

Tânia Lúcia Santos Miranda

**Utilização do Gel Termosensível
Poli (N-isopropilacrilamida) na
Concentração de Urina Humana
Visando a Obtenção de Calicreína
Humana, em Grande Escala.**

*Dissertação apresentada ao Departamento
de Bioquímica e Imunologia do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica.*

Orientador: Prof. Roberto Fernando de Souza Freitas.

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

1990

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -
CNPq.

Proc. 401.809/88-9/PQ/FV

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -
CAPES.

Conv: CAPES/BIOQUIMICA.

- Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

FINEP/BIOQUIMICA. Conv. 43.87.0307.00

PADCT/FINEP. Conv. 43.86.0226.00

PADCT/FINEP. Conv. 43/88/0445/00

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
(FAPEMIG).

FAPEMIG - Proc. CBS - 162/86

- Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq - UFMG).

Proc. 23072.050902/88-27

Proc. 23072.028033/89-35

Aos professores

Roberto Fernando de Souza Freitas

Amintas Fabiano de Souza Figueiredo

Pela orientação, apoio e amizade.

Ao meu marido Rafael de Oliveira Miranda

Pelo apoio e estímulo constante.

Aos meus pais Vicente de Paula Salviano dos Santos,
Ana Araújo dos Santos e a toda a minha família,
minha eterna gratidão.

Agradecimentos

Ao Professor Glênio Rubens Teixeira de Siqueira, pela solidariedade e participação direta na parte experimental das atividades cininolibadoras.

Às amigas Ione de Matos e Wânia da Silva Carvalho, pela colaboração na realização dos ensaios biológicos.

Aos estudantes do Curso de Ciências Biológicas, Rosemary Vilaça e Carlos H. I. Ramos, pelo auxílio na parte experimental do trabalho.

Ao Leonardo José de Paiva, pela atenção e colaboração na fase inicial do trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação, especialmente à Rosalma Aparecida Chaves, pela amizade e agradável convivência.

Aos companheiros de trabalho no laboratório de enzimologia do Departamento de Bioquímica da UFMG, especialmente à Roseli Aparecida Gomes da Silva e Kátia Barroso Gonçalves, pelo apoio e atenção dispensados.

Aos professores do Curso de Pós-graduação, na pessoa do Coordenador do Curso, Prof. Tasso Moraes e Santos, pelo incentivo e facilidades criadas no decorrer deste trabalho.

A Valéria Ruiz de Souza pelos serviços de computação.

Às secretárias Celise Maria Ferreira Costa e Marly Fonseca Silva por terem sido sempre muito atenciosas e prestativas.

Às bibliotecárias Maria Cecília de Souza Lima, Júnia Lessa França, bem como à Roseli e ao Évano pela atenção e disponibilidade.

Aos meus sogros, Alailton J. A. de Miranda e Maria E. O. Miranda pelo carinho e exemplo de vida.

Enfim, agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

	pg
Lista de abreviaturas	11
Lista de figuras	12
Lista de gráficos	13
Lista de tabelas	15
Prefácio	16
Resumo	18
1 Concentração e purificação de calicreína urinária humana: aspectos principais	19
1.1 Sistema calicreína-cinina	20
1.2 Processos de concentração e purificação de calicreína uri- nária humana	24
1.2.1 Diálise e liofilização	24
1.2.2 Ultrafiltração	25
1.2.3 Adsorção seletiva em resinas	26
1.2.4 Precipitação de proteínas por salificação	27
1.2.5 Fracionamento por solventes	28
1.2.6 Cromatografia de afinidade	28
1.2.7 Cromatografia de troca iônica	29
1.2.8 Cromatografia de exclusão molecular	29
1.3 Processo de concentração de macromoléculas via gel ter- mosensível	30
1.4 Concentração de urina humana utilizando gel termosensível: aspectos gerais	36
Objetivos	39

2	Materias e métodos	41
2.1	Concentração da urina	41
2.1.1	Concentração da urina via gel termosensível	43
2.1.1.1	Coleta da urina humana	43
2.1.1.2	Precipitação da glicoproteína de Tamm Horsfall	44
2.1.1.3	Síntese do gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1	44
2.1.1.4	Processo de concentração da urina humana	46
2.1.1.5	Estudo dos efeitos de lavagem do gel durante o processo de concentração, na eficiência de extração.....	48
2.1.1.6	Estudo da interação da glicoproteína de Tamm Horsfall com o gel	48
2.1.1.7	Estudo da estabilidade do gel	49
2.1.1.8	Estudo das relações massa de gel/volume de urina.....	49
2.1.2	Diálise e liofilização	53
2.2	Purificação da caliceína	53
2.2.1	Preparo do extrato bruto	53
2.2.2	Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina	54
2.2.3	Cromatografia em coluna de hidroxilapatita	55
2.3	Métodos analíticos	56
2.3.1	Dosagem de proteínas	56
2.3.2	Medida da atividade amidásica	58
2.3.2.1	Atividade amidásica com o substrato sintético APAPNA	58
2.3.3	Atividade cininolibradora	59
2.3.3.1	Preparo do substrato	59
2.3.3.2	Preparo do útero de rata	60

2.3.3.3 Ensaio da atividade cininoliberadora	60
2.3.4 Ativação de pré-caliceína urinária humana	62
2.3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida	63
2.3.6 Estimação do peso molecular aparente	66
3 Resultados e discussão	68
3.1 Concentração de urina humana via gel poli (N-isopro- pilacrilamida) 10 x 1	69
3.1.1 Influência da lavagem do gel, após cada ciclo, sobre as eficiências de extração	72
3.1.2 Influência da presença da glicoproteína de Tamm Horsfall nas etapas de concentração	74
3.1.3 Estudo da estabilidade do gel	77
3.1.4 Determinação das relações massa de gel/volume de urina	79
3.2 Purificação da caliceína urinária humana	98
3.3 Ativação de pré-caliceína pela β -tripsina	109
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	109
3.5 Determinação do peso molecular aparente da caliceína urinária humana	110
4 Conclusões	115

5 Apêndices	118
Apêndice A : Determinação de algumas condições de operação do processo de concentração	119
Apêndice B : Balanço de massa	125
Apêndice C : Determinação das relações massa de gel/volume de urina	130
Apêndice D : Dados referentes à purificação da calicreína urinária humana e determinação do seu peso molecular	138
6 Referências bibliográficas	143

Lista de abreviaturas

APApNA - Acetil-Phe-Arg-p-nitronilida

BK - bradicinina

DEAE - dietilaminoetilcelulose

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

SBTI - inibidor de tripsina de soja

SDS - dodecylsulfato de sódio

TEMED - N,N,N',N', tetrametiletlenodiamina

TRIS - hidroximetilaminometano

Lista de figuras

FIGURA 1 - Representação esquemática da liberação de cininas do cininogênio humano	21
FIGURA 2 - Processo de concentração de macromoléculas através da utilização de géis termosensíveis	34
FIGURA 3 - Fluxograma global dos processos envolvidos na concentração e purificação da calicreína urinária humana	42
FIGURA 4 - Fluxograma esquemático de um ciclo de concentração	47
FIGURA 5 - Fluxograma global dos processos envolvidos na concentração ocorrendo em vários ciclos	47
FIGURA 6 - Fluxograma completo do processo de concentração da urina humana via gel	91
FIGURA 7 - Fluxograma da purificação da calicreína urinária humana	99
FIGURA 8 - Eletroforese da calicreína urinária humana purificada, em gel de poliacrilamida contendo SDS	111

Lista de gráficos

GRAFICO 1 - Expansão do gel poli (N-Isopropilacrilamida) em água	35
GRAFICO 2 - Influência da lavagem do gel após cada ciclo nas eficiências de extração	73
GRAFICO 3 - Estudo de alguma possível interação entre a glicoproteína de Tamm Horsfall e o gel	75
GRAFICO 4 - Estudo da estabilidade do gel	78
GRAFICO 5 - Estudo dos efeitos causados pelo aumento da relação (R) nas eficiências de extração	81
GRAFICO 6 - Determinação das eficiências de extração para concentração realizada em 6 ciclos e com $R = 0,010$	83
GRAFICO 7 - Determinação das eficiências de extração em função da concentração de proteínas para concentrações realizadas em 4 e 5 ciclos	87
GRAFICO 8- Determinação das eficiências de extração em função da atividade amidásica para concentrações realizadas em 4 e 5 ciclos	88

GRAFICO 9 - Determinação das eficiências de extração para as concentrações realizadas na relação $R = 0,010$, em três volumes iniciais, diferentes, de urina	93
GRAFICO 10 - Determinação das eficiências de extração para as concentrações realizadas na relação $R = 0,018$, em três volumes iniciais, diferentes, de urina	94
GRAFICO 11 - Determinação das eficiências de extração para as concentrações realizadas na relação $R = 0,025$, em três volumes iniciais, diferentes, de urina	95
GRAFICO 12 - Determinação das eficiências de extração nas relações $R = 0,010$, $R = 0,025$ e $R = 0,040$	97
GRAFICO 13 - Perfil da cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina	104
GRAFICO 14 - Perfil da cromatografia em coluna de hidroxilapatita	105
GRAFICO 15 - Estimação do peso molecular aparente da calicreína urinária humana	112

Lista de tabelas

TABELA 1 - Processos de concentração e purificação de calicreína urinária humana	31
TABELA 2 - Eficiências de separação	37
TABELA 3 - Relações (R) em diferentes volumes iniciais de urina	52
TABELA 4 - Eficiências médias de separação	70
TABELA 5 - Resultados preliminares	84
TABELA 6 - Purificação da calicreína urinária humana, usando-se APapNA como substrato	100
TABELA 7 - Purificação da calicreína urinária humana, usando-se como substrato o plasma humano tratado	102
TABELA 8 - Comparação de dados sobre as purificações de calicreína urinária humana	107
TABELA 9 - Pesos moleculares citados na literatura para a calicreína urinária humana	114

Prefácio

Um dos maiores obstáculos encontrado para o estudo da calicreína urinária humana é a dificuldade de obtenção da enzima em quantidades que sejam suficientes para um estudo mais amplo, pois a concentração de calicreína na urina é extremamente baixa. Portanto, para se conseguir alguns microgramas de calicreína purificada há que se trabalhar com grandes volumes de urina o que torna necessário a utilização de processos de concentração. Os processos convencionais de que se dispõe para concentrar urina, tais como diálise e liofilização, ultrafiltração e adsorção em resinas são, em geral, caros, demorados e não permitem trabalhar com grandes volumes. Assim, o desenvolvimento de um método de concentração que seja rápido, econômico e que possa ser operado em grande escala é de grande importância para o avanço dos estudos de caracterização química, físico-química e biológica das calicreínas tissulares humanas.

O presente trabalho propõe a utilização de um novo processo de concentração da urina humana, o qual proporciona a obtenção de grandes quantidades de calicreína urinária humana em um tempo relativamente curto quando comparado com o tempo necessário para concentrar o mesmo volume de urina através dos processos convencionais. Este processo baseia-se na utilização de géis termosensíveis como solventes extratores. Esses géis têm a propriedade de se expandir em temperaturas baixas, absorvendo água e solutos de baixo peso molecular, excluindo as macromoléculas, e eles podem ser regenerados por um pequeno aumento na temperatura, que promove uma súbita contração dos mesmos, liberando o solvente e solutos absorvidos.

No capítulo 1, após uma breve revisão sobre o sistema calicreína-cininogênio-cinina, são apresentadas as técnicas usualmente

empregadas para concentração da urina e purificação da calicreína urinária humana, bem como, seus princípios de operação e os problemas normalmente encontrados na utilização de tais processos de concentração. Em seguida, são introduzidos os conceitos de géis termosensíveis, a possibilidade de utilização desses géis para a concentração de macromoléculas a partir de soluções diluídas e o conceito de seletividade. No último item deste primeiro capítulo são apresentados os resultados preliminares obtidos no estudo da utilização do gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1 para a concentração da urina humana e os objetivos do presente trabalho.

O trabalho experimental envolveu a síntese do gel; a concentração da urina humana utilizando o gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1, como solvente extrator; estudo de algumas condições de operação para o processo de concentração via gel; diálise e liofilização do material concentrado e purificação da calicreína a partir da solução do pó urinário obtido. Toda a metodologia empregada na realização do trabalho experimental está descrita no capítulo 2.

No capítulo 3, estão reunidos todos os resultados obtidos e as discussões pertinentes a esses resultados. Assim, neste capítulo são apresentadas as condições de operação do processo de concentração da urina humana via gel poli (N-isopropilacrilamida) e as etapas utilizadas na purificação da calicreína urinária humana. Os resultados obtidos mostram que a concentração da urina via gel termosensível é extremamente viável, pois o processo é rápido e barato, permite a concentração de grandes volumes de urina e não altera as características da calicreína.

No quarto capítulo do presente trabalho são apresentadas as conclusões a que se chegou.

Resumo

No presente trabalho foi feito um estudo da utilização do gel polimérico termosensível poli (N-isopropilacrilamida) para a concentração da urina humana, visando a obtenção de calicreína purificada. Este novo processo, ao contrário daqueles convencionalmente utilizados para tal fim, é simples, econômico, "suave", e não apresenta problemas de "scale up".

Este estudo envolveu a síntese de géis, a sua utilização para a concentração da urina, e a determinação das melhores condições operacionais do processo. Após a concentração da urina, via gel termosensível, foi feito um estudo da purificação da calicreína, com o objetivo de simplificação de tal procedimento.

As eficiências de extração são elevadas nos ciclos iniciais e decrescem com o número de ciclos. A escolha adequada da relação massa de gel/volume de urina permite a redução do volume inicial de urina em cerca de vinte vezes em apenas quatro ciclos, mantendo-se elevada a eficiência de separação. Foi demonstrada, ainda, a excelente estabilidade do gel, podendo o mesmo ser submetido a vários ciclos de extração/regeneração.

A purificação da calicreína urinária humana foi realizada em apenas duas etapas de cromatografia.

1. Concentração e purificação de caliceína urinária humana: aspectos principais.

Neste primeiro capítulo são abordados os principais aspectos relativos à concentração e purificação da caliceína urinária humana. Assim, o primeiro item apresentado traz uma breve revisão sobre o sistema caliceína-cinina.

No segundo item são apresentados os processos normalmente utilizados para concentrar urina, tais como diálise e liofilização, ultrafiltração e adsorção em resinas, bem como, os princípios de operação e os problemas encontrados na utilização de cada um. Ainda neste item são apresentados alguns processos utilizados para a purificação da caliceína, citados na literatura, e seus princípios básicos.

O terceiro item deste capítulo mostra um novo processo de concentração de macromoléculas em que se utiliza o gel termosensível poli (N-isopropilacrilamida) como solvente extrator. Os princípios básicos desse sistema, as principais características do gel e o conceito de seletividade são apresentados.

No quarto e último item é apresentada a proposta de utilização do gel termosensível para concentrar a urina humana e os objetivos do presente trabalho.

1.1 Sistema Calicreína - cinina.

As calicreínas ou cininogenases (E.C. 3.4.21.8) são enzimas, pertencentes ao grupo das serino-proteases, com atividade proteolítica específica e restrita. Elas hidrolisam, além de seu substrato natural (cininogênio plasmático), substratos sintéticos dos tipos amida e éster, derivados da arginina.

O cininogênio plasmático (α 2-globulina), no homem e na maioria dos mamíferos, ocorre sob duas formas, uma de alto peso molecular (88.000-114.000 daltons) e outra de baixo peso molecular (50.000-68.000 daltons) (MULLER et al, 1986). Já no rato, além dessas duas, há uma terceira forma, o T-cininogênio, de peso molecular 69.000 (GREENBAUM & OKAMOTO, 1988).

A descoberta das calicreínas deu-se entre 1926 e 1928. FREY (1926) e FREY & KRAUT (1928) encontraram na urina humana uma substância não dialisável e termolábil que, injetada por via intravenosa no cão, produzia o abaixamento da pressão arterial. Pensou-se, inicialmente, que essa substância era um hormônio excretado, com atividade sobre os vasos sanguíneos e a circulação. Essa hipótese só foi descartada quando WERLE et al (1937) demonstraram que as calicreínas liberavam enzimaticamente, de um precursor inativo do plasma, uma substância que era capaz de provocar contrações em preparações de músculos isolados.

A partir de 1950, resultados de estudos sobre calicreínas, publicados na literatura, alteraram significativamente algumas das idéias mais antigas sobre elas. Assim, sabe-se atualmente, que a calicreína pancreática é originada no pâncreas e não no plasma, como se pensava anteriormente, e que a fonte da calicreína urinária não é o pâncreas, mas sim o próprio rim.

As caliceínas são divididas em dois grupos, as plasmáticas e as tissulares (ou glandulares). As caliceínas plasmáticas hidrolisam, exclusivamente, o cininogênio de alto peso molecular, liberando bradicinina enquanto que as tissulares hidrolisam preferencialmente o cininogênio de baixo peso molecular liberando calidina (lisil-bradicinina) (MULLER et al, 1985). Os pontos de hidrólise do cininogênio para a liberação de bradicinina e calidina são mostrados, esquematicamente, na FIGURA 1.

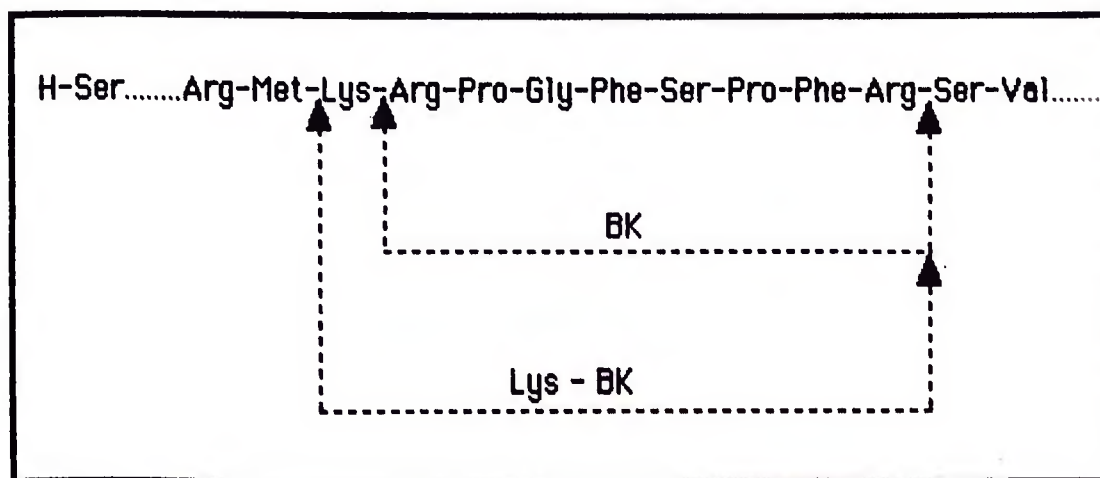


FIGURA 1 – Hidrólise enzimática do cininogênio com liberação de bradicinina e calidina.

Bradicinina, calidina e T-cinina são polipeptídeos denominados genericamente como cininas. A calidina, um decapeptídeo, foi descoberta em 1937 por WERLE et al. ROCHA E SILVA et al (1949) descreveram a liberação de um peptídeo ativo, pela tripsina e certos venenos de serpentes, da fração globulina do plasma. A este nonapeptídeo eles deram o nome de bradicinina. Uma terceira cinina, a metionil-lisil-bradicinina foi descoberta por ELLIOTT & LEWIS (1968). Finalmente, a T-cinina, (Ile-Ser-bradicinina) encontrada no plasma de rato, foi descoberta em

1986 por OKAMOTO & GREENBAUM.

Segundo REGOLI & BARABÉ (1988), as cininas exercem uma grande variedade de efeitos biológicos, dos quais os mais importantes são a hipotensão, dor, edema local, inflamação, vasodilatação arterial, contração de algumas artérias de grande calibre, contração do endotélio capilar, contração de veias, contração do útero, brônquios, intestinos e bexiga, relaxamento do duodeno, estimulação da liberação de prostaglandinas, histamina, renina e catecolaminas e, estimulação da proliferação celular (fibroblastos humanos). Assim, as atividades biológicas das calicreínas são indiretas, pois os efeitos observados devem-se à ação da cinina, a qual é liberada pela ação enzimática das calicreínas sobre os cininogênios.

Até agora, várias calicreínas tissulares já foram isoladas, purificadas e caracterizadas como mostram os trabalhos de FIEDLLER (1979) para as calicreínas pancreática, submandibular e pancreática de porco, salivar e urinária humana, pancreática, submandibular e urinária de rato, submaxilar de camundongo e gato, pancreática do cão e urinária do cavalo; MURTHY et al (1986) para a calicreína urinária de cão e UCHIDA et al (1980) para a calicreína estomacal do rato. Com relação à calicreína urinária humana, há vários trabalhos na literatura, descrevendo o seu isolamento, purificação e caracterização (MORIYA et al, 1963; HIAL et al, 1977; SPRAGG & AUSTEN, 1974; MATSUDA et al, 1976; GEIGER et al, 1977; OZA & RYAN, 1978; OLE-MOIYOI et al, 1979; LEVINSKY et al, 1979; GEIGER et al, 1980; MORICHI et al, 1980 e MORICHI et al, 1984).

As calicreínas, como outras enzimas, também ocorrem em múltiplas formas, segundo demonstraram NUSTAD & PIERCE (1974), para a calicreína urinária de rato; FRITZ et al (1977), para as calicreínas pancreática, submandibular e urinária de porco; MORIYA et al (1977), para a calicreína renal de cão; MORIYA et al (1963 e 1973), HIAL et al (1974), MATSUDA et

al (1976), OLE-MOIYOI et al (1977 e 1979), GEIGER et al (1977 e 1980); MORICHI et al (1984) e LIMA (1986), para a calicreína urinária humana.

Quanto a composição química, as calicreínas pancreáticas de porco têm sido as mais estudadas, mas já se conhece as composições em aminoácidos de várias calicreínas, inclusive da calicreína urinária humana, como demonstram os trabalhos de HIAL et al (1974); PORCELLI et al (1974); OLE-MOIYOI et al (1979) e GEIGER et al (1979). Além da composição em aminoácidos, já se conhece hoje, a seqüência completa de aminoácidos das calicreínas pancreática de porco e urinária humana como demonstram, respectivamente, os trabalhos de TSCHESCHE et al (1979) e KELLERMANN et al (1987).

Quanto às funções das calicreínas tissulares, a literatura é extremamente ampla. LEVINSKY (1979) afirma que, embora as funções do sistema calicreína-cinínogênio-cinina renal ainda não estejam completamente definidas, há evidências de que ele pode regular o fluxo sanguíneo renal e modular o transporte tubular de sal e água. GEIGER & MISKA (1988) afirmam, ainda, que as calicreínas tissulares podem ter um papel importante na hipertensão, na função e disfunção renais, na proliferação celular, na motilidade e migração do esperma, na absorção intestinal e no metabolismo muscular da glicose e no diabetes.

Assim, apesar de muitos estudos já terem sido realizados com as calicreínas tissulares humanas (pancreática, salivar e urinária) ainda há muito que se estudar para se chegar a uma boa compreensão de seus papéis enzimático, fisiológico e patofisiológico.

1.2 Processos de concentração e purificação de calicreína urinária humana.

As fontes de calicreína tissular humana são a urina e os órgãos retirados de cadáveres. Dessas fontes, a melhor é a urina pois, além de ser um produto de excreção, nela a calicreína já se encontra em grande parte na forma ativa, enquanto que nos órgãos ela se encontra na forma de pré-calicreína e teria que ser ativada antes do seu isolamento e purificação, o que tornaria o processo de purificação da enzima muito mais trabalhoso.

Entretanto, a quantidade de calicreína na urina humana é muito baixa, logo, para se isolar e purificar quantidades suficientes da enzima, que tornem possível a realização de estudos adequados para caracterizá-la melhor química, físico-química e biologicamente, há que se trabalhar com grandes volumes de urina, o que torna necessário a utilização de métodos para sua concentração.

Os processos de concentração da urina humana mais comumente usados são a diálise e liofilização, ultrafiltração e adsorção em resinas. A seguir, são apresentados os princípios de operação, bem como os problemas normalmente encontrados na utilização de cada um desses métodos de concentração.

1.2.1 Diálise e liofilização.

As proteínas globulares, em solução, podem ser separadas de solutos de baixo peso molecular através de diálise. Este método consiste na utilização de uma membrana semipermeável que retém as proteínas e

permite a passagem de moléculas menores do soluto e da água. A membrana (tubo de celofane), contendo a solução a ser dialisada, é imersa em um grande volume de água destilada. Devido ao gradiente de concentração entre a água destilada e a solução protéica, as moléculas de baixo peso molecular vão passando através da membrana até que o equilíbrio entre as duas fases seja atingido. A água destilada é trocada várias vezes, de forma que a concentração de moléculas de baixo peso molecular diminui a praticamente zero na solução protéica.

A liofilização é o processo de remoção de água, por sublimação, de uma solução congelada, sob alto vácuo. A liofilização de proteínas requer a eliminação prévia de sais, daí se utilizar anteriormente a diálise. O material, que antes era uma solução congelada, com a retirada da água torna-se pó.

Este processo de concentração é muito utilizado para concentrar pequenos volumes, mas quando se quer concentrar um grande volume, uma série de fatores dificultam a utilização desta técnica. O grande volume de solvente utilizado para extrair os solutos de baixo peso molecular (diálise) e o alto consumo de energia requerido para resfriar, aquecer e fazer vácuo na liofilização, torna este método de concentração muito caro. Além disso, o tempo necessário para concentrar grandes volumes, através desta técnica, é muito longo.

1.2.2 Ultrafiltração.

O processo de ultrafiltração consiste em forçar a passagem de moléculas pequenas através de uma membrana pela aplicação de pressão. A membrana é permeável a moléculas de baixo peso molecular e os poros são

suficientemente pequenos para impedir a passagem de proteínas e outras macromoléculas. Assim, moléculas grandes são retidas e concentradas em relação a uma solução inicial.

As dificuldades encontradas nesta técnica derivam do acúmulo de uma camada com alta concentração de soluto sobre a membrana.

Tal polarização de concentração pode reduzir grandemente o escoamento através da membrana exigindo, assim, pressões cada vez mais altas para a manutenção do fluxo. Tal aumento de pressão, freqüentemente, leva a desnaturação das macromoléculas biológicas e rompimento da membrana.

1.2.3 Adsorção seletiva em resinas.

As proteínas podem ser adsorvidas, e seletivamente eluídas, de colunas de materiais relativamente inertes, finamente divididos, com uma área de superfície muito grande em relação ao tamanho das moléculas protéicas. Esses materiais incluem substâncias não polares como o carvão e substâncias polares como a alumina e sílica-gel. A natureza exata das forças que unem as proteínas a esses adsorventes ainda não é conhecida, porém, com os adsorventes não-polares, devem prevalecer, provavelmente, interações hidrofóbicas e de van der Waals, enquanto que as atrações iônicas e/ou pontes de hidrogênio devem ser as forças principais com os adsorventes polares.

Este é um método "suave" para a concentração de proteínas. Entretanto, a regeneração de tais resinas torna os custos proibitivos para operação do processo em grande escala.

Os vários laboratórios do mundo que estudam a calicreína urinária humana utilizam os processos citados acima para a concentração da urina.

Assim, HIAL et al (1974) usaram o processo de dessalinização da urina por filtração em coluna G-25 e liofilização, GEIGER et al (1977), GEIGER & FRITZ (1981) e LIMA (1986), concentraram a urina humana através de diálise e liofilização. O processo de concentração de urina humana através da ultrafiltração foi utilizado por OLE-MOIYOI et al (1977), SHIMAMOTO et al (1980) e TAKADA et al (1985). Já o trabalho de MORICHI et al (1984) mostra a utilização de sílica-gel para concentração da urina humana.

Quanto à purificação da calicreína urinária humana, há vários trabalhos descritos na literatura e cada um apresenta etapas diferentes de purificação. Entre as etapas comumente utilizadas na purificação da calicreína urinária humana estão a precipitação das proteínas por salificação ou por adição de solventes orgânicos, cromatografia de afinidade com ligantes específicos, cromatografias de troca iônica e de adsorção seletiva e cromatografia de exclusão molecular. Os princípios básicos de cada um desses processos são apresentados a seguir.

1.2.4 Precipitação de proteínas por salificação.

Em concentrações reduzidas, os sais aumentam a solubilidade de muitas proteínas, um fenômeno denominado solubilização por salificação ("salting-in"). A capacidade dos sais neutros de influenciar a solubilidade das proteínas é uma função de sua força iônica. Os efeitos da salificação na solubilização são ocasionados por alterações na tendência a ionização dos grupos dissociáveis da proteína.

Por outro lado, à medida que a força iônica é aumentada, a solubilidade das proteínas é reduzida e, em forças iônicas suficientemente

altas, ocorre a precipitação de proteínas ("salting-out"). As bases físico-químicas deste fenômeno são bastante complexas, mas há uma hipótese de que os sais, em altas concentrações, podem remover água de hidratação da molécula protéica reduzindo, desta forma, sua solubilidade. O sal mais freqüentemente utilizado para a precipitação de proteínas é o sulfato de amônio.

1.2.5 Fracionamento por solventes.

A adição de solventes orgânicos neutros, miscíveis com a água, em especial etanol e acetona, reduz a solubilidade da maioria das proteínas globulares, em água, ao ponto de precipitá-las. Isto se deve ao fato desses solventes possuírem constante dielétrica menor do que a da água, o que faz aumentar a força de atração entre as cargas opostas, levando a um agregamento e precipitação das moléculas de proteína.

1.2.6 Cromatografia de afinidade.

Algumas proteínas podem ser isoladas de uma mistura muito complexa e obtidas em um alto grau de purificação, muitas vezes em uma só etapa, pela cromatografia de afinidade. Esse método é baseado na propriedade biológica que algumas proteínas têm de se ligar especificamente, por forças não covalentes, a outra molécula, denominada ligante. A eluição da proteína ligada é feita através de variação de algumas condições do tampão como pH e força iônica ou pela adição de inibidores.

A molécula ligante normalmente é fixada em suportes sólidos, onde os materiais mais usados são agarose e Sepharose.

1.2.7 Cromatografia de troca iônica.

A cromatografia de troca iônica utiliza o comportamento ácido-básico das proteínas como base de separação. Os materiais mais freqüentemente utilizados para a cromatografia de proteínas são preparados sinteticamente como derivados da celulose. A dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose) contém grupos carregados positivamente em pH 7,0 e é, portanto, um trocador de ânions. A carboximetilcelulose (CM-celulose) contém grupos carregados negativamente em pH neutro, sendo trocadora de cátions. As misturas protéicas, aplicadas às colunas de troca iônica, são resolvidas em seus componentes individuais através de eluição sucessiva pela aplicação de tampões, com força iônica adequada, às colunas.

1.2.8 Cromatografia de exclusão molecular.

Na cromatografia de exclusão molecular a mistura de proteínas, dissolvidas em um tampão adequado, flui através de uma coluna cheia de esferas microscópicas, contendo poros, de um material polimérico altamente hidratado e inerte, previamente lavado e equilibrado com tampão adequado. Os materiais usualmente empregados neste tipo de cromatografia são géis, tais como Sephadex, agarose e Bio-gel, que podem ser preparados com diferentes graus de porosidade interna. Nas colunas, as proteínas de tamanhos moleculares diversos penetram nos poros internos das esferas em diferentes graus e assim, percorrem a coluna em diferentes velocidades. Moléculas protéicas muito grandes serão excluídas das microesferas sendo portanto, eluídas primeiro. Por outro lado, as moléculas protéicas muito

pequenas penetram livremente nos poros das microesferas e têm assim, suas velocidades retardadas. As moléculas de tamanho intermediário serão excluídas das esferas em um grau que dependerá do seu tamanho, daí o nome de exclusão molecular.

A TABELA 1 mostra alguns processos, citados na literatura, utilizados para concentrar e purificar a calicreína urinária humana.

Todos os processos utilizados para concentrar a urina humana, citados até o momento, apresentam problemas de operação. Em geral, os custos de tais processos são altos e o tempo necessário para a obtenção de quantidades apropriadas do material concentrado, de forma a que possa dar início às etapas de purificação da calicreína, é muito longo. Portanto, o desenvolvimento de um processo que permita a obtenção mais rápida e facilmente de grande quantidade do pó urinário, sem perda substancial da atividade da calicreína, é de fundamental importância.

1.3 Processo de concentração de macromoléculas via gel termosensível.

FREITAS (1986), descreve um novo método de concentração de macromoléculas a partir de soluções diluídas. Este método baseia-se na utilização de hidrogéis termosensíveis como solventes extratores.

Segundo RATNER & HOFFMAN (1976), um hidrogel pode ser definido como um material polimérico que é capaz de se expandir em água, absorvendo e retendo uma fração significativa da mesma dentro de sua estrutura, mas não se dissolvendo nela. Uma outra definição leva em conta a instabilidade potencial do sistema formado pela rede expandida e sua

TABELA 1 – Processos de concentração e purificação de caliceína urinária humana.

Autores	Sumário dos Processos
<p>HIAL et al (1974)</p>	<p>Sephadex G- 25 e liofilização DEAE-Sephadex A- 50 Sephadex G- 150 Sephadex G- 150</p>
<p>GEIGER et al (1977)</p>	<p>Diálise e liofilização Sephadex G- 100 Sephacryl S-200 Sephadex G- 25 Sephacryl S-200</p>
<p>OLE-MOIYOI (1977)</p>	<p>Ultrafiltração DEAE-celulose DEAE-celulose Sephadex G- 100</p>
<p>OZA & RYAN (1978)</p>	<p>Precipitação com sulfato de amônio DEAE-celulose Sephacryl S-200 Sephacryl S-200</p>
<p>GEIGER et al (1981)</p>	<p>Diálise e liofilização Sephacryl S-200 Sephacryl S-200 DEAE-Sephacryl S-200</p>
<p>MORICHI et al (1983)</p>	<p>Sílica gel Sephadex G- 75 DEAE-Sephadex A- 50 Bentonita Sephacryl S-200 Gel TSK G- 3000 SWG</p>
<p>LIMA et al (1986)</p>	<p>Diálise e liofilização Fracionamento com sulfato de amônio DEAE-Celulose Hidroxiapatita Sephacryl S- 200 Sephacryl S- 200</p>

vizinhança quando a temperatura, pressão, pH ou composição química da vizinhança é alterada (SILBERG,1976). O fato do gel expandir-se em água e não se dissolver nela deve-se à existência de ligações cruzadas entre as moléculas do polímero. Durante a expansão o volume do hidrogel aumenta até o equilíbrio, no qual o potencial químico da água no gel, e da água que circunda o gel está balanceado. Como a rede se expande, as cadeias do polímero são alongadas e exercem uma força em oposição a expansão de tal forma que pequenas variações das condições de equilíbrio podem provocar uma redução drástica no volume do gel (TANAKA et al,1980; TANAKA,1981; TANAKA et al,1982; ILAVSKY,1982; ILAVSKY et al,1982; ILAVSKY & HROUZ, 1983).

O hidrogel poli (N-Isopropilacrilamida) desenvolvido por FREITAS (1986), tem a característica de ser termosensível, ou seja, ele apresenta uma grande variação no grau de expansão volumétrico - definido pela razão do volume do gel expandido pelo volume do gel seco - para uma mudança relativamente pequena na temperatura. Portanto, a instabilidade da rede expandida com as mudanças na temperatura é o aspecto chave envolvido no desenvolvimento desse novo processo de separação de macromoléculas.

O gel poli (N-Isopropilacrilamida) é um homopolímero derivado da acrilamida e ele apresenta uma outra característica muito importante: ele se contrai no aquecimento, sugerindo que se comporta como um polímero com temperatura crítica inferior (DIEU, 1954; MALCOM & ROWLINSON,1957; FREEMAN & ROWLINSON, 1960). Soluções com temperatura crítica inferior são sistemas caracterizados por uma única fase estável onde a separação das fases ocorre no aquecimento.

Assim, este novo processo de concentração envolve basicamente duas etapas: a etapa de extração, que faz uso da propriedade do gel de absorver

solvente e solutos de baixo peso molecular, excluindo moléculas de soluto com alto peso molecular, e a etapa de recuperação que consiste na contração do gel com conseqüente liberação das moléculas absorvidas.

O processo de concentração de macromoléculas por géis termosensíveis está representado na FIGURA 2. A solução a ser concentrada é adicionada ao gel contraído, o qual se expande a baixas temperaturas, absorvendo moléculas de baixo peso molecular e excluindo as macromoléculas. A solução de macromoléculas, agora mais concentrada, é separada do gel expandido e reservada para as concentrações posteriores. O gel expandido é aquecido e, assim, se contrai liberando as moléculas absorvidas. O gel contraído (recuperado) é resfriado para que possa retornar ao processo e dar continuidade às concentrações.

As principais características desse processo de concentração são, portanto, o comportamento do gel, em função da temperatura, e sua seletividade (FREITAS, 1986). Como pode ser visto no GRAFICO 1, o gel expande cerca de 40 vezes seu peso seco em água, a 8 °C, e contrai, bruscamente, a 33 °C.

A seletividade, expressa como eficiência de separação do gel, η , é definida como a diferença da concentração real, ΔC , entre a solução inicial e a solução concentrada dividido pela diferença máxima de concentração, ΔC_{max} , a qual poderia ser obtida se todo o soluto da solução inicial fosse recuperado no concentrado. Fisicamente, a eficiência representa o quanto o soluto foi excluído do gel em relação a determinada quantidade de solvente absorvido. Assim, uma eficiência de 100 % significa que o gel não absorveu o soluto, ou seja, o soluto é completamente excluído do gel. Entretanto, se o soluto é absorvido pelo gel, na mesma proporção que o solvente, tal que a concentração de soluto na solução final seja igual a da solução inicial, a eficiência de separação é 0 %.

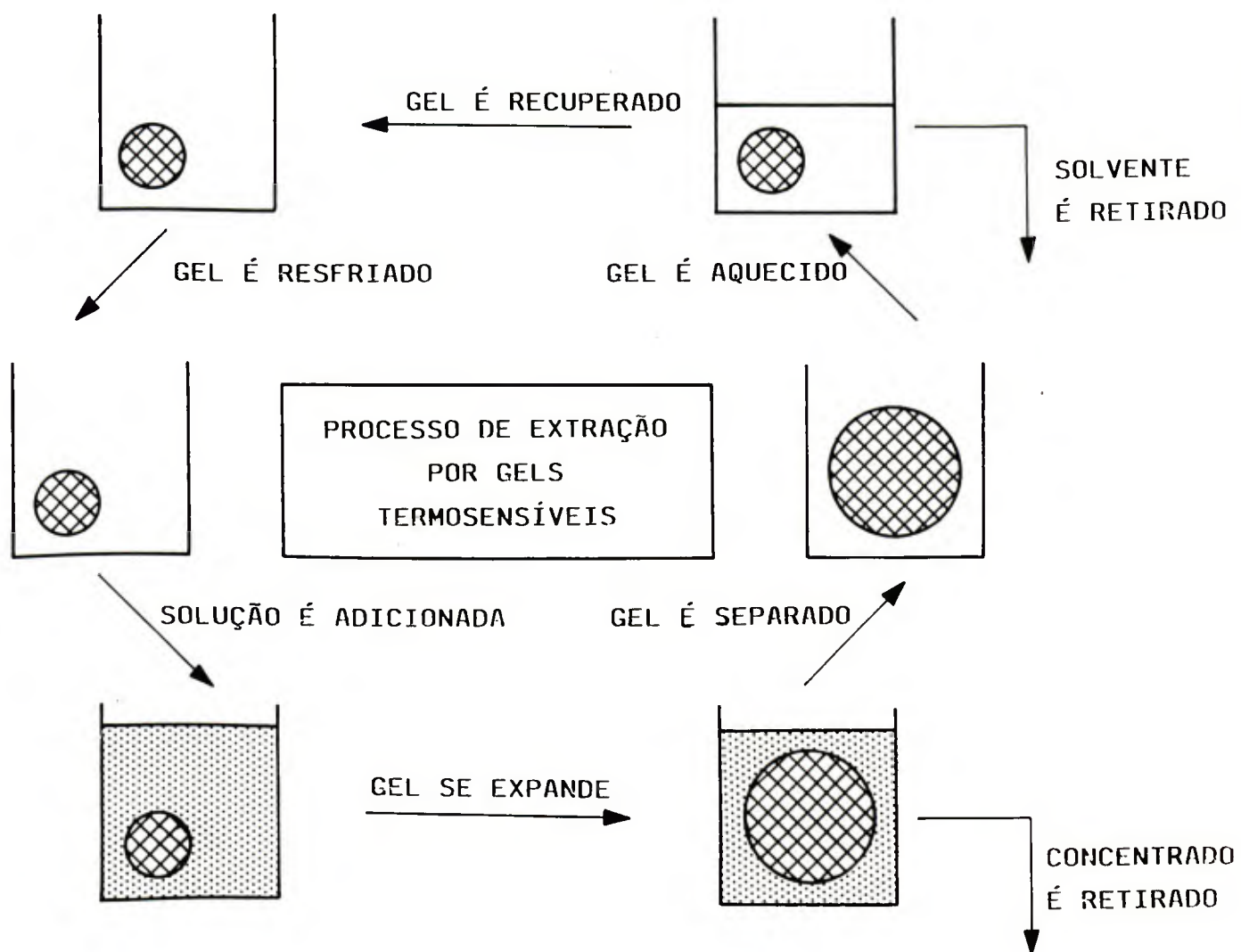


FIGURA 2 - Representação do processo de concentração de macromoléculas através da utilização de géis termosensíveis.

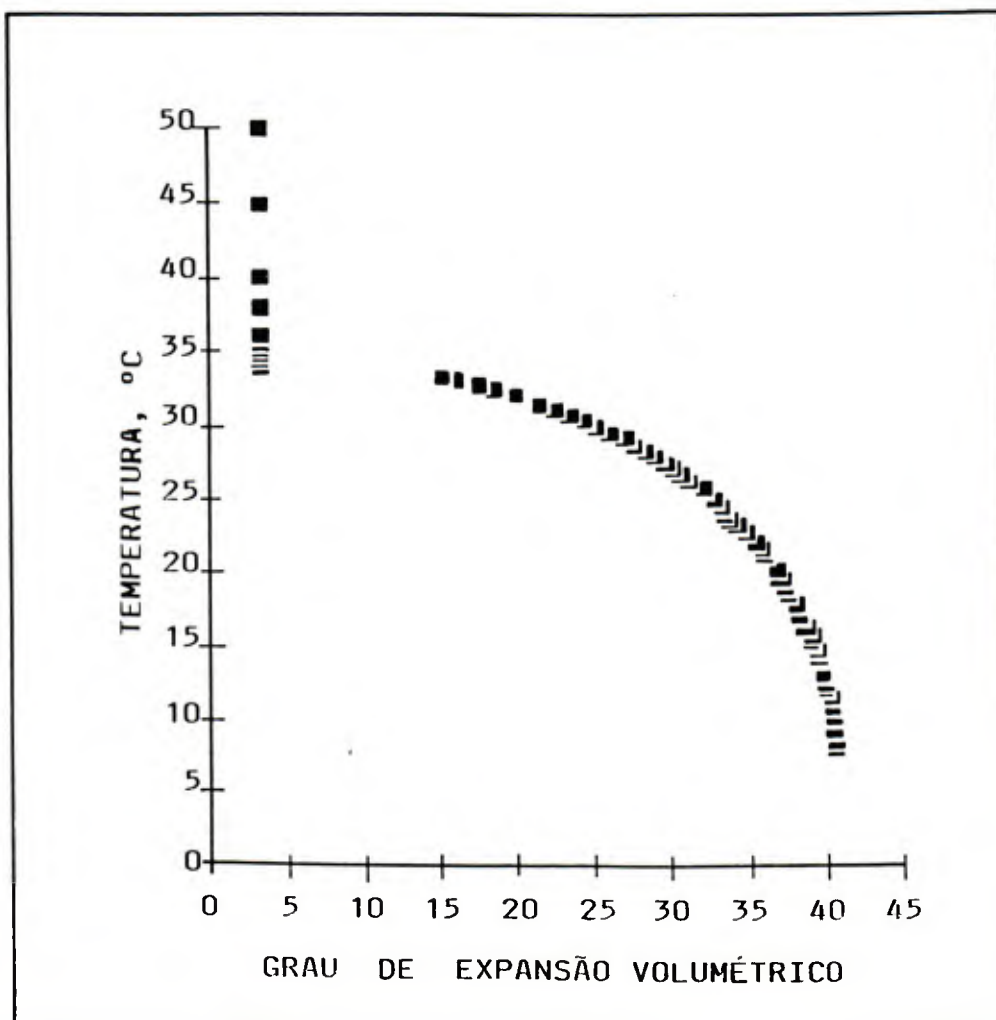


GRAFICO 1 - Expansão do gel poli(N-isopropilacrilamida) em água.

Assim, a equação que define a eficiência é:

$$\eta = \frac{\Delta C}{\Delta C_{\max}} \times 100 \quad (1.1)$$

A TABELA 2, mostra as eficiências de separação para várias moléculas, com diferentes pesos moleculares (FREITAS, 1986). Como pode ser visto, moléculas de alto peso molecular como Blue dextran, são totalmente excluídas, enquanto moléculas com pesos moleculares mais baixos são absorvidas pelo gel, em proporções que dependerão de seus tamanhos.

O gel poli (N-isopropilacrilamida) também foi utilizado, com sucesso, na concentração do vírus da Influenza (ROEPKE et al, 1986).

Tal método de separação parece ser extremamente atrativo, pois é efetivo para proteínas e outras macromoléculas, pode ser usado em larga escala, não requer qualquer equipamento complexo ou caro e, além disso, a recuperação do gel pode ser conduzida com o calor que é geralmente desperdiçado em processos industriais, fazendo com que as concentrações tenham baixo custo (FREITAS, 1986; FREITAS & CUSSLER, 1987).

1.4 Concentração de urina humana utilizando gel termosensível: aspectos gerais.

Para a concentração de urina humana utilizou-se o gel poli(N-isopropilacrilamida) 10 x 1. A composição desse gel está descrita segundo a notação de HJERTEN (1962), onde o primeiro índice depois do nome representa o peso global de monômeros (monômeros + agente de ligação cruzada) por 100 ml de solução, e, o segundo índice, representa a

TABELA 2 - Eficiências de separação.

SOLUTO	PESO MOLECULAR	EFICIÊNCIA DE SEPARAÇÃO, η^*
UREA	60	2
VITAMINA B ₁₂	1355	32
OVALBUMINA	45000	97
DEXTRAN AZUL	2000000	97
POLIETILENO GLICOL	400	10
	3400	30
	8000	56
	18500	80
	160000	88
ANTICORPO MONOCLONAL		

* GEL POLI (N-ISOPROPILACRILAMIDA) 8 x 1

quantidade de agente de ligação cruzada como uma porcentagem (p/p) da quantidade total de monômeros. O exemplo abaixo ilustra esta notação:

Gel (a x b)

a = % de monômeros totais (monômero principal + agente de ligação cruzada)

b = % de agente de ligação cruzada em relação a quantidade de monômeros totais.

Assim, na preparação de 100 g de gel (10 x 1), tem-se:

massa de monômeros totais = 100 g x 0,1 (10 %) = 10 g

massa de agente de ligação cruzada = 10 g (monômeros totais) x
0,01 (1 %) = 0,1 g.

A razão da escolha do gel acima para a concentração da urina deveu-se ao fato das variáveis desse sistema já estarem bem delineadas (FREITAS, 1986).

Como o comportamento do gel varia de acordo com o meio no qual ele está sendo utilizado, para concentrar a urina foi necessário fazer uma série de estudos (PAIVA, 1988), onde foram analisadas as seguintes variáveis:

- Grau de expansão do gel em urina
- Comportamento da expansão do gel em urina, como uma função da temperatura
- Eficiência de extração em função da concentração de proteínas na urina
- Atividade amidásica específica da calicreína urinária humana na urina concentrada

Os resultados desses estudos mostraram que a temperatura de transição e o grau de expansão do gel em urina são menores do que em água e isto se deve à presença de sais na urina que alteram o comportamento termodinâmico do gel (OLIVEIRA & FREITAS, 1990). Por outro lado, as eficiências de separação obtidas foram bastante altas e não houve alteração na atividade amidásica específica da calicreína, após as concentrações. Assim, esses estudos preliminares mostraram que o gel, apesar de apresentar um grau de expansão volumétrico mais baixo na urina (cerca de 11 vezes seu peso seco), é adequado para a concentração da mesma.

Dentro deste contexto, considerando-se o potencial desse novo processo de separação e os problemas das técnicas convencionais para concentração de urina humana visando a obtenção de calicreína purificada, vários estudos se fizeram necessários para a determinação dos vários aspectos envolvidos na concentração de urina humana pelo processo gel termosensível, incluindo a determinação de condições ótimas de operação. Estes estudos constituem o objetivo do presente trabalho.

A seguir, os objetivos gerais e específicos são apresentados.

Objetivos:

1. Determinação das condições de operação do processo de concentração da urina humana via gel poli (N-Isopropilacrilamida) 10 x 1. Para a determinação dessas condições uma série de estudos devem ser realizados:

- Efeito da lavagem do gel após cada ciclo, sobre as eficiências de extração.

- Estabilidade do gel após ter sido usado em um grande número de ciclos.
- Influência de proteínas presentes na urina sobre as eficiências de extração.
- Determinação das relações massa de gel/volume de urina a serem usadas em cada ciclo de forma a obter maiores eficiências de separação.

2. Simplificação do processo de purificação da calicreína urinária humana de maneira a purificá-la mais facilmente, no menor tempo possível e com um bom rendimento.

2. Material e métodos.

Este capítulo pode ser dividido em três grandes itens. O primeiro item, concentração da urina, será dividido em duas partes, concentração via gel termosensível e diálise-lyofilização. No segundo item a ser considerado são mostradas as etapas realizadas para purificação da calicreína humana. O terceiro e último item traz todas as técnicas utilizadas para o acompanhamento analítico das etapas envolvidas na concentração e purificação da calicreína urinária humana.

Para uma melhor visualização do trabalho experimental, a FIGURA 3, página 42, mostra um fluxograma esquemático global dos processos envolvidos na concentração e obtenção de calicreína urinária humana purificada.

2.1 Concentração da urina.

A concentração de proteínas e, conseqüentemente, de calicreína, na urina humana é muito baixa (a concentração de proteínas totais na urina é aproximadamente 0,10 mg/ml). Assim, torna-se necessário trabalhar com volumes muito grandes de urina para se conseguir alguns microgramas de calicreína purificada. Este é um grande obstáculo encontrado no estudo da calicreína, mesmo nos laboratórios mais bem equipados do mundo, pois os processos convencionais de concentração da urina humana conforme já mencionado, tais como diálise-lyofilização, ultrafiltração e adsorção em resinas, são caros e apresentam dificuldades operacionais e de "scale-up".

Assim tem se tornado cada vez mais necessário o desenvolvimento de um método eficiente, simples, de baixo custo, e que possa ser operado em grande escala, para concentrar urina possibilitando a obtenção de grandes quantidades de calcireína urinária humana.

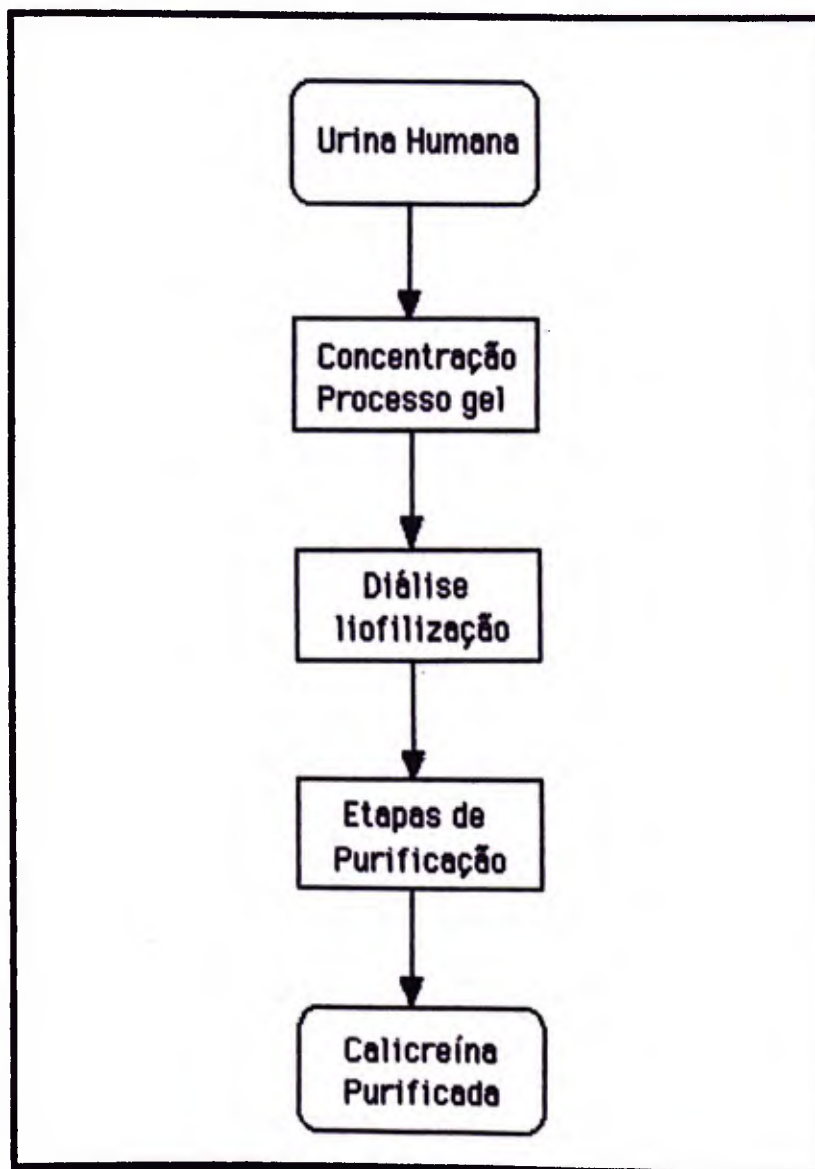


FIGURA 3- Fluxograma esquemático global dos processos envolvidos na concentração e obtenção de calcireína urinária purificada.

2.1.1 Concentração da urina via gel termosensível.

Neste item será apresentada, em detalhes, toda a metodologia empregada na concentração da urina humana via gel poli (N-isopropilacrilamida).

Os primeiros tópicos abordados são a coleta da urina, a precipitação da glicoproteína de Tamm Horsfall e a síntese do gel poli (N-isopropilacrilamida). Em seguida, o processo de concentração da urina humana, em que se utiliza o gel poli (N-isopropilacrilamida) como solvente extrator, é completamente descrito.

Visando uma melhor utilização do potencial de absorção desse gel, uma série de estudos foram realizados. Assim, os tópicos seguintes tratam, respectivamente, do estudo dos efeitos de lavagem do gel, após cada ciclo, na eficiência de extração; estudo da influência da presença da glicoproteína de Tamm Horsfall na urina, no processo de concentração; estudo da estabilidade do gel e, finalmente, determinação das relações massa de gel/volume de urina que apresentam maiores eficiências de extração.

2.1.1.1 Coleta da urina humana.

A coleta da urina humana masculina era feita em frasco de vidro de 10 l, siliconizado, contendo um funil de vidro com gase para filtração da mesma. Adicionava-se ao frasco 10 ml de uma solução de azida de sódio (Carlo Erba) a 0,2 %, com o objetivo de se evitar a proliferação bacteriana. Durante a coleta da urina, o frasco era mantido em banho de gelo,

2.1.1.2 Precipitação da glicoproteína de Tamm Horsfall.

Após a coleta, o pH da urina era ajustado para 8,0 através da adição de quantidades apropriadas de uma solução de hidróxido de sódio (Vetec) 6 N. A medida do pH era feita em pH-metro (Micronal B 375). Em seguida, a urina era guardada em câmara fria, a 4 ° C, durante doze horas, para que a glicoproteína de Tamm Horsfall fosse precipitada (GIUSTTI et al, 1988). O precipitado formado era separado da urina através de filtração a vácuo na qual se utilizava um Kitassato de 4 litros, um funil de Buchner e filtro de papel qualitativo (Frama).

A precipitação dessa glicoproteína era feita para diminuir a concentração de proteínas indesejáveis na urina, consistindo assim, de uma etapa prévia na purificação da calicreína.

A urina, livre da glicoproteína de Tamm Horsfall, era contactada com o gel poli (N-isopropilacrilamida) para dar início às sucessivas concentrações.

2.1.1.3 Síntese do gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1.

O gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1, foi sintetizado segundo o método descrito por FREITAS (1986).

Para a síntese do gel usou-se o monômero N-isopropilacrilamida (Kodak), o agente de ligação cruzada N,N'-metilenobisacrilamida (Polysciences) e os iniciadores, persulfato de amônio (Merk) e metabissulfito de sódio (Reagen). O solvente usado foi a água, pois o seu

parâmetro de solubilidade é compatível com o do monômero (THOMSON, 1983).

Todos os reagentes necessários para a síntese do gel foram utilizados na forma como vieram dos fabricantes, não sendo submetidos a nenhum processo de purificação.

Foram sintetizados 2000 g de gel poli (N-isopropilacrilamida), em bateladas de 200 g, como será descrito a seguir.

Dissolvia-se, em água, 0,2 gramas do agente de ligação cruzada (N,N'-metilenobisacrilamida) em um Erlenmeyer de 250 ml, acrescentava-se então 19,8 g do monômero (N-isopropilacrilamida) que era dissolvido com o auxílio de um agitador magnético (FANEM Mod.257). Transferia-se a solução para um cilindro de vidro graduado, onde uma das extremidades fora tampada com uma rolha de borracha. Adicionava-se, então, 0,02 g do primeiro iniciador (persulfato de amônio) e borbulhava-se nitrogênio na solução durante 5 minutos. Em seguida, adicionava-se 0,02 g do segundo iniciador (metabissulfito de sódio) borbulhando-se novamente o nitrogênio por mais 5 minutos. O espaço livre no cilindro fica com uma atmosfera inerte, pois a pressão é aumentada no momento da retirada da mangueira de nitrogênio de dentro da solução. Esta reação de polimerização ocorre via radical livre e, como o oxigênio é inibidor deste tipo de reação, ele deve ser totalmente eliminado do meio.

A quantidade dos iniciadores a ser utilizada e o tempo necessário para a gelificação foram descritos por PAIVA (1988).

Após a polimerização o gel era removido do cilindro, cortado em partículas cúbicas de aproximadamente 2 mm e, em seguida, levado para uma estufa (FANEM-Modelo 315 SE) a 50 °C até secagem completa.

2.1.1.4 Processo de concentração da urina humana

O gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1, seco ou contraído, em quantidades apropriadas, era contactado com a urina durante duas horas, a 4 ° C, sob agitação mecânica em que se utilizava um agitador (FISATON) acoplado com uma hélice propulsora de vidro (Pyrex). O gel expandia e absorvia grande parte da água e de outras moléculas de baixo peso molecular. A urina, já mais concentrada, era separada do gel expandido através de filtração em funil de Buchner e era então reservada para que pudesse retornar ao processo. O gel expandido, após ser pesado (balança Mettler P 1210) era submetido a um processo de recuperação que consistia em elevação da temperatura a 50 ° C, durante uma hora e trinta minutos, levando a uma contração do gel com conseqüente liberação das moléculas absorvidas (extrato). O gel contraído, após pesagem, era utilizado novamente para dar continuidade às concentrações.

O processo, representado na FIGURA 4 era repetido até que o volume de urina fosse reduzido, aproximadamente 20 vezes. Assim, eram concentrados diariamente 6 litros de urina, para um volume final de 300 ml, que era então guardado em câmara fria, a 4 ° C, para posterior diálise e liofilização.

Foram concentrados aproximadamente 200 litros de urina fresca, chegando-se a um volume total de 10 litros de urina concentrada.

O fluxograma esquemático do processo de concentração ocorrendo em vários ciclos está representado na FIGURA 5, onde cada bloco representa um ciclo completo de concentração (extração e recuperação).

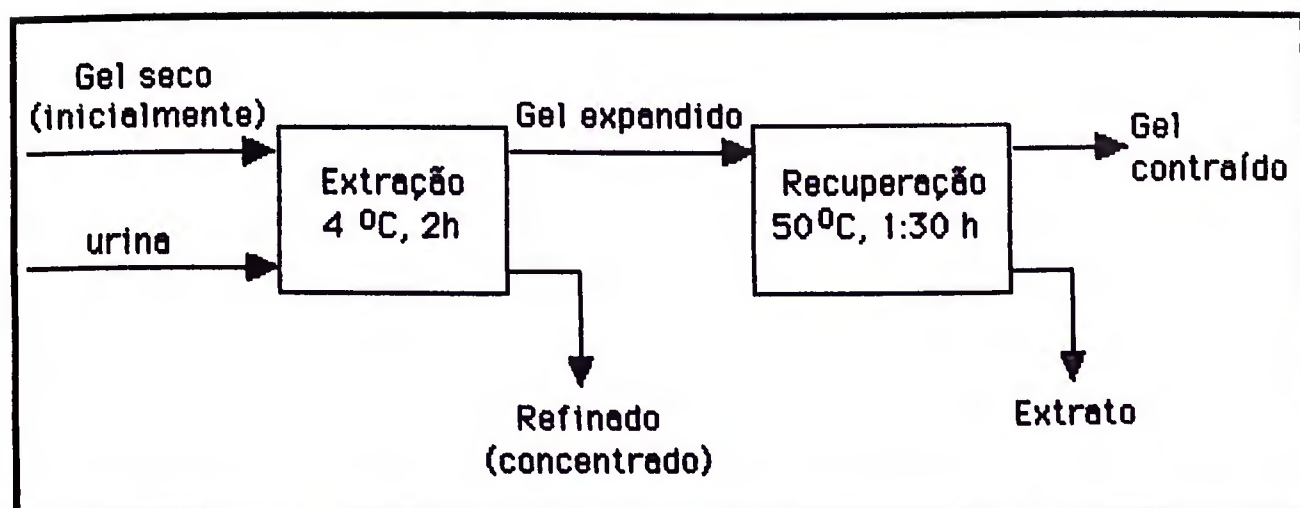


FIGURA 4 - Fluxograma esquemático de um ciclo de concentração.

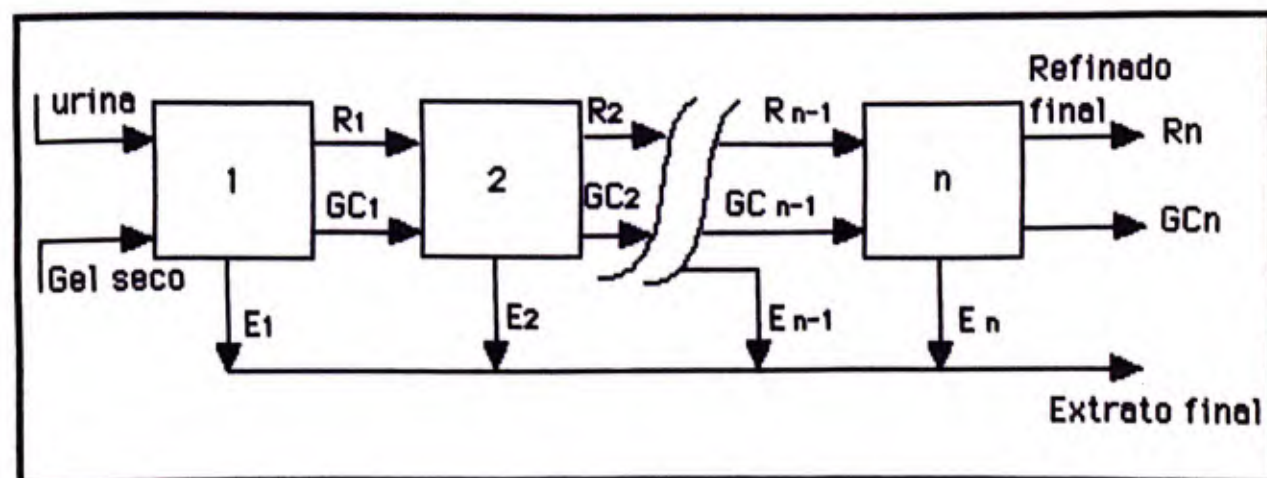


FIGURA 5 - Fluxograma esquemático do processo de concentração ocorrendo em vários ciclos, onde R = refinado, GC = gel contraído e E = extrato.

2.1.1.5 Estudo dos efeitos de lavagem do gel durante o processo de concentração, na eficiência de extração.

Dois experimentos foram conduzidos sob as mesmas condições, exceto que, em um deles, o gel era lavado com 200 ml de água antes de ser reusado no ciclo seguinte. A concentração de proteínas era dosada após cada ciclo, segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e as eficiências de extração eram então calculadas e comparadas.

Tais experimentos tiveram como objetivo a verificação da necessidade ou não de se lavar o gel após cada ciclo, devido ao entranhamento de proteínas entre as partículas de gel, principalmente em soluções mais concentradas.

2.1.1.6. Estudo da interação da glicoproteína de Tamm Horsfall com o gel.

De resultados preliminares obtidos observou-se que as eficiências de extração eram maiores quando a glicoproteína de Tamm Horsfall estava ausente. Procedeu-se, então, a um estudo para verificação de alguma possível interação entre a glicoproteína e o gel.

Para este estudo, um certo volume de urina, da qual a glicoproteína tenha sido extraída, foi concentrado utilizando o gel poli (N-isopropilacrilamida) até se atingir a mesma concentração, em proteínas, que a urina natural. As duas urinas, a natural e aquela ausente de glicoproteína, agora com a mesma concentração, foram, então, submetidas a

concentrações sucessivas, sob as mesmas condições, de forma a se obter volumes iguais no último ciclo de concentração.

As concentrações de proteína em cada ciclo foram dosadas (método Bradford) e calculadas as eficiências de extração.

2.1.1.7 Estudo da estabilidade do gel.

Uma batelada de gel que estava sendo usada diariamente, cerca de 100 ciclos, foi submetida a um processo de recuperação em que o gel era deixado expandir, em água, a 4 ° C e, em seguida, contraído a 50 ° C, liberando assim, as moléculas absorvidas. Fazendo cinco repetições desse processo, o gel ficava livre das proteínas entranhadas e dos pigmentos da urina. Após as lavagens, o gel foi levado a 50 ° C até secagem completa.

O gel recuperado e um gel virgem foram submetidos a concentrações sucessivas, sob as mesmas condições. As eficiências após cada ciclo foram determinadas e os dois experimentos foram comparados.

2.1.1.8 Estudo das relações massa de gel/volume de urina.

Os primeiros resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a utilização de relações massa de gel/volume de urina diferentes levam a diferentes valores de eficiência de extração. Porém, a queda da eficiência não está relacionada apenas com o aumento das relações massa de gel/volume de urina, mas com uma série de fatores, tais como, o número de ciclos utilizado na concentração, o grau de redução do volume inicial de urina e, até mesmo, da concentração de proteínas na urina fresca.

Os experimentos descritos a seguir tiveram por objetivo mostrar a influência das relações massa de gel/volume de urina (R) sobre as eficiências de extração e determinar quais devem ser as condições de operação do processo. Tal determinação foi feita através de um balanço entre os efeitos causados pelas relações (R), pelo grau de redução do volume de urina a que se pretende atingir e pelo número de ciclos utilizado para atingir tal redução do volume.

O primeiro experimento realizado teve por objetivo determinar a influência das relações (R) crescentes sobre a eficiência de extração. Para tanto foram utilizadas as relações $R_1 = 0,010$, $R_2 = 0,025$ e $R_3 = 0,040$, onde R representa a massa de gel seco em gramas dividida pelo volume de urina em mililitros. A escolha de tais relações foi baseada nos resultados obtidos em relação ao grau de expansão do gel em urina.

O volume inicial de urina era de 500 ml e, as massas de gel seco correspondentes eram $m_1 = 5,0$ g, $m_2 = 12,5$ g e $m_3 = 20,0$ g. A massa de gel a ser usada em cada ciclo ia variando de acordo com o volume de urina obtido após cada concentração, de forma que a relação (R) se mantinha constante em todos os ciclos.

O cálculo das eficiências foi feito através da concentração de proteínas em cada ciclo, as quais foram dosadas pelo método de Bradford.

O segundo experimento realizado, onde a concentração de urina foi feita em 6 ciclos com uma baixa relação ($R = 0,010$) teve por objetivo mostrar que a eficiência cai com o número de ciclos, mesmo quando a massa relativa de gel é pequena, porém, essa queda se dá a uma taxa menor. Para tal experimento o volume inicial de urina era de 250 ml e a massa de gel seco correspondente era de 2,5 g. A concentração de proteínas foi dosada após cada ciclo, segundo o método de Bradford, e as eficiências de extração foram, então, determinadas.

No terceiro experimento realizado, as relações (R) fixadas para cada ciclo foram maiores que aquelas usadas nos experimentos anteriores. Neste experimento duas concentrações foram conduzidas simultaneamente, uma em 4 e outra em 5 ciclos. Para a concentração em 4 ciclos, usou-se as relações $R = 0,05$ no primeiro ciclo e $R = 0,0415$ nos outros três, tais relações permitem a extração de 60 % e 50 % do volume presente de urina, respectivamente. O volume inicial de urina era de 900 ml, portanto a massa de gel a ser usada no primeiro ciclo era de 45 g.

Para a concentração em 5 ciclos, usou-se também as relações $R = 0,05$ e $R = 0,0415$ nos dois primeiros ciclos, porém, nos ciclos seguintes, a massa relativa de gel foi diminuída de forma que a relação (R) se tornou igual a 0,033. Tal relação possibilita a extração de 40 % do volume presente. Nas duas concentrações (em 4 e 5 ciclos) o volume de urina foi reduzido aproximadamente 20 vezes.

As eficiências de extração após cada ciclo foram determinadas através da concentração de proteínas, dosada pelo método de Bradford e, também, através da atividade amidásica sobre o substrato sintético APApNA.

Um quarto experimento foi realizado com o objetivo de se verificar o efeito da variação do volume inicial de urina na eficiência de extração, mantendo-se constante as relações (R). Foram utilizadas três relações e três volumes iniciais de urina, conforme mostra a TABELA 3.

TABELA 3 – Relações massa de gel/volume de urina em diferentes volumes iniciais de urina.

Relações (m/v)	massa de gel seco (g)	Volume inicial de urina (ml)
R = 0,010	$m_1 = 2,5$ $m_2 = 5,0$ $m_3 = 10,0$	$V_1 = 250$ ml $V_2 = 500$ ml $V_3 = 1.000$ ml
R = 0,018	$m_1 = 4,5$ $m_2 = 9,0$ $m_3 = 18,0$	$V_1 = 250$ ml $V_2 = 500$ ml $V_3 = 1.000$ ml
R = 0,025	$m_1 = 6,25$ $m_2 = 12,50$ $m_3 = 25,00$	$V_1 = 250$ ml $V_2 = 500$ ml $V_3 = 1.000$ ml

A concentração de proteína foi dosada após cada ciclo, segundo o método de Bradford, e as eficiências de extração foram então, determinadas.

Em todos os experimentos descritos acima as condições de temperatura e tempo de extração e recuperação foram idênticas àquelas descritas no item 2.1.1.4 do presente trabalho.

2.1.2 Diálise e liofilização.

Após a concentração via gel termosensível, a urina foi dializada e liofilizada.

Dez litros de urina concentrada, provenientes de aproximadamente 200 litros de urina fresca, foram dializados e liofilizados. A diálise de cada 2 litros de urina concentrada era feita em câmara fria, a 4^o C, durante cinco dias, contra água destilada, que era trocada duas vezes ao dia. Terminada a diálise, a urina era distribuída em duas bandejas de aço inox e guardada em Freezer. A seguir, a urina dializada e congelada era colocada para liofilizar (em liofilizador Virtis modelo 10.146 MR-BA). O liofilizado era armazenado congelado.

Cada litro de urina concentrada produzia aproximadamente 2,5 gramas de pó liofilizado.

2.2 Purificação da calicreína.

2.2.1 Preparação do extrato bruto.

A partir desta etapa, todas as demais etapas de purificação da calicreína urinária humana foram realizadas em câmara fria, a 4^o C.

Quinze gramas de liofilizado de urina humana foram dissolvidos em 400 ml de tampão glicina 0,1 M (Carlo Erba), NaCl 0,75 M pH 9,5, contendo azida de sódio 0,05 % (Carlo Erba). A solução foi deixada sob agitação branda, com barra magnética, durante 1 hora e, a seguir, centrifugada a 9.000 r.p.m. (Centrífuga Sorvall RC-5B), durante 30 minutos, a 4^o C. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi diluído para um volume total

de 3,0 litros. Este extrato bruto foi submetido a dosagem de proteínas (método de Bradford), determinação das atividades amidásica, com o substrato APAPNA (Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina, São Paulo), e ciníno liberadora, com plasma humano tratado, o qual contém os substratos cininogênicos humanos de alto e baixo peso molecular, (Plasma humano obtido no banco de sangue da Hemominas, Belo Horizonte).

2.2.2. Cromatografia de afinidade em coluna de sepharose-aprotinina.

20,0 g de Sepharose ativada foram acoplados com 500 mg de Aprotinina (Novo ALLÉ), segundo a técnica descrita por GEIGER & FRITZ (1981). O gel resultante, 50 ml, foi empacotado em coluna (9,2 cm x 2,5 cm) equilibrada em tampão glicina 0,1 M, NaCl 0,75 M, contendo 500 mg de azida de sódio.

Três litros de extrato bruto (3.155 mg de proteína) foram aplicados à coluna, em volumes de 1,0 litro. Após aplicação de cada litro do extrato bruto, a coluna era lavada com o tampão de equilíbrio e, em seguida, a amostra era eluída com tampão acetato de sódio 0,025 M, NaCl 1,0 M pH 3,5, contendo azida de sódio 0,05 %. As frações eluídas eram coletadas em tubos de ensaio contendo 0,5 ml de TRIS-HCl 2,0 M pH 8,5 (Sigma), elevando-se assim o pH da fração, cujo volume era 2,5 ml, para próximo de 7,0. As frações eram analisadas quanto à absorção em 280 nm e à atividade amidásica com APAPNA. A seguir, a coluna era regenerada com uréia 8 M (Grupo Química).

As frações que continham calicreína eram agrupadas e a mistura resultante era submetida às dosagens de proteínas e de atividades amidási-

ca e cininoliberadora e, a seguir, era dializada contra água destilada e concentrada (em concentrador Amicon).

2.2.3 Cromatografia em coluna de hidroxilapatita.

6,0 ml de amostra (1,002 mg), provenientes da etapa anterior, foram aplicados a uma coluna (21,0 cm x 0,7 cm) de gel de hidroxilapatita (Calbiochem), equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,01 M (Sigma), NaCl 3,0 M pH 6,0, contendo azida de sódio 0,05 %. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio, coletando-se frações de 2,0 ml, que foram analisadas quanto à absorção em 280 nm e quanto à atividade amidásica com APApNA. A seguir, a calicreína foi eluída com 52 ml de um gradiente linear de fosfato de sódio até 0,08 M, NaCl 3,0 M pH 6,0 e, finalmente com 60 ml de tampão fosfato de sódio 0,08 M, NaCl 3,0 M pH 6,0, contendo azida de sódio 0,05 %, coletando-se frações de 1,0 ml que foram analisadas, como já descrito. As frações que continham calicreína foram agrupadas e o "pool" resultante (Pico-E) foi denominado (CAL-E). O volume obtido foi de 16 ml.

O "pool" de calicreína foi concentrado (em concentrador Amicon) para o volume final de 4,0 ml. A solução de calicreína foi analisada quanto à concentração de proteínas, atividade amidásica, com APApNA, atividade cininoliberadora, com o plasma humano tratado e eletroforese em gel de poliacrilamida.

2.3 Métodos analíticos.

2.3.1 Dosagem de proteínas.

As dosagens de proteínas eram realizadas pelo método de BRADFORD (1976), usando soroalbumina bovina (Sigma) como padrão.

Para a preparação do reagente dissolvia-se 100 mg de Comassie Brilhante Blue G-250 (Sigma) em 50 ml de etanol (Reagen) 95 %. Em seguida, adicionava-se 100 ml de ácido fosfórico (BERZOG) 85 % e completava-se o volume para um litro, com água destilada. A solução final era filtrada em filtro de papel qualitativo e guardada a 4 °C.

Nos tubos, em triplicata, adicionava-se 100 µl da amostra e 5,0 ml da solução reagente. A mistura era agitada e as absorvâncias das reações eram lidas em 595 nm.

Como padrão, usava-se soroalbumina bovina em duas concentrações, 0,1 e 0,5 mg/ml, cujas leituras das absorvâncias eram tomadas como base de cálculo das concentrações das amostras através da equação:

$$P = \frac{b \cdot A}{1 - a \cdot A} \quad (2.1)$$

$$a = \bar{A}^{-1} - b \cdot \bar{P}^{-1} \quad (2.2)$$

$$b = (A_i^{-1} - A_h^{-1}) / (P_i^{-1} - P_h^{-1}) \quad (2.3)$$

$$\bar{A}^{-1} = \frac{A_i^{-1} + A_h^{-1}}{2} \quad (2.4)$$

$$\bar{P}^{-1} = \frac{P_i^{-1} + P_h^{-1}}{2} \quad (2.5)$$

Onde:

P= concentração de proteínas (mg/ml)

A= absorvância em 595 nm

A_i= absorvância do padrão de menor concentração

A_h= absorvância do padrão de maior concentração

P_i= padrão de menor concentração (mg/ml)

P_h= padrão de maior concentração (mg/ml)

2.3.2 Medida da atividade amidásica.

2.3.2.1 Atividade amidásica com substrato sintético acetil-Phe-Arg-p-nitroanilida - APApNA.

A atividade amidásica com o substrato APApNA era realizada segundo os métodos de ERLANGER et al, (1961) e de MARES-GUIA (1968).

Para tanto, preparava-se a solução de substrato APApNA, dissolvendo-se 0,32 g em 0,05 ml de sulfóxido de dimetila (Aldrich) e 0,95 ml de tampão glicina 0,2 M pH 9,5. A concentração dessa solução era de $6,25 \times 10^{-4}$ M.

A amostra (50 μ l) era incubada com 450 μ l da solução de APApNA, a 37 ° C, durante 30 min, e a reação era paralisada por resfriamento utilizando-se gelo (extrato bruto) ou pela adição de 50 μ l de ácido acético. Sob as mesmas condições, eram incubados um controle do substrato, que consistia de 450 μ l da solução de substrato e 50 μ l do tampão glicina 0,2 M pH 9,5 e, um controle da cor da amostra, que consistia de 450 μ l do tampão glicina 0,2 M pH 9,5 e 50 μ l da amostra. Todas as incubações eram feitas em triplicatas.

As absorvâncias das reações eram lidas em 410 nm e transformadas em m mol de p-nitroanilina/(mg.min) através da equação:

$$v = \Delta A_{410} \frac{1}{\epsilon} \times \frac{1}{t} \times \frac{10^3}{F} \times 1,1 \quad (2.6)$$

onde:

ΔA_{410} = absorvância da incubação com a amostra menos absorvância dos controles do substrato e da amostra.

ϵ = coeficiente de extinção molar (l/M) da p-nitroanilina em 410 nm.

t = tempo de incubação (min).

10^3 = fator de conversão de mol/litro para m mol/litro.

F = quantidade de proteína da amostra na incubação.

1,1 = fator de correção do volume da reação para o volume final, da leitura da absorvância.

2.3.3 Atividade cininoliberadora.

A atividade cininoliberadora era medida através de ensaio biológico com útero isolado de rata, montado em banho de Tyrode a 37 °C com aeração (ERSPAMER, 1948 e 1962).

Usava-se, como substrato, uma preparação de plasma humano tratado.

2.3.3.1 Preparo do substrato.

Tratou-se o plasma humano segundo o método de HENRIQUES & ALLAN (1972) modificado. Assim, 780 ml de plasma humano foram colocados em um frasco Erlenmeyer de dois litros siliconizado, o qual era aquecido rapidamente em banho-Maria até 58 °C. A seguir, o Erlenmeyer foi transferido para um banho-Maria a 61 °C e deixado, durante duas horas, sob agitação branda. Terminado o aquecimento, o plasma foi centrifugado em frascos de plástico a 2500 rpm, durante 60 minutos, a 4 °C. O volume de ma-

terial decantado obtido foi de 732 ml, ao qual foi adicionado 7,3 ml de uma solução de EDTA 10^{-1} M. A seguir, ao plasma (739,3 ml) foram adicionados 231,4 g de sulfato de amônio pulverizado, correspondendo a 50 % de saturação, em pequenas porções, sob agitação branda. Terminada a adição, a mistura foi deixada em agitação lenta, durante uma hora, e, depois, em repouso durante 12 horas, a 4°C . O precipitado foi separado, dissolvido em 200 ml de água destilada, dialísado e liofilizado. A preparação produziu 60 g de pó liofilizado que foram guardados congelados.

2.3.3.2 Preparo do útero de rata.

Ratas virgens Wistar (120-140 g) eram castradas e, 15 dias depois, injetadas subcutaneamente com Primogyna-Depot (Berlimed) 5 ng/Kg; após 48 horas eram sacrificadas por concussão cerebral, seguida de sangria por secção dos vasos cervicais. Os dois cornos uterinos eram removidos, os mesentérios retirados e um dos cornos era montado no banho para ensaio biológico e deixado em repouso durante uma hora. O outro corno uterino era deixado em Tyrode, a 37°C .

2.3.3.3 Ensaio da atividade cininoliberadora.

Uma das propriedades das cininas é provocar contrações no útero isolado de rata. Essas contrações, dentro de certos limites, são proporcionais às doses aplicadas. Como padrão, usava-se uma solução de bradicinina (Sandoz), 100 ng/ml em salina, contida em tubo de plástico, em banho de gelo. Essa solução era preparada a partir de uma solução-estoque, contendo 5 μg de bradicinina/ml em ácido oxálico 10^{-3} M (Reagen), que era armazenada em tubos de plástico e congelada.

Para a reação de liberação de cininas, usava-se o método de pré-incubação, no qual volumes determinados da solução de callicreína eram pré-incubados a 37 °C, com volumes determinados da solução de substrato que era preparado dissolvendo-se 40 mg do pó de plasma em 1290 µl de TRIS-HCl 0,2 M pH 8,2, adicionando-se 150 µl de uma solução de SBTI (Sigma), contendo 10 mg em 1,0 ml de TRIS-HCl 0,2 M pH 8,2 e 160 µl de solução de EDTA 10⁻²M. Após um intervalo de tempo determinado, a reação era paralisada, adicionando-se à mistura de pré-incubação Trasylol (Bayer) (200 K.I.U.). A mistura era imediatamente transferida para um banho de gelo. A seguir, retiravam-se amostras da mistura, que eram aplicadas ao útero no banho, em volumes adequados para que a contração provocada tivesse uma altura intermediária entre as contrações provocadas por duas doses diferentes da solução-padrão de bradicinina.

A fixação do registro em papel era realizada por imersão em goma laca a 3 %, em etanol. Após a secagem do papel, media-se em mm as alturas das contrações, provocadas pelas doses do padrão e da mistura de pré-incubação, tirava-se as respectivas médias e determinava-se o teor de cinina nas doses da mistura de pré-incubação através da equação:

$$C = 100 \times \frac{s_1}{t} \times \text{antilog} \left(\frac{T - S_1}{S_2 - S_1} \times \frac{\log s_2}{s_1} \right) \quad (2.7)$$

onde:

C = conc. da amostra (ng/ml) de BK)

s 1 = dose menor do padrão de BK (ml)

s 2 = dose maior do padrão de BK (ml)

t = dose do desconhecido (ml)

T = resposta do desconhecido.

S_1 = resposta da dose menor de BK(mm)

S_2 = resposta da dose maior de BK(mm)

100 = conc. da solução de BK usada (ng/ml)

Determinava-se, assim a quantidade de cinina presente na dose t e, conhecendo-se o volume total da mistura de pré-incubação, dosava-se a quantidade total de cinina liberada.

Conhecendo-se a quantidade de proteínas presentes na mistura de pré-incubação, calculava-se a quantidade de cinina liberada por mg de proteína. A atividade específica era expressa em μg de equivalentes de bradicinina liberada/(mg.min).

Eram incubados, também, dois controles sob as mesmas condições de pré-incubação da amostra, o controle do substrato e o controle da amostra. No primeiro, a pré-incubação continha apenas o substrato e o tampão TRIS-HCl 0,2 M pH 8,2. Já no segundo, a pré-incubação era constituída de amostra, e, no lugar do substrato, adicionava-se o tampão TRIS-HCl 0,2 M pH 8,2.

2.3.4 Ativação de pré-caliceína urinária humana.

Esse estudo era realizado segundo o método de KIZUKI et al (1986) modificado; onde pré-incubava-se 100 μl da amostra, 100 μl do tampão TRIS-HCl 0,2 M, CaCl_2 5 mM, pH 8,2 e 10 μl da solução de β -tripsina em solução de HCl 1 mM, durante 30 min. a 37 °C. A reação era paralisada pela adição de 100 μl de uma solução de SBTI 5 mg/ml em TRIS-HCL 0,2 M pH 8,2 e era então transferida para um banho de gelo. A seguir, incubavam-se 50 μl da mistura resultante com o substrato APApNA, conforme descrito anteriormente.

Como controle, usavam-se 10 µl da solução de HCL 1 mM em vez da solução de β-tripsina

A percentagem de pré-caliceína na amostra era calculada, usando-se a equação:

$$\% \text{ pré-caliceína} = \frac{KAT - KA}{KAT} \times 100 \quad (2.8)$$

onde:

KAT = caliceína total (caliceína ativa + caliceína ativada pela tripsina), e

KA = caliceína ativa.

2.3.5 Eletroforese em gel de poli-acrilamida.

As eletroforeses eram realizadas em placas segundo o método de WEBER & OSBORN (1975) modificado.

Os géis, com 10 % de acrilamida, eram polimerizados a partir de misturas adequadas das seguintes soluções:

1. Solução de acrilamida (37:1):

acrilamida (Sigma)	29,97 g
metilenobis-acrilamida (Sigma)	0,81 g
água destilada.....q.s.p.	100,00 ml

2. Solução de persulfato de amônio a 10 %.

3. Solução de SDS a 10 %.

4. TEMED (Sigma) a 1 %.

Os géis de concentração tinham 3 % de acrilamida e eram polimerizados a partir de misturas adequadas das quatro soluções mencionadas anteriormente.

O tampão para dissolver as amostras era constituído de:

TRIS-HCl 2 M pH 6,8	0,20 ml
bromofenol 0,05 %	0,12 ml
glicerol 60 %	1,00 ml
2-mercaptoetanol	0,30 ml
SDS 10 %	0,60 ml

As amostras eram aplicadas em volumes variados, abaixo de 100 μ l, de acordo com a concentração de proteínas na solução.

O tampão do reservatório, o qual fica em contato com os eletrodos, era constituído de TRIS 0,05 M; glicina 0,384 M pH 8,3, contendo 0,1 % de SDS.

As eletroforeses eram conduzidas sob uma diferença de potencial de 100 Volts.

Para a detecção das bandas usava-se o princípio de coloração pela prata, segundo o método de TUNON & JOHANSSON (1984), o qual utiliza as seguintes soluções:

1. Pré-fixador 1:

metanol	500 ml
água destilada	430 ml
ácido acético	70 ml

2. Pré-fixador 2:

metanol	100 ml
água destilada	800 ml
ácido acético	100 ml

3. Fixador de glutaraldeído:

glutaraldeído (25 %)	100 ml
água destilada	200 ml

4. Solução de etanol aquoso (20 %).**5. Solução de prata amoniacal:**

AgNO ₃	1,0 g
água	20,0 ml
etanol aquoso	300,0 ml
NH ₄ OH.....q.s.p.	dissolver precipitados.

6. Revelador:

Etanol aquoso	400 ml
Formaldeído (37 %)	400 µl
ácido cítrico (2,3 M)	100 µl

7. Inativador:

Etanol aquoso	400,0 ml
ácido acético	4,0 ml
Etanolamina	200,0 µl

Terminada a eletroforese, o gel era lavado com água e deixado no pré-fixador 1 durante 4 horas. Em seguida, retirava-se o primeiro e adicionava-se o segundo pré-fixador, no qual o gel ficava aproximadamente 12 horas. Em seguida, o pré-fixador 2 era retirado, o gel era lavado e deixado em fixador de glutaraldeído durante 45 min.

O gel era novamente lavado, primeiro com água, depois com etanol aquoso e então adicionava-se a solução de prata amoniacal, na qual ele permanecia durante 1 hora, no escuro e sob agitação. Lavava-se novamente com etanol aquoso e, então, adicionava-se a solução reveladora, que era retirada logo após a obtenção de um resultado satisfatório. Adicionava-se então a solução inativadora, na qual o gel permanecia durante 2 horas. Em seguida, o gel era submetido a um processo de pré-encolhimento através do contato com o pré-fixador 1, durante 4 horas, e plastificado. Para a plastificação, o gel era fixado entre duas folhas de celofane, contendo uma solução de gelatina comercial a 4,8% e deixado secar ao ar livre. A solução de gelatina impedia que a secagem fosse muito rápida, evitando assim, uma possível quebra do gel.

2.3.6 Estimação do peso molecular aparente.

O peso molecular aparente da calicreína urinária humana foi estimado através de eletroforese em gel de poliacrilamida 10 %, na presença de SDS.

Uma mistura de proteínas, onde se conhecia o peso molecular de todos os componentes (padrão de pesos moleculares) foi aplicada ao lado da calicreína. Terminada a eletroforese, as bandas de proteína foram detectadas através do método de coloração pela prata, conforme descrito no item 2.3.5.

Locando-se o logaritmo dos pesos moleculares do padrão como função da mobilidade relativa de cada proteína, obtém-se uma reta. Assim, através da mobilidade relativa determina-se o peso molecular da calicreína.

3. Resultados e Discussão.

Todos os resultados obtidos no trabalho experimental, bem como as discussões pertinentes a estes resultados, estão apresentados neste capítulo, o qual pode ser dividido em duas partes. A primeira parte trata da determinação das condições de operação do processo de concentração de urina via gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1, onde são apresentados os resultados obtidos em uma série de estudos. Estes estudos foram realizados visando um maior conhecimento do comportamento do gel poli (N-isopropilacrilamida) em urina humana e uma melhor utilização das suas características, expansão a baixas temperaturas e seletividade, para a concentração da urina. Assim, são mostradas as curvas de eficiência de extração em função do número de ciclos, para as concentrações realizadas nas diferentes condições de processo.

A segunda parte deste capítulo é referente à purificação da calicreína e ativação da pré-calicreína. Então, para cada etapa de purificação, são apresentados os perfis cromatográficos, o número de vezes que a calicreína foi purificada e o rendimento obtido. Os últimos resultados mostrados são o perfil eletroforético, em gel de poliacrilamida 10 % e o peso molecular aparente da calicreína purificada.

3.1 Concentração da urina humana via gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1.

Os primeiros estudos sobre a possibilidade de utilização do gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1 para a concentração da urina foram realizados por PAIVA (1988). Os resultados obtidos mostram que, apesar do gel apresentar um menor grau de expansão na urina que na água, conforme discutido no Capítulo 1, ele é seletivo para as proteínas presentes na urina. Além disso, a atividade amidásica específica da calicreína, sobre o substrato sintético APAPNA, não é alterada após a concentração.

A TABELA 4 resume alguns dos resultados obtidos. Observa-se que as eficiências médias - soma das eficiências de todos os ciclos dividida pelo número de ciclos - foram altas em todos os experimentos, porém os experimentos realizados em quatro ciclos apresentaram eficiências médias de extração maiores que os experimentos realizados em cinco ciclos. Assim, chegou-se à conclusão que um ciclo adicional no processo implicaria em grande diminuição na eficiência deste último ciclo, pois faz cair a eficiência média. As relações massa de gel/volume de urina utilizadas em tais experimentos eram fixas somente no primeiro ciclo, onde $R = 0,010$. Nos ciclos seguintes as relações se tornavam cada vez maiores, pois a massa de gel era mantida constante e o volume de urina ia diminuindo após cada ciclo. Dessa forma, a massa de gel utilizada nos ciclos finais da concentração era muito grande em relação ao volume de urina.

Um outro estudo realizado por PAIVA (1988) foi a comparação das eficiências obtidas para os processos em co-corrente - onde o gel é reutilizado em todos os ciclos - e em corrente cruzada - onde é alimentado gel "virgem" em cada ciclo de concentração. Os resultados obtidos neste

TABELA 4 - Eficiências médias de separação obtidas para a concentração de urina humana.

Experimento	Nº de Ciclos	Volume inicial de urina (ml)	Volume Final (ml)	Eficiência média de separação (%)
1	4	500	53	86
2	4	500	62	88
3	5	500	20	74
4	5	500	22	72

estudo mostraram que o processo em corrente cruzada só apresentava melhores eficiências que o processo em co-corrente após muitos ciclos de concentração, onde a concentração de urina já se encontra elevada agravando desta forma, o problema de entranhamento de proteínas entre as partículas de gel.

A possibilidade de operação do processo em corrente cruzada foi totalmente descartada, pois, além deste processo não proporcionar melhoras significativas na eficiência de extração, os custos de operação se tornariam muito altos, pois teria-se que alimentar gel novo em todos os ciclos. Além disso, deixaria de aproveitar a importante característica de fácil regeneração do gel.

Após uma análise desses resultados preliminares e da verificação de que o gel é adequado para a concentração da urina tornou-se necessário determinar quais seriam as melhores condições de operação dese novo processo de concentração de forma a obter maiores eficiências de separação em um determinado grau de redução do volume de urina.

O presente trabalho teve por objetivo a determinação dessas condições, bem como a simplificação do processo de purificação da caliceína urinária humana, conforme descrito no Capítulo I.

Os resultados obtidos na determinação das melhores condições de operação do processo de concentração da urina humana via gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1 são mostrados a seguir. Assim, são apresentados os resultados obtidos no estudo dos efeitos de lavagem do gel após cada ciclo de concentração, estudo de alguma possível interação entre a glicoproteína de Tamm Horsfall, presente na urina, e o gel, estudo da estabilidade do gel após ter sido usado em um grande número de ciclos de concentração e, a determinação das relações massa de gel/volume de urina

que proporcionam maiores eficiências de extração. O conhecimento de todas essas condições permitiu a construção de um fluxograma completo do processo de concentração de urina humana via gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1, partindo-se de um volume inicial de 50 litros de urina.

3.1.1 Influência da lavagem do gel, após cada ciclo, sobre as eficiências de extração.

O GRAFICO 2 mostra as curvas de eficiência de extração, em função do número de ciclos, para as concentrações realizadas com o gel lavado após cada ciclo e, com o gel sem lavar. Como pode ser observado, as eficiências são altas nos primeiros ciclos e vão caindo após cada ciclo de concentração. As eficiências no primeiro ciclo, obtidas para as concentrações realizadas com o gel sem lavar e gel lavado foram, respectivamente, 98 % e 94 %, enquanto no último ciclo da concentração as eficiências obtidas foram, respectivamente, 48 % e 44 %. As eficiências obtidas nos ciclos intermediários têm valores intermediários entre as eficiências obtidas no primeiro e último ciclos.

Como pode ser observado, a lavagem do gel pós cada ciclo não melhora a eficiência de extração e a diferença observada entre as duas curvas está dentro do erro experimental (da ordem de 5 %).

Entretanto, observou-se no decorrer do trabalho experimental, que à medida que o gel vai sendo usado nas concentrações, sem ser lavado, o seu grau de expansão e sua seletividade vão diminuindo, principalmente quando a solução vai se tornando mais concentrada. A explicação para tal fato advém do entranhamento de proteínas e pigmentos, presentes na urina, entre as partículas de gel

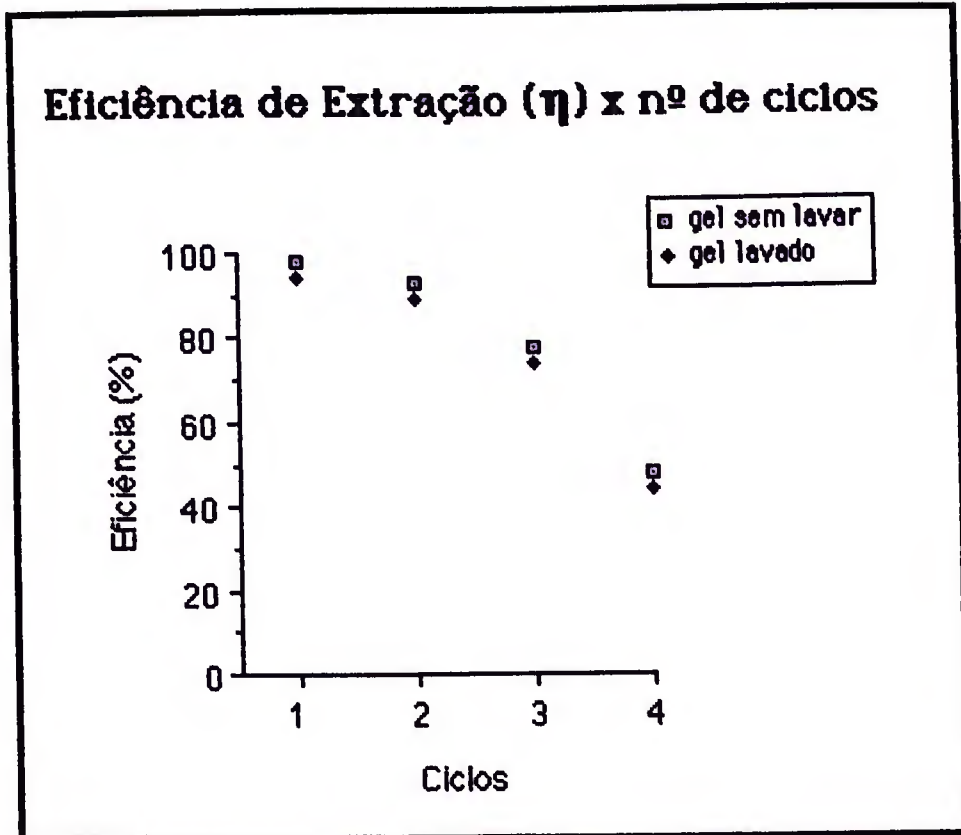


GRAFICO 2 - Verificação da influência de lavagem do gel, após cada ciclo, nas eficiências de extração.

Quando o gel (seco ou contraído) é contactado com a solução a ser concentrada, devido a uma diferença de potencial químico entre o solvente e solutos dentro e fora do gel, ocorre um fluxo da solução para o interior do gel. Entretanto, o gel se comporta como uma membrana semi-permeável, permitindo a passagem do solvente e/ou solutos de baixo peso molecular e excluindo as macromoléculas*. O volume do gel aumenta até que o equilíbrio, no qual os potenciais químicos dos componentes dentro e fora do gel se igualam. À medida que o gel se expande, as cadeias poliméricas são alongadas e exercem uma força oposta à expansão. Algumas macromoléculas se acumulam na superfície das partículas de gel, provocando uma polarização de concentração. Essa polarização de concentração dificulta a expansão posterior do gel. As macromoléculas entranhadas, apesar de excluídas, não aparecem na solução concentrada, diminuindo, dessa forma, a eficiência de separação.

Verifica-se portanto, que é desnecessário lavar o gel após cada ciclo de concentração, porém quando a eficiência de separação e o grau de expansão do gel começam a diminuir muito, torna-se necessário fazer a recuperação do mesmo, submetendo-o a lavagens em água de forma que as moléculas entranhadas sejam liberadas.

3.1.2 Influência da presença da glicoproteína de Tamm Horsfall nas etapas de concentração.

O GRAFICO 3 mostra as curvas de eficiência de extração em função do número de ciclos, obtidas para as concentrações das urinas com e sem a

* O estudo do mecanismo de exclusão é objeto de um trabalho que está sendo conduzido no laboratório do Dr. Freitas, no Departamento de Engenharia Química do UEMG.

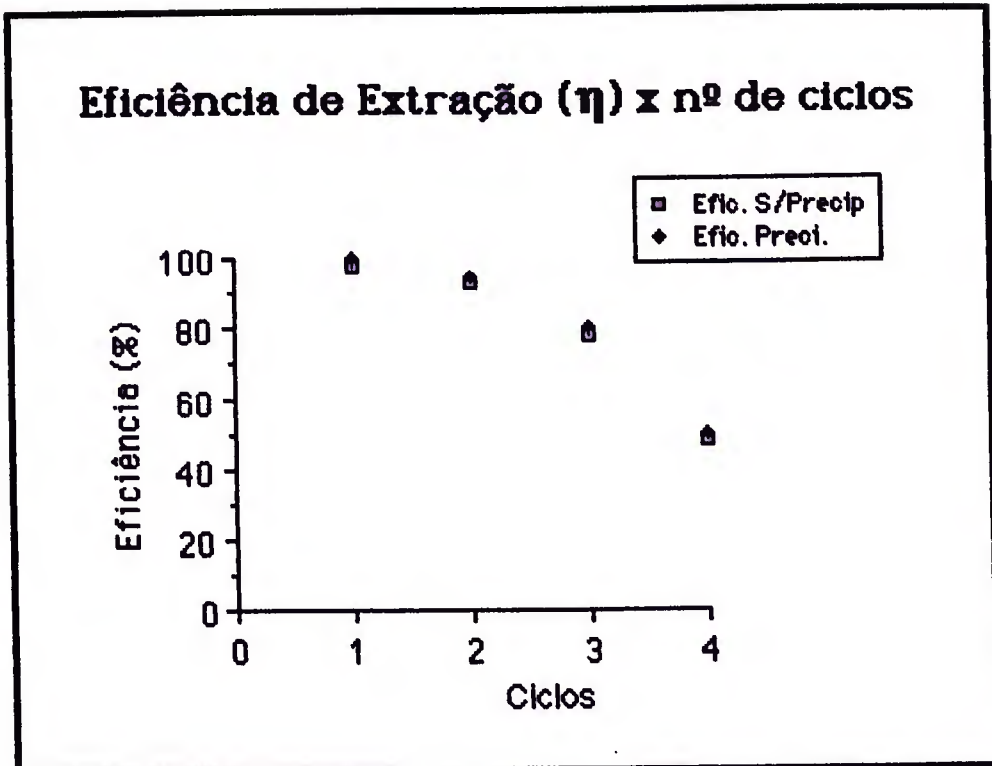


GRAFICO 3 – Determinação de alguma possível interação entre a glicoproteína de Tamm Horsfall e o gel.

glicoproteína. A urina sem a glicoproteína de Tamm Horsfall foi submetida a uma concentração prévia, através da contactação com o gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1, conforme descrito no item 2.1.6, de forma que apresentasse a mesma concentração, em proteínas, da urina natural, ou seja, da urina que continha a glicoproteína.

Como pode ser observado, na concentração da urina que continha a glicoproteína, as eficiências obtidas nos dois primeiros ciclos foram acima de 90 % e cerca de 80 % no terceiro ciclo. Já no último ciclo da concentração, a eficiência caiu para 48 %. Na concentração da urina em que a glicoproteína estava ausente, as eficiências obtidas em todos os ciclos foram praticamente iguais às eficiências obtidas na concentração da urina que continha a glicoproteína. A diferença entre as duas curvas deve-se a erros experimentais e não ultrapassa a 5 %. Assim, concluiu-se que não há nenhum tipo de interação entre a glicoproteína de Tamm Horsfall e o gel.

A suspeita de uma possível interação entre essa glicoproteína e o gel surgiu, conforme mencionado em **Material e Métodos**, pelo fato de se ter obtido em experimentos anteriores, maiores valores das eficiências de separação quando a glicoproteína estava ausente. Entretanto, em tais experimentos a concentração de proteínas totais na urina onde a glicoproteína havia sido precipitada era menor que a concentração de proteínas na urina que continha a glicoproteína, pois a primeira não era submetida a nenhum processo de concentração antes de se iniciar o experimento. Assim, a concentração da urina que continha a glicoproteína levava a valores mais baixos de eficiência de separação devido ao maior entranhamento de proteínas entre as partículas de gel, pois, conforme mencionado no item anterior deste capítulo, o problema de entranhamento de proteínas vai se acentuando à medida que a solução se torna mais concentrada.

3.1.3 Estudo da estabilidade do gel.

Conforme apresentado no início deste capítulo, os resultados obtidos por PAIVA (1988) sobre a operação do processo de concentração da urina via gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1 em corrente cruzada, onde se utiliza gel "virgem" em todos os ciclos de concentração, não é viável, pois além de aumentar os custos de operação, a melhora obtida na eficiência não é significativa. Assim, o processo se torna mais econômico à medida que um mesmo gel é utilizado continuamente nas sucessivas concentrações.

A partir dessas observações surgiu uma questão muito importante sobre a estabilidade do gel, ou seja, o gel que foi usado em um grande número de ciclos de concentração, após ser submetido a um processo de lavagem para eliminação das moléculas entranhadas, volta a se comportar semelhantemente a um gel "virgem"? Para responder tal questão foram realizados dois experimentos. No primeiro foi utilizado gel virgem (somente no primeiro ciclo) e, no segundo utilizou-se um gel que havia sido usado anteriormente em aproximadamente 100 ciclos de concentração e que foi recuperado através de lavagens em água, conforme descrito no item 2.1.7.

O GRAFICO 4 mostra as curvas de eficiência de extração em função do número de ciclos, obtidos em tais experimentos. Observa-se que, nos dois processos, as eficiências de extração obtidas nos dois primeiros ciclos foram acima de 90 %, e estas eficiências sofreram uma queda através dos dois últimos ciclos de modo que, as eficiências de extração obtidas no último ciclo, para o gel novo e para o gel que já havia sido usado anteriormente em muitos ciclos de concentração foram, respectivamente, 48 % e 46 %. Assim, observa-se que as curvas de eficiência de extração em função do número de ciclos, obtidas para os dois processos, não apresentam nenhuma diferença significativa, mostrando portanto, que o gel recuperado tem um comportamento idêntico ao comportamento do gel "virgem".

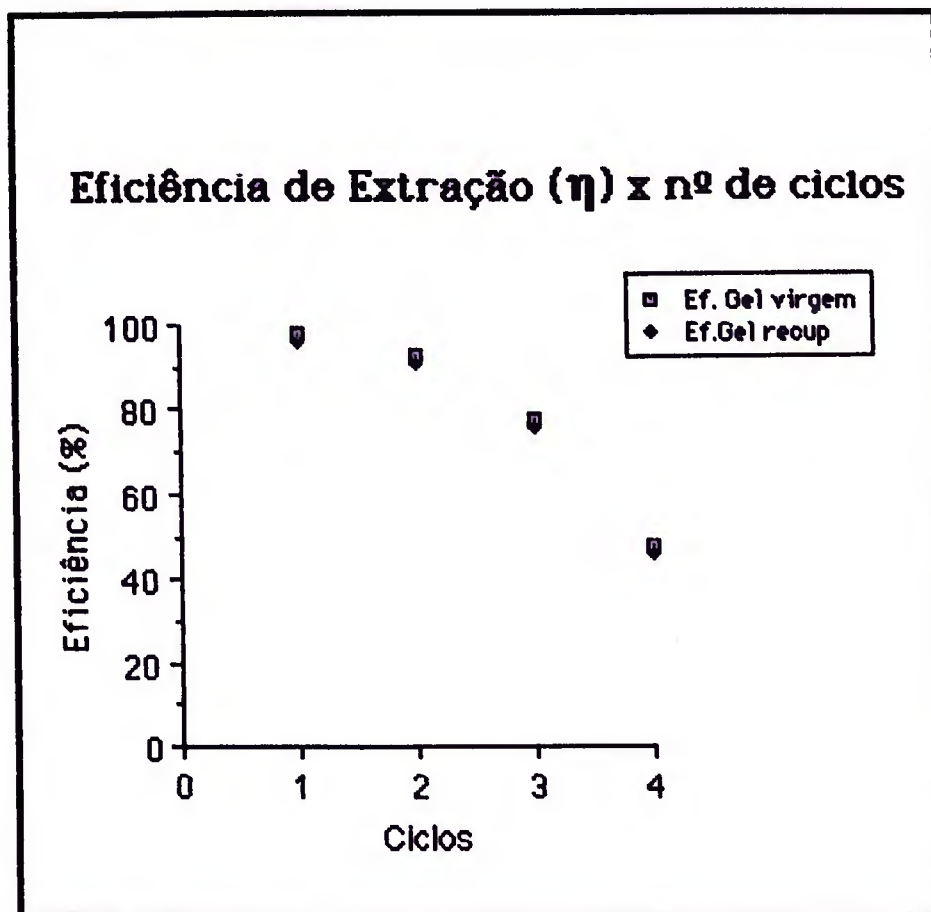


GRAFICO 4 - Verificação da estabilidade do gel após ter sido usado em aproximadamente 100 ciclos de concentração e recuperado através de lavagens.

A partir dos resultados acima concluiu-se que o gel apresenta uma excelente estabilidade e que pode ser reusado em inúmeros ciclos de concentração sem que haja alteração de suas propriedades de expansão e seletividade.

As relações massa de gel/ volume de urina (R) utilizadas em todos os experimentos anteriores foram diferentes de um experimento para outro, pois na ocasião da realização desses experimentos ainda não havia a preocupação com a quantidade relativa de gel a ser usada. Para eliminar as diferenças causadas pela utilização de diferentes relações (R), os resultados foram padronizados como se todos os experimentos tivessem sido realizados com a utilização da relação massa de gel/volume de urina fixa e igual a 0,04.

Os dados experimentais referentes aos resultados até aqui apresentados são mostrados no apêndice A.

3.1.4 Determinação das relações massa de gel / volume de urina.

Conforme apresentado no Capítulo anterior, item 2.1.1.8, procedeu-se a um estudo visando a determinação dos fluxos de alimentação de cada estágio, isto é, das quantidades relativas de gel e urina contactadas em cada ciclo de extração/regeneração, para a obtenção de um elevado grau de concentração. Por elevado grau de concentração entende-se a redução significativa do volume de urina em poucos ciclos, com uma alta eficiência de separação.

A redução significativa do volume em poucos ciclos requer uma elevada relação massa de gel/volume de urina (R), em cada ciclo, na medida

em que o gel se expande em cerca de doze vezes o seu peso seco. Entretanto, observou-se que a eficiência de separação diminui com o número de ciclos, sendo esta diminuição mais acentuada para relações R maiores.

Para o estabelecimento das melhores condições operacionais do processo, relativamente aos fluxos de alimentação, e baseado nos resultados obtidos ao longo deste trabalho, foram escolhidas, inicialmente, três relações, quais sejam: $R_1 = 0,010$, $R_2 = 0,025$ e $R_3 = 0,040$. Tais relações eram mantidas constantes em todos os ciclos.

As respectivas massas para um volume inicial de urina de 500 ml foram, respectivamente, $m_1 = 5,0$ g, $m_2 = 12,5$ g e $m_3 = 20,0$ g.

O GRAFICO 5 mostra as curvas obtidas para as eficiências de extração, nas respectivas relações massa de gel/volume de urina. Observa-se que para a relação R_1 , a eficiência de extração foi acima de 90 % em todos os ciclos, porém, a redução do volume de urina neste processo foi de apenas 1,4 vezes. Para a relação R_2 a eficiência de separação foi, também, bastante alta em todos os ciclos apresentando uma eficiência de 77 % no último ciclo. Neste segundo processo ($R = 0,025$) a redução do volume foi de 2,6 vezes. Já no processo onde foi utilizada a relação R_3 , a eficiência de separação foi de 100 % no primeiro ciclo e foi caindo ao longo dos ciclos de forma que no último estágio da concentração obteve-se uma eficiência de 68 %. O volume de urina neste terceiro processo foi reduzido 16 vezes.

Observa-se portanto, que conforme mencionado anteriormente, a eficiência cai ao longo dos ciclos e esta queda é mais acentuada nos processos onde as relações R são maiores.

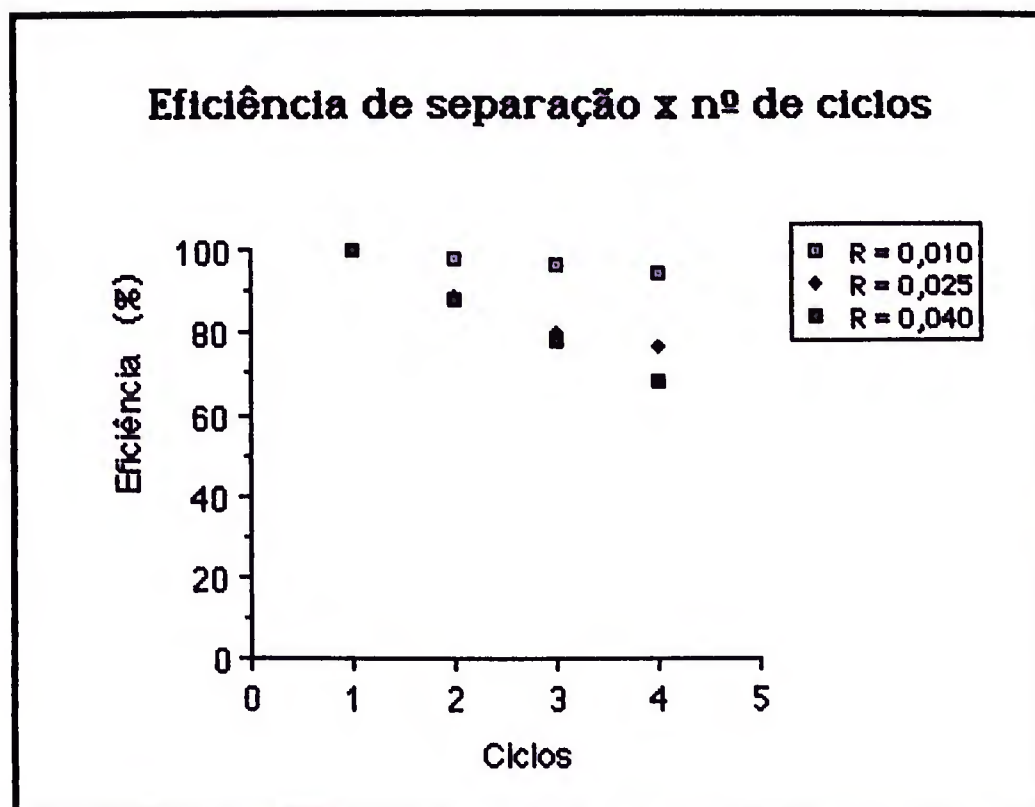


GRAFICO 5 - Determinação das eficiências de extração em cada ciclo nas concentrações realizadas com as relações massa de gel/volume de urina iguais a 0,010; 0,025 e 0,040, em um volume inicial fixo de urina e igual a 250 ml.

Em seguida foi realizado um outro experimento, onde a relação R usada foi baixa (0,010), porém a concentração foi realizada não em 4, mas em 6 ciclos. O GRAFICO 6 mostra a curva obtida. Observa-se que a eficiência se mantém bastante alta em todos os ciclos e cai lentamente no decorrer da concentração, atingindo o valor de 82 % no último ciclo.

A princípio, poderia-se pensar que é melhor usar uma relação menor e um maior número de ciclos, do que o inverso. Porém, no processo acima, o volume de urina foi reduzido apenas 1,9 vezes e, para se atingir uma redução significativa do volume, de aproximadamente 20 vezes, com tal relação, teria-se que usar um número de ciclos tão grande que a eficiência no ciclo final, certamente, seria muito baixa, pois a perda de proteínas por entranhamento, conforme já mencionado, vai de acumulando no decorrer da concentração. Além disso, o tempo necessário para atingir tal concentração seria muito longo.

Assim, observa-se que para atingir a uma redução adequada do volume de urina, ou seja, uma redução suficientemente alta de forma a possibilitar a execução mais rápida da segunda etapa de concentração (diálise e liofilização) há que se ponderar os efeitos causados na eficiência tanto pelo aumento do número de ciclos como os efeitos ocasionados pelo aumento da massa relativa de gel.

Na fase inicial do presente trabalho foram realizados vários experimentos, onde as relações massa de gel/volume de urina não foram fixadas. Mas, estes experimentos foram de grande importância, pois serviram de base para a determinação da massa de gel a ser usada em cada ciclo, quando se quer reduzir o volume de urina em um número determinado de vezes. A TABELA 5 traz os resultados obtidos em alguns desses experimentos. Como pode ser observado, no primeiro ciclo de concentração,

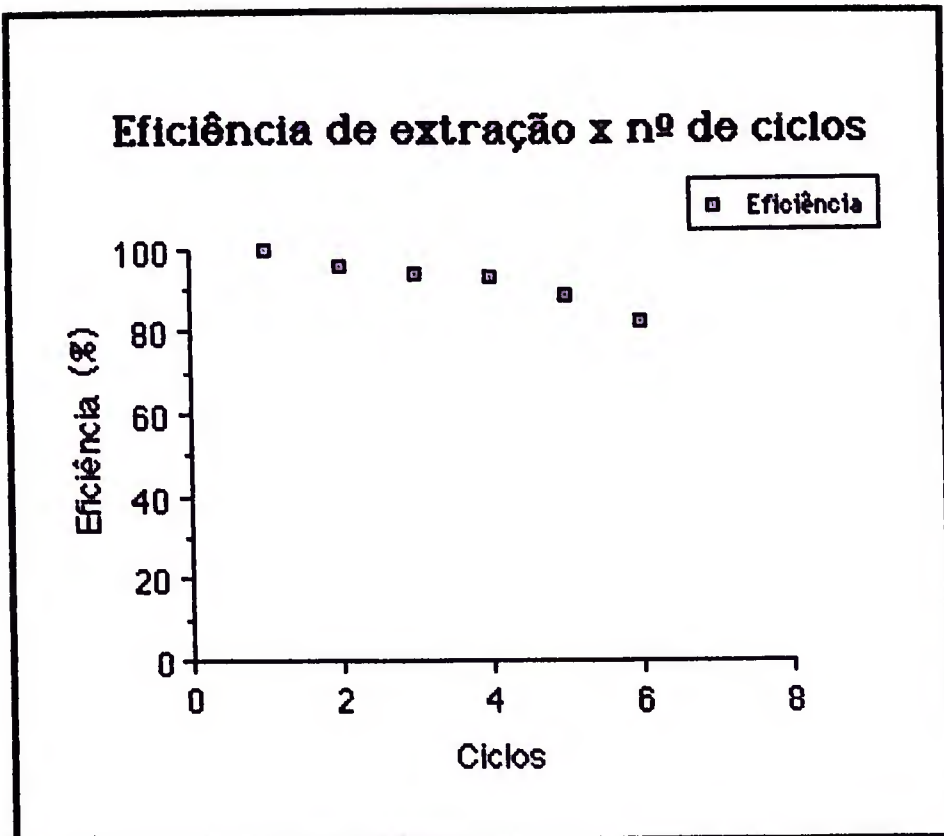


GRAFICO 6 - Determinação das eficiências de extração para a concentração realizada na relação massa de gel/volume de urina fixa e igual a 0,010.

TABELA 5 - Resultados preliminares.

Número de ciclos	Grau de concentração	V(%) no 1º ciclo	η (%) no 1º ciclo	η (%) no último ciclo
3	16	52	95	44
	19	54	90	33
4	17	62	89	42
	28	50	100	31
5	18	42	99	33
	12,5	28	100	41
6	4	29	100	54
	21	28	100	32
7	38	27	100	22
	50	28	100	17

- Grau de concentração - expressa o número de vezes que a urina foi concentrada em relação ao volume inicial.

- V (%) - expressa a porcentagem do volume extraído em relação ao volume inicial de urina.

- η - eficiência de extração expressa em termos de porcentagem.

pode-se extrair até 60 % do volume inicial de urina sem que a eficiência de separação sofra uma queda muito grande. Observa-se, também, que há uma grande queda na eficiência quando o número de ciclos é aumentado e quando o volume é reduzido em mais de 20 vezes.

Assim, a partir da análise dos resultados acima, chegou-se à conclusão que a redução do volume de urina não deve ser muito acima de 20 vezes e esta redução deve ser feita no menor número de ciclos possível. Por outro lado, o número de ciclos não deve ser muito pequeno, pois a sua redução implica em utilização de uma massa de gel muito grande em relação ao volume de urina, o que leva a obtenção de baixas eficiências, principalmente quando a urina vai se tornando mais concentrada, pois além do problema de entranhamento de proteínas, uma parte da urina concentrada é perdida no processo de separação do gel (filtração), pois a grande área de superfície apresentada pelas partículas de gel ficam molhadas com a urina concentrada. Portanto, a determinação da massa de gel a ser usada em cada ciclo depende de quantas vezes o volume será reduzido e do número de ciclos usado para atingir tal redução do volume.

Através das observações feitas acima e dos resultados apresentados na TABELA 5, conclui-se que a redução de 20 vezes no volume de urina deve ser feita em 4 ou 5 ciclos de concentração e, nos últimos ciclos, deve-se extrair um menor volume de solvente que nos primeiros.

Com o objetivo de confirmar as conclusões tomadas acima foram realizados dois experimentos, um em 4 e outro em 5 ciclos, com a redução de 20 vezes no volume inicial de urina. Conforme já mencionado, pode-se extrair até 60 % do volume de urina no primeiro ciclo sem que a eficiência sofra grandes quedas. Portanto, para a concentração realizada em 4 ciclos foram extraídos 60 % do volume inicial no primeiro ciclo e 50 % nos ciclos

seguintes. De acordo com o grau de expansão do gel em urina as relações massa de gel/volume de urina que possibilitam tais extrações são, respectivamente, $R = 0,05$ e $R = 0,0415$.

Para a concentração em 5 ciclos, da mesma forma que no experimento anterior, foram extraídos 60 % do volume no primeiro ciclo e 50 % no segundo, porém, nos ciclos seguintes, a relação massa de gel/volume de urina foi reduzida para 0,033, de forma que eram extraídos apenas 40 % do volume em cada ciclo.

Os dois experimentos foram realizados simultaneamente, sob as mesmas condições de temperatura e tempo de extração e recuperação.

O GRAFICO 7 mostra as curvas de eficiência de extração como função do número de ciclos obtidas para os dois experimentos. As eficiências apresentadas foram determinadas através da concentração de proteínas obtida em cada ciclo. Como pode ser observado, as eficiências obtidas no primeiro ciclo foram idênticas nos dois experimentos e igual a 80 %. Ao longo das concentrações as eficiências foram diminuindo após cada ciclo de forma que, no último ciclo, as eficiências também foram iguais (46 %) para as concentrações realizadas em 4 e 5 ciclos.

O GRAFICO 8 mostra também, as curvas de eficiência de extração em função do número de ciclos obtidas para as concentrações realizadas em 4 e 5 ciclos, porém as eficiências foram determinadas através da atividade amidásica da calicreína sobre o substrato sintético APAPNA. Como pode ser observado, obteve-se 100 % de eficiência no primeiro ciclo e cerca de 50 % no ciclo final das concentrações, nos dois processos realizados, ou seja, em 4 e 5 ciclos de concentração.

Os resultados apresentados acima mostram que o gel apresenta a mesma seletividade para calicreína e outras proteínas presentes na urina.

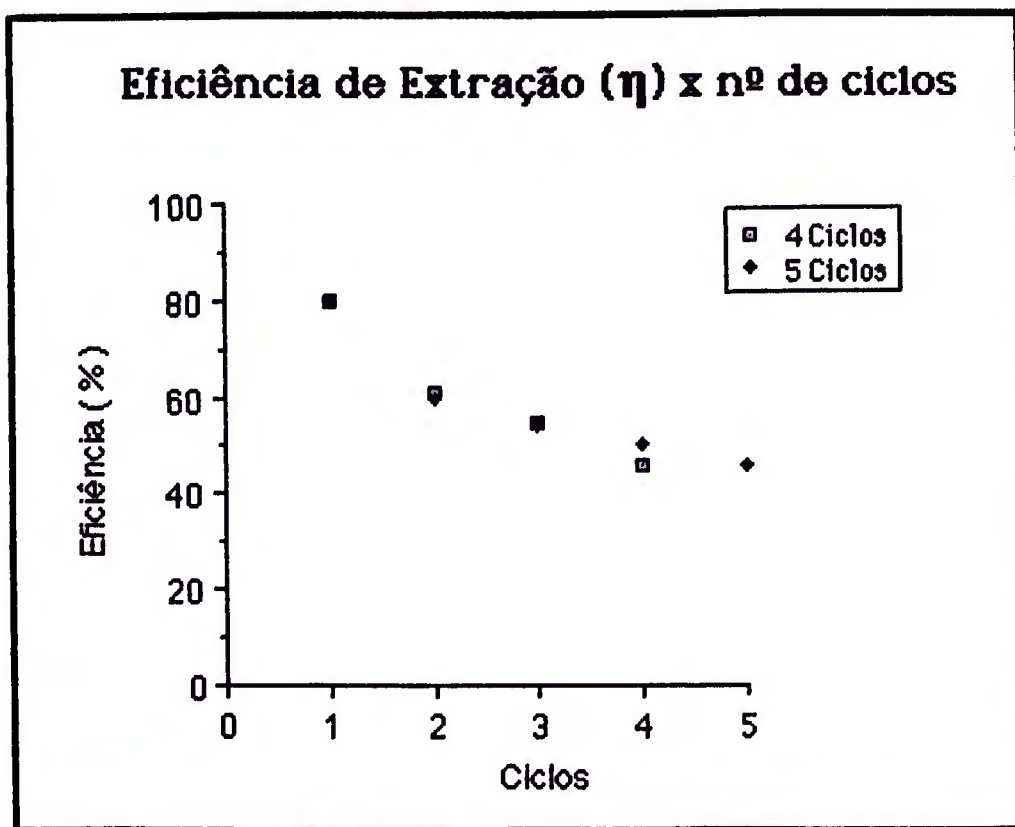


GRAFICO 7 - Determinação das eficiências de extração, em cada ciclo, para as concentrações realizadas em 4 e 5 ciclos. As eficiências foram determinadas através da concentração de proteínas obtida após cada ciclo de concentração.

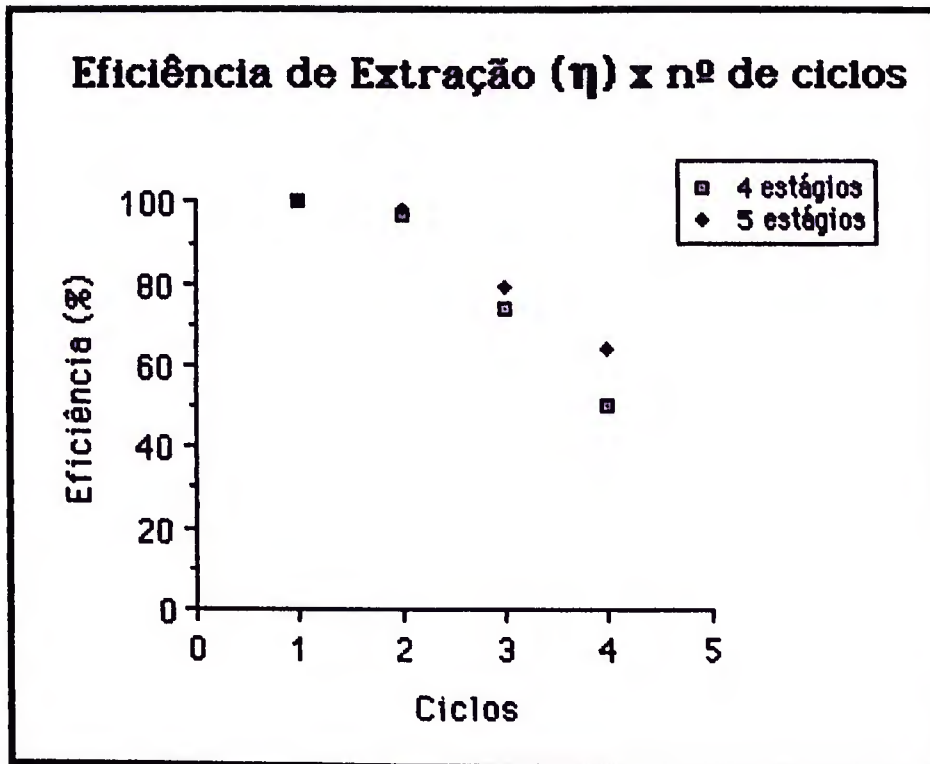


GRAFICO 8 - Determinação das eficiências de extração em função do número de ciclos, para as concentrações realizadas em 4 e 5 estágios. As eficiências foram determinadas através da atividade amidásica da caliceína sobre o substrato sintético - APAPNA.

O fato da eficiência, em termos de atividade, ser maior que a eficiência calculada através da concentração de proteínas, nos dois primeiros ciclos, deve-se à concentração extremamente baixa de calicreína na urina. Assim, nos ciclos iniciais, a chance da calicreína ficar entranhada entre as partículas de gel é menor que das outras proteínas presentes na urina.

No experimento realizado em 5 ciclos a massa relativa de gel usada nos três últimos ciclos era menor que a massa relativa de gel usada nos dois últimos ciclos do experimento realizado em 4 etapas. Dessa forma, extraía-se uma porcentagem menor do volume de solvente, nos últimos ciclos, para a concentração realizada em 5 etapas. Porém, tal diminuição na massa relativa de gel não fez aumentar a eficiência de separação no ciclo final da concentração, pois o aumento de um ciclo no processo fez aumentar as perdas de proteínas.

Devido ao fato da urina ser um material de excreção e de fácil obtenção, sendo portanto, o fator de menor custo do processo, a eficiência de 50 % obtida no ciclo final é considerada satisfatória. Porém se a matéria-prima representa custos muito altos no processo, a perda de material em níveis assim tão altos não pode ser aceita. No caso do processo gel há duas formas de minimizar essas perdas. A primeira é a recirculação do extrato (solvente que foi extraído) na alimentação do processo, porém, devido à facilidade de obtenção da matéria-prima (urina) tal operação não se justifica. A outra forma de minimizar as perdas é aumentando o tamanho das partículas de gel, pois diminuiria a área de superfície e, dessa forma, o problema de entranhamento de proteínas se tornaria menor. Entretanto, o aumento no tamanho das partículas faz com que o tempo necessário para se atingir o equilíbrio entre o interior e o exterior das partículas de gel seja maior.

O fluxograma completo do processo de concentração da urina via gel poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1 está representado na FIGURA 6. Como o equipamento concentrador que está sendo construído no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Minas Gerais tem a capacidade de concentrar bateladas de 50 litros de urina, os cálculos das massas a serem utilizadas foram feitas com base em tal volume. Assim, são mostradas as massas de gel a serem utilizadas, bem como o volume de solvente extraído em cada etapa da concentração. Como pode ser observado, as massas de gel contraído a serem utilizadas em cada ciclo estão multiplicadas pelo fator 4,5. A multiplicação de tal fator se faz necessária pelo fato do gel contraído ainda reter uma fração de água, e desta forma, apresentar um grau de expansão inferior ao grau de expansão do gel utilizado no primeiro estágio (gel seco). Observa-se também que o processo é extremamente rápido, pois o gel contraído utilizado em todos os ciclos seguintes é proveniente do gel que foi recuperado no primeiro ciclo. Desta forma, não é necessário esperar a recuperação do gel do ciclo anterior para se iniciar o ciclo seguinte.

Para a realização do balanço de massa não foi considerada nenhuma perda, ou seja, o processo está representado sob condições ideais de operação.

A perda de gel durante o processo é extremamente pequena e, através do balanço de massa verifica-se que uma pequena fração do solvente extraído é também perdida, pois a etapa de recuperação do gel se dá a 50 °C levando portanto à evaporação de um pouco da água presente. O apêndice B traz, em detalhes, os balanços de massa global e por componente, considerando as possíveis perdas durante o processo e o diagrama esquemático do equipamento de concentração.

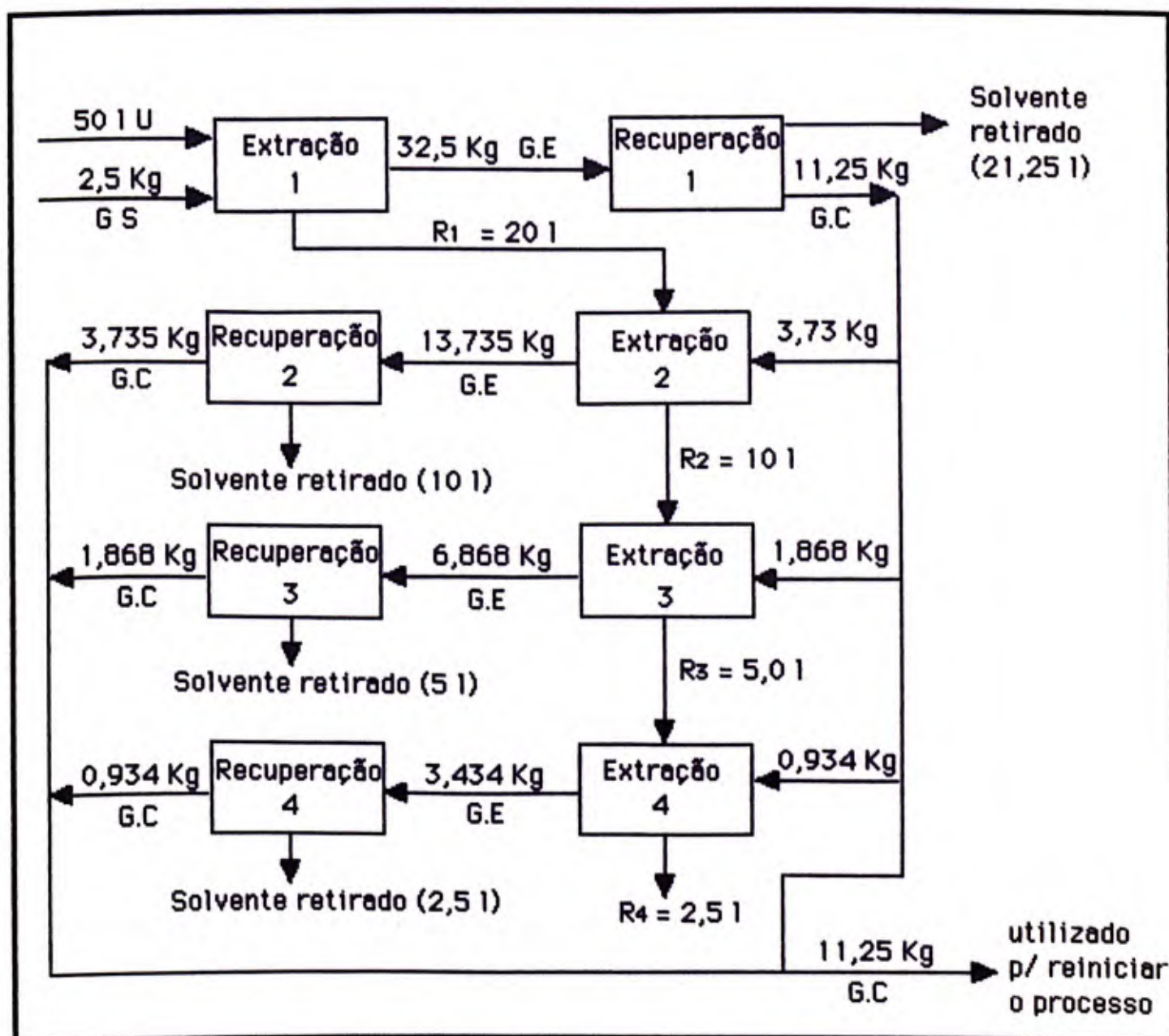


FIGURA 6 - Fluxograma esquemático do processo de concentração de urina (via gel termossensível). Onde U = urina, GS = gel seco, GE = gel expandido, R = refinado, GC = gel contraído.

Com o objetivo de verificar se as eficiências de extração apresentariam alguma diferença, em relações (R) constantes, quando o volume era variado, três experimentos foram realizados. Foram utilizadas as relações $R_1 = 0,010$, $R_2 = 0,018$ e $R_3 = 0,025$ para três volumes iniciais de urina: $V_1 = 250$ ml, $V_2 = 500$ ml e $V_3 = 1000$ ml. Os GRAFICOS 9, 10 e 11 mostram as curvas de extração obtidas em cada um desses experimentos. Observa-se que as eficiências se mantiveram altas em todos os ciclos e que não há nenhuma diferença significativa para eficiências obtidas nos diferentes volumes, em uma relação determinada.

Observa-se no GRAFICO 9, onde $R = 0,010$, que as eficiências obtidas no primeiro ciclo foram próximas de 100 %. As eficiências foram caindo lentamente ao longo dos ciclos de forma que obteve-se cerca de 90 % de eficiência no ciclo final, para os três volumes utilizados.

No GRAFICO 10, onde $R = 0,018$, observa-se também uma eficiência de extração em torno de 100 % no primeiro ciclo e no ciclo final, a eficiência obtida, para os três volumes utilizados, é cerca de 80 %.

Nas curvas apresentadas no GRAFICO 11, onde $R = 0,025$, observa-se que as eficiências obtidas, para os três volumes, no primeiro ciclo foram acima de 90 % e no último ciclo das concentrações obteve-se 70 % de eficiência.

Portanto, desde que a relação massa de gel/volume de urina seja mantida fixa, a alteração no volume a ser concentrado não irá provocar nenhuma mudança no comportamento das eficiências de separação.

Em outro experimento realizado, visando a determinação do comportamento das eficiências com o aumento das relações massa de gel/volume de urina verificou-se que o gel usado em tal experimento apresentava um comportamento de expansão anômalo ao comportamento dos

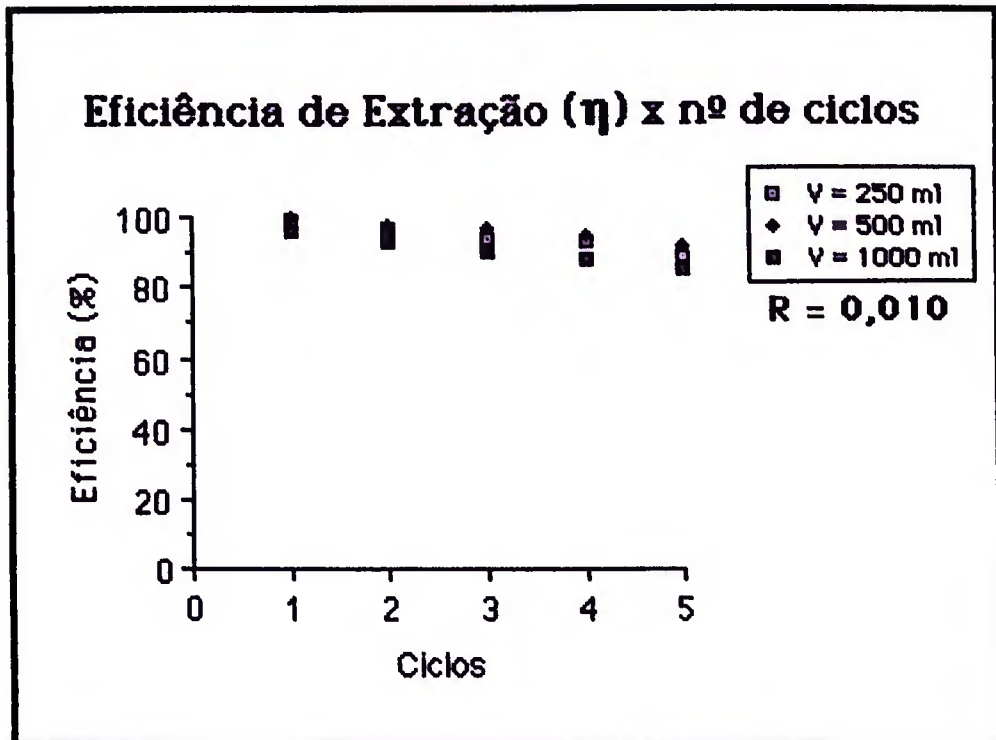


GRAFICO 9 - Determinação das eficiências de extração, em cada ciclo, para as concentrações realizadas com a relação massa de gel/volume de urina fixa e igual a 0,010, em três volumes iniciais, diferentes de urina: $V_1 = 250$ ml; $V_2 = 500$ ml e $V_3 = 1.000$ ml.

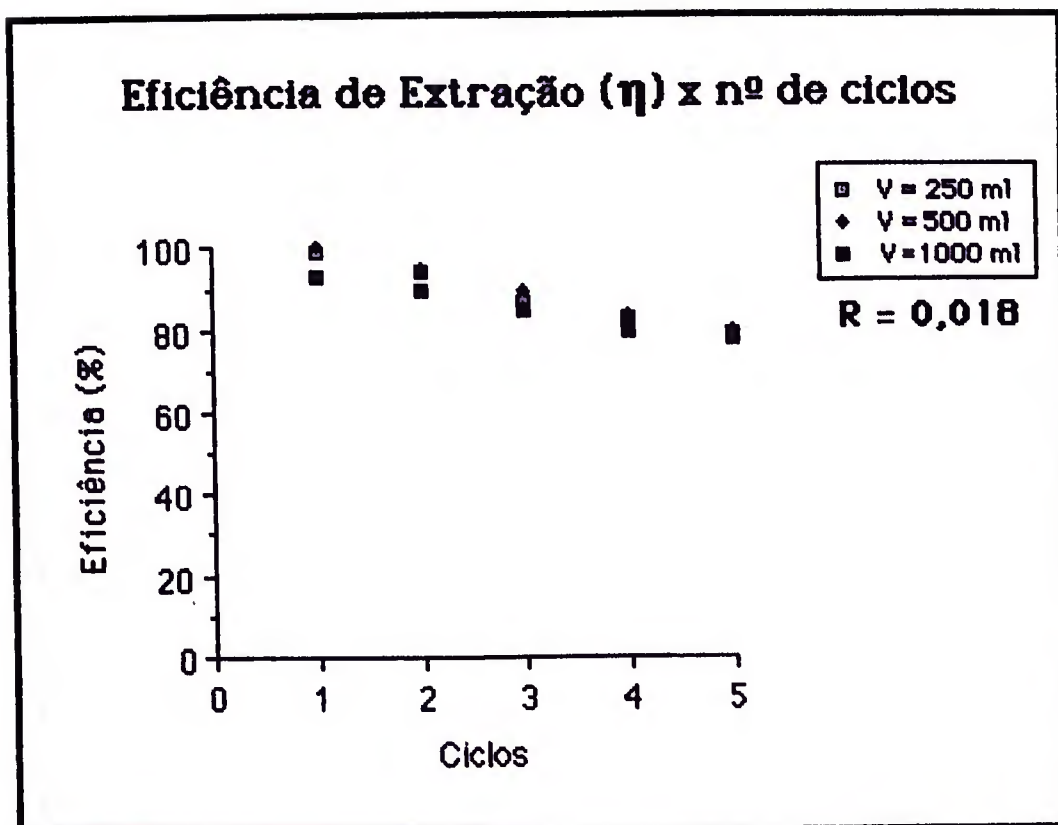


GRAFICO 10— Determinação das eficiências de extração, em cada ciclo, para as concentrações realizadas com a relação massa de gel/volume de urina fixa e igual a 0,018, em três volumes iniciais diferentes de urina: $V_1 = 250$ ml, $V_2 = 500$ ml e $V_3 = 1.000$ ml.

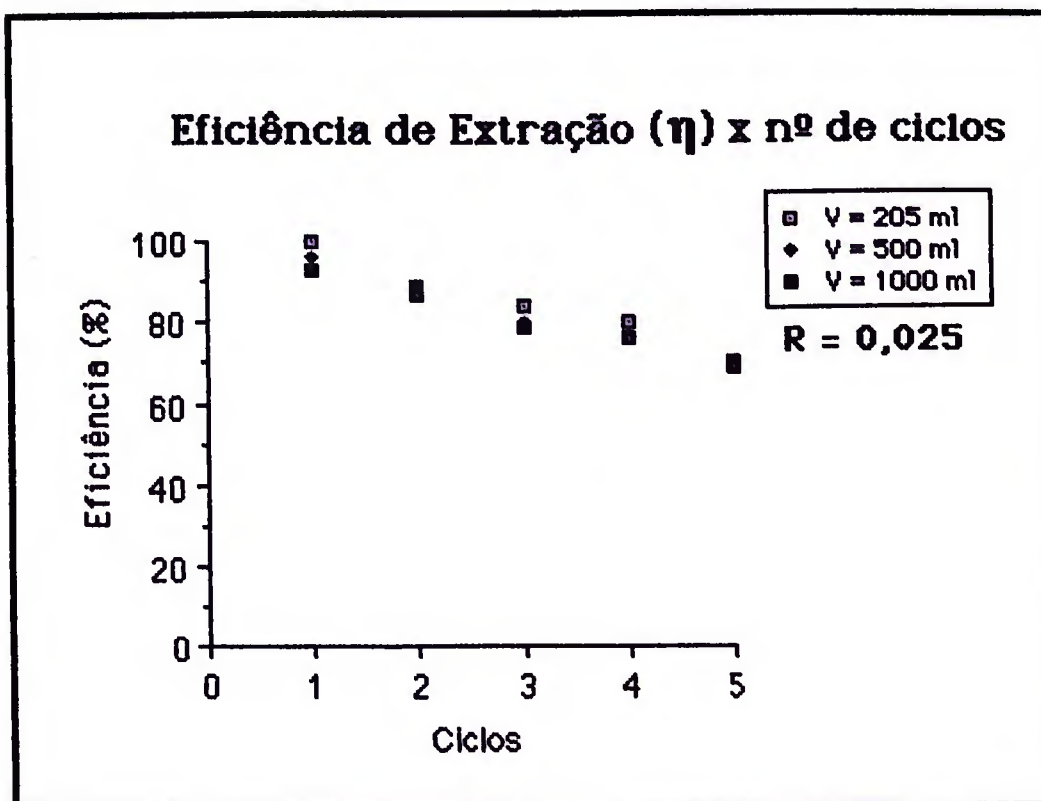


GRAFICO 11 – Determinação das eficiências de extração, em cada ciclo, para as concentrações realizadas com a relação massa de gel/volume de urina fixa e igual a 0,025, em três volumes iniciais diferentes de urina: $V_1 = 250$ ml, $V_2 = 500$ ml e $V_3 = 1.000$ ml.

demais géis utilizados no presente trabalho. Para tal experimento foram utilizadas as relações $R_1 = 0,010$, $R_2 = 0,025$ e $R_3 = 0,040$, onde o volume inicial de urina fora fixado em 250 ml. Assim, as respectivas massas de gel utilizadas foram iguais a 2,5 g, 6,25 g e 10,0 g.

O GRAFICO 12, mostra as curvas obtidas para as eficiências de extração, nas respectivas relações massa de gel/volume de urina. Observa-se que para a relação R_1 , a eficiência de extração foi altíssima em todos os ciclos (acima de 90 %). Para a relação R_2 , a eficiência de extração foi bastante alta nos dois primeiros ciclos (100% no primeiro e 80 % no segundo) e foi caindo após cada ciclo, de forma que a eficiência de extração obtida no ciclo final foi de 33 %. Já para a relação R_3 , a eficiência de extração foi cerca de 80 % no primeiro ciclo e caiu bruscamente, obtendo-se no último ciclo da concentração apenas 10 % de eficiência. Para esta última relação não foi possível realizar os cinco ciclos de concentração, pois o volume de urina após o terceiro ciclo já se encontrava extremamente reduzido. Ao se comparar as eficiências apresentadas neste gráfico, para as relações 0,025 e 0,040, com aquelas apresentadas no GRAFICO 5, observa-se que aqui as eficiências obtidas foram muito menores.

Observou-se que o gel utilizado nesse experimento apresentava um grau de expansão de aproximadamente 20 vezes seu peso seco. Esse grau de expansão é superior ao grau de expansão do gel normalmente obtido em urina, o qual gira em torno de 12 vezes. Assim, o volume de solvente extraído por ciclo nesse experimento era muito superior ao volume de solvente extraído naquele primeiro experimento. Portanto, aqui a urina sofreu maiores graus de concentração, em todas as relações, que aqueles obtidos no primeiro experimento e isto, conforme citado anteriormente, fez

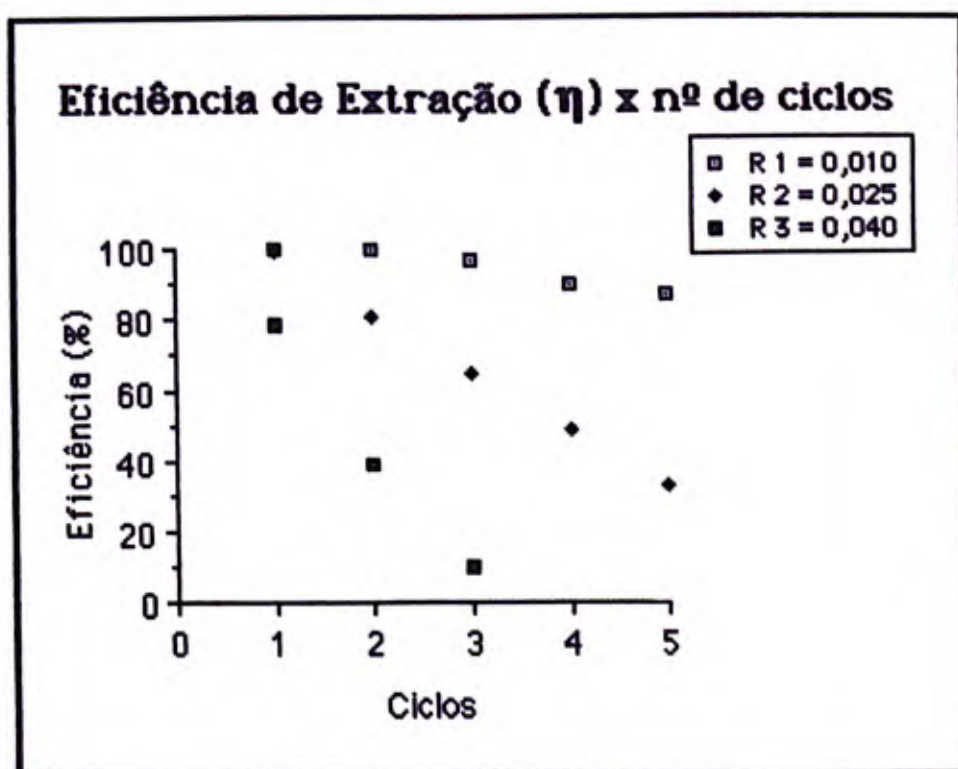


GRAFICO 12- Determinação das eficiências de extração em cada ciclo nas concentrações realizadas com as relações massa de gel/volume de urina iguais a 0,010; 0,025 e 0,040, em um volume inicial fixo de urina e igual a 250 ml.

agravar o problema de entranhamento de proteínas fazendo com que a queda da eficiência fosse muito mais acentuada.

O grau de expansão obtido para o gel nesse experimento, a princípio foi uma surpresa. Porém, recentemente foi demonstrado que o grau de expansão do gel varia de acordo com a temperatura na qual ele foi polimerizado e que o maior grau de expansão era obtido quando o gel era polimerizado a 16 °C.

Os dados experimentais referentes à determinação das relações (R) são mostrados no apêndice C.

3.2 Purificação da calicreína urinária humana.

A purificação da calicreína urinária humana a partir do pó urinário obtido, dissolvido em tampão glicina 0,01 M, NaCl 0,75 M pH 9,5 contendo azida de sódio 0,05 % foi conduzida através de cromatografia em duas colunas, a primeira de afinidade, em coluna de Sepharose-aprotínina e a segunda, em coluna de hidroxilapatita.

A FIGURA 7, mostra o fluxograma da purificação da calicreína urinária humana, onde estão representadas todas as etapas envolvidas.

A TABELA 6, mostra o sumário dos processos utilizados na purificação da calicreína urinária humana, usando-se como substrato, para medida das atividades amidásicas específicas, o APAPNA.

Etapa 1 - O primeiro passo tomado foi a precipitação da glicoproteína de Tamm Horsfall. Tal procedimento consistiu numa etapa prévia de purificação da calicreína. Em seguida, a urina passou por um processo de concentração, que se consistiu de duas etapas, concentração via gel termosensível e diálise-liofilização. A concentração da urina é uma etapa indispensável, pois a concentração de proteínas e, por conseguinte, a de calicreína na urina é extremamente baixa. A solução do extrato bruto

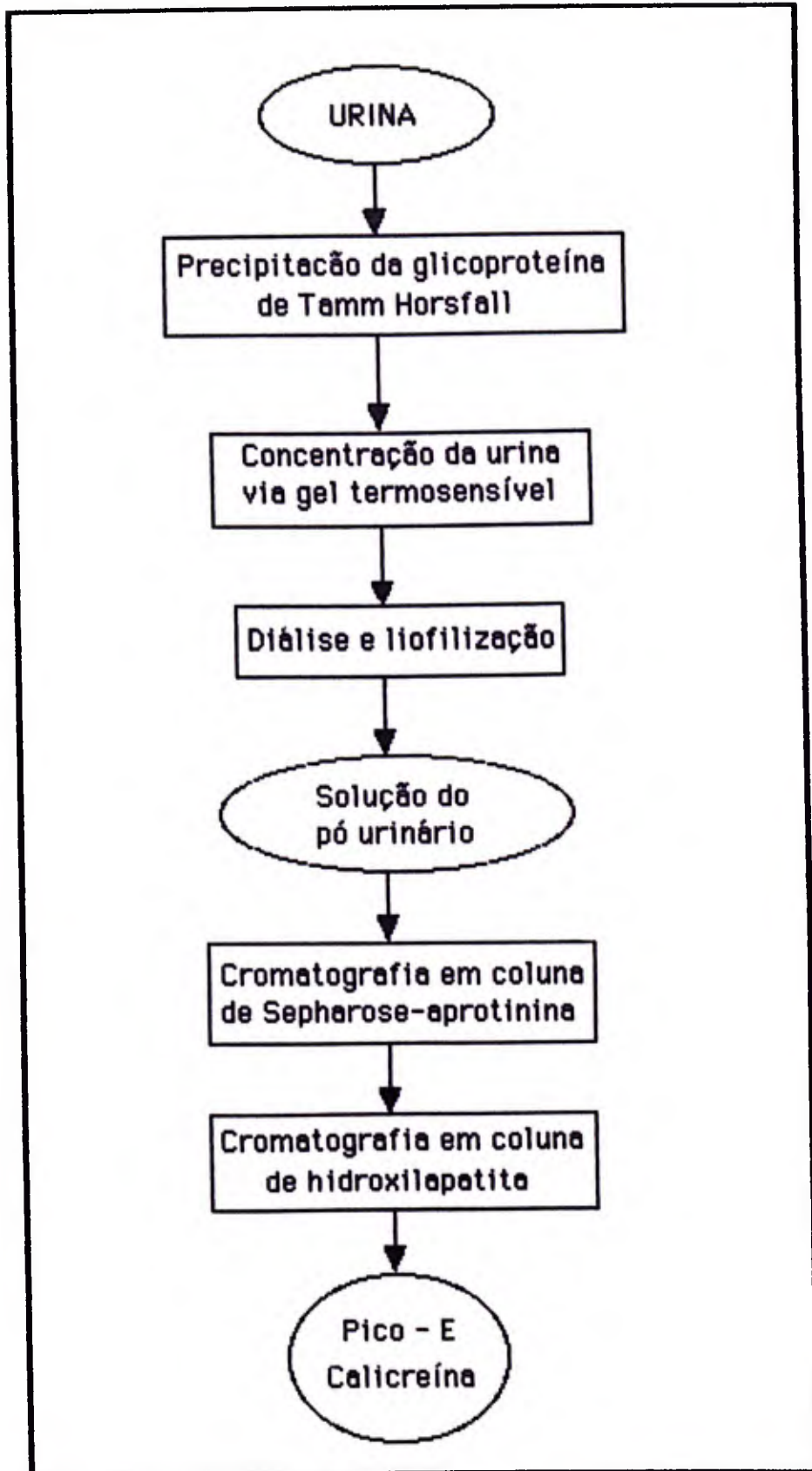


FIGURA 7 – Fluxograma esquemático da purificação da calicreína urinária humana.

TABELA 7 – Purificação da caliceína urinária humana, CAL-E, usando-se plasma humano tratado, como substrato para a medida das atividades cininoliberadoras.

Etapa	Tratamento	Proteína (mg)	Atividade Específica equivalente de bradicinina $\mu\text{g}/(\text{mg}\cdot\text{min})$	Atividade Total equivalente de bradicinina $\mu\text{g}/\text{min}$	Purificação	Rendimento (%)
1	Concentração	3.155,000	5,22	16.469	1	100,00
2	Cromatografia em Sepharose - aprotinina	1,002	4.412,00	4.412	845	26,80
3	Cromatografia em hidroxilapatita Pico-E	0,296	6.774,00	2.005	1.298	12,20

(3155 mg de proteína) obtida através da dissolução do pó urinário em tampão glicina, conforme descrito no capítulo 2, apresentou uma atividade amidásica específica de $3,3 \times 10^{-3}$ mmolar de p-nitroanilina por milígrama de proteína por minuto.

Etapa 2 – A segunda etapa consistiu em cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina. Nesta etapa foi separada uma grande quantidade de proteínas indesejáveis, como pode ser visto no GRAFICO 13, (1ª pico), o que possibilitou o aumento de 998 vezes na atividade amidásica específica, com recuperação de atividade de 31,7 %.

Etapa 3 – A terceira etapa de purificação foi a cromatografia em coluna de hidroxilapatita, a qual separou cinco picos ativos, pico-A, pico-B, pico-C, pico-D e pico-E. Porém, como será visto posteriormente, somente o pico-E apresentou atividade cininoliberadora.

Assim, observa-se que apesar do APApNA ser um bom substrato para calicreína ele não é tão específico quanto o cininogênio humano e, desta forma, outras enzimas, similares à calicreína, podem hidrolizá-lo.

Nesta etapa, a calicreína (pico-E), foi purificada 751 vezes, com um rendimento de 7,04 %, como pode ser visto na TABELA 6. Observa-se que a atividade amidásica nesta etapa diminuiu em relação à etapa anterior. A explicação para tal reside no fato do APApNA não ser específico para calicreína fazendo assim, com que a atividade na presença de outras proteínas que o hidrolisam seja maior.

A TABELA 7 à página 102, apresenta o sumário dos processos utilizados na purificação da calicreína urinária humana (pico-E), usando-se como substrato, para medida das atividades cininoliberadoras específicas, o plasma humano tratado.

Etapa 1 - A atividade específica apresentada na etapa 1 (extrato bruto) foi de 5,22 μg de equivalentes de bradicinina por mg de proteína por minuto.

Etapa 2 - A cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina permitiu um aumento de 845 vezes na atividade cininoliberadora específica, com a recuperação de 26,8 % de atividade.

Etapa 3 - A cromatografia em coluna de hidroxilapatita, como já mencionado, permitiu a separação de cinco picos com atividade sobre o APApNA, mas somente o pico-E apresentou atividade cininoliberadora. Esta etapa permitiu o aumento na atividade cininoliberadora específica de 1298 vezes e recuperação de 12,2 % de atividade.

Assim, partindo-se de 3155 mg de proteína na solução do pó de urina, foram obtidos 296 μg de caliceína purificada (pico-E).

O perfil da cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina, da solução resultante do pó urinário está representado no GRAFICO 13. Um grande pico de proteínas inativas passou pela coluna sem combinar com a aprotinina. A fração que continha a caliceína foi eluída, depois que a coluna foi lavada, com o tampão acetato de sódio 0,025 M, NaCl 1,0 M pH 3,5. O pico ativo apresentou uma alta atividade específica, pois as leituras das absorvâncias, em 280 nm, foram muito baixas.

O GRAFICO 14, mostra o perfil da cromatografia do material contendo caliceína, eluído da coluna de Sepharose-aprotinina, em coluna de hidroxilapatita. Dois componentes protéicos, sem atividade sobre o APApNA, foram separados. O primeiro saiu logo no início da cromatografia e o segundo foi eluído após a aplicação do tampão fosfato de sódio 0,08 M à coluna. Cinco frações ativas, conforme já mencionado, foram separadas

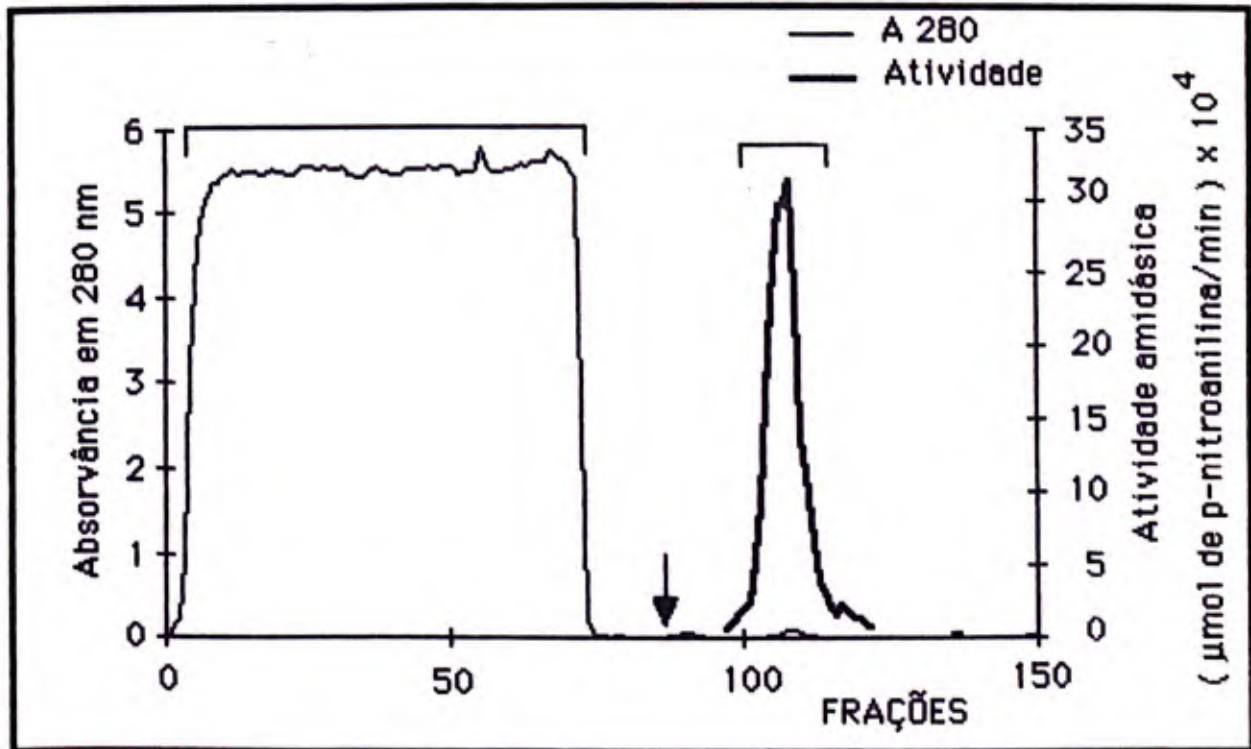


GRAFICO 13 - Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina.

Condições: coluna de 2,5 cm x 9,2 cm, equilibrada com tampão glicina 0,1 M, NaCl 0,75 M pH 9,5, contendo 500 mg de azida de sódio. A amostra aplicada -Extrato Bruto- continha 1052 mg de proteínas. A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio e a calicreína foi eluída através de aplicação do tampão acetato de sódio 0,025 M, NaCl 1,0 M pH 3,5, contendo 500 mg de azida de sódio. A seta indica o início da aplicação do tampão de eluição. Durante a eluição, as frações eram coletadas em tubos contendo 0,5 ml de TRIS-HCl 2 M pH 8,5. Volume por fração: 15 ml durante a lavagem da coluna e 2,0 ml durante a eluição. Foram aplicados à coluna 3,0 litros de solução do Extrato Bruto. Para maiores detalhes, vide **Material e Métodos**.

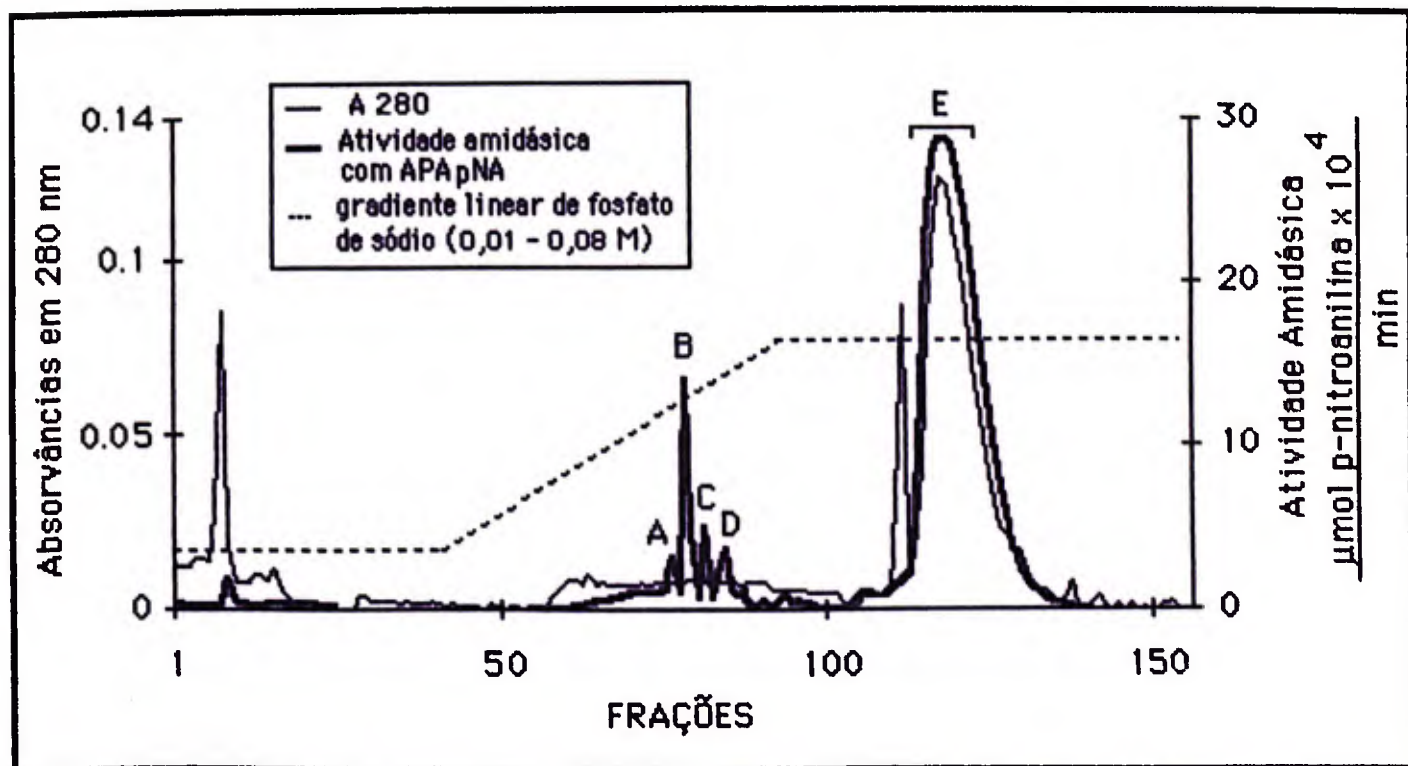


GRAFICO 14 - Cromatografia em coluna de hidroxilapatita.

Condições: Coluna de 21,0 cm x 0,7 cm , equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,01 M, contendo NaCl 3,0 M pH 6,0. Amostra aplicada: 1,002 mg em proteína do material ativo obtido da cromatografia de afinidade em Sepharose-aprotinina. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e eluída com 52 ml de um gradiente linear de fosfato de sódio até 0,08 M, contendo NaCl 3,0 M pH 6,0. Volume por fração: 2,0 ml durante a lavagem da coluna e 1,0 ml durante o gradiente. Para maiores detalhes, vide **Material e Métodos**.

através desta coluna. As quatro primeiras, pico-A, pico-B, pico-C e pico-D foram eluídas, separadamente, após aplicação de um gradiente linear de fosfato de sódio de 0,01 M a 0,08 M. O pico-E foi eluído após aplicação do tampão fosfato de sódio 0,08 M à coluna. Como pode ser visto, o pico-E é simétrico tanto em termos de atividade como em termos de absorvância em 280 nm. Este constituiu o primeiro indício de pureza da caliceína.

A atividade amidásica específica da caliceína urinária humana, usando-se APApNA como substrato, foi de 2,48 mMolar de p-nitroanilina/(mg . min). Infelizmente, não há na literatura valores de atividades amidásicas específicas de caliceína urinária humana com este substrato que possam ser comparados com os valores encontrados neste trabalho.

Entretanto, os valores de atividade cininoliberadoras específicos descritos no presente trabalho, e determinados por pré-incubação em pH 8,2, a 37 °C, podem ser comparados com outros descritos na literatura para caliceínas urinárias humanas. A TABELA 8, à pagina 107 apresenta as atividades cininoliberadoras específicas para caliceínas urinárias humanas, descritas na literatura. Como pode ser observado, a maior atividade cininoliberadora específica determinada para caliceína urinária humana é aquela descrita no presente trabalho.

Observa-se também que o fator de purificação, obtido no presente trabalho, está entre os mais altos até agora citados na literatura para a purificação da caliceína urinária humana. Este dado é uma evidência a favor da excelência do processo de purificação da caliceína urinária humana descrito no presente trabalho.

Conforme mostrado na TABELA 7, à página 102, a recuperação de atividade cininoliberadora da ordem de 12 % é baixa comparada com os va-

TABELA 8 - Comparação de dados sobre as purificações de caliceínas urinárias humanas.

Autores	Sumário dos Processos	Atividade Específica µg de equivalentes de BK/(mg.min)	Purificação	Rendimento (%)
HIAL et al (1974)	Sephadex G-25 DEAE-Sephadex A-50 Sephadex G-150 Sephadex G-150	12,5 μ	25	43,5
MATSUDA et al (1976)	Concentração da urina DEAE-Celulose Precipitação com acetona Sephadex G-100 DEAE-Sephadex A-50 Focalização isoeletrica	63,0 μ	200	14,0
GEIGER et al (1976)	Concentração de urina Sephadex G-100 Sephacryl S-200 Sephacryl S-200	113,95 μ	212	—
OZA & RYAN (1978)	Precipitação com sulfato de amônio DEAE-celulose Sephacryl S-200 Sephacryl S-200	1.094,0 μ	833	31,0
OLE-MOIYOI (1979)	Concentração da urina Sephacryl S-200 Sephadex G-100	2.910 μ	1.727	77,1

TABELA 8 (Continuação)

GEIGER et al (1980)	Extrato do pó de urina Sephacryl S-200 Sephacryl S-200 DEAE-Sephacryl	786 ^f	225	48,0
SOUZA LIMA et al (1986)	Concentração da urina Fracionamento com sulfato de amônio DEAE-Celulose Hidroxiapatita Sephacryl S-400 HUK-A HUK-B HUK-D	4.708 ^g 6.649 5.044	1.357 1.916 1.453	13,0 27,0 3,0
MIRANDA et al (1990)	Concentração da urina Sephacryl S-400 Hidroxiapatita	6.774 ^h	1.298	12,2

a - Cininogênio canino parcialmente purificado.

b - Cininogênio bovino parcialmente purificado.

c - Cininogênio humano de alto peso molecular, puro.

d - Plasma humano aquecido a 59 °C durante 3 horas.

e - Plasma humano aquecido a 61 °C durante 1 hora.

f - Cininogênio humano de alto peso molecular, altamente purificado.

g e h - Plasma humano aquecido e precipitado com sulfato de amônio a 50 % de saturação.

A FIGURA 8 mostra o perfil eletroforético da calicreína (pico-E) em gel de poliacrilamida 10 % e 0,1 % de SDS. Como pode ser observado houve o aparecimento de apenas uma banda protéica, o que constitui uma evidência da pureza dessa enzima.

Em todos os trabalhos citados na literatura a identificação da banda protéica de calicreína foi feita através de coloração com o Coomassie. Entretanto, no presente trabalho, foi utilizado o método de coloração pela prata o qual apresenta uma sensibilidade muito maior que aquela apresentada pelo reagente Coomassie.

3.5 Determinação do peso molecular aparente.

O peso molecular aparente da calicreína urinária humana foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % na presença de SDS.

A mistura de padrões de peso molecular utilizada continha: 1. soroalbumina (66.000), 2. ovalbumina (45.000), 3. glutaraldeído 3-fosfatodesidrogenase (36.000), 4. anidrase carbônica (29.000) e 5. SBTI (20.500). As bandas obtidas pela eletroforese são mostradas na FIGURA 8. O GRAFICO 15 mostra a reta obtida para os valores locados do logaritmo do peso molecular de cada proteína como função da sua mobilidade relativa.

A mobilidade relativa da calicreína urinária humana foi de 0,4, correspondendo, portanto, ao peso molecular estimado de aproximadamente 47.000.

A faixa de pesos moleculares citada na literatura para a calicreína urinária humana é bastante ampla, variando, dependendo do processo utilizado para sua determinação, de 23.000 a 64.000.

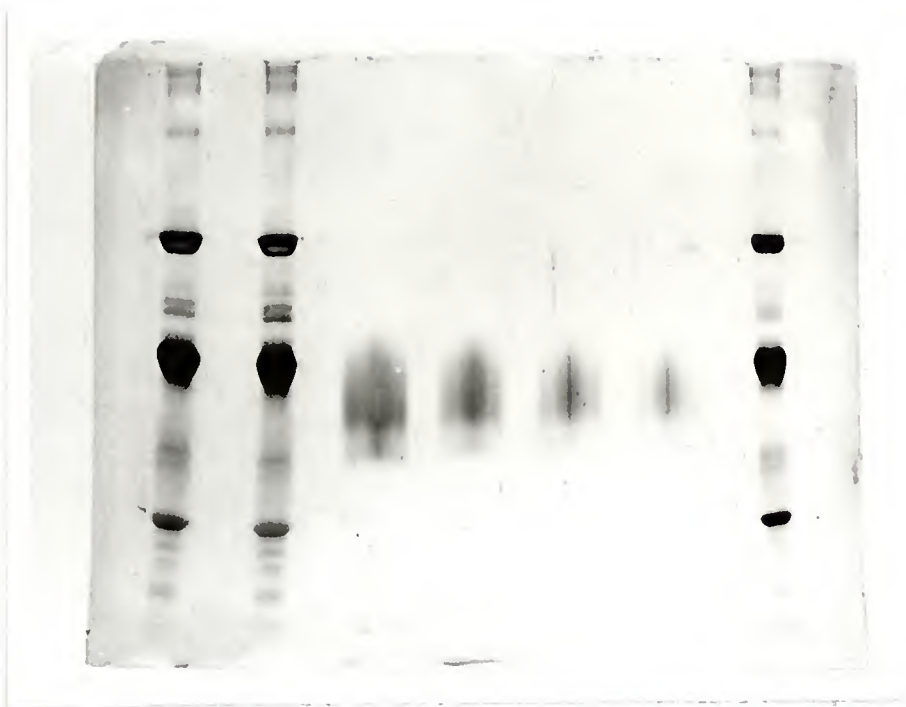


FIGURA 8 - Eletroforese da calicreïn urinária humana, purificada, em gel de poliacrílamida 10 %, contendo SDS. Nas canaletas laterais são mostradas as bandas do padrão de peso molecular e, as canaletas centrais trazem a banda de calicreïn purificada em concentrações decrescentes da esquerda para a direita.

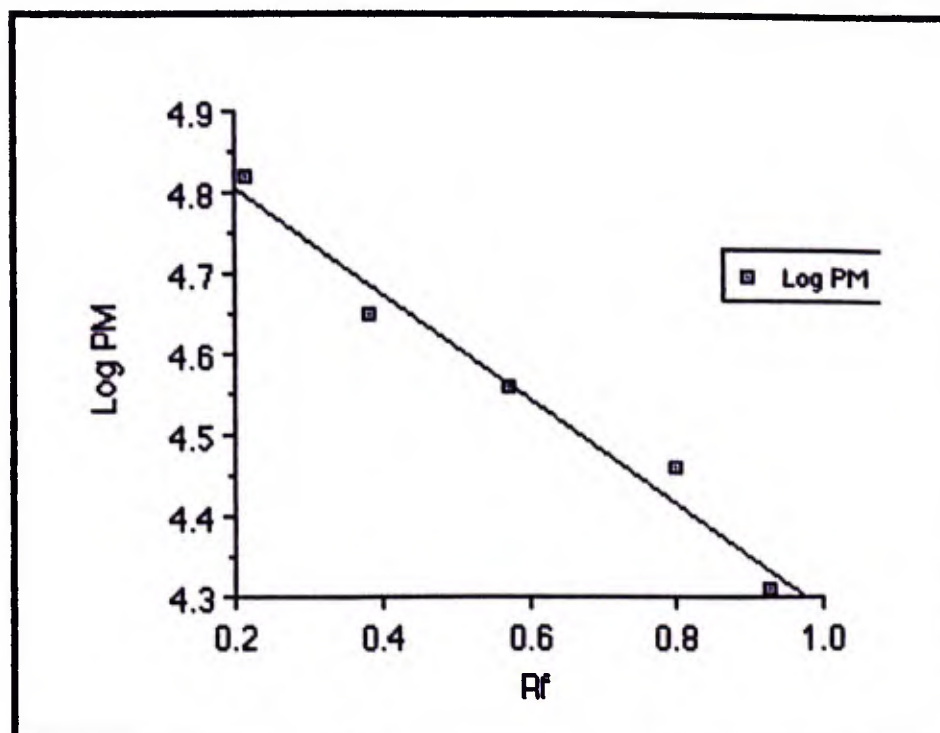


GRAFICO 15 - Estimação do peso molecular aparente da caliceína urinária humana.

Onde:

Rf = mobilidade relativa das proteínas.

$$y = 4.9351 - 0.6483x \quad R = 0.99$$

A TABELA 9 mostra os valores desses pesos moleculares, bem como, os processos utilizados para sua determinação.

Como pode ser visto, o peso molecular, 47.000, aqui determinado para a calicreína urinária humana é muito semelhante aos pesos moleculares citados na literatura, 45.000-50.000, para determinações feitas em eletroforese na presença de SDS.

Os dados experimentais referentes às cromatografias utilizadas para a purificação da calicreína urinária humana e os valores das mobilidades relativas encontrados na estimação do seu peso molecular encontram-se no apêndice D.

4. Conclusões.

O presente trabalho teve por objetivo a determinação das condições de operação do processo de concentração da urina humana através do gel termosensível poli (N-isopropilacrilamida) 10 x 1 e a simplificação do processo de purificação da calicreína purinária humana.

Para a determinação das condições de operação uma série de estudos foi realizada e, a partir dos resultados obtidos chegou-se às seguintes conclusões:

- A urina não deve conter a glicoproteína de Tamm Horsfall, pois com a sua presença a concentração de proteínas indesejáveis na urina é mais alta, o que leva a diminuição na eficiência de extração. Porém, ficou demonstrado também que outras proteínas presentes na urina, assim como a calicreína, não sofrem nenhum tipo de interação com o gel, ou seja, elas são excluídas do gel sem se combinar com ele.

- O gel não deve ser lavado após cada ciclo, pois o aumento desta etapa no processo não proporciona aumentos significativos nas eficiências de extração. Porém, constatou-se que o gel apresenta uma excelente estabilidade, pois para que ele volte a ter as mesmas características de um gel virgem é necessário apenas, que durante o processo ele passe por lavagens periódicas em água.

- A urina deve sofrer uma redução máxima no volume de aproximadamente 20 vezes, pois a concentração além deste ponto leva a grandes perdas de proteínas por entranhamento.

- As eficiências obtidas para as concentrações realizadas em 4 e 5 ciclos foram idênticas, tanto em termos de proteínas, como em função da atividade amidásica sobre o APApNA. Assim, concluiu-se que o gel apresenta a mesma seletividade para a calicreína e outras proteínas presentes na urina.

- A redução de 20 vezes do volume de urina dese ser realizada em 4 ciclos de concentração. Assim, deve-se usar as relações $R = 0,05$ no primeiro ciclo e $R = 0,0415$ nos ciclos seguintes. As massas de gel respectivas a tais relações proporcionam a extração de 60 % e 50 % do volume presente, respectivamente.

- A variação no volume inicial de urina a ser concentrada não modifica o comportamento das eficiências de extração para relações (R) fixas. Portanto, na concentração de 50 litros de urina para um volume final de 2,5 litros, em 4 ciclos, é de se esperar que o comportamento da eficiência seja análogo àquele obtido na concentração do volume inicial de 900 ml de urina.

Quanto à purificação da calicreína, o processo foi bastante simplificado, pois foi conduzido em apenas duas cromatografias, a de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina e a cromatografia em coluna de hidroxilapatita. Os resultados mostram que a calicreína apresentou um grau de purificação de 751 vezes, com um rendimento de 7,04 %, quando as atividades eram medidas através do substrato APApNA. Quando se utilizou o plasma humano tratado, o grau de purificação para a calicreína urinária humana foi de 1.298 vezes, com um rendimento de 12,2 %.

A eletroforese da calicreína urinária humana, em gel de poliacrilamida 10 % com SDS, apresentou somente uma banda, mostrando, dessa forma, que a calicreína obtida apresenta um bom grau de pureza.

O peso molecular obtido para a calicreína urinária humana foi de aproximadamente 47.000. Tal valor está dentro da faixa de pesos moleculares, citados na literatura, para a calicreína urinária humana.

5. Apêndices

As tabelas apresentadas a seguir obedecerão à seguinte notação:

η - eficiência de separação

C - concentração de proteínas

u - urina fresca

r - refinado (solução concentrada em cada ciclo)

e - extrato

A1 - experimento realizado sem a lavagem do gel após cada ciclo.

A2 - experimento onde o gel era lavado após cada ciclo de concentração.

E1 - a urina continha a glicoproteína de Tamm Horsfall

E2 - a urina não continha a glicoproteína de Tamm Horsfall

G1 - gel virgem

G2 - gel usado em aproximadamente 100 ciclos de concentração e recuperado através de lavagens

R - relação massa de gel/volume de urina

v - atividade amidásica sobre o substrato sintético APApNA

A₂₈₀ - absorvância em 280 nm

PM - peso molecular

R_f - mobilidade relativa

Apêndice A

DETERMINAÇÃO DE ALGUMAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO DE URINA HUMANA VIA GEL POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA).

TABELA A₁ - Estudo dos efeitos de lavagem do gel após cada ciclo de concentração (Valores experimentais).

Experi- mento	Fração	C real (mg/mol)	C ideal (mg/mol)	η (%)
A1	U	0,184	-	-
	r ₁	0,261	0,260	100
	r ₂	0,304	0,368	83
	r ₃	0,442	0,648	68
	r ₄	0,619	0,979	63
A2	U	0,184	-	-
	r ₁	0,250	0,252	100
	r ₂	0,308	0,333	92
	r ₃	0,427	0,676	63
	r ₄	0,592	0,022	58

TABELA A₂ - Estudo dos efeitos de lavagem do gel após cada ciclo de concentração (valores padronizados para a relação massa de gel/volume de urina igual a 0,04).

Experi- mento	Fração	η (%)
A ₁	U	-
	r ₁	98
	r ₂	93
	r ₃	78
	r ₄	48
A ₂	U	-
	r ₁	94
	r ₂	89
	r ₃	74
	r ₄	44

TABELA A₃ - Estudo de alguma possível interação entre a glicoproteína de Tamm Horsfall e o gel (valores experimentais).

Experi- mento	Fração	C real (mg/mol)	C ideal (mg/mol)	η (%)
E ₁	U	0,135	-	-
	r ₁	0,198	0,200	100
	r ₂	0,347	0,466	75
	r ₃	0,700	0,467	48
	r ₄	1,279	3,375	38
A2	U	0,114	-	-
	r ₁	0,149	0,150	100
	r ₂	0,247	0,345	72
	r ₃	0,456	0,803	58
	r ₄	0,818	2,280	36

TABELA A₄ - Estudo de alguma possível interação entre a glicoproteína de Tamm Horsfall e o gel (valores padronizados para a relação massa de gel/volume de urina igual a 0,04).

Experi- mento	Fração	η (%)
E ₁	U	-
	r ₁	98
	r ₂	93
	r ₃	78
	r ₄	48
E ₂	U	-
	r ₁	100
	r ₂	95
	r ₃	80
	r ₄	50

TABELA A₅ - Estudo da estabilidade do gel (valores experimentais).

Experi- mento	Fração	C real (mg/mol)	C ideal (mg/mol)	η (%)
G ₁	U	0,092	-	-
	r ₁	0,164	0,165	100
	r ₂	0,379	0,541	70
	r ₃	0,532	0,868	61
	r ₄	0,830	1,840	45
G ₂	U	0,114	-	-
	r ₁	0,211	0,211	100
	r ₂	0,393	0,570	69
	r ₃	0,593	0,950	62
	r ₄	0,890	1,900	47

TABELA A₆ - Estudo da estabilidade do gel (valores padronizados para a relação massa de gel/volume de urina igual a 0,04)

Experi- mento	Fração	η (%)
G ₁	U	-
	r ₁	98
	r ₂	93
	r ₃	78
	r ₄	48
G ₂	U	-
	r ₁	96
	r ₂	91
	r ₃	76
	r ₄	46

Apêndice B

BALANÇO DE MASSA GLOBAL E POR COMPONENTE

1. Balanço de massa global por componente para um ciclo de concentração.

massa de gel seco: $M_{gs} = 10,00 \text{ g}$

massa de urina: $M_u = 510,00 \text{ g}$

concentração de proteínas na urina: $C_{pu} = 0,135 \text{ mg/ml}$

massa de refinado: $M_r = 244,80 \text{ g}$

concentração de proteínas no refinado: $C_{pr} = 0,256$

massa de extrato: $M_e = 153,00 \text{ g}$

concentração de proteínas no extrato: $C_{pe} = 0,040 \text{ mg/ml}$

massa de gel expandido: $M_{ge} = 273,30 \text{ g}$

massa de gel contraído: $M_{gc} = 118,30 \text{ g}$

perdas na etapa de extração

1.1 Balanço global

$$M_u + M_{gs} = M_r + M_{ge} + m' = M_{gc} + M_e + M_r + m''$$

extração

$$M_u + M_{gs} = M_r + M_{ge} + m'$$

$$510,00 + 10,00 = 244,80 + 273,30 + m'$$

$$m' = 1,90 \text{ g}$$

recuperação

$$M_r + M_{gc} + m' = M_{gc} + M_r + M_e + m''$$

$$273,30 + 1,9 = 118,30 + 153 + m''$$

$$m'' = 3,90 \text{ g}$$

1.2 Balanço de massa por componente

$$M_{gs} \times C_{pgs} + M_u \times C_{pu} = M_{ge} \times C_{pge} + M_r \times C_{pr} =$$

$$M_{gc} \times C_{pgc} + M_e \times C_{pe} + M_r \times C_{pr}$$

extração

$$M_{gs} \times C_{pgs} + M_u \times C_{pu} = M_{ge} \times C_{pge} + M_r \times C_{pr}$$

$$C_{pgs} = 0$$

$$510,00 \times 0,135 = 273,30 \times C_{pge} + 244,80 \times 0,256$$

$$C_{pge} = 0,023 \text{ mg/ml}$$

recuperação

$$M_{ge} \times C_{pge} + M_r \times C_{pr} = M_{gc} \times C_{pgc} + M_e \times C_{pe} + M_r \times C_{pr}$$

$$273,30 \times 0,023 = 118,30 \times C_{pgc} + 153,00 \times 0,040$$

$$C_{pgc} = 0,001 \text{ mg/ml}$$

A perda de 1,90 g na etapa de extração deve-se às partículas de gel expandido que ficam aderidas às superfícies do becker e do funil de Buchner. A percentagem de perda do gel é, portanto, de 0,36 % em cada ciclo.

Na etapa de recuperação a perda de massa (3,90 g) deve-se quase exclusivamente à evaporação de líquidos durante a contração do gel. Assim, são perdidos cerca de 1,42 % da massa líquida nesta etapa.

A concentração de proteínas encontrada para o gel expandido (0,023mg/ml) representa as proteínas que ficaram entranhadas entre as partículas de gel. Quando o gel sofre a contração ele libera praticamente todas essas proteínas, pois a concentração de proteínas obtida para o gel contraído é de apenas 0,001 mg/ml.

Através do balanço global de massa apresentado acima, torna-se possível fazer uma previsão das perdas (gel + líquidos) que ocorrem durante o processo para a concentração realizada em vários ciclos. O balanço de massa apresentado a seguir mostra essas possíveis perdas para a concentração de 50 litros de urina fresca realizada em 4 etapas.

2. Balanço de massa para a concentração de 50 litros de urina fresca para um volume final de 2,5 litros, sendo realizada em 4 etapas.

volume inicial de urina = 50 l

perda de gel em cada ciclo: $m' = 0,36 \%$

perda de líquidos em cada ciclo: $m'' = 1,42 \%$.

1º Ciclo

$M_{gs} = 2,5 \text{ Kg}$

$V_u = 50 \text{ l} \approx 50 \text{ Kg}$

extração

$M_{gs} + M_u = M_{ge \ 1} + M_{r \ 1} + m' \ 1 = 52,5 \text{ Kg}$

recuperação

$M_{ge \ 1} = M_{gc \ 1} + M_{e \ 1} + m'' \ 1 = 32,5 \text{ Kg}$

Perda total de gel no 1º ciclo = $0,0036 \times 2.500 \text{ g} = 9,00 \text{ g}$

Perda de líquidos = $0,0142 \times 3.000 \text{ g} = 426,00 \text{ g}$

2º Ciclo

Mgc = 830,00 g

Vr 1 = 20,00 l \approx 20,00 Kg

extração

Mgc + Mr 1 = Mge 2 + Mr 2 + m' 2 = 20,83 Kg

recuperação

Mge 2 = Mgc 2 + Me 2 + m" 2 = 10,83 Kg

Perda total de gel no 2º ciclo = $0,0036 \times 830,00 \text{ g} = 2,99 \text{ g}$

Perda total de líquidos no 2º ciclo = $0,0142 \times 10.000 \text{ g} = 142,00 \text{ g}$

3º Ciclo

Mgc = 415,00 g

Vr 2 = 10,00 l \approx 10,00 Kg

extração

Mgc + Mr 2 = Mge 3 + Mr 3 + m' 3 = 10,415 Kg

recuperação

Mge 3 = Mgc 3 + Me 3 + m" 3 = 5,415 Kg

Perda total de gel no 3º ciclo = $0,0036 \times 415,00 \text{ g} = 1,49 \text{ g}$

Perda total de líquidos no 3º ciclo = $0,0142 \times 5.000 \text{ g} = 71,00 \text{ g}$

4º Ciclo

$$M_{gc} = 207,50 \text{ g}$$

$$V_{r3} = 5,00 \text{ l} \approx 5,00 \text{ Kg}$$

extração

$$M_{gc} + M_{r3} = M_{ge4} + M_{r4} + m'_{4} = 5,21 \text{ Kg}$$

recuperação

$$M_{ge4} = M_{gc4} + M_{e4} + m''_{4} = 2,71 \text{ Kg}$$

$$\text{Perda total de gel no 4º ciclo} = 0,0036 \times 207,50 \text{ g} = 0,75 \text{ g}$$

$$\text{Perda total de líquidos no 4º ciclo} = 0,0142 \times 2.500 \text{ g} = 35,50 \text{ g}$$

$$\text{Perda total de gel na concentração (m' t)} = 14,23 \text{ g}$$

$$\text{Perda total de líquidos por evaporação durante a concentração (m'' t)} = 674,50 \text{ g}$$

Apêndice C

DETERMINAÇÃO DAS RELAÇÕES MASSA DE GEL/VOLUME DE URINA

TABELA C₁ - Eficiências de separação para concentrações realizadas em diferentes relações massa de gel/volume de urina.

R	Fração	C real (mg/mol)	C ideal (mg/mol)	η (%)
0,010	U	0,176	-	-
	r ₁	0,200	0,201	100
	r ₂	0,212	0,217	98
	r ₃	0,227	0,233	97
	r ₄	0,238	0,249	95
0,025	U	0,158	-	-
	r ₁	0,219	0,220	100
	r ₂	0,250	0,278	90
	r ₃	0,264	0,331	80
	r ₄	0,318	0,412	77
0,040	U	0,160	-	-
	r ₁	0,234	0,234	100
	r ₂	0,381	0,433	88
	r ₃	0,557	0,715	78
	r ₄	0,891	1,310	68

TABELA C₂ - Eficiência de separação em cada ciclo para a concentração realizada com a relação massa de gel/volume de urina fixa e igual a 0,010.

Fração	C real (mg/mol)	C ideal (mg/mol)	η (%)
U	0,132	-	-
r ₁	0,149	0,149	100
r ₂	0,160	0,168	96
r ₃	0,173	0,183	94
r ₄	0,193	0,208	93
r ₅	0,200	0,228	89
r ₆	0,209	0,254	82

TABELA C₃ - Redução de 20 vezes no volume inicial de urina através de concentração em 4 e 5 ciclos (eficiência determinada pela concentração de proteínas em cada ciclo).

Experi- mento	R	Fração	C real (mg/mol)	C ideal (mg/mol)	η (%)
1	-	U	0,143	-	-
	0,0500	r ₁	0,300	0,375	80
	0,0415	r ₂	0,385	0,631	61
	0,0415	r ₃	0,615	1,119	55
	0,0415	r ₄	0,904	1,950	46
2	-	U	0,143	-	-
	0,0500	r ₁	0,297	0,371	80
	0,0415	r ₂	0,396	0,657	60
	0,0330	r ₃	0,531	0,957	54
	0,0330	r ₄	0,685	1,369	50
	0,0330	r ₅	1,012	2,219	46

TABELA C 4 - Redução de 20 vezes no volume inicial de urina através de concentração em 4 e 5 ciclos (eficiência determinada pela atividade amidásica em cada ciclo).

Experi- mento	R	Fração	v real (mM de p-nitroanili- na.miri ⁻¹) × 10 ⁵	v ideal (mM de p-nitroanili- na.miri ⁻¹) × 10 ⁵	η (%)
1	-	U	1,515	-	-
	0,0500	r ₁	4,356	3,697	100
	0,0415	r ₂	6,439	6,650	97
	0,0415	r ₃	9,564	12,906	74
	0,0415	r ₄	12,667	25,333	50
2	-	U	1,515	-	-
	0,0500	r ₁	3,788	3,850	100
	0,0415	r ₂	6,946	7,088	98
	0,0330	r ₃	9,375	11,793	79
	0,0330	r ₄	12,216	19,000	64
	0,0330	r ₅	14,230	29,645	48

TABELA C₅ - Influência da variação do volume inicial de urina para a concentração realizada na relação massa de gel/volume de urina fixa e igual a 0,010.

V (ml)	Fração	C real (mg/mol)	C ideal (mg/mol)	η (%)
250	U	0,132	-	-
	r ₁	0,147	0,149	99
	r ₂	0,163	0,168	97
	r ₃	0,173	0,183	94
	r ₄	0,193	0,208	93
	r ₅	0,200	0,228	89
500	U	0,176	-	-
	r ₁	0,200	0,201	100
	r ₂	0,212	0,217	98
	r ₃	0,227	0,233	97
	r ₄	0,238	0,249	95
	r ₅	0,247	0,269	92
1000	U	0,118	-	-
	r ₁	0,136	0,137	100
	r ₂	0,139	0,149	93
	r ₃	0,143	0,159	90
	r ₄	0,149	1,169	88
	r ₅	0,158	0,184	85

TABELA C 6 - Influência da variação do volume inicial de urina para a concentração realizada na relação massa de gel/volume de urina fixa e igual a 0,018.

V (ml)	Fração	C real (mg/mol)	C ideal (mg/mol)	η (%)
250	U	0,132	-	-
	r ₁	0,164	0,165	99
	r ₂	0,195	0,208	94
	r ₃	0,214	0,246	87
	r ₄	0,230	0,277	83
	r ₅	0,248	0,314	79
500	U	0,158	-	-
	r ₁	0,200	0,201	100
	r ₂	0,233	0,245	95
	r ₃	0,254	0,280	90
	r ₄	0,285	0,339	84
	r ₅	0,311	0,389	80
1000	U	0,118	-	-
	r ₁	0,142	0,153	93
	r ₂	0,166	0,184	90
	r ₃	0,171	0,202	85
	r ₄	0,182	1,226	80
	r ₅	0,199	0,253	78

TABELA C 7 - Influência da variação do volume inicial de urina para a concentração realizada na relação massa de gel/volume de urina fixa e igual a 0,025.

V (ml)	Fração	C real (mg/mol)	C ideal (mg/mol)	η (%)
250	U	0,176	-	-
	r ₁	0,252	0,250	100
	r ₂	0,281	0,314	89
	r ₃	0,327	0,289	84
	r ₄	0,374	0,468	80
	r ₅	0,411	0,587	70
500	U	0,158	-	-
	r ₁	0,211	0,220	96
	r ₂	0,245	0,278	88
	r ₃	0,264	0,311	80
	r ₄	0,318	0,412	77
	r ₅	0,343	0,490	70
1000	U	0,111	-	-
	r ₁	0,145	0,156	93
	r ₂	0,185	0,213	87
	r ₃	0,189	0,239	79
	r ₄	0,215	1,283	76
	r ₅	0,226	0,328	69

TABELA C₈ - Eficiências de separação para concentrações realizadas em diferentes relações massa de gel/ volume de urina.

R	Fração	C real (mg/mol)	C ideal (mg/mol)	η (%)
0,010	U	0,074	-	-
	r ₁	0,091	0,090	100
	r ₂	0,100	0,101	100
	r ₃	0,118	0,122	97
	r ₄	0,135	0,150	90
	r ₅	0,147	0,170	87
0,025	U	0,074	-	-
	r ₁	0,126	0,128	99
	r ₂	0,167	0,206	81
	r ₃	0,201	0,308	65
	r ₄	0,346	0,712	49
	r ₅	0,438	1,321	33
0,040	U	0,074	-	-
	r ₁	0,177	0,226	78
	r ₂	0,401	1,028	39
	r ₃	0,611	6,167	10

Apêndice D

DADOS REFERENTES À PURIFICAÇÃO DA CALICREINA URINARIA HUMANA E DETERMINAÇÃO DO SEU PESO MOLECULAR.

TABELA D₁ - Dados referentes à cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aprotinina.

Fração	A ₂₈₀	v x 10 ⁴ (μmol de p-nitro anilina . min ⁻¹)
1	0.012	
2	0.148	
3	0.219	
4	0.907	
5	3.21	0.437
6	4.63	
7	5.04	
8	5.21	
9	5.36	
10	5.36	0.439
11	5.44	
12	5.5	
13	5.44	
14	5.49	
15	5.49	
16	5.47	
17	5.45	
18	5.48	
19	5.51	
20	5.49	0.375
21	5.48	
22	5.44	
23	5.49	
24	5.53	
25	5.54	
26	5.53	
27	5.5	
28	5.55	
29	5.52	
30	5.5	0.437
31	5.55	
32	5.44	
33	5.46	
34	5.43	
35	5.46	
36	5.5	
37	5.54	
38	5.48	
39	5.48	
40	5.45	0.417

Fração	A ₂₈₀	v x 10 ⁴ (μmol de p-nitro anilina . min ⁻¹)
41	5.45	
42	5.52	
43	5.5	
44	5.52	
45	5.51	
46	5.56	
47	5.51	
48	5.53	
49	5.53	
50	5.53	0.354
51	5.45	
52	5.49	
53	5.47	
54	5.52	
55	5.77	
56	5.53	
57	5.49	
58	5.48	
59	5.5	
60	5.51	0.375
61	5.56	
62	5.59	
63	5.55	
64	5.6	
65	5.62	
66	5.6	
67	5.72	
68	5.66	
69	5.65	
70	5.54	0.292
71	5.4	
72	2.58	
73	0.188	
74	0.068	
75	0.042	
76	0.03	
77	0.024	
78	0.021	0.104
79	0.017	0.104
80	0.021	

TABELA D₁ - Dados referentes à cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-aptotina. (continuação)

Fração	A 280	$v \times 10^4$ (μmol de p-nitro anilina . min^{-1})
81	0.002	
82	0.012	
83	0.008	
84	0.007	
85	0.007	
86	0.006	
87	0.038	0.208
88	0.042	
89	0.069	
90	0.073	0.167
91	0.067	
92	0.052	
93	0.027	
94	0.016	
95	0.012	0.275
96	0.012	
97	0.013	0.646
98	0.014	0.896
99	0.014	1.271
100	0.014	2.104
101	0.014	2.313
102	0.014	5.417
103	0.022	9.167
104	0.033	16.25
105	0.051	22.92
106	0.074	29.58
107	0.09	29.58
108	0.098	31.25
109	0.097	22.92
110	0.072	13.54
111	0.053	11.04
112	0.037	6.458
113	0.025	3.75
114	0.021	2.917
115	0.017	2.167
116	0.014	1.542
117	0.011	2.208
118	0.011	1.646
119	0.01	1.396
120	0.009	1.292

Fração	A 280	$v \times 10^4$ (μmol de p-nitro anilina . min^{-1})
121	0.008	1.063
122	0.008	0.708
123	0.006	
124	0.006	
125	0.007	
126	0.006	
127	0.006	0.667
128	0.004	
129	0.004	
130	0.006	
131	0.004	
132	0.005	0.354
133	0.004	
134	0.003	
135	0.004	
136	0.003	0.188
137	0.003	0.188
138	0.002	
139	0.001	
140	0	
141	0	
142	0	
143	0	0.168
144	0.002	
145	0.004	
146	0.005	
147	0.004	
148	0.005	
149	0.005	0.168
150	0.006	0.168

TABELA D₂ - Dados referentes à cromatografia de afinidade em coluna de hidoxilapatita.

Fração	A ₂₈₀	ψ (μmol de p-nitro anilina . min ⁻¹ x 10 ⁻⁴)	Fração	A ₂₈₀	ψ (μmol de p-nitro anilina . min ⁻¹ x 10 ⁻⁴)
1	0.013	0.019	41	0.002	
2	0.013		* 42	0.001	0.023
3	0.013		43	0.002	
4	0.015		44	0.001	
5	0.015	0	45	0.001	
6	0.014		46	0.001	0.023
7	0.028		47	0.001	
8	0.085	0.447	48	0	
9	0.018	1.837	49	0.002	
10	0.008	0.53	50	0.001	
11	0.008		51	0	0
12	0.008		52	0.001	
13	0.01		53	0.001	
14	0.01		54	0	
15	0.009		55	0.001	
16	0.012	0.076	56	0.001	0
17	0.006		57	0.001	
18	0.004	0	58	0.003	
19	0.003		59	0.005	
20	0.003		60	0.007	
21	0.002		61	0.009	
22	0.001		62	0.009	0.046
23	0.001		63	0.007	
24	0		64	0.01	
25	0	0	65	0.007	
26	0		66	0.008	
27	0		67	0.007	0.023
28	0		68	0.007	
29	0.004		69	0.007	
30	0.004		70	0.007	0.023
31	0.003		71	0.007	
32	0.003		72	0.008	
33	0.003		73	0.007	0.046
34	0.003		74	0.008	
35	0.002		75	0.008	
36	0.003		76	0.008	2.085
37	0.002		77	0.008	3.208
38	0.002		78	0.008	1.054
39	0.002		79	0.009	14.09
40	0.003		80	0.009	4.698

* início da aplicação do gradiente.

TABELA D₂ - Dados referentes à cromatografia de afinidade em coluna de hidroxilapatita. (continuação)

Fração	A 280	v (μmol de p-nitro anilina . min^{-1} $\times 10^{-4}$)
81	0.008	0.687
82	0.008	5.042
83	0.011	0.779
84	0.008	2.223
85	0.008	3.713
86	0.008	1.306
87	0.007	0.9396
88	0.008	1.169
89	0.008	
90	0.008	0.1375
91	0.008	0.596
92	0.006	0.0688
93	0.006	0.481
94	0.006	0.917
95	0.006	0.481
96	0.006	0.504
97	0.006	
98	0.005	
99	0.005	
100	0.005	
101	0.005	0.069
102	0.005	0.16
103	0.0011	0.138
104	0.001	0.183
105	0	0.596
106	0.004	0.985
107	0.004	1.054
108	0.004	0.848
109	0.004	
110	0.005	
111	0.03	1.421
112	0.087	
113	0.015	
114	0.015	3.117
115	0.041	13.06
116	0.082	22
117	0.111	27.62
118	0.123	28.65
119	0.12	28.53
120	0.108	28.19

Fração	A 280	v (μmol de p-nitro anilina . min^{-1} $\times 10^{-4}$)
121	0.096	25.9
122	0.084	24.18
123	0.069	21.08
124	0.055	16.84
125	0.043	14.21
126	0.03	10.31
127	0.023	8.25
128	0.02	5.844
129	0.017	3.621
130	0.011	3.529
131	0.009	2.2
132	0.008	
133	0.006	
134	0.006	
135	0.003	
136	0.003	1.673
137	0.004	
138	0.008	0.848
139	0.001	
140	0.001	
141	0.001	0.412
142	0.004	
143	0.001	
144	0	0.183
145	0.002	
146	0	
147	0.002	0.206
148	0	
149	0.001	
150	0	0.046
151	0	
152	0.002	
153	0.003	0.115
154	0.001	
155	0	
156	0	0

TABELA D₃ - Estimacão do peso molecular aparente da calicreína urinária humana.

Amostra	R_f	PM	log PM
P ₁	0,2143	66.000	4,82
P ₂	0,3810	45.000	4,65
P ₃	0,5714	36.000	4,56
P ₄	0,7976	29.000	4,46
P ₅	0,9286	20.500	4,31
CAL	0,4048	47.000	4,69

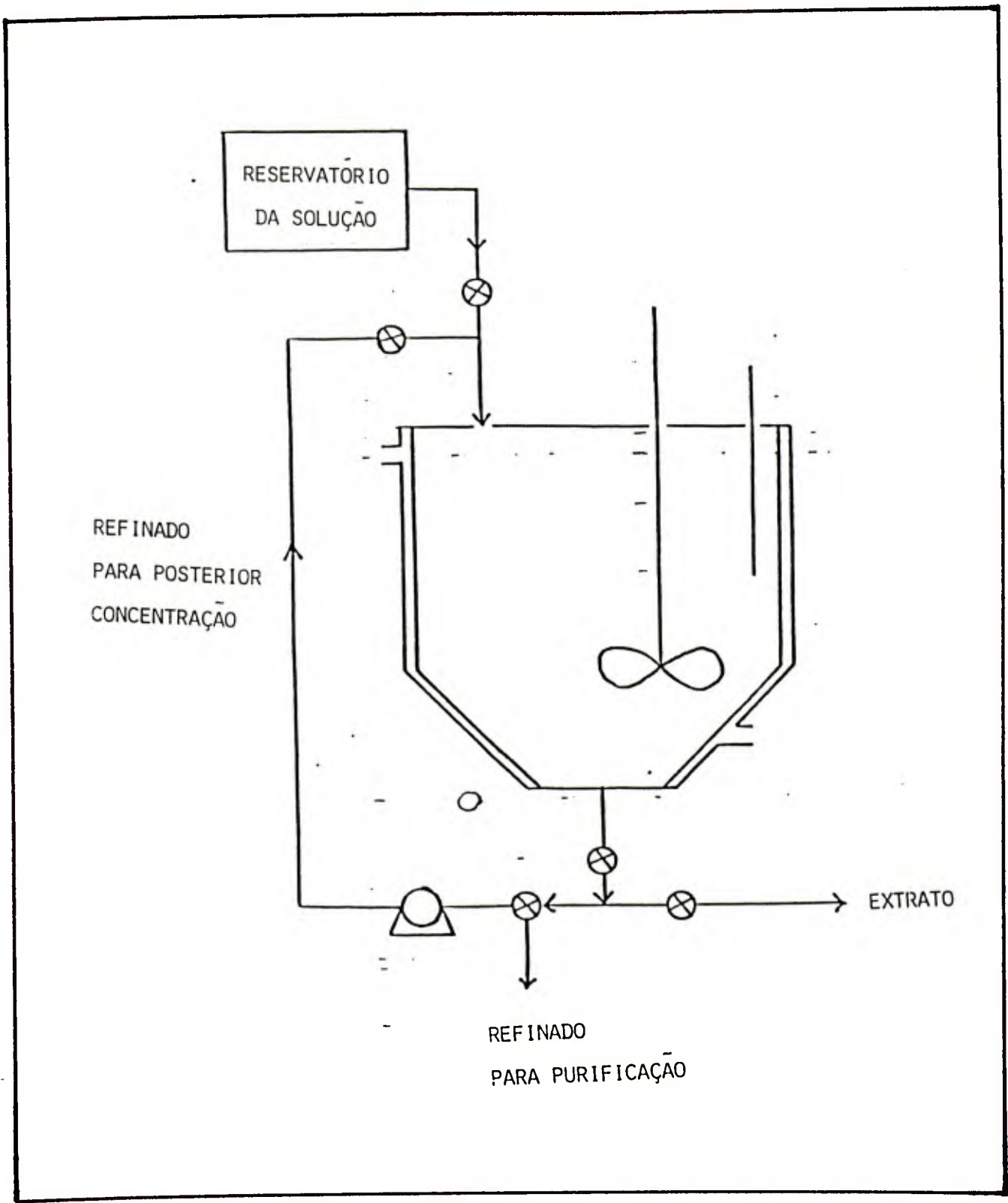


FIGURA D 4 - Diagrama esquemático do concentrador.

6. Referências Bibliográficas

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- DIEU, M.A. Etudes de solutions d'alcool polyvinylique. **J. Polymer Sci.**, v. 512, p.417-438, 1954.
- ELLIOT, D.F., LEWIS, G.P. Methionyl-lysyl-bradikinin, a new kinin from ox blood. In: ERDÖS, G.E., WILDE, A.F. **Handbook of Experimental Pharmacology**: XXV. Berlin: Springer-Verlag, 1970. 768 p., p.522-524.
- ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N., COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 95, p. 271-278, 1961.
- ERSPAMER, G.F. Assay methods in the kinin system. In: ERDÖS, G.E., WILDE, A.F. **Handbook of Experimental Pharmacology**: XXV. Berlin: Springer-Verlag, 1970. 768 p., p. 55-57.
- FIEDLER, F. Enzymology of glandular kallikreins. In: ERDÖS, G.E., WILDE, A.F. **Handbook of Experimental Pharmacology**: XXV. Berlin: Springer - Verlag, 1970. 768 p., p. 103-161.
- FREEMAN, P.I., ROWLINSON, J.S. Lower critical points in polymer solutions. **Polymer**, v.1, p. 20-26, 1960.

- FREITAS, R.F. de S. **Extraction with and phase behavior of temperature sensitive gels**. Minnesota: University of Minnesota, 1986. 166 p. Thesis (Doctor of Philosophy) - Faculty of the graduate school, University of Minnesota, 1986.
- FREITAS, R.F.S., CUSSLER, E.L. Temperature sensitive gels extraction solvents. **Chem. Eng. Sci.**, v. 42, n. 1, p. 97-103, 1987.
- FREITAS, R.F.S., CUSSLER, E.L. Temperature sensitive gels as size selective absorbants. **Separation Science and Technology**, v. 22, p. 911-919, 1987.
- FREY, E.K. Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit. **Arch. Klin. Chir.**, v. 142, p. 663-668, 1926.
- FREY, E.K., KRAUT, H. Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. **Arch. Pathol. Pharmacol.**, Heidelberg, v. 133, p. 1-56, 1928.
- FRITZ, H., FIEDLER, F. DIETL, T. et al On the relationships between porcine, pancreatic, submandibular and urinary kallikrein. In: HARBELAND, G.L., ROHEN, J.W., SUZUKI, T. **Kininogenases**, Schattauer, New York: Stuttgart, 1977, v. 4, p. 15-28.
- GEIGER, R., FRITZ, H. Human urinary kallikrein. In: LORAND, L. **Proteolytic Enzymes**; Part C. New York: Academic Press, 1981. Cap. 39, p. 466-492. (Methods in Enzymology, 80).

- GEIGER, R., STUCKSTEDTE, U., FÖRG-BREY, B. et al Human urinary kallikrein-biochemical and physiological aspects. In: FUIL, S., MORIYA, H., SUZUKI, T. **Kinins II. Biochemistry, Pathophysiology and clinical aspects.** New York: Plenum Press, 1979. p. 235-244, (Advances in Experimental Medicine and Biology, 120 A).
- GEIGER, R., STUCKSTEDTE, U., FRITZ, H. Isolation and characterization of human urinary kallikrein. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.** Berlin, v. 361, p. 1003-1016, 1980.
- GEIGER, R., MISKA, W. Human tissue kallikrein. In: SABATO, G. (Ed.). **Immunochem. Tech.:** Part M. Chemotaxis and Inflammation. San Diego: Academic Press, 1988. 819p. Cap. 10, p.102-115 (Methods in Enzymology, 163).
- GIUSTTI, E.P., SAMPAIO, C.A.M., MICHELACCI, Y.M. et al Horse urinary kallikrein, I. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v. 369, p. 369-387, 1988.
- GREENBAUM, L., OKAMOTO, H. T-cinin and T-kininogen. In: DI SABATO, Giovanni (Ed.) **Immunochemical Techniques;** Part M: Chemotaxis and Inflammation. San Diego: Academic Press, 1988. 819 p. Cap. 24, p. 272-282 (Methods in Enzymology, 163).
- HENRIQUES, O.B., ALLAN, L. Glass activated kallikrein from human plasma. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 21, p. 3163-3169, 1962.
- HIAL, V., DINIZ, C.R., MARES-GUIA, M. Purification and properties of a human urinary kallikrein (Kininogenase). **Biochemistry**, Washington, v.13, p. 4311-4318, 1974.

HJERTEN, S. Arch, Biochem. Biophys., Suppl. 1, 147, 1962 apud FREITAS, R.F. de S. **Extraction with and phase behavior of temperature sensitive gels.** Minnesota: University of Minnesota, 1986. 166 p. Thesis (Doctor of Philosophy) - Faculty of the graduate school, University of Minnesota, 1986.

HOLME, D.J., PECK, H. Proteins. In: _____. **Analytical Biochemistry.** London: Longman, 1983. cap. 11, p. 384-404.

ILAVSKY, M. Phase transition swollen gels. Effect of charge concentration on the collapse and mechanical behavior of polyacrylamide networks. **Macromolecules**, v. 15, p. 782-788, 1982.

KELLERMANN, J. LOTTSPREICH, F. GEIGER, R. et al Human urinary kallikrein: amino acid sequence and carbohydrate attachment sites. In: ABE, K., MORIYA, H. FUJII, S. In: **Kinins V.** Part A. New York: Plenum Press, 1987, p.519-525, (Advances in Experimental Medicine and Biology, 247 A).

KIZUKI, K. SHIMAMOTO, Y., IKEKITA, M. et al An inactive form of kallikrein in human urine. In: GREENBAUM, L.M., MARGOLIUS, H.S. **Kinins IV.** Part A. [S.l.]: Plenum Pub., 1986. p. 329-337.

LEVINSKY, N.G., OLE-MOIYOI, O., AUSTEN, K.F. et al Measurement of human urinary kallikrein and evidence for non-kallikrein urinary TAME esterases by direct immunoassay and by affinity chromatography. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 28, p. 2491-2495, 1979.

- LIMA, R. de S. **Calicreínas urinárias humanas (HUK) A, B e D: Isolamento, purificação e propriedades.** Belo Horizonte: UFMG, 1986. 101p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais, 1986.
- MALCOLM, G.N., ROWLINSON, J.S. The thermodynamic properties of aqueous solutions of polyethylene glycol, poly-propylene glycol and dioxane. **Trans. Faraday Soc.**, v. 53, p. 921-931, 1957.
- MARES-GUIA, M. Hidrophobic interactions in the trypsin active center. The sensitivity of the hidrophobic site to side chain modifications in the competitive inhibitors of the amidinium type. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 127, p. 317-322, 1968.
- MATSUDA, Y., MIYAZAKI, K., MORIYA, H. et al Studies on urinary kallikreins. 1. Purification and characterization of human urinary kallikreins. **J. Biochem., Tokyo**, v. 80, p. 671-679, 1976.
- MORICHI, S., SAKO, E., HASEGAWA, E. et al Large-scale purification and characterization of human urinary kallikrein. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 32, n. 3, p. 1152-1162, 1984.
- MORIYA, H., MATSUDA, Y., FUJIMOTO, Y. et al Some aspects of multiple components on the kallikrein. Human urinary kallikrein (HUK). In: HABERLAND, G.L., ROHEN, J.W. **Kininogenases - Kallikrein.** Stuttgart, New York: Schattauer, 1973.

- MORIYA, H., MATSUDA, Y., MIYAZAKI, C. et al Some aspects of urinary and renal kallikrein. In: HABERLAND, G.L., COHEN, J.W., SUZUKI, T. **Kininogenases**. Stuttgart, New York: Schattauer, 1977, v. 4, p. 225-228.
- MORIYA, H., PIERCE, J.V., WEBSTER, M.E. Purification and some properties of three kallikreins. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, New York, v. 104, p. 172-185, 1963.
- MULLER-ESTERL, W., RAUTH, G., LOTTSPREICH, F. et al Limited proteolysis of human low-molecular-mass kininogen by tissue kallikrein. **Eur. J. Biochem.**, v. 149, p. 15-22, 1985.
- MULLER-ESTERL, W., SADAOKI, I., NAKANISCH, S. Kininogenases Revised. **TIBS**, v. 11, p. 336-339, 1986.
- MURTHY, K.K., CARRETERO, O.A., SCICLI, G. Purification and characterization of canine urinary kallikrein. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 244, n. 2, p. 563-571, 1986.
- MUSTAD, K., PIERCE, J.V. Purification of rat urinary kallikrein and their specific antibody. **Biochemistry**, Washington, v. 13, p. 2312-2319, 1974.
- MUSTAD, K., PIERCE, J.V., WAAJE, K. Synthesis of kallikreins by rat kidney slices. **Br. J. Pharmacol.**, London, v. 53, p. 229-234, 1975.
- OKAMOTO, H. & GREENBAUM, L.M. Isolation and structure of T-kinin. **Biochem. Biophys. res. commun.**, v. 112, n. 2, p. 201-208, 1983.

- OLE-MOIYOI, O., AUSTEN, K.F., SPRAGG, J. Kinin generating and esterolytic activity of purified human urinary kallikrein (urokallikrein). **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 26, p. 1893-1900, 1977.
- OLE-MOIYOI, O., SPRAGG, J., AUSTEN, K.F. Structural studies of human urinary kallikrein (urokallikrein). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 3121-3125, 1979.
- OLIVEIRA, E.D., FREITAS, R.F.S. Salt effect on the phase behavior of cross-linked poly (N-isopropylacrylamide) gel. **Journal of Polymer Science**. submetido à publicação, 1990.
- OZA, N.B., RYAN, J.W. A simple high-yield procedure for isolation of human urinary kallikrein. **Biochem. J.**, Colchester, v. 171, p. 285-288, 1978.
- PAIVA, L. J. **Concentração e purificação de caliceína urinária humana. Uso do gel termosensível**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia da U.F.M.G., 1988. 104 p. (Relatório de Iniciação Científica).
- PORCELLI, G., MARINI-BETTOLO, G.B. CROXATO, H.R. et al Purification and chemical studies on human urinary kallikrein. **Ital. J. Biochem. (Engl. Ed.)**, Rome, v. 23, p. 44-45, 1974 a.
- RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S. Hidrogels for medical and related applications. **ACS Symposium Series**, Washington, n. 31, 1976.

REGOLI, D. BARABÉ, J. Kinin receptors. In: DI SABATÒ, Giovanni (Ed.)

Immunochemical Techniques; PartM: Chemotaxis and Inflammation.
San Diego: Academic Press, 1988. 819 p. cap. 19, p. 210-230. (Methods
in Enzymology, 163).

ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W.T., ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive
and smooth muscle stimulatory factor released by snake venoms and by
trypsin. **Ame. J. Physiol.**, Bethesda, v. 156, p. 261-273, 1949.

ROEPKE, D.C., GOYAL, S.M., KELLEHER, C.J. et al Use of temperature-sensitive
gel for concentration of influenza virus from infected allantoic
fluids. **Journal of Virol. Met.**, v. 15, p. 25-31, 1987.

SCHACHTER, M. Kallikreins (Kininogenases) - A group of serine proteases
with bioregulatory actions. **Pharmacol. Rev.**, Baltimore, v. 31, p.
1-17, 1980.

SCHACHTER, M., THAIN, E.M. Chemical and pharmacological properties of the
potent, slow contracting substance (kinin) in vesp venon. **Br. J.
Pharmacol.**, London, v. 9, p. 353-359, 1954.

SHIMAMOTO, K., CHAO, J., MARGOLIUS, H.S. The radioimmunoassay of human
urinary kallikrein and comparisons with kallikrein activity measure-
ments. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.**, v. 51,
n. 4, p.840-848, 1980.

SILBERG, A. Hidrogels for medical and related applications. **ACS Sympo-
sium Series**, Washington, n. 31, 1976.

- SPRAGG, J., AUSTEN, K.F. Preparation of human kininogen. Enzymatic digestion and modification. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 23, p. 781-791, 1974.
- TAKADA, Y., SKIDGEL, R.A., ERDÖS, E.G. Purification of human urinary prokallikrein. **Biochem. J.**, Great Britain, v. 232, p. 851-858, 1985.
- TANAKA, T. et al Phase transition in ionic gels. **Physical Review Letters**, v. 45, p. 1636-1639, 1980.
- TANAKA, T., NISHIO, I., SUN, S.T. et al Science, 218, 467, 1962 apud FREITAS, R.F. de S. **Extraction with and phase behavior of temperature sensitive gels**. Minnesota: University of Minnesota, 1986. 166 p. Thesis (Doctor of Philosophy) - Faculty of the graduate school, University of Minnesota, 1986.
- TANAKA, T. Gels. **Scientific American**, v. 1, p. 124-128, 1981.
- THOMSON, R.A.M. Chemistry and technology of water-soluble polymers, (C.A. Finch Ed), Plenum Press, New York, 1983 apud FREIRAS, R.F. de S. **Extraction with and phase behavior of temperature sensitive gels**. Minnesota: University of Minnesota, 1986. 166p. Thesis (Doctor of Philosophy)-Faculty of the graduate school, University of Minnesota, 1986.
- TSCHESCHE, H., MAIR, G., GODEK, G. et al The primary structure of porcine glandular kallikrein. In: FUJII, S.; MORIYA, H.; SUZUKI, T. **Kinins II**; Biochemistry, Pathophysiology, and Clinical aspects, New York: Plenum Press, 1979. p. 245-260, (Adv. in Exp. Med. and Biol., 120 A).

TUNON, P., JOHANSSON, K.E. Yet another improved silver staining method for the detection of proteins in page. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 9, p. 171-179, 1984.

UCHIDA, K., NIINOBE, M., KATO, H. et al Purification and properties of rat stomach kallikrein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 614, p. 501-510, 1980.

WEBER, K., OSBORN, M. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. In: HIRS, C.H.W., TIMASHEFF, S.N. **Enzyme structure**; Part C. New York: Academic Press, 1972. cap. 1, p. 3-27. (Methods in Enzymology, XXVI).

WERLE, E., GÖTZE, W., KEPPLER, A. Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue Darmkontrahierende Substanz. **Biochem. Z.**, Heidelberg, v. 289, p. 217-237, 1937.