



## Desarrollo y caracterización de una matriz de adsorción eficiente basada en micropartículas de alginato para la purificación de proteínas

M.E. Brassesco<sup>1</sup>, P. Fuciños<sup>2</sup>, L. Pastrana<sup>2</sup>, G. Picó<sup>1</sup>

- (1) Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos. CONICET. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 570 (S2002RLK) Rosario. Argentina.
- (2) Departamento de Ciencias de la Vida, Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL), Avenida Mestre José Veiga 4715-330, Braga, Portugal  
[\\*brassesco@conicet-iprobyq.gob.ar](mailto:*brassesco@conicet-iprobyq.gob.ar)

### Resumen

Las micropartículas de alginato (Alg) se prepararon mediante Spray Drying (secado por pulverización) y se entrecruzaron químicamente con epiclorohidrina. Las micropartículas se caracterizaron por tamaño, morfología de la superficie (SEM), potencial zeta (DLS) y análisis térmico (TGA / DSC). Se encontró que las micropartículas reticuladas con epiclorohidrina tenían tamaños promedios de 648 nm, y un valor de potencial zeta de -84 mV. La capacidad de adsorción de la matriz se estudió utilizando Lisozima y Quimiotripsinógeno como proteínas modelo. Las isoterms de equilibrio fueron descritas por los modelos Langmuir y Hill, respectivamente. El  $Q_{max}$  para la lisozima y el quimiotripsinógeno fueron 1880 y 3034 mg/g de micropartícula de Alg, que representan una mayor capacidad de adsorción que los lechos comerciales. Al final, se ensayó la capacidad de recuperación para ambas proteínas.

### Palabras Claves

Micropartículas de alginato; proteínas; adsorción; isoterms; purificación.

### 1. Introducción

La adsorción es una herramienta importante en la bioseparación de macromoléculas. Sin embargo, las matrices de adsorción comerciales existentes son costosas y tienen una vida útil corta. Como resultado, es deseable diseñar nuevos sistemas rentables con alta capacidad de adsorción. El alginato es un polielectrolito natural que tiene la propiedad única de formar un gel en presencia de cationes divalentes, como el calcio. Además, es un polímero biodegradable y muy rentable. Por lo tanto, se llevó a cabo la producción y caracterización de micropartículas de Alg con la tecnología de Spray Drying y, a continuación, se ensayó su capacidad de adsorción para dos proteínas modelo, la lisozima (LZ) y el quimiotripsinógeno (QTg). Finalmente, se estudió la eficiencia de las micropartículas de alginato entrecruzadas en la recuperación de ambas proteínas modelo a partir de una mezcla de proteína.

### 2. Metodología

Las micropartículas se produjeron usando un Büchi Nano Spray Drying B-90. La solución de alginato de sodio (CR8133) al 0,1% (p/V) se secó por pulverización para formar micropartículas. Para entrecruzar (unir covalentemente las cadenas polisacáridas) las micropartículas se dispersaron 30 mg de micropartículas en 1,2 ml de  $CaCl_2$  en solución de EtOH (0,1 M) y se sonicaron durante 30 minutos a 45°C. La dispersión se entrecruzó luego con Epiclorohidrina (Epi) (72  $\mu$ L) en medio básico (150  $\mu$ L de NaOH 5 M) y se incubó durante toda la noche a 30°C. Se adicionó ácido acético (glacial) hasta que el pH del sistema fue 7,0, y así, finalizar la reacción de entrecruzamiento. Se realizaron las isoterms de adsorción en lecho agitado de cada proteína modelo, utilizando condiciones de trabajo determinadas previamente. A partir de una mezcla de proteínas, 90% impurezas y 10% proteína de interés, se llevó a cabo un ciclo de adsorción-lavado-desorción, realizándose, finalmente, una electroforesis SDS-PAGE.

### 3. Resultados y Discusión

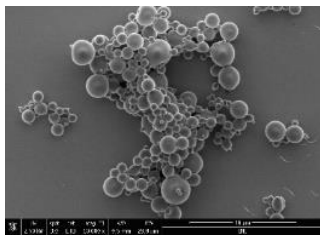
La morfología de la micropartícula de Alg entrecruzadas se analizaron mediante SEM (Imagen 1). El diámetro medio (D) y potencial Zeta ( $Z_p$ ) de las micropartículas de Alg se muestran en la Tabla 1. Las curvas termogravimétricas (TGA) para muestras de micropartículas de Alg sin entrecruzar y entrecruzadas mostraron tres eventos térmicos. El primer evento para ambas muestras se describe como pérdida de humedad donde las muestras presentaron temperaturas de evaporación que con un pico en

107°C. A partir de este evento, se obtuvo la capacidad de retención de agua de la muestra entrecruzada: 0,63g/g. Los otros eventos se deben a la descomposición del polisacárido que ocurre principalmente en los rangos de 186-220°C y 248-289°C. La capacidad de adsorción de la matriz se estudió utilizando proteínas modelos: Qtg y LZ. La Fig 1 muestran los ajustes correspondientes a cada isoterma realizada, a partir de los cuales se determinaron los parámetros isotérmicos (no mostrado). Los  $Q_{max}$  de cada una son 3034 mg g de matriz y 1880 mg/g de matriz, respectivamente. La Fig. 2 ilustra las bandas obtenidas en cada paso de ciclo de adsorción-lavado-desorción, mostrándose una excelente recuperación de la LZ y una recuperación parcial del QTg.

#### 4. Conclusiones

Las micropartículas de Alg obtenidas tienen forma esférica, con una superficie lisa y una pequeña rugosidad. Presentan un comportamiento polidisperso probablemente debido a la tecnología de secado por pulverización. El potencial negativo se debe a los grupos  $COO^-$  presentes en el Alg. La elevada retención de agua demostró la alta capacidad hidrófila de la micropartícula entrecruzada y las curvas de TGA demostraron la mayor estabilidad térmica de estas. Finalmente, la mayor capacidad de adsorción y selectividad de la matriz con respecto a los lechos comerciales la hace altamente adecuada para ser aplicada en la recuperación de proteínas.

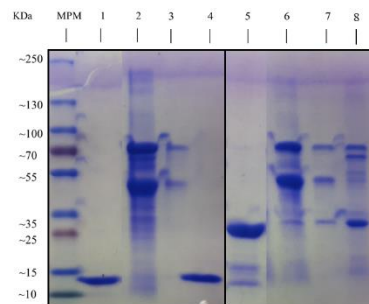
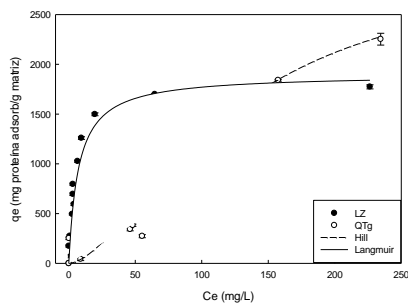
#### Tabla, gráficas e imágenes



**Imagen 1.** Micrografía SEM de las micropartículas de Alg entrecruzadas con Epi.

**Tabla 1.** Diámetros medios y  $Z_p$  de las micropartículas de Alg entrecruzadas.

	D (nm)	$Z_p$ (mV)
<b>Micropartículas Alg</b>	648.3±811.9	-83.94 ± 2.01



**Figura 2.** SDS-PAGE para el sistema de mezcla de proteínas: marcador molecular (MPM); (1) LZ puro 10mg/ml, (2) Adsorción del sistema selectivo para LZ, buffer fosfato 20 mM pH 7,0, (3) lavado del sistema selectivo para LZ, buffer fosfato 20 mM pH 7,0, (4) desorción del sistema selectivo para LZ, buffer fosfato 20 mM pH 7,0 - NaCl 300 mM, (5) Qtg puro 10mg/ml (6) adsorción del sistema selectivo para Qtg, buffer citrato 25 mM, pH 5,0; (7) lavado del sistema selectivo para Qtg, buffer citrato 25 mM, pH 5,0; (8) desorción del sistema selectivo para Qtg, buffer citrato 25 mM, pH 5,0.

**Figura 1.** Isotermas de adsorción de LZ y Qtg sobre micropartículas de Alg entrecruzadas. Medio: Buffer fosfato 20 mM, pH 7,0 y buffer citrato 25 mM, pH 5,0, respectivamente.

#### 5. Bibliografía

- Brassesco, M.E., Woitovich Valetti, Nadia, Picó, Guillermo (2017). Molecular mechanism of lysozyme adsorption onto chemically modified alginate guar gum matrix. *International journal of biological macromolecules*. 96, 111-117.
- Spelzini, D., Farruggia, Beatriz, Picó, Guillermo (2011). Purification of chymotrypsin from pancreas homogenate by adsorption onto non-soluble alginate beads. *Biochem.* 46(3), 801-805.
- Skidmore GL, Hortsman BJ, Chase HA (1990). Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose® FF. *Journal of Chromatography A* 498, 113-128.
- Xiang Li, et. al. (2010) Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*. 147, 304-310.

#### 6. Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por un subsidio de FonCyT, proyecto PICT 2013-271 y PICT 2015-0083 - Argentina Innovator 2020. MEB es becaria de FonCyT.

**EJE TEMÁTICO:** Procesos de recuperación y purificación de macromoléculas.