtora de β -lactamase)	1	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	0,5	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 (ESBL)	8	-
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	-	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,25	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)	4	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	8	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 (VRE e HLAR)	> 2000	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	8	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	1	-

FONTE: O Autor (2024)

A amostra 4 destacou-se nos ensaios microbiológicos por apresentar os melhores resultados antimicrobianos entre as frações analisadas. Para aprofundar a compreensão da composição dessa amostra e explorar os possíveis fatores que contribuíram para sua eficácia, foi realizada uma sobreposição do cromatograma do padrão da melitina com o cromatograma da amostra 4, evidenciando as semelhanças e diferenças nos perfis cromatográficos.

Além da melitina que apresentou uma concentração próxima ao veneno puro diluído em solução PBS, é possível observar detecções menores entre 2 e 4 minutos, que não correspondem diretamente à melitina que indicam a presença de outros compostos que podem estar contribuindo para a atividade antimicrobiana observada.

FIGURA 10 – SOBREPOSIÇÃO CROMATOGRAMA DA AMOSTRA 04 COM O PADRÃO DA MELITINA



FONTE: O Autor (2024)

6. CONCLUSÃO

O estudo do veneno de abelha, conhecido como apitoxina, tem se mostrado altamente promissor devido à ampla gama de atividades biológicas exibidas por seus diversos componentes, é composta por uma rica variedade de enzimas, peptídeos e outras moléculas bioativas, que demonstram propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antitumorais e imunomoduladoras. No entanto, o uso terapêutico do veneno puro é severamente limitado pela presença de componentes que podem desencadear reações alérgicas graves em indivíduos sensíveis, representando um obstáculo significativo para sua aplicação clínica.

A separação eficiente dos componentes alergênicos dos farmacologicamente ativos é, portanto, essencial para tornar a apitoxina uma opção terapêutica viável e segura. A técnica de separação como o *salting out* seguido de diálise, mostrou-se prática e eficaz para isolar os componentes desejados do veneno de abelha. Essa metodologia permitiu a obtenção de frações enriquecidas com compostos bioativos específicos.

A Fosfolipase A2 não é um componente desejável, pois está associada a reações alérgicas, o que torna essencial sua remoção para aplicações terapêuticas seguras. Curiosamente, as amostras 3 e 5 não identificaram a presença da Fosfolipase A2, sugerindo que essas frações podem ter um perfil mais seguro para uso terapêutico, ao mesmo tempo que a concentração de melitina nessas amostras não foi muito expressiva. A análise cromatográfica sugere que a detecção anterior ao da melitina pode estar associado à Fosfolipase A2, o que ressalta a importância de métodos de separação precisos.

A amostra 4 destacou-se por apresentar o melhor resultado antimicrobiano. A concentração de melitina detectada foi próxima da amostra de veneno puro diluída em solução PBS, porém com menos detecções de outros componentes sugerindo ser uma fração promissora para estudos relacionados a reações alérgicas.

Apesar da eficácia do *salting out* no fracionamento do veneno, não foi possível confirmar a separação dos componentes de interesse das enzimas devido às limitações da técnica analítica utilizada neste estudo. Porém a contínua caracterização e avaliação das propriedades bioativas da apitoxina pode levar ao desenvolvimento de novos medicamentos e terapias inovadoras, com potencial para melhorar a eficácia dos tratamentos e reduzir os efeitos colaterais associados aos medicamentos.

Em suma, a pesquisa sobre o veneno de abelha e seus componentes representa um campo de estudo altamente promissor. A capacidade de isolar e utilizar de forma segura e eficaz os compostos bioativos da apitoxina tem um grande potencial no tratamento de diversas doenças, proporcionando novas opções terapêuticas.

Em perspectivas futuras, pode-se utilizar técnicas analíticas mais aprimoradas para determinar qualitativamente e quantitativamente de forma mais precisa as amostras obtidas através do processo de separação.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. M. - **Composição farmacêutica contendo fração de apitoxina e uso.** Patents WO2011041865 A1, 2011.

ARAKAWA, T., TIMASHEFF, S. N. **Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding.** Biochemistry, v. 24, p. 6756-6762, 1985.

Brandão, E.C.V., et al. **Separação de melitina através da ultrafiltração: o efeito da concentração da apitoxina e da diferença de pressão no fluxo e seletividade.** Conference paper, XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2018.

BROADMAN, J. Bee Venom. **The Natural Curative for Arthritis and Rheumatism.** New York, Putnam & Sons. 1962. p. 224.

BURGESS, R. R. **Protein Precipitation Techniques.** Methods in Enzymology. v. 463, p. 331-342, 2009.

CARPENA M.; et al. **Bee Venom: An Updating Review of Its Bioactive Molecules and Its Health Applications.** MDPI nutrientes, 2020.

CHEN J.; LARIVIERE W. R. **The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword.** NIH Prog Neurobiol. v. 92, p. 151-183, 2010.

COHN, E. J., EDSALL, J. T. **Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions.** New York: Reinhold Publishing Corporation, 1943.

COLLINS A. M.; BLUM M. S. **Alarm Responses caused by newly identified compounds derived from the honeybee sting.** Journal of Chemical Ecology, v. 9, USA, 1983.

CORNARA L.; BIAGI M.; XIAO J.; BURLANDO B. **Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products.** Frontiers in Pharmacology, Italy, 2017.

DEBYE, P., HÜCKEL, E. **The theory of electrolytes. I. Lowering of freezing point and related phenomena.** Physikalische Zeitschrift, v. 24, p. 185-206, 1923.

DIANA, M.; QUÍLEZ, J.; RAFECAS M. **Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review.** Elsevier Journal of functional foods. v. 10, p. 407-420, 2014.

DUFFY C. et al. **Honeybee venom and melittin suppress growth factor receptor activation in HER2-enriched and triple-negative breast cancer.** Nature, Precision Oncology 2020.

EL-SEEDI, H.; et al. **Antimicrobial Properties of Apis mellifera's Bee Venom.** MDPI Toxins, 2020.

ENGLARD, S., SEIFTER, S. **Precipitation techniques.** Methods in Enzymology, v. 182, 285-300, 1990

GU H.; HAN S. M.; PARK K. **Therapeutic Effects of Apamin as a Bee Venom Component for Non-Neoplastic Disease.** MDPI Toxins, 2020.

HIDER, R. C.; DOTIMAS E. M. **Honeybee venom.** Bee World 68, p. 51-70, UK, 1983.

HYDE, A. M.; et al. **General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series.** OPRED, Merck & Co., New Jersey, USA, 2017.

JIN. W.; KLEM A. M.; LEWIS J. H.; LU Z. **Mechanisms of Inward-Rectifier K⁺ Channel Inhibition by Tertiapin-Q.** Biochemistry. v. 38, p. 14294-14301, USA, 1999.

KHALIL, A.; ELESAWY, B. H.; ALI, T. M.; AHMED, A. M. **Bee Venom: From venom to Drug.** MDPI Molecules, Switzerland, 2021.

KIM S.; et al. **Apamin inhibits THP-1-derived macrophage apoptosis via mitochondria-related apoptotic pathway.** Journal Elsevier Experimental and Molecular Pathology. v. 93, p. 129-134, 2012.

KIM W.; et al. **Apamin inhibits TNF- α - and IFN- γ -induced inflammatory cytokines and chemokines via suppressions of NF- κ B signaling pathway and STAT in human keratinocytes.** Journal Elsevier Pharmacological Reports. v. 69, p. 1030-1035, 2017.

KRISNA, C. D.; SANDRA, B. G. **Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation.** Methods in Enzymology, v. 541, p. 85-94, 2014.

LEE G.; BAE H. **Bee Venom Phospholipase A2: Yesterday's Enemy Becomes Today's Friend.** MDPI Toxins, Switzerland, 2015.

LEE J.; et al. **Anti-inflammatory Effect of Bee Venom on Type II Collagen-Induced Arthritis.** The American Journal of Chinese Medicine, v. 32, n. 3, p. 361–367, 2004.

LEE K. S.; et al. **Secapin, a bee venom peptide, exhibits anti-fibrinolytic, anti-elastolytic, and anti-microbial activities.** Journal Elsevier Developmental and Comparative Immunology, p. 27-35, 2016.

LEE Y. M.; et al. **Apamin from bee venom suppresses inflammation in a murine model of gouty arthritis.** Journal Elsevier Journal of Ethnopharmacology v. 257, 2020.

Lo Nostro, P., Ninham, B. W. **Hofmeister phenomena: an update on ion specificity in biology.** Chemical Reviews. v. 112, 2286-2322, 2012.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. **Molecular Cell Biology (4th ed.).** New York: W. H. Freeman, 2000.

Miller, J. C., Miller, J. N. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry (6th ed.).** Harlow: Pearson Education, 2010.

Pankey, G. A., & Sabath, L. D. **Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections.** Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, v. 38, p. 864–870, 2004.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 90488935, **Tertiapin LQ.** Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tertiapin-LQ>>. Acesso em: 15 dez. 2021.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 16132134, **Secapin**. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Secapin>>. Acesso em: 15 dez. 2021.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice (3rd ed.)**. New York: Springer-Verlag, 1994.

SFORCIN, J. M.; et al. **Apiterapia: Medicamentos das abelhas e possíveis tratamentos**. Editora UNESP, São Paulo, 2022

SILVA, J. F. **Apitoxina, Coleta e Processamento**. XVIII SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA – PEC NORDESTE, 2014.

SOMWONGIN S.; et al. **Antioxidant activity and irritation property of venoms from Apis species**. Elsevier Toxicon v. 145, p. 32-39, 2018.

SOUZA, P. L. R. **Novas estratégias cromatográficas visando a recuperação e purificação de proteínas do soro de sangue humano e do leite bovino**, PPGEQ UFCE, 2019

TIMASHEFF, S. N. **The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes**. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. v. 22(1),67-97, 1993.

TOBIN, P. C., SHULER, M. L., KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts (2nd ed.)**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2013.

WHEELWRIGHT, S. M. **Protein Purification: Design and Scale-Up of Downstream Processing**. New York: Wiley, 1991.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences (2nd ed.)**. New York: Marcel Dekker, 1994.

WINGFIELD, P. T. **Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate**. Current Protocols in Protein Science, v. 13, A.3F.1-A.3F.8, 2001.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. **Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series**. Current Opinion in Chemical Biology, v. 10(6), p. 658-663, 2006.

ZIAI M. R.; et al. **Mast Cell Degranulating Peptide**. A Multi-functional Neurotoxin. Journal Pharmacology. v. 42, p. 457-461, 1990.