



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE
NÍVEL MESTRADO

**IMOBILIZAÇÃO DE HEPARINA EM MEMBRANAS DE ÓXIDO DE
ALUMÍNIO ANÓDICO REVESTIDAS COM POLIANILINA COMO MATRIZ
DE AFINIDADE PARA PURIFICAÇÃO DE ANTITROMBINA**

RENATA VIEIRA

Recife

2013

RENATA VIEIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE HEPARINA EM MEMBRANAS DE ÓXIDO DE ALUMÍNIO ANÓDICO REVESTIDAS
COM POLIANILINA COMO MATRIZ DE AFINIDADE PARA PURIFICAÇÃO DE ANTITROMBINA**

Dissertação apresentada ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Biotecnologia

Linha de Pesquisa: Biomateriais

Orientador: Prof^o Dr Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Recife, 2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

V657i Vieira, Renata

Imobilização de heparina em membranas de óxido de alumínio anódico revestidas com polianilina como matriz de afinidade para purificação de antitrombina / Anderson José Paulo. – Recife: O Autor, 2013.

44. f. : il., fig.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2013.

Inclui bibliografia

1. Anticoagulantes (Medicina) 2. Heparina I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orientador) II. Título.

612.115

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-208

FOLHA DE APROVAÇÃO

Renata Vieira

Imobilização de heparina em membranas de óxido de alumínio anódico revestidas com polianilina como matriz de afinidade para purificação de antitrombina

Dissertação apresentada ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

Orientador

Prof^o Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior
Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório De Imunopatologia Keizo Asami

Examinador

Dr. Gustavo Alves do Nascimento
Laboratório De Imunopatologia Keizo Asami

Examinador

Dr. Roberto Afonso da Silva
Laboratório De Imunopatologia Keizo Asami

Recife, 26 de fevereiro de 2013

Dedido esse trabalho...

... ao meu querido tio Jorge, ao homem maravilhoso que sempre foi.

Nunca serás esquecido. Saudades eternas. Te amo.

*... à minha família, principalmente meus pais,
pelo incentivo, carinho, amor e paciência;*

... ao meu amor, Felipe, pelo amor, companherismo e apoio.

Agradecimentos

Minha eterna gratidão ao Prof. Luiz Carvalho pela maravilhosa oportunidade de trabalhar sob sua orientação. Agradeço a sua absoluta confiança, as idéias amadurecidas e o total apoio para o desenvolvimento deste projeto. O exemplo de respeito e igualdade para com seus alunos, foi sem dúvida, um dos maiores aprendizados durante toda esta trajetória.

À Aurenice Dutra por ter sido meus braços direito e esquerdo, e mais do que isso, por ter sido amiga e companheira, por ter me encorajado as vezes em que desanimei, por ter acreditado neste projeto e ter me feito acreditar também. À você, minha amiga “retumbante”, muito obrigada por tudo.

À Paula Vasconcelos pela grande contribuição científica e emocional, por todos seus conselhos e tão agradáveis conversas que sem sombra de dúvida foram imprescindíveis nesta trajetória.

À Taciano França que deu o seu próprio sangue ao este trabalho sem hesitar e com a maior boa vontade e disposição.

À Ricardo Souza e Givanildo Oliveira, muito obrigada por suas idéias e contribuições científicas e por serem sempre acessíveis quando precisei.

Ao IMOBIO, um grupo maravilhoso que tive o prazer de conhecer e poder trocar informações precisosas para o desenvolvimento deste projeto, além de descobrir grandes pessoas e amizades verdadeiras. Muito obrigada a Rosemery Moura, Gabriela Ayres, Luiza Rayanna, Mariana Cabreira, Lúcia Patrícia, Jackeline Maciel, Matheus Figueira, Raquel Varela, Thiago Veras, Marília Sales, Sinara Almeida.

À Camila Galvão e Larissa Barros pela compainha e amizade. Em vocês pude confiar e compartilhamos momentos difíceis e felizes, nos apoiamos umas na outras e isso me ajudou muito a continuar.

Aos amigos queridos que mesmo distantes, sempre continuaremos unidos e juntos, muito obrigada a Rafael Lira, Kátia Medeiros, Carol Martins, Dany Lídia, Juliana Souza, Natália Tavares, Jéssyca

Campos, Melissa Papaléo, Odinson Brandão, Danielle Isis, Millena Oliveira, Marcela Lubambo, Andréa Giraldez, Zaine Borgonovo.

Aos amigos do Laboratório Fleury pela amizade e companherismo.

Aos meus queridos amigos, primos, sobrinhas, tias e tios de Petrolina por todo amor e amizade e por me aceitarem como parte de suas famílias.

Ao meu querido primo, Gustavo, e minha amiga Wal pela amizade e companherismo e pelos grandes momentos de descontração.

À Dra. Emília Santos, minha primeira, inesquecível e incrível orientadora, que me ensinou a beleza de ser pesquisadora, que me mostrou como é maravilhoso aprender hemostasia e que sempre acreditou em mim.

Aos amigos e profissionais da UNILAB-HEMOPE pela contribuição na busca de resultados.

Aos professores, técnicos de laboratório e funcionários do Lika e colegas de mestrado e doutorado do curso de Biologia Aplicada À Saúde.

À querida secretária do nosso curso, Eliete, por toda a ajuda e amizade que teve para comigo durante todo este período.

À banca examinadora desta dissertação, pela gentileza de avaliar este trabalho e contribuir de forma tão importante para sua melhoria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Deus, por me dar saúde e forças para continuar, mesmo quando as dificuldades pareciam infundáveis... E, por colocar em meu caminho pessoas tão especiais e indispensáveis...

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Resumo

Antitrombina (AT) é uma serpina que está envolvida na regulação da coagulação sanguínea através da inibição de enzimas pró-coagulativas. A heparina é um ativador alostérico da AT que se liga a ela e causa uma mudança conformacional no sítio reativo, o que faz aumentar sua ação anticoagulante. Sendo assim, a fim de obter AT purificada através de separação por afinidade, este trabalho propôs imobilizar heparina utilizando a sua propriedade de se ligar à AT. O suporte para imobilização foram as membranas nanoporosas de óxido de alumínio anódico (AAO), adquiridas da Whatman[®]. Estas foram tratadas com solução de permanganato de potássio a 0,1 M, 50 °C por 12 horas e revestidas com polianilina (PANI) a 0,5 M por 2 horas. Posteriormente, uma solução de heparina de 3 mg/mL foi imobilizada ao suporte por 12 horas a 25 °C e então foi determinada a quantidade de heparina fixada à membrana. O suporte foi incubado com plasma humano por 1 hora à 4 °C. A remoção das proteínas ligadas ao suporte foi realizada mediante aumento da força iônica, utilizando soluções de NaCl 0,5 M, 1,0 M, 1,5 M e 2,0 M tipo stepwise. Em seguida, os eluatos foram submetidos à eletroforese (SDS-PAGE), segundo metodologia de Laemmli (1970). O percentual da quantidade de heparina imobilizada foi 53,04 % do total ofertado. O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e a dosagem da atividade da antitrombina constataram a presença de antitrombina nos eluatos, a qual começa a dissociar da membrana após concentração de sal de 1,5 M. A presença de AT complexada à membrana foi confirmado pela eletroforese. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que este novo modelo de imobilização de heparina pode ser aplicado nas áreas de purificação de proteínas e biomateriais.

Palavras-chave: heparina, antitrombina, imobilização de heparina, membranas de alumínio anódico, polianilina.

Abstract

Antithrombin (AT) is a serpin that is involved in the regulation of blood coagulation through the inhibition of blood clotting enzymes. Heparin is an allosteric AT activator that binds to it and causes a conformational change in the reactive center loop that increases its anticoagulant action. Therefore, in order to obtain AT purified by affinity separation, the aim of this study was immobilize heparin using its property of binding to AT. Nanoporous anodic aluminum oxide (AAO) composites purchased from Whatman[®] were used as support immobilization. These membranes were treated with a solution of potassium permanganate at 0, 1 M, 50 °C for 12 hours and coated with polyaniline (PANI) to 0.5 M for 2 hours. Subsequently, a heparin solution of 1mg/mL was immobilized to the membrane support for 12 hours at 25 ° C, and the amount of heparin attached to the membrane was determined. The support was incubated with human plasma for 1 hour at 4 ° C. The proteins attached to the support were removed by increasing the ionic strength, using solutions of NaCl 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M and 2.0 M stepwise. Then, the eluates were subjected to electrophoresis (SDS-PAGE) according to Laemmli method (1970).

The percentage of immobilized heparin was 53.04% of the total offered. The activated partial thromboplastin time (APTT) and Determination of antithrombin activity revealed the presence of antithrombin in the samples. It starts to dissociate from the membrane after salt concentration of 1.5 M. The presence of plamatic proteins complexed to membrane was confirmed by electrophoresis. The results of this study suggest that this new model of heparin immobilization could be applied in the areas of protein purification and biomaterials.

Keywords: heparin, antithrombin, heparin immobilization, anodic oxide alumminium composites, polyaniline.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Conformação helicoidal da heparina de uma sequência de 10 monossacarídeos com grupos sulfatos (amarelo), átomos de oxigênio (vermelho), átomos de nitrogênio (azul) e átomos de hidrogênio (azul-claro) (CAPILA & LINHARDT, 2002). 15
- Figura 2** Representação da estrutura molecular do hexassacarídeo de heparina, contendo as unidades de ácido idurônico e glicurônico e glicosamina (adaptado de NADER et al, 2001). 16
- Figura 3** (a) Localização dos quatro potenciais locais de glicosilação dentro da estrutura terciária de um monômero de antitrombina. Ilustração obtida a partir de dados do *protein data bank*. Nesta estrutura única Asn 155 é glicosilada por meio da adição de um resíduo de N-acetilglucosamina. (b) Local de ligação da AT e a protease, entre Arg 393 – Ser 394, está localizado em um *loop* (RCL) exposto na superfície da molécula (<http://www.answers.com/topic/antithrombin>). 17
- Figura 4** Sequência de aminoácidos do loop local reactivo da antitrombina humana. O RCL compreende números de sequência de aminoácidos 377-400 ou P1 a P17 de aminoácidos e P1' a P7'. O local de ligação é indicado por uma seta (<http://www.answers.com/topic/antithrombin>). 18
- Figura 5** Mecanismo de ação das serpinas. A serpina e a enzima inicialmente formam um complexo denominado complexo de Michaelis. Em seguida, a clivagem da ligação peptídica na alça reativa forma em um composto intermediário acil-enzima, que pode resultar em transposição e inserção da alça da serpina na enzima, bloqueando-a permanentemente ou em certas circunstâncias, na liberação da serpina clivada e da enzima livre (adaptado de OLSON et al, 2010). 18
- Figura 6** Efeito anti-inflamatório da AT ao ligar ao proteoglicano no endotélio resultando na síntese prostaciclina e inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios (WIEDERMANN, 2006). 19
- Figura 7** a) Mecanismo de indução heparina – AT baseado em mudanças conformacionais. Estrutura cristalográfica do complexo de Michaelis entre pentassacarídeo-AT ativada e fator Xa. O domínio da protease do fator Xa em magenta, e um segundo domínio do fator Xa em púrpura, o sítio reativo RCL está em amarelo, e os resíduos com P4 - P1 de cor vermelha. (b) Mecanismo de *ponte*. Representação do complexo de Michaelis AT-trombina. O sítio reativo RCL está em amarelo com partes verdes para P4 (Ile 390) e P1 (Arg 393). A Trombina (ciano semitransparente) está orientada à frente da AT e do RCL

e entra no sítio ativo da trombina com P4-P1 alinhadas ao longo do eixo-z (no plano) (adaptado de JOHNSON et al, 2006b).	20
Figura 8 Interações de cadeia lateral são ilustrados de forma esquemática, com pontes salinas indicadas por linhas sólidas e ligações de hidrogénio indicadas por linhas tracejadas. Unidades de monossacarídeos individuais rotuladas de DEFGH (JOHNSON et al, 2006b; OLSON et al, 2010).....	20
Figura 9 Figura representativa da reação de ativação da biomolécula através da ligação do seu grupo carboxílico com a carbodiimida (EDAC) e o N-hidroxi-succinamida (Sulfo-NHS) (adaptada de http://www.piercenet.com).....	23
Figura 10 Vista superior da membrana AAO 0,2 μm (Anodisc - Whatman [®]) (à esquerda) e uma vista de corte transversal (à direita). Espessura da membrana aproximadamente 60 μm . Note-se a densidade de poros extremamente elevado, o que torna possível alta taxa de fluxo (http://www.2spi.com/catalog/spec_prep/filter2.shtml).	25
Figura 11 Estrutura geral da polianilina (COELHO et al, 2001).....	27
Figura 12 Estruturas da polianilina nos três principais estágios de oxidação (adaptado de MACDIARMID & EPSTEIN, 1995).	27
Figura 13 Esquema ilustrando o processo de dopagem da PANI (adaptado de MACDIARMID & EPSTEIN, 1995).....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAO	Óxido de Alumínio Anódico
AT	Antitrombina
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
EB	Base de esmeraldina
EDAC	1-etil-3-(3-Dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreida
ES	Sal de esmeraldina
FIIa	Fator II ativado (trombina)
FXa	Fator X ativado
GAG	Glicosaminoglicano
GlcA	Ácido Glicurônico
GlcNAc	N-Acetil Glicosamina
HBPM	Heparina de baixo peso molecular
HNF	Heparina não-fracionada
HNO ₃	Ácido Nítrico
HRP	Peroxidase
IdoA	Ácido idurônico 2-sulfatado
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
NHS	N-hidroxissuccinimida
PANI	Polianilina
PBS	Tampão Fosfato Salina
RSL/ RCL	Loop centro reativo
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TP	Tempo de recalcificação
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	15
1.1. Heparina	15
1.2. Antitrombina	16
1.3. Aspectos moleculares da modulação da heparina sobre a antitrombina	19
1.4. Imobilização de biomoléculas	21
1.4.1. Imobilização de heparina.....	22
1.5. Membranas de óxido alumínio anódico	24
1.6. Polianilina.....	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Geral	30
3.2. Específicos.....	30
4. REFERÊNCIAS	31
ARTIGO	36
Abstract.....	36
1. INTRODUCTION	37
2. MATERIALS AND METHODS	38
2.1. Anodic Aluminum Oxide (AAO) membrane coating with polyaniline (PANI).....	38
2.2. Heparin activation and immobilization onto the AAO–PANI.....	38
2.3. Plasmatic antithrombin purification	39
2.4. In vitro anticoagulant assay	39
2.5. Determination of Antithrombin Activity and albumin concentration	39
2.6. Electrophoresis	40
3. RESULTS AND DISCUSSION	40
4. CONCLUSIONS	43
5. ACKNOWLEDGMENTS	43
6. REFERENCES	43

1. INTRODUÇÃO

Inibidores de proteases, compõem a família das Serpinas e atuam na regulação de proteases em diversos processos fisiológicos. Apesar do nome “*Serpin*” ser uma abreviação de *Serine Proteinase Inhibitor*, é também estabelecido que estes inibidores agem não somente sobre a classe das serino-proteases, mas também regulam a classe das cistino-proteases (OLSON et al, 2010). Dentre os processos biológicos em que as serpinas participam incluem-se: hemostasia da coagulação, fibrinólise, apoptose, angiogênese e processos anti-inflamatórios (HUNTINGTON *et al*, 2000).

Um dos mais conhecidos e estudados membros das serpinas é a antitrombina (AT), uma serpina que regula proteases da cascata da coagulação sanguínea e tem seu poder inibitório potencializado na presença de seus cofatores, heparina ou heparan sulfato (FRANCO, 2004; OLSON *et al*, 2010; RODGERS, 2009).

A heparina é um dos mais estudados glicosaminoglicanos (GAG) devido a suas inúmeras propriedades biológicas, associadas com sua interação com diversas proteínas (CAPILA & LINHARDT, 2002). Devido à presença de grupos reativos funcionais em sua cadeia, a heparina se fixa facilmente à matriz e por isso tem sido alvo de pesquisas na área de imobilização de biomoléculas (MURUGESAN *et al*, 2008).

Muitas investigações estão sendo desenvolvidas para o estudo de matrizes a fim de alcançar uma matriz com características de alto-desempenho para imobilização de biomoléculas. Dentro desse contexto, o uso de materiais nano estruturados, como as membranas de óxido alumínio anódico (AAO) como matriz para imobilização de biomoléculas tem sido alvo de pesquisadores (SHEINTUCH & SMAGINA, 2007).

Inicialmente, as membranas de AAO podem ser utilizadas como matriz, porém, para isso elas necessitam de grupamentos funcionais capazes de se ligar a molécula de interesse. Portanto, se faz necessário o revestimento da membrana com polianilina para funcionalização do suporte, etapa esta requerida para se obter uma imobilização por ligação covalente entre a membrana e a heparina (MELLO & KUBOTA, 2002; COELHO *et al*, 2001).

Diante disso, a proposta desta pesquisa consiste em revestir as membranas de AAO com polianilina e imobilizar heparina com vistas à purificação de antitrombina advindo do plasma humano por separação por afinidade.

2. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1.1. Heparina

Foi descoberta em 1916 sendo utilizada clinicamente há mais de 50 anos como uma droga anticoagulante baseado na sua habilidade de acelerar a velocidade na qual a antitrombina inibe as serino-proteases da cascata da coagulação (CAPILA & LINHARDT, 2002).

A potencialização da atividade anticoagulante da antitrombina está relacionada com o fato de que este inibidor circula no plasma de forma inativa e requer de uma ligação de um glicosaminoglicano como cofator fisiológico (heparan sulfato) ou terapêutico (heparina) para agir em suas proteases-alvo. Heparina e o estruturadamente relacionado, heparan sulfato, são complexos polímeros lineares compostos de uma mistura de cadeias de diferentes comprimentos, tendo sequências variáveis (CAPILA & LINHARDT, 2002).

A heparina tem um peso molecular variando de 5 kDa a 50 kDa, com peso médio de 15 kDa. Sua conformação compreende em uma estrutura molecular primariamente helicoidal (**Figura 1**), linear, sem ramificações, altamente negativa por ser um polissacarídeo polissulfatado, composto de unidades contendo ácido idurônico 2-sulfatado (IdoA), glicosamina 2,6-dissulfatada (GlcN) e ácido glicurônico não sulfatado (GlcA) (**Figura 2**) unidas por ligações glicosídicas 1→4 (CAPILA & LINHARDT, 2002; MURUGESAN et al, 2008).

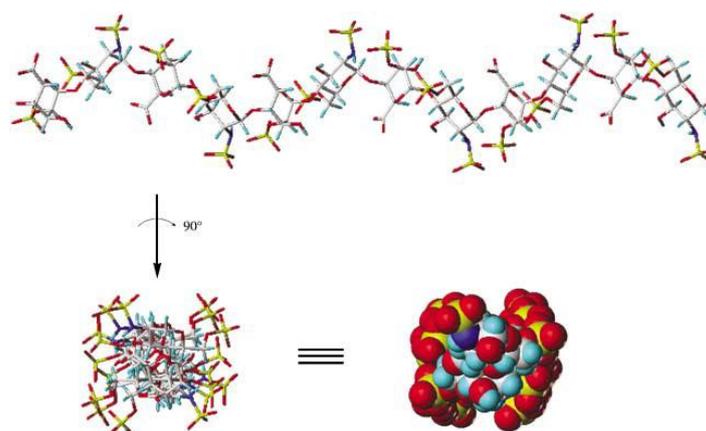


Figura 1 Conformação helicoidal da heparina de uma sequência de 10 monossacarídeos com grupos sulfatos (amarelo), átomos de oxigênio (vermelho), átomos de nitrogênio (azul) e átomos de hidrogênio (azul-claro) (CAPILA & LINHARDT, 2002).

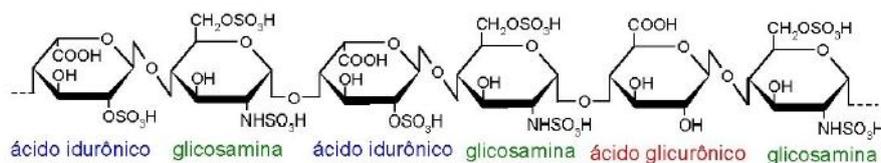


Figura 2 Representação da estrutura molecular do hexassacarídeo de heparina, contendo as unidades de ácido idurônico e glicurônico e glicosamina (adaptado de NADER et al, 2001).

O processo no qual a heparina potencializa o efeito inibitório da AT é dependente do tamanho da cadeia polissacarídica da heparina: uma cadeia de 18 unidades monossacarídicas (~5,4 kDa) é a menor estrutura apta para induzir inibição da trombina.

Para inibição do fator Xa e IXa, não dependente do comprimento da cadeia de heparina, pequenas cadeias (pentassacarídeos de ~1,7 kDa) já são biologicamente ativas sob esta inibição (JOHNSON et al, 2006b). Desse modo, a heparina de baixo peso molecular (HBPM) e pentassacáridos sintéticos, representam uma sequência mínima para a ligação de alta afinidade, e são capazes de estimular a inibição dos fatores IXa e Xa por duas ordens de grandeza, mas acelera a inibição da trombina (FIIa) somente em 2 vezes (OLSON et al, 2010).

No caso das heparinas não fracionadas (HNF), também utilizadas terapêuticamente, são eficazes para a inibição da trombina. Esta, por sua vez, é responsável não só pela hidrólise do fibrinogênio, mas também atua na ativação de outros fatores da coagulação como os cofatores V e VIII e o fator XIII. Desta forma, a inibição da trombina inativa também a ativação destes cofatores que são essenciais para a formação dos complexos envolvidos na cascata. Existe então, uma diferença no aspecto farmacológico entre a HNF e as HBPM, sendo HNF um agente significativamente mais anticoagulante e por isso o uso clínico necessita de maior atenção e cuidado médico (JOHNSON et al, 2006a; JOHNSON et al, 2006b)

1.2. Antitrombina

Antitrombina é uma glicoproteína sintetizada no fígado e encontra-se em circulação no plasma sob duas isoformas, denominadas α e β , que não diferem entre si nos seus efeitos de inibição à trombina, mas diferem na afinidade pela heparina. A isoforma α , predominante (85 a 95%) na circulação, a qual possui glicosilação nas suas quatro moléculas de asparagina (Asn 96, Asn 135, Asn 155 e Asn 192) e peso molecular de 58kDa, e a isoforma β (5 a 15%), que possui afinidade aumentada de 3 a 10 vezes à heparina por sua falta de glicosilação na Asn 135 e possui

peso molecular de 56kDa (**Figura 3a**) (WIEDERMANN, 2006; PATNAIK & MOLL, 2008; KARLSSON & WINGE, 2004; RODGERS, 2009).

A sua estrutura composta por uma única cadeia polipeptídica contém 432 aminoácidos e 3 pontes dissulfetos intramoleculares e sua síntese é codificada por um gene no cromossomo 1q23-q25, contendo 7 éxons e 6 íntrons, e 13 477 pares de bases (WIEDERMANN, 2006).

A molécula da AT possui uma região central que consiste em 3 folhas- β (A, B e C) e α -hélices (hA-hI) e ainda uma alça reativa em sua superfície. Esta região da alça é denominada de “*reactive site loop (RSL)* ou *reactive center loop (RCL)*” e apresenta uma ligação peptídica entre os resíduos P1 e P1’ (**Figura 3b, Figura 4**) usando a convenção de Schechter e Berger (SCHECHTER & BERGER, 1967). Este local, por sua vez, é onde a AT liga-se à protease-alvo que de acordo com o mecanismo de ação das serpinas: o resíduo Arg 393 (P1), liga-se covalentemente a serina ou cisteína da protease resultando na formação do complexo intermediário acila, que irá aumentar sua susceptibilidade à proteólise por parte da enzima, facilitando sua depuração () (OLSON et al, 2010).

Em sua forma latente inativa, a AT circula com seu loop reativo não exposto. Uma vez ligado à heparina, a AT sofre uma mudança conformacional e se transforma em uma forma ativada permitindo a exposição do sítio reativo e assim aumentando sua reatividade em até 1000 vezes (ASMAL et al, 2012).

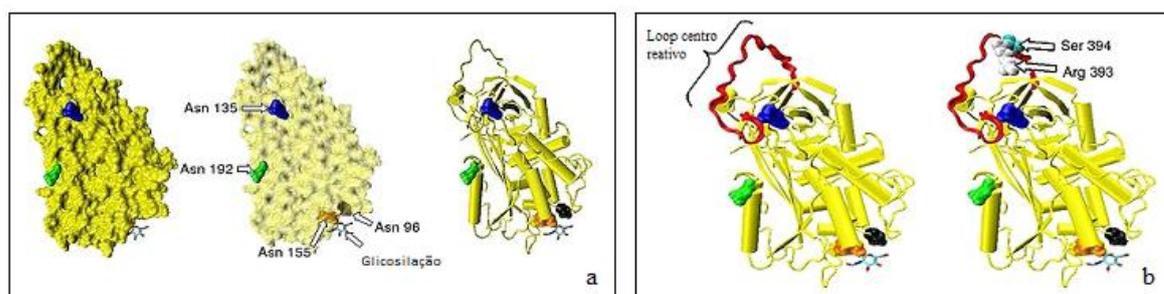


Figura 3 (a) Localização dos quatro potenciais locais de glicosilação dentro da estrutura terciária de um monómero de antitrombina. Ilustração obtida a partir de dados do *protein data bank*. Nesta estrutura única Asn 155 é glicosilada por meio da adição de um resíduo de N-acetilglucosamina. (b) Local de ligação da AT e a protease, entre Arg 393 – Ser 394, está localizado em um *loop* (RCL) exposto na superfície da molécula (<http://www.answers.com/topic/antithrombin>).



Figura 4 Sequência de aminoácidos do loop local reactivo da antitrombina humana. O RCL compreende números de sequência de aminoácidos 377-400 ou P1 a P17 de aminoácidos e P1' a P7'. O local de ligação é indicado por uma seta (<http://www.answers.com/topic/antithrombin>).

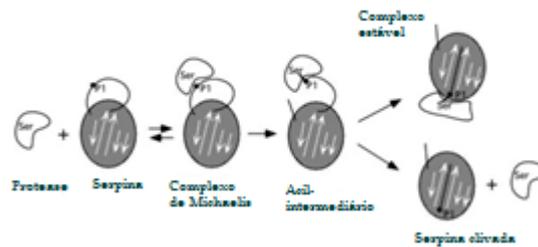


Figura 5 Mecanismo de ação das serpinas. A serpina e a enzima inicialmente formam um complexo denominado complexo de Michaelis. Em seguida, a clivagem da ligação peptídica na alça reativa forma em um composto intermediário acil-enzima, que pode resultar em transposição e inserção da alça da serpina na enzima, bloqueando-a permanentemente ou em certas circunstâncias, na liberação da serpina clivada e da enzima livre (adaptado de OLSON et al, 2010).

Independente da sua propriedade anticoagulante, a AT tem sido relatada com um importante efeito anti-inflamatório que ocorre na interação com o endotélio. A AT se liga aos glicosaminoglicanos específicos (na ausência de heparina) na superfície das células endoteliais, induzindo a síntese de prostaciclina. Esta, por sua vez, além de promover a vasodilatação e o relaxamento muscular, inibe também, a agregação plaquetária, expressão de moléculas de adesão e a ligação dos neutrófilos às células endoteliais e atenua a liberação de mediadores pró-inflamatórios como as interleucinas 6 e 8, e TNF (Fator de necrose tumoral), provocando um efeito anti-inflamatório () (SOUTER et al, 2001; WIEDERMANN, 2006; PATNAIK & MOLL, 2008, ASMAL et al, 2012). Além disso, estudos recentes evidenciam que a AT também possui poder inibitório em crescimento bacteriano (WIEDERMANN & DJANANI, 2010).

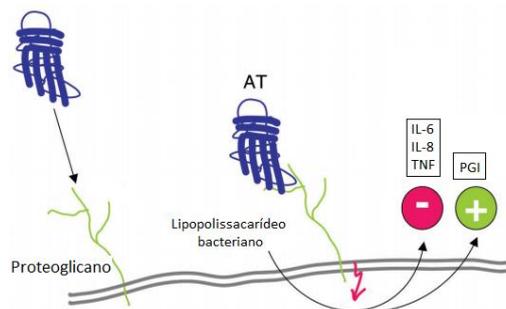


Figura 6 Efeito anti-inflamatório da AT ao ligar ao proteoglicano no endotélio resultando na síntese prostaciclina e inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios (WIEDERMANN, 2006).

O valor médio da concentração plasmática da AT encontra-se em torno de $140\mu\text{g/ml}$. A faixa de normalidade para testes funcionais em laboratórios varia entre 80 e 120%.

A determinação da atividade AT no plasma pode ser por um método usando substrato cromogênico e para determinação da quantidade de AT se faz por método imunológico (ELISA).

É bem estabelecida a associação de deficiências adquirida ou hereditária desta serpina em humanos com um risco aumentado para desenvolvimento anormal de coágulos ou trombozes (ZWICKER & BAUER, 2002; KHAN & DICKERMAN, 2006; PATNAIK & MOLL, 2008). Tem sido relatada a prevalência da deficiência da AT é de 1 em cada 5000 habitantes na população geral (PATNAIK & MOLL, 2008).

1.3. Aspectos moleculares da modulação da heparina sobre a antitrombina

A antitrombina é ativada pela heparina através de dois distintos mecanismos dependendo da protease-alvo e do comprimento da cadeia da heparina. A inibição da trombina é acelerada por um mecanismo simples chamado Mecanismo de “*ponte*” (heparina de cadeia maior), onde heparina serve como uma ponte (**Figura 7b**) para melhorar a difusão e estabilizar o complexo de Michaelis, formando um complexo terciário entre a AT, a trombina e a heparina.

Além deste mecanismo de ponte, há um segundo modelo de interação entre a heparina – AT baseado na indução de mudanças conformacionais. Devido à presença de uma sequência pentassacarídica específica (DEFGH) (**Figura 8**), localizada na heparina, esta se liga alostericamente a AT, e induz uma mudança conformacional, na qual a folha β expõe o RCL e o torna acessível, aumentando sua reatividade para os fatores Xa e IXa. O que ocorre nesta ligação heparina – AT é a conexão física através de interações iônicas entre grupos sulfato da heparina e

resíduos de aminoácidos carregados positivamente na AT. Este mecanismo alostérico minimamente afeta a atividade da AT com a trombina uma vez que esta não interage com os exossítios específicos dos fatores Xa e IXa (**Figura 7a**) (JOHNSON et al, 2006a; JOHNSON et al, 2006b; OLSON et al, 2010).

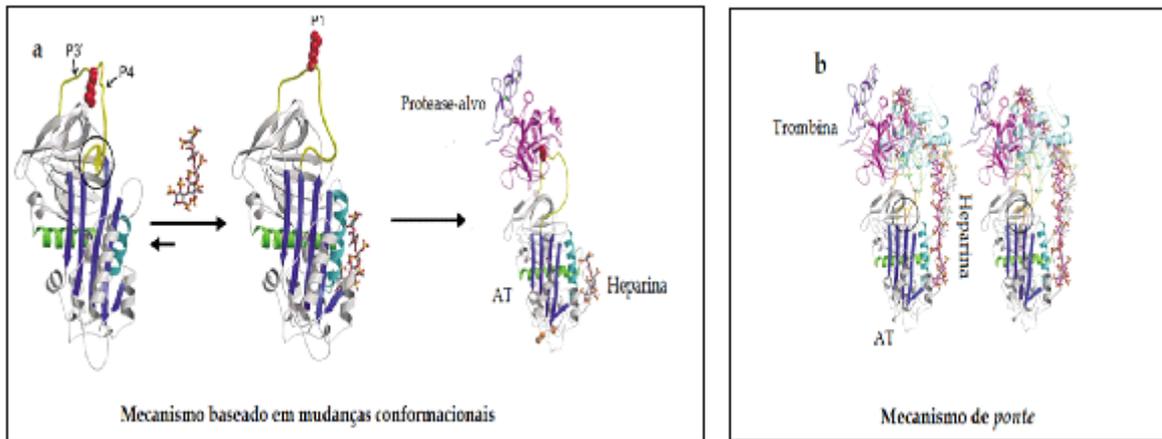


Figura 7 a) Mecanismo de indução heparina – AT baseado em mudanças conformacionais. Estrutura cristalográfica do complexo de Michaelis entre pentassacarídeo-AT ativada e fator Xa. O domínio da protease do fator Xa em magenta, e um segundo domínio do fator Xa em púrpura, o sítio reativo RCL está em amarelo, e os resíduos com P4 - P1 de cor vermelha. (b) Mecanismo de *ponte*. Representação do complexo de Michaelis AT-trombina. O sítio reativo RCL está em amarelo com partes verdes para P4 (Ile 390) e P1 (Arg 393). A Trombina (ciano semitransparente) está orientada à frente da AT e do RCL e entra no sítio ativo da trombina com P4-P1 alinhadas ao longo do eixo-z (no plano) (adaptado de JOHNSON et al, 2006b).

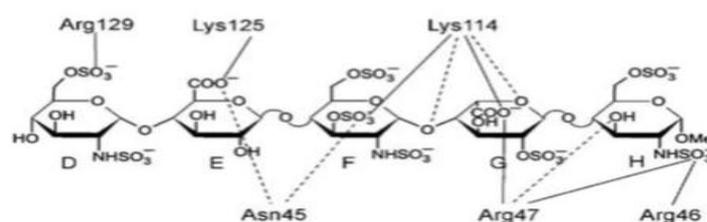


Figura 8 Interações de cadeia lateral são ilustrados de forma esquemática, com pontes salinas indicadas por linhas sólidas e ligações de hidrogénio indicadas por linhas tracejadas. Unidades de monossacarídeos individuais rotuladas de DEFGH (JOHNSON et al, 2006b; OLSON et al, 2010).

1.4. Imobilização de biomoléculas

Imobilização de biomoléculas consiste em um método pelo qual elas são quimicamente ou fisicamente aprisionadas em um suporte insolúvel em água, mantendo suas funções biológicas, de forma a serem utilizadas repetidamente e continuamente. Dessa forma, a utilização da biomolécula torna-se economicamente viável e de grande interesse industrial. Além disso, a fixação à matrizes inorgânicas combina a alta seletividade das reações com as particularidades químicas e físicas do suporte (KONG & FUN HU, 2012).

Os métodos de imobilização são conscientemente categorizados em *adsorção física*, onde há uma interações não covalentes, tal como força de van der Waals, pontes de hidrogênio e contatos hidrofóbicos; *aprisionamento* em um suporte semipermeável ou no interior de polímeros; *reações cruzadas (cross-linking)* que consiste em ligações cruzadas através do uso de reagentes bifuncionais e multifuncionais; *ligação por bioafinidade* quando a molécula imobilizada se liga espontaneamente com alta afinidade e especificidade à superfície do material; Imobilização por *interações iônicas*; e imobilização por *ligação covalente* diretamente a matriz (BICKERSTAFF, 1997; KONG & FUN HU, 2012).

O método de adsorção física tem sido muito utilizado devido à facilidade do processo, não exige qualquer modificação química e possui a vantagem da simplicidade, requerendo apenas uma solução contendo o substrato a utilizar. Entretanto, a estabilidade funcional e a possibilidade de reutilização são comprometidas devido à essas moléculas estarem aderidas à superfície do suporte por ligações fracas quebradas facilmente, além de se ocorrem alterações do meio como, por exemplo, variações de pH, força iônica ou temperatura, pode levar à lixiviação da biomolécula adsorvida ao material (MELLO & KUBOTA, 2002).

Diante disso, o emprego da imobilização por ligação covalente pode ser usado a fim de eliminar este problema pois geralmente está associada com uma maior estabilidade. Esta técnica baseia-se na reação entre grupos funcionais terminais da molécula, não essenciais à sua atividade, e grupos reativos da superfície (MELLO & KUBOTA, 2002).

De acordo com a literatura, inúmeras biomoléculas já foram imobilizadas e são vastamente empregadas na biotecnologia, tais como: proteínas, enzimas, anticorpos, antígenos e outros ligantes de afinidade. Cada biomolécula imobilizada pode desempenhar importantes funções na biotecnologia como, por exemplo, as enzimas imobilizadas podem funcionar como reagentes reutilizáveis na preparação de fragmentos de proteínas ou na análise de pureza; a imobilização de proteínas pode ser usada de várias formas como separar e medir analitos específicos; imobilizar anticorpos, antígenos e outros ligantes de afinidade pode ser útil como adsorventes de fase sólida

em imunoenaios; a técnica de imobilização pode também ser empregada na área de separação e/ou purificação de biomoléculas.

Outra possível aplicação é o desenvolvimento de dispositivos biotecnológicos, como biossensores, que não só medem a concentração do analito, mas também determinam as características quantitativas de interações bioespecíficas com alta seletividade e sensibilidade (BRUNO et al, 2004).

A imobilização da biomoléculas tem sido uma linha de pesquisa desenvolvida pelo Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Vários materiais, biomoléculas e metodologias tem sido empregadas, alguns exemplos são: tripsina imobilizada em polissacarídeo celulósico extraído pela *Zoogloea* sp a partir do melão da cana (CAVALCANTE et al, 2006); tripsina de peixe imobilizada em Dacron ferromagnético (AMARAL et al, 2006); anti-proteína S100 (MELO JUNIOR et al, 2007), antígeno recombinante de *Toxocara canis* (COELHO et al, 2003) e antígeno de *Yersina pestis* (BARROS et al, 2002) imobilizados em polisiloxano-álcool polivinílico; antibióticos imobilizados em fucana extraída da alga *Spatoglossum schröderi* (ARAÚJO et al, 2003); antígeno de *Yersinia pestis* imobilizado em compósito de polianilina-Dacron (COELHO et al, 2001), entre outros; tripsina e horseradish peroxidase (HRP) imobilizados em compósitos de polianilina-membranas de alumínio anódico (OLIVEIRA et al, 2008), entre outros trabalhos realizados.

1.4.1. Imobilização de heparina

A área de imobilização de heparina é muito abordada e desenvolvida pois a sua cadeia tem um número consideravelmente grande de grupos reativos funcionais que facilitam sua fixação à matriz. Cada unidade dissacarídica repetida (glicosamina e ácido glicurônico) contém grupos carboxila, um ou dois grupos hidroxila e uma média de 2-2,5 grupos sulfatos. Aproximadamente 15-25% dessas unidades repetidas possui grupos diol vicinais e cada cadeia contém um grupo reduzido hemiacetal terminal. Heparina tem aproximadamente 0,3 grupos amino por cadeia. Esses grupos funcionais podem ser utilizados diretamente ativados e ligados a uma matriz de suporte ou a um espaçador (ex. glutaraldeído) para poder se ligar a matriz (MURUGESAN et al, 2008).

Para a heparina ser imobilizada e ligada ao suporte de forma covalente, é necessário um processo de ativação da mesma com carbodiimida (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide – EDAC), processo este frequentemente utilizado, pois este reagente não permanece como parte do *cross-linking*, impedindo a despolimerização da heparina e possível liberação de reagentes potencialmente citotóxicos. O que ocorre é uma complexação entre o grupo amino

nucleofílico (encontrado no suporte após hidrogenólise) com o grupo carboxílico da heparina. O EDAC tem a função de ativar a heparina levando à formação de um composto intermediário (o- aciluréia) que possui um grupamento éster bastante reativo e que sofre hidrólise facilmente. O NHS (N-hidroxi-succinamida) reage com o grupo éster do composto intermediário instável deixando o grupo livre da hidrólise rápida. Então, na presença do grupo amino, este irá reagir com a carbonila do éster formando uma ligação amida (OLIVEIRA et al, 2003) (**Figura 9**).

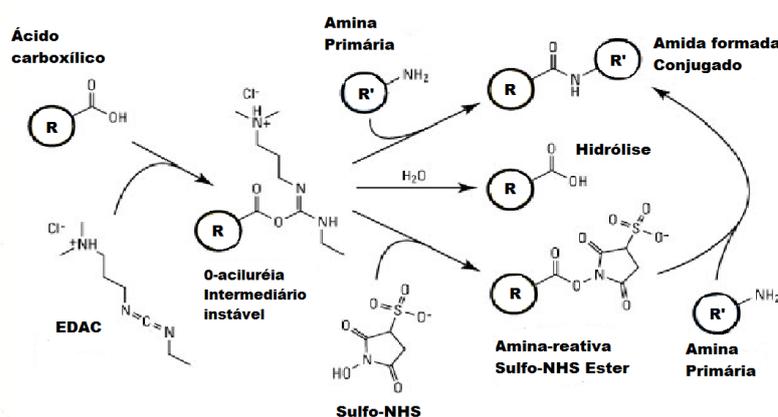


Figura 9 Figura representativa da reação de ativação da biomolécula através da ligação do seu grupo carboxílico com a carbodiimida (EDAC) e o N-hidroxi-succinamida (Sulfo-NHS) (adaptada de <http://www.piercenet.com>).

Pesquisadores tem focado na hibridização de polímeros sintéticos com moléculas biologicamente ativas a fim de obter materiais compatíveis com sangue e tecidos, comumente chamados de biomateriais. Estes podem ser definidos como materiais que contém componentes biologicamente derivados.

Nesse contexto, o uso de heparina imobilizada a um suporte tem sido ferramenta para a produção desses dispositivos biomédicos (OLIVEIRA et al, 2003). Tais materiais são geralmente usados em cirurgias cardíacas para alcançar efeitos antitrombogênicos, baixo grau de ativação do complemento e redução da adesão bacteriana (YE et al, 2013). Superfícies heparinizadas também mostram redução da adesão plaquetária, aumento do tempo do tempo de recalcificação (TP) do plasma e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) (MURUGESAN et al, 2008).

Além do mais, pesquisas demonstram que dispositivos utilizados na terapia extracorpórea tal como máquinas de diálise com heparina revestida no interior das tubulações podem potencialmente evitar efeitos colaterais associados com heparina administrada sistemicamente (MURUGESAN et al, 2008).

Heparina imobilizada é também vastamente usada para cromatografia de afinidade para purificação de proteínas que se ligam a GAG. Segue abaixo alguns exemplos de materiais heparinizados já disponíveis no mercado:

- *Immobilized Heparin* (InterBioTech[®]) para purificação de proteínas ligantes.
- *BD™ Heparin Binding Plate* (BD Biosciences[®]) Heparina imobilizada em microplacas de poliestireno (placa de ELISA) com a finalidade de interagir com proteínas heparino-ligantes.
- *PROSEP[®]-Heparin Chromatography Media* (Millipore[®]) matriz cromatográfica de vidro poroso heparinizada para uso na purificação de moléculas heparina-ligantes.

Na literatura existe grande número de artigos referentes à heparinização além de diversas aplicações desta biotecnologia. Podemos citar algumas destas publicações: em polidimetilsiloxano (THORSLUND et al, 2005); em enxertos de politetrafluoretileno para cirurgia vascular (HEYLIGERS et al, 2006); em superfície de polietileno (KONDO et al, 2008); superfície de titânio com heparina revestida (HUH et al, 2011); em dacron e polietileno tereftalato (CHANDY et al, 2000); em matriz de celulose (MURUGESAN et al, 2008); imobilização de heparina em nanopartículas (nanotubos de carbono, óxidos de ferro, sílica, fosfato de cálcio e pontos quânticos) (MURUGESAN et al, 2008; XING et al, 2010).

1.5. Membranas de óxido alumínio anódico

Nos últimos anos, a tecnologia de membranas tem encontrado aplicações importantes na indústria química, biotecnologia, processos de proteção ambiental, e as indústrias de exploração de gás natural. A utilização de membranas depende se membranas possuem a desejada seletividade e propriedades de estabilidade térmica. Geralmente, membranas orgânicas, devido à degradação térmica, não são adequadas para aplicações em temperaturas superiores a 180°C. Em contrapartida, membranas microporosas inorgânicas exibem maior estabilidade térmica e química e satisfatórias propriedades de condutividade e melhor seletividade e permeabilidade (SALMAS & ANDROUTSOPOULOS, 2009).

As membranas de óxido de alumínio anódico (AAO) possui um arranjo hexagonal de nanoporos de tamanhos homogêneos que lembra uma colméia conforme pode visualizar na **Figura 10**. Estas membranas têm se tornado “molde” na fabricação de materiais nanoestruturados e, portanto, tem despertado o interesse de pesquisadores e da indústria devido a grande importância da nanotecnologia na ciência atual (KIM et al, 2003).

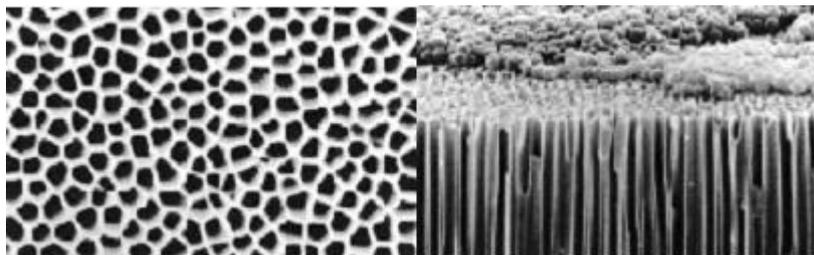


Figura 10 Vista superior da membrana AAO 0,2 μm (Anodisc - Whatman[®]) (à esquerda) e uma vista de corte transversal (à direita). Espessura da membrana aproximadamente 60 μm . Note-se a densidade de poros extremamente elevado, o que torna possível alta taxa de fluxo (http://www.2spi.com/catalog/spec_prep/filter2.shtml).

A membrana de AAO possui poros de cilindros centrais, de tamanhos uniformes. As dimensões (diâmetro, densidade de poros e espessura) são ajustadas no momento da síntese sob diferentes condições de anodização. Outra característica importante é que os poros destas membranas possui quase nenhuma inclinação sendo perpendiculares à superfície e assim, são poros individualizados, sem conexão com poros vizinhos (HULTEEN & MARTIN, 1997).

Existem diversos protocolos na literatura de como sintetizar membranas de alumínio anódico, mas de forma geral, essas membranas são sintetizadas através da anodização do alumínio que consiste em uma técnica teoricamente simples. Segundo a literatura é necessário mergulhar o alumínio no eletrólito em questão (geralmente ácido sulfúrico, ácido oxálico ou ácido fosfórico), estabelecer uma diferença de potencial passando uma determinada corrente no circuito e deixar que o processo ocorra, de forma a se obter um arranjo de poros regular (LEE et al, 2006).

As membranas de AAO são frágeis, mas apesar disso, elas podem ser usadas em um número diverso de aplicações, tal como bioreatores, biosensores, modelos para pontos quânticos, moldes para síntese de nanofios, nanotubos e nanofibras, síntese de membranas bioquímico funcionais.

Sendo variados tamanhos de poros, de micômetros a nanômetros, estas membranas também são utilizadas em processos de filtração devido ao seu poder de separação, desde microfiltração até ultra filtração e nanofiltração (MIERZWA et al, 2008).

Essa membrana indica ser um promissor suporte em processos de imobilização de biomoléculas. As razões para isto parecem estar relacionadas com a grande área superficial que esta membrana oferta, além disso, a AAO possui bom comportamento mecânico e certa estabilidade química e térmica. Assim, as biomoléculas são imobilizadas dentro dos poros, onde ocorre a ligação da biomolécula via adsorção, ligação covalente ou encapsulação (SHEINTUCH & SMAGINA, 2007).

Algumas publicações referem-se a estudos de imobilização usando esta membrana como suporte, Oliveira et al (2008) imobilizaram tripsina em membranas AAO revestidas com polietilenimina e horseradish peroxidase em membranas de AAO revestidas com polianina. A imobilização de glicose oxidase e glicose oxidase-biotina sobre as membranas de AAO foram pesquisadas por Dalvie & Baltus (1992), onde estudou-se a imobilização via ligação covalente e por adsorção. Outra aplicação é a utilização das membranas AAO como suporte para imobilização de catalisadores homogêneos assimétricos para gerar uma membrana catalítica enantioselectiva (CHO et al, 2005).

Comercialmente disponíveis pela Anodisc - Whatman[®], são indicadas em website as diversas vantagens e aplicabilidade para sua utilização, incluindo: alta taxa de fluxo, retenção de partículas extremamente eficiente, superfície rígida e uniforme para crescimento celular, transparentes quando molhadas facilitando a microscopia óptica para visualização do crescimento celular, usadas para técnica de coloração, fluorescência e imunofluorescência, resistentes à temperatura e radiação. São usadas para HPLC para filtração de fase móvel e ultrafiltração de solventes.

1.6. Polianilina

A descoberta dos polímeros condutores intrínsecos tem atraído um grande número de pesquisadores e indústrias. Esses novos materiais formam uma classe de polímeros orgânicos ou metais sintéticos que unem a simplicidade de síntese orgânica com a condutividade de um metal, baseado em uma técnica simples e de baixo custo.

Os polímeros condutores possuem um vasto campo de aplicações tecnológicas podendo ser utilizados em eletrodos de baterias recarregáveis, capacitores, isolantes eletromagnéticos, proteção anti-corrosiva, diodos emissores de luz, dispositivos eletrocromáticos, radares, sensores químicos, térmicos e biológicos (COELHO et al, 2001).

A polianilina é o polímero condutor considerado ter melhor estabilidade química de sua forma condutora em condições ambientais, facilidade de polimerização e dopagem e baixo custo do monômero. O termo polianilina (PANI) refere-se a uma classe de polímeros consistindo de 1000 ou mais unidades repetitivas, cuja forma básica tem a composição generalizada representada na **figura 11**, obtida pela polimerização química ou eletroquímica da anilina em meio ácido. A figura mostra que a PANI possui unidades reduzidas (1-y) e oxidadas (y), onde pode variar entre zero e um (COELHO et al, 2001).

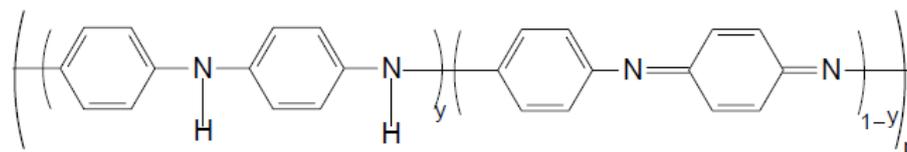


Figura 11 Estrutura geral da polianilina (COELHO et al, 2001).

As propriedades da PANI podem ser variadas e vai depender de dois principais fatores: o estado de oxidação e o estado de protonação (dopagem). O grau de protonação vai depender do estado de oxidação e do pH do meio. Dependendo do grau de protonação os polímeros condutores podem assumir valores de condutividade elétrica que vão desde isolante até condutor.

Dependendo do valor de y , a PANI pode apresentar diferentes estados de oxidação: o estado totalmente oxidado ($y=0$) é chamado pernigranilina, o estado parcialmente oxidado e parcialmente reduzido ($y=0,5$) é chamado esmeraldina, e o estado totalmente reduzido ($y=1$) é chamado leucoesmeraldina (VARELA-ALVAREZ et al, 2005) (**Figura 12**).

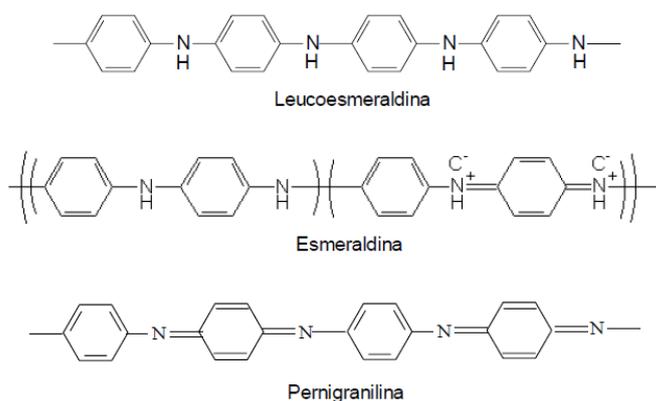


Figura 12 Estruturas da polianilina nos três principais estágios de oxidação (adaptado de MACDIARMID & EPSTEIN, 1995).

O polímero condutor, quando em processo de dopagem, sofre mudanças drásticas nas suas propriedades eletrônicas, ópticas, magnéticas e ou propriedades estruturais, sendo acompanhada por um grande aumento da condutividade. O mais importante estado de oxidação dentre os encontrados para a PANI é esmeraldina, pois depois de dopado, atinge os maiores valores de condutividade.

A dopagem química acontece por meio uma reação do tipo ácido-base onde há a protonação dos átomos de nitrogênio do polímero em solução ácida aquosa. A completa protonação dos átomos de nitrogênio na Base de Esmeraldina (EB) por um ácido (ex. HNO_3) resulta na formação de um sal do polímero protonado, estado mais estável, chamado de Sal de Esmeraldina (ES) (STEJSKAL et al, 2008; MARIA et al, 1999; VARELA-ALVAREZ et al, 2005) (**Figura 13**).

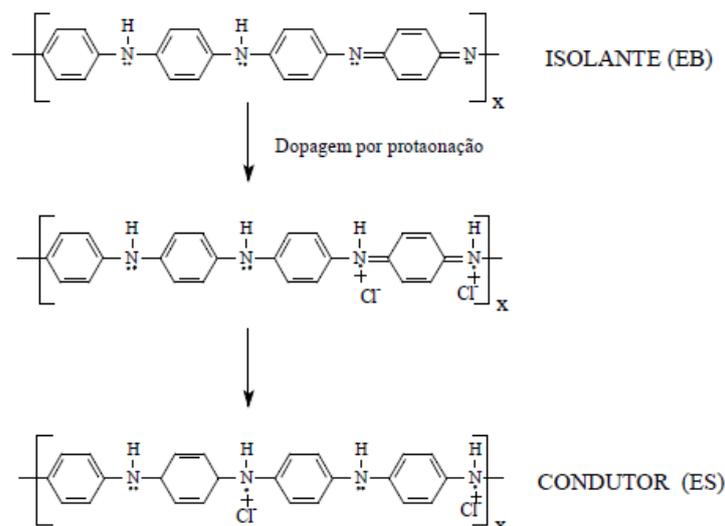


Figura 13 Esquema ilustrando o processo de dopagem da PANI (adaptado de MACDIARMID & EPSTEIN, 1995).

Há diversos estudos relacionados com polianilina revestindo membranas. Piletsky et al (2003), publicaram um estudo onde membranas comerciais porosas de polipropileno que foram quimicamente funcionalizadas com PANI, usando como agente oxidante o persulfato de amônio. Foi observado que estas membranas apresentaram alta afinidade para proteínas, as quais podiam ser imobilizadas através de adsorção física ou imobilização covalente com glutaraldeído. Outros estudos foram a imobilização de horseradish peroxidase (HRP) em magnetita revestida com PANI e ativada com glutaraldeído (BARBOSA et al, 2012); tripsina imobilizada em polivinil-alcool revestido também com PANI e tratado com glutaraldeído (CARAMORI et al, 2011);

2. JUSTIFICATIVA

A separação de biomoléculas de seus contaminantes ainda não é uma tarefa fácil. Existem vários métodos de purificação e aqueles baseados na afinidade entre uma biomolécula e seu ligante são os mais específicos. A separação por afinidade é uma ferramenta bastante utilizada na purificação de proteínas, sendo a heparina um ligante já bem conhecido em processos de afinidade, o presente trabalho propôs sua imobilização na membrana de óxido de alumínio anódico revestida com PANI. Assim, a proposição de imobilizar a heparina sobre esta matriz vem somar na tentativa de propor um novo modelo para purificação/separação da proteína plasmática antitrombina, pois esta tem diversas aplicações nas áreas da bioquímica da coagulação, terapêutica, e indústria farmacêutica, além de aplicar as membranas nanoporosas de AAO nas áreas de purificação de proteínas e biomateriais.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Imobilizar heparina em membrana de óxido alumínio anódico e verificar sua viabilidade como matriz de afinidade.

3.2. Específicos

- Revestir polianilina na membrana de óxido de alumínio anódico;
- Imobilizar heparina à membrana;
- Purificar antitrombina por cromatografia de afinidade mediante o uso da membrana de óxido de alumínio anódico revestida com polianilina e heparina imobilizada;
- Realizar testes de coagulação: teste de tromboplastina parcialmente ativado e o teste cromogênico para dosagem da atividade de antitrombina, os quais comprovam a separação/purificação da antitrombina,
- Realizar eletroforese SDS-PAGE a fim de identificar a antitrombina.

4. REFERÊNCIAS

- AMARAL, I. P. G.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; BEZERRA, R. S. Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 5, p. 1213-1216, 2006.
- ARAÚJO P. M.; OLIVEIRA, G. B.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; SILVA, M. P. C. Sulfated fucan as support for antibiotic immobilization. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 3, p. 301-305, 2003.
- ASMAL M.; WHITNEY J. B.; LUEDEMANN C.; CARVILLE A.; STEEN R.; et al. In vivo Anti-HIV Activity of the Heparin-Activated Serine Protease Inhibitor Antithrombin III Encapsulated in Lymph-Targeting Immunoliposomes. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, p. 01- 15, 2012.
- BARBOSA E. F.; MOLINA F. J.; LOPES F. M.; GARCIA-RUIZ P. A.; CARAMORI S. S.; FERNANDES K. F. Immobilization of Peroxidase onto Magnetite Modified Polyaniline. *The Scientific World Journal*, v. 2012, p. 01-05, 2012.
- BARROS, A. E. L.; ALMEIDA A. M. P.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; AZEVEDO, W. M. Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, n. 4, p. 459-463, 2002.
- BICKERSTAFF, G. Immobilization of enzymes and cells. In: Walker JM, *Methods in biotechnology 1*. 2ª edição. Totowa, NJ. Humana Press, 1997.
- BRUNO L.; BARRA G.; MANSUR H.; ORÉFICE R. L. Imobilização de Proteínas do Veneno do Escorpião *Tytilus Serrulatus* em Blenda Condutora de Polianilina-Poli (Metacrilato de Hidroxietila). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 14, n. 3, p. 156-161, 2004.
- CAPILA, I; LINHARDT, R. J. Heparin - Protein Interactions. *Angewandte Chemie International*, v. 41, n. 3, p. 390-412, 2002.
- CARAMORI S. S.; FARIA F. N.; VIANA M. P.; FERNANDES K. F.; CARVALHO L. B. Trypsin immobilization on discs of polyvinyl alcohol glutaraldehyde/polyaniline composite. *Materials Science and Engineering C*, v. 31, p. 252–257, 2011.
- CAVALCANTE, A. H. M.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. as a film support for trypsin immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, v. 29, n. 3, p. 258-261, 2006.

- CHANDY T.; DAS G. S.; WILSON R. F.; ROA G. H. R. Use the plasmaglow for surface-engineering biomolecules to enhance blood compatibility of Dacron and PTFE vascular prosthesis. *Biomaterials*, v. 21, n. 7, p. 699-712, 2000.
- CHO, S. H.; WALTHER, N. D.; NGUYEN, S. T.; HUPP, J. T. Anodic aluminium oxide catalytic membranes for asymmetric epoxidation. *Chemical Communications*, v. 42, n. 14, p. 5331-5333, 2005.
- COÊLHO, R. A. L.; SANTOS, G. M. P.; AZEVEDO, P. H. S.; JAQUES, G. A.; AZEVEDO, W. M.; CARVALHO JUNIOR, L. B. Polyaniline-Dacron composite as solid phase in ELISA for *Yersinia pestis* antibody detection. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 56, n. 2, p. 257-260, 2001.
- COÊLHO, R. A. L.; YAMASAKI, H.; PEREZ, E. P.; CARVALHO JUNIOR, L. B. The use of polysiloxane-polyvinyl alcohol beads as solid phase in IgG anti-*Toxocara canis* detection using a recombinant antigen. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98 n. 3, p. 391-393, 2003.
- DALVIE, S. D.; BALTUS, R. E. Distribution of immobilized enzymes on porous membranes. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 40, n. 10, p. 1173-1180, 1992.
- FRANCO, R. F. Trombofilias. Bases Moleculares. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. *Hematologia: fundamentos e prática*. Editora Atheneu, 1ª edição, cap. 76, p. 843-854, 2004.
- HEYLIGERS, J. M. M.; VERHAGEN, H. J. M.; ROTMANS, J. I.; WEETERINGS C.; GROOT, P. G. D.; MOLL, F. L.; LISMAN T. Heparin immobilization reduces thrombogenicity of small-caliber expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Journal of vascular surgery*, v. 43, n. 3, p. 587- 591, 2006.
- HUH J. B.; LEE J. Y.; LEE K. L.; KIM S. E.; YUN M. J.; SHIM J. S.; SHIM J.S.; SHIN S.W. Effects of the immobilization of heparin and rhPDGF-BB to titanium surfaces for the enhancement of osteoblastic functions and anti-inflammation. *The Journal of Advanced Prosthodontics*, v. 3, n. 3, p. 152-160, 2011.
- HULTEEN, J. C.; MARTIN, C. R. A general method for the preparation of nanomaterials. *Journal of Materials Chemistry*, v. 7, p. 1075-1087, 1997.
- HUNTINGTON, J. A.; READ, R. J.; CARRELL, R. W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, v. 407, n. 6806, p. 923-926, 2000.
- JOHNSON, D. J.; LANGDOWN J.; LI W.; LUIS S. A.; BAGLIN T. P.; HUNTINGTON J. A. Crystal Structure of Monomeric Native Antithrombin Reveals a Novel Reactive Center

- Loop Conformation. *The Journal Biological Chemistry*, v. 281 n. 46, p. 35478-35486, 2006a.
- JOHNSON D. J.; LI W.; ADAMS T. E; HUNTINGTON J. A. Antithrombin–S195A factor Xa heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation. *The EMBO Journal*, v. 25, n. 9, p. 2029-2037, 2006b.
- KHAN, S.; DICKERMAN, J. D. Hereditary thrombophilia. *Thrombosis Journal*, v. 4, n. 15, p. 01-17, 2006.
- KARLSSON, G.; WINGE, S. Separation of latent, prelatent, and native forms of human antithrombin by heparin affinity high-performance liquid chromatography. *Protein Expression and Purification*, v. 33, p. 339–345, 2004.
- KIM, M. J.; LEE, T. Y.; CHOI, J. H.; PARK, J. B.; LEE, J. S.; KIM, S. K.; YOO, J. B.; PARK, C. Y.; Growth of carbon nanotubes with anodic aluminum oxide formed on the catalytic metal-coated Si substrate. *Diamond and Related Materials*, v. 12, n. 3-7, p. 870–873, 2003.
- KONDO, S.; FUKUNAGA, Y.; OIKAWA, M.; SASAI, Y.; KUZUYA, M. Plasma-Assisted Immobilization of Heparin onto Low-Density Polyethylene Surface. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 56, n. 7, p. 921-925, 2008.
- LEE, W.; JI, R.; SELE, U. G.; NIELSCH, K. Fast fabrication of long-range ordered porous alumina membranes by hard anodization. *Nature materials*, v. 5, p. 741-747, 2006.
- KONG, F.; FUN HU, Y. Biomolecule immobilization techniques for bioactive paper fabrication. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 403, n. 1, p. 7-13, 2012.
- MACDIARMID, A. G.; EPSTEIN, A. J.; Secondary doping in polyaniline, *Synthetic Metals*, v. 69, p. 85-92, 1995.
- MARIA, D. J.; DE PAOLI, M. A.; ALVES, O. L.; ZARBIN, A. J. G.; NEVES, S.; Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 204-215, 1999.
- MELO JUNIOR, M. R.; ARAÚJO FILHO, J.; CAVALCANTI, C. L. B.; PATU, V.; BELTRÃO, E. I. C.; CARVALHO JUNIOR, L. B. Detection of S100 protein from prostate cancer patients using anti-S100 protein antibody immobilized on POS-PVA discs. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, n. 1, p. 182-187, 2007.
- MIERZWA, J. C.; SILVA, M. C. C.; RODRIGUES, L. B.; HESPANHOL, I. Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração: avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado. *Engenharia Sanitária Ambiental*, v. 13, n. 1, p. 78-87, 2008.

- MURUGESAN, S.; XIE, J.; LINHARDT, R. J. Immobilization of heparin: approaches and applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 8, n.2, p. 90-100, 2008.
- NADER, H. B.; PINHAL, M. A. S.; BAÚ, E. C.; CASTRO, R. A. B.; MEDEIROS, G. F.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L. TRINDADE, E. S.; SHINJO, S. K.; ROCHA, H. A. O.; TERSARIOL, I. L. S.; MENDES, A.; DIETRICH, C. P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, n. 6, p. 699-709, 2001.
- OLSON S. T.; RICHARD B.; IZAGUIRRE G.; SCHEDIN-WEISS S.; GETTINS P. G. W. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. a paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie*, v. 92, n. 11, p. 1587–1596, 2010.
- OLIVEIRA, G. B.; CARVALHO JR., L. B.; SILVA, M. P. C. Properties of carbodiimide treated heparin. *Biomaterials*, v. 24, n. 26, p. 4777- 4783, 2003.
- OLIVEIRA, G. B.; LIMA FILHO, J. L.; CAVALCANTE CHAVES, M. E.; AZEVEDO, W.M.; CARVALHO, L.B. Enzyme immobilization on anodic aluminum oxide/polyethyleneimine or polyaniline composites. *Reactive and Functional Polymers*, v. 68, n. 1, p. 27-32, 2008.
- PATNAIK, M. M.; MOLL, S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia*, v. 14, n. 6 p. 1229-1239, 2008.
- PILETSKY, S.; PILETSKA, E.; BOSSI, A.; TURNER, N.; TURNER, A. Surface functionalization of porous polypropylene membranes with polyaniline for protein immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 82, n. 1, p. 86-92, 2003.
- RODGERS, G M. Role of antithrombin concentrate in treatment of hereditary antithrombin deficiency. *Thrombosis Haemostasis*, v. 101, n. 5, p. 806–812, 2009.
- SALMAS, C. E.; ANDROUTSOPOULOS, G. P. Preparation and Characterization of Anodic Aluminum Oxide Films Exhibiting Microporosity. *Chemical Engineering Communications*, v. 196, n. 4, p. 407-442, 2009.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 27, n. 2, p. 157-162, 1967.
- SOUTER P.J.; THOMAS, S.; HUBBARD, A. R.; POOLE, S.; RÖMISCH, J.; GRAY, E. Antithrombin inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor and interleukin-6 production by mononuclear cells, human umbilical vein endothelial cell, and whole blood. *Critical Care*, v. 29, n. 1, p. 134-139, 2001.

STEJSKAL J.; PROKEŠ J. B; TRCHOVÁ M. Reprotonation of polyaniline: A route to various conducting polymer materials. *Reactive & Functional Polymers*, v. 68, n.9, p. 1355–1361, 2008.

THORSLUND, S.; SANCHEZ, J.; LARSSON, R.; NIKOLAJEFF, F.; BERGQUIST J. Bioactive heparin immobilized onto microfluidic channels in poly(dimethylsiloxane) results in hydrophilic surface properties. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, v. 46, n. 4, p. 106–113, 2005.

VARELA-ALVAREZ A.; SORDO J. A.; SCUSERIA G. E. Doping of polyaniline by acid-base chemistry: density functional calculations with periodic boundary conditions. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, n. 32, p. 11318-11327, 2005.

WIEDERMANN C. J.; DJANANI A. Direct antimicrobial activity of antithrombin? *Critical Care*, v. 14, n. 5, p. 440, 2010.

WIEDERMANN, C. J. Clinical review: molecular mechanisms underlying the role antithrombin in sepsis. *Critical Care*, v. 10, n. 1, p. 01-09, 2006.

XING Z. C.; CHANG Y.; KANG I. K. Immobilization of biomolecules on the surface of inorganic nanoparticles for biomedical applications, *Science and technology Advanced Materials*, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2010.

ZWICKER, J; BAUER, K. A. Thrombophilia. In: KITCHENS C.S; ALVING B.; KESSLER C. M., eds. *Consultative Hemostasis and Thrombosis*, Philadelphia, PA, p. 181-196, 2002.

YE X.; WANG H.; ZHOU J.; LI H.; LIU J.; et al. The Effect of Heparin-VEGF Multilayer on the Biocompatibility of Decellularized Aortic Valve with Platelet and Endothelial Progenitor Cells. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, 2013.

Fotografia 3, color. Disponível em:<<http://www.answers.com/topic/antithrombin>> Acesso em 10 de fev 2013.

Fotografia 4, color. Disponível em:< <http://www.answers.com/topic/antithrombin> > Acesso em 10 de fev 2013.

Fotografia 9, color. Disponível em:< <http://www.piercenet.com> > Acesso em 08 de fev 2013.

Fotografia 10, color. Disponível em:<http://www.2spi.com/catalog/spec_prep/filter2.shtml> Acesso em 10 de set 2013.

ARTIGO

Será submetido à revista Biomaterials; fator de impacto: 7,404; ISSN: 0142-9612.

ANTITHROMBIN PURIFICATION BY AFFINITY MATRIX USING ANODIC ALUMINUM OXIDE- POLYANILINE-HEPARIN COMPOSITE

VIEIRA, R.¹; CARVALHO JR, L. B.¹.

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

Corresponding at:

CARVALHO JR, L. B

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Av. Prof Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife/PE

50670-901 Brazil

Fax number: 55 81 2126 8000

e-mail: lcbj@hotmail.com.br

Abstract

Here is described a method to purify antithrombin from human plasma based on its affinity to heparin. Nanoporous membrane of anodic aluminum oxide (AAO) was coated with polyaniline (PANI). Heparin was previously functionalized with 1-ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC) and covalently immobilized onto the AAO-PANI. The membrane was introduced into a polycarbonate syringe filter holder. Human plasma was incubated with the AAO-PANI-heparin membrane and successively washed with phosphate buffer and increasing concentrations of NaCl (0.5; 1.0; 1.5 and 2 M: stepwise). The amount of immobilized heparin was 53.04 % of that offered. The fractions (1 mL) were collected and the antithrombin was eluted in 1.5 and 2 M NaCl as proved by the activated partial thromboplastin time and antithrombotic activity analyses as well as SDS-PAGE electrophoresis.

Keywords: antithrombin purification, heparin immobilization, Anodic Aluminum Oxide composites.

1. INTRODUCTION

The antithrombin (AT) is the primary thrombin inhibitor but also exerts an inhibitory effect on several other coagulation enzymes. Besides its anticoagulant power AT has anti-inflammatory effect (WIEDERMANN, 2006; PATNAIK & MOLL, 2008); more recently has been described as antiangiogenic agent (O'REILLY, 2007) and may be given exogenously as a medication for thrombotic disorders. Therefore, its purification has been assumed in important issue in industrial plasma fractionation.

The anticoagulant effect of AT is accelerated almost 1000 times by the presence of heparin. This specific binding leads to a conformational change in antithrombin molecule that induces its binding to proteases (PATNAIK & MOLL, 2008). The use of heparin therapeutically is based on the increasing of endogenous antithrombin power. Thus, this interaction plays an important role in normal physiology and in disease processes (PETITOU et al, 2003; NADER et al, 2001).

Heparinized materials has been the subject of research in the medical and biomedical research because they enable better biocompatibility and have anticoagulant effects, such as surgical prostheses heparinized, these devices also allow their use in biotechnology, such as protein purification by affinity chromatography and biomolecule immobilization. This technique consists in linking or incorporation these biomolecules on or within solid supports and their study involves from the interactions between biomolecules and surfaces, as well as their intermolecular interactions (OLIVEIRA et al, 2003; MURUGESAN et al, 2008)

Once immobilized, the water insolubility, conferred to this molecule, the product becomes easily removable, enabling obtaining products exempt from contamination and a higher mechanical stability. Furthermore, the immobilized biomolecule can retain part or the whole of their biological properties (KORECKÁ et al, 2005).

The matrix or support is the material which is fixed a biospecific ligand and choice of the best matrix for a particular application will result in efficient use of the immobilized biomolecule. According to literature, the aluminum anodic membrane (AAO) reveals to be a suitable material for use as multifunctional matrix (OLIVEIRA et al, 2008). By having a nanoporous surface, it provides a large surface area, being advantageous property for immobilizing biomolecules (TAKHISTOV, 2004).

The polyaniline (PANI) coating on these membranes enhances the immobilization process, as it provides a microenvironment hydrophilic, and promote functional groups on their surface, absent in the AAO, allowing high possibility in chemical interactions (SALMAS & ANDROUTSOPOULOS, 2009).

The purpose of this study is to coat the aluminum anodic oxide membrane with PANI and immobilize it with heparin to obtain human antithrombin and other plasma proteins by affinity separation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Anodic Aluminum Oxide (AAO) membrane coating with polyaniline (PANI)

The membrane (Whatman[®], pore size = 0.2 μm , thickness = $\sim 60 \mu\text{m}$, area = 2.3 cm^2 , density = ~ 108 pores per membrane) was coated according to Oliveira et al (2008). Briefly, the AAO membrane was treated with 0.1 M KMnO_4 solution at 50 $^\circ\text{C}$ overnight (petri dish). Afterwards, the treated membrane was washed with distilled water and immersed into 0.5 M aniline solution (Vetec; 99.0%) prepared in 1.0 M HNO_3 . Polymerization was allowed to occur for 2 h and after that the AAO–PANI was successively washed with distilled water, 0.1 M citric acid and distilled water.

2.2. Heparin activation and immobilization onto the AAO–PANI

The AAO–PANI membrane was introduced into a polycarbonate syringe filter holder, 25 mm (Sartorius AG, Goettingen, Germany) and from now on was treated by circulating the reagent solutions through it using a peristaltic pump.

Heparin (150 mg; Liquemine obtained from Roche Laboratories) was dissolved in Phosphate Buffered Saline (PBS) (50 mL). Then, an amount of 92 mg of NHS (N-hydroxysuccinimide; Reagen Laboratories) was dissolved into the heparin solution and afterwards 150 mg of 1-ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC; Sigma Chemical Company) were dissolved. The mixture pH was decreased between 4.5 and 4.8 by adding 2 M HCl and kept for 30 min, after this time interval the mixture pH was increasing to 8.0. After that, 1 mL of this treated heparin in introduced into the polycarbonate syringe filter holder containing the AAO–PANI membrane and kept for 6 h (heparin covalent immobilization onto the AAO–PANI membrane). The membrane was washed with 10 mL of PBS. The amount of immobilized heparin was estimated by the difference between that present before immobilization and in the PBS (washings) according to method described by Oliveira et al (2003).

2.3. Plasmatic antithrombin purification

Human blood (10 mL) was collected from a healthy adult by venipuncture into 5 mL sterile vacuum tubes containing anticoagulant (citrate). The blood was centrifuged at $3.500 \times g$ for 20 min at 25 °C and the platelet-poor plasma collected for the purification. This plasma (1 mL) was introduced into the polycarbonate syringe filter holder containing the AAO-PANI membrane and incubated at 4 °C for 1 h. Afterwards the membrane was successively washed with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2 and this buffer containing increasing concentration of NaCl (0.5 M, 1.0 M, 1.5 M, and 2.0 M). Fractions (1 mL) were collected at each washing solution that were used for protein concentration estimation ($\lambda = 280$ nm), *in vitro* anticoagulation assay, antithrombin activity and electrophoresis (after dialysis for 24 h).

2.4. In vitro anticoagulant assay

For the activated partial thromboplastin time (aPTT) measurement (Labtest[®]) the collected Fractions (100 μ L) and plasma normal (100 μ L) were added in microtubes and incubated for 10 min at 4°C. After, 100 μ L of this mixture were added to 100 μ L of ellagic acid reagent followed by incubation for 3 min. Then, 100 μ L of CaCl₂ solution were added and the clotting time measured (min).

2.5. Determination of Antithrombin Activity and albumin concentration

The quantitative determination of antithrombin activity in the Fractions was established using a chromogenic (SAR-PRO-ARG p-Nitroanilide) assay (TriniCHROM[™] Antithrombin IIa, Trinity Biotech, Ireland). In this two-stage method, thrombin was added to the Fraction in the presence of heparin. After an initial incubation period (stage 1) residual thrombin was determine with the thrombin-specific chromogenic substrate (stage 2). The residual thrombin activity was inversely proportional to the antithrombin activity. The procedure was precisely carried out as recommended by the manufacturer instruction.

The albumin concentration in the Fractions was estimated using the cassette COBAS INTEGRA Albumin Gen.2 (Roche Diagnostics).

2.6. Electrophoresis

After dialysis for 24 h the Fractions were lyophilized and resuspended in 15 μL sample buffer and submitted to electrophoresis SDS-PAGE in polyacrylamide gel to 10.0% and stained with silver nitrate according to the methodology of Laemmli (1970).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The heparin was covalently immobilized onto this matrix. The derivative also yielded filtering membrane. Figure 1 shows the AAO membrane without treatment, before (treated with KMnO_4) and after PANI coating. The green color of the AAO-PANI indicates that the polymer is in esmeraldine salt configuration. The flux obtained during the use of AAO-PANI-heparin placed into the polycarbonate syringe filter holder is an evidence that nanoporous is also preserved after heparin coating.

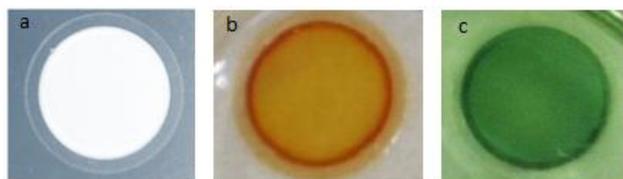


Figure 1. AAO membrane (a) without treatment, (b) treated with KMnO_4 and (c) coated with PANI.

The amount of immobilized heparin was found to be $77.90 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of AAO-PANI membrane that represents 53.04 % of that offered, was several times higher than those reported in the literature. Lin et al (2004) immobilized heparin onto microporous poly (vinylidene fluoride) (PVDF) membranes that were prepared either by dry or immersion precipitation method and the maximal immobilization value was $9.68 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Figure 2 displays the human plasma protein purification profile by using the AAO-PANI-heparin membrane placed into the syringe filter holder and washed with phosphate buffer and increasing NaCl solutions (stepwise). Large amount of protein was leached off from the membrane washed with phosphate buffer whereas smaller protein peaks were obtained with the use of NaCl solutions. The Fraction equivalents to these peaks were dialyzed, lyophilized, resuspended and further analyzed.

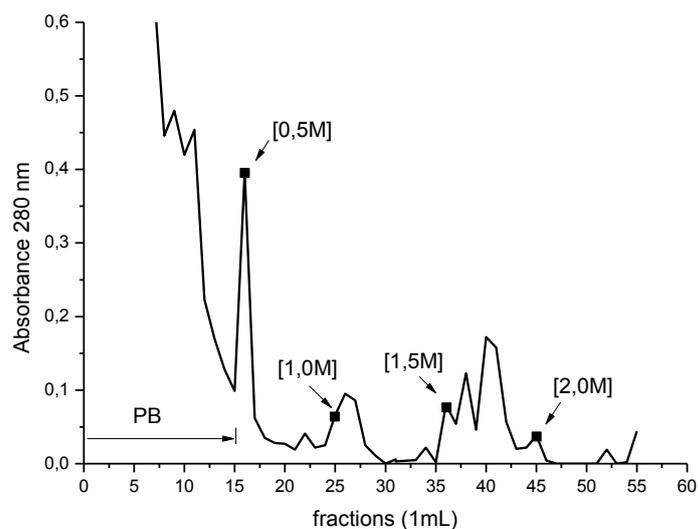


Figure 2 – Protein elution profile of plasma proteins adsorbed onto the AAO-PANI-heparin and washed with phosphate buffer (PB) and increasing NaCl concentrations (0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 M).

Table 1 shows the activated partial thromboplastin time, antithrombin activity and the amount of albumin present in each protein peak. Proteins presenting antithrombotic activity and increasing the aPTT were collected from the AAO-PANI-heparin at the 36, 38, 40, 41, 52 and 55 Fractions that are equivalents to NaCl concentrations of 1.5 and 2.0 M. The proteins eluted with lower NaCl concentrations did not present antithrombotic activity and relevant aPTT values. It is important to register that the large amount of protein eluted with phosphate buffer showed high albumin amounts, important protein for biotechnology area.

Table 1 – The activated partial thromboplastin time, antithrombin activity and albumin concentration of the Fractions collected from the elution of the plasma proteins adsorbed onto the AAO-PANI-heparin membrane.

Fractions (Number)	[NaCl] (M)	Absorbance (280nm)	aTTP ¹ (min: s)	AT ² activity (%)	Albumin (mg/dL)
4	PB ³	2.253	00:56	0	90
22	0.5	0.041	00:57	0	Undetectable
25	0.5	0.066	00:52	0	Undetectable
26	1.0	0.095	01:35	0	10
27	1.0	0.086	01:40	0	10

34	1.0	0.022	02:00	0	Undetectable
36	1.5	0.080	04:00	0	10
38	1.5	0.123	06:00	3.18	10
40	1.5	0.172	06:00	0.85	10
41	1.5	0.158	06:34	0.42	10
52	2.0	0.019	15:00	0.74	Undetectable
55	2.0	0.044	12:00	2.18	Undetectable

1 - Activated partial thromboplastin time; 2 - Antithrombotic activity and 3 – 10 mM phosphate buffer, pH 7.2.

The findings presented in Table 1 were corroborated with the SDS-PAGE results (Figure 2). Bands of protein can be visualized at the same position of the antithrombin standard (58 kDa) for the elutions with 1.5 and 2.0 M NaCl (see rectangle) that revealed higher aPTT and antithrombotic activity values.

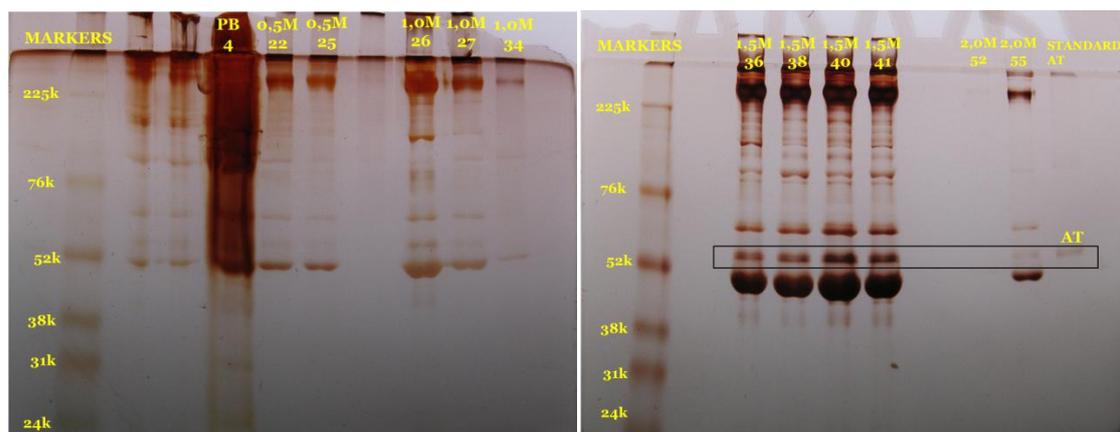


Figure 2 – SDS-PAGE of the Fractions collected from the plasma protein adsorbed onto the AAO-PANI-heparin. Elutions were carried out using phosphate buffer (PB) and increasing NaCl concentrations (0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 M). The figures indicate the number of the Fractions collected according to the Figure 1. Protein presenting different molecular weight (Markers) and a standard antithrombin were also applied to the gel for comparison analysis. The rectangle shows the Fractions that presented higher aPTT antithrombotic activity values (Table 1).

4. CONCLUSIONS

Based on the results of the use of AAO-PANI-heparin membrane to purify antithrombin from human plasma one can conclude that the derivative is capable to establish strong binding to this relevant anticoagulant protein so that only high concentrated NaCl would leach it off. Therefore, other plasmatic proteins are removed by washing the preparation with buffer and lower NaCl concentrations. The AAO-PANI-Heparin membrane is filterable and can be fitted to holder. Thus columns can be easily built up to make the purification procedure easier and to be applied in scale up conditions.

5. ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank to HEMOPE foundation (Recife, Brazil) for the antithrombin activity and albumin concentration determinations. This research was financed by CAPES and CNPq (Brazilian agencies).

6. REFERENCES

- (1) LIN, D.-J.; LINB, D.-T.; YOUNGC, T.-H.; HUANGA, F.-M.; CHENA, C.-C.; CHENGA, L.-P. *Journal of Membrane Science*, n. 245, p.137–146, 2004.
- (2) KORECKÁ, L.; JEŽOVÁ, J.; BÍLKOVÁ, Z.; BENEŠ, M.; HORÁK, D.; HRADCOVÁ, O.; SLOVÁKOVÁ, M.; VIOVY, J.. Magnetic enzyme reactors for isolation and study of heterogeneous glycoproteins. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 293, n. 1, p. 349-357, 2005.
- (3) LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n. 259, p. 680-685, 1970.
- (4) MURUGESAN, S.; XIE, J.; LINHARDT, R. J. Immobilization of heparin: approaches and applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 8, n.2, p. 90-100, 2008.
- (5) NADER, H. B.; PINHAL, M. A. S.; BAÚ, E. C.; CASTRO, R. A. B.; MEDEIROS, G. F.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L. TRINDADE, E. S.; SHINJO, S. K.; ROCHA, H. A. O.; TERSARIOL, I. L. S.; MENDES, A.; DIETRICH, C. P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, n. 6, p. 699-709, 2001.

- (6) OLIVEIRA, G. B.; CARVALHO JR., L. B.; SILVA, M. P. C. Properties of carbodiimide treated heparin. *Biomaterials*, v. 24, n. 26, p. 4777- 4783, 2003.
- (7) OLIVEIRA, G. B.; LIMA FILHO, J. L.; CAVALCANTE CHAVES, M. E.; AZEVEDO, W. M.; CARVALHO, L. B. Enzyme immobilization on anodic aluminum oxide/polyethyleneimine or polyaniline composites. *Reactive and Functional Polymers*, v. 68, n. 1, p. 27-32, 2008.
- (8) O'REILLY, M. S. Antiangiogenic antithrombin. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, v. 33, n. 7, p. 660-666, 2007.
- (9) PATNAIK, M. M.; MOLL, S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia*, v. 14, n. 6 p. 1229-1239, 2008.
- (10) PETITOU, M; CASU, B.; LINDAHL, U. 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. *Biochimie*, v. 85, n. 1-2, p. 83-89, 2003.
- (11) SALMAS, C. E.; ANDROUTSOPOULOS, G. P. Preparation and Characterization of Anodic Aluminum Oxide Films Exhibiting Microporosity. *Chemical Engineering Communications*, v. 196, n. 4, p. 407-442, 2009.
- (12) TAKHISTOV, P. Electrochemical synthesis and impedance characterization of nano-patterned biosensor substrate. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 19, n. 11, p. 1445-1456, 2004.
- (13) WIEDERMANN, C. J. Clinical review: molecular mechanisms underlying the role antithrombin in sepsis. *Critical Care*, v. 10, n. 1, p. 01-09, 2006.

