

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

AURENICE ARRUDA DUTRA DAS MERCÊS

FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COM EMPREGO DE
HEPARINA IMOBILIZADA EM SUPORTES MAGNÉTICOS

Recife,
2016

AURENICE ARRUDA DUTRA DAS MERCÊS

**FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COM EMPREGO DE
HEPARINA IMOBILIZADA EM SUPORTES MAGNÉTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de Concentração: Ciências Biológicas I

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Jackeline da Costa Maciel

Recife,
2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Mercês, Aurenice Arruda Dutra das
Fracionamento de proteínas plasmáticas com emprego de heparina
imobilizada em suportes magnéticos/ Aurenice Arruda Dutra das Mercês–
Recife: O Autor, 2016.

92 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Coorientadora: Jackeline da Costa Maciel

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Aplicada à
Saúde, 2016.

Inclui referências e anexos

- 1. Proteínas 2. Heparina 3. Plasma sanguíneo I. Carvalho Júnior,**
Luiz Bezerra de (orientador) II. Maciel, Jackeline da Costa
(coorientadora) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-106

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Parecer da comissão examinadora da dissertação de mestrado de:

AURENICE ARRUDA DUTRA DAS MERCÊS

**FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COM EMPREGO DE
HEPARINA IMOBILIZADA EM SUPORTES MAGNÉTICOS**

Aprovado em: 22/02/2016

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Orientador – Membro interno

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral
Membro externo

Prof.^a Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida
Membro suplente externo

*Aos meus pais: João Bosco e Socorro, ao meu irmão João
Bosco Filho e ao meu namorado Taciano, pelo incentivo, apoio
e amor incondicional.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por financiar a minha sabedoria, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus amados pais João Bosco e Maria do Socorro e irmão João Bosco Filho, minha família, pela dedicação, confiança, paciência, apoio incondicional e incentivo aos estudos principalmente por acreditarem em meu potencial realizando esforços para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu namorado, companheiro e amigo, Taciano, pelo amor, carinho e compreensão ao me escutar; por estar sempre presente ao meu lado, compartilhando momentos de alegria e me incentivando a seguir em frente e não desistir dos meus objetivos.

Ao meu queridíssimo orientador e “Pai Científico”, Prof. Luiz Carvalho, pelas oportunidades acadêmicas e momentos descontraídos desde a iniciação científica sempre com imensa confiança, dedicação e carinho. Obrigada por acreditar em mim.

A minha co-orientadora e amiga Prof. Dra. Jackeline Maciel, por me incentivar sempre a buscar meu crescimento pessoal e profissional, pela paciência, cumplicidade e amizade sincera.

Aos meus companheiros dos grupos IMOBIO e BMC, em especial aos queridos: Gabriela Ayres, Igor, Luiza, Sinara, Lúcia e Mariana pelas trocas de experiência e boa amizade.

Aos meus queridíssimos e amados amigos da turma do mestrado: Andriu Catena, Amanda Quintino, Romério Alencar e Priscila Leão pelos momentos de aprendizado e alegria durante o convívio dentro e fora do laboratório.

Aos meus companheiros científicos do Departamento de Física, os doutorandos Karciano e Davian, por me proporcionar uma boa amizade, troca de experiências e aprendizado multidisciplinar.

A todos os meus professores que durante o mestrado proporcionaram conhecimentos e experiências acadêmicas. Meus Sinceros agradecimentos em especial aos queridos Professores: Luiz Carvalho, Eduardo Beltrão, José Luiz e Gustavo Nascimento.

A todos os funcionários do LIKA pelo apoio e suporte, em especial aos queridos Fábio Constantino e o Senhor Otaviano.

A minha queridíssima amiga e Professora Monica Albuquerque, que desde a graduação durante o grupo PET-Parasitologia, me proporciona momentos de aprendizado, descontração, alegria e amizade sincera.

Aos queridíssimos amigos que conheci durante minha vida acadêmica, desde a graduação, que levarei sempre em minha vida: Karla Ribeiro, Ricardo Souza, Raquel Varela, Joicy Kelly, Taciana Higino, Sílvia Guedes e Renata Vieira. Vocês estão em meu coração!

*“Eu nunca vejo o que já foi feito. Eu somente
vejo o que ainda falta para ser feito.”*

Marie Curie

RESUMO

Heparina imobilizada em suportes sólidos tem sido utilizada como ligante de afinidade em processos de identificação e purificação de diversas proteínas. No presente estudo, foram sintetizados e caracterizados dois diferentes suportes magnéticos: Dacron (polietilenotereftalato) magnético (mDAC) e magnetita revestida com polianilina (MAG-PANI). Esses materiais foram utilizados como suporte para imobilização covalente de heparina e os compósitos magnéticos obtidos foram usados no fracionamento, depleção e purificação de proteínas do plasma humano. Para produzir o suporte mDAC, o Dacron foi tratado com hidrato de hidrazina, formando Dacron-hidrazida, e, em seguida, foi utilizado para formar um compósito com a magnetita, produzida por co-precipitação de sais de ferro II e III. O suporte MAG-PANI foi obtido a partir do revestimento da magnetita (obtida por coprecipitação) com polianilina através da oxidação da anilina pelo permanganato de potássio. Para imobilizar a heparina aos suportes foi necessária a ativação dos seus grupos carboxílicos com carbodiimida (EDAC) e N-hidroxissuccinimida (NHS). Análise por microscopia eletrônica mostrou que mDAC possui um tamanho de $1,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ e $14,4 \pm 0,9 \text{ nm}$ para MAG-PANI. Difrátograma de raio-X indicou a presença do Dacron nas partículas de mDAC e da polianilina em MAG-PANI e em ambos a formação do cristal de magnetita. Além disso, medidas de magnetização demonstraram um comportamento superparamagnético para as duas partículas e uma saturação magnética de 23 e 66 emu/g para mDAC e MAG-PANI, respectivamente, nas temperaturas de 293 K, 300 K e 313 K. A quantidade de heparina imobilizada foi de $51 \pm 0,1$ e $26,4 \pm 0,09 \mu\text{g}$ de heparina por mg de mDAC e MAG-PANI, respectivamente. Plasma humano foi incubado nos compósitos com heparina imobilizada covalentemente (mDAC-HEP e MAG-PANI-HEP) e posteriormente foram lavados com tampão fosfato com concentrações crescentes de NaCl (0,25; 0,5; 1,0 M). Após esse processo, os eluatos obtidos foram submetidos à eletroforese SDS/PAGE de proteínas. Foram observadas muitas proteínas nas primeiras frações que foram depletadas do plasma (albumina, por exemplo) e as frações obtidas com NaCl 1,0 M demonstraram bandas com peso molecular de 58 kDa que correspondem à antitrombina. Além disso, ao realizar a incubação com a provável antitrombina purificada com o plasma normal, o valor do teste de tromboplastina parcial ativado (TTPa) se mostrou prolongado. Isso ocorreu devido à ação anticoagulante da antitrombina que inibiu a formação da trombina e assim o plasma não coagulou. Sendo assim, o método aqui proposto se mostrou útil como ferramenta de depleção de proteínas plasmáticas e purificação da antitrombina humana apresentando as seguintes vantagens: fácil síntese e separação por afinidade magnética.

Palavras-chave: antitrombina; heparina; imobilização; partículas magnéticas; proteínas plasmáticas; purificação.

ABSTRACT

Heparin immobilized on solid supports has been used as a ligand in affinity purification processes and identification of several proteins. In the present study, two different magnetic supports were synthesized and characterized: Dacron (polyethylene terephthalate) magnetic (mDAC) and magnetite coated with polyaniline (MAG-PANI). These materials were used as supports for covalent immobilization of heparin and these magnetic obtained composites were used for the fractionation, depletion and purification of human plasma protein. To produce the support mDAC, Dacron was treated with hydrazine hydrate forming Dacron hydrazide, and then was used to form a composite with magnetite produced by co-precipitation of salts iron II and III. MAG-PANI support was obtained from the coating magnetite (obtained by co-precipitation) with polyaniline by oxidation of aniline with potassium permanganate. To immobilize the heparin on the supports it was necessary to activate its carboxyl groups with carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS). Electron microscopy analysis showed that mDAC has a size of $1.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ and $14.4 \pm 0.9 \text{ nm}$ for MAG-PANI. X-ray diffraction indicated the presence of Dacron in mDAC particles and polyaniline in PANI-MAG and formation of magnetite crystal in both preparations. Furthermore, magnetization measurements demonstrated a superparamagnetic behavior for the two particles and a magnetic saturation of 23 and 66 emu/g to mDAC and MAG-PANI, respectively, at temperatures of 293 K, 300 K and 313 K. The amount of heparin immobilized was $51 \pm 0.1 \mu\text{g}$ and $26.4 \pm 0.09 \mu\text{g}$ heparin per mg of mDAC and MAG-PANI, respectively. Human plasma was incubated with the magnetic composites of heparin (mDAC-HEP and MAG-PANI-HEP) that were subsequently washed with phosphate buffer containing increasing concentrations of NaCl (0.25; 0.5; 1.0 M). After this process, the obtained eluates were subjected to electrophoresis SDS/PAGE of proteins. Many proteins were observed in the early fractions that were depleted of the plasma (albumin, for example) and the fractions obtained from 1.0 M NaCl showed bands with a molecular weight of 58 kDa corresponding to antithrombin. Furthermore, by performing incubation with this purified antithrombin from the plasma the value of the activated partial thromboplastin time test (APTT) showed prolonged. Therefore, the proposed method has proven useful as a tool depletion of plasma proteins and purification of human antithrombin having the following advantages: facile synthesis and magnetic affinity separation.

Keywords: antithrombin; heparin; immobilization; magnetic particles; plasma proteins; purification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1** Cascata da coagulação. Fonte: Adaptado de OVERBEY et al., 2014. 18
- Figura 2** Representação esquemática da cascata da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. As grandes setas azuis correspondem à via principal da coagulação, incluindo os complexos tenase e protrombinase (círculos em vermelho). Linhas contínuas e descontínuas representam vias de ativação e inativação, respectivamente. As setas vermelhas correspondem às diversas funções da trombina, as verdes às do TFPI, as azuis às da antitrombina, alaranjado às da proteína Z e roxo às da proteína C. PC: proteína C; APC: proteína C ativada; PS: proteína S; FL: fosfolipídios; tPA: plasminogênio tissular; Ca²⁺: cálcio; FT: fator tissular; i: inativo; EPCR: receptor endotelial da proteína C; ZPI: protease dependente da proteína Z; TAFI: inibidor da fibrinólise ativado pela trombina. Fonte: REZENDE, 2010. 20
- Figura 3** Estrutura terciária da α -antitrombina. Fonte: Adaptado de: <http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2014/SC/c4sc01295j/c4sc01295j-f1.gif> 21
- Figura 4** Ação fisiológica de inibição exercida pela interação da antitrombina com heparina na cascata da coagulação. Fonte: Adaptado de: http://www.nature.com/nrcardio/journal/v11/n3/images_article/nrcardio.2013.211-f1.jpg. 22
- Figura 5** Estrutura molecular da heparina. Fonte: Adaptado de LEE et al., 2013. 25
- Figura 6** Interação das proteínas com a heparina carregada negativamente. Fonte: Adaptado de ESKO et al., 2009. 25
- Figura 7** Ligação entre heparina e antitrombina. Fonte: Disponível em: <http://en.academic.ru/pictures/enwiki/65/Antithrom%2Bheparin.jpeg> 26
- Figura 8** Esquema de ativação dos grupos carboxílicos por EDAC/NHS. Fonte: Adaptado de HERMANSON, 2008. 27
- Figura 9** Princípios da cromatografia de afinidade à heparina. (a) representa a 1ª etapa que corresponde à imobilização da heparina em um suporte ou

coluna. (b) ilustra a incubação do suporte com as proteínas do plasma humano e a interação das proteínas que tem afinidade com a heparina. (c) demonstra a formação de um complexo de ligação entre a heparina e proteína específica com posterior eluição e purificação desta proteína. Fonte: Elaborado pela autora (2016).

- Figura 10** Estrutura do Polietinotereftalato formado pela condensação do ácido tereftálico e etileno glicol. Fonte: Disponível em <http://allchemy.iq.usp.br/agregando/ABQ/oqsp07red/11a.gif> 28 33
- Figura 11** Formação de Dacron-hidrazida a partir da reação de hidrazinólise do Dacron. Em destaque (vermelho) o grupo hidrazida formado. Fonte: Elaborado pela autora (2016). 34
- Figura 12** Estrutura da polianilina. Fonte: Adaptado de BALINT et al., 2014. 35
- Figura 13** Estruturas químicas da polianilina em diferentes estados de oxidação. Fonte: Adaptado de JARAMILLO-TABARES, et al., 2012. 36
- Figura 14** Procedimento realizado na técnica de separação por afinidade magnética. Fonte: Adaptado de CHEN et al., 2011. 37
- Figura 15** Procedimento geral realizado para separação magnética para a realização de análises biológicas. Fonte: Adaptado de He et al., 2014. 38

ARTIGO 1

- Figure 1** SEM images and EDX of Dacron hydrazide (a) and mDAC (b). 57
- Figure 2** X-ray diffraction patterns of magnetite (M), Dacron (D) and mDAC particles (mDAC). 58
- Figure 3** Hysteresis curves at 293 K, 300 K and 313 K for MAG (a) and mDAC (b). 59
- Figure 4** Infrared spectra of MAG, Dacron-hydrazide; mDAC and mDAC-HEP (In ascending order). 1: Band of NH₂ group of the hydrazide; 2: Band of amide I; 3: Band of amide II. 60
- Figure 5** Activity removed of antithrombin present in fresh plasma and after direct contact with the mDAC derivatives. Immediately synthesized (a) and 2 years stored (b). 61
- Figure 6** Activated partial thromboplastin time (aPTT) of fresh plasma performed by adding small aliquot of the eluate (1.0 M) of mDAC derivatives.

	Immediately synthesized (a) and 2 years stored (b).	62
Figure 7	Electrophoresis of protein fractions of plasma obtained with the use of magnetic particles. Elutions were carried out using increasing NaCl concentrations (0.25; 0.5 and 1.0 M) in the magnetic derivatives: mDAC-HEP (a) and mDAC (b). AT: Standard Antithrombin. (0): Elutions performed in supports immediately synthesized. (24): Elutions performed in supports stored for 24 months. Arrows: Antithrombin (58 kDa).	62
Figure 8	Schematic route of mDAC-HEP composite synthesis. Dacron is firstly hydrolyzed under hydrazine hydrate that introduces amino group and subsequently co-precipitated with Fe^{2+} and Fe^{3+} . Hep is simultaneously functionalized with EDAC/NHS. Finally, magnetic Dacron-hydrazide and functionalized Hep are incubated to form mDAC-HEP.	63
 ARTIGO 2		
Figure 1	Images obtained by transmission electron microscopy of the synthesized magnetic particles. (A) MAG. (B) MAG-PANI.	72
Figure 2	X-ray diffraction patterns of MAG (magnetite bare) and MAG-PANI (magnetite coated with polyaniline). (P) polyaniline phase. (M) magnetite phase.	73
Figure 3	Hysteresis curve obtained for the synthesized magnetic particles. (A) MAG-PANI. (B) MAG.	74
Figure 4	Elution of plasma proteins based on the affinity to the MAG-PANI-HEP composite.	75
Figure 5	Electrophoresis performed from protein eluates obtained in plasma fractionation. (A) Samples extracted with 0.25M NaCl (F1, F2 and F3); 0.5 M (F4, F5 and F6); (B) Samples extracted with 1.0 M (F7, F8 and F9).	76

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1	Trabalhos publicados na literatura sobre diferentes processos de isolamento, identificação e purificação de antitrombina. Fonte: Adaptado de He et al., 2014.	30
-----------------	---	----

ARTIGO 2

Table 1	Activated partial thromboplastin time (APTT) measures of plasma.	77
---------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	absorbância
Arg	arginina
AT	antitrombina
Dacron	polietilenotereftalato
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
emu	unidades eletromagnéticas
Fe₃O₄	magnetita
γFe₂O₃	hematita
GAG	glicosaminoglicano
HEP	heparina
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
kDa	kilodalton
KMnO₄	permanganato de potássio
Lys	lisina
MAG	magnetita
MAG-PANI	magnetita revestidas com polianilina
MAG-PANI-Hep	magnetita revestida com polianilina com heparina imobilizada
mDAC	Dacron magnético
mDAC-Hep	Dacron magnético com heparina imobilizada
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
NHS	N-hidroxi-succinamida
NMR	ressonância nuclear magnética
Oe	oersted
PANI	polianilina
PET	Polietileno tereftalato
rpm	rotações por minuto
SB	sobrenadante
SPR	ressonância de plasmon de superfície

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	HEMOSTASIA	18
2.1.1	ANTITROMBINA	20
2.2	PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	23
2.2.1	DEPLEÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	23
2.3	HEPARINA	24
2.3.1	INTERAÇÃO HEPARINA E PROTEÍNAS	25
2.3.2	IMOBILIZAÇÃO DA HEPARINA	26
2.4	CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE À HEPARINA	28
2.4.1	PURIFICAÇÃO DA ANTITROMBINA	29
2.5	SUPORTES MAGNÉTICOS	31
2.5.1	PARTÍCULAS MAGNÉTICAS	32
2.5.2	DACRON MAGNÉTICO	33
2.5.3	MAGNETITA REVESTIDA COM POLIANILINA	35
2.6	SEPARAÇÃO MAGNÉTICA	36
3	REFERÊNCIAS	40
4	OBJETIVOS	51
4.1	OBJETIVO GERAL	51
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
5	ARTIGO 1	52
6	ARTIGO 2	67
7	CONCLUSÃO	82
8	PERSPECTIVAS	82
	ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

A hemostasia é um processo fisiológico que tem como objetivo manter o fluxo sanguíneo no interior dos vasos e cessar a perda sanguínea. Trata-se de um processo multifuncional que envolve a participação de vários componentes celulares e acelulares, incluindo a resposta vascular, agregação plaquetária e a cascata de coagulação. Distúrbios da hemostasia podem estar associados tanto com hemorragia ou com doenças tromboembólicas (BERGER et al., 2014). Esse processo pode ser afetado por anormalidades genéticas, condições patológicas e pela entrada de fatores exógenos, tais como toxinas de origem animal, alérgenos ou medicamentos (HIREMATH et al., 2016).

O mecanismo bioquímico do sistema hemostático da coagulação gera enzimas tais como a trombina, que precisam ser inibidas, após exercer sua função e se houver um distúrbio desta inibição ocasiona coagulação sistêmica descontrolada (MOORE et al., 2015). Desta forma, o controle fisiológico deste processo é determinado por anticoagulantes naturais, tais como a antitrombina (AT) que inibe a trombina e outros fatores de coagulação (FERNÁNDEZ e VILLAMEDIANA, 2012).

A heparina é um polissacarídeo linear sulfatado pertencente à família dos glicosaminoglicanos, que tem sido utilizada na clínica devido à sua propriedade anticoagulante (VISKOV et al., 2013). Além disso, é bastante conhecida por apresentar afinidade com várias proteínas, as chamadas “proteínas de ligação à heparina”, tais como o fator de crescimento de fibroblastos básico, fator de crescimento endotelial vascular, fibronectina e AT, além de desempenhar um importante papel na regulação da atividade e estabilidade destas proteínas (ARISAKA et al., 2013). A interação da heparina com a AT foi o primeiro caso relatado de uma interação de significado fisiológico entre a heparina e uma proteína específica (CAPILA e LINHARDT, 2002). Essas interações ocorrem devido a presença dos sítios de ligação nas proteínas que contêm aminoácidos básicos (Lys e Arg) cujas cargas positivas, provavelmente, interagem com os grupamentos sulfatos e carboxilatos (carregados negativamente) presentes nas cadeias da heparina (ESKO et al., 2009).

Quando imobilizada, a heparina pode interagir com fatores da coagulação, funcionando como um ligante de afinidade, capaz de interagir com proteínas, o que a literatura descreve como “cromatografia de afinidade à heparina” (KRAPPENBAUER e FOUNTOULAKIS, 2009). A heparina imobilizada em suportes sólidos é amplamente utilizada na cromatografia de afinidade para a purificação e identificação dessas proteínas que são capazes de se ligar à glicosaminoglicano (MURUGESAN et al., 2008). Desta forma a

heparina tem sido utilizada em processos de purificação e identificação de proteínas da cascata da coagulação sanguínea (LI et al., 2009). Além disso, a elevada afinidade de ligação da AT com a heparina tem sido utilizada em sistemas de cromatografia de afinidade para o isolamento da AT a partir do plasma (HEGER et al., 2002). No processo de imobilização é comum o uso de suportes insolúveis em água que apresentem: resistência física, estabilidade mecânica e térmica à biomolécula imobilizada (CARAMORI e FERNANDES, 2004). E, quando magnetizados, a recuperação do compósito suporte-biomolécula pode facilmente ser obtida mediante a aplicação de um campo magnético externo (MACIEL, 2012).

Portanto, este trabalho propõe a síntese de compósitos magnéticos com heparina covalentemente imobilizada e sua aplicação no fracionamento e isolamento de proteínas do plasma humano com base na cromatografia de afinidade à heparina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

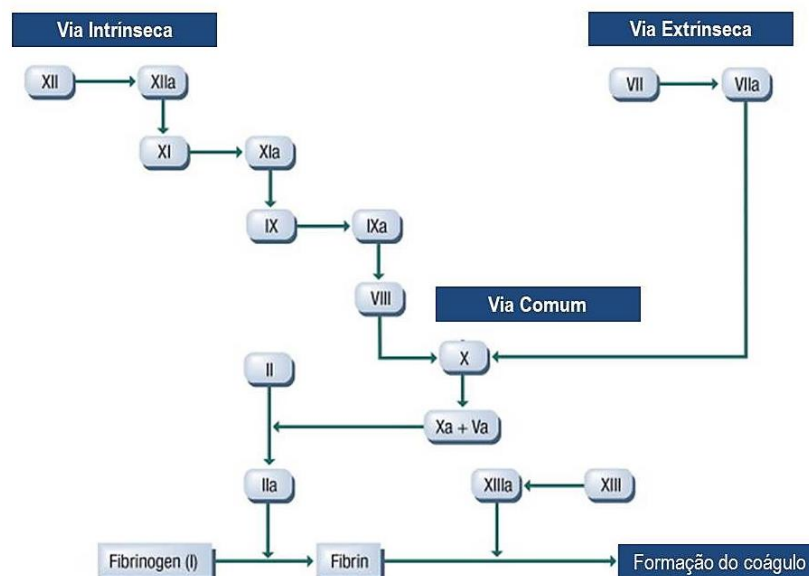
2.1 HEMOSTASIA

A hemostasia é um processo fisiológico que tem como objetivo manter o fluxo sanguíneo no interior dos vasos e cessar a perda sanguínea. Além disso, é um mecanismo complexo de defesa, responsável pelo controle da perda de sangue resultante de uma lesão vascular. Trata-se de um processo multifuncional e bem regulado que envolve a participação de vários componentes fisiológicos celulares e acelulares, incluindo a resposta vascular, agregação plaquetária e a cascata de coagulação. Distúrbios da hemostasia podem estar associados tanto com hemorragia ou com doenças tromboembólicas (BERGER et al., 2014).

Sendo assim, a hemostasia é fortemente regulada, onde qualquer condição clínica possibilita biomarcadores para o diagnóstico. Esse processo pode ser afetado por anormalidades genéticas, condições patológicas e pela entrada de fatores exógenos, tais como toxinas de origem animal, alérgenos ou medicamentos (HIREMATH et al., 2016).

De uma forma geral, a cascata da coagulação consiste em uma série de reações proteolíticas através de serinas proteases geradas a partir de zimogênios. O evento final é a formação de um coágulo de fibrina que pode parar uma hemorragia em um vaso danificado. Convencionalmente, estas reações foram divididas em três vias (figura 1), a via extrínseca: fator tecidual e fator VII; via intrínseca: fatores VIII, IX e XI e via comum: fatores II, V e X (CUGNO et al., 2014).

Figura 1 - Cascata da coagulação.



Fonte: Adaptado de OVERBEY et al., 2014.

Quando ocorre um dano ao vaso, o fator tecidual (FT) é exposto e liga-se ao fator VII-VIIa, assim a via extrínseca é ativada iniciando o processo de coagulação (FURIE e FURIE, 1988; REZENDE, 2010).

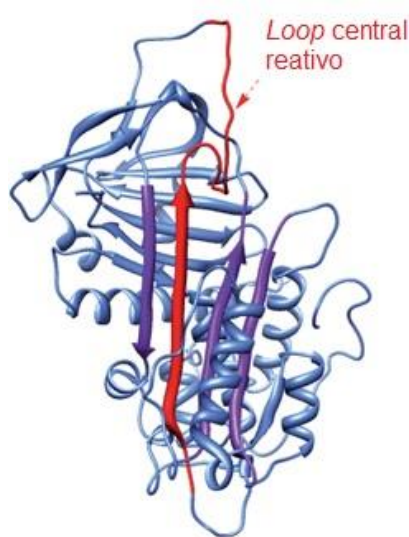
Enquanto que na via intrínseca, a ativação do fator XII ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Tal processo é denominado "ativação por contato" e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O fator XII, assim ativado, ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IX ativado, na presença de fator VIII ativado por traços de trombina e em presença de íons cálcio (complexo tenase), ativa o fator X da coagulação desencadeando a geração de trombina e, subsequentemente, formação de fibrina (DAVIE et al., 1991; REZENDE, 2010).

O mecanismo bioquímico do sistema hemostático da coagulação gera enzimas tais como a trombina, que precisam ser inibidas, após exercer sua função e, se houver um distúrbio desta inibição, ocasiona coagulação sistêmica descontrolada (MOORE et al., 2015).

Desta forma, o controle fisiológico deste processo é determinado por anticoagulantes naturais, tais como a antitrombina que inibe a trombina e outros fatores de coagulação; a proteína C e S, as quais inibem os fatores V e VIII; e o mecanismo fibrinolítico responsável pela dissolução de fibrina (FERNÁNDEZ e VILLAMEDIANA, 2012). A figura 2 representa todo o processo que ocorre na cascata da coagulação.

seu efeito anticoagulante, a AT também possui propriedades anti-inflamatórias, que é observado quando há uma elevada concentração deste inibidor presente no sangue (MARIE et al., 2015). Com um peso molecular de 58 kDa, a AT é sintetizada no fígado e circula no plasma sanguíneo em duas formas principais onde a isoforma predominante, a α -isoforma, constitui cerca de 90% do total de antitrombina do plasma. A estrutura terciária da AT (figura 3) baseia-se numa cadeia simples com cinco folhas α - β e um *loop* central móvel de reação (HEGER et al., 2002).

Figura 3 - Estrutura terciária da α -antitrombina.



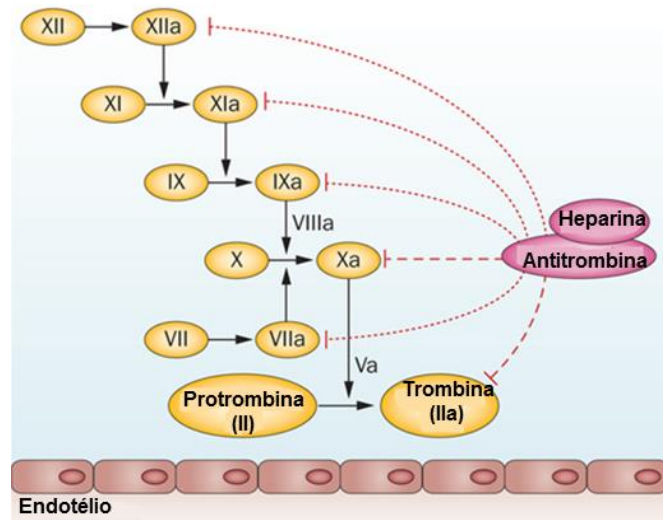
Fonte: Adaptado de:

<http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/ArticleImage/2014/SC/c4sc01295j/c4sc01295j-f1.gif>

Estima-se que a AT proporciona 80% do efeito anticoagulante natural contra a trombina, e o seu amplo espectro de inibição a torna um regulador chave do sistema de coagulação (ORNAGHI et al., 2014).

A inibição da trombina realizada pela AT é fortemente aumentada pela sua ligação a sequências específicas de monossacarídeos presentes na heparina (figura 4), glicosaminoglicanos e outros proteoglicanos que estão na circulação ou ao longo das superfícies endoteliais (KARLSSON e WINGE, 2004).

Figura 4 - Ação fisiológica de inibição exercida pela interação da antitrombina com heparina na cascata da coagulação.



Fonte: Adaptado de: http://www.nature.com/nrcardio/journal/v11/n3/images_article/nrcardio.2013.211-f1.jpg.

A deficiência da antitrombina está associada com um risco aumentado de tromboembolismo venoso principalmente durante a gravidez (KOVAC et al., 2014). A deficiência hereditária da AT é uma doença trombótica autossômica dominante e está associada com a incidência de tromboembolismo venoso (MARUYAMA et al., 2013). Embora essa deficiência seja incomum, tem sido relatada entre 0,07% - 0,16% da população geral e está presente em 1 a 8 % dos pacientes com trombofilia, por isso a necessidade da determinação dos níveis de AT em todos os pacientes com trombofilia (MOORE et al., 2015).

A deficiência da antitrombina pode ser herdada ou adquirida e pode ser classificada em dois tipos: tipo I e tipo II. O primeiro é caracterizado pelas condições de deficiência na AT e sua atividade. Esses valores são reduzidos para aproximadamente 50% nos heterozigotos e mais de 80 mutações já foram relatadas em pacientes com a deficiência do tipo I. Enquanto que a do tipo II é caracterizada por um nível normal da AT, porém apresenta uma deficiência funcional o que leva a sua baixa atividade (WAHED e DASGUPTA, 2015). Há também um subtipo de deficiência funcional que está relacionado a um defeito no local de ligação da heparina, a do tipo II HBS. Ao contrário das outras formas de deficiência de AT, a do tipo II HBS representa um risco trombótico menor na sua forma heterozigótica, enquanto a deficiência homozigótica é caracterizada pelo aparecimento precoce de trombose arterial e venosa (KOVAC et al., 2014).

2.2 PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

O plasma humano contém proteínas com uma ampla gama de funções biológicas e é um dos fluidos biológicos mais comumente utilizados para o diagnóstico clínico (KULLOLLI et al., 2013). Este complexo de proteínas está associado a diversos processos que ocorrem no organismo, desta forma, no plasma é possível encontrar proteínas relacionadas com a progressão de doenças e que podem ser uma fonte de biomarcadores (AHN e KHAN, 2014).

Albumina, Imunoglobulina G (IgG), Imunoglobulina A (IgA), transferrina, haptoglobina e α -1-antitripsina representam 90% da massa de proteína no plasma sanguíneo (JAVANMARD et al., 2014) e tendem a mascarar as proteínas de menor abundância e esse é o maior problema para os estudos que envolvem, por exemplo, amostras de soro ou plasma (KARATAS et al., 2007).

A capacidade de identificar e quantificar as proteínas de baixa abundância no plasma facilita sua análise proteômica e a busca de biomarcadores de doenças (KULLOLLI et al., 2013).

2.2.1 DEPLEÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Nos últimos anos, a proteômica tem auxiliado no desenvolvimento de métodos de diagnóstico para várias doenças. Com essas tecnologias é possível detectar e identificar compostos específicos que podem ser usados como marcadores de diagnóstico, pois essas substâncias encontram-se presentes apenas em células e tecidos doentes ou secretadas para o ambiente externo ou interno do organismo nas doenças (BORMOTOVA et al., 2015).

Nas amostras biológicas, tais como plasma ou soro há milhares de proteínas diferentes e um dos maiores desafios da análise dessas amostras é a elevada dinâmica dos peptídeos e proteínas com concentrações elevadas (FISCHNALLER et al., 2014). Dessa forma, a proteômica é um campo de crescimento rápido que se dedica ao estudo e descoberta de biomarcadores, no entanto se limita devido à presença das proteínas de grande abundância no plasma. Como consequência dificulta a detecção das proteínas de baixa abundância, que são mais susceptíveis de serem biomarcadores (MAHN e ISMAIL, 2011).

Para analisar os componentes de baixa abundância, as proteínas de alta abundância, em especial a albumina, devem ser removidas por adsorção a corantes imobilizados, através de extração por imunoafinidade ou captura de afinidade via peptídeos imobilizados (ANDAC et al., 2013). Por isso, vários métodos e adsorventes tem sido desenvolvidos e aplicados para reduzir a complexidade do plasma, essas técnicas apresentam desvantagens consideráveis, tais como o alto custo, instrumentação cara, etc.

Nenhum método analítico estabelecido até hoje pode esclarecer completamente toda a dinâmica das proteínas presentes no plasma ou soro. Porém, existe um método disponível para fracionar ou remover as proteínas da amostra através de colunas de depleção, construídas de modo a remover de uma forma geral as proteínas mais abundantes dos fluidos corporais. As colunas existentes são baseadas em anticorpos, anticorpos variantes e recombinantes ou outro tipo de matriz de afinidade modificada (SUNDEBERG et al., 2015). O maior inconveniente é o volume da amostra limitada, o que requer passos pré-analíticos demorados e resultando em amostras muito pequenas para a próxima análise, limitando medições repetitivas, intra e inter precisão das amostras e geração de dados confiáveis (UZUN et al., 2013).

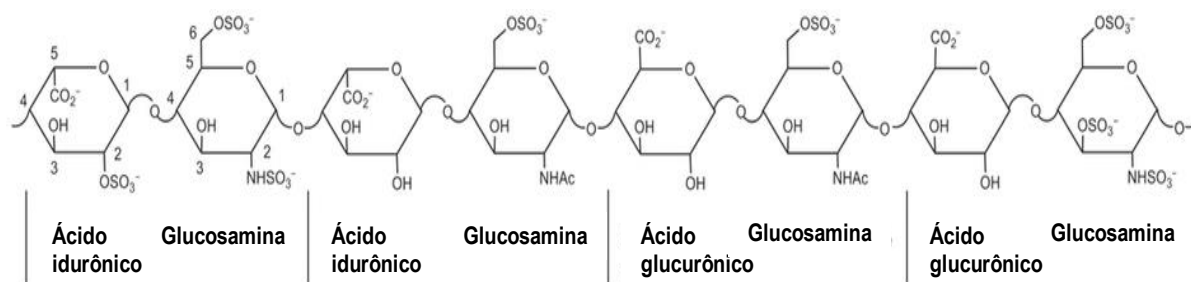
2.3 HEPARINA

A heparina foi descoberta em 1916 e sua aplicação como anticoagulante na clínica ocorre desde 1935 (SAKIYAMA-ELBERT, 2014), além disso, vem sendo amplamente utilizada no tratamento de tromboembolismo (MOURIER et al., 2015).

Ao longo das últimas décadas, foi mostrado que a heparina está envolvida em muitos processos biológicos, através da sua interação com um elevado número de proteínas (LEVER e PAGE, 2012) e que também está envolvida na regulação de eventos importantes como a sinalização celular e o controle de uma variedade de funções biológicas (HANSEN et al., 2013).

Sob o ponto de vista molecular, a heparina (figura 5) é um polissacarídeo pertencente à família dos glicosaminoglicanos (GAGs) de cadeia linear polimérica altamente sulfatada, formada por unidades repetidas de dissacarídeos constituídos por um ácido urônico (glucurônico ou idurônico) e uma glucosamina (MOURIER et al., 2015) seu peso molecular varia de 5 kDa a 50 kDa, com peso médio de 15 kDa (VIEIRA, 2012).

Devido a esta estrutura a heparina possui a mais alta densidade de carga negativa, quando comparada a qualquer outra macromolécula biologicamente ativa, (CAPILA e LINHARDT, 2002), o que permite sua interação com um alto número de proteínas diferentes (FLENGSRUD e ANTONSEN, 2015).

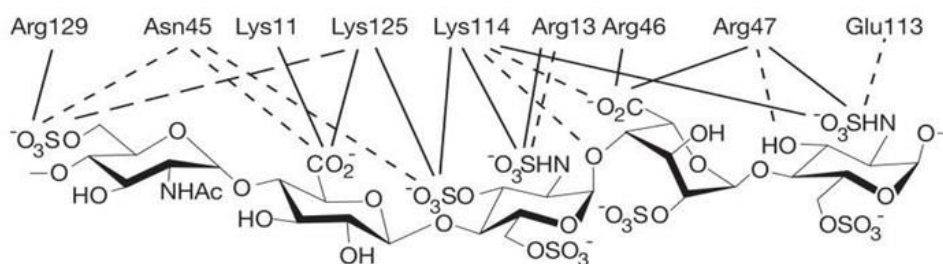
Figura 5 - Estrutura molecular da heparina.

Fonte: Adaptado de LEE et al., 2013.

2.3.1 INTERAÇÃO HEPARINA E PROTEÍNAS

Numerosos métodos e abordagens têm sido utilizados para estudar as interações entre os glicosaminoglicanos e as proteínas, tais como: ensaios de fase sólida e ligação à filtros, cromatografia de afinidade, técnicas de eletroforese (POWELL et al., 2004); Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR), cristalografia de raios X, espectroscopia de RNM (LAGURI et al., 2011), afinidade proteômica (ORI et al., 2011) e ensaios com carboidratos (ROGERS et al., 2011) incluindo matrizes de GAG sondados por imagens de SPR (FAYE et al., 2009).

Mais de 400 proteínas, por exemplo, proteínas extracelulares, fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas, enzimas, lipoproteínas que estão envolvidas numa variedade de processos biológicos, tais como formação da matriz extracelular, desenvolvimento, sinalização e câncer são capazes de interagir com a heparina (PEYSSELON e RICARD-BLUM, 2014). Os sítios de ligação dessas proteínas sempre contêm aminoácidos básicos (Lys e Arg) cujas cargas positivas, provavelmente, interagem com os grupamentos sulfatos e carboxilatos (carregados negativamente) presentes nas cadeias da heparina (ESKO et al., 2009) como demonstrado na figura 6.

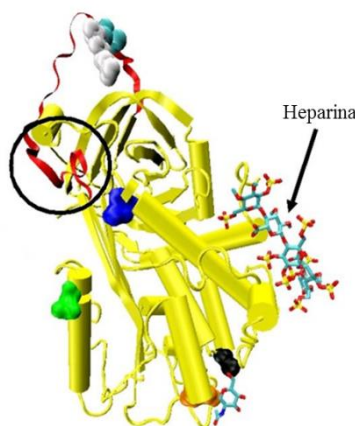
Figura 6 - Interação das proteínas com a heparina carregada negativamente.

Fonte: Adaptado de ESKO et al., 2009.

Essas proteínas tais como fator de crescimento de fibroblastos básico, fator de crescimento endotelial vascular, fibronectina e antitrombina são descritas na literatura como “proteínas de ligação à heparina”, pois apresentam uma elevada afinidade em interagir com a heparina. Além disso, a heparina desempenha um importante papel na regulação da atividade e estabilidade destas proteínas (ARISAKA et al., 2013).

A interação da heparina com a antitrombina (figura 7) foi o primeiro caso relatado de uma interação de significado fisiológico entre a heparina e uma proteína específica (CAPILA e LINHARDT, 2002). Uma eficiente regulação da atividade da antitrombina requer a presença da heparina que possibilita o aumento da atividade de inibição da AT em milhares de vezes (MARIE et al., 2015).

Figura 7 - Ligação entre heparina e antitrombina.



Fonte: Disponível em: <http://en.academic.ru/pictures/enwiki/65/Antithrom%2Bheparin.jpeg>

2.3.2 IMOBILIZAÇÃO DA HEPARINA

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

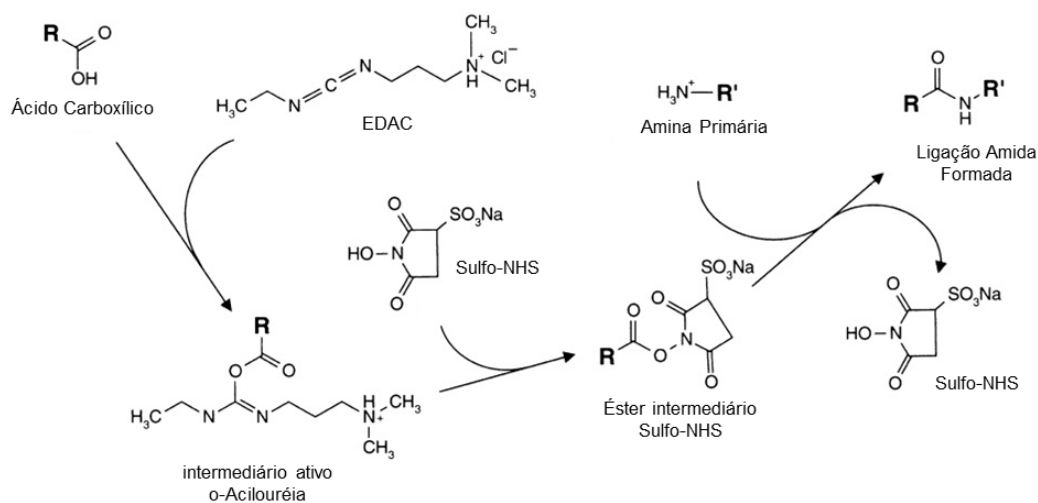
O tipo de suporte, o processo escolhido para a imobilização e as propriedades dos derivados imobilizados depende muito da sua aplicação (GUISAN, 2006). Entre os vários processos já conhecidos para imobilização de biomoléculas, o emprego da imobilização por ligação covalente é o que está associado a uma estabilidade da biomolécula imobilizada.

Nesse método ocorre uma reação química entre grupos funcionais da molécula e grupos reativos presentes no suporte. Desta forma a imobilização covalente da biomolécula proporciona uma fixação mais durável e evita a perda da biomolécula por meio de lixiviação, quando estiver em contato com solventes durante a análise (PAGÁN et al., 2015).

A heparina imobilizada em suportes sólidos é amplamente utilizada na cromatografia de afinidade para a purificação e identificação nas chamadas “proteínas de ligação à heparina”. Por apresentar grupos funcionais (sulfatos e carboxilatos) reativos, a heparina é facilmente imobilizada a uma matriz, por isso o seu uso tem sido alvo de pesquisas na área de imobilização de biomoléculas (MURUGESAN et al., 2008).

Para que ocorra a ligação covalente da heparina, primeiramente é necessário que seus grupos carboxílicos passem por um processo de ativação através da adição de EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida). O EDAC ativa os grupos carboxílicos da heparina levando à formação do *o*-acilureia, um composto intermediário, que apresenta um grupamento éster bastante reativo e fácil de sofrer hidrólise. Para resolver esse problema é adicionado o NHS (*N*-hidroxi-succinamida) que vai reagir com o grupo éster do composto intermediário deixando-o mais estável. Logo, em presença de um grupamento amino do suporte, este irá reagir com a carbonila do éster formando uma ligação amida (HERMANSON, 2008). A reação está ilustrada na figura 8. Estudos realizados por Oliveira et al. (2003) avaliaram as propriedades da heparina modificada com EDAC/NHS e relataram essa ativação como importante processo para imobilização da heparina em materiais.

Figura 8 - Esquema de ativação dos grupos carboxílicos por EDAC/NHS.

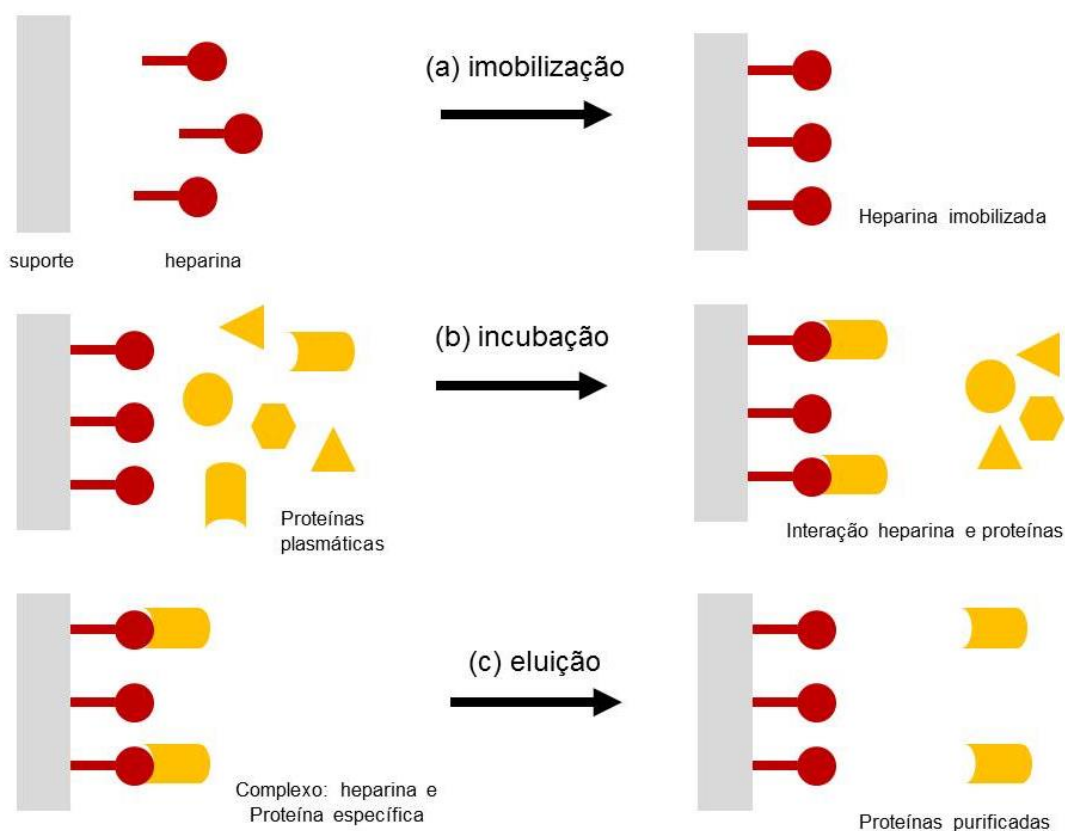


Fonte: HERMANSON, 2008. Adaptado.

2.4 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE À HEPARINA

Quando imobilizada, a heparina pode interagir com fatores da coagulação, funcionando como um ligante de afinidade, capaz de interagir com estas proteínas (KRAPPENBAUER e FOUNTOULAKIS, 2009), isso é o que a literatura descreve como cromatografia de afinidade à heparina. Este método (figura 9) ocorre devido à interação (afinidade) entre as moléculas de interesse e a heparina imobilizada ao suporte insolúvel (FAROOQUI, 1980; XIONG et al., 2008).

Figura 9 - Princípios da cromatografia de afinidade à heparina. (a) representa a 1ª etapa que corresponde à imobilização da heparina em um suporte ou coluna. (b) ilustra a incubação do suporte com as proteínas do plasma humano e a interação das proteínas que tem afinidade com a heparina. (c) demonstra a formação de um complexo de ligação entre a heparina e proteína específica com posterior eluição e purificação desta proteína.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

Em geral, este método de cromatografia de afinidade é bastante utilizado para fracionar ou purificar proteínas e outras substâncias biológicas que podem interagir com a heparina. A elevada afinidade de ligação da AT com a heparina tem sido utilizada em sistemas de cromatografia de afinidade para o isolamento da antitrombina a partir do plasma (HEGER et

al., 2002). Embora a cromatografia de afinidade seja uma boa abordagem para estudar essa interação entre a antitrombina e a heparina, até agora essa metodologia não foi explorada para determinar constantes de ligação entre estes dois ligantes (MARIE et al., 2015).

Cromatografia de afinidade à heparina também tem sido utilizada para purificar lactoferrina a partir de leite de cabra, bovino e humano. Além disso, também é utilizada para purificar alguns fatores de crescimento (fator de betacelulina e fator de crescimento de fibroblastos básico) a partir do soro de leite bovino (OUNIS et al., 2008).

Recentemente, Bjarnadóttir e Flensrud (2014) utilizaram cromatografia de afinidade à heparina para detectar proteínas do plasma humano e foi observado que entre essas proteínas muitas eram biomarcadores já descritos na literatura. Hu et al. (2010) utilizaram a cromatografia de afinidade à heparina para purificação do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos em cultura de célula, chegando a remover das células cerca de 96% desse vírus. A separação de pequenos componentes proteicos presentes no soro do leite foram isolados por Ounis et al. (2008) utilizando a cromatografia de afinidade à heparina.

A alta afinidade de ligação da heparina a várias proteínas, incluindo fatores de crescimento, tem sido relacionada com a sua carga líquida negativa em pH neutro (KAWAKAMI et al., 2006; FENG et al., 2004). Além disso, o uso da cromatografia de afinidade à heparina pode ser aplicada como uma estratégia para remover seletivamente algumas proteínas de grande abundância, facilitando a análise de proteínas de baixa concentração no plasma. Já foi demonstrado que a albumina pode ser removida, por exemplo, através de técnicas de colunas de imunoafinidade, aprisionamento isoelétrico e cromatografia de afinidade (LEI et al., 2008).

2.4.1 PURIFICAÇÃO DA ANTITROMBINA

Como já mencionado anteriormente, o uso da cromatografia de afinidade à heparina é o método mais utilizado no processo de isolamento ou purificação da antitrombina a partir do plasma humano. De acordo com a tabela 1, a purificação da antitrombina baseada na sua ligação por afinidade à heparina foi descrita há quatro décadas e continua até os dias de hoje, utilizando diferentes metodologias como mostrado nesta tabela.

Tabela 1 – Trabalhos publicados na literatura sobre diferentes processos de isolamento, identificação e purificação de antitrombina.

Título do Trabalho	Metodologia para purificação/ isolamento/ identificação	Autores/ Ano de publicação
A fast capillary electrophoresis method to assess the binding affinity of recombinant antithrombin toward heparin directly from cell culture supernatants.	Foi determinada a afinidade de ligação entre uma nova geração de recombinante de antitrombina e heparina, com base no método de electroforese capilar por afinidade de equilíbrio dinâmico.	MARIE et al., 2015.
Purification and characterization of a1-proteinase inhibitor and antithrombin III: major serpins of rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) and carp (<i>Cyprinus carpio</i>) blood plasma.	Uso de colunas comerciais de cromatografia de afinidade.	MICKOWSKA, 2009.
Purification and characterization of recombinant human antithrombin containing the prelatent form in Chinese hamster ovary cells.	Coluna de cromatografia de afinidade à heparina comercial.	MOCHIZUKI et al., 2005
A novel matrix for high performance affinity chromatography and its application in the purification of antithrombin III.	Cromatografia de afinidade de alta eficiência baseada na imobilização da heparina em uma matriz de fibra de viscose.	ZHAO et al., 2005
Separation of latent, prelatent, and native forms of human antithrombin by heparin affinity high-performance liquid chromatography.	Colunas comerciais de heparina.	KARLSSON e WINGE, 2004.
Separation of active and inactive forms of human antithrombin by heparin affinity chromatography.	Duas etapas de cromatografia de afinidade à heparina utilizando colunas comerciais.	HEGER et al., 2002.
Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use.	Revisão sobre os principais métodos de purificação das proteínas plasmáticas, onde menciona a cromatografia de afinidade à heparina como melhor método para purificação da antitrombina.	BURNOUF e RADOSEVICH, 2001.
The interactions between antithrombin III, thrombin and surface immobilized heparin.	Heparina imobilizada em pérolas de poliestireno carboxiladas; cromatografia de afinidade à heparina.	VAN DELDEN, ENGBERS e FEIJEN, 1996.
A Highly Purified Antithrombin III Concentrate Prepared From Human Plasma Fraction IV-1 by Affinity Chromatography.	Colunas comerciais de cromatografia de afinidade à heparina	LEBING et al., 1994.
Isolation of plasma proteins from	Uso de suportes à base agarose e	JOSIC, BAL e SCHWINN, 1993.

the clotting cascade by heparin affinity chromatography.	outros polímeros, como matriz de afinidade, para purificação da antitrombina via cromatografia de afinidade.	
Purification and Large-Scale Preparation of Antithrombin III	Cromatografia de afinidade à heparina com Ultrogel de Heparina	HOFFMAN, 1989.
Isolation and Characterization of an Antithrombin III Variant with Reduced Carbohydrate Content and Enhanced Heparin Binding	Cromatografia com uso de plasma normal em Heparina-Sepharose.	PETERSON e BLACKBURN, 1985.
Development of Large Scale Fractionation Methods VII. Preparation of Antithrombin III Concentrate	Cromatografia de afinidade por Heparina-Sepharose.	WICKERHAUSER, WILLIAMS e MERCER, 1979.
Purification Of Antithrombin III By Affinity Chromatography.	Cromatografia de afinidade à heparina em gel de Sepharose.	MILLER-ANDERSSON, BORG e ANDERSSON, 1974.

2.5 SUPORTES MAGNÉTICOS

Na escolha de um suporte para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físico-químicas, além da possibilidade de regeneração do material (MACIEL, 2012). Os suportes utilizados para imobilização de biomoléculas devem apresentar um bom perfil como resistência física, insolubilidade, resistência a ataques microbianos, além de estabilidade mecânica e térmica (CARAMORI e FERNANDES, 2004). E, quando magnetizados, a recuperação do compósito suporte-biomolécula pode facilmente ser obtida mediante a aplicação de um campo magnético.

A literatura descreve o uso de diferentes partículas magnéticas como suportes para imobilização de biomoléculas, alguns exemplos são: Dacron magnético para imobilização de heparan sulfato (MERCÊS et al., 2015) e tripsina (AMARAL et al., 2006); terra de diatomáceas magnética e argila magnética para imobilização de invertase (CABRERA et al., 2014); levana magnética para imobilização de tripsina (MACIEL et al. 2012); nanopartículas de magnetita modificadas com APTES (3-aminopropiltriétoxisilano) e funcionalizadas com glutaraldeído para imobilização de albumina (MALTAS et al. 2011); magnetita revestida com polianilina para imobilização de β -galactosidase (NERI et al, 2011) e tripsina (MACIEL et al., 2016).

2.5.1 PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

As partículas magnéticas foram empregadas pela primeira vez na década de 1940 como uma nova tecnologia no tratamento de água poluída (ARIAS et al., 2001). Nanopartículas à base de óxido de ferro podem ser sintetizadas por diferentes formas (NICOLÁS et al., 2013), por exemplo: co-precipitação dos íons $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ em uma solução aquosa utilizando uma base como agente de precipitação (WU et al., 2007; FRIED et al., 2001), técnicas de sol-gel (XU et al., 2007), métodos coloidais (MARTÍNEZ et al., 2007), reação de pirólise (CHIU et al., 2007) entre outros. O procedimento mais barato, simples e ecologicamente correto é o método de coprecipitação (KANG et al., 1996; QU et al., 1999).

De acordo com Laurent et al. (2008), a técnica de co-precipitação é provavelmente a via mais eficiente para obter partículas magnéticas. Os óxidos de ferro tais como magnetita (Fe_3O_4) ou hematita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) são geralmente preparadas por uma mistura estequiométrica de sais férricos e ferrosos em meio aquoso. A reação química de formação de Fe_3O_4 pode ser escrita de acordo com a equação abaixo:



Ainda de acordo com o mesmo autor, a precipitação completa de Fe_3O_4 deve acontecer a um pH entre 8 e 14, com uma relação estequiométrica de 2:1 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) em um ambiente não oxidante sem oxigênio.

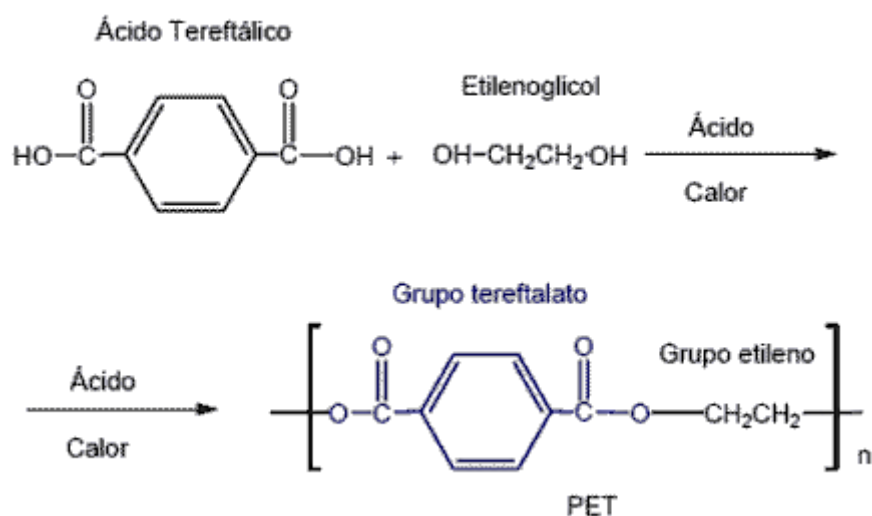
Recentemente, os nanomateriais magnéticos (magnetita, hematita e metais de ferritina), têm sido amplamente utilizados na área da biomedicina e de catalisadores devido às suas excelentes propriedades magnéticas (CHINNARAJ et al., 2015). Nanopartículas de óxido de ferro têm sido desenvolvidas como novos sistemas promissores para serem aplicados em diferentes áreas, tais como: agentes de imagem na ressonância magnética; mediadores de calor no tratamento do câncer por hipertermia; suporte sólido para catálise heterogênea; biossensores; adsorventes para a remoção de corantes e metais; e em sistemas de entrega de drogas: “drug delivery” (DEBRASSI et al., 2011).

As partículas magnéticas modificadas são constituídas por um núcleo de óxido de ferro revestido com um polímero. Esse revestimento possui grupos ativos que podem ser conjugados a biomoléculas tais como carboidratos, proteínas e enzimas (MA et. al, 2003; YMAURA et al., 2004). As partículas de magnetita superparamagnéticas revestidas com polímeros são usualmente formadas por núcleos magnéticos responsáveis por uma resposta magnética forte e uma camada polimérica para fornecer grupos funcionalizáveis e característicos (WUNDERBALDINGER et al., 2002).

2.5.2 DACRON MAGNÉTICO

O Dacron ou Polietileno tereftalato (PET) é um poliéster insolúvel em água, obtido comercialmente pela condensação do etileno glicol com o ácido tereftálico (figura 10) e as suas propriedades dependem do seu peso molecular, estrutura molecular, cristalinidade e a presença de impurezas (DUARTE et al., 2004).

Figura 10 - Estrutura do Polietileno tereftalato formado pela condensação do ácido tereftálico e etileno glicol.



Fonte: Disponível em <http://allchemistry.iq.usp.br/agregando/ABQ/oqsp07red/11a.gif>

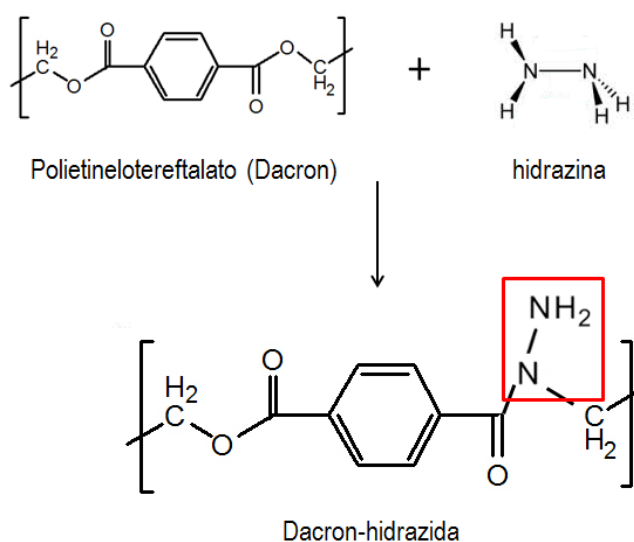
O PET é o material mais comumente usado para a produção de garrafas plásticas de água, possui uma característica bastante atraente que é o seu baixo custo de fabricação (BABA et al., 2014). As matrizes fibrosas de PET podem ser aplicadas em diferentes áreas na biotecnologia. Além disso, esse poliéster tem sido muito utilizado em aplicações biomédicas, tais como material para vasos sanguíneos artificiais, tendões, prótese de tecido duro, fio cirúrgico (IRENA et al, 2009) e enxertos vasculares devido à sua bioestabilidade (HADJIZADEH et al., 2010).

Como a maioria dos polímeros sintéticos, o PET é relativamente inerte e hidrofóbico sem grupos funcionais úteis para processos de imobilização. Para resolver este inconveniente, algumas modificações químicas são realizadas para alterar as propriedades de superfície desse material. Um dos métodos inclui a reação do PET com substâncias de baixo peso molecular contendo grupos hidroxila, carboxila ou amina, que após a reação esses grupos funcionais se incorporam na superfície do polímero. Os grupos funcionais criados durante os processos de

modificação podem servir para imobilização covalente de várias biomoléculas como, por exemplo, carboidratos, peptídeos e proteínas (IRENA et al., 2009).

A síntese de partículas de Dacron ferromagnéticas inicialmente foi descrita por Carneiro Leão et al. (1991). Primeiramente, o Dacron sob a forma de folhas é submetido à hidrazinólise, uma reação que consiste na adição de grupamentos hidrazidas ao suporte. As hidrazidas formadas são obtidas pela reação entre o hidrato de hidrazina e grupamentos ésteres presentes no Dacron (figura 11). O pó obtido é mecanicamente resistente e não biodegradável. Essas propriedades o qualificam como um suporte adequado para imobilização. Sua magnetização é realizada através da co-precipitação de sais de ferro em meio aquoso e alcalino. Esse suporte quando magnetizado possibilita sua rápida separação de uma mistura reacional.

Figura 11 - Formação de Dacron-hidrazida a partir da reação de hidrazinólise do Dacron. Em destaque (vermelho) o grupo hidrazida formado.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

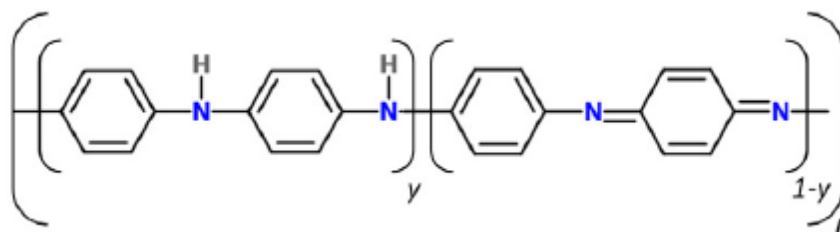
A literatura descreve alguns trabalhos que utilizaram suportes de Dacron magnéticos para imobilização de biomoléculas, tais como: heparan sulfato (MERCÊS et al., 2015); α -L-Rhamnosidase (SORIA et al., 2012); β -galactosidase (NERI et al., 2011); invertase (CADENA et al., 2010); tripsina (AMARAL et al., 2006) e proteínas (OLIVEIRA et al., 1989).

2.5.3 MAGNETITA REVESTIDA COM POLIANILINA

As nanopartículas de óxido de ferro na forma cristalina de magnetita (Fe_3O_4) contêm propriedades supermagnéticas e ferromagnéticas e essas características únicas têm despertado grande interesse em vários campos. Em particular, a magnetita é o material mais comumente utilizado em aplicações biomédicas devido à sua baixa toxicidade, alta saturação magnética e fácil síntese (ZHANG et al., 2011).

A polianilina ou PANI é um polímero condutor que apresenta facilidade de síntese, baixo custo e boa estabilidade ambiental, porém sua utilização em aplicações biológicas é limitada pela sua baixa capacidade de processamento (BALINT et al., 2014). A sua estrutura é composta por dois segmentos: uma estrutura plana de dois grupos imina e um anel quinóide e segmentos tetraédricos de dois grupos amina que separam três anéis benzênicos (figura 12).

Figura 12 - Estrutura da polianilina.

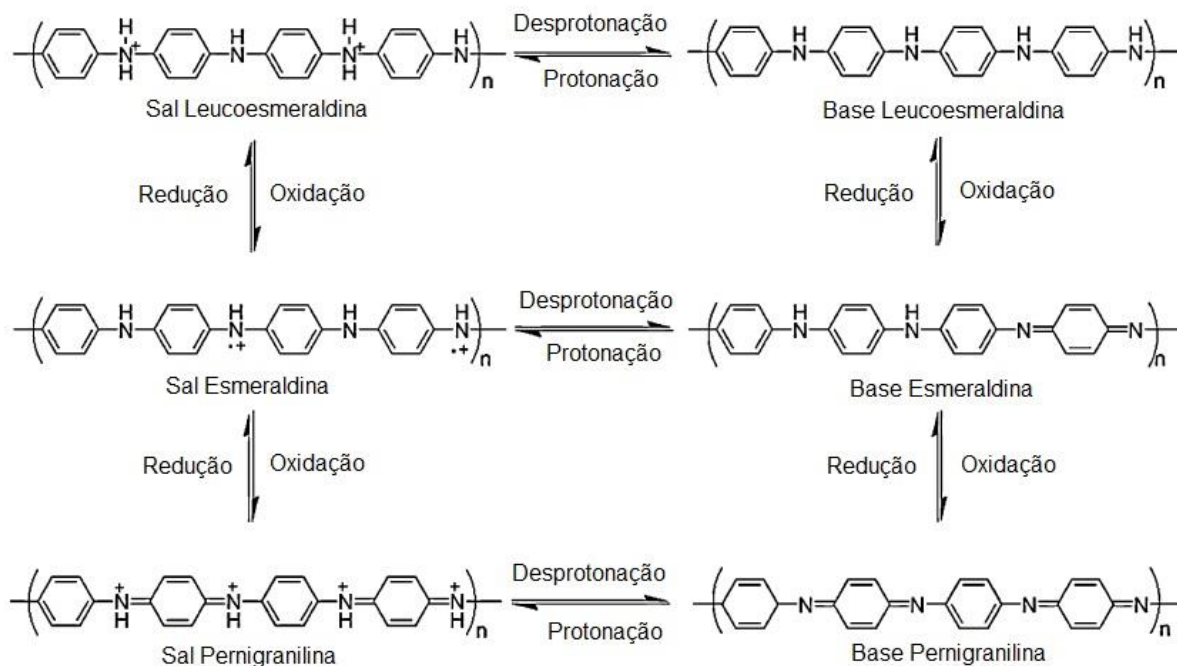


Fonte: Adaptado de BALINT et al., 2014.

A polianilina é obtida através da polimerização da anilina, esse método pode ser feito através de três métodos de polimerização: química, eletroquímica e fotoeletroquímica. O mais utilizado e vantajoso é o de síntese química que possibilita uma reação à baixo custo. A síntese química envolve a oxidação direta do monômero de anilina por oxidantes químicos, sendo realizada na presença de um ácido forte em meio aquoso (MOLAPO et al., 2012)

A estrutura da polianilina pode ser facilmente modificada mediante protonação. A figura 13 mostra as diferentes formas da PANI e a sua transformação por qualquer ácido/base ou por reações eletroquímicas (JARAMILLO-TABARES et al., 2012). Porém entre essas formas, a PANI esmeraldina, é a mais estável e condutora (BALINT et al., 2014).

Figura 13 - Estruturas químicas da polianilina em diferentes estados de oxidação.



Fonte: Adaptado de JARAMILLO-TABARES, et al., 2012.

O revestimento de uma matriz magnética com polianilina, por exemplo, devido a sua fácil síntese (eletroquimicamente ou mediante uso de agentes oxidantes) a tornam atrativas em aplicação como matriz para imobilização de moléculas (FERNANDES et al., 2003; NGAMNA et al., 2005; SINGH et al., 2006).

Alguns trabalhos descritos na literatura utilizaram partículas de magnetita revestidas com polianilina como suporte para imobilização de biomoléculas, tais como: heparan sulfato (MERCÊS et al., 2015); creatinase, creatinase e sarcosina oxidase (YADAV et al., 2012); β -galactosidase (NERI et al., 2011) e tripsina (WANG et al., 2008).

2.6 SEPARAÇÃO POR AFINIDADE MAGNÉTICA

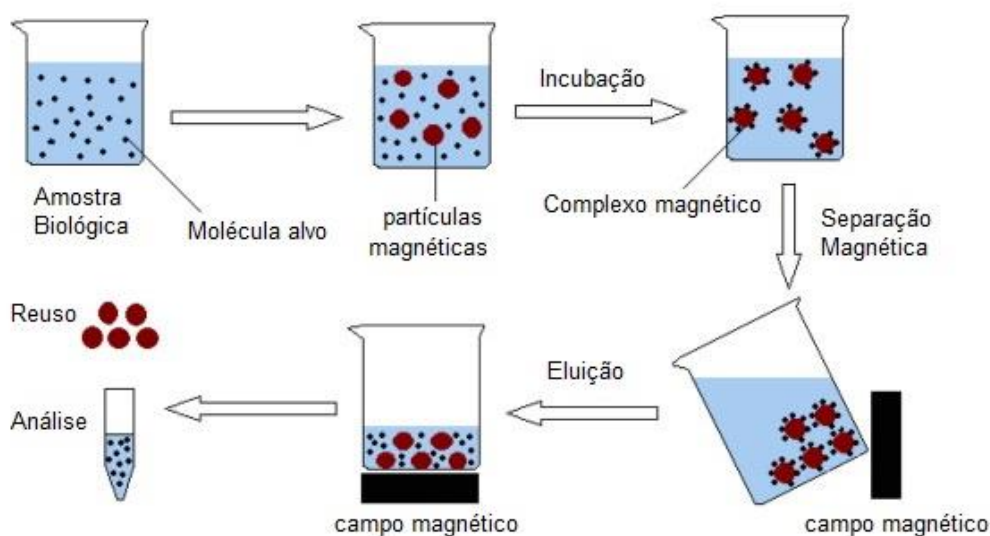
Em 1792 a técnica de separação magnética foi descrita pela primeira vez por William Fullarton, quando ele utilizou um ímã para separar minerais de ferro (YAVUZ et al., 2009). Desde então, diversas aplicações têm sido descritos na literatura. Na década de 1970 foram introduzidas pequenas partículas magnéticas nas técnicas de separação magnética e com isso houve um aumento de estudos voltados para o seu desenvolvimento e aplicações. As partículas magnéticas estão entre os materiais mais utilizados em técnicas de separação, com

aplicações na área de imobilização de biomoléculas (proteínas, enzimas e outros), sistemas de análise em medicina e na biotecnologia (AGUILAR-ARTEAGA et al., 2010).

O processo de separação por afinidade é um poderoso método utilizado na purificação de proteínas e se baseia na formação de complexos específicos e reversíveis entre uma molécula imobilizada e seus ligantes a serem purificados. O uso da cromatografia de afinidade magnética possui algumas vantagens, como ser realizada de forma mais rápida e utilizar processos de separação baseado em campo magnético (LAN et al., 2015).

Nesse tipo de separação, os materiais magnéticos funcionalizados exibem afinidade para um ligante específico e desta forma são misturados com uma amostra contendo essas moléculas alvo. Dentro de um período de incubação, as moléculas alvo ligam-se às partículas magnéticas. O complexo magnético inteiro é subsequentemente separado da amostra a partir da aplicação de um campo magnético externo e, após lavagens, as moléculas alvo são isoladas (HE et al., 2014). A figura 14 ilustra o processo de separação por afinidade magnética.

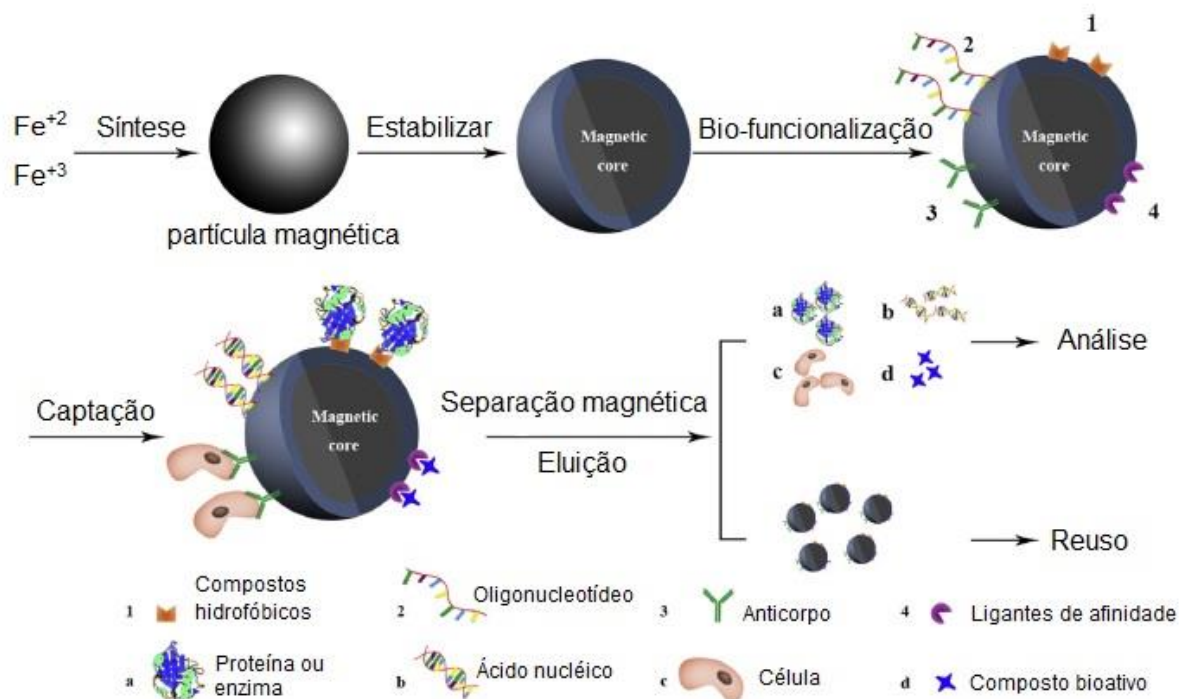
Figura14 - Procedimento realizado na técnica de separação por afinidade magnética.



Fonte: Adaptado de CHEN et al., 2011.

Atualmente, separações magnéticas das células, proteínas e ácidos nucleicos são rotineiramente utilizados em laboratórios (BORLIDO et al., 2013). Sendo assim é necessário preparar, estabilizar e funcionalizar as partículas magnéticas para serem aplicadas no processo de separação de analitos presentes em amostras biológicas. Esse procedimento está esquematizado na figura 15.

Figura 15. Procedimento geral realizado na separação magnética para a realização de análises biológicas.



Fonte: Adaptado de He et al., 2014.

A literatura descreve estudos que utilizam o processo de separação magnética na área de biotecnologia para processos de separação de resíduos e purificação de moléculas específicas. Recentemente, Zhang et al. (2016) estudaram o uso de micropartículas hidrofóbicas com propriedades magnéticas para serem utilizadas na remoção eficaz do óleo na água em diferentes vias. Gao et al. (2016) utilizaram nanopartículas magnéticas "imprinted" de alta eficiência para separação e identificação de 17 β -Estradiol por afinidade magnética a partir do leite.

Lan et al. (2015) realizaram um estudo sobre a purificação da enzima conversora de angiotensina (ECA) através do processo de separação por afinidade magnética utilizando microesfera de agarose magnética. Mercês et al. (2015) descreveram o uso de heparan sulfato imobilizado em partículas magnéticas como matriz de afinidade para purificação de antitrombina a partir do plasma humano.

Estudos realizados por Rêgo et al. (2014) relataram o uso da goma de sementes de *Parkia pendula* magnética como matriz para imobilização covalente da lectina Concanavalina-A onde esse compósito foi aplicado na purificação de glicoconjugados por afinidade. Sennikov et al. (2013) utilizaram cromatografia de afinidade e separação magnética para purificação de anticorpos para o fator de necrose tumoral a partir do soro humano.

Angeli et al. (2009) demonstraram o uso de um compósito de levana ferromagnético como matriz de afinidade para purificar lectinas através de um procedimento rápido e fácil baseado na afinidade magnética. O uso de nanoesferas magnéticas de sílica foi descrito por Ma et al. (2006) no processo de separação por afinidade de uma mistura de proteínas.

Em resumo, a separação por afinidade magnética permite uma remoção rápida e fácil de compostos ligados às partículas magnéticas funcionalizadas a partir de misturas heterogêneas. Além de outras vantagens tais como manipulação fácil, suscetível à automatização, miniaturização e não há necessidade de diluir a amostra ou perda de material durante a lavagem. Ainda possui uma separação rápida e eficaz das partículas magnéticas da mistura reacional sem precisar utilizar métodos como filtração ou centrifugação. Isso faz com que os materiais magnéticos sejam úteis não só na rotina diária de trabalho no laboratório, mas também na produção prática (HORÁK et al., 2007).

3 REFERÊNCIAS

AGUILAR-ARTEAGA, K.; RODRIGUEZ J.A.; BARRADOB, E. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*, 674, 157-165, 2010.

AHN, S.B.; KHAN, A. Detection and quantitation of twenty-seven cytokines, chemokines and growth factors pre- and post-high abundance protein depletion in human plasma. *EuPA open proteomics*, 3, 78-84, 2014.

AMARAL, I.P.G.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; CARVALHO-JÚNIOR, L.B.; BEZERRA, R.S. Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Process Biochemistry*, 41, 1213-1216, 2006.

ANDAC, M.; GALAEV, I.Y.; DENIZLI, A. Molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel for albumin depletion from human serum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 259-265, 2013.

ANGELI, R.; PAZ, N.V.N.; MACIEL, J.C.; ARAUJO, F.F.B.; PAIVA, P.M.G.; CALAZANS, G.M.T.; VALENTE, A.P.; ALMEIDA, F.C.L.; COELHO, L.C.B.B.; CARVALHO JR, L.B.; SILVA, M.P.; CORREIA, M.T.S. Ferromagnetic Levan Composite: An Affinity Matrix to Purify Lectin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1-6, 2009.

ARIAS, J.L.; GALLARDO, V.; GÓMEZ-LOPERA, S.A.; PLAZA, R.D.; DELGADO, A.V. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *Journal of Controlled Release*, 77, 309-321, 2001.

ARISAKA, Y.; KOBAYASHI, J.; YAMATO, M.; AKIYAMA, Y.; OKANO, T. Switching of cell growth/detachment on heparin-functionalized thermoresponsive surface for rapid cell sheet fabrication and manipulation. *Journal of Biomaterials*, 34, 4214-4222, 2013.

AZHAR, A.; KHAN, M.S.; SWAMINATHAN, A.; NASEEM, A.; CHATTERJEE, S.; JAIRAJPURI, M.A. Oxidized antithrombin is a dual inhibitor of coagulation and angiogenesis: Importance of low heparin affinity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 541-550, 2016.

BABA, S; SATO, H.; HUANG, L.; URITANI, A.; FUNAHASHI, R.; AKEDO, J. Formation and characterization of polyethylene terephthalate-based $(\text{Bi}_{0.15}\text{Sb}_{0.85})_2\text{Te}_3$ thermoelectric modules with CoSb_3 adhesion layer by aerosol deposition. *Journal of Alloys and Compounds*, 589, 56-60, 2014.

BALINT, R.; CASSIDY, N.J.; CARTMELL, S.H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 10, 2341-2353, 2014.

BERGER, M.; DA SILVA, W.O.B.; SANTI, L.; GUIMARÃES, J. A. Hemostasia: uma breve revisão. *Caderno pedagógico - Lajeado*, 11, 140-148, 2014.

BJARNADÓTTIR, S.G.; FLENGSRUD, R. Affinity chromatography, two-dimensional electrophoresis, adapted immunodepletion and mass spectrometry used for detection of

porcine and piscine heparin-binding human plasma proteins. *Journal of Chromatography B*, 944, 107-113, 2014.

BORLIDO, L.; AZEVEDO, A.M.; ROQUE, A.C.A.; AIRES-BARROS, M.R. Magnetic separations in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 31, 1374-1385, 2013.

BORMOTOVA, E.A.; MIL'MAN, B.L.; GUPALOVA, T.V. A New Approach to the Depletion of Albumin and Immunoglobulin G from Human Serum. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51, 367-373, 2015.

BURNOUF, T.; RADOSEVICH, M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49, 575-586, 2001.

CABRERA, M.; MACIEL, J.C.; QUISPE-MARCATOMA, J.; PANDEY, B ; NERI, D.F.M.; SORIA, F.; BAGGIO-SAITOVITCH, E.; CARVALHO, L.B. Magnetic composites from minerals: study of the iron phases in clay and diatomite using Mössbauer spectroscopy, magnetic measurements and XRD. *Hyperfine Interaction*, 224, 197-204, 2014.

CADENA, P.G.; JERONIMO, R.A.S.; MELO, J.M.; SILVA, R.A.; LIMA FILHO, J.L.; PIMENTEL, M.C.B. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. *Bioresource Technology*, 101, 1595-1602, 2010.

CAPILA, I.; LINHARDT, R.J. Heparin - Protein Interactions. *Angewandte Chemie International*, 41, 390-412, 2002.

CARAMORI, S.S.; FERNANDES, K.F. Covalent immobilisation of horseradish peroxidase onto poly(ethylene terephthalate)-poly(aniline) composite. *Process Biochemistry*, 39, 883-888, 2004.

CARNEIRO-LEAO A.M.A.; OLIVEIRA E.A.; CARVALHO-JR L.B. Immobilization of protein on ferromagnetic dacron. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 33, 53-58, 1991.

CHEN, L.; WANG, T.; TONG, J. Application of derivatized magnetic materials to the separation and the preconcentration of pollutants in water samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 1095-1108, 2011.

CHINNARAJ, K.; MANIKANDAN, A.; RAMU, P.; ANTONY, S.A.; NEERAJA, P. Comparative Studies of Microwave- and Sol-Gel-Assisted Combustion Methods of Fe₃O₄ Nanostructures: Structural, Morphological, Optical, Magnetic, and Catalytic Properties. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 28, 179-190, 2015.

CHIU, W.; RADIMAN, S.; ABDULLAH, M.; KHIEW, P.; HUANG, N.; ABD-SHUKOR, R. One pot synthesis of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals by pyrolysis reaction of organometallic compound. *Materials Chemistry and Physics*, 106, 231-235, 2007.

CUGNO, M.; GUALTIEROTTI, R.; TEDESCHI, A.; MERONI, P.L. Autoantibodies to coagulation factors: From pathophysiology to diagnosis and therapy. *Autoimmunity Reviews*, 13, 40-48, 2014.

DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry*, 30, 10363–10370, 1991.

DEBRASSI, A.; BÜRGER, C.; RODRIGUES, C.A.; NEDELKO, N.; SLAWSKA-WANIEWSKA, A.; DŁUZEWSKI, P.; SOBCZAK, K.; GRENECHE, J.-M. Synthesis, characterization and in vitro drug release of magnetic N-benzyl-O-carboxymethylchitosan nanoparticles loaded with indomethacin. *Acta Biomaterialia*, 7, 3078-3085, 2011.

DUARTE, L.T.; PAULA E SILVA, E.M.; BRANCO, J.R.T.; LINS, V.F.C. Production and characterization of thermally sprayed polyethylene terephthalate coatings. *Surface and Coatings Technology*, 182, 261-267, 2004.

ESKO, J.D.; LINHARDT, R.J. *Proteins that Bind Sulfated Glycosaminoglycans*. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1948/>.

FAROOQUI, A.A. Purification of enzymes by heparin-sepharose affinity chromatography. *Journal of Chromatography*, 184, 335-345, 1980.

FAYE, C.; CHAUTARD, E.; OLSEN, B.R.; RICARD-BLUM, S. The first draft of the endostatin interaction network. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 22041-22047, 2009.

FENG, W.; ZHAO, L.; WANG, K. Interaction of polysaccharides with interferon-gamma using an improved ELISA approach. *Carbohydrate Polymers*, 58, 89-94, 2004.

FERNANDES, K.F.; LIMA, C.S.; PINHO, H.; COLLINS, C.H. Immobilisation of horseradish peroxidase onto polyniline polymers. *Process Biochemistry*, 38, 1379-1384, 2003.

FERNÁNDEZ, J.A.P.; VILLAMEDIANA, R.L. Trombofilia y trombosis. *Medicine*, 11, 1345-1352, 2012.

FISCHNALLER, M.; KÖCK, R.; BAKRY, R.; BONN, G.K. Enrichment and desalting of tryptic protein digests and the protein depletion using boron nitride. *Analytica Chimica Acta*, 823, 40-50, 2014.

FLENGSRUD, R.; ANTONSEN, S.G. The binding of pentapeptides to biological and synthetic high affinity heparin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 4774-4776, 2015.

FRIED, T.; SHEMER, G.; MARKOVICH, G. Ordered two dimensional arrays of ferrite nanoparticles. *Advanced Materials*, 13, 1158-1161, 2001.

FURIE, B.; FURIE, B.C. The Molecular Basis of Blood Coagulation. *Cell*, 53, 505-518, 1988.

GAO, R.; CUI, X.; HAO, Y.; ZHANG, L.; LIU, D.; TANG, Y. A highly-efficient imprinted magnetic nanoparticle for selective separation and detection of 17 β -estradiol in milk. **Food Chemistry**, 194, 1040-1047, 2016.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes as the 21st century begins**. In: Immobilization of enzymes and cells. (second edition), J. M. Guisan, (Ed.), Humana Press Inc., ISBN 1-59745-053-7, New Jersey, 2006.

HADJIZADEH, A.; AJJI, A.; BUREAU, M.N. Preparation and characterization of NaOH treated micro-fibrous polyethylene terephthalate nonwovens for biomedical application. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, 3, 574-583, 2010.

HANSEN, S.U.; MILLER, G.J.; JAYSON, G.C.; GARDINER, J.M. First Gram-Scale Synthesis of a Heparin-Related dodecasaccharide. **Organic Letters**, 15, 88-91, 2013

HE, J.; HUANG, M.; WANG, D.; ZHANG, Z.; LI, G. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 101, 84-101, 2014.

HEGER, A.; GRUNERT, T.; SCHULZ, P.; JOSIC, D.; BUCHACHER, A. Separation of active and inactive forms of human antithrombin by heparin affinity chromatography. **Thrombosis Research**, 106, 157-164, 2002.

HERMANSON, Greg. **Bioconjugate Techniques**. Rockford, IL USA. 2008. 1323 p.

HIREMATH, V.; A.N. URS, A.N.N.; JOSHI, V.; SUVILESH, K.N.; SAVITHA, M.N.; AMOG, P.U.; RUDRESHA, G.V.; YARISWAMY, M.; VISHWANATH, B.S. Differential action of medically important Indian BIG FOUR snake venoms on rodent blood coagulation. **Toxicon**, 110, 19-26, 2016.

HOFFMAN, D.L.; BERKELEY, B.A. Purification and Large-Scale Preparation of Antithrombin III. **The American Journal of Medicina**, 87, 3B_23S-3B26S, 1989.

HORÁK, D.; BABIC, M.; MACKOVÁ, H.; BENES, M.J. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. **Journal of Separation Science**, 30, 1751-1772, 2007.

HU, J.; NI, Y.; DRYMAN, B.A.; MENG, X.J.; ZHANG, C. Purification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from cell culture using ultrafiltration and heparin affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1217, 3489-3493, 2010.

IRENA, G.; JOLANTA, B.; KAROLINA, Z. Chemical modification of poly(ethylene terephthalate) and immobilization of the selected enzymes on the modified film. **Applied Surface Science**, 255, 8293-8298, 2009.

JARAMILLO-TABARES, B.E.; ISAZA, F.J.; TORRESI, S.I.C. Stabilization of polyaniline by the incorporation of magnetite nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, 132, 529-533, 2012.

JAVANMARD, M.; EMAMINEJAD, S.; GUPTA, C.; PROVINE, J.; DAVIS, R.W.; HOWE, R.T. Depletion of cells and abundant proteins from biological samples by enhanced dielectrophoresis. ***Sensors and Actuators B***, 193, 918-924, 2014.

JOSIC, D.; BAL, F.; SCHWINN, H. Isolation of plasma proteins from the clotting cascade by heparin affinity chromatography. ***Journal of Chromatography***, 632, 1-10, 1993.

KANG, Y.S.; RISBUD, S.; RABOLT, J.F.; STROEVE, P. Synthesis and characterization of nanometer-size Fe_3O_4 and gamma- Fe_2O_3 particles. ***Chemistry of Materials***, 8, 2209-2211, 1996.

KARATAS, M.; AKGÖL, S.; YAVUZ, H.; SAY, R.; DENIZLI, A. Immunoglobulin G depletion from human serum with metal-chelated beads under magnetic field. ***International Journal of Biological Macromolecules***, 40, 254-260, 2007.

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***, 33, 339-345, 2004.

KAWAKAMI, A.; HIRAYAMA, K.; KAWAKAMI, F.; KAWAKAMI, H.; FUJIHARA, M.; OHTSUKI, K. Purification and biochemical characterization of a fibroblast growth factor-binding protein (FGF-BP) from the lactoferrin fraction of bovine milk. ***Biochimica et Biophysica Acta***, 1760, 421-431, 2006.

KONG, F.; FUN HU, Y. Biomolecule immobilization techniques for bioactive paper fabrication. ***Analytical and Bioanalytical Chemistry***, 403, 7-13, 2012.

KOVAC, M.; MITIC, G.; MILJIC, P.; MIKOVIC, Z.; MANDIC, V.; DJORDJEVIC, V.; RADOJKOVIC, D.; BERECZKY, Z.; MUSZBEK, L. Poor pregnancy outcome in women with homozygous type-II HBS antithrombin deficiency. ***Thrombosis Research***, 133, 1158-1160, 2014.

KRAPFENBAUER, K.; FOUNTOULAKIS, M. Improved Enrichment and Proteomic Analysis of Brain Proteins with Signaling Function by Heparin Chromatography. ***Methods in Molecular Biology***, 566, 165-180, 2009.

KULLOLLI, M.; WARREN, J.; ARAMPATZIDOU, M.; PITTERI, S.J. Performance evaluation of affinity ligands for depletion of abundant plasma proteins. ***Journal of Chromatography B***, 939, 10-16, 2013.

LAGURI, C.; SAPAY, N.; SIMORRE, J.-P.; BRUTSCHER, B.; IMBERTY, A.; GANS, P.; LORTAT-JACOB, H. ^{13}C -labeled heparan sulfate analogue as a tool to study protein/heparan sulfate interactions by NMR spectroscopy: application to the CXCL12 α chemokine. ***Journal of the American Chemical Society***, 133, 9642-9645, 2011.

LAN, X.; LIAO, D.; WU, S.; WANG, F.; SUN, J.; TONG, Z. Rapid purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from lizard fish protein hydrolysates with magnetic affinity separation. ***Food Chemistry***, 182, 136-142, 2015.

LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; ELST, L.V.; MULLER, R.N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 108, 2064-2110, 2008.

LEBING, W.R.; HAMMOND, D.J.; WYDICK III, J.E.; BAUMBACH, G. A. A Highly Purified Antithrombin III Concentrate Prepared From Human Plasma Fraction IV-1 by Affinity Chromatography. *Vox Sanguinis*, 67, 117-124, 1994.

LEE, S.; RAW, A.; YU, L.; LIONBERGER, R.; YA, N.; VERTHELYI, D.; ROSENBERG, A.; KOZLOWSKI, S.; WEBBER, K.; WOODCOCK, J. Scientific considerations in the review and approval of generic enoxaparin in the United States. *Nature Biotechnology*, 31, 220-226, 2013.

LEI, T.; HE, Q.Y.; WANG, Y.L.; SI, L.S.; CHIU, J.F. Heparin chromatography to deplete high-abundance proteins for serum proteomics. *Clinica Chimica Acta*, 388, 173-178, 2008.

LEVER, R.; PAGE, C.P. Non-anticoagulant Effects of Heparin: An Overview. *Heparin - A Century of Progress*, 207, 281-305, 2012.

MA, M.; ZHANG, Y.; YU, W.; SHEN, H.; ZHANG, H.; GU, N. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects*, 212, 219-226, 2003.

MA, Z.-Y.; LIU, X.-Q.; GUAN, Y.-P.; LIU, H.-Z. Synthesis of magnetic silica nanospheres with metal ligands and application in affinity separation of proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 275, 87-91, 2006.

MACIEL, J.C. *Compósitos de partículas magnéticas e polímeros para imobilização de tripsina*. Tese Doutorado. 2012. 116p. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

MACIEL, J.C.; ANDRAD, P.L.; NERI, D.F.M.; CARVALHO JR, L.B.; CARDOSO, C.A.; CALAZANS, G.M.T.; AGUIAR, J.A.; SILVA, M.P.C. Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324, 1312-1316, 2012.

MACIEL, J.C.; MERCÊS, A.A.D.; CABRERA, M.; SHIGEYOSI, W.T.; DE SOUZA, S.D.; OLZON-DIONYSIO; FABRIS, J.D.; CARDOSO, C.A.; NERI, D.F.M.; SILVA, M.P.C.; CARVALHO JR., L.B. Magnetic nanoparticles coated with polyaniline to stabilize immobilized trypsin. *Hyperfine Interactions*. (aceito com data de publicação conhecida) DOI: 10.1007/s10751-016-1264-y, 2016: no prelo.

MAHN, A.; ISMAIL, M. Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by ammonium sulfate precipitation for 2D-PAGE analysis. *Journal of Chromatography B*, 879, 3645-3648, 2011.

MALTAS, E.; OZMEN, M.; VURAL, H.C.; YILDIZ, S.; ERSOZ, M. Immobilization of albumin on magnetite nanoparticles. *Materials Letters*, 65, 3499-3501, 2011.

MARIE, A.-L.; TRAN, N.T.; BIANCHINI, E.P.; SALLER, F.; PAUTUS, S.; ABACHE, T.; PLANTIER, J.-L.; URBAIN, R.; BORGEL, D.; TAVERNA, M. A fast capillary electrophoresis method to assess the binding affinity of recombinant antithrombin toward heparin directly from cell culture supernatants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 111, 64-70, 2015.

MARTÍNEZ, M.; ESPINOSA, R.; PÉREZ, J. ARENAS, A. Synthesis of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles without surfactants at room temperature. *Materials Letters*, 61, 4447-4451, 2007.

MARUYAMA, K.; MORISHITA, E.; KARATO, M.; KADONO, T.; SEKIYA, A.; GOTO, Y.; SATO, T.; NOMOTO, H.; OMI, W.; TSUZURA, S.; IMAI, H.; ASAKURA, H.; OHTAKE, S.; NAKAO, S. Antithrombin deficiency in three Japanese families: One novel and two reported point mutations in the antithrombin gene. *Thrombosis Research*, 132, e118–e123, 2013.

MERCÊS, A.A.D.; MACIEL, J.C.; CARVALHO JÚNIOR, L.B. Magnetic particles as affinity matrix for purification of antithrombin. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 97, 012002, 2015.

MICKOWSKA, B. Purification and characterization of α1-proteinase inhibitor and antithrombin III: major serpins of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and carp (*Cyprinus carpio*) blood plasma. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 231-240, 2009

MILLER-ANDERSSON, M.; BORG, H.; ANDERSSON, L.-O. Purification of Antithrombin III by Affinity Chromatography. *Thrombosis Research*, 5, 439-452, 1974.

MOCHIZUKI, S.; MIYANO, K.; KONDO, M.; HIROSE, M.; MASAKI, A.; OHI, H. Purification and characterization of recombinant human antithrombin containing the prelatent form in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expression and Purification*, 41, 323-331, 2005.

MOLAPO, K.M.; NDANGILI, P.M.; AJAYI, R.F.; MBAMBISA, G.; MAILU, S.M.; NJOMO, N.; MASIKINI, M.; BAKER, P.; IWUOHA, E.I. Electronics of Conjugated Polymers (I): Polyaniline. *International Journal of Electrochemical Science*, 7, 11859-11875, 2012.

MOORE, G.W.; DE JAGER, N.; CUTLER, J. A. Development of a novel, rapid assay for detection of heparin-binding defect antithrombin deficiencies: the heparin-antithrombin binding (HAB) ratio. *Thrombosis Research*, 135, 161-166, 2015.

MOURIER, P.; ANGER, P.; MARTINEZ, C.; HERMAN, F.; VISKOV, C. Quantitative compositional analysis of heparin using exhaustive heparinase digestion and strong anion exchange chromatography. *Analytical Chemistry Research*, 3, 46-53, 2015.

MURUGESAN, S.; XIE, J.; LINHARDT, R.J. Immobilization of heparin: approaches and applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8, 90-100, 2008.

NERI, D.F.M.; BALCÃO, V.M.; CARDOSO, S.M.; SILVA, A.M.S.; DOMINGUES, M.R.M.; TORRES, D.P.M.; RODRIGUES, L.R.M.; CARVALHO JR., L.B.; TEIXEIRA, J.A.C. Characterization of galactooligosaccharides produced by β -galactosidase immobilized onto magnetized Dacron. *International Dairy Journal*, 21, 172-178, 2011.

NERI, D.F.M.; BALCAO, V.M.; DOURADO, F.O.Q.; OLIVEIRA, J.M.B.; CARVALHO-JÚNIOR, L.B.; TEIXEIRA, J.A. Immobilized β -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: Support characterization and galactooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70 74-80, 2011.

NGAMNA, O.; MORRIN, A.; MOULTON, S.E.; KILLARD, A.J.; SMYTH, M.R.; WALLACE, G.G. An HRP based biosensor using sulphonated polyaniline. *Synthetic Metals*, 153, 185-188, 2005.

NICOLÁS, P.; SALETA, M.; TROIANI, H.; ZYSLER, R.; LASSALLE, V.; FERREIRA, M.L. Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: Experimental and mechanistic issues. *Acta Biomaterialia*, 9, 4754-4762, 2013.

OLIVEIRA, E.A.; SILVA, M.P.C.; FIGUEIREDO, Z.M.B.; CARVALHO, L.B. Immobilization of proteins on plates of dacron. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 221, 109-114, 1989.

OLIVEIRA, G.B., CARVALHO JR., L.B., SILVA, M.P.C. Properties of carbodiimide treated heparin. *Biomaterials*, 24, 4777-4783, 2003.

ORI, A.; WILKINSON, M.C.; FERNIG, D.G. A systems biology approach for the investigation of the heparin/heparan sulfate interactome. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 19892-19904, 2011.

ORNAGHI, S.; BARNHART, K.T.; FRIELING, J.; STREISAND, J.; PAIDAS, M.J. Clinical syndromes associated with acquired antithrombin deficiency via microvascular leakage and the related risk of thrombosis. *Thrombosis Research*, 133, 972-984, 2014.

OUNIS, W.B.; GAUTHIER, S.F.; TURGEON, S.L.; ROUFIK, S.; POULIOT, Y. Separation of minor protein components from whey protein isolates by heparin affinity chromatography. *International Dairy Journal*, 18, 1043-1050, 2008.

OVERBEY, D.M.; JONES, E.L.; ROBINSON, T.N. How Hemostatic Agents Interact With the Coagulation Cascade. *AORN Journal*, 100, 148-159, 2014.

PAGÁN, M.; SUAZO, D.; DEL TORO, N.; GRIEBENOWN, K. A comparative study of different protein immobilization methods for the construction of an efficient nano-structured lactate oxidase-SWCNT-biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 138-146, 2015.

PETERSON, C.B.; BLACKBURN, M.N. Isolation and Characterization of an Antithrombin III Variant with Reduced Carbohydrate Content and Enhanced Heparin Binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 610-615, 1985.

PEYSELON, F.; RICARD-BLUM, S. Heparin–protein interactions: From affinity and kinetics to biological roles. Application to an interaction network regulating angiogenesis. *Matrix Biology*, 35, 73-81, 2014.

POWELL, A.K.; YATES, E.A.; FERNIG, D.G.; TURNBULL, J.E.; Interactions of heparin/heparin sulfate with proteins: appraisal of structural factors and experimental approaches. *Glycobiology*, 14, 17R–30R, 2004.

QU, S.C.; YANG, H.B.; REN, D.W.; KAN, S.H.; ZOU, G.T.; LI, D.M. Magnetite nanoparticles prepared by precipitation from partially reduced ferric chloride aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 215, 190-192, 1999.

RÊGO, M.J.B.M.; ALMEIDA, S.M.; BEZERRA, S.A.; CARVALHO JÚNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Magnetic Parkia pendula seed gum as matrix for Concanavalin A lectin immobilization and its application in affinity purification. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86, 1351-1357, 2014.

REZENDE, S.M. Distúrbios da hemostasia: doenças hemorrágicas. *Revista Médica de Minas Gerais*, 20, 534-553, 2010.

ROGERS, C.J.; CLARK, P.M.; TULLY, S.E.; ABROL, R.; GARCIA, K.C.; GODDARD III, W.A.; HSIEH-WILSON, L.C. Elucidating glycosaminoglycan–protein–protein interactions using carbohydrate microarray and computational approaches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A*, 108, 9747-9752, 2011.

SAKIYAMA-ELBERT, S.E. Incorporation of heparin into biomaterials. *Acta Biomaterialia*, 10, 1581-1587, 2014.

SENNIKOV, S.V.; GOLIKOVA, E.A.; KIREEV, F.D.; LOPATNIKOVA, J.A. Purification of human immunoglobulin G autoantibodies to tumor necrosis factor using affinity chromatography and magnetic separation. *Journal of Immunological Methods*, 390, 92-98, 2013.

SINGH, S.; SOLANKI, P.R.; PANDEY, M.K.; MALHOTRA, B.D. Covalent immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase on polyaniline films for application to cholesterol biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 568, 126–132, 2006.

SORIA, F.; ELLENRIEDER, G.; OLIVEIRA, G.B.; CABRERA, M.; CARVALHO, L.B. α -L-Rhamnosidase of *Aspergillus terreus* immobilized on ferromagnetic supports. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 1127-1134, 2012.

SUNDBERG, M.; BERGQUIST, J.; RAMSTRÖM, M. High-abundant protein depletion strategies applied on dog cerebrospinal fluid and evaluated by high-resolution mass spectrometry. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 3, 68-75, 2015.

UZUN, L.; ARMUTCU, C.; BICEN, Ö.; ERSÖZ, A.; SAY, R.; DENIZLI, A. Simultaneous depletion of immunoglobulin G and albumin from human plasma using novel monolithic cryogel columns. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 1-8, 2013.

VAN DELDEN, C.J.; ENGBERS, G.H.M.; FEIJEN, J. The interactions between antithrombin III, thrombin and surface immobilized heparin. *Journal of Biomaterials Science*, Polymer Edition, 7, 989-1004, 1996.

VIEIRA, R. *Imobilização de heparina em membranas de óxido de alumínio anódico revestidas com polianilina como matriz de afinidade para purificação de antitrombina*. 2012. 45p. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada à Saúde) - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

WAHED, A.; DASGUPTA, A. *Hematology and Coagulation: A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice*. Elsevier, 2015. Cap 16. 324p.

WANG, S.; BAO, H.; YANG, P.; CHEN, G. Immobilization of trypsin in polyaniline-coated nano-Fe₃O₄/carbon nanotube composite for protein digestion. *Analytica Chimica Acta*, 612, 182-189, 2008.

WICKERHAUSER, M.; WILLIAMS, C.; MERCER, J. Development of Large Scale Fractionation Methods VII. Preparation of Antithrombin III Concentrate. *Vox Sanguinis*, 36, 281-293, 1979.

WU, J.H.; KO, S.P.; LIU, H.L.; KIM, S.S.; JU, J.S.; KIM, Y.K. Sub 5 nm magnetite nanoparticles: synthesis, microstructure, and magnetic properties. *Materials Letters*, 61, 3124-3129, 2007.

WUNDERBALDINGER, P.; JOSEPHSON, L.; WEISSLEDER, R. Tat peptide directs enhanced clearance and hepatic permeability of magnetic nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, 13, 264-268, 2002.

XIONG, S.; ZHANG, L.; HE, Q.Y. Fractionation of Proteins by Heparin Chromatography. *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation Methods in Molecular Biology™*, 424, 213-221, 2008.

XU, H.; YANG, W.; FU, K.; DU, Y.; SUI, J.; CHEN Y.; YI, Z.; LI, M.; ZOU, G. Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol-gel method. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 309, 307-311, 2007.

YADAV, S.; DEVI, R.; BHAR, P.; SINGHLA, S.; PUNDIR, C.S. Immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline modified Pt electrode for detection of creatinine. *Enzyme and Microbial Technology*, 50, 247-254, 2012.

YAVUZ, C.T.; PRAKASH, A.; MAYO, J.T.; COLVIN, V.L. Magnetic separations: From steel plants to biotechnology. *Chemical Engineering Science*, 64, 2510-2521, 2009.

YMAURA, M.; CAMILO, R.L.; SAMPAIO, L.C.; MACÊDO, M.A.; NAKAMURA, M.; TOMA, H.E. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 279, 210-217, 2004.

ZHANG, L.; LI, L.; DANG, Z.-M. Bio-inspired durable, superhydrophobic magnetic particles for oil/water separation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 463, 266-271, 2016.

ZHANG, Y.J.; LIN, Y-W.; CHANG, C-C.; WU, T-M. Conducting and magnetic behaviors of polyaniline coated multi-walled carbon nanotube composites containing monodispersed magnetite nanoparticles. *Synthetic Metals*, 161, 937-942, 2011.

ZHAO, R.; LUO, J.; SHANGGUAN, D.; LIU, G. A novel matrix for high performance affinity chromatography and its application in the purification of antithrombin III. *Journal of Chromatography B*, 816, 175-181, 2005.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Produzir dois suportes (Dacron magnético e magnetita revestida com polianilina) imobilizar heparina nesses materiais e utilizar esses derivados magnéticos para o fracionamento/purificação de proteínas plasmáticas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Imobilizar covalentemente heparina às partículas de Dacron magnético (mDAC) e magnetita revestida com polianilina (MAG-PANI);
- Caracterização físico-química das partículas magnéticas sintetizadas;
- Determinar a quantidade de heparina imobilizada;
- Utilizar os derivados magnéticos para o fracionamento de proteínas plasmáticas;
- Identificar as proteínas separadas ou purificadas;
- Realizar testes *in vitro* com as proteínas fracionadas mediante suas funções biológicas específicas.

5 ARTIGO 1

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MAGNETIZED DACRON-HEPARIN COMPOSITE EMPLOYED FOR ANTITHROMBIN AFFINITY PURIFICATION

Aurenice Arruda Dutra das Mercês¹, Ricardo de Souza Silva¹, Karciano José Santos Silva², Jackeline da Costa Maciel³, Givanildo Bezerra Oliveira⁴, Davian Martinez Buitrago², José Albino Oliveira de Aguiar², Luiz Bezerra de Carvalho Júnior¹.

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

²*Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil.*

³*Universidade Federal de Roraima, Aeroporto, 69310-000 Boa Vista, RR, Brazil.*

⁴*Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Recôncavo, Centro, 44380-000 Cruz das Almas, BA, Brazil.*

ABSTRACT

This work aimed to immobilize heparin onto magnetic Dacron-hydrazide (mDAC) and to use for human antithrombin purification. Dacron was firstly converted to Dacron-hydrazide and magnetized by co-precipitation method of $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Heparin (HEP) was activated by carbodiimide and N-hydroxysuccinimide and immobilized on mDAC yielding the mDAC-HEP composite containing $51 \pm 0.1 \mu\text{g}$ heparin/mg of support. EDX and infrared spectra analyses confirmed each synthesis step of mDAC comparing to magnetite. mDAC exhibited superparamagnetism and magnetic saturation equal to about 23 emu/g to 293 K, 300 K and 313 K. Human plasma was incubated with mDAC-HEP (zero time and 2 years stored preparations) and washed with phosphate buffer (PBS) containing increasing NaCl concentration. mDAC-HEP was capable to remove the plasma antithrombin activity (about 20%) using both zero time and 2 years stored preparations. Eluate obtained with 1.0 M NaCl in PBS was also able to prolong coagulation time (aPTT) using both mDAC preparations. Electrophoresis of the eluates revealed bands of antithrombin (58 kDa). These mDAC-HEP properties were preserved even after 10 reuses. This method presents the following advantages: easy synthesis of the composite at low cost, affinity purification steps with the help of magnetic field and reuse.

Key words: antithrombin; heparin; immobilization; magnetic support; purification.

1. Introduction

Heparin (Hep) is a highly sulfated linear polysaccharide pertaining to the family of glycosaminoglycans (GAGs), which has been used in clinic because of its anticoagulant property [1]. Its structure is composed by linear chain with repeating disaccharide units comprised of an uronic acid (iduronic or glucuronic) [2] and glucosamine that can be either N-acetylated or N-sulfonated [3]. As a result of this structure Hep has the highest negative charge density when compared to any other biologically active macromolecule [4]. The net negative charge of Hep has been associated to its property of binding to various proteins strongly [5]. Therefore, the literature describes several "heparin binding protein" such as the growth factor basic fibroblast (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibronectin (FN) and antithrombin (AT). Also it plays an important role in regulating the activity and stability of these proteins [6]. Human AT is a plasma protein involved mainly in anti-coagulation [7]. Hep has reactive functional groups (carboxylates and sulphates) that enable it for covalent immobilization onto water insoluble matrices [8]. Immobilized Hep can interact, for example with coagulation factors, acting as an affinity ligand capable of purifying proteins [9]. This method is known as heparin affinity chromatography that is used to purify or fractionate biological samples [10]. However, immobilized Hep on column containing resins such as Sepharose has been more frequently used for human plasma AT purification [11].

Here, an alternative procedure is proposed based on immobilized Hep on ferromagnetic Dacron. The advantages of this proposal are: the Hep derivative is easily synthesized using low cost reagents; can be easily removed from the incubation mixture by applying a magnetic field and it is reusable. In our laboratory, magnetic Dacron has been proposed for enzyme immobilization [12, 13, 14]. Dacron or polyethylene terephthalate (PET) is a widely used polymer derived from condensation reaction between terephthalic acid and ethyleneglycol and has good mechanical and chemical properties [15].

2. Material and methods

2.1. Materials and reagents

Terphane Ltda. (Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil) kindly donated Dacron. Heparin was purchased from Cristália Chemicals & Pharmaceuticals Ltda (São Paulo, Brazil). Carbodiimide (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; EDAC), N-hydroxysuccinimide (NHS), hydrazine hydrate, antithrombin III from human plasma (lyophilized powder, $\geq 95\%$ - SDS-PAGE), ferric and ferrous chloride were purchased from Sigma-Aldrich Ltda (São Paulo, Brazil). The antithrombin amidolytic activity kit

(TriniCHROMTM Antithrombin IIa) was acquired from the Trinity Biotech SA (New Jersey, USA), whereas the activated partial thromboplastin time (aPTT) kit was from Labtest Diagnóstica (Minas Gerais, Brazil). Human blood was collected from a volunteer under the Ethical Committee of the Universidade Federal de Pernambuco approval.

2.2. Synthesis of magnetic Dacron-hydrazide (mDAC)

Dacron (polyethylene terephthalate) was converted to Dacron-hydrazide by hydrazinolysis reaction according to Amaral et al. [12]. Briefly: Films of Dacron (4 g) were cut in strips and incubated in methanol (100 mL) containing hydrazine hydrate (10 mL) at 40°C for 48 h with stirring. Afterward, the Dacron-hydrazide obtained (white powder) was washed twice with methanol and distilled water, successively. Then the Dacron-hydrazide was magnetized by co-precipitation method of $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (mDAC). Briefly: Hydrazide-Dacron (2 g) was stirred in deionized water (100 mL), after was added an aqueous solution (10 mL) containing $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.1 M) and $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.6 M). This mixture remained under vigorous stirring at 90°C for 30 min with pH adjusted to 10.0 using ammonium hydroxide.

2.3. Characterization of magnetic particles

The particle size, morphology and chemical composition of Dacron-hydrazide and mDAC were established by scanning electronic microscopy (SEM) utilizing a QUANTA 200 FEG electron microscope equipped with Energy Dispersive X-ray (EDX). The structural properties were characterized by X-ray diffraction (XRD) performed at room temperature in the range $10^\circ - 90^\circ$, in equal 2θ steps of 0.02° , using Bruker D8 Advance diffractometer with $\text{CuK}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). Magnetization measurements were made as a function of applied magnetic field ($M \times H$) using a vibrating sample magnetometer (VSM), Versalab, manufactured by Quantum Design. The measurements were obtained at 293 K, 300 K and 313 K, with magnetic fields in the -30 KOe to +30 KOe range.

2.4. Immobilization of heparin on the mDAC

First, a solution of heparin (3 mg/mL) was treated with EDAC/NHS to activate heparin carboxylic groups according to Oliveira et al. [16]. An aliquot of this functionalized heparin (1 mL) was incubated with 30 mg of mDAC for 72 h with mild agitation yielding the covalently immobilized heparin on the magnetic support (mDAC-HEP composite). The composite were recovered under a magnetic field (6000 Oe) and washed ten times with deionized water to remove non-immobilized heparin. Under this magnetic field the particles

precipitation occurred in about 30 s but one minute was used to assure that all of them were collected. The supernatant (SB), first washed (L1) and second washed (L2) were reserved for heparin determination. This magnetic composite was stored in water at 4°C and used in two moments: time zero (immediately synthesized) and 24 months stored (stored during two years) in order to investigate the composite stability for purification of antithrombin.

2.5. Determination of heparin

Heparin was determined according to Oliveira et al. [16] based on the property of heparin to form complexes with basic dyes such as methylene blue. The calibration curve was constructed using heparin concentrations from 10 to 100 µg/mL. The amount of immobilized heparin was estimated through the difference between the amounts of offered heparin with that found in the supernatants (SB, L1 and L2).

2.6. Physical-chemical analysis

Infrared spectra of the 24 months stored magnetite (MAG), mDAC and mDAC-HEP were analyzed using, respectively, a BRUKER instrument model IFS 66 (Central Analytical of the Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil).

2.7. Plasma antithrombin purification

Citrated human plasma (1.0 mL) was incubated with mDAC-HEP (30 mg) and kept under stirring for 1 h at 4°C. Both time zero and 24 months stored preparations of mDAC and mDAC-HEP were used in the plasma AT purification. Then, the magnetic composite was collected by a magnetic field (6000 Oe) and the supernatant stored for further analysis. The composite was washed out with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2, containing 150 mM NaCl (PBS) and subsequently; the composite was eluted with the same buffer containing an increasing gradient of NaCl (0.25 M; 0.5 M; 1.0 M). Furthermore, both mDAC-HEP preparations (time zero and 24 months stored) were reused ten times intercalating each successive use with PBS washing fifty times.

2.8. Measurement of antithrombin activity

The plasma antithrombin activity was evaluated by its amidolytic inhibition using chromogenic substrate assay (Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA) and the aPTT. These procedures were carried out according to the manufacturers instructions. The aPTT test for the plasma

was performed adding 20 μ L of eluate obtained with the gradient 1.0 M NaCl to the reaction system kit.

2.9. Electrophoresis SDS/PAGE

The eluates obtained by increasing gradient of NaCl (0.25 M; 0.5 M; 1.0 M) were analyzed by gel electrophoresis sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) 12,5% according to Laemmli [17]. The two mDAC-HEP preparations were used: time zero and 24 months stored.

2.10. Statistics

Statistical analysis was performed using OriginPro 8.5 (OriginLab, Northampton, MA 01060, USA). All data are presented as the arithmetic mean $\pm$ standard deviation of at least 3 independent replicates, except the data of reuse the material.

3. Results and Discussion

3.1. Morphology and size of particles

A white powder was obtained after Dacron hydrazinolysis reaction (Dacron-hydrazide) and a dark one after being magnetized by the co-precipitation of $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (mDAC). Images obtained by SEM (Fig. 1) showed heterogeneous morphology and similar size for both Dacron-hydrazide (Fig. 1a; 0.7 – 2.0 μm) and mDAC (Fig. 1b; 1.0 – 2.0 μm) microparticles, whereas EDX analysis demonstrated the elements C, N and O in Dacron-hydrazide and the additional presence of iron (Fe) in mDAC particles. These findings indicate the presence of Dacron in the magnetic composite.

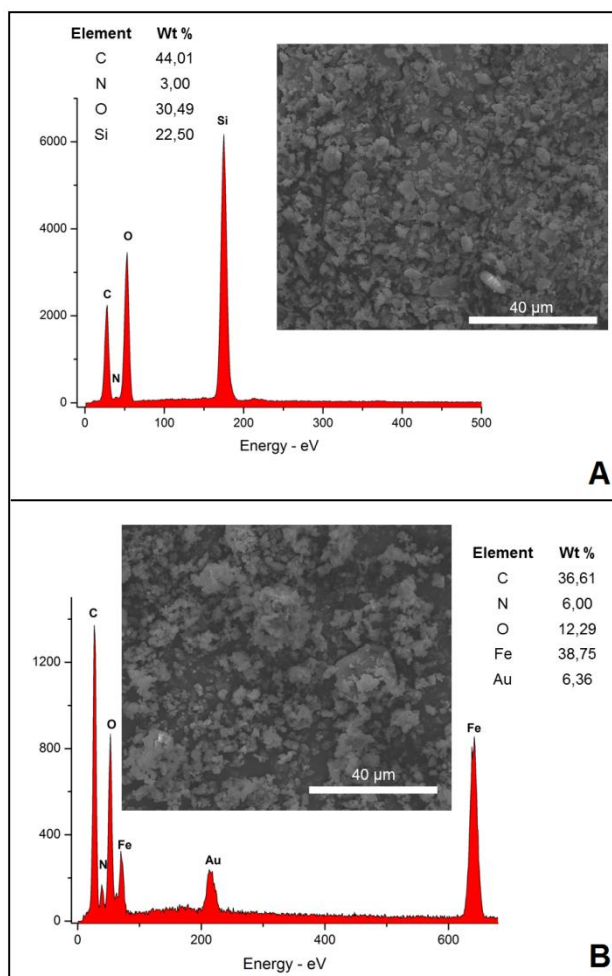


Figure 1 SEM images and EDX of Dacron hydrazide (a) and mDAC (b).

3.2. X-ray analysis

Presence of magnetite phase in the Dacron-hydrazide particles was indicated by X-ray analysis. The X-ray diffraction patterns of magnetite, Dacron hydrazide and mDAC particles can be seen in Fig. 2. In magnetite XRD pattern the 2θ peaks concerning to this phase appear at 18.39° , 30.26° , 35.65° , 43.33° , 53.74° , 57.76° , 62.94° , 74.49° and 79.50° .

These peaks of magnetite also appear in mDAC's XRD pattern in addition to the peaks relative to Dacron hydrazide material. Corresponding to the Dacron hydrazide's peaks: 11.24° , 13.10° , 17.57° , 19.25° , 22.35° , 22.58° , 23.44° , 25.33° , 26.54° , 27.49° , 28.51° , 30.33° , 32.66° , 34.43° , 35.49° , 36.76° , 38.71° , 39.23° , 41.17° , 45.54° , 45.75° , 48.42° , 50.64° , 52.18° , 54.24° , 56.75° . The magnetite diffractogram revealed values of cell parameter for the magnetite phase of $8,37 \text{ \AA}$. In relation the cell parameter of the magnetite phase formed in mDAC, its value is $8,36 \text{ \AA}$, very close to the value obtained by Jamarillo-Tabares et al. [18].

The peaks corresponding to magnetite are according to Jamarillo-Tabares et al. [18] and Cabrera et al. [23]. The mDAC particles XRD peaks are slightly broader than those of the Dacron-hydrazide (powder), which is characteristic for amorphous materials and also of ultrafine crystalline particles. It suggests the presence of the polyethylene terephthalate in mDAC particles.

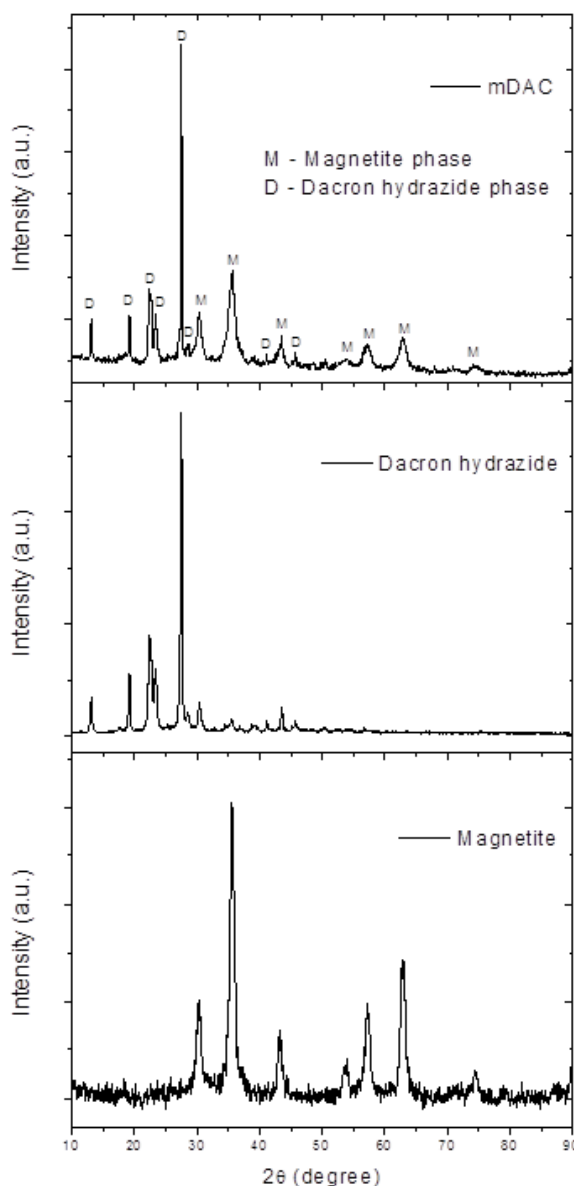


Figure 2 X-ray diffraction patterns of magnetite (M), Dacron (D) and mDAC particles (mDAC).

3.3. Magnetization measurements

The magnetization curves dependent on the magnetic field for pure magnetite and mDAC particles are shown in Fig. 3a and 3b, respectively. The hysteresis curves revealed a magnetic

saturation (M_s) to mDAC of 23.13 emu/g (293 K), 23.02 emu/g (300 K) and 22.67 emu/g (313 K). As expected, the mDAC particles had a magnetic ordering but the degree of M_s was lower (2.74 times) to temperatures of 293 K, 300 K and 313 K as compared to pure magnetite. For all these temperatures, the decrease in saturation could be related to magnetite modification in the mDAC particles due to the presence of polyethylene terephthalate. Cabrera et al. [23] and Maciel et al. [24] synthesizing minerals composites and magnetic levan, respectively, reported similar results. Furthermore, according to magnetization of MAG and mDAC analysis neither remnant magnetization nor coercivity was observed suggesting that both magnetic materials exhibited superparamagnetism. Nicolás et al. [25] also reported that the magnetic particles produced by co-precipitation method modified by the addition of stabilizers presented superparamagnetic behavior.

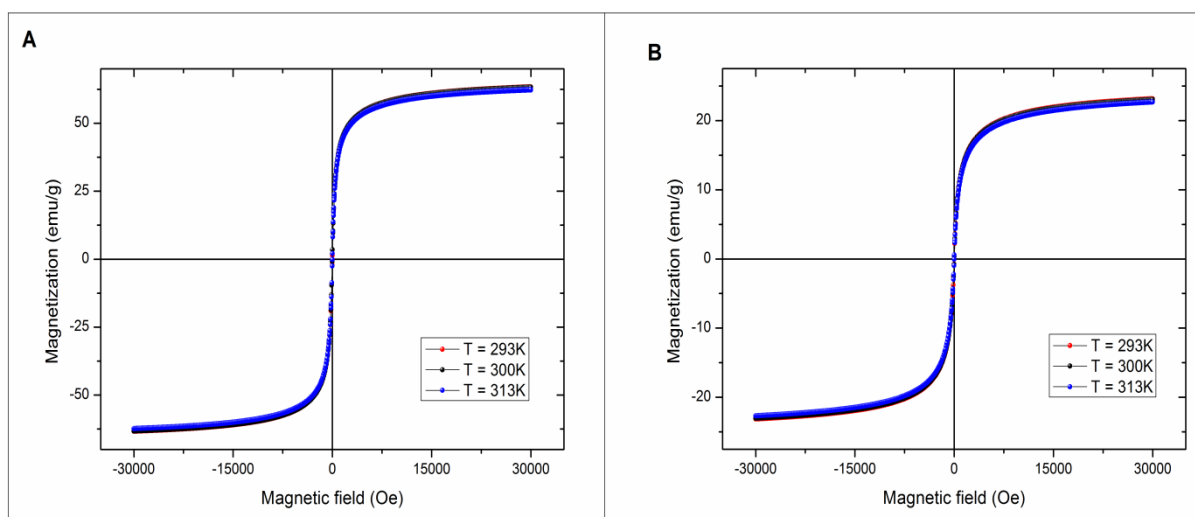


Figure 3 Hysteresis curves at 293 K, 300 K and 313 K for MAG (a) and mDAC (b).

3.4. Heparin immobilization

The covalent immobilization of Hep was established between the Hep carboxyl groups with and mDAC amino groups yielding an amide bond. The mDAC-HEP presented an amount of 51 ± 0.1 μg of heparin per mg of mDAC, whereas 13 ± 0.4 μg of heparin was adsorbed to each mg of MAG. About half of heparin offered was covalently immobilized on the mDAC particles. These quantities of immobilized heparin are comparable to those described in the literature, disregarding the differences between the methods of restraint that were used [26, 27, 28]. However, Funahashi et al. [29] reported a preparation containing 16 μg of Hep per mg of wet gel (Sepharose-4B modified to contain amine groups) using as a coupling agent EDAC whereas this work yielded preparations with about 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of support.

3.5. Assignment of infrared absorption bands

The infrared spectrum of mDAC-HEP showed a pattern of bands in the region between 1700 and 1500 cm^{-1} indicating the exit of the immobilization (Fig. 4). In this region one can point to the amide I bands (1650 cm^{-1} , arrow 2) and amide II (1544 cm^{-1} , arrow 3) suggesting the amide group formed by linking the carboxyl group of heparin with the hydrazide group of Dacron. Dacron spectrum presents a band around 3300 cm^{-1} (NH_2 group, arrow 1) that is absent in mDAC-HEP suggesting that the hydrazide groups were consumed during the immobilization reaction. Infrared spectra of the three constituent particles: magnetite, Dacron-hydrazide and heparin have been described in the literature. Yamaura et al. [30] observed strong bands around 632 cm^{-1} and 585 cm^{-1} in their magnetic nanoparticles and attributed to the presence of magnetite. Ma et al. [31] and Peng et al. [32] reported similar spectra. Yamaya et al. [33] obtained terephthalate-hydrazide from Dacron as a method of plastic recycling. They reported bands at 3330, 1630 and 1540 cm^{-1} and characteristics of dihydrazide obtained from the Dacron. Here, the infrared spectra of the composites did not denote any band characteristic of heparin, probably because Dacron-hydrazide bands overlapped them. Infrared of heparin should presents bands around 3400, 1624, 1425 and 1236 cm^{-1} [16]. In both derivatives: mDAC and mDAC-HEP were found the elements C, H and N as expected because both have these elements. An indication that the immobilization occurred can be suggested from the C: N ratio of the derivative that was higher (5.94) that for the mDAC (4.55) and intermediate value of the heparin (10.0) [34, 35, 36].

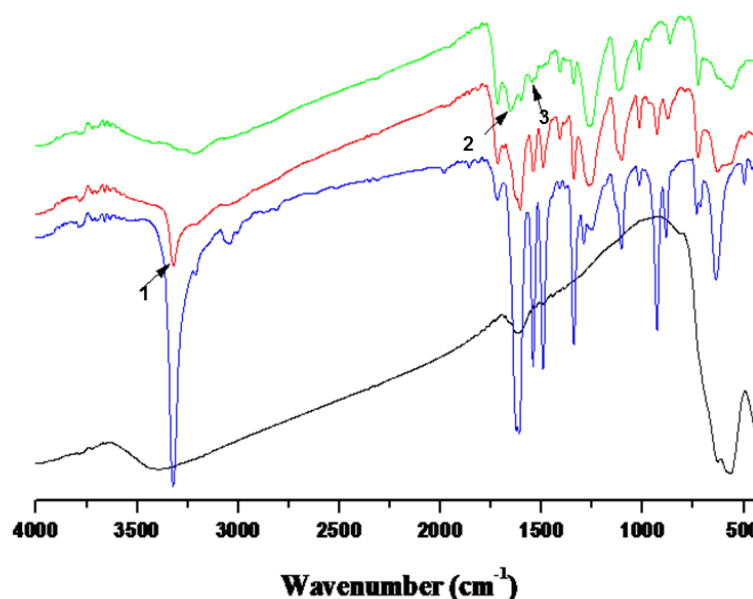


Figure 4 Infrared spectra of MAG, Dacron-hydrazide; mDAC and mDAC-HEP (In ascending order). 1: Band of NH_2 group of the hydrazide; 2: Band of amide I; 3: Band of amide II.

3.6. Plasma antithrombin purification.

Heparin chromatography is a powerful technology for separating various target biomolecules and has been widely used to fractionate proteins from the extract of prokaryotic organism or eukaryotic cells [19, 20]. The Hep affinity chromatography associated to elution increasing concentrations of NaCl is the most common method for separating human plasma AT [21, 22]. Fig. 5 shows the plasma AT activity before and after being incubated with mDAC-HEP and mDAC using time zero and after 2 years of storage preparations. AT was removed after incubation with time zero mDAC-HEP preparation (Fig. 5a) at the 1st (approximately 20%) as well as during all reuses keeping removing capacity at the 10th reuse (approximately 10%). Negligible removing properties were observed for the mDAC (Fig. 5b) as compared for the fresh plasma antithrombin activity. Similar behavior was observed for the 2 years of stored preparation employment.

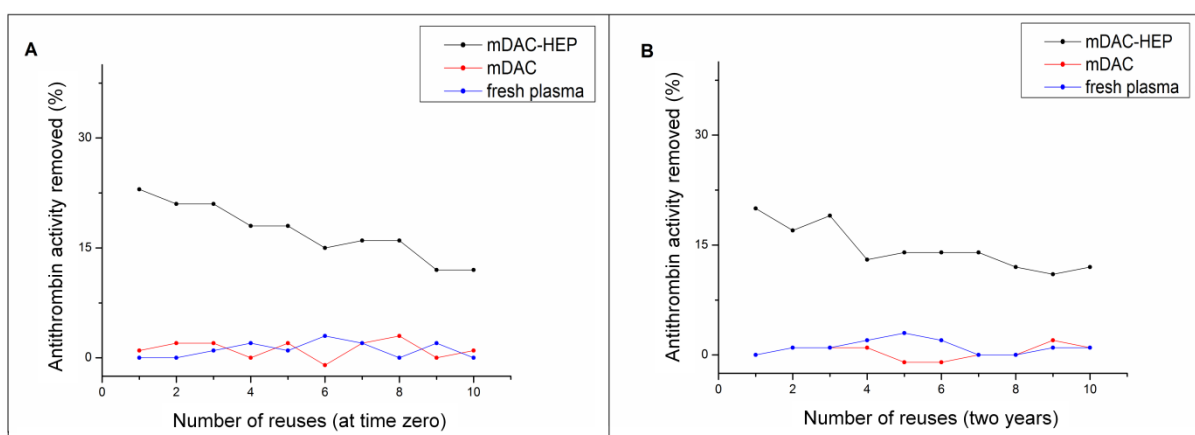


Figure 5 Activity removed of antithrombin present in fresh plasma and after direct contact with the mDAC derivatives. Immediately synthesized (a) and 2 years stored (b).

3.7. In vitro anticoagulant assay and electrophoresis

Fig. 6 displays the aPTT for the eluates obtained from the mDAC-HEP-plasma antithrombin complex washings with PBS containing 1 M NaCl. Higher aPTT values can be noticed for the eluates from mDAC-HEP compared with the values for those tests of fresh plasma and mDAC either using the zero time (Fig. 6a) or 2 years stored (Fig. 6b) preparations at the 1st use and all reuses. Values for the mDAC eluates did not experience increase in coagulation time and were close to the fresh plasma. Fig. 7 presents plasma proteins eluted from zero time and 2 years stored mDAC-HEP-AT complex preparations (Fig. 7a) and MAG (Fig. 7b) using 0.25, 0.5 and 1 M NaCl solutions stepwise. No protein was eluted with higher NaCl

concentrations (data not shown). The number of protein bands decreased as far as the NaCl concentrations increased either for the eluates from zero time or 2 years stored preparations. As displayed in Fig. 5 antithrombin activity was only demonstrated in the 1.0 M NaCl elution. The electrophoresis of this elution showed a band at the same position of the standard antithrombin (58 kDa) employing both preparations. It is important to notice that a strong band is presented above and one can suggest that is corresponding to albumin (66.5 kDa). Furthermore, the results for the mDAC preparation did not present protein band at antithrombin position (Fig. 7b). The purification profile observed in the control can be attributed to the presence of absorbed heparin. Nevertheless, this heparin was not capable to purify antithrombin in detectable amounts.

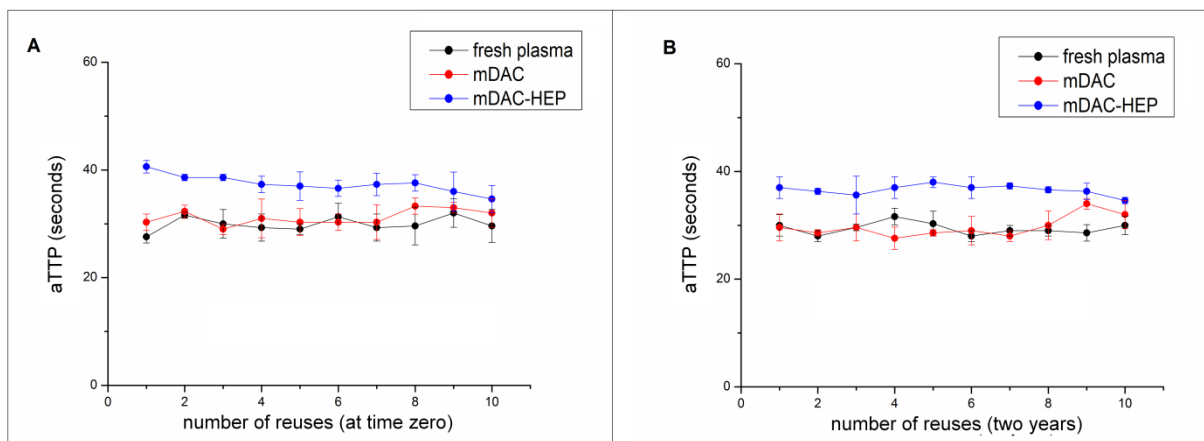


Figure 6 Activated partial thromboplastin time (aPTT) of fresh plasma performed by adding small aliquot of the eluate (1.0 M) of mDAC derivatives. Immediately synthesized (a) and 2 years stored (b).

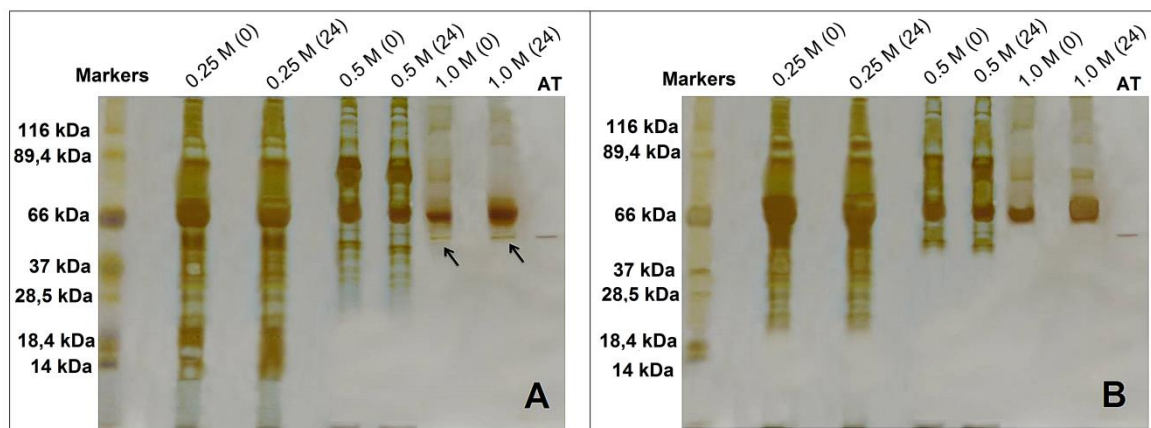


Figure 7 Electrophoresis of protein fractions of plasma obtained with the use of magnetic particles. Elutions were carried out using increasing NaCl concentrations (0.25; 0.5 and 1.0

M) in the magnetic derivatives: mDAC-HEP (a) and mDAC (b). AT: Standard Antithrombin. (0): Elutions performed in supports immediately synthesized. (24): Elutions performed in supports stored for 24 months. Arrows: Antithrombin (58 kDa).

3.8. Application of mDAC-HEP composite

Fig. 8 schematically shows the mDAC-HEP synthesis. It is a simple procedure consisting of the amide bond breaks of the Dacron by hydrazine hydrate introducing amine group essential for the covalent linkage to the treated Hep (functionalization with EDAC/NHS). However, before this step the Dacron-hydrazide was magnetized to facilitate the purification operations under a magnetic field. Immobilized biomolecules onto magnetic particles offer conditions for large-scale uses once reactors can be devised to separate them from the incubation mixture by applying a magnetic field. This strategy could be an alternative to the use of columns. Here, the main focus was AT purification due to its medical importance in the inactivation of blood clotting [37]. The separation process of proteins from human plasma was carried by elution using increasing NaCl concentrations of NaCl. The presence of AT was evaluated in the eluates by its amidolytic inhibition, aPTT and SDS-PAGE. AT was eluted in the PBS containing 1.0 M NaCl. Furthermore, the results also showed that mDAC-HEP stored for 2 years still presented capacity to complex to AT and both preparations (zero time and 2 years stored) can be reused ten times preserving affinity properties. It is worthwhile to notice that other plasmatic proteins complexed to the mDAC-HEP preparation and could be easily removed from the magnetic particles under a magnetic field using step elution with increasing ionic strength solutions.

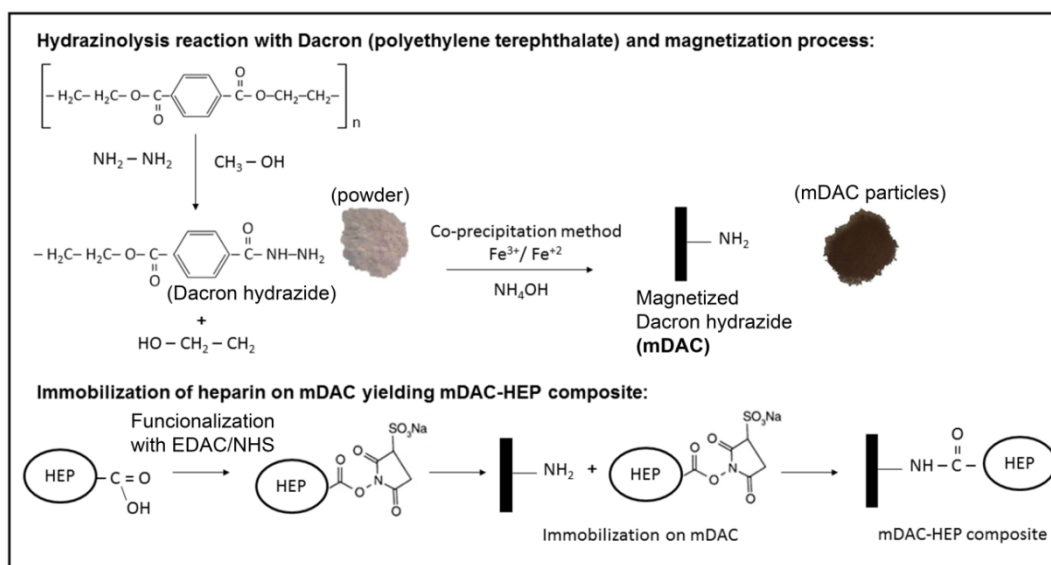


Figure 8 Schematic route of mDAC-HEP composite synthesis. Dacron is firstly hydrolyzed under hydrazine hydrate that introduces amino group and subsequently co-precipitated with Fe^{2+} and Fe^{3+} . Hep is simultaneously functionalized with EDAC/NHS. Finally, magnetic Dacron-hydrazide and functionalized Hep are incubated to form mDAC-HEP.

4. Conclusion

According to the results presented in this contribution one can conclude that: mDAC microparticles (1-2 μm) showed good magnetic ordering and a suggestive superparamagnetic behavior; magnetite and Dacron-hydrazide were demonstrated in mDAC by EDX and XRD analyses; heparin was covalently fixed onto the mDAC as demonstrated by Infrared spectra; this derivative (mDAC-HEP) showed to form complex to human plasmatic proteins, including antithrombin, and to release these proteins under increasing ionic strength solutions; mDAC-HEP preparations can be reused ten times at least and stored for 2 years preserving these affinity properties.

Acknowledgements

The authors thank: CNPq and FACEPE for financial support; Department of Physics/UFPE for the physical analysis; Northeast Strategic Technology Center (CETENE) for the electron microscopic analysis and Mr. Adeilton Oliveira (ANALAB clinical laboratory) by the technical assistance.

References

- [1] VISKOV, C.; ELLI, S.; URSO, E. et al. Heparin dodecasaccharide containing two antitrombin binding pentasaccharides Structural features and biological properties. *J. Biol. Chem.*, 288, 25895-25907, 2013.
- [2] MOURIER, P.; ANGER, P.; MARTINEZ, C.; et al. Quantitative compositional analysis of heparin using exhaustive heparinase digestion and strong anion exchange chromatography. *Anal. Chem. Res.*, 3, 46-53, 2015.
- [3] DONEANU, C.E.; CHEN, W.; GEBLER, J.C. Analysis of oligosaccharides derived from heparin by ion-pair reversed-phase chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 81, 3485-3499, 2009.
- [4] CAPILA, I.; LINHARDT, R.J. Heparin – protein interactions. *Angewandte Chem.*, 41, 390-412, 2002.
- [5] KAWAKAMI, A.; HIRAYAMA, K.; KAWAKAMI, F.; et al. Purification and biochemical characterization of a fibroblast growth factor-binding protein (FGF-BP) from the lactoferrin fraction of bovine milk. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1760, 421-431, 2006.

- [6] ARISAKA, Y.; KOBAYASHI, J.; YAMATO, M.; et al. Switching of cell growth/detachment on heparin-functionalized thermoresponsive surface for rapid cell sheet fabrication and manipulation. *J. Biomater.*, 34, 4214-4222, 2013.
- [7] KARLSSON, G.; WINGE, S. Separation of latent, prelatent, and native forms of human antithrombin by heparin affinity high-performance liquid chromatography. *Protein Expr. Purif.*, 33, 339-345, 2004.
- [8] MURUGESAN, S.; XIE, J.; LINHARDT, R.J. Immobilization of heparin: approaches and applications. *Curr. Top. Med. Chem.*, 8, 80-100, 2008.
- [9] Krapfenbauer K, Fountoulakis M. Improved enrichment and proteomic analysis of brain proteins with signaling function by heparin chromatography. *Methods Mol. Biol.*, 566, 165-180, 2009.
- [10] LEI, T.; HE, Q.Y.; WANG, Y.L.; et al. Heparin chromatography to deplete high-abundance proteins for serum proteomics. *Clinic Chimica Acta*, 388, 173-178, 2008.
- [11] JOSIC, D.; BAL, F.; SCHWINN, H. Isolation of plasma proteins from the clotting cascade by heparin affinity chromatography. *J. Chromatogr.*, 632, 1-10, 1993.
- [12] AMARAL, I.P.G.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; CARVALHO-JÚNIOR, L.B.; et al. Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Process Biochem.*, 41, 1213-1216, 2006.
- [13] NERI, D.F.M.; BALCÃO, V.M.; CARDOSO, S.M.; et al. Characterization of galactooligosaccharides produced by β -galactosidase immobilized onto magnetized Dacron. *Int. Dairy J.*, 21, 172-178, 2011.
- [14] SORIA, F.; ELLENRIEDER, G.; OLIVEIRA, G.B.; et al. α -L-Rhamnosidase of *Aspergillus terreus* immobilized on ferromagnetic supports. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 1127-1134, 2012.
- [15] DUARTE, L.T.; PAULA E SILVA, E.M.; BRANCO, J.R.T.; et al. Production and characterization of thermally sprayed polyethylene terephthalate coatings. *Surf. Coat Technol.*, 182, 261-267, 2004.
- [16] OLIVEIRA, G.B.; CARVALHO JR, L.B.; SILVA, M.P.C. Properties of carbodiimide treated heparin. *J. Biomater.*, 24, 4777-4783, 2003.
- [17] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nat.*, 227, 680-685, 1970.
- [18] JARAMILLO-TABARES, B.E.; ISAZA, F.J.; TORRESI, S.I.C. Stabilization of polyaniline by the incorporation of magnetite nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.*, 132, 529-533, 2012.
- [19] MARQUES, M.A.M.; ESPINOSA, B.J.; SILVEIRA, E.K.X.; et al. Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions. *J. Proteomics.*, 4, 2942-2953, 2004.
- [20] SRIVASTAVA, P.N.; FAROOQUI, A.A. Heparin-sepharose affinity chromatography for purification of bull seminal-plasma hyaluronidase. *Biochem. J.*, 183, 531-537, 1979.
- [21] KONG, Y.; ZHANG, G.; LUO, J.; et al. Facile purification and characterization of recombinant human antithrombin III from transgenic goat milk. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 86, 1303-1309, 2011.
- [22] WICKERHAUSER, M.; WILLIAMS, C.; MERCER, J. Development of large scale fractionation methods. VII Preparation of antithrombin III concentrate. *Vox Sanguinis*, 36, 281-293, 1979.

- [23] CABRERA, M.; MACIEL, J.C.; QUISPE-MARCATOMA, J.; et al. Magnetic composites from minerals: study of the iron phases in clay and diatomite using Mössbauer spectroscopy, magnetic measurements and XRD. *Hyperfine Interact.*, 224, 197-204, 2014.
- [24] MACIEL, J.C.; ANDRAD, P.L.; NERI, D.F.M.; et al. Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. *J. Magn. Magn. Mater.*, 324, 1312-1316, 2012.
- [25] NICOLÁS, P.; SALETA, M.; TROIANI, H.; et al. Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: Experimental and mechanistic issues. *Acta Biomater.*, 9, 4754-4762, 2013.
- [26] CHEN, L.; GUO, C.; GUAN, Y.; et al. Isolation of lactoferrin from acid whey by magnetic affinity separation. *Sep. Purif. Technol.*, 56, 168-174, 2007.
- [27] BJÖRKLUND, M.; HEARN, M.T.W. Synthesis of silica-based heparin-affinity adsorbents. *J. Chromatogr. A*, 728, 149-169, 1996.
- [28] DENIZLI, A.; PISKIN, E. Heparin-immobilized polyhydroxyethylmethacrylate microbeads for cholesterol removal: a preliminary report. *J. Chromatogr. B*, 670, 157-161, 1995.
- [29] FUNAHASHI, M.; MATSUMOTO, I.; SENO, N. Preparation of three types of heparin-sepharose and their binding activities to thrombin and antithrombin III. *Anal. Biochem.* 126, 414-421, 1982.
- [30] YAMAURA, M.; CAMILO, R.L.; SAMPAIO, L.C.; et al. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.*, 279, 210-217, 2004.
- [31] MA, M.; ZHANG, Y.; YU, W.; et al. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids Surf A: Physicochem. Eng. Asp.*, 212, 219-226, 2003.
- [32] PENG, Z.G.; HIDAJAT, K.; UDDIN, M.S. Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles. *J. Colloid Interface Sci.*, 271, 277-283, 2004.
- [33] YAMAYE, M.; HASHIME, T.; YAMAMOTO, K.; et al. Chemical recycling of poly(ethylene terephthalate) 2 Preparation of terephthalohydroxamic acid and terephthalohydrazide. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 41, 3993-3998, 2002.
- [34] GRIFFIN, C.C.; LINHARDT, R.J.; VAN GORP, C.L.; et al. Isolation and characterization of heparan sulfate from crude porcine intestinal mucosal peptidoglycan heparin. *Carbohydr. Res.*, 276, 183-197, 1995.
- [35] DANISHEFSKY, I.; SISKOVIC, E. Heparin derivatives prepared by modification of the uronic acid carboxyl groups. *Thromb Res.*, 1, 173-182, 1972.
- [36] BURSON, S.L.; FAHRENBACH, M.J.; FROMMHAGEN, L.H.; et al. Isolation and Purification of Mactins, Heparin-like Anticoagulants from Mollusca. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 5874-5878, 1956.
- [37] LIU, T.; LIU, Y.; CHEN, Y.; et al. Immobilization of heparin/poly-L-lysine nanoparticles on dopamine-coated surface to create a heparin density gradient for selective direction of platelet and vascular cells behavior. *Acta Biomater.*, 10, 1940-1954, 2014.

6 ARTIGO 2

FRACTIONATION OF HUMAN PLASMA PROTEINS BY AFFINITY TO HEPARIN IMMOBILIZED ONTO MAGNETITE COATED WITH POLYANILINE.

Aurenice Arruda Dutra das Mercês¹, Karciano José Santos Silva², Gabriela Ayres Fragoso Nascimento¹, Jackeline da Costa Maciel³, Davian Martinez Buitrago², José Albino Oliveira de Aguiar², Luiz Bezerra de Carvalho Júnior¹.

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

²*Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil.*

³*Universidade Federal de Roraima, Aeroporto, 69310-000 Boa Vista, RR, Brazil.*

ABSTRACT

This work aimed to immobilize heparin (HEP) onto magnetite coated with polyaniline particles (MAG-PANI) and to use for fractionation and isolation of proteins from human plasma. Magnetite (MAG) was obtained by co-precipitation method of Fe²⁺/Fe³⁺ and then the particles were coated with polyaniline by the oxidation reaction of aniline with potassium permanganate. HEP was activated by carbodiimide and N-hydroxysuccinimide and immobilized on MAG-PANI yielding the MAG-PANI-HEP composite containing 26.4 ± 0.09 µg heparin/mg of support. TEM analysis showed that MAG-PANI has a spherical morphology and size of 14.4 ± 0.9 nm and XRD indicates the presence of polyaniline phase in MAG. Besides that MAG-PANI exhibited superparamagnetism and magnetic saturation equal to about 66 emu/g to 293 K, 300 K and 313 K. Human plasma was diluted (1:5) with phosphate buffer (PBS) and incubated with MAG-PANI-HEP and washed with phosphate buffer (PBS) containing increasing NaCl concentration and the fractionation process was monitored at 280 nm. Electrophoresis of collected fractions 1 to 6 showed the presence of proteins with 23.9 to 151.3 kDa. F9 collected with 1.0 M NaCl in PBS showed a single band (58.8 kDa) corresponding to antithrombin, a protein with anticoagulant activity. APTT test was performed and it was observed that the plasma does not clot after being incubated with F9. This method can be applied to the blood products industry since it proved useful as a tool for the fractionation of human plasma being possible to make the depletion of plasma proteins and also isolate human antithrombin.

Key words: fractionation; heparin; immobilization; magnetite; polyaniline; plasma proteins.

1. Introduction

Human plasma contains proteins with a wide range of biological functions and is one of the most commonly used biofluids in clinical diagnostics. However, the complexity of plasma, namely due to the wide dynamic range of protein abundance, has been a major obstacle to the comprehensive analysis and understanding of the plasma proteome [1]. These high-abundance proteins hinder the detection of low-abundance proteins which are potential biomarkers for various diseases. To improve their detection, high-abundance proteins like IgG and albumin must be removed [2]. Different methods can be used to deplete these proteins in plasma samples, being liquid chromatography the most popular one. A variety of stationary phases are available for this purpose such as affinity columns containing lectins, peptides or inorganic ligands. These methods are easy to use and to scale-up, but are relatively expensive. Additionally, they have some disadvantages, such as non-specific interactions that lead to the loss of some proteins [3]. Heparin is a linear polysaccharide of the glycosaminoglycan family, has a highly sulfated chain formed by repeating disaccharide units consisting of a uronic acid (iduronic or glucuronic) and glucosamine [4]. Due to this structure heparin has a higher negative charge density, when compared to any other biologically active macromolecule [5], allowing heparin to interact with a large number of different proteins [6]. Heparin when immobilized may interact with the coagulation factors, acting as an affinity ligand capable of interacting with these proteins [7], this method is known as heparin-affinity chromatography and is also widely used to fractionate or purify proteins and other biological substances that may interact with heparin. The high binding affinity of AT to heparin has been used in affinity chromatography systems for the isolation of antithrombin from human plasma [8]. Furthermore, the use of heparin affinity chromatography can be applied as a strategy to selectively remove some abundance proteins, facilitating the analysis of low concentration in plasma proteins [9]. Magnetic particles are among the most commonly used materials in separation techniques, with applications such as immobilization of proteins, enzymes, and other bioactive agents used in medical analytical systems and biotechnology. The paramagnetic properties of these particles allow the easy isolation of products in solution by attracting them with the aid of an external magnetic field. Thus, suspended magnetic particles tagged with analytes can be removed from large volume samples using a magnet and their isolation and purification are easier and faster than with other methods [10]. The iron oxide nanoparticles in the crystalline form of magnetite (Fe_3O_4) contain supermagnetic and

ferromagnetic properties and these unique features are of great interest in various fields, especially in the biomedical field due to its low toxicity, high magnetic saturation and easy synthesis [11]. Polyaniline is a conducting polymer that is easily synthesized, low cost and good environmental stability [12]. The magnetic matrix coating with polyaniline it is attractive for immobilization of biomolecules. Some studies have used magnetite particles coated with polyaniline as a support for the immobilization of heparan sulfate [13], creatininase, creatinase and sarcosine oxidase [14], β -galactosidase [15] and trypsin [16]. In this work the use of heparin immobilized on magnetite coated with polyaniline is explored as an affinity column for fractionation, depletion and isolation of some proteins from human plasma.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

Carbodiimide (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; EDAC), N-hydroxysuccinimide (NHS), aniline (ACS reagent $\geq 99.5\%$), ferric and ferrous chloride were purchased from Sigma-Aldrich Ltda (São Paulo, Brazil). The heparin was purchased from Cristália Chemicals & Pharmaceuticals Ltda (São Paulo, Brazil), whereas the activated partial thromboplastin time (APTT) kit was from Labtest Diagnóstica (Minas Gerais, Brazil). Human blood was collected from a volunteer under the Ethical Committee of the Universidade Federal de Pernambuco approval.

2.2. Synthesis and preparation of the magnetic particles

The magnetite was obtained by co-precipitation of ferric and ferrous chloride in aqueous alkaline solution and then the obtained magnetic particles were coated with polyaniline according to Maciel et al. [17] as follows: (a) A solution of 0.1 M KMnO_4 (50 mL) was incubated in 500 mg of magnetite under light stirring for 1 hour at room temperature. Then washing was performed with distilled water then was added 50 mL of aniline (0.5 M in 1.0 M HNO_3), this mixture was in contact for 1 hour at 4 ° C. At the end the material was washed with distilled water.

2.3. Magnetic matrix characterization

Images of morphology of magnetite (MAG) and magnetite coated with polyaniline (MAG-PANI) were established by transmission electronic microscopy (TEM) utilizing a TECNAI 20 - 200kv and the size particles were obtained by analysis of the TEM images using the ImageJ

1.48v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) software. The structural properties were characterized by X-ray diffraction (XRD) performed at room temperature in the range 10° - 90° , in equal 2θ steps of 0.02° , using Bruker D8 Advance diffractometer with $\text{CuK}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). Magnetization measurements were made as a function of applied magnetic field ($M \times H$) using a vibrating sample magnetometer (VSM), Versalab, manufactured by Quantum Design. The measurements were obtained at 293 K, 300 K and 313 K, with magnetic fields in the -30 KOe to +30 KOe range.

2.4. Immobilization and determination of heparin

A solution of heparin with approximately 3.5 mg/mL was treated with EDAC/NHS to activate heparin carboxylic groups according to Oliveira et al [18]. An aliquot (1 mL) of this functionalized heparin solution was incubated with 30 mg of MAG-PANI for 72 h with mild agitation yielding the covalently immobilized heparin on the magnetic support (MAG-PANI-HEP composite). The composite were recovered under a magnetic field (6000 Oe) and washed ten times with deionized water to remove non-immobilized heparin. Under this magnetic field the particles precipitation occurred in about 10. The supernatant (SB), first washed (L1) and second washed (L2) were incubated with methylene blue at room temperature. This resulted in a complex of methylene blue with heparin. The solution was measured at 664 nm using a spectrophotometer (Ultrospec 3000 Pro UV-VIS). The calibration curve was obtained through measurement of the absorbance of a series of standards at heparin concentrations of 10–100 $\mu\text{g/mL}$. The amount of immobilized heparin was calculated from the calibration curve.

2.5. Fractioning of proteins by magnetic composite affinity

Human plasma was obtained from intravenous blood puncture using a citrate tube. The total plasma was diluted (1:5) with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2, containing 150 mM NaCl (PBS). So, 1 mL of the diluted plasma was filtered through a membrane (0.22 μm) and incubated at 30 mg MAG-PANI-HEP for 60 minutes at 4°C . Then, the magnetic composite was collected by a magnetic field (6000 Oe) and the proteins that bind affinity to the magnetic composite were eluted with the PBS containing an increasing gradient of NaCl (0.25 M; 0.5 M; 1.0 M; 1.5 M; 2.0 M). For each concentration gradient, 3 fractions were obtained.

2.6. Monitoring of eluted proteins

During the elution process, the fractions collected with NaCl (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 M) in PBS were monitored at 280 nm (Ultrospec 3000 Pro UV-VIS spectrophotometer) and absorbance values were gathered to mount a chromatogram graph.

2.7. SDS–PAGE electrophoresis

Electrophoresis of proteins SDS/PAGE (sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis) 10.0% was performed to the fractions collected between 1 and 9 corresponding the eluates obtained with NaCl (0.25, 0.5, 1.0 M) in PBS. The molecular weight corresponding to protein bands were analyzed according to their electrophoretic mobility and compared with a standard molecular weight (260 kDa to 26 kDa).

2.8. Antithrombin activity test

The isolated antithrombin (AT) obtained in the fractionation process was incubated at a normal plasma to check their in vitro activity as follows: (a) 100 uL of normal plasma was mixed with 100 μ L of third eluate obtained with the gradient 1.0 M NaCl for 5 minutes at 4°C; (b) the APTT test for this plasma solution was performed using the reaction system kit.

3. Results and Discussion

3.1. Morphology and size of magnetic particles

Magnetic particles obtained by co-precipitation method showed a black powder aspect. The treatment of the particles with KMnO_4 was important to oxidize the aniline and thus obtain the coating with the polyaniline. From the analysis of images obtained with TEM, MAG particles (Fig. 1A), and MAG-PANI particles (Fig. 1B) have a varied morphology like a sphere. In addition, MAG-PANI have a size of 14.4 ± 0.9 nm while MAG showed a smaller size (10.0 ± 1.4 nm). The particles of MAG-PANI have the coating with polyaniline which increased its size when compared to bare particle (MAG). The increased particle size of MAG-PANI when compared to MAG PANI may be attributed to the coating on the magnetite particles with polyaniline. The coating produced changes in the size particle according to Maciel et al. [19] Silva et al. [20]. Similar results were shown by Chelminiak et al. [21] that synthesized magnetite nanoparticles coated with poly (acrylic acid) and this material by TEM analysis showed a size of about 13 nm, larger than compared to pure magnetite.

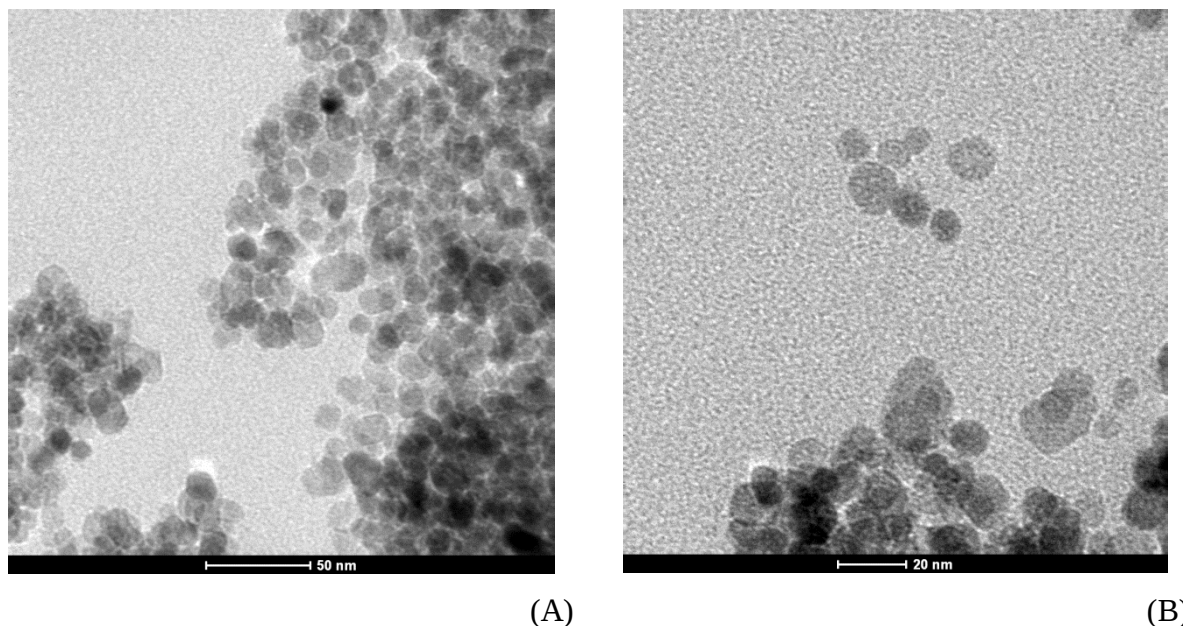


Figure 1. Images obtained by transmission electron microscopy of the synthesized magnetic particles. (A) MAG. (B) MAG-PANI.

3.2. X-ray analysis

The magnetite was the dominant phase in the particles of magnetite coated with polyaniline. X-ray diffraction patterns of magnetite and MAG-PANI particles can be seen in Fig. 2. In MAG-PANI XRD pattern the 2θ peaks concerning to magnetite phase appear at 35.6° , 43.3° , 54.0° , 57.6° , 62.9° , 71.6° , 74.2° , 79.7° and the presence of polyaniline phase was indicted by peaks correponding of 18.6° . These results for MAG-PANI agree with the study by Jaramillo-Tabares [22]. Neri et al. [15] reports that the differentiation between magnetite and magnetite-polyaniline, their lines are close and it is difficult to distinguish them from one another by X-ray diffraction pattern.

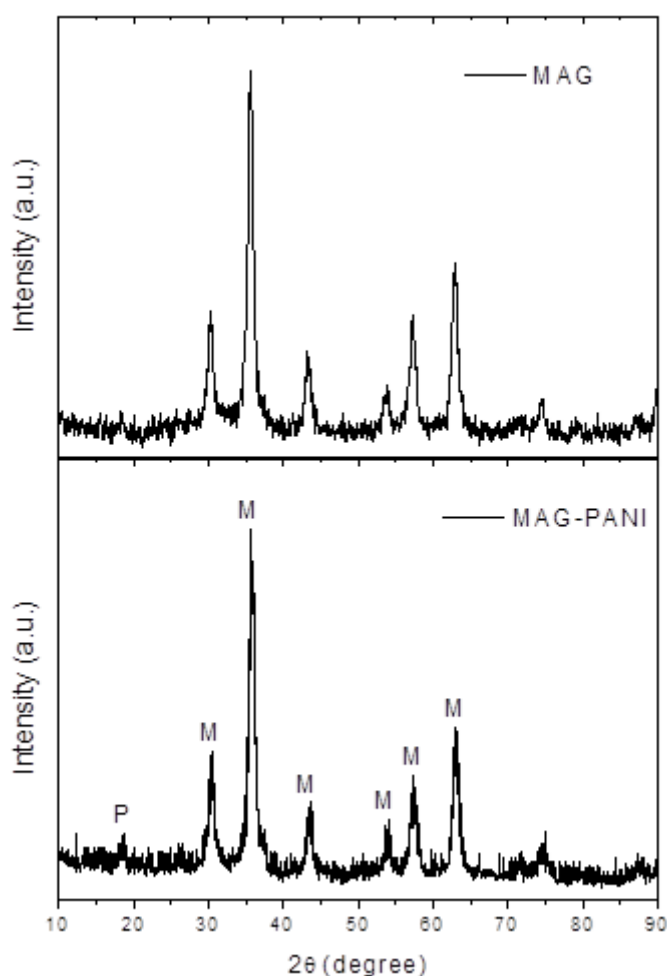


Figure 2. X-ray diffraction patterns of MAG (magnetite bare) and MAG-PANI (magnetite coated with polyaniline). (P) polyaniline phase. (M) magnetite phase.

3.3. Magnetization measurements

Magnetic measurements based on the magnetic field ($M \times H$) of the synthesized magnetic particles is shown in Figure 3. The magnetic saturation (M_s) of the MAG-PANI (Fig. 3A) at 293 K, 300 K and 313 K were 63.3 emu/g, 63.2 emu/g and 62.2 emu/g respectively. However, for the same temperatures, MAG (Fig. 3B) obtained M_s values of 66.5 emu/g, 66.4 emu/g and 65.5 emu/g. The presence of a coating or polymer in magnetite crystal causes a reduction in its magnetic saturation. In the hysteresis curves it was not observed remnant magnetization or coercivity, so, the superparamagnetic behavior suggests that these temperatures [23]. Similar results were obtained in studies of Neri et al. [15], the magnetic saturation of the MAG-PANI was about 60 emu/g.

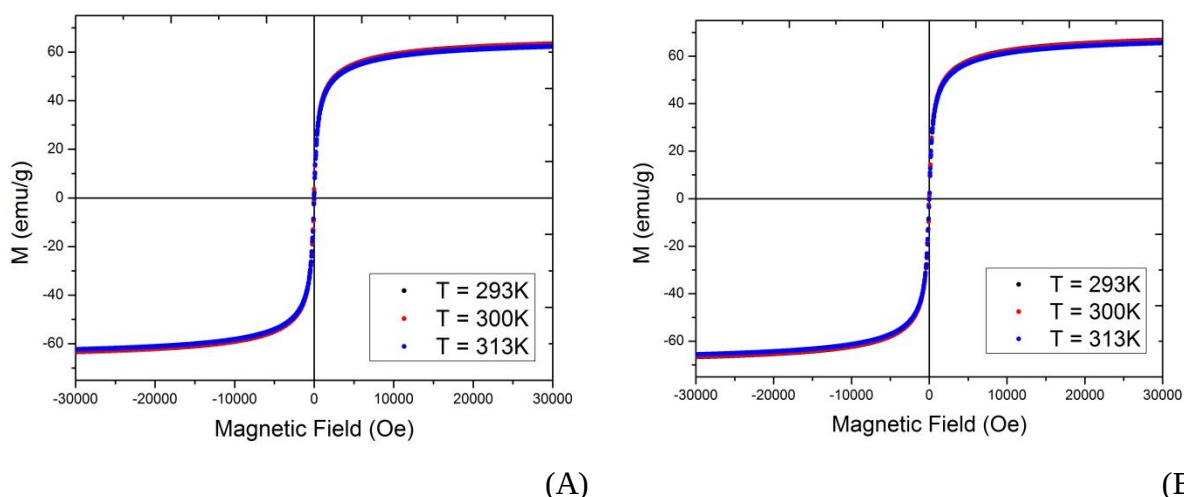


Figure 3. Hysteresis curve obtained for the synthesized magnetic particles. (A) MAG-PANI. (B) MAG.

3.4. Heparin immobilization

The magnetic coating of a matrix with polyaniline due to their easy synthesis makes it attractive for application as a matrix for the immobilization of molecules [24]. Some studies using magnetite coated with polyaniline supports for immobilization of biomolecules are described in the literature such as heparan sulfate [13]; creatininase, creatinase and sarcosine oxidase [14]; β -galactosidase [15] and trypsin [16]. Approach to covalently immobilize heparin on biomaterials have been described in literature through covalently link it to a support using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) [25]. So, in our studies the covalent immobilization of HEP was established between the Hep carboxyl groups with and MAG-PANI amino groups yielding an amide bond. The MAG-PANI-HEP presented an amount of $26.4 \pm 0.09 \mu\text{g}$ of heparin per mg of MAG-PANI.

3.5. Proteins fractionated by affinity

Magnetic separation is used in biotechnology to be a quick, cost effective and highly efficient technique. In addition, a magnetic field is used as the main force for the isolation, separation and analysis of different types of molecules [26]. In this type of separation, the functionalized magnetic materials exhibit affinity for a specific ligand and thus are mixed with a sample containing these target molecules. Within a period of incubation, the target molecules bind to the magnetic particles. The entire magnetic complex is subsequently separated from the sample through the application of an external magnetic field, and after washing, the target

molecules are isolated [27]. During the incubation period, some plasma proteins bind by affinity to heparin present in the composite MAG-PANI-HEP. The literature already describes the possibility of some proteins binding to heparin such as antithrombin [8], albumin [9], growth factors, chemokines, cytokines, extracellular proteins and lipoproteins which are involved in a variety of biological processes such as signaling and cancer [28]. Thus the application of the external magnetic field (6000 Oe) enables the recovery of the magnetic composite and elution of the protein through different concentrations of NaCl in PBS buffer, then, the fractions (F) collected with 0.25M NaCl corresponds to: F1, F2 and F3; 0.5M: F4, F5 and F6; 1.0 M: F7, F8 and F9; 1.5. M: F10, F11 and F12; 2.0 M: F13, F14 and F15. During the elution process, the fractionated proteins were monitored at 280 nm [29, 30] in a spectrophotometer, forming a chromatogram shown in Figure 4. Fractions 1 to 9 indicated a probable presence of proteins that were investigated by SDS-PAGE.

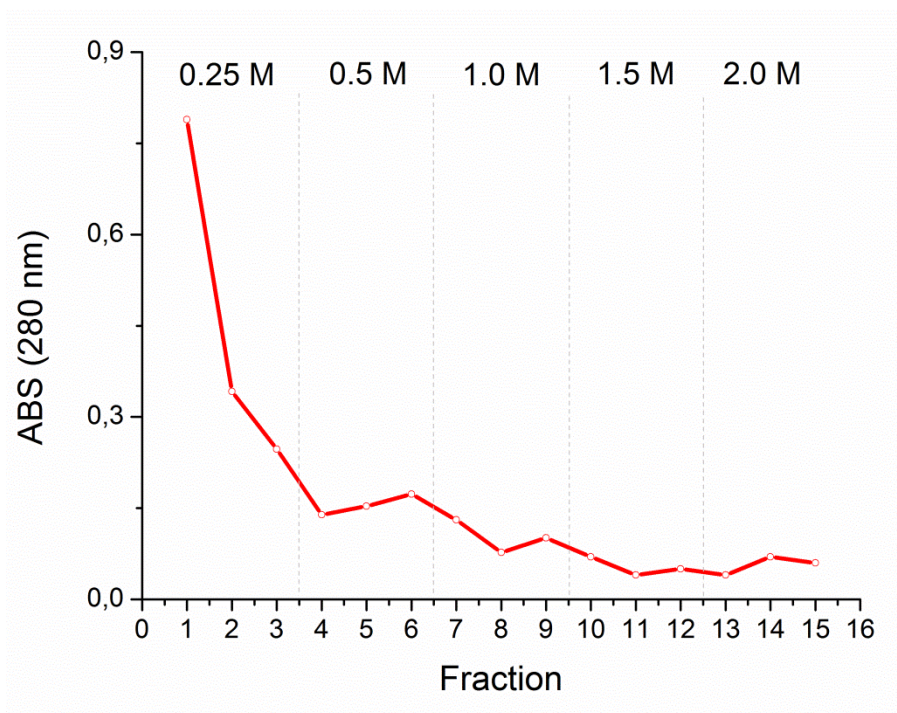


Figure 4. Elution of plasma proteins based on the affinity to the MAG-PANI-HEP composite.

3.5. Protein electrophoresis

The samples obtained from the plasma fractionation step were precipitated with 20% trichloroacetic acid (TCA) and submitted to SDS-PAGE electrophoresis of proteins (Figure 5). The electrophoretic mobility of the bands obtained in fractions 1 to 9 was calculated and compared to standard. It is observed the presence of high molecular weight plasma proteins (like albumin) which probably caused a stain in F1 and F2 eluates. There is a pattern of bands

obtained fractionated F3, F4, F5 and F6 having molecular weights of 151.3; 125.8; 123.0; 107.1; 89.1; 74.1; 54.9; 43.6; 32.3; 23.9 kDa. In F7 sample, it is not possible to observe defined waves, there are some clear traces. There are two bands with molecular weight of 50.1 kDa and 58.8 in the sample F8. The only band present in F9 has a molecular weight of 58.8 kDa that probably corresponds to antithrombin [31].

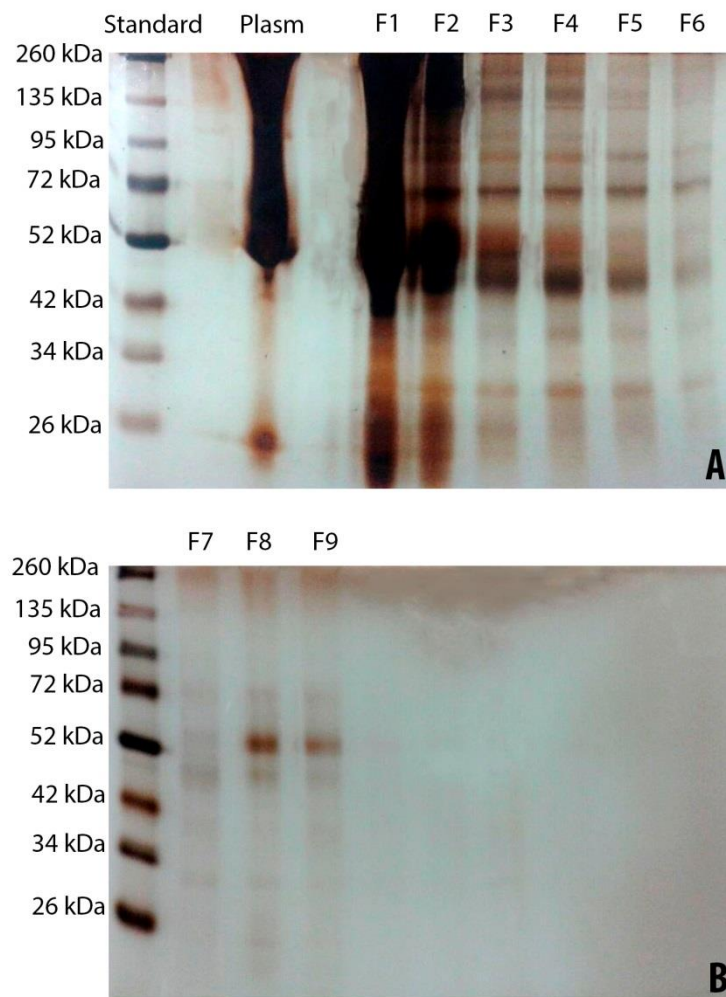


Figure 5. Electrophoresis performed from protein eluates obtained in plasma fractionation. (A) Samples extracted with 0.25M NaCl (F1, F2 and F3); 0.5 M (F4, F5 and F6); (B) Samples extracted with 1.0 M (F7, F8 and F9).

3.6. Antithrombin activity *in vitro*

The heparin affinity chromatography has been used as a main tool for the isolation of antithrombin present in human blood plasma [8]. Antithrombin is the main inhibitor of the clotting cascade proteases such as factor Xa, thrombin and factor IXa [32]. The interaction between heparin and AT it is already well known because in the presence of heparin

antithrombin activity inhibition increases a thousandfold [33]. Therefore as shown above in protein electrophoresis (Fig. 5B), a protein of 58.8 kDa that probably corresponds to AT was isolated in F9. The main activity of antithrombin is inhibits thrombin formation and consequently inhibiting blood clotting. So, the eluate obtained with the protein investigated in F9 was incubated with plasma and APTT was performed to verify the test plasma coagulation time and the result is shown in Table 1.

Table 1. Activated partial thromboplastin time (APTT) measures of plasma

	APTT values
Normal plasma	39.5 ± 7 seconds
Diluted plasma (1:2)	45.0 ± 2 seconds
Plasma incubated with F9 eluate	No clot in 15 minutes

In a time greater than 15 minutes the plasma incubated with 100 uL of the eluate F9 not coagulated, it was probably due to the presence of AT. This indicates that the antithrombin was isolated by immobilized heparin on MAG-PANI. The major application of this material is the identification of antithrombin; useful for *in vitro* plasma AT monitoring tool in patients with thrombophilia. Additionally, this purification procedure can be applied in the blood products industry. Therefore, antithrombin purification proposed this work was carried out by affinity to the MAG-PANI-HEP magnetic composite enabling quick and easy removal of this protein bound to the functionalized magnetic particles. This magnetic property is useful not only in daily routine laboratory work but also in large scale purification procedures [34]. The literature describes studies using magnetic separation process in biotechnology for residues separation processes and purification of specific molecules. Recently, Zhang et al. [35] studied the use of magnetic microparticles having hydrophobic properties for use in the effective removal of oil in the water in different ways. Lan et al. [36] conducted a study on purification of angiotensin-converting enzyme (ACE) through the magnetic separation process using magnetic microsphere agarose affinity. Studies by Rêgo et al. [37] reported the use of magnetic seed gum of *Parkia pendula* as matrix for the covalent immobilization of the Concanavalin-A lectin where this composite was applied on glycoconjugate affinity purification. Sennikov et al. [38] used affinity chromatography and magnetic separation for purification of antibodies to tumor necrosis factor from human serum. Angeli et al. [39]

demonstrated the use of a levan-ferromagnetic composite as affinity matrix for purifying lectins through a quick and easy procedure based on magnetic affinity.

4. Conclusion

According to the above results, MAG-PANI nanoparticles exhibited a superparamagnetic behavior when subjected to a magnetic field of +30 kOe to -30 kOe at temperatures of 293 K, 300 K and 313 K. In addition, the presence the phase magnetite and polyaniline have been proven MAG-PANI through X-ray analysis. Moreover, the composite MAG-PANI-HEP can be used as a tool for fractionation and depletion of plasma proteins and also in the purification of antithrombin, an important protein in the blood coagulation cascade. The proposed method based on the affinity magnetic separation is effective, easy and specific

Acknowledgements

The authors thank: CNPq and FACEPE for financial support; Department of Physics/UFPE for the physical measures, Northeast Strategic Technology Center (CETENE) for the electron microscopic analysis.

References

- [1] KULLOLLI, M.; WARREN, J.; ARAMPATZIDOU, M.; PITTERI, S.J. Performance evaluation of affinity ligands for depletion of abundant plasma proteins. *Journal of Chromatography B*, 939, 10-16, 2013.
- [2] URBAS, L.; BRNE, P.; GABOR, B.; BARUT, M.; STRLIC, M.; PETRIC, T.C.; STRANCAR, A. Depletion of high-abundance proteins from human plasma using a combination of an affinity and pseudo-affinity column. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2689–2694, 2009.
- [3] MAHN, A.; ISMAIL, M. Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by ammonium sulfate precipitation for 2D-PAGE analysis. *Journal of Chromatography B*, 879, 3645-3648, 2011.
- [4] MOURIER, P.; ANGER, P.; MARTINEZ, C.; HERMAN, F.; VISKOV, C. Quantitative compositional analysis of heparin using exhaustive heparinase digestion and strong anion exchange chromatography. *Analytical Chemistry Research*, 3, 46-53, 2015.
- [5] CAPILA, I.; LINHARDT, R.J. Heparin - Protein Interactions. *Angewandte Chemie International*, 41, 390-412, 2002.
- [6] FLENGSRUD, R.; ANTONSEN, S.G. The binding of pentapeptides to biological and synthetic high affinity heparin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 4774-4776, 2015.
- [7] KRAPFENBAUER, K.; FOUNTOULAKIS, M. Improved Enrichment and Proteomic Analysis of Brain Proteins with Signaling Function by Heparin Chromatography. *Methods in Molecular Biology*, 566, 165-180, 2009.

- [8] HEGER, A.; GRUNERT, T.; SCHULZ, P.; JOSIC, D.; BUCHACHER, A. Separation of active and inactive forms of human antithrombin by heparin affinity chromatography. *Thrombosis Research*, 106, 157-164, 2002.
- [9] LEI, T.; HE, Q.Y.; WANG, Y.L.; SI, L.S.; CHIU, J.F. Heparin chromatography to deplete high-abundance proteins for serum proteomics. *Clinica Chimica Acta*, 388, 173-178, 2008.
- [10] AGUILAR-ARTEAGA, K.; RODRIGUEZ J.A.; BARRADOB, E. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*, 674, 157-165, 2010.
- [11] ZHANG, Y.J.; LIN, Y-W.; CHANG, C-C.; WU, T-M. Conducting and magnetic behaviors of polyaniline coated multi-walled carbon nanotube composites containing monodispersed magnetite nanoparticles. *Synthetic Metals*, 161, 937-942, 2011
- [12] BALINT, R.; CASSIDY, N.J.; CARTMELL, S.H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 10, 2341-2353, 2014.
- [13] MERCÊS, A.A.D.; MACIEL, J.C.; CARVALHO JÚNIOR, L.B. Magnetic particles as affinity matrix for purification of antithrombin. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 97, 012002, 2015.
- [14] YADAV, S.; DEVI, R.; BHAR, P.; SINGHLA, S.; PUNDIR, C.S. Immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline modified Pt electrode for detection of creatinine. *Enzyme and Microbial Technology*, 50, 247-254, 2012.
- [15] NERI, D.F.M.; BALCAO, V.M.; DOURADO, F.O.Q.; OLIVEIRA, J.M.B.; CARVALHO-JÚNIOR, L.B.; TEIXEIRA, J.A. Immobilized β -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: Support characterization and galactooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70 74-80, 2011.
- [16] WANG, S.; BAO, H.; YANG, P.; CHEN, G. Immobilization of trypsin in polyaniline-coated nano-Fe₃O₄/carbon nanotube composite for protein digestion. *Analytica Chimica Acta*, 612, 182-189, 2008.
- [17] MACIEL, J.C.; MERCÊS, A.A.D.; CABRERA, M.; SHIGEYOSI, W.T.; DE SOUZA, S.D.; OLZON-DIONYSIO; FABRIS, J.D.; CARDOSO, C.A.; NERI, D.F.M.; SILVA, M.P.C.; CARVALHO JR., L.B. Magnetic nanoparticles coated with polyaniline to stabilize immobilized trypsin. *Hyperfine Interactions*. DOI: 10.1007/s10751-016-1264-y, 2016: no prelo.
- [18] OLIVEIRA, G.B.; CARVALHO JR, L.B.; SILVA, M.P.C. Properties of carbodiimide treated heparin. *Biomaterial*, 24, 4777-4783, 2003.
- [19] MACIEL, J.C.; ANDRAD, P.L.; NERI, D.F.M. et al. Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. *Journal of Magnetism and Magnetic Material*, 324, 1312-1316, 2012.
- [20] SILVA, A.K.A.; SILVA, E.L.; OLIVEIRA, E.E.; NAGASHIMA JR, T.; SOARES, L.A.L.; MEDEIROS, A.C.; ARAÚJO, J.H.; ARAÚJO, I.B.; CARRIÇO, A.S.; EGITO, E.S.T. Synthesis and characterization of xylan-coated magnetite microparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 334, 42-47, 2007.
- [21] CHEŁMINIAK, D.; ZIEGLER-BOROWSKA, M.; KACZMAREK, H. Synthesis of magnetite nanoparticles coated with poly(acrylic acid) by photopolymerization. *Materials Letters*, 164, 464-467, 2016.
- [22] JARAMILLO-TABARES, B.E.; ISAZA, F.J.; TORRESI, S.I.C. Stabilization of polyaniline by the incorporation of magnetite nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 132, 529-533, 2012.
- [23] CHINNARAJ, K., MANIKANDAN, A., RAMU, P., ANTONY, S.A., NEERAJA, P. Comparative Studies of Microwave- and Sol-Gel-Assisted Combustion Methods of

- Fe₃O₄ Nanostructures: Structural, Morphological, Optical, Magnetic, and Catalytic Properties. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 28, 179-190, 2015.
- [24] SINGH, S.; SOLANKI, P.R.; PANDEY, M.K.; MALHOTRA, B.D. Covalent immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase on polyaniline films for application to cholesterol biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 568, 126-132, 2006.
- [25] SAKIYAMA-ELBERT, S.E. Incorporation of heparin into biomaterials. *Acta Biomaterialia*, 10, 1581-1587, 2014.
- [26] AGUILAR-ARTEAGA, K.; RODRIGUEZ J.A.; BARRADOB, E. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*, 674, 157-165, 2010.
- [27] HE, J.; HUANG, M.; WANG, D.; ZHANG, Z.; LI, G. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 84-101, 2014.
- [28] PEYSSELON, F.; RICARD-BLUM, S. Heparin-protein interactions: From affinity and kinetics to biological roles. Application to an interaction network regulating angiogenesis. *Matrix Biology*, 35, 73-81, 2014.
- [29] BEAVEN, G.H.; HOLIDAY, E.R. Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids. *Advances Protein Chemistry*, 7, 319-386, 1952.
- [30] LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, 3, 447-454, 1957.
- [31] 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*, 33, 339-345, 2004.
- [32] AZHAR, A.; KHAN, M.S.; SWAMINATHAN, A.; NASEEM, A.; CHATTERJEE, S.; JAIRAJPURI, M.A. Oxidized antithrombin is a dual inhibitor of coagulation and angiogenesis: Importance of low heparin affinity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 541-550, 2016.
- [33] MARIE, A.-L.; TRAN, N.T.; BIANCHINI, E.P.; SALLER, F.; PAUTUS, S.; ABACHE, T.; PLANTIER, J.-L.; URBAIN, R.; BORGEL, D.; TAVERNA, M. A fast capillary electrophoresis method to assess the binding affinity of recombinant antithrombin toward heparin directly from cell culture supernatants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 111, 64-70, 2015.
- [34] HORÁK, D.; BABIC, M.; MACKOVÁ, H.; BENES, M.J. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science*, 30, 1751-1772, 2007.
- [35] ZHANG, L.; LI, L.; DANG, Z.-M. Bio-inspired durable, superhydrophobic magnetic particles for oil/water separation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 463, 266-271, 2016.
- [36] LAN, X.; LIAO, D.; WU, S.; WANG, F.; SUN, J.; TONG, Z. Rapid purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from lizard fish protein hydrolysates with magnetic affinity separation. *Food Chemistry*, 182, 136-142, 2015.
- [37] RÊGO, M.J.B.M.; ALMEIDA, S.M.; BEZERRA, S.A.; CARVALHO JÚNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Magnetic *Parkia pendula* seed gum as matrix for Concanavalin A lectin immobilization and its application in affinity purification. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86, 1351-1357, 2014.
- [38] SENNIKOV, S.V.; GOLIKOVA, E.A.; KIREEV, F.D.; LOPATNIKOVA, J.A. Purification of human immunoglobulin G autoantibodies to tumor necrosis factor using affinity chromatography and magnetic separation. *Journal of Immunological Methods*, 390, 92-98, 2013.

- [39] ANGELI, R.; PAZ, N.V.N.; MACIEL, J.C.; ARAUJO, F.F.B.; PAIVA, P.M.G.; CALAZANS, G.M.T.; VALENTE, A.P.; ALMEIDA, F.C.L.; COELHO, L.C.B.B.; CARVALHO JR, L.B.; SILVA, M.P.; CORREIA, M.T.S. Ferromagnetic Levan Composite: An Affinity Matrix to Purify Lectin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1-6, 2009.

7 CONCLUSÃO

As micropartículas de mDAC e as nanopartículas de MAG-PANI sintetizadas exibiram um comportamento superparamagnético ao serem submetidas à um campo magnético com intervalo entre + 30 KOe e – 30 KOe nas temperaturas de 293 K, 300 K e 313 K. Além disso, a presença das fases de Dacron e polianilina foram comprovadas em mDAC e MAG-PANI, respectivamente, através das análises por raios-X. Esses revestimentos das partículas magnéticas foram importantes para a efetivação do processo de imobilização covalente da heparina que precisou ser funcionalizada com EDAC/NHS.

Os compósitos magnéticos com heparina covalentemente imobilizada (mDAC-HEP e MAG-PANI-HEP) foram aplicados no processo de fracionamento das proteínas plasmáticas e a partir disso foi realizada a depleção de proteínas e também a purificação da antitrombina advinda do plasma humano.

As proteínas, em especial a antitrombina, foram capazes de interagir de forma específica com a heparina e foram fracionadas através do processo de separação por afinidade com aplicação de um campo magnético externo. Entre as vantagens em utilizar esse método podemos destacar o baixo custo, facilidade no manuseio e especificidade, que é baseada na já conhecida interação da cromatografia de afinidade à heparina com as proteínas.

8 PERSPECTIVAS

Considerando-se a grande quantidade de proteínas plasmáticas que podem se ligar a heparina, entre elas alguns biomarcadores, esse estudo inicial permitirá uma avaliação futura do perfil de diferentes proteínas presentes em pacientes com câncer de próstata e mama, por exemplo. Além da possibilidade de ser utilizada como ferramenta de monitoramento da antitrombina em casos de pacientes com trombofilias e também em estudos clínicos de cadeias de fibrinogênio e seus fragmentos na patogênese de doenças cardiovasculares.

Portanto, os compósitos magnéticos com heparina imobilizada poderão ser utilizados como um sistema de triagem das proteínas do plasma humano, baseado no seu padrão de ligação à heparina.

ANEXO

**Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Pesquisador: Aurenice Arruda Dutra das Mercês

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42686715.9.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.023.480

Data da Relatoria: 01/04/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma dissertação da Estudante AURENICE ARRUDA DUTRA DAS MERCES vinculada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Patologia Keizo Asami (LIKA). A proposta consiste basicamente em produzir dois suportes, Dacron magnético e magnetita revestida com polianilina, imobilizar heparina nesses materiais e utilizar esses derivados magnéticos para o fracionamento/purificação de proteínas plasmáticas de humanos.

Objetivo da Pesquisa:

Produzir dois suportes, Dacron magnético e magnetita revestida com polianilina;

Imobilizar heparina nesses materiais;

Utilizar esses derivados magnéticos para o fracionamento/purificação de proteínas plasmáticas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão explicitamente delineados no projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido. Adicionalmente todos os procedimentos de coleta da amostra de sangue serão realizados por profissional habilitado, portanto, os riscos restringem-se inerentemente aos procedimentos padrões de coleta sanguínea por venopunctura. Friso que o único voluntário participante da pesquisa, e doador das amostras de sangue será a própria Estudante responsável pela pesquisa.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

**Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 1.023.480

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um tema bastante atual, uma vez que visa desenvolver novos materiais para purificação de proteínas plasmáticas. Os resultados obtidos podem permitir até o estabelecimento de patente de produto ou de protocolo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as cartas de anuência e os currículos estão devidamente anexados. O termo de consentimento livre e esclarecido está em linguagem acessível ao participante da pesquisa.

Recomendações:

Alterar o nome do projeto de pesquisa na folha de rosto, pois, acredito ter ocorrido um erro de digitação de maneira que o nome do projeto não foi colocado por completo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.023.480

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

RECIFE, 15 de Abril de 2015

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

Magnetic particles as affinity matrix for purification of antithrombin

A A D Mercês^{1,2}, J C Maciel³, L B Carvalho Júnior²

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, LIKA/UFPE, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

³Universidade Federal de Roraima, Aeroporto, 69310-000 Boa Vista, RR, Brazil.

E-mail: aurenice.dutra@yahoo.com.br

Abstract: Immobilization of biomolecules onto insoluble supports is an important tool for the fabrication of a diverse range of functional materials. It provides advantages: enhanced stability and easy separation. In this work two different magnetic composites were synthesized (MAG-PANI-HS and mDAC-HS) to human antithrombin purification. The magnetic particles (MAG) were obtained by co-precipitation method of iron salts II and III and subsequently coated with polyaniline (MAG-PANI particles). Dacron (polyethylene terephthalate) suffered a hydrazinolysis reaction to obtain a powder (Dacron hydrazide) which was subsequently magnetized (mDAC particles) also by co-precipitation method. Heparan sulfate (HS) was immobilized to MAG-PANI and mDAC retained respectively 35µg and 38.6µg per of support. The magnetic composite containing HS immobilized (MAG-PANI-HS and mDAC-HS) was incubated with human blood plasma (1mL) and then washed with NaCl gradients. Electrophoresis of proteins present in eluates showed bands of antithrombin (58kDa). A reduction in the antithrombin activity was detected in plasma that were incubated in the composites magnetic with HS immobilized, suggesting that the antithrombin was removed of the human blood plasma and then purified. Therefore, the above results suggest that both preparations: MAG-PANI-HS and mDAC-HS are able to affinity purify antithrombin, an important component of blood coagulation.

Keywords: affinity, heparan sulfate, immobilization, magnetic particles, purification.

1. Introduction

Different types of materials have been used as supports for the immobilization of biomolecules, including the supports that exhibit magnetic properties. In addition to being used as adsorbents in magnetic separation, these particles within the micrometer to the nanometer scale, are being used in a growing number of medical applications due to non-toxicity [1,2]. In general, the most suitable inorganic supports have high mechanical strength, good thermal stability, resistance to organic solvents and to attack by microorganisms [3]. Biomolecules immobilized on magnetic supports may be used in the pre analyte concentration, magnetic separation adsorbents, molecular identification of organic and inorganic molecules [4]. Magnetic particles as Dacron ferromagnetic [5] and magnetite coated with polyaniline [6] has been used as supports for immobilization of enzymes.

Biomolecules is immobilized to a solid support by adsorption physical, hydrogen bonding, electrostatic interactions or covalently attached. Covalent immobilization is considered to



result in higher biomolecule activity, reduce nonspecific adsorption, and greater stability of immobilized biomolecules compared to that by physical adsorption, furthermore the biomolecule immobilized covalently cannot be removed from the support by washing with buffers and/or detergents [7].

Affinity separation is a good protein purification method which is based on the formation of reversible and specific complexes between an immobilized molecule and the ligands to be purified. When using a magnetic affinity chromatography has the great advantage of to get a rapid process of separation [8].

Heparan sulfate (HS) is a type of proteoglycan and specific glycoproteins that containing long and sulfated sugar chains that consist of repeating disaccharide units composed of D-glucosamine and D-glucuronic acid or L-iduronic acid. HS have a variety of functions, affecting cell growth, cell adhesion, cell migration, angiogenesis and anticoagulation [9]. So, the HS is able to interact with these and a wide variety of proteins. This work intends to immobilize the heparan sulfate in magnetic particles to affinity purify human blood plasma proteins.

2. Experimental Procedure

2.1. Synthesis of the magnetic particles

The synthesis of Dacron ferromagnetic according to Amaral et al. [5]. First, Dacron was converted to Dacron-hydrazide and then magnetized by co-precipitation method of iron salts II and III. The magnetic particles (MAG) were obtained also by co-precipitation method of iron salts II and III and subsequently coated with polyaniline (MAG-PANI) according to Neri et al [6].

2.2. Immobilization of heparan sulfate on magnetic particles

First, a solution of heparan sulfate 3 mg/mL was functionalized carbodiimide (EDAC) and N-hydroxysuccinimide (NHS). The carboxylic groups of heparan sulfate were activated with EDAC and formed an intermediate compound (O-acylurea) which contains an ester grouping quite reactive and easily undergo hydrolysis. So, was added the NHS that reacted with the ester group of the intermediate compound, leaving it more stable. Thus, the amino group present on the support reacted with the carbonyl of the ester and formed a covalent amide bond [10]. Aliquot 1 ml of heparan sulfate functionalized solution was incubated in each 30 mg of MAG, MAG-PANI and mDAC under light stirring for 72 hours at 25 °C. The amount of heparan sulfate immobilized to the supports was determined according to the methodology used by Oliveira et al. [11].

2.3. Purification of antithrombin

The test of human antithrombin purification by affinity was conducted as follows: for each 30 mg of MAG-PANI-HS and mDAC-HS (magnetic particles with covalently immobilized heparan sulfate) was added 1 mL of human plasma. This mixture was stirred for 60 minutes at 4 °C. Then, with the aid of a magnetic field, the supernatants were collected. Subsequently successive washes with phosphate buffer pH 7.2 in increasing concentrations of NaCl (0.5 M, 1.0 M and 1.5 M) to remove non-adsorbed proteins. A solution of 2.0 M NaCl was added to elute proteins complexed to HS. Electrophoresis of proteins SDS/PAGE (sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis) 12,5% was performed to the corresponding fractions collected eluates 2M. These human blood plasmas that were incubated in the

magnetic derivatives: MAG-PANI-HS and mDAC-HS, were subjected to the antithrombin amidolytic activity kit (TriniCHROMTM Antithrombin IIa - Trinity Biotech SA - New Jersey, USA).

3. Results and Discussion

The particles: Dacron-hydrazide ferromagnetic (mDAC) and magnetite coated with polyaniline (MAG-PANI) had an excellent magnetic activity by their conduct through a magnetic field of 6000 Oe using a magnetic separation system (AbraxisTM LLC), see Fig. 1.

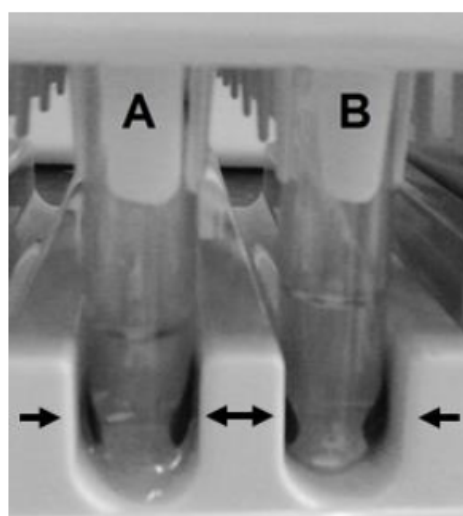


Figure 1: Magnetic separation system with a magnetic field of 6000 Oe (AbraxisTM LLC). The magnetic particles have been attracted by the magnet located on the lateral of the plate (indicated by arrows). A) MAG-PANI; B) mDAC.

Approximately 35 µg of heparan sulfate offered was immobilized covalently on MAG-PANI and 38.6 µg in mDAC-HS. An amount of 18 µg of HS was adsorbed in each mg of the MAG particles, this value was lower (compared to MAG-PANI) because MAG particles were not coated with polyaniline. After functionalization with EDAC/NHS [10] the covalent immobilization of heparan sulfate happened by linking its carboxyl groups with the amino groups present in MAG-PANI and mDAC. The electrophoresis of the purified proteins with 2 M NaCl (Fig. 2) in both magnetic supports showed bands corresponding to antithrombin (58kDa) and other bands may be plasma proteins that interact with HS and are identified in subsequent studies. The bands corresponding to the antithrombin were more pronounced in supports containing the covalently immobilized HS: MAG-PANI-HS (Fig. 2A) and mDAC-HS (Fig. 2B). Therefore the other supports did not interact with the antithrombin due to absence or small amount of HS. Heparin and heparan sulfate have structures qualitatively similar [12] and the use of heparin affinity chromatography has been used to purify antithrombin for the past four decades [13]. Here, we study the HS immobilized in magnetic particles to use in the purification process of the AT because was already shown that heparan sulfate also can interact with antithrombin [14].

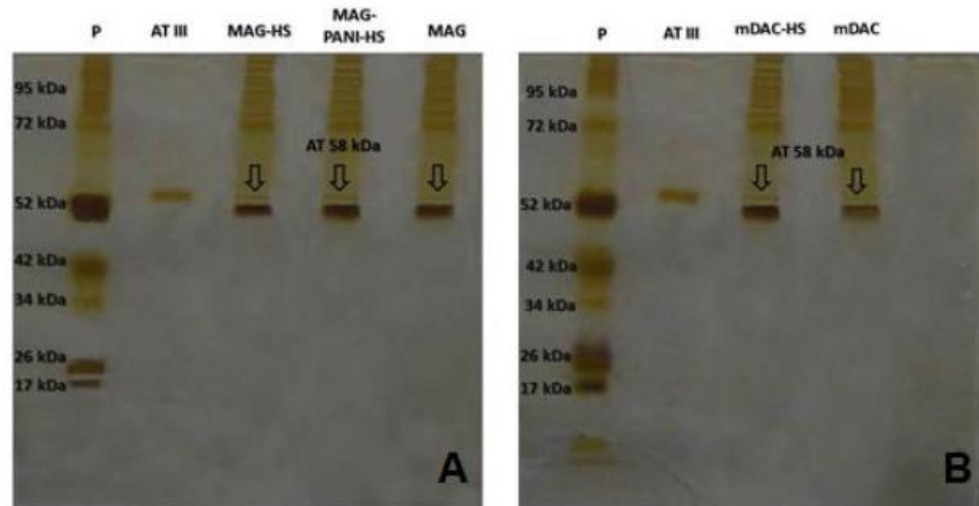


Figure 2: Electrophoresis of proteins obtained in 2M eluates, SDS/PAGE 12.5%. A) MAG-HS (pure magnetite with heparan sulfate adsorbed), MAG-PANI-HS and MAG (pure magnetite). B) mDAC-HS and mDAC (pure ferromagnetic Dacron).

After the purification process, was performed the antithrombin activity of the human blood plasmas that were incubated with MAG-PANI-HS and mDAC-HS. Fig. 3 showed a reduced antithrombin activity of 88% to MAG and 82% to MAG-PANI-HS (Fig. 3A), and 79% in mDAC-HS (Fig. 3B). These reductions suggest that the antithrombin was removed from the human blood plasma and then fixed at HS. Comparing MAG-HS and MAG-PANI-HS, it can be seen that the particle coated with polyaniline showed a more significant AT removal performance, it was probably due to the HS is immobilized covalently on MAG-PANI and only adsorbed (smaller amount) in MAG. So, the magnetic composites with HS have proven useful in the purification of antithrombin process, but according to the results mDAC-HS was a little better because has more HS covalently immobilized and then can removed a large amount of AT when compared to MAG-PANI-HS and MAG-HS.

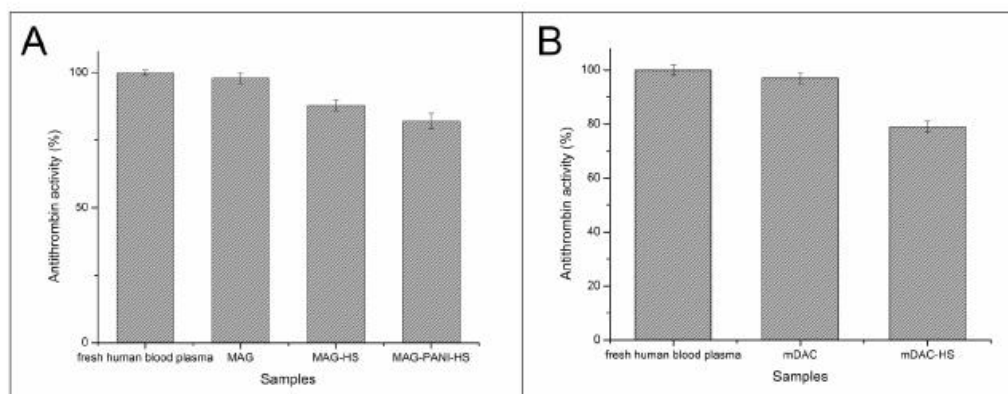


Figure 3: Antithrombin Activity plasma after direct contact with the supports. A) pure magnetite (MAG), pure magnetite with heparan sulfate (MAG-HS) and MAG-PANI-HS. B) pure ferromagnetic Dacron (mDAC) and mDAC-HS.

Angeli et al. [15] demonstrated the use of affinity matrix of ferromagnetic levan composite to purify lectin, this composite used as matrix affinity makes a fast and easy procedure. We obtained similar results, but use magnetic composites for purification of antithrombin human blood plasma. Recently, Lan et al. [8] conducted a study on angiotensin converting enzyme (ACE) purified through magnetic affinity separation, using a magnetic agarose microsphere. In our study, the affinity matrix is represented by magnetic composite MAG-PANI-HS and mDAC-HS which were capable of interacting with plasma proteins, especially antithrombin. The specificity of these elements led to the removal and identification of specific proteins. Moreover, these magnetic composites described in this work can be applied as affinity matrix to be used in the area of materials science, blood products industry, biochemistry and pharmacology. This is a single and innovative tool and can be exploited in the biotechnology of biomaterials.

4. Conclusions

From the above displayed results one can conclude that the amount of HS immobilized on the particles and the coating of magnetic particles can influence the performance of composites in AT purification process. Thus when comparing the three preparations synthesized in this work, we can see that mDAC-HS proved slightly more efficient because it contained more HS covalently immobilized and so could remove more AT of human blood plasma. Another important fact is that coating of MAG with polyaniline promoted a larger amount of HS immobilized in MAG-PANI particles and thus also more useful in the AT purification process. So, according to the results presented these composites can be applied as magnetic affinity matrices for purification of antithrombin, this human blood plasma protein has an important biological value and the great advantage this method are: easy synthesis and low cost.

Acknowledgments

CAPES, CNPq and FACEPE for financial support.

References

- [1] Ito A, Shinkai M, Honda H and Kobayashi T 2005 Medical application of functionalized magnetic nanoparticles *J. Biosci. Bioeng.* **100** 1-11.
- [2] Tokoro H, Nakabayashi T, Fujii S, Zhao H and Häfeli U O 2009 Magnetic iron particles with high magnetization useful for immunoassay *J. Magn. Magn. Mater.* **321** 1676-1678.
- [3] Bickerstaff Jr G F 1997 Immobilization of Enzymes and Cells *Methods Biotechnol.* **1** 1-11.
- [4] Aguilar-Arteaga K, Rodriguez J A and Barrado E 2010 Magnetic solids in analytical chemistry: a review *Anal. Chim. Acta* **674** 157-165.
- [5] Amaral I P G, Carneiro da Cunha M G, Carvalho Júnior L B and Bezerra R S 2006 Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron *Process Biochem.* **41** 1213-1216.

- [6] Neri D F M, Balcao V M, Dourado F O Q, Oliveira J M B, Carvalho-Júnior L B and Teixeira J A 2011 Immobilized β -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: Support characterization and galactooligosaccharides production *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **70** 74-80.
- [7] Tsougeni K, Petrou P S, Awsiuk K, Marzec M M, Ioannidis N, Petrouleas V, Tserepi A, Kakabakos S E and Gogolides E 2015 Direct Covalent Biomolecule Immobilization on Plasma Nanotextured Chemically Stable Substrates *App. Mater. Interfaces* **7** 14670-14681.
- [8] Lan X, Liao D, Wu S, Wang F, Sun J and Tong Z 2015 Rapid purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from lizard fish protein hydrolysates with magnetic affinity separation *Food Chem.* **182** 136-142.
- [9] Murakami K, Tanaka T, Bando Y and Yoshida S 2015 Nerve injury induces the expression of syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan in primary sensory neurons *Neuroscience* **300** 338-350.
- [10] Hermanson G T 2008 *Zero Length Crosslinkers* (Bioconjugate Techniques second edition) ed G T Hermanson (New York Academic Press) chapter 3 pp 215-233. Available in <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123705013000035>
- [11] Oliveira G B, Carvalho Jr L B and Silva M P C 2003 Properties of carbodiimide treated heparin *Biomaterials* **24** 4777-4783.
- [12] Brito A S, Cavalcante R S, Palhares L C G F, Hughes A J, Andrade G PV, Yates E A, Nader H B, Lima M A and Chavante S F 2014 A non-hemorrhagic hybrid heparin/heparan sulfate with anticoagulant potential *Carbohydr. Polym.* **99** 372-378.
- [13] Miller-Andersson M, Borg H and Andersson L -O 1974 Purification of antithrombin III by affinity chromatography *Thromb. Res.* **5** 439-452.
- [14] Chen J and Liu J 2005 Characterization of the structure of antithrombin-binding heparan sulfate generated by heparan sulfate 3-O-sulfotransferase *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects* **1725** 190-200.
- [15] Angeli R, da Paz N V N, Maciel J C, Araújo F F B, Paiva P M G, Calazans G M T, Valente A P, Almeida F C L, Coelho L C B B, Carvalho Jr L B, Silva M P C and Correia M T S 2009 Ferromagnetic Levan Composite: An Affinity Matrix to Purify Lectin *J. Biomed. Biotechnol.* **2009** 1-6.



< Uso exclusivo do INPI >

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA

Tipo de Documento:

Formulário

DIRPA

Página:

1/3

Título do Documento:

Depósito de Pedido de Patente

Código:

FQ001

Versão:

2

Procedimento:

DIRPA-PQ006

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JUNIOR

1.2 Qualificação: MEDICO

1.3 CNPJ/CPF: 123.735.914-72

1.4 Endereço Completo: Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitaria, Recife-PE

1.5 CEP: 50670-901

1.6 Telefone: (81) 21268000

1.7 Fax: (81) 21268000

1.8 E-mail: lbcj.br@gmail.com

☐ continua em folha anexa

2. Natureza:

☒ Invenção☐ Modelo de Utilidade☐ Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

PURIFICACAO DA ANTITROMBINA HUMANA POR AFINIDADE A HEPARINA
IMOBILIZADA EM PARTICULAS DE MAGNETITA REVESTIDAS COM POLIANILINA

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N°

Data de Depósito:

5. Prioridade:

☐ Interna (66)☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

☐ continua em folha anexa