

ROSEMERY BATISTA DE MOURA

**PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EMPREGANDO COMPÓSITO
DE SEPHADEX-POLIANILINA-HEPARINA**

Dissertação apresentada à coordenação
do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas do Centro de
Ciências Biológicas, UFPE, como parte
dos requisitos para a obtenção do título
de Mestra em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia
Linha de Pesquisa: Imobilização de
Biomoléculas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de
Carvalho Junior

Recife
2012

Catálogo na Fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Moura, Rosemery Batista de

Purificação de proteínas plasmáticas empregando compósito de Sephadex-polianilina-heparina/ Rosemery Batista de Moura– Recife: O Autor, 2012.

68 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia, 2012.

Inclui bibliografia e anexo

- 1. Proteínas 2. Heparina 3. Plasma sanguíneo I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orientador) II. Título**

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2012- 231

ROSEMERY BATISTA DE MOURA

**PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EMPREGANDO COMPÓSITO
DE SEPHADEX-POLIANILINA-HEPARINA**

Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas, UFPE, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica – UFPE (Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE (Titular)

Dr. Roberto Afonso da Silva

Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami – UFPE (Titular)

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Departamento de Bioquímica– UFPE (Suplente)

Ian Porto Gurgel do Amaral

Departamento de Bioquímica– UFPE (Suplente)

Aos meus pais: Daniel e Rosileide, meu maior bem material e imaterial.

Ao querido jovem Diogo Santana, in memoriam.

"Bendito és Tu, Senhor, Deus de Israel, nosso pai, de eternidade em eternidade. Teu, Senhor, é o poder, a honra, a vitória e a majestade; porque teu é tudo quanto há nos céus e na terra; teu, Senhor, é o reino, e tu te exaltaste por chefe sobre todos. Riquezas e glória vêm de ti, tu dominas sobre tudo, na tua mão há força e poder; contigo está o engrandecer e a tudo dar força. Agora, pois, ó nosso Deus, graças te damos e louvamos o teu glorioso nome. Porque quem sou eu, e quem é o meu povo para que pudéssemos dar voluntariamente todas estas coisas? Porque tudo vem de ti, e das tuas mãos to damos."

(Bíblia Sagrada: 1ª Crônicas, cap. 29, vs. 10-14)

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus, por sua misericórdia e seu amor incondicional, pela capacidade de superação a mim concedida; por permitir a cada dia um recomeço (Ele sabe todas as coisas).
- Ao meu orientador Prof. Luiz Carvalho, pela oportunidade, apoio e encorajamento.
- Meu agradecimento especial a Marilia Cadena (minha “madrinha” científica) pela amizade carinhosa e seu incentivo desde sempre; e Ericka Queiroz, pelo carinho e companheirismo, nos momentos alegres e nos mais difíceis. Vocês foram pessoas-chaves e fundamentais para e/ou durante a conclusão deste trabalho. Vosso carinho me constrange, muito obrigada.
- Ao Grupo IMOBIO pela colaboração, e registro meu carinho à Amanda Melo, Aurenice Dutra, Renata Vieira, Jaqueline Maciel, Paula Vasconcelos, Ana Katarina, Ricardo Souza, Taciano França e Raquel Varela.
- Aos colegas de trabalho dos Departamentos de Bioquímica e Biotecnologia do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA).
- Aos meus amigos cujo carinho, mesmo de longe, tanto me incentiva: Millana e Luiz, Silvania Amorim, Savio Pompozo, Java, Isaac Junior, Marta Virginia, Daniel e Daniela, Danille Lima; Fatima Candido, Aramis Macedo, João Franco, Thayse Delmiro, George, Julio, Penelope e Rogério Cavalcanti.
- A Luzinete e Gildo, pelo apoio e acolhimento como a uma filha.
- A minha irmã, Danielle, e meu sobrinho David (essa pessoinha que traz luz à minha vida).
- A Marluce, por sua sensibilidade, e seus filhos Moises, Raphael e Raphaela.
- A todos os meus familiares: avós, tias e tios, e os primos queridos.
- Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Hemoderivados são medicamentos produzidos pelo fracionamento industrial do plasma humano. O principal método para purificação de proteínas plasmáticas humanas é baseado no método de precipitação com etanol desenvolvido por Cohn-Oncley. O uso de metodologias simples, de baixo custo e eficientes constitui um avanço tecnológico para obtenção desses hemoderivados. O objetivo deste trabalho foi imobilizar heparina comercial em Sephadex G-25 revestido com polianilina e posteriormente utilizar o derivado imobilizado como matriz de afinidade para purificação de proteínas do plasma humano. Para síntese do derivado imobilizado, Sephadex G-25 foi revestido com polianilina e tratado com glutaraldeído, em seguida, incubado com solução de heparina ativada com 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxisuccinimida. A fim de determinar a influencia de variáveis na imobilização de heparina em Sephadex-polianilina, foi realizado planejamento experimental fatorial fracionário (2^{4-1}) no qual se avaliou quatro variáveis independentes: concentração e tempo de reação do glutaraldeído e concentração e tempo de reação da heparina. Nas condições otimizadas desses níveis, a heparina imobilizada em Sephadex-polianilina foi utilizada para purificação de proteínas do plasma humano. As variáveis concentração de glutaraldeído e concentração de heparina foram estatisticamente significativas na imobilização de heparina ao Sephadex-PANI e foi obtido melhor rendimento de heparina imobilizada ($6,88 \mu\text{g mg}^{-1}$ suporte, equivalente a 45,9% da heparina ofertada) nas condições 1% (v v⁻¹) de glutaraldeído, 1,5 h de reação com glutaraldeído, $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de concentração de heparina e 2 h de reação com heparina. Nessas condições obteve-se uma quantidade de proteínas plasmáticas de $25,02 - 27,06 \mu\text{g mL}^{-1}$, nos eluatos de NaCl 0,5 a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. A presença de proteínas foi confirmada através da técnica eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O compósito sephadex-polianilina-heparina foi eficiente para purificação de proteínas do plasma, podendo ser usado como teste a antitrombina.

Palavras-chave: Sephadex, polianilina, heparina, imobilização, proteínas plasmáticas, purificação.

ABSTRACT

Hemoderivatives are medicines produced by industrial fractionation of human plasma. The main method for purifying human plasma proteins is based on the ethanol precipitation method developed by Cohn-Oncley. The use of simple, low cost and efficient is a technological breakthrough to obtain these blood products. The aim of this study was to immobilize commercial heparin on Sephadex G-25 coated with polyaniline synthesized chemically, and then use the immobilized derived as affinity matrix to purificate antithrombin from human plasma. For synthesis of the immobilized derived, Sephadex G-25 was coated with polyaniline and treated with glutaraldehyde and then incubated with heparin solution treated with N-hidroxisuccinimide and 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimide. To determine the variables that influence in the immobilization of heparin in Sephadex-polyaniline, was performed fractional factorial design (2^{4-1}) where were analyzed four independents variables: concentration and reaction time of glutaraldehyde and concentration and reaction time of heparin. Under optimized conditions these levels, heparin immobilized on polyaniline-Sephadex was used for purification of proteins from human plasma. The variables glutaraldehyde concentration and heparin concentration were statistically significant in the heparin immobilization on Sephadex-PANI and it was obtained higher amounts of immobilized heparin ($6.88 \mu\text{g mg}^{-1}$ support equivalent at 45.9% of heparin offered) in the conditions glutaraldehyde 1.0 % (v/v), 1.5 h time reaction with glutaraldehyde, heparin 1.5 mg mL^{-1} and 2 h reaction time with heparin. In this conditions obtained amount plasmatic proteins of $25.02 - 27.06 \mu\text{g mL}^{-1}$, in 0,5 a 2,0 mol L^{-1} NaCl eluate The protein presence was confirmed by polyacrylamide gel electrophorese in reduced conditions (SDS-PAGE). The composite Sephadex-polyaniline-heparin was efficient for purification of plasmatic protein, and can be used as test the antithrombin.

Keywords: Sephadex, polyaniline, heparin, immobilization, antithrombin, purification.

LISTA DE FIGURAS

PAG.

CAPÍTULO 1:

Figura 1. Representação das antitrombins α e β com seus sítios de glicosilação. FONTE: Becker, 2007. _____ 20

Figura 2. Representação do complexo ternário antitrombina-heparina-trombina (mecanismo de ponte). FONTE: Li et al., 2004. _____ 22

Figura 3. Sequência de ligação da heparina à antitrombina. (*) grupos sulfato considerados essenciais para a ligação com a AT: glicosamina (HNSO_3^-) e ácido idurônico (OSO_3^-) sulfatados. FONTE: Lindhal, 1984. _____ 23

Figura 4. Esquema da cascata de coagulação. FONTE: Becker, 2007. _____ 24

Figura 5. Alguns métodos para imobilização de biomoléculas. FONTE: modificado de Neri, 2008. _____ 26

Figura 6. Estrutura básica da polianilina. FONTE: Debarnot et al., 2011, adaptado de Pouget et al., 1991. _____ 29

Figura 7. Representação da interconversão entre diferentes formas da polianilina. FONTE: modificado de Menezes, 2007. _____ 29

CAPÍTULO 2:

Figure 1. Effect of the variables in the heparin immobilization. (1)GC: glutaraldehyde concentration, (2)GTR: glutaraldehyde time reaction, (3)HC: heparin concentration and (4)HTR: heparin time reaction. _____ 53

Figure 2. Electrophoretic profile obtained of the human plasma subject at affinity chromatography by SDS-PAGE (10% acrylamide gel) stained with Comassie Blue. **P**, Standard; **A**, 0.5 mol L⁻¹ NaCl eluate; **B**, 1.5 mol L⁻¹ NaCl eluate._____54

Figure 3. Electrophoretic profile obtained of the human plasma subject at affinity chromatography by SDS-PAGE (10% acrylamide gel) stained with silver nitrate. **P**, Standard; **A**, 0.5 mol L⁻¹ NaCl eluate; **B**, 1.0 mol L⁻¹ NaCl eluate; **C**, 1.5 mol L⁻¹ NaCl eluate; and **D**, 2.0 mol L⁻¹ NaCl eluate._____55

LISTA DE TABELAS

PAG.

CAPÍTULO 1:

Tabela 1. Trabalhos publicados usando polianilina para imobilização de biomoléculas. _28

CAPÍTULO 2:

Table 1. Distribution of the level of the variables experimental (glutaraldehyde concentration, glutaraldehyde reaction time, heparin concentration and heparin reaction time) for heparin immobilization with response of immobilization (%)._____52

LISTA DE ABREVIações

Asn	Asparagina
AT	Antitrombina
Hep	Heparina
EDAC	1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida
GAG	Glicosaminoglicano
NHS	N-hidroxisuccinimida
PANI	Polianilina
PANIG	Polianilina ativada com glutaraldeído
PFC	Plasma fresco congelado
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

	PAG.
1. INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO 1:	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Hemoderivados e proteínas plasmáticas	17
2.1.1. <i>Purificação de proteínas plasmáticas</i>	18
2.1.2. <i>Antitrombina</i>	19
2.2. Heparina	21
2.3. Coagulação sanguínea	23
2.4. Imobilização de biomoléculas	24
2.5. Polianilina	27
2.5.1. Formas de polianilina	28
3. OBJETIVOS	31
3.1. Geral	31
3.2. Específicos	31
4. REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 2:	44
5. ARTIGO – Heparin immobilization onto polyaniline and purification of plasmatic human protein	45
1. Introduction	47
2. Experimental	48
2.1. Chemical and Reagents	48
2.2. Support synthesis	48
2.3. Heparin immobilization	49
2.4. Heparin quantification	49
2.5. Influence of variables in the heparin immobilization	49
2.6. Plasma sample and protein purification	50
2.7. Protein determination	50
2.8. Anticoagulant assay	50
2.9. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	50

3. Results and discussion	51
3.1. Heparin immobilization	51
3.2. Protein plasmatic purification	53
4. Conclusion	55
6. CONCLUSÃO	60
7. ANEXO – NORMAS DA REVISTA <i>REACTIVE & FUNCTIONAL POLIMERS</i>	61

1. INTRODUÇÃO

A heparina tem sido utilizada como principal anticoagulante para a profilaxia e tratamento de trombose. Contudo, pode provocar reações adversas graves como hemorragias e trombocitopenia, e outros distúrbios (hipersensibilidade, reações anafiláticas, hipercalemia, dor torácica, rinite ou broncoespasmo, náuseas, vômitos e constipação). Outra limitação no uso da heparina deve-se a inabilidade em inibir a trombina ligada a fibrina (FURLANETTO, 2005; BECKER, 2009). Esses fatores impulsionaram o desenvolvimento de novos anticoagulantes. Entretanto, compósitos covalentes AT-heparina podem resolver muitos destes problemas, bem como uso de AT concentrada (PATEL *et al.*, 2007). A heparina comercial é uma mistura de GAGs extraídas principalmente da mucosa intestinal de bovinos e suínos. O peso molecular de suas cadeias varia de 5 kDa a 30 kDa, com um peso médio de 15 kDa referente à aproximadamente 30 unidades monossacarídicas (MIDDELDORP, 2008).

A heparina imobilizada pode ser usada para purificar várias proteínas, particularmente certos fatores de coagulação, proteínas anti-heparina, proteínas de membrana, enzimas e lectinas. Superfícies heparinizadas mostram redução da adesão de plaquetas, menor perda de células do sangue e aumento do tempo de recalcificação do plasma e tempo de tromboplastina, resultando em biocompatibilidade aumentada sem comprometer propriedades trombo-resistente (LINHARDT *et al.*, 2008). Assim, a heparina é uma poderosa proposta geral para elaboração de um suporte de afinidade, permitindo a purificação de várias proteínas, através de eluição diferencial com gradiente salino (HERMANSON *et al.*, 1992). Nos últimos anos, vários tipos de suportes têm sido sugeridos para a imobilização de heparina, tais como polidimetilsiloxane-poli(etileno glicol) (uma superfície de silicone; CHEN *et al.*, 2005), álcool poli(vinílico) (MA *et al.*, 2008), poli(fluoreto de vinilideno) (ZHU *et al.*, 2009).

Em geral, os sistemas de proteína/biomolécula imobilizada têm a vantagem de estabilidade estrutural de proteínas e preservação do sítio ativo, permitindo o acesso do substrato ao meio catalítico. A escolha do material de suporte deve considerar fatores como hidrofobicidade / hidrofilicidade, área de superfície, diâmetro dos poros e grupos reativos superficiais, mecanismo de síntese, custos e facilidade de manuseio (CARAMORI *et al.*, 2011). Na busca por melhores suportes, a polianilina tem se destacado.

O termo polianilina (PANI) refere-se a uma classe de polímeros compostos de unidades repetidas de anilina. A PANI pode ser considerada como um excelente suporte por possuir propriedades como: alta capacidade de retenção, alta estabilidade físico-química, síntese simples e rápida e de baixo custo. As partículas da PANI apresentam uma grande área de superfície na qual as enzimas e outras biomoléculas podem ser imobilizadas. A ausência de poros e presença de grupos reativos na superfície do polímero representam importantes características morfológicas, que permite que o substrato se ligue ao sítio ativo da enzima imobilizada (GAMBOA, 2010).

Em decorrência da colaboração entre a indústria farmacêutica e a pesquisa acadêmica no isolamento e purificação de inibidores protease-específicos e considerando a demanda de hemocomponentes/hemoderivados no país em contradição com a quantidade de plasma de boa qualidade descartada, a purificação de proteínas plasmáticas a partir da imobilização de heparina em suporte de baixo custo (Sephadex-polianilina), mediante procedimento de fácil execução, pode proporcionar menores custos operacionais e ampliação da aplicação biotecnológica e terapêutica das proteínas do plasma, como albumina e antitrombina.

CAPÍTULO 1:
REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Hemoderivados e proteínas plasmáticas

Hemoderivados são medicamentos produzidos pelo fracionamento industrial do plasma humano. Os hemoderivados são de grande valia para a saúde pública devido à possibilidade de serem usados na prevenção e tratamento de diversas doenças, traumas, desordens imunológicas, infecções e deficiências congênitas. Após a coleta do sangue, este é submetido a procedimentos de separação de seus componentes nos Serviços de Hemoterapia, como centrifugação, que separa hemácias, leucócitos, plaquetas, plasma e crioprecipitado (precipitação a frio de fatores da coagulação), denominados hemocomponentes. Na maioria das vezes, os serviços de hemoterapia preparam apenas os quatro primeiros hemocomponentes mencionados. Todos os concentrados de hemácias e plaquetas produzidos são transfundidos, contudo apenas uma parte do plasma preparado pelos hemocentros é usada para fins transfusionais. O restante constitui o chamado plasma excedente (BURNOUNF, 2007; FARRUGIA *et al.*, 2009).

Cerca de 4 milhões de bolsas de sangue por ano são arrecadadas no Brasil. De cada uma separam-se os hemocomponentes plasmáticos. No período de até oito horas após a coleta do sangue, o plasma fresco pode ser congelado (PFC) por um ano a -20 °C. Porém, devido à baixa demanda de uso nos centros hemoterápicos, o excedente de PFC é grande: muitas bolsas de plasma são inutilizadas e descartadas. Em contrapartida, o Ministério da Saúde importa medicamentos hemoderivados para atender a necessidade da população (mais de 400 milhões de dólares por ano em hemoderivados) (SOARES, 2002; FARRUGIA *et al.*, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O plasma tem aproximadamente 60 gramas de proteína/litro, predominantemente albumina (com 25 gramas), em seguida as imunoglobulinas polivalentes e específicas e depois um conjunto de várias proteínas, incluindo as relacionadas com a coagulação do sangue (antitrombina, por exemplo) (SOARES, 2002).

2.1.1. Purificação de proteínas plasmáticas

O principal método para purificação de proteínas plasmáticas humanas é baseado no método de precipitação com etanol desenvolvido por Cohn-Onclay na década de 1940 (CAI *et al.*, 2005; OFOSU *et al.*, 2008). Neste método, o sangue coletado (geralmente na presença de anticoagulante) é centrifugado e o plasma separado é congelado imediatamente. A purificação inicia-se com a separação do crioprecipitado (fração do plasma que contém o fator VIII, fator von Willebrand e algum fibrinogênio e outras globulinas insolúveis). Centrifugação ou filtração é depois usada para fracionamento de diferentes proteínas do plasma (CAI *et al.*, 2005). Apesar de ser um método simples e de baixa toxicidade, o método de Cohn possui baixa especificidade na purificação de proteínas em baixas concentração plasmática e efeitos desnaturantes devido ao etanol em relação as proteínas lábeis (fatores da coagulação, por exemplo) (BURNOUNF, 1995).

A maioria dos centros de hemoderivados utiliza processo misto de purificação pelo método de Cohn e cromatografia. A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura por meio da distribuição dos componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de maneira que cada um deles seja seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS *et al.*, 2006).

A GE Healthcare comercializa um processo inteiramente cromatográfico para purificação de fator VIII, IX, albumina e IgG em grande escala (~1000 L plasma por processo). Este processo utiliza como primeira etapa de purificação filtração a gel do plasma e possui melhor rendimento que o processo de separação por crioprecipitado, embora exija grandes colunas e grandes volumes de resina (RAW *et al.*, 2007).

A cromatografia de afinidade envolve a preparação de uma fase estacionária seletiva, por imobilização covalente de ligantes específicos à matriz ou suporte sólido. A amostra é aplicada à coluna cromatográfica contendo o suporte sólido com o ligante imobilizado. As moléculas sem afinidade com o ligante passam pela coluna sem serem retidas e as moléculas com afinidade pelo ligante são retidas em função da intensidade desta ligação (COLLINS *et al.*, 2006).

Entre as proteínas plasmáticas com aplicação terapêutica destacam-se os fatores de coagulação (cujos concentrados podem ser utilizados no tratamento de coagulopatias). Concentrados de fator VIII (FVIII) são utilizados no tratamento de Hemofilia A, podendo ser também usado para o tratamento da doença de von Willebrand. A deficiência de Proteína C também é tratada com concentrados desta proteína. A forma ativada desta proteína (APC) apresenta atividade anticoagulante, antiinflamatória, citoprotetora e antiapoptótica. A terapia de APC reduz a mortalidade em pacientes com sepse severa (GRIFFIN *et al.*, 2006). Além destes produtos pode ser citada a comercialização de produtos de FVII, FIX, FXII, FvW, fibrinogênio, antitrombina, IgG, α -antitripsina, albumina e complexo protrombínico (MAMMEN, 2002; MANNUCCI, 2003; MORI *et al.*, 2008; WONG & RECHT, 2011).

2.1.2. Antitrombina

A antitrombina (AT, anteriormente designada antitrombina III) pertence à superfamília serpina e é a proteína inibitória mais importante no sistema de coagulação sanguínea. A AT é capaz de inativar os fatores IXa, Xa XIa, XIIa e o complexo VIIa/fator tecidual e trombina, componentes chaves na cascata de coagulação (MAJERUS *et al.*, 1991; AUSTIN *et al.*, 1992; BOURIN & LINDAHL, 1993; LAWSON *et al.*, 1993; NORRIS, 2003). A AT humana é uma glicoproteína plasmática de cadeia única, com peso molecular de 58 kDa. Esta proteína é sintetizada no fígado e em condições normais está presente no plasma numa concentração em torno de 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, com meia vida de três dias. A habilidade da AT em inibir os fatores de coagulação é grandemente aumentada com a presença de glicogaminoglicanos (GAGs) como a heparina (a qual aumenta 1000 vezes a razão da inibição) e o heparan sulfato (presente nas superfícies luminal e subluminal dos vasos sanguíneos) e por substâncias similares a heparina (heparin-like) (NORRIS, 2003; OLSON & CHUANG, 2002; LINDHAL & KJELLEN, 1991; CARRELL, 1999).

A estrutura primária da AT humana é composta por 432 resíduos de aminoácidos, dos quais seis são cisteína, que formam pontes dissulfeto. A inibição pela AT envolve a formação de um complexo estável entre o sítio ativo da serinoprotease e o sítio reativo da AT, reconhecido inicialmente pela protease como substrato. Com a clivagem de uma ligação do sítio reativo da AT (Arg393 – Ser394) pela enzima-alvo ocorre uma mudança conformacional no inibidor que captura a protease e corrompe sua tríade catalítica

promovendo inibição reversível (ROSENBERG & DAMUS, 1973). A AT inibe preferencialmente enzimas livres, pois enzimas que estão fazendo parte dos complexos tenase ou protrombinase estão menos acessíveis a inibição. Outras enzimas que não participam da coagulação sanguínea, como a plasmina e tripsina, também são inativadas pela AT (BJÖRK & LINDHAL, 1982).

A AT contém 4 sítios de glicosilação. 90% das moléculas encontram-se na forma α , e 10% encontram-se na forma β . A forma α é glicosilada em três resíduos de aminoácidos, asparaginas (Asn) 96, 155 e 192 e apresenta um sítio extra de glicosilação na Asn₁₃₅. A forma β não é glicosilada na posição Asn₁₃₅, devido à presença de um resíduo de serina no lugar de uma treonina na sequência consenso de reconhecimento para adição do oligossacarídeo neste sítio. A **Figura 1** exibe uma comparação entre estas isoformas da AT. A β -AT está ligada às paredes dos vasos sanguíneos em maior grau do que a α -AT e possui maior afinidade pela heparina. A AT é composta por 3 folhas β (A-C), 9 α -hélices (A-I) e pelo centro reativo, que contém uma sequência de aminoácidos complementar ao sítio ativo de proteases alvo (BECKER, 2007; STEIN & CARREL, 1995; WHISSTOCK, SKINNER & CARREL, 1998).

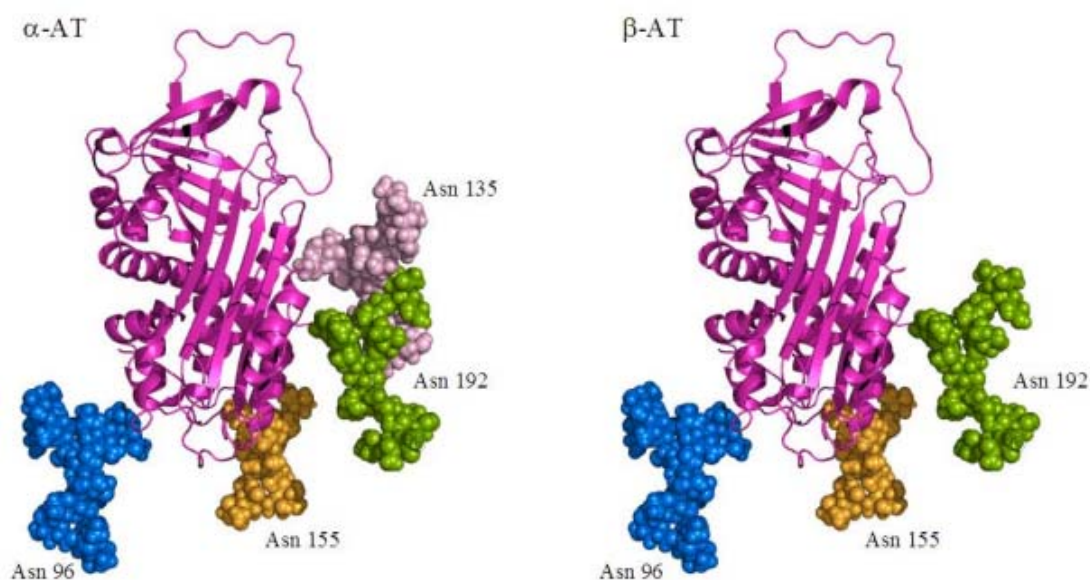


Figura 1. Representação das antitrombinas α e β com seus sítios de glicosilação.
 FONTE: Becker, 2007.

As interações entre protease e inibidor são lentas, contudo podem ser aumentadas com glicosaminoglicanos (GAGs) como a heparina (cofator terapêutico, aumenta em até 1000 vezes a razão da inibição), o heparan sulfato (cofator fisiológico, presente nas

superfícies luminal e subluminal dos vasos sanguíneos) e substâncias similares a heparina (heparin-like). Estes, quando presentes, ligam-se aos resíduos lisina e arginina positivamente carregados, localizados na região amino-terminal da AT e aceleram a formação do complexo enzima-inibidor por induzir mudanças conformacionais no sítio reativo da AT (NORRIS, 2003; OLSON & CHUANG, 2002; LINDHAL & KJELLEN, 1991; CARRELL, 1999; MORAIS, 2009).

No mecanismo molecular da inibição de serinoproteases pela AT, o centro reativo da AT é exposto e reconhecido pela proteinase-alvo (Fator Xa, IXa, trombina, etc.) como um substrato normal a ser clivado. A clivagem do centro reativo pela proteinase-alvo é interrompida no estágio de um intermediário *acil*, quando ocorre a inserção da alça do centro reativo na folha- β A. Esta inserção resulta em uma translocação da protease-alvo de um polo da molécula de AT ao outro; o centro reativo da protease-alvo é deformado resultando na inibição irreversível (STRATIKOS & GETTINS, 1999; HUNTINGTON, READ & CARREL, 2000; LAWRENCE, OLSON & MUHAMMAD, 2000).

Clinicamente, AT purificada (incluindo concentrados) é usada para tratamento de deficiência hereditária ou adquirida de AT, de trombose por deficiência congênita desta proteína e de Proteína C, septicemia e como substituinte da heparina em pacientes pós-cirúrgicos (SAIGO *et al.*, 2001; LEMMER & DESPOTIS, 2002; MOLL & HILL, 2009). Níveis de AT no plasma têm sido observados nos casos de coagulação intravascular disseminada, hemorragia hipertensiva intracerebral e asma em recém-nascidos ou crianças pequenas (KONG *et al.*, 2011).

2.2. Heparina

Em 1916, Jay MacLean, um estudante de medicina, investigava tecidos do coração e fígado buscando substâncias tromboplásticas e encontrou um extrato de tecido hepático com capacidade de retardar a coagulação plasmática. Esta substância anticoagulante foi denominada, mais tarde, heparina (MacLEAN, 1959).

Apesar de ter sido descoberta em 1916, o primeiro uso clínico/farmacológico da heparina na prevenção de tromboembolismo foi em 1935, por dificuldades na purificação e padronização terapêutica (MUELLER, 2004; KAKAR, 2004). Tecidos animais ricos em mastócitos, como os pulmões de bovinos e mucosa intestinal de porcos, são usados como

fontes de heparina comercial (MARTINICHEN, 2005; FERREIRA, 2007; LINHARDT *et al.*, 2008).

A heparina é sintetizada e armazenada exclusivamente nos grânulos secretores dos mastócitos e encontrada ao redor de vasos, em órgãos e tecidos ricos nessas células (pulmões, músculos, fígado, coração, rins, intestino). Em condições normais, não é detectada no plasma. (CARRELL *et al.*, 1995; FERREIRA, 2007). A heparina consiste numa mistura de polissacarídeos aniônicos, constituída por uma sequência alternada de unidades sulfatadas de ácido urônico e D-glucosamina. O ácido urônico pode ser ácido L-idurônico (70 a 80%) ou ácido D-glucurônico (20 a 30%) (BOURIN & LINDAHL, 1993.) e as unidades de D-glucosamina apresentam-se N-sulfatadas ou N-acetiladas. Estas unidades são unidas através de ligações glicosídicas (α e β) $1 \rightarrow 4$. A presença e frequência destas unidades de sacarídeo variam de acordo com a fonte de tecidos a partir da qual a heparina é extraída (LINHARDT *et al.*, 2008).

A ligação de heparina à AT induz uma mudança conformacional na molécula de AT aumentando grandemente a inibição de várias serinoproteases, principalmente os fatores Xa e IIa (trombina) (LI *et al.*, 2004). A heparina serve como um molde para que AT e trombina liguem-se formando um complexo ternário heparina-antitrombina-proteinase (BOURIN & LINDAHL, 1993) (**Figura 2**).

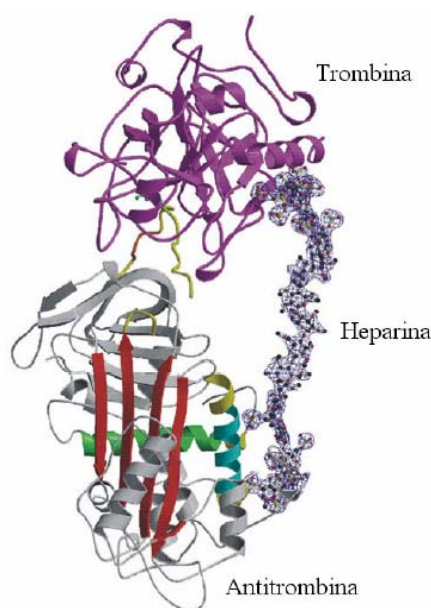


Figura 2. Representação do complexo ternário antitrombina-heparina-trombina (mecanismo de ponte). *FONTE: Li et al., 2004.*

A inativação da trombina pela heparina depende do tamanho da cadeia sacarídica: mínimo de 18 unidades monossacarídicas (~5,4 kDa) é necessário para ativar a inibição da trombina pela AT; moléculas de heparina menores não podem ligar-se a trombina e AT simultaneamente. Todavia, para inibição do fator Xa na presença de AT é necessária apenas uma sequência pentassacarídica, representada na **Figura 3** (MAJERUS et al., 1991).

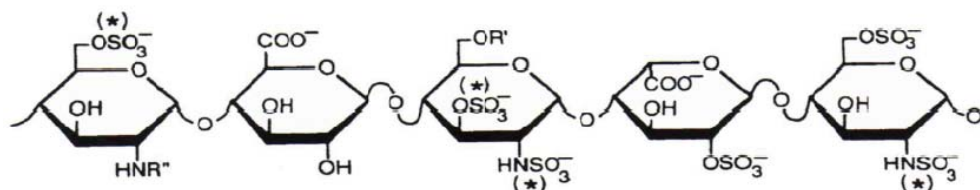


Figura 3. Sequência de ligação da heparina à antitrombina. (*) grupos sulfato considerados essenciais para a ligação com a AT: glicosamina (HNSO_3^-) e ácido idurônico (OSO_3^-) sulfatados. *FONTE: Lindhal, 1984.*

2.3. Coagulação Sanguínea

A maioria das proteínas envolvidas nas vias de coagulação e fibrinólise são enzimas proteolíticas majoritariamente pertencentes à classe das serinoproteases e de acordo com a classificação pelo “International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (NC-IUBMB) estas enzimas recebem o número EC 3.4.2.1. Têm sido descritas uma centena delas e dentre estas estão trombina, fator Xa, plasmina, fator VIIa, fator IXa, fator XIa, fator XIIa, etc (BLOMBACK & ANTOVIC, 2010).

A coagulação sanguínea pode ocorrer através de duas vias básicas: intrínseca (iniciada pela exposição do sangue a uma superfície negativamente carregada) e extrínseca (iniciada com a liberação de tromboplastina tecidual após uma lesão do tecido biológico). Ambas as vias confluem para uma via final comum. Na via comum, o principal resultado da propagação da coagulação é a conversão, pelo fator Xa, de protrombina em trombina, a qual realiza a conversão da proteína plasmática solúvel fibrinogênio numa matriz insolúvel de fibrina (**Figura 4**). A fibrina polimerizada (pelo fator Xa), juntamente com o tampão plaquetário, forma um coágulo ou trombo a fim de prevenir a propagação da hemorragia (BECKER, 2007).

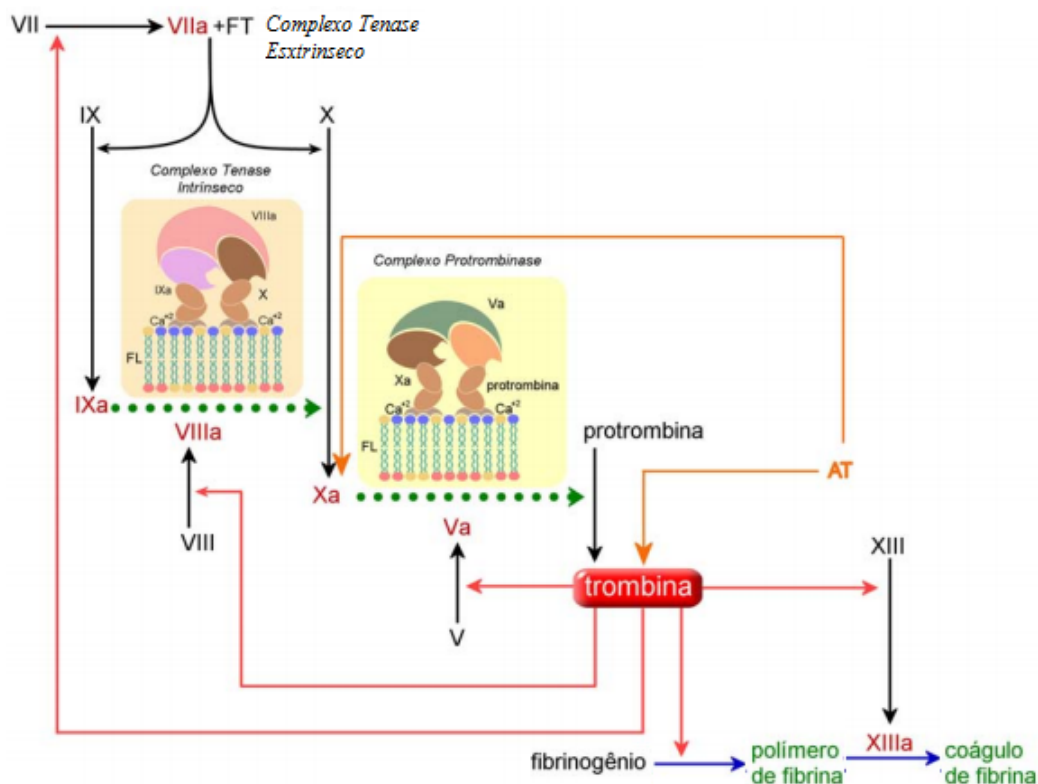


Figura 4. Esquema da cascata de coagulação. *FONTE: Becker, 2007.*

As serpinas (do inglês Serpin, serino protease inibhytor) são uma família de inibidores das serinoproteases e estão amplamente distribuídas entre os seres vivos, desde bactérias termófilas (IRVING *et al.*, 2002) a mamíferos (SILVERMAN *et al.*, 2001). Esta família é composta por um grupo de proteínas altamente conservadas, constituídas por 370 a 390 aminoácidos, de diferentes graus de glicosilação e capacidade de formar dímeros. A característica principal dessas proteínas é a presença de uma região central consistindo de 8 a 9 α -hélices e 3 grupos de folhas- β (ROBERTS *et al.*, 1995; BECKER, 2007).

2.4. Imobilização de biomoléculas

Imobilizar uma biomolécula consiste em confiná-la em um suporte sólido para posterior reutilização, tornando o processo menos dispendioso (GUISAN, 2006). A imobilização oferece uma série de vantagens e as razões para a escolha de um derivado imobilizado variam de aplicação para aplicação, incluindo: utilização da atividade catalítica por maior período de tempo; possibilidade de operação contínua do processo, com maior facilidade de controle; facilidade de separação do produto final; maior

estabilidade ao pH e à temperatura; facilidade de interrupção da reação, num nível desejado (GUISAN, 2006; HANEFELD, GARDOSI & MAGNER, 2009; LOPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005; VILLENEUVE *et al.*, 2000; DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004).

Proteínas/enzimas podem ser imobilizadas em matrizes ou suportes naturais ou sintéticos por *interações físicas* (enclausuramento, oclusão) ou *interações químicas* (adsorção, interação iônica, ligação covalente). O encapsulamento/enclausuramento consiste no aprisionamento de enzimas ou células no interior de uma membrana semipermeável. Na oclusão o biocatalisador é confinado ao interior da matriz sem estabelecimento de qualquer ligação química, não se observam alterações estruturais ou interações com o centro ativo, enquanto que os substratos/produtos podem escoar através da matriz (AIRES-BARROS & CABRAL, 2003).

Em imobilizações por interações químicas, a molécula é retida a uma superfície sólida mediante interações estabelecidas entre ela e a matriz. No método de imobilização por **adsorção**, mais antigo e simples, consiste na adsorção a um suporte sólido (nylon, celite, cerâmica, vidro, entre outros) por ação de interações fracas do tipo Van der Waals, pontes de hidrogênio, hidrófobas e eletrostáticas, sem uma modificação prévia da matriz ou da biomolécula. Apesar de ser uma técnica de baixo custo é limitada devido à reversibilidade da ligação (susceptível a mudança de pH, temperatura, força iônica). O método por **interação iônica** geralmente se dá pela utilização de resinas de trocas iônicas como suportes de imobilização permitindo o estabelecimento de interações iônicas. A força deste tipo de interação situa-se entre a adsorção física e a ligação covalente caracterizando-se por limitações e vantagens idênticas à adsorção física, podendo ocorrer dessorção da biomolécula na presença de meios reacionais com força iônica elevada ou em que se registrem variações significativas de pH (AIRES-BARROS & CABRAL, 2003).

A imobilização por **ligação covalente** baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da biomolécula e os grupos reativos da matriz. Esta técnica apresenta a vantagem de evitar a dessorção e por proporcionar alta estabilidade funcional, além de ser um dos métodos mais estudado e difundido (AIRES-BARROS & CABRAL, 2003, GÓMEZ *et al.*, 2003).

A figura 5 esquematiza alguns métodos para imobilização de biomoléculas.

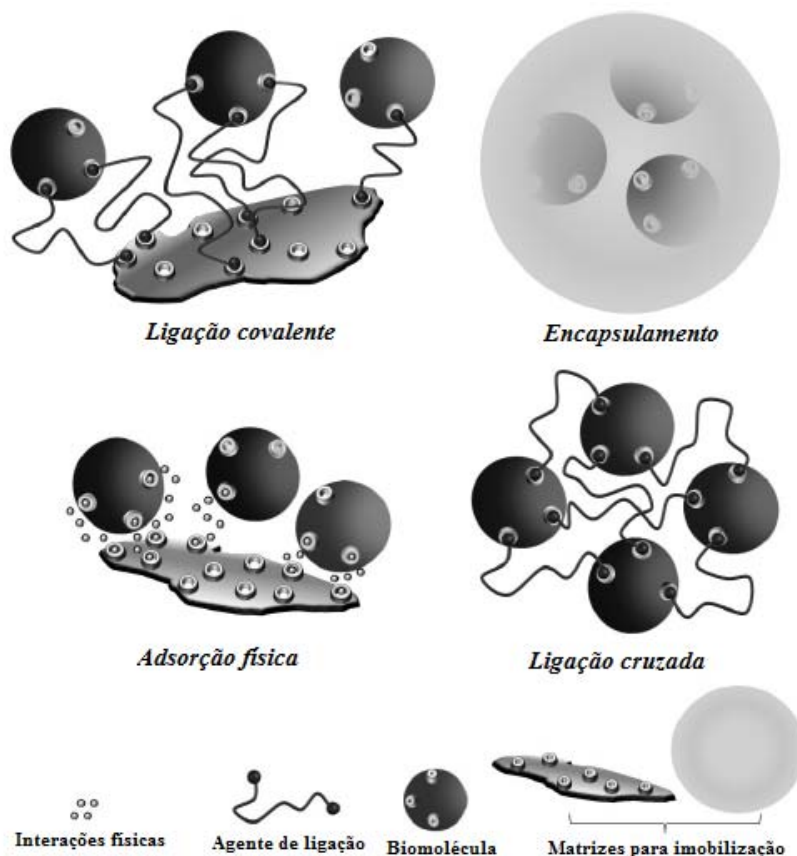


Figura 5. Alguns métodos para imobilização de biomoléculas. *FONTE: modificado de Neri, 2008.*

A efetividade da imobilização superficial pode ser incrementada mediante a utilização de suportes sintéticos ou através de modificações químicas introduzidas na matriz por ligações cruzadas (*cross-linking*) com agentes bifuncionais (glutaraldeído, carbodiimida) que permitem a ligação covalente (AIRES-BARROS & CABRAL, 2003).

Na seleção de um suporte para uma determinada aplicação devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo, dentre outras. Eles podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, e conforme sua morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel (VILLENEUVE *et al.*, 2000; DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004; JEGANNATHAN *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2009; MATEO *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2007). Os materiais orgânicos, notadamente os

polímeros que podem ser naturais ou sintéticos, são uma classe de suportes amplamente empregados na imobilização de enzimas (LOPEZ-GALLEGU *et al.*, 2005). Os sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal, porém os naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo e são facilmente degradados, não causando danos ao meio ambiente (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004; MENDES *et al.*, 2011).

2.5. Polianilina

A polianilina (PANI) ficou conhecida desde a metade do século XIX sobre o nome de *anilina preta*. A PANI foi primeiramente sintetizada por Runge em 1834 e usada para colorfast fabrics dyeing (NIZIOL *et al.*, 2011; DEBARNOT *et al.*, 2011). Em 1862, Letheby desenvolveu a síntese electroquímica e obteve um precipitado verde escuro. Isto demonstrou que a PANI existe em diferentes estruturas químicas dependendo dos parâmetros e procedimentos para sua elaboração. O interesse no polímero ressurgiu na década de 1980 após trabalho publicado por MacDiarmid e Chiang (1986), que descobriram que a protonação da base de esmeraldina tornava este material condutor de eletricidade. A PANI tem atraído considerável atenção e possui potencial para um amplo campo de aplicações, como baterias recarregáveis (MARTIN, 1995), proteção contra corrosão (FAHLMAN *et al.*, 2000; TALLMAN *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2007), proteção eletromagnética (HAKANSSON *et al.*, 2006), revestimentos condutores (MAZIARZ *et al.*, 2000), catalisadores (HIGUCHI *et al.*, 1997) e sensores (VIRJI *et al.*, 2005; ZHANG & WANG, 2006; YAN *et al.*, 2007).

PANI apresenta características tais como síntese simples, alta estabilidade física e química e a extremos de temperatura e pH, resistência ao ataque de microrganismos, e larga capacidade de retenção do composto (GOSPODINOVA & TERLEMEZYAN, 1998; FERNANDES *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005). Além disso, a ausência de poros e a presença de grupos reativos na superfície do polímero representam características morfológicas importantes que fazem da PANI um excelente suporte polimérico (CARAMORI *et al.*, 2011; PURCENA *et al.*, 2009).

Devido às características morfológicas da PANI, diferentes autores têm reportado o seu uso como aplicação alternativa para imobilização de diferentes biomoléculas, como anticorpos, antígenos e enzimas, conforme mostrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Trabalhos publicados usando polianilina para imobilização de biomoléculas.

Biomolécula	Autor(es)
α -amylase	Ashly <i>et al.</i> , 2011
Invertase	Bayramoglu <i>et al.</i> , 2009
Tripsina	Caramori & Fernandes, 2008
Tripsina	Caramori <i>et al.</i> , 2011
Invertase	Chen <i>et al.</i> , 2000
Antígeno de <i>Yersinia pestis</i>	Coelho <i>et al.</i> , 2001
Peroxidase	Fernandes <i>et al.</i> , 2003 e 2004
L-Asparaginase	Ghosh <i>et al.</i> , 2012
Urease	Lasca <i>et al.</i> , 2006
Lipase	Lee <i>et al.</i> , 2008
Glucose oxidase	Leite <i>et al.</i> , 1994
Xantina oxidase	Nadrusz <i>et al.</i> , 1996
β -galactosidase	Neri <i>et al.</i> , 2009 e 2011
Horseradish peroxidase	Oliveira <i>et al.</i> , 2008
Glucose oxidase	Parente <i>et al.</i> , 1992
Tripsina	Purcena <i>et al.</i> , 2009
Anticorpo IgG	Sergeyeva <i>et al.</i> , 1996
Glucoamylase de <i>Aspergillus niger</i>	Silva <i>et al.</i> , 2005
Colesterol esterase e colesterol oxidase	Singh <i>et al.</i> , 2006

2.5.1. Formas de Polianilina

Dependendo do estado de oxidação, a PANI existe em muitas formas com cores diferentes: leucoesmeraldina (forma totalmente reduzida, amarelo claro), pernigranilina (forma totalmente oxidada, violeta), contendo diferentes números de anéis benzenos e quinoides, e esmeraldina (parcialmente oxidada, azul e/ou verde escuro). A prescrição geral para esta classe de polímero é exibida na **Figura 5**, proposta inicialmente por Pouget *et al.* (1991) e adaptada por Debarnot *et al.* (2011), onde y corresponde a unidades repetidas de espécies reduzidas e $(1-y)$ a espécies oxidadas, onde y pode variar de 1, quando o polímero está totalmente reduzido e contendo somente nitrogênios amina, para zero, para o polímero totalmente oxidado, que contém apenas nitrogênios imina. As formas não protonadas foram conhecidas como base e as formas protonadas, como sal. (NIZIOL *et al.*, 2011; FERREIRA, 2010; DALMOLIN, 2006). A **Figura 6** representa a interconversão das diferentes formas (e cores) de PANI: incolor a amarelo claro é

leucoesmeraldina, azul é base de esmeraldina, verde escuro é sal de esmeraldina e violeta é pernigranilina.

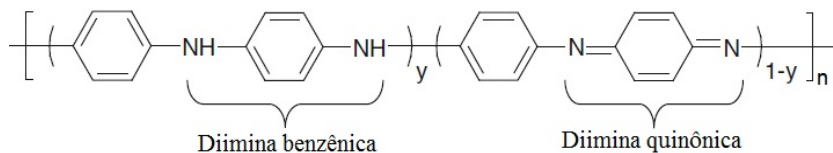


Figura 6. Estrutura básica da polianilina. *FONTE: Debarnot et al., 2011, adaptado de Pouget et al., 1991.*

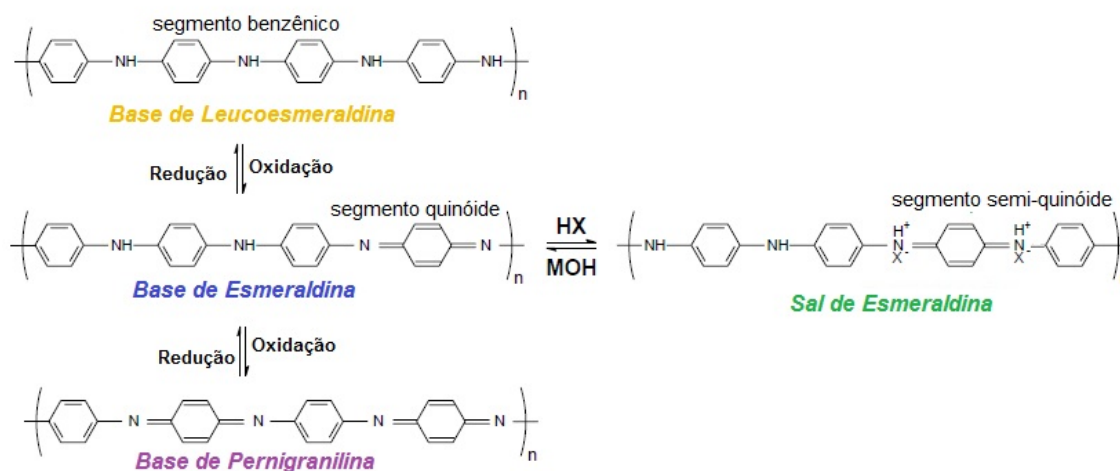


Figura 7. Representação da interconversão entre diferentes formas da polianilina. *FONTE: modificado de Menezes, 2007.*

A forma leucoesmeraldina é eletricamente isolante e consiste basicamente de anéis benzenos (4B). Num primeiro processo de oxidação, ocorre uma forte modificação da estrutura química, onde 25% do anel benzeno são convertidos para formas quinóides (Q + 3B), levando à formação da espécie denominada esmeraldina. Num segundo processo de oxidação ocorre a formação de uma espécie que tem 50% de anéis oxidados (2Q+2B), esta espécie é conhecida como pernigranilina. A polianilina dopada (sal de esmeraldina) consiste de anéis benzeno e quinóide, e é formado por radical cátion de poli (semiquinona), que dão origem a uma banda de condução polarônica (NIZIOL *et al.*, 2011; MENEZES, 2007).

Os métodos mais frequentemente utilizados para polimerização da anilina são baseados na síntese química, eletroquímica ou ambas. A síntese química é executada em meio ácido e requer um forte agente oxidante (geralmente persulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), para criar um radical cátion de anilina ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}^+$), com estrutura de

ressonância que conecta dímeros crescentes. Os dímeros são oxidados formando diiminas e o aumento da cadeia ocorre por uma reação de substituição nucleofílica aromática. Esta síntese obtém um polímero de alto peso molar (pó verde) e alta pureza. A síntese eletroquímica ocorre por oxidação anódica do monômero sobre diferentes substratos metálicos (por exemplo, platina, ouro ou carbono) (NIZIOL *et al.*, 2011; FERREIRA, 2010; AFZAL *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Imobilizar heparina em Sephadex-polianilina para purificar proteínas plasmáticas.

3.2. Objetivos Específicos

- Revestir Sephadex G-25 com polianilina;
- Imobilizar covalentemente heparina a Sephadex G-25 revestido com polianilina;
- Avaliar a influência das variáveis tempo de reação e concentração do glutaraldeído e tempo de reação e concentração da heparina na imobilização da heparina ao suporte Sephadex- polianilina;
- Purificar proteínas plasmáticas utilizando Sephadex-polianilina heparinizado;
- Identificar as proteínas plasmáticas purificadas através da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, A. B.; AKHTAR, M. J.; NADEEM, M.; AHMAD, M.; HASSAN, M. M.; YASIN, T.; MEHMOOD, M. Structural and electrical properties of polyaniline/silver nanocomposites. *Journal Physical D: Applied Physical*, 42: 1-8, 2009.

AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Bioseparações in *Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações*. LIDEL, LISBOA, 2003.

ASHLY, P.C.; JOSEPH, M.J.; MOHANAN, P.V. Activity of diastase α -amylase immobilized on polyanilines (PANIs). *Food Chemistry*, 127: 1808–1813, 2011.

AUSTIN, R. C.; SHEFFILD, W. P.; RACHBINSKI, R. A.; BLACHMAN, M. A. The N-terminal domain of antithrombin III is essential for heparin binding and complex formation with, but not cleavage by, α -thrombin. *Biochemistry Journal*, 282(2): 345-351, 1992.

BAYRAMOGLU, G.; KARAKISLA, M.; ALTINTAS, B.; METIN, A. U.; SAÇAK, M.; ARICA, M. Y. Polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite fibers for reversible immobilization of enzymes: Stability and catalytic properties of invertase. *Process Biochemistry*, 44: 880–885, 2009.

BECKER, C. F. Caracterização do reconhecimento molecular de polissacarídeos de ouriço-do-mar pela antitrombina. 122 f. *Dissertação* (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BJÖRK, L.; LINDAHL, U. Mechanism of the anticoagulant actions of heparin. *Molecular and Cellular Biochemistry Journal*, 48(3): 161-182, 1982.

BLOMBACK, M.; ANTOVIC, J. *Essential Guide to Blood Coagulation*. Oxford, UK: Wiley & Balckwell, 192 p., 2010.

BOURIN, M. C.; LINDAHL, U. Glicosaminoglycans and the relation of blood coagulation. *Biochemistry Journal*, 289(1): 313-330, 1993.

BURNOUF, T. Modern plasma fractionation. *Transfus. Med. Rev.*, 21: 101-117, 2007.

BURNOUF, T. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. *Journal of Chromatography B: Biomed. Appl.*, 664, 3-15, 1995.

CAI, K.; GIERMAN, T.M.; HOTTA, J.; et al. Ensuring the biologic safety of plasma-derived therapeutic proteins. Detection, inactivation, and removal of pathogens. *Biodrugs*, 19: 79–96, 2005.

CARAMORI, S. S.; FARIA, F. N. de; VIANA, M. P.; FERNANDES, K. F., CARVALHO JR, L. B. Trypsin immobilization on discs of polyvinyl alcohol glutaraldehyde/polyaniline composite. *Materials Science and Engineering C*, 31: 252–257, 2011.

CARAMORI, S. S.; FERNANDES, K. F. The use of poly(ethylene terephthalate)-poly(aniline) composite for trypsin immobilization. *Materials Science and Engineering C*, 28: 1159-1163, 2008.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. de; CASS, Q. B. *Quimica Nova*, 32: 175, 2009.

CARRELL, R.W. How serpins are shaping up. *Science*, 285: 1861-1862, 1999.

CARRELL, R.; SKINNER, R.; WANDELL, M.; WHISSTOCK, J. Antithrombin and heparin. *Molecular Medicine Today*, 1: 226-231, 1995.

CHEN, H.; CHEN, Y.; SHEARDOWN, H.; BROOK, M. A. Immobilization of heparin on a silicone surface through a heterobifunctional PEG spacer. *Biomaterials*, 26: 7418–7424, 2005.

CHEN, Y.; WANG, X.H.; LI, J.; LU, J.L.; WANG, F.S. Polyaniline for corrosion prevention of mild steel coupled with copper. *Electrochimistry Acta*, 52: 5392–5399, 2007.

CHEN, Y.; KANG, E. T.; NEOH, K. G.; TAN, K. L. Covalent immobilization of invertase onto the surface-modified polyaniline from graft copolymerization with acrylic acid. *European Polymer Journal*, 36: 2095-2103, 2000.

COELHO, R. A. L.; SANTOS, G. M. P.; AZEVEDO, P. H. S.; JAQUES, G. A.; AZEVEDO, W. M.; CARVALHO JR., L. B. *Journal Biomedical Material Research*, 56: 257, 2001.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Unicamp, p.456, 2006.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V.; *Química Nova*, 27: 623, 2004.

DEBARNOT, D.; ME'RIAN, T.; PONCIN-EPAILLARD, F. Film chemistry control and growth kinetics of pulsed plasma-Polymerized Aniline. *Plasma Chemistry Plasma Process*, 31: 217–231, 2011.

FAHLMAN, M.; CRISPIN, X.; GUAN, H.; LI, S.; SMALLFIELD, J.; WEI, Y.; EPSTEIN, A.J. Polyaniline-metal interfaces: implications on corrosion protection of steel and aluminum alloys. *Polymer Preprints*, 41(2): 1753-1754, 2000.

FARRUGIA, A.; EVERS, T.; FALCOU, P. F.; BURNOUF, T.; AMORIM, L.; THOMAS, S. Plasma fractionation issues. *Biologicals Journal*, 37: 88-93, 2009.

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

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M.; Collins, C. H. Properties of horseradish peroxidase immobilized onto polyaniline. *Process Biochemistry*, 39: 957-962, 2004.

FERREIRA, S.R. A influência da heparina em baixa concentração sobre a miotoxicidade do veneno de *Bothrops jararacussu* e bothropstoxina-I. 64 f. *Dissertação* (Mestrado em Farmacologia), Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

FERREIRA, D.C.; Caracterização espectroscópica dos produtos da polimerização de polianilina – correlação entre estrutura química e morfologia. *Dissertação* (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2010.

FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; de CASTRO, H. F.; *Journal Brazilian Chemistry Soc.*, 18: 1360, 2007.

FURLANETTO, M. L. Estudo de utilização de heparinas para profilaxia de tromboembolia venosa em procedimentos cirúrgicos realizados no Hospital das Clínicas de Porto Alegre. 103 f. *Dissertação* (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

GAMBOA, A. G. Utilização do inibidor de papaína extraído de sementes de *Adenanthera pavonina* L. na purificação de proteases cisteínicas. 61f. *Dissertação* (Mestrado em Biologia), Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2010.

GHOSH, S.; CHAGANTI, S. R.; PRAKASHAM, R.S. Polyaniline nanofiber as a novel immobilization matrix for the anti-leukemia enzyme l-asparaginase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74: 132– 137, 2012.

GÓMEZ, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; YAGCI, Y. Immunization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. *Reactive & Functional Polymers*, 57: 57-65, 2003.

GOSPODINOVA, N.; TERLEMEZYAN, L. Conducting polymers prepared by oxidative polymerization: polyaniline. *Progress in Polymer Science*, 23: 1443-84, 1998.

GRIFFIN, J.; FERNANDEZ, J. A.; MOSNIER, L. O.; LIU, D.; CHENG, T.; GUO, H.; ZLOKOVIC, B. V. The promise of protein C. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 36: 211-216, 2006.

GUISAN, J. M. *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana Press: Totowa, cap. 1, 2006.

HAKANSSON, E.; AMIET, A.; KAYNAK, A. Electromagnetic shielding properties of polypyrrole/ polyester composites in the 1-18GHz frequency range. *Synthetic Metals*, 156: 917–925, 2006.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E.; *Chemical Society Reviews*, 38: 453, 2009.

HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; SMITH, P.K. *The matrix. In: Immobilized Affinity Ligand Techniques*. New York: Academic Press, cap. 1, 1-6, 1992.

HIGUCHI, M.; IKEDA, I.; HIRAO, T. A novel synthetic metal catalytic system. *Journal Organic Chemistry*, 62(4): 1072-1078, 1997.

HUNTINGTON, J. A.; READ, R. J.; CARREL, R. W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 407: 923-926, 2000.

IRVING, J.A.; STEENBAKKERS, P.J.M.; LESK, A.M.; OP DEN CAMP, H.J.M.; PIKE, R.N.; WHISSTOCK, J.C. Serpins in Prokaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 1881-1890, 2002.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P.; *Critical Reviews in Biotechnology*, 28: 253, 2008.

KONG, Y.; ZHANG, G.; LUO, J.; LIU, Y.; Li, X.; Ma, G.; Zhao, Y.; Yuan, S.; Su, Z. Facile purification and characterization of recombinant human antithrombin III from transgenic goat milk. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86(10): 1303-1309, 2011.

LASCA, J.; WLODARCZYK, J.; ZABORSKA, W. Polyaniline as a support for urease immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6: 549 – 553, 2006.

LAWRENCE, D. A.; OLSON, S. T.; MUHAMMAD, S. Partitioning of serpin-proteinase reactions between stable inhibition and substrate cleavage is regulated by the rate of serpin

reactive center loop insertion into β -sheet A. *Journal Biological Chemistry*, 275: 5839-5844, 2000.

LAWSON, J. G.; BUTENAS, S.; RIBARICK, N. MANN, K. G. Complex-dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, 268(2): 767-770, 1993.

LEE, G.; KIM, J.; LEE, J-H. Development of magnetically separable polyaniline nanofibers for enzyme immobilization and recovery. *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 466-472, 2008.

LEITE, V.; SILVA, V. L.; AZEVEDO, W. M.; MELO, E. H. M.; LIMA FILHO, J. L. Increasing glucose determination range flow injection analysis (FIA) using glucose oxidase immobilized on polyaniline. *Biotechnol Tech*, 87: 133–136, 1994.

LEMMER, J. H.; DESPOTIS, G. J. Antithrombin III concentrate to treat heparin resistance in patients undergoing cardiac surgery. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 123: 213–217, 2002.

LI, W.; JOHNSON, D. J. D.; ESMON, C. T.; HUNTINGTON, J. A. Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nature Structural Biology*, 11: 857-862, 2004.

LINDAHL, U.; KJELLEN, L. Heparin or heparan sulfate. What the difference? *Thrombosis and Haemostasis*, 66: 44-48, Stuttgart, 1991.

LINHARDT, R. J.; XIE, J.; MUEUGESAN, S. Immobilization of heparin: approaches and applications. *Currents Topics in Medicinal Chemistry*, 8(2): 80-100, 2008.

LOPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *Journal of Biotechnology*, 116(1): 1-10, 2005.

MA, K.-W.; MA, L.; CAI, S.-X.; WANG, X.; LIU, B.; XU, Z.-L.; DAI, X.-Z.; YANG, J.-Y.; JING, A.-H.; LEI, W.-J. Preparation of heparin-immobilized PVA and its adsorption for low-density lipoprotein from hyperlipemia plasma. *Journal Materials Science: Materials in Medicine*, 19: 3255–3261, 2008.

MACLEAN, J. The discovery of heparin. *Circulation*, 19: 75-78, 1959.

MACDIARMID, A.G.; CHIANG, J.-C. Polyaniline: protonic acid doping of the emeraldine form to the metallic regime. *Synthetic Metals*, 13: 193-205, 1986.

MAJERUS, P. M.; BROZE JR., G. J.; MILITICH, J. P.; TOLLESFSEN, D. M. Drogas anticoagulantes trombolíticas e antiplaquetárias. In: GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S., TAYLOR, D. *Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 874-886, 1991.

MAMMEN, E. F. Recombinant fator VIII and hemophilia A: efficacy, safety, and inhibitor development. *Seminars Thrombosis Hemostasis*, 28: 239-240, 2002.

MANNUCCI, P. M. Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. *Journal Thrombosis Haemostasis*, 1: 1349-55, 2003.

MARTIN, C. R. Template synthesis of electronically conductive polymer nanostructures. *Accounts of Chemical Research*, 28(2): 61-68, 1995.

MARTINICHEN, J. C. Propriedades anticoagulantes e antitrombóticas de polissacarídeos quimicamente sulfatados de liquens. 187 f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE-FERNANDEZ, R.; *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1451, 2007.

MAZIARZ, E. P.; LORENZ, S. A.; WHITE, T. P.; WOOD, T. D. Polyaniline: a conductive polymer coating for durable nanospray emitters. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11: 659–663, 2000.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. de; CASTRO, H. F. de; GIORDANO, R. de L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, 34(5): 831-840, 2011.

MENEZES, W. G. Síntese, caracterização e propriedades de materiais híbridos formados entre polianilina e óxido vanádio obtidos pelo processo Sol-Gel. 120 f. *Dissertação* (Mestrado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MIDDELDORP, S. Heparin: from animal organ extract to designer drug. *Thrombosis Research*, 122: 753-762, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. **Perfil das Coagulopatias Hereditárias no Brasil 2007** – Série G. Estatística e Informação em Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/perfil_coagulopatias_hereditarias_brasil_2007.pdf.

MOLL, Stephan; HILL, Chapel. Antithrombin Deficiency: An In-Depth Guide for Patients and Health Care Providers. *National Alliance for Thrombosis and Thrombophilia*, 1-16, 2009.

MORAIS, K. B. Purificação e caracterização da antitrombina do plasma da serpente *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) (Ophidia: Viperidae, Crotalinae). 91 f. *Dissertação* (Mestrado em Biociências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MORI, F.; NARDINI, I.; ROSSI, P.; NARDINI, C.; FARINA, C. Progress in large-scale purification of fator VII/von Willebrand fator concentrates using ion- exchange chromatography. *Vox Sanguinis*, 95: 298-307, 2008.

MUELLER, R. L. First-generation agents: aspirin, heparin and coumarins. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 17(1): 23-53, 2004.

NADRUZ JR, W.; MARQUES, E. T. A.; AZEVEDO, W. M.; LIMA FILHO, J. L.; CARVALHO JR, L. B.. Immobilization of xanthine oxidase on a polyaniline silicone support. *Brazilian Journal Medical Biology Research*, 29: 347–350, 1996.

NERI, D. F. M.; BALCÃO, V. M.; DOURADO, F. O. Q.; OLIVEIRA, J. M. B.; CARVALHO JR., L. B.; TEIXEIRA, J. A. Galactooligosaccharides production by β -galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane–polyaniline particles. *Reactive & Functional Polymers*, 69: 246–251, 2009.

NERI, D. F. M.; BALCÃO, V. M.; DOURADO, F. O. Q.; OLIVEIRA, J. M. B.; CARVALHO JR., 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.

NERI, D. F. M. Immobilization of b-galactosidase onto different water insoluble matrices. 189f. Tese. Universidade do Minho, 2008.

NIZIOL, J.; SNIECHOWSKI, M.; PODRAZA-GUBA, A.; PIELICHOWSKI, J. Alternative oxidizers in polyaniline synthesis. *Polymer Bulletin.*, 66: 761–770, 2011.

NORRIS, L.A. Blood coagulation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 17(3): 369-383, 2003.

OLIVEIRA, G. B.; LIMA-FILHO, J. L.; CHAVES, M. E. C.; AZEVEDO, W. M.; CARVALHO JR., L. B. Enzyme immobilization on anodic aluminum oxide/ polyethyleneimine or polyaniline composites. *Reactive & Functional Polymers*, 68: 27–32, 2008.

OFOSU, F. A.; FREEDMAN, J.; SEMPLE, J. W. Plasma-derives biological medicines used to promote haemostasis. *Thrombosis and haemostasis*, 99: 851-862, 2008.

OLSON, S. T.; CHUANG, Y. J. Heparin activates antithrombin anticoagulant function by generating new interaction sites (exosites) for blood clotting proteinases. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 12: 331-338, 2002.

PARENTE, A. H.; MARQUES JR, E. T. A.; AZEVEDO, W. M.; DINIZ, F. B.; MELO, E. H. M.; LIMA FILHO, J. L. Glucose biosensor using glucose oxidase immobilized in polyaniline. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 37: 267–273, 1992.

PATEL, S.; BERRY, L. R.; CHAN, A. K. C. Covalent antithrombin-heparin complexes. *Thrombosis Research*, 120: 151-160, 2007.

POUGET, J. P.; JOZEFOWICZ, M. E.; EPSTEIN, A. J.; TANG, X.; MACDIARMID, A. G. X-ray structure of polyaniline. *Macromolecules*, 24: 779–789, 1991.

PURCENA, L. L. A.; CARAMORI, S. S.; MITIDIERI, S.; FERNANDES, K. F. The immobilization of trypsin onto polyaniline for protein digestion. *Materials Science and Engineering C*, 29: 1077–1081, 2009.

ROBERTS, R. M.; MATHIALAGAN, N.; DUFFY, J. Y.; SMITH, G. W. Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 5: 385-436, 1995.

ROSENBERG, R. D.; DAMUS, P. S. The Purification and Mechanism of Action of Human Antithrombin-Heparin Cofactor. *Journal of Biological Chemistry*, 248(18), 1973.

SAIGO, M.; ABE, S.; OGAWA, M.; YAMASHITA, T.; BIRO, S.; MINAGOE, S., *et al*, Imbalance of plasminogen activator inhibitor-I/tissue plasminogen activator and tissue factor/tissue factor pathway inhibitor in young Japanese men with myocardial infarction. *Thrombosis Haemostasis*, 86: 1197–1203, 2001.

SERGEYEVA, T. A.; LAVRIK, N. V.; PILETSKY, S. A.; RACHKOV, A. E.; EI'SKAYA, A. V. Polyaniline label-based conductometric sensor for IgG detection. *Sensors and Actuators B*, 34: 283-288, 1996.

SILVA, R. N.; ASQUIERI, E. R.; FERNANDES, K.F. Immobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer. *Process Biochemistry*, 40: 1155–1159, 2005.

SILVERMAN, G. A.; BIRD, P. I.; CARRELL, R. W.; CHURCH, F. C.; COUGHLIN, P. B.; GETTINS, P. G. W.; IRVING, J. A.; LOMAS, D. A.; LUKE, C. J.; MOYER, R. W.; PEMBERTON, P. A.; REMOLD-O'DONNELL, E.; SALVESEN, G. S.; TRAVIS, J.; WHISSTOCK, J. C. The serpins are an expanding Superfamily of structurally Similar but Functionally Diverse Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 33293-33296, 2001.

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.

SOARES, B. M. Política de Hemoderivados no Brasil: Desafios e Perspectivas. 101 f. *Dissertação* (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável), Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

STEIN, P. E.; CARREL, R. W. What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nature Structural Biology*, 2: 96-113, 1995.

STRATIKOS, E.; GETTINS, P. G. W. Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into b -sheet A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 4808-4813, 1999.

TALLMAN, D. E.; SPINKS, G.; DOMINIS, A.; WALLACE, G. G. Electroactive conducting polymers of corrosion control Part 1. General introduction and a review of non-ferrous metal. *Journal of Solid State Electrochrmistry*, 6(2): 73-84, 2002.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (9) 113, 2000.

VIRJI, S.; FOWLER, J. D.; BAKER, C. O.; HUANG, J. X.; KANER, R. B.; WEILLER, B. H. Polyaniline nanofiber composite with metal salts: chemical sensors for hydrogen sulfide. *Small*, 1(16): 624-627, 2005.

WHISSTOCK, J. C.; SKINNER, R.; CARREL, R. W. An atlas of serpin conformations. *Trend in Biochemical Science*, 23: 63-67, 1998.

WONG, T.; RECHT, M. Current options and developments in the treatment of haemophilia. *Drugs*, 71: 305-320, 2011.

YAN, X. B.; HAN, Z. J.; YANG, Y.; TAY, B. K. NO₂ gas sensing with polyaniline nanofibers synthesized by a facile aqueous/organic interfacial polymerization. *Sensors Actuators B*, 123: 107–113, 2007.

ZHANG, D. H.; WANG, Y. Y. Synthesis and applications of one-dimensional nanostructured polyaniline: an overview. *Materials Science Engineers B*, 134(1): 9-19, 2006.

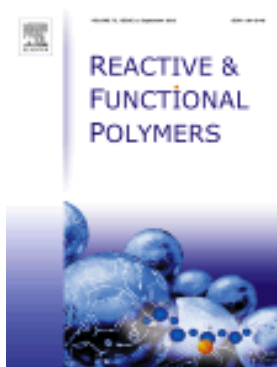
ZHU., L. P.; YU, J.-Z.; XU, Y. Y.; XI, Z.-Y.; ZHU, B.-K. Surface modification of PVDF porous membranes via poly(DOPA) coating and heparin immobilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69: 152–155, 2009.

CAPÍTULO 2:

**5. ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA *REACTIVE & FUNCTIONAL
POLYMER***

Fator de Impacto: 2.479

ISSN 1381-5148



**HEPARIN IMMOBILIZATION ONTO SEPHADEX-POLYANILINE AND
PURIFICATION OF PROTEIN PLASMATIC HUMAN**

Rosemery Batista de Moura^a, Marília Ribeiro Sales Cadena^a, Luiz Bezerra Carvalho Jr^{a,b,*}

^a*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-901, Brazil*

^b*Departamento de Bioquímica Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-901, Brazil*

* Corresponding author: lbcj@hotmail.com (L.B. Carvalho Jr)

E-mail addres: moura.rosemary@gmail.com (R.B. Moura), mariliarsales@gmail.com
(M.R.S. Cadena)

Abstract

Sephadex G-25 coated with polyaniline was treated with glutaraldehyde and then incubated with heparin solution treated with 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide. To determine the variables that influenced in the immobilization of heparin, was performed fractional factorial design (2^{4-1}) where were analyzed four independent variables: glutaraldehyde concentration (1%, 2.5% and 4%), reaction time of glutaraldehyde (0.5, 1.0 and 1.5 hour), heparin concentration (0.5, 1.0 and 1.5 mg mL⁻¹) and reaction time of heparin (2.0, 7.0 and 12 hour). Under optimized conditions these levels, heparin immobilized on Sephadex-polyaniline was used for purification of proteins from human plasma. The variables glutaraldehyde concentration and heparin concentration were statistically significant in the heparin immobilization on Sephadex-PANI and it was obtained higher amounts of immobilized heparin (6.88 µg mg⁻¹ support, 45.9% of heparin offered) in the conditions glutaraldehyde 1.0 % (v/v), 1.5 h time reaction with glutaraldehyde, heparin 1.5 mg mL⁻¹ and 2 h reaction time with heparin. In this conditions obtained amount plasmatic proteins of 25.02 µg mL⁻¹, in 0.5 a 2.0 mol L⁻¹ NaCl eluate. The protein plasmatic presence was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Thus, the support can be used as chromatography column for biomolecules purification of medical, pharmacology and biotechnology interest.

Keywords: Sephadex, polyaniline, immobilization, heparin, plasmatic protein, purification.

1. Introduction

Heparin is a linear sulfated glycosaminoglycan (GAG) synthesized in mastocyte. It can be found around vases, organs and tissue rich in these cells (for example, lung, muscle, liver and blood). It has molecular weight between 5 and 40 kDa, comprised primarily of a unit of disaccharide repeated of glucuronic or iduronic acid 1–4 linked to *D*-glucosamine residues. The presence and frequency of this saccharide units changes according with the tissue source [1, 2]. The heparin immobilized can be used as affinity support to purify proteins, particularly coagulation factors, as antithrombin, protein anti-heparin, of membrane, enzymes and lectins, by differential elution with saline gradient [3]. The choice of carrier material should be considered as factors hydrophobicity / hydrophilicity, surface area, pore diameter and surface reactive groups, synthesis procedure, cost and ease of handling [4]. In the search for better support, polyaniline has been highlighted.

The polyaniline (PANI) term refers to at one polymer class composites of units repeated aniline. PANI is a polymer present one wide field of application, such as battery [5], corrosion inhibitor [6], electromagnetic shielding [7], conductive coatings [8], catalyzer [9] e sensors [10]. Furthermore, polyaniline (PANI) has been used to the immobilization of different proteins and enzymes, such as antigen [11], peroxidase [12], glucoamylase [13] and β -galactosidase [14]. PANI can be considered as an excellent support by having properties as: high capacity of retention, high physic-chemistry stability, simple and fast synthesis and of low cost. The particles of PANI have a large surface area on which the enzymes and other biomolecules can be immobilized. The absence porous and presence of groups reactivities in the polymer surface represent an important morphological characteristics which allows the substrate to bind to the active site of the immobilized enzyme [4].

The human plasma has approximately 60 grams of protein/L, predominantly albumin, then the immunoglobulins and a group of several proteins, including the proteins related with blood coagulation (antithrombin, for example). These 60 grams of proteins, 57 yet have her identified value clinical and the utilization of all 57 grams of protein with therapeutic value is up to challenge at industry [15]. Human antithrombin (AT) belongs to the serine protease inhibitor family and is the most important anticoagulant factor. It has a molecular weight of approximately 58 kDa and contains 432 amino acids, three disulfide bonds, and four carbohydrate side chains. Clinically, AT is used for the treatment of

hereditary or acquired AT deficiency. Changes in the plasma level of AT have been observed in cases of disseminated intravascular coagulation, hypertensive intracerebral hemorrhage and asthma of infants or young children. AT is widely used for the diagnosis, treatment and pathogenesis discussion of these diseases [16].

Thus, the objective this work was to immobilize heparin on Sephadex G-25 covered with polyaniline and activated with glutaraldehyde. This composite (Sephadex–PANIG–Heparin) was employed as a matrix for human protein plasmatic purification, as an alternative of an efficient process, simple and cost menor.

2. Experimental

2.1. Chemical and Reagents

Sodium heparin (500 UI mL^{-1}) was obtained from Parinex-Hipolabor. Sephadex G-25 was punched of the Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Aniline, ammonium persulfate, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC), N-hydroxysuccinimide ester (NHS), glutaraldehyde, acrylamide and N,N-methylene-bisacrylamide were obtained of Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); methylene blue was from Vetec (Rio de Janeiro). Activated partial thromboplastin time (aTTP) was performed utilizing kit from Labtest Diagnostic SA (Minas Gerais); silver nitrate was obtained from Neon (São Paulo, Brazil). Protein standard Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder was obtained from (Fermentas Life Sciences). All other reagents were of analytical grade and were used without further purification unless otherwise specified.

2.2. Support synthesis

Polyaniline (PANI) was synthesized by oxidation of aniline solution (0.5 mol L^{-1}) with ammonium persulphate solution (0.38 mol L^{-1}). Hydrated Sephadex G-25 (4g) was washed with 1 mol L^{-1} HCl and then incubated with 0.5 mol L^{-1} aniline solution in HCl (1 mol L^{-1}), at 4°C , under stirring for 12 hour. For aniline polymerization, the Sephadex–aniline was carried out in an ice bath by dropping 0.38 mol L^{-1} ammonium persulphate, previously cooled in ice bath. The support was kept in distilled water at 4°C until use.

2.3. Heparin immobilization

Before heparin immobilization, Sephadex-PANI was treated with 1 mL (v/v) of glutaraldehyde aqueous solution (1.0, 2.5 and 4%) onto stirring reflux and washed with distilled water. Heparin was immobilized by reacting 100 mg of Sephadex-PANI treated with glutaraldehyde (Sephadex-PANIG) with 1 mL of heparin solution (0.5, 1.0 and 1.5 $mg\ mL^{-1}$) under reflux at room temperature (25 °C) for 2.0, 7.0 and 12 h. Finally, the derivative was washed with 0.5 $mol\ L^{-1}$ NaCl and 10 fractions (1 mL) were collected. Heparin solution was prepared in 20 $mmol\ L^{-1}$ Tris HCl buffer, pH 7.4, and treated with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) according with Oliveira et al. [17].

2.4. Heparin quantification

The amount immobilized heparin was measured by methylene blue binding assay, modified of Oliveira et al. [17]: 1.25 mL of methylene blue solution (0.005% with 0.3% v/v 0.01N HCl and 0.2% p/v NaCl) was added into tests tubes contains 500 μL of samples and added water (7 mL) for final volume of 9.25 mL, stirred in vortex. Absorbance was measured at 664 nm.

2.5. Influence of variables in the heparin immobilization

To determine the variables that influence in the heparin immobilization on Sephadex-PANI it was performed a 2^{4-1} fractional factorial design. There were analyzed four variables: glutaraldehyde concentration (1, 2.5 and 4%), glutaraldehyde reaction time (0.5, 1 and 1.5 h), heparin concentration (0.5, 1 and 1.5 $mg\ mL^{-1}$) and heparin reaction time (2, 7 and 12 h). The result was analyzed by Statistic 8.0 program (Statsoft INC, 2008). All assays were realized in triplicate and the results of immobilization represent the median between them. The results of parameter studied in fractional factorial design were subjected to ANOVA (Tukey test, $p < 0.05$).

2.6. Plasma sample and protein purification

Human blood was collected from healthy adults by venipuncture onto sterile tubes with anticoagulant (sodium citrate) present. The blood was centrifuged at 2500g for 15 min, at 15 °C and the plasma was collected.

For protein purification was construed chromatography column adapted in polystyrene syringe with capacity to 1 mL. Heparinized Sephadex-PANIG (100 mg) was equilibrated with Tris-HCl buffer 20 mmol L⁻¹, pH 7.2 (from now on called buffer) and incubated with human plasma citrated, at 4 °C for 1 h, with 1 mL minute fluxo. After, the plasma was recovered and the column washed with buffer to remove the proteins non-retained. For plasmatic protein elution, saline buffer containing NaCl 0.5 – 2.0 mol L⁻¹ and 60 fractions (1 mL) were collected. The fractions were monitored at $\lambda = 280$ nm, dialyzed in distilled water for 24 h, freeze-dried and stored at -20°C.

2.7. Protein determination

The protein concentration of the fractions/eluates was measured by Follin-phenol method [18] using bovine serum albumin as standard.

2.8. Anticoagulant assay

Assay anticoagulant was measurement following instruction of kit's activated partial thromboplastin time (aPTT) fabricant (APTT Hemostasis – LABTEST). Briefly, samples (200 µL) containing protein were incubated with platelet poor plasma (200 µL) for 10 minutes at 37 °C. Then 100 µL was collected and added actincephrahaloplastin reagent (100 µL) by incubation for 3 minutes; after, CaCl₂ solution (100 µL) was added and the clotting time was measured (minutes).

2.9. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

For analysis of protein pool plasmatic, identification and confirm the antithrombin presence was performed SDS-PAGE according Laemmli [19]. Samples containing proteins

were applied to 10% homogeneous polyacrylamide gel. The gel was performed utilizing with acrylamide 30%, bis-acrylamide 0,8%, SDS 10%, ammonium persulfate 10% and TEMED and Tris-HCl 1.5 mol L⁻¹ pH8.8 buffer (separation gel) or Tris-HCl 1.5 mol L⁻¹ pH 6.8 (concentration gel). The electrophoretic corrida was realized in buffer with Tris, glycine and SDS, onto 120 V, 100 mA and room temperature. The samples were pre-treated with buffer sample (glycerol, SDS 10%, β -mercaptoethanol, bromophenol blue 2% and Tris-HCl 0.5 mol L⁻¹ pH 6.8 buffer). The protein standard utilized was the SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas Life Sciences), compost of a mixture of 10 recombinant and highly purified protein with apparent molecular weights of 10 to 260 kDa. Afterwards, the gels were stained with comassie blue and silver nitrate.

3. Results and discussion

3.1. Heparin immobilization

The best conditions for heparin immobilization were obtained using 2⁴⁻¹ fractional factorial design. Ten assays were realized comprising four factors: glutaraldehyde concentration, glutaraldehyde time reaction, heparin concentration and heparin time reaction, being the heparin immobilized (%) the response evaluated for each factor. The amount immobilized heparin in the assays of the fractional factorial design is shown in the **Table 1**.

The high amount of heparin, in the heparinized supports, were assay 7 (6.88 $\mu\text{g mg support}^{-1}$) and 5 (4.49 $\mu\text{g mg support}^{-1}$), corresponding at 45.9% and 29.95% of the offered heparin, respectively. As well the heparin reaction time not presented significance we opt to reproduce the assay 7, with smaller heparin reaction time. Same works relating a reaction time for heparin immobilization largest 12 h, as well Zhu et al. [20] and Kim et al. [21]. Reaction time of 2 h for heparin immobilization was related for Wissink et al. [22].

MA *et al.* [23] reported a decrease in the heparin immobilization when increased the glutaraldehyde amount on poly(vinyl alcohol) surface, obtaining a heparin density of 25 $\mu\text{g g}^{-1}$ (optimal reaction time of 5 h); and when reaction time was prolonged for long time the amount immobilized heparin decreased probably due at reduction of amount aldehydes free groups. TSAI *et al.* [24] studied the heparin covalent immobilization on glutaraldehyde-fixed porcine tissues and obtained heparin density of 3.0 $\mu\text{g cm}^{-1}$, using

tissue treated with glutaraldehyde 0.625% with reaction time of 1 h and 0.4% heparin (24 h of reaction time).

Table 1. Distribution of the level of the experimental variables (glutaraldehyde concentration, glutaraldehyde reaction time, heparin concentration and heparin reaction time) for heparin immobilization with response of immobilization (%).

Assay	GC (%)	GTR (h)	HC (mg mL ⁻¹)	HTR (h)	Immobilized Heparin (µg mL ⁻¹)	Immobilized Heparin (%)
1	1.0	0.5	0.5	2	0.00	0.00
2	4.0	0.5	0.5	12	0.00	0.00
3	1.0	1.5	0.5	12	11.47	2.29
4	4.0	1.5	0.5	2	0.00	0.00
5	1.0	0.5	1.5	12	449.30	29.95
6	4.0	0.5	1.5	2	0.00	0.00
7	1.0	1.5	1.5	2	688.47	45.90
8	4.0	1.5	1.5	12	143.48	9.56
9	2.5	1.0	1.0	7	39.09	3.91
10	2.5	1.0	1.0	7	56.53	5.65

Note: GC: Glutaraldehyde concentrate; GTR: glutaraldehyde time reaction; HC: Heparin concentrate; HTR: Heparin time reaction.

The factors that demonstrate significant effects were glutaraldehyde concentration (GC) and heparin concentration (HC). According to **Figure 1**, the GC had negative effect and the HC a positive effect that indicates that the inverse relationship between these two variables. When the GC is in lowest level and the HC is in highest level the amount of immobilized heparin tent to be higher, as in the assays 5 and 7 (**Table 1**).

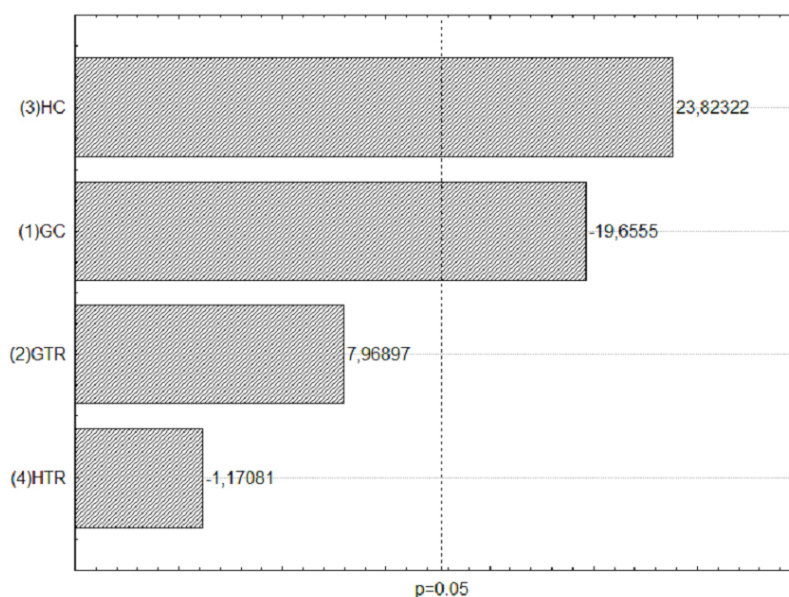


Figure 1. Effect of the variables in the heparin immobilization. (1)GC: glutaraldehyde concentration, (2)GTR: glutaraldehyde time reaction, (3)HC: heparin concentration and (4)HTR: heparin time reaction.

This work obtained bigger heparin density immobilized than CHEN *et al.* [25] and SASCK *et al.* [26]. CHEN *et al.* studied the immobilization on silicone polydimethylsiloxane-poly(ethylene glycol) elastomer, with heparin concentration 10 mg mL^{-1} for 6 h of reaction, and obtained a heparin density of $0.68 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$. SASCK *et al.* heparin immobilized onto gold surfaces and reported a heparin density of $0.23 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$. Jiang *et al.* [27] available heparin immobilization on polyethylene-polydopamine membrane and observed an increase in the membrane surface amount heparin with increasing heparin concentration ($0.25 - 2 \text{ g L}^{-1}$) together with an increasing in reaction time to limit of 10 h, obtaining heparin density of 2.6 to $14.2 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$.

3.2. Plasmatic protein purification

Proteins were purified ($25.02 - 27.06 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) in unique incubation with human plasma, by $0.5 - 2.0 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl elution. The fraction eluted with 1.5 mol L^{-1} NaCl showed aTTP coagulation time result of 6 min and 2.0 mol L^{-1} longer than 15 min (not clotting), this confirm the antithrombin presence.

The fractions obtained in the chromatography were analyzed by SDS-PAGE (10% acrylamide gel) and the results are exhibit in the **Figure 2** and **Figure 3**. The bands observed in gels correspond at protein with molecular weight between 26 at 60 kDa. The

presence of the band referent at 66 kDa corresponding to the albumin [28, 29] and the band at 58 kDa indicates antithrombin [16]. It was reported that AT has various sites of glycosylation (Asn96, Asn135, Asn155 and Asn192) [30, 31] and that there were three heparin-binding sites (Arg47, Lys125 and Arg129) in AT [32]. Thus, can occur variation of binding site or multiple binding sites of AT with heparin, resulting in the different binding capacity of AT and different desorption behaviors during the elution process.

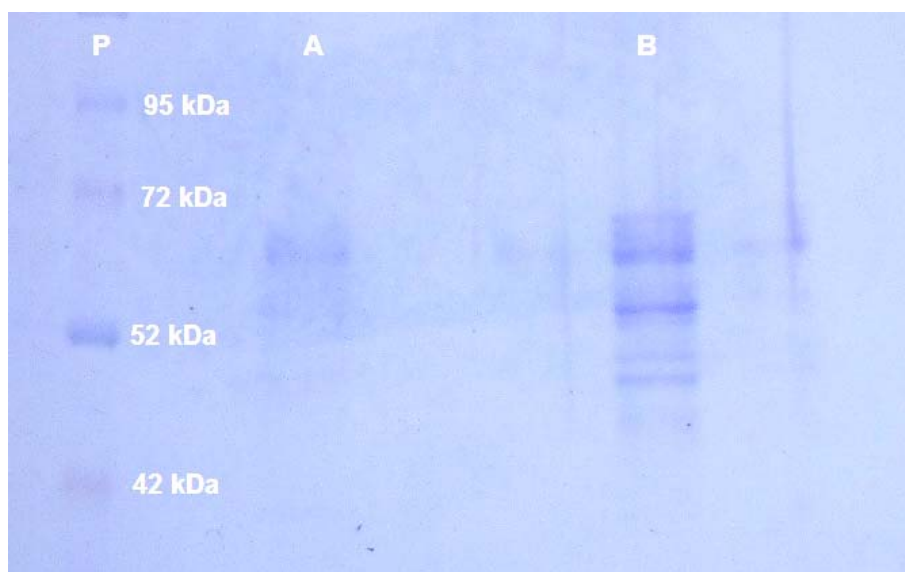


Figure 2. Electrophoretic profile obtained of the human plasma subject at affinity chromatography by SDS-PAGE (10% acrylamide gel) stained with Coomassie Blue. **P**, Standard; **A**, 0.5 mol L⁻¹ NaCl eluate; **B**, 1.5 mol L⁻¹ NaCl eluate.

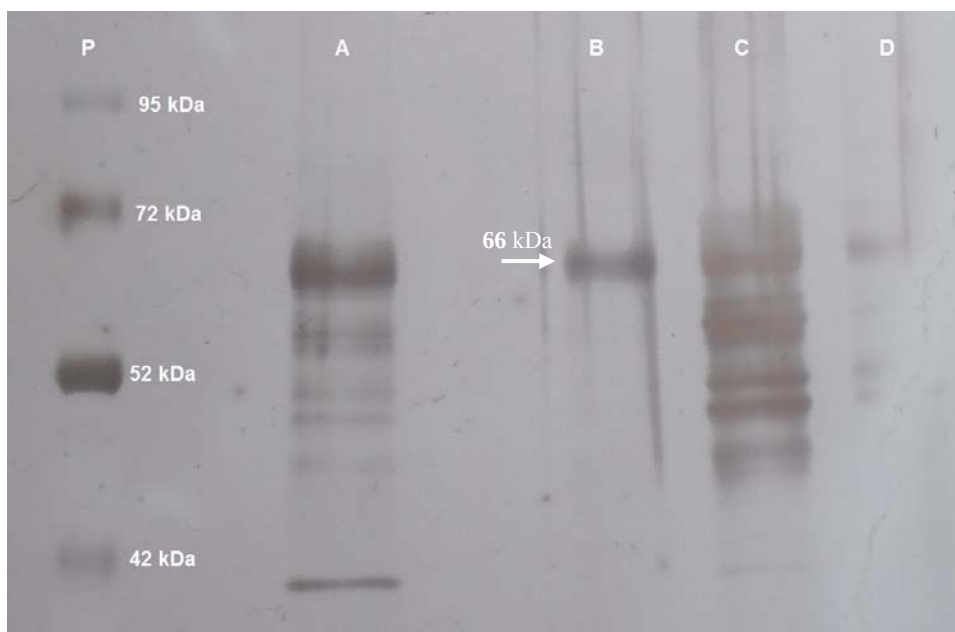


Figure 3. Electrophoretic profile obtained of the human plasma subject at affinity chromatography by SDS-PAGE (10% acrylamide gel) stained with silver nitrate. **P**, Standard; **A**, 0.5 mol L⁻¹ NaCl eluate; **B**, 1.0 mol L⁻¹ NaCl eluate; **C**, 1.5 mol L⁻¹ NaCl eluate; and **D**, 2.0 mol L⁻¹ NaCl eluate.

4. Conclusion

Sephadex-PANI can be used as support for heparin immobilization. The variables that influence the heparin immobilization are glutaraldehyde and heparin concentration. It was obtained the highest level of immobilized heparin (6.88 $\mu\text{g mg}^{-1}$) in assay containing 1.0 % of glutaraldehyde (v v⁻¹), glutaraldehyde reaction 1.5 h, heparin concentration 1.5 mg mL⁻¹ and reaction time of 2 h. the heparin immobilized on Sephadex-PANI was effective when utilized for purification of plasma proteins, as test the antithrombin. The presence of this protein was confirmed by SDS-PAGE (58 kDa). The vantage principal this process is the period short to purification. Thus, the support can be used as chromatography column for biomolecules purification of medical, pharmacology and biotechnology interest.

Acknowledgements

The Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) and the CNPq for financial support. Roberto Afonso da Silva, Pabyton Gonçalves Cadena and Otaviano Tavares da Costa. Microscopy Sector of LIKA.

References

- [1] I. Capila, R.J. Linhardt. Heparin – Protein Interactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 41, 390-412, 2002.
- [2] T.R. Rudd, M.A. Skidmore, S.E. Guimond, C. Cosentino, G. Torri, et al. Glycosaminoglycan origin and structure revealed by multivariate analysis of NMR and CD spectra. *Glycobiology*, 19 (2009) 52–67.
- [3] G.T. Hermanson, A. K. Mallia, P.K. Smith. *The matrix. In: Immobilized Affinity Ligand Techniques*. New York: Academic Press, cap. 1, 1-6, 1992.
- [4] S.S. Caramori, F.N. de Faria, M.P. Viana, K.F. Fernandes, L.B. Carvalho Jr. Trypsin immobilization on discs of polyvinyl alcohol glutaraldehyde/polyaniline composite. *Materials Science and Engineering C* 31 (2011) 252–257.
- [5] C.R. Martin. Template synthesis of electronically conductive polymer nanostructures. *Accounts of Chemical Research*, 28:2 (1995) 61-68.
- [6] M. Fahlman, X. Crispin, H. Guan, S. Li, J. Smallfield, Y. Wei, A.J. Epstein. Polyaniline-metal interfaces: implications on corrosion protection of steel and aluminum alloys. *Polymer Preprints*, 41:2 (2000) 1753-1754.
- [7] E. Hakansson, A. Amiet, A. Kaynak. Electromagnetic shielding properties of polypyrrole/ polyester composites in the 1-18GHz frequency range. *Synthetic Metals*, 156 (2006) 917–925.
- [8] E.P. Maziarz, S.A. Lorenz, T.P. White, T.D. Wood. Polyaniline: a conductive polymer coating for durable nanospray emitters. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11 (2000) 659–663.
- [9] M. Higuchi, I. Ikeda, T. Hirao. A novel synthetic metal catalytic system. *Journal of Organic Chemistry* 62:4 (1997) 1072-1078.

- [10] X.B. Yan, Z.J. Han, Y. Yang, B.K. Tay. NO₂ gas sensing with polyaniline nanofibers synthesized by a facile aqueous/organic interfacial polymerization. *Sensors Actuators B* 123 (2007) 107–113.
- [11] R.A.L. Coelho, G.M.P. Santos, P.H.S. Azevedo, G.A. Jaques, W.M. Azevedo, L.B. Carvalho Jr. *Journal of Biomedical Materials Research* 56 (2001) 257.
- [12] G.B. Oliveira, J.L. Lima-Filho, M.E.C. Chaves, W.M. Azevedo, L.B. Carvalho Jr. Enzyme immobilization on anodic aluminum oxide/ polyethyleneimine or polyaniline composites. *Reactive & Functional Polymers* 68 (2008) 27–32.
- [13] R.N. Silva, E.R. Asquieri, F. Fernandes, Immobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer. *Process Biochemistry* 40 (2005) 1155–1159.
- [14] D.F.M. Neri, V.M. Balcão, F.O.Q. Dourado, J.M.B Oliveira, L.B. Carvalho Jr., J.A. Teixeira. Immobilized β -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: Support characterization and galactooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 70 (2011) 74–80.
- [15] B.M. Soares. Política de Hemoderivados no Brasil: Desafios e Perspectivas. 101 f. *Dissertation* (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável), Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília, Brasília, 2002.
- [16] Y. Kong, G. Zhang, J. Luo, Y. Liu, X. Li, G. Ma, Y. Zhao, S. Yuan, Z. Su. Facile purification and characterization of recombinant human antithrombin III from transgenic goat milk. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 86:10 (2011), 1303-1309.
- [17] G. B. oliveira, L.B. carvalho Jr, M.P.C. Silva. Properties carbodiimide trated heparina. *Biomaterials* 24 (2003) 4777-4783.
- [18] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* 193:1 (1951), 265-275.

- [19] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [20] L.P. Zhu, J.-Z. Yu, Y.Y. Xu, Z.-Y. Xi, B.-K. Zhu. Surface modification of PVDF porous membranes via poly(DOPA) coating and heparin immobilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69 (2009) 152–155.
- [21] S.E. Kim, S.-H. Song, Y.P. Yun, B.-J. Choi, I.K. Kwon, M.S. Bae, H.-J. Moon, Y.-D. Kwon. The effect of immobilization of heparin and bone morphogenic protein-2 (BMP-2) to titanium surfaces on inflammation and osteoblast function. *Biomaterials* xxx (2010) 1-8.
- [22] M.J.B. Wissink, R. Beernink, J.S. Pieper, A.A. Poot, G.H.M. Engbers, T. Beugeling, W.G. van Aken, J. Feijen. Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation. *Biomaterials* 22 (2001) 151-163.
- [23] K.-W. Ma, L. Ma, S.-X. Cai, X. Wang, B. Liu, Z.-L. Xu, X.-Z. Dai, J.-Y. Yang, A.-H. Jing, W.-J. Lei. Preparation of heparin-immobilized PVA and its adsorption for low-density lipoprotein from hyperlipemia plasma. *Journal Materials Science: Materials in Medicine* 19 (2008) 3255–3261.
- [24] C.C. Tsai, Y. Chang, H.-W. Sung, J.-C. Hsu, C.-N. Chen. Effects of heparin immobilization on the surface characteristics of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin): an in vitro study. *Biomaterials* 22 (2001) 523-533.
- [25] H. Chen, Y. Chen, H. Sheardown, M.A. Brook. Immobilization of heparin on a silicone surface through a heterobifunctional PEG spacer. *Biomaterials* 26 (2005) 7418–7424.
- [26] K.N. Sasck, et al. Surface modification with an antithrombin-heparin complex for anticoagulation: studies on a model surface with gold as substrate. *Acta Biomaterialia* 6 (2011) 2911-2919.

- [27] J.-H. Jiang, L.-P. Zhu, X.-L. Li, Y.-Y. Xu, B.-K. Zhu. Surface modification of PE porous membranes based on the strong adhesion of polydopamine and covalent immobilization of heparina. *Journal of Membrane Science* 364 (2010) 194–202.
- [28] SILVA, M. A. O. Avaliação e caracterização de sistemas baseados em ponto nuvem visando à remoção de albumina do plasma sanguíneo. 138 f. *Dissertação* (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2008.
- [29] STEWART, A. J.; BLINDAUER, C. A.; BEREZENKO, S.; SLEEP, D.; SADLER, P. J. Interdomain zinc site on human albumin. *Proc. Natl. Academy Science U.S.A.*, 100 (2003) 3701-3706.
- [30] S.T. OLSON, Y.J. CHUANG. Heparin activates antithrombin anticoagulant function by generating new interaction sites (exosites) for blood clotting proteinases. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 12 (2002) 331-338.
- [31] L. Franzen, S. Svensson, O. Larm, Structural studies on the carbohydrate portion of human antithrombin III. *Journal of Biological Chemistry* 255 (1980) 5090–5093.
- [32] E. Ersdal-Badju, A. Lu, Y. Zuo, V. Picard, S. Bock. Identification of the antithrombin III heparin binding site. *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997)19393–19400.

6. CONCLUSÃO

A heparina comercial pode ser eficientemente imobilizada em Sephadex-PANI, apresentando como melhores condições para imobilização: tempo de reação com de 1,5 h de reação com glutaraldeído a 1% (v v⁻¹) e tempo de reação de 2 h com heparina 1,5 mg mL⁻¹. A concentração de glutaraldeído influenciou negativamente a quantidade de heparina imobilizada (%), ou seja, quanto menor a concentração de glutaraldeído maior a quantidade de heparina imobilizada no suporte. A concentração de heparina influenciou positivamente a quantidade de heparina imobilizada (%), e neste caso quanto maior a concentração de heparina, maior a quantidade de heparina imobilizada no suporte.

O uso do planejamento fatorial permitiu otimizar as condições de imobilização de heparina em Sephadex-PANI e assim obter o melhor rendimento para o derivado imobilizado. A heparina imobilizada pode ser utilizada para purificação de proteínas do plasma (por exemplo, a antitrombina). A vantagem do uso desse material consiste no baixo custo do processo, na especificidade da ligação de certas proteínas do plasma com a heparina e a possibilidade de usar o processo em larga escala.

7. ANEXO – NORMAS DA REVISTA *REACTIVE & FUNCTIONAL POLIMERS*

Aim and scope

The Journal publishes papers dealing with new ideas and developments in the science and technology of polymers with functional groups that provide specific chemical reactivity or physico-chemical behaviour. The scope covers functional polymers, acting as reagents and catalysts, with specific emphasis on solid- or gel-state chemistry; carriers of protecting groups or biofunctional groups; templating agents and functional matrices; ion-exchangers, selective sorbents, chelating agents; supports for enzymes and cells; electro-active and sensing materials. It also includes advanced polymer synthesis techniques. The study of polymer networks and rheology and processing of functional polymers. The Journal addresses two main audiences: those engaged in the synthesis of new materials and the development of novel techniques, and those concerned with technology and practical applications in the laboratory or plant. The Journal encourages, and serves as a forum for, the dialogue between these two groups.

Language and language services

Manuscripts should be written in English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these) in a clear and concise manner and follow the style of a current issue of *Reactive and Functional Polymers*. Authors whose native language is not English should have the spelling, grammar, and style checked by someone fully proficient in the English language. Manuscripts which are not written in fluent English will be rejected automatically without refereeing.

Authors in Japan kindly note that, upon request, Elsevier Japan will provide a list of people who can check and improve the English of an article before submission. Contact our Tokyo office: Elsevier Japan K.K., 1-9-15 Higashi Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan Tel.: +81-3-5561-5032; fax: +81-3-5561-5045; e-mail: jp.info@elsevier.com

Authors who require further information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information. Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services

offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via ➡ <http://ees.elsevier.com/react>.

Preparation

Article structure

Format

Manuscripts must be written with 1 1/2 line spacing, using a 12 pt Arial or Times font. All pages must be numbered consecutively. Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Title page: essential information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where

the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract, of not more than 200 words, is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide 5 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Introduction

Statement of the problem. Outline of the paper and important findings. Provide an appropriate literature review and a statement of novelty of the approach relative to the state of the art, or a clear justification of the study.

Experimental

Please divide into the following sections: *Materials* and *Physico-chemical characterization* to provide, respectively, the details of all the materials employed and of all instrumental techniques used. Sections for the *Synthesis*, *Physical characterization*, *Physico-chemical characterization* or *Biological experiments* will contain experimental details. If you feel that equations need to be provided in support of the experimental description (e.g. to show how a yield, a swelling degree, a diffusion coefficient were calculated, to illustrate a mathematical model, etc.), add also a *Theory* section.

List of Symbols: Please include a list in the experimental section if more than about 10 symbols are used. Define all symbols and include units.

Results and discussion

Report the results in a clear and concise fashion, and explore their significance. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Please move any detailed description of equations or methods to the experimental section (*Theory*).

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

References

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result"

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which

they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2000) 51-59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 1999, pp. 281-304.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions in a separate list after the references section, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Schemes and figures

All the display elements should be placed in a separate section after the figure captions. Graphs and pictures should be numbered as figures. Schemes should contain reaction or process graphical descriptions and must be numbered separately from the other display elements. The place of schemes and figures should be clearly indicated in the text and their captions should be provided after the references section (see above). Generally graphs should be in black and white, otherwise you will incur in charges for graphs in colour. Please avoid the use of splines in graphs, which suggest the existence of a mathematical model for the data. Graphs should contain data points (with error bars) possibly connected by straight lines (as guide for eyes) or columns. The background of the graphs should be white, no grid used. Finally, the legend should not be embedded in a box. The font for the legend, axis labels and any other additional text should be Arial.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place them in a separate section at the end of the manuscript. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.