

PROYECTO FINAL DE BIOTECNOLOGÍA

DESARROLLO DE FILMS ADSORBENTES

BIOESPECÍFICOS PARA APLICACIONES

BIOTECNOLÓGICAS A BASE DE POLÍMEROS

SUSTENTABLES

Greppi Alonso, Tomas Xuan- LU: 1108676

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Wolman, Federico

Baieli, María Fernanda

Instituto Nanobiotec UBA- CONICET

Co-Tutor Interno:

Eisik, Magalí, UADE

Diciembre 16, 2022



UADE

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que me acompañaron durante la realización del proyecto final de biotecnología.

En primer lugar quiero agradecer a Federico Wolman por brindarme la oportunidad de llevar a cabo el trabajo en su laboratorio y permitirme conocer el ambiente de la investigación y a Fernanda Baieli por compartir horas en el laboratorio guiándome. Gracias a ambos por su apoyo, por educarme y por hacerme sentir más seguro de mí mismo.

Quiero agradecer a Magalí Eisik por su predisposición, por compartir sus conocimientos y ayudarme a resolver obstáculos que se presentaron en el camino.

A todos mis compañeros del Instituto Nanobiotec por la buena compañía, brindar su ayuda cada vez que lo necesite y educarme como profesional.

También quiero extender mi agradecimiento a los docentes de la Universidad de la Empresa (UADE) por formarme a lo largo de estos años y a mi familia y amigos que siempre me apoyaron durante esta etapa.

Resumen

La adsorción e inmovilización de proteínas son la base para el desarrollo de dispositivos de diagnóstico, así como de procesos de purificación. La adsorción directa de proteínas *target* a partir de muestras crudas es un objetivo a alcanzar, especialmente para el desarrollo de dispositivos de diagnóstico ya que requieren de procesos de pre-purificación antes de la inmovilización de proteínas antigénicas o anticuerpos, lo cual impacta negativamente en costos y tiempo. Para ello, se desarrollaron *films* de quitosano mediante el método de *casting* y evaporación a modo de recubrimiento sobre materiales plásticos. El quitosano es un polímero compuesto por unidades aleatorias de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina que se obtiene por desacetilación de la quitina. Gracias a que presenta grupos amino e hidroxilo, diferentes ligandos pueden ser inmovilizados sobre su estructura. Los *films* se estudiaron estructuralmente por microscopía electrónica de barrido y sus capacidades adsorptivas mediante estudios de adsorción y desorción de diferentes proteínas modelo, como glicomacropéptido, lisozima y aglutinina. Finalmente, se estudiaron la adsorción directa de proteínas desde muestras crudas como clara de huevo para la lisozima y extracto de germen de trigo para la lectina. Para esto, el seguimiento del proceso de purificación de lisozima fue midiendo su actividad y el seguimiento del proceso de purificación de aglutinina fue mediante cromatografía líquida de alta eficacia.

Las condiciones con mayores capacidades adsorptivas resultaron ser las de menor volumen de solución de quitosano (250 µl) dispensado por pocillo. Además, el agregado de polietilenglicol en la síntesis de los *films* resultó en la formación de la estructura porosa deseada y en un aumento de las capacidades adsorptivas como se demostró en los ensayos con lisozima. Siendo, la condición con mayor capacidad adsorptiva, en los ensayos con proteínas puras, la condición 1% quitosano y 5% polietilenglicol. En función de los resultados, obtenidos en los ensayos con muestras complejas, los *films* de quitosano podrían utilizarse para desarrollo de kits de diagnóstico, gracias a que permitiría la adsorción directa de proteínas de interés a partir de muestras crudas, sin requerir de previas purificaciones. Por otro lado, como surge de los procesos de purificación testeados empleando muestras crudas, restan ajustar las condiciones de lavado y/o elución.

Abstract

The adsorption and immobilization are the base for the development of diagnostic devices, as well as the purification processes. The direct adsorption of target proteins is an objective to be achieved, especially in the development of diagnostic devices because they require pre-purification processes before the immobilization of antigenic proteins or antibodies, which negatively impacts in costs and time. For this, chitosan films were produced by casting methods as a coating on plastic materials. Chitosan is a polymer composed of random units of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine that is obtained by deacetylation of chitin. Chitosan has amino and hydroxyl groups in their structure that can be used to immobilized different ligands. The films were structurally studied by scanning electron microscopy and their adsorptive capacities by adsorption and desorption studies of different model proteins, such as glycomacropeptide, lysozyme and agglutinin. Finally, direct protein adsorption were studied from crude samples such as egg white for lysozyme and wheat germ extract for lectin. For this, the monitoring of the lysozyme purification process was measuring its activity and the agglutinin purification process by high efficiency liquid chromatography.

The conditions with the highest adsorptive capacities were those with the lowest volume of chitosan solution (250 μ l) dispensed per well. The addition of polyethylene glycol in the synthesis of the films resulted in the formation of the desired porous structure and in an increase in the adsorptive capacities as demonstrated in the tests with lysozyme. In the tests with pure proteins, the condition with the highest adsorptive capacity was the condition with 1% chitosan and 5% polyethylene glycol. Based on the results obtained in the tests with complex samples, chitosan films could be used for the development of diagnostic kits, thanks to the fact that they would allow the direct adsorption of proteins of interest from complex samples without requiring prepurification. On the other hand, it remains to adjust the washing and/or elution conditions for purification processes.

Índice

1	Introducción	7
2	Antecedentes	8
3	Objetivos del trabajo	8
3.1	Objetivos generales	8
3.2	Objetivos específicos	9
4	Metodologías	9
4.1	Síntesis de los <i>films</i>	10
4.2	Caracterización estructural de los <i>films</i>	12
4.3	Estudios de adsorción y elución con proteínas puras	12
4.3.1	GMP	13
4.3.2	Lz	13
4.3.3	WGA	14
4.3.3.1	Purificación de WGA. Preparación de <i>stock</i> puro	14
4.4	Estudios de purificación con muestras complejas	15
4.4.1	Purificación de Lz a partir de clara de huevo	15
4.4.1.1	Seguimiento del proceso purificación	15
4.4.2	Purificación de WGA a partir de germen de trigo	16
4.4.2.1	Seguimiento de los procesos de purificación	16
4.5	Análisis estadístico	16
5	Resultados y discusión	17
5.1	Caracterización estructural de los <i>films</i>	17
5.2	Estudios de adsorción y elución con proteínas puras	18
5.2.1	GMP	18
5.2.2	Lz	19
5.2.3	WGA	22
5.3	Estudios de purificación con muestras complejas	26
5.3.1	Purificación de Lz a partir de clara de huevo	26
5.3.2	Purificación de WGA a partir de germen de trigo	27
6	Conclusiones y perspectivas	30
7	Bibliografía	31
8	Anexo	34

Índice de abreviaturas

CS	Quitosano
Cu	Cobre
GlcNAC	N-Acetil-D-Glucosamina
GMP	Glicomacropéptido
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IDA	Ácido Iminodiacético
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones inmovilizados
Lz	Lisozima
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso molecular
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TFA	Ácido Trifluoroacético
WGA	Aglutinina de germen de trigo

1 Introducción

En este trabajo de tesis se estudiaron las condiciones de síntesis para generar *films* o membranas depositados a modo de recubrimiento sobre materiales plásticos, con propiedades adecuadas para la adsorción bio-específica de diferentes proteínas blanco. La adsorción e inmovilización de proteínas son la base para el desarrollo de tecnologías como *kits* y dispositivos de diagnóstico, así como de procesos de purificación. Los dispositivos de diagnóstico requieren de la inmovilización de proteínas antigénicas o un anticuerpo sobre la superficie plástica para dar lugar a eventos de reconocimiento y detección colorimétrica posterior. Uno de los costos asociados a estos procesos es la necesidad de purificar previamente el antígeno a inmovilizar, lo que, si bien mejora la eficiencia del proceso de inmovilización, impacta negativamente en los costos y tiempos. En este sentido, el empleo de materiales adsorbtivos en forma de *films* o recubrimientos con especificidad de unión por la proteína blanco, posibilitarían la adsorción directa a partir de muestras crudas de la proteína de interés sobre la superficie, evitando la necesidad de purificarla previamente y mejorando, además, la eficacia antigénica de la proteína inmovilizada. Este desarrollo también puede encontrar aplicación en procesos de purificación en condiciones de micro-escala, eluyendo la proteína previamente adsorbida en lugar de inmovilizándola. Un ejemplo es el empleo de *films* a modo de recubrimiento sobre placas multiwell, para el estudio de distintas condiciones de adsorción y elución sobre cada pocillo. PreDicator™, comercializada por Cytiva, y OPUS® RoboColumn® Pre-packed Columns, comercializada por Repligen, son ejemplos de tecnologías similares para esta aplicación.

Los *films* pueden fabricarse, entre otros, mediante el método de *casting* y evaporación, que consiste en la dispersión de una solución filmogénica sobre una superficie y la posterior evaporación del solvente hasta dar con una película sólida [1]. El quitosano (CS) es un polisacárido lineal obtenido de la desacetilación parcial o total de la quitina, el segundo polímero en abundancia en el planeta. El CS está compuesto por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidos por enlace glucosídico β 1,4. Es ampliamente utilizado debido a su alta disponibilidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y por poder ser producido sin impactos negativos al medio ambiente. Debido a su solubilidad en medios ácidos [2] e insolubilidad en medios alcalinos, puede ser formateado como *film* mediante la técnica de

casting. Además, dependiendo de las condiciones de evaporación y del agregado o no de porógenos, se pueden obtener *films* porosos con su área superficial magnificada. Los mismos, resultan ser de naturaleza adhesiva frente a materiales plásticos e inmunoquímicamente transparentes, punto crítico a considerar en el caso de las aplicaciones en enzimoensayos [3, 4]. El CS, como material adsorbtivo, adquiere importancia debido a que presenta grupos amino e hidroxilo, los cuales permiten que diferentes tipos de ligandos puedan ser inmovilizados covalentemente sobre su estructura [5].

2 Antecedentes

El CS es ampliamente utilizado en campos como la biomedicina, tratamiento de aguas, la agricultura y la cosmética [6-9]. En trabajos previos, el grupo de investigación sintetizó mini-esferas de CS con diferentes modificaciones químicas para adsorber en forma selectiva diferentes proteínas a partir de muestras crudas [10-16]. Al igual que las mini-esferas, los *films* de CS también pueden sintetizarse con diferentes modificaciones químicas, en búsqueda del mismo objetivo. Como fue mencionado en la introducción, los *films* se pueden sintetizar mediante métodos de *casting*. En estas condiciones el CS tiene la capacidad de quedar adherido al plástico [3, 4]. Por tanto, se espera que estos *films*, luego de ser químicamente modificados tras la incorporación de diferentes ligandos, puedan ser utilizados como materiales adsorbtivos en dispositivos para la inmovilización y/o purificación de proteínas. Cabe destacar que también existen precedentes de la utilización de *films* de CS adheridos a superficies plásticas para aplicaciones en inmunoensayos [17].

3 Objetivos del trabajo

3.1 Objetivos generales

Desarrollar *films* a partir de CS para ser empleadas en el recubrimiento de superficies plásticas, para adsorber diferentes proteínas *target* de interés tecnológico. Se desarrollarán las condiciones para lograr una adecuada estructuración de los recubrimientos a los fines de garantizar elevadas velocidades y capacidades de adsorción. Las superficies recubiertas se funcionalizarán con diferentes ligandos a los fines de posibilitar la adsorción específica de las proteínas *target* sin necesidad de que éstas sean previamente purificadas. Además, se evaluarán los parámetros estructurales y morfológicos de los recubrimientos, así como su performance adsortiva empleando diferentes proteínas modelo.

3.2 Objetivos específicos

- Desarrollar y caracterizar los materiales y condiciones de recubrimiento según la aplicación.
- Inmovilizar diferentes tipos de ligandos sobre los recubrimientos.
- Aplicar los materiales recubiertos a la adsorción de diferentes proteínas puras modelo y caracterizar sus propiedades adsortivas.
- Aplicar los materiales recubiertos a la adsorción de proteínas a partir de fuentes naturales.

4 Metodologías

El quitosano *low molecular weight* (lote # BCCG5629), el ácido sulfanílico, el *Micrococcus lysodeikticus* y la epíclorhidrina (lote #SHBH4775V) fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU). El polietilenglicol (20000 g/mol) fue de Fluka Analytical (Buchs SG, Switzerland). El reactivo *Quick Start Bradford reactive for total protein determination* fue de BioRad (Hercules, CA, USA). Las placas multiwell no tratadas fueron de JetBiofil (Alicante, España). El GMP fue donado por Davisco Food International (Eden Prairie, MN), el estándar comercial de la lectina de aglutinina de germen de trigo fue de Megazyme (Bray Wicklow, Ireland), la lisozima fue de Bio Basic Canada INC (Markham ON, Canada). La columna C8 monolítica Chromolith® Performance RP-8 endcapped, 100-4.6 mm fue de Merck & Millipore (Darmstadt, Germany). El reactivo de Biuret Proti 2 fue de Wiener Lab (Rosario,

Argentina). La resina comercial a base de quitina *Chitin beads* fue de New England BioLabs (Ipswich, Suffolk, UK). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

4.1 Síntesis de los *films*

Los *films* se sintetizaron disolviendo durante 48 horas a 25 °C, soluciones de CS al 1 o 2% p/V en ácido acético 2% V/V, con agregado de polietilenglicol (PEG, PM de 20000 g/mol) en el rango de concentraciones 0 a 5% p/V como porógeno. Las soluciones se dispensaron sobre placas multiwell de 24 pocillos empleando volúmenes de 250, 500 o 1000 µl, con el objeto de generar recubrimientos de distintos espesores para evaluar diferencias en las capacidades adsorptivas. Tras la evaporación del ácido acético a 25 °C durante 48-72 horas, se realizaron 4 lavados de 30 minutos cada uno y otro de 16 horas a 90 rpm con soluciones de NaOH 2M. Posteriormente, los *films* fueron entrecruzados con 1 ml por pocillo de solución de epiclorhidrina 150 mM pH 10,00 a 60 °C durante 4 horas. Por último, se realizaron 4 lavados de 30 minutos a 90 rpm con agua. Las matrices sintetizadas se denominan en función de la Tabla 1.

Tabla 1. Nomenclatura de films sintetizados

Denominación	CS (% p/V)	Polietilenglicol (% p/V)	Volumen dispensado (ml)
AC1P0	1	0	0,25
AC1P1	1	1	0,25
AC1P5	1	5	0,25
AC2P0	2	0	0,25

AC2P1	2	1	0,25
AC2P5	2	5	0,25
BC1P0	1	0	0,5
BC1P1	1	1	0,5
BC1P2	1	2	0,5
BC1P5	1	5	0,5
BC2P0	2	0	0,5
BC2P1	2	1	0,5
BC2P2	2	2	0,5
BC2P5	2	5	0,5
CC1P0	1	0	1,0
CC1P1	1	1	1,0

CC1P2	1	2	1,0
CC1P5	1	5	1,0
CC2P0	2	0	1,0
CC2P1	2	1	1,0
CC2P2	2	2	1,0
CC2P5	2	5	1,0

A partir de dichos *films*, se realizaron modificaciones químicas con el objetivo de funcionalizarlos con ácido iminodiacético (IDA), agente quelante de metales del grupo II, ampliamente usado en protocolos de adsorción/purificación de proteínas por IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*), como lo indica la figura 1. Esto se hizo mediante una secuencia de reacciones en 2 pasos. El primero involucró la reacción de los grupos hidroxilo y amino del CS con un exceso de epíclorhidrina 1,5 M a 25 °C durante 24 horas. Luego de lavados exhaustivos, en una segunda reacción, los *films* se trataron con IDA 0,5 M disuelto en DMSO/H₂O 1:1, pH 10,00, a 25 °C durante 3-4 días. Tras sucesivos lavados, los *films* se incubaron con 1 ml de solución de sulfato de cobre 0,1 M por pocillo durante 1 hora en agitación y se realizaron varios lavados para eliminar el exceso del metal.

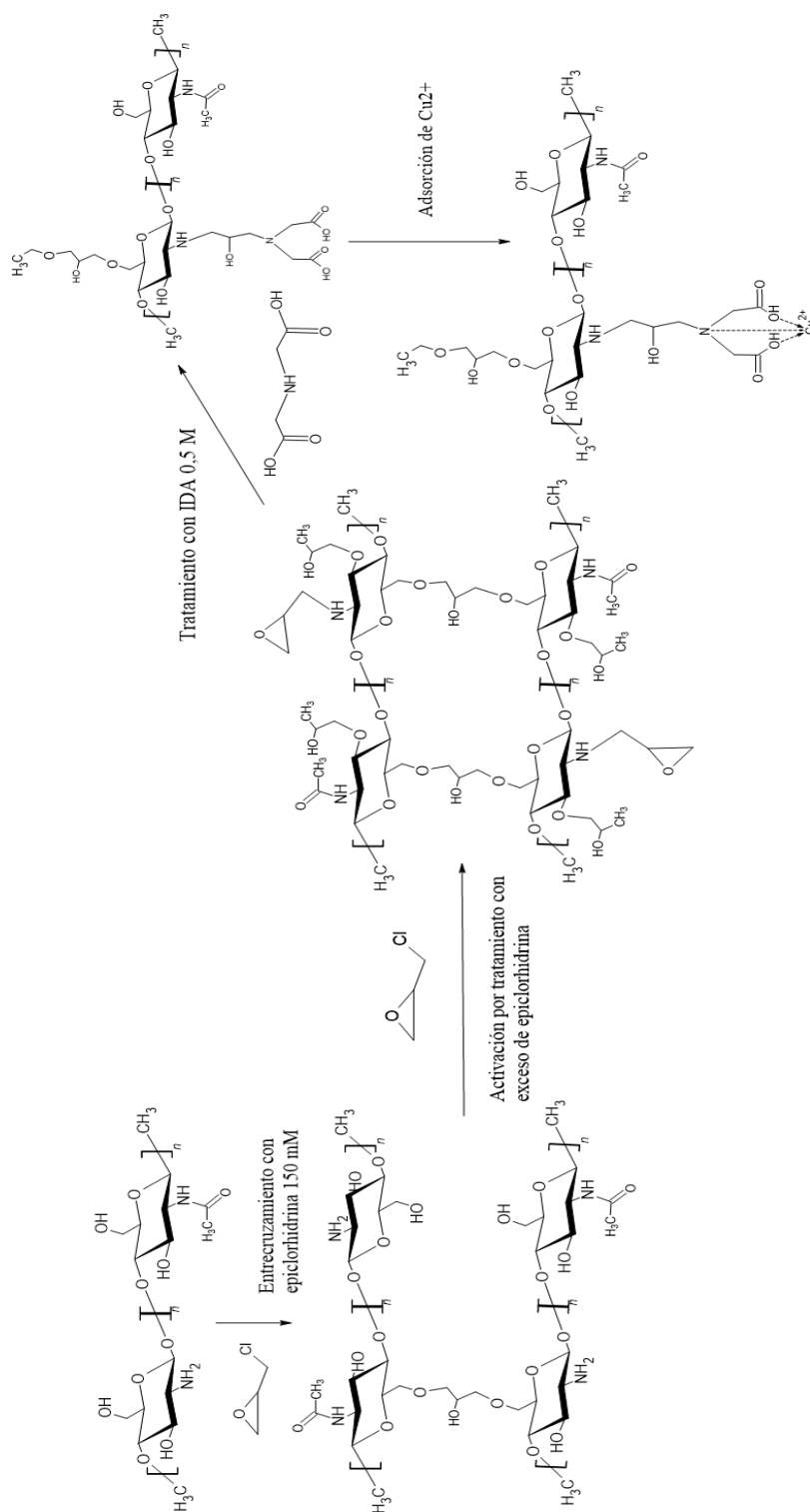


Figura 1. Modificaciones químicas de los films

4.2 Caracterización estructural de los *films*

El impacto de las condiciones de síntesis en la estructura interna de los *films* fue estudiado por microscopía electrónica de barrido (SEM), previa remoción de los *films* de las placas y liofilización. La microscopía se realizó en el Departamento de Ingeniería Mecánica del Instituto Tecnológico de Buenos Aires (ITBA). El objetivo fue observar diferencias en la estructura interna de los *films* y verificar que no fuese afectada por cada tratamiento.

4.3 Estudios de adsorción y elución con proteínas puras

Distintas condiciones de adsorción y elución se testearon en función de la proteína modelo de estudio, las cuales fueron glicomacropéptido de caseína (GMP), lisozima (Lz) y aglutinina de germen de trigo (WGA).

4.3.1 GMP

El GMP es un péptido de 8 kDa producto de la hidrólisis enzimática de la kappa caseína de la leche, que se obtiene en el proceso de elaboración de queso. El GMP posee un punto isoeléctrico en torno a 4-5 y no contiene compuestos aromáticos en su estructura. Este hecho lo vuelve un candidato interesante a explorar como fuente de proteínas apta para personas que padecen de fenilcetonuria. El GMP fue utilizado como proteína modelo para validar la interacción electrostática entre proteínas con carga negativa y *films* de CS con carga positiva, en un proceso adsortivo de intercambio iónico.

Los *films* fueron equilibrados con 4 ciclos de 30 minutos a 90 rpm de solución buffer de acetatos 20 mM, pH 4,00. Sobre los recubrimientos se dispensó 1 ml/pocillo de una solución 1 mg/ml de GMP en buffer de acetatos 20 mM a pH 4,00 y se incubaron a 25 °C durante 2 horas en agitación a 90 rpm. También se dispensó 1 ml de dicha solución sobre pocillos sin *films* y se incubó en las mismas condiciones, como control. Luego se realizaron 2 lavados con buffer de acetatos durante 30 minutos en agitación 90 rpm y se eluyó utilizando el mismo buffer con agregado de 2 M NaCl durante 2 horas en agitación 90 rpm. El estándar de proteína pura, los sobrenadantes y los eluidos fueron analizados mediante espectrofotometría en 230 nm [13].

4.3.2 Lz

La Lz es una enzima de 14,4 kDa con un punto isoelectrico de 10,70. Es ampliamente usada en protocolos de ruptura celular y como conservante en la industria alimentaria. La Lz fue utilizada como proteína modelo para validar la interacción entre los *films* modificados con IDA y con el agregado de Cu^{2+} y proteínas con residuos de histidina superficiales (IMAC).

Los *films* se equilibraron con 2 ciclos de buffer de fosfatos 20 mM, pH 7,00, + 1 M NaCl y se dispensó a continuación 1 ml de solución de Lz 0,5 mg/ml en el mismo buffer de fosfatos y se dejó incubar durante 2 horas en agitación. También se dispensó 1 ml de dicha solución sobre pocillos sin *films* y se incubó en las mismas condiciones, como control. Luego, se realizaron 2 lavados con mismo buffer y se eluyó la Lz con buffer acético 50 mM pH 3,00 + 1 M NaCl durante 2 horas en agitación.

También se estudió la interacción electrostática entre el IDA y la Lz, sin agregado de cobre. La adsorción y los lavados se realizaron con buffer de fosfatos 20 mM pH 7,00 pero sin agregado de sal y la elución fue con dicho buffer con agregado 1 M NaCl. El estándar de proteína pura, los sobrenadantes y los eluidos fueron medidos mediante espectrofotometría en 280 nm.

4.3.3 WGA

La WGA es una lectina de alrededor de 35 kDa. La WGA tiene una alta especificidad por el ácido N-acetilneuramínico y posee dos sitios de unión para GlcNAc en cada subunidad. La WGA encuentra aplicación en el estudio y purificación de proteínas sialiladas así como en la funcionalización de sistemas de delivery para el direccionamiento órgano-específico. La WGA fue utilizada como proteína modelo para la validar la interacción por afinidad directa con el material de base de los *films*.

4.3.3.1 Purificación de WGA. Preparación de *stock* puro

El objetivo de la purificación de la lectina a partir de germen de trigo, fue generar un *stock* de la WGA pura para realizar estudios de adsorción y elución de dicha proteína. Esto se hizo siguiendo un protocolo previamente publicado por el grupo. Otro objetivo fue la obtención del extracto de germen de trigo, para realizar estudios de adsorción y elución a partir de una muestra compleja.

Primero, 500 gr de germen de trigo fueron desgrasados con 1,5 l n-hexano durante 1 hora y media por ciclo. Luego de dos ciclos, el hexano fue removido y el germen de trigo se dejó secar durante 72 horas a temperatura ambiente bajo campana. Posteriormente, se realizó una extracción ácida con 4 l de HCl 0,05M durante 4 horas a temperatura ambiente y agitación constante. El pH del extracto fue llevado a neutralidad y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se concentró diez veces por filtración de flujo tangencial con un cartucho de fibra hueca (corte de peso molecular de 10 kDa, superficie 650 cm²). El extracto concentrado se diafiltró con 2,4 l de buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8,50. Previo a su uso, 20 g de la matriz comercial se equilibraron con buffer Tris-HCl 10mM, pH 8,50. La adsorción de la lectina se realizó en modo *batch* incubando 400 ml del extracto de WGA concentrado y diafiltrado con 20 g de la matriz en agitación por 16 horas. Posteriormente, se realizaron 4 lavados con 50 ml de buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8,50 de 1 hora cada uno. La WGA se eluyó incubando la matriz con 50 ml de ácido acético 1 M en agitación por 16 horas. Por último, el eluato se dializó contra buffer de fosfatos 2 mM, pH 7,00 durante 72 horas empleando membranas de diálisis (Sigma-aldrich, MWCO 12400 kDa) y se liofilizó [16].

Los *films* fueron equilibrados con 3 lavados de 1 hora a 100 rpm a 25 °C con solución buffer Tris-HCl 10 mM pH 8,50 + 150 mM NaCl. Se incubó 1 ml de WGA 1 mg/ml en el mismo buffer por pocillo a 25 °C durante 2 horas en agitación 100 rpm. También se dispensó 1 ml de dicha solución sobre pocillos sin *films* y se incubó en las mismas condiciones, como control. Luego, se realizaron 3 lavados con buffer Tris-HCl durante 30 minutos en agitación 100 rpm y se eluyó utilizando 1 M de ácido acético *overnight* en agitación 100 rpm. El estándar de proteína pura, los sobrenadantes y los eluidos fueron medidos mediante espectrofotometría en 280 nm.

4.4 Estudios de purificación con muestras complejas

4.4.1 Purificación de Lz a partir de clara de huevo

La clara de huevo fue utilizada como muestra para estudiar la *performance* de los *films* sintetizados. La clara de huevo fue diluida 1:4 con buffer de fosfatos 20 mM + 1M NaCl. Previo a su uso, los *films* se equilibraron con el mismo buffer de fosfatos. Luego, se incubaron 0,5 ml de muestra por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente y 100 rpm de agitación y se realizaron varios lavados. Finalmente, la elución se realizó con 1 ml de buffer de acetatos 50 mM pH 3,00 + 1 M NaCl *overnight* en agitación 100 rpm.

4.4.1.1 Seguimiento del proceso purificación

La actividad de la Lz se determinó mediante la acción lítica en *Micrococcus lysodeikticus*. A 975 μ l de una suspensión de 0,5 mg/ml de *M. lysodeikticus* en buffer de fosfatos 20 mM, pH 7,00, se le agregaron 25 μ l de muestra. Luego, se midió la absorbancia en 450 nm cada 10 segundos durante 2 minutos. Para la cuantificación, se considera que el descenso de 0,001 unidades de absorbancia por minuto se define como 1 unidad de actividad enzimática de Lz [10].

La determinación de proteínas totales se realizó utilizando el reactivo de Biuret por espectrofotometría en 540 nm.

4.4.2 Purificación de WGA a partir de germen de trigo

El extracto de germen de trigo producido en la sección “Purificación de WGA. Preparación de *stock* puro” fue utilizado como muestra compleja. El ensayo de adsorción y elución, con dicha muestra, se realizó siguiendo el protocolo de la sección “WGA”.

4.4.2.1 Seguimiento de los procesos de purificación

La *performance* de los *films* en el proceso fue estudiada mediante HPLC en un sistema Shimadzu LC-20AT y se empleó una columna C8 monolítica. Los solventes fueron agua milliQ

con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,065 % (A) y acetonitrilo con TFA al 0,05% (B). Cada corrida fue monitoreada por su absorbancia en 214 y 280 nm. El flujo de la fase móvil fue 1 ml/min y el volumen de inyección fue de 20 μ l. El gradiente de elución fue: 0–5 min, 15% B; 5–35 min, 15–60 % B; 35–36 minutos, 60–100 %B; 36–41 min, 100 % B. El control empleado fue 1 mg/ml de lectina estándar [16].

La determinación de proteínas totales se realizó empleando el método de Bradford [18].

4.5 Análisis estadístico

Los resultados de capacidad adsorptiva (mg de proteína por gr de CS) y elución (%) de cada proteína fueron analizados mediante el análisis de la varianza. En los casos de incumplimiento del supuesto de homocedasticidad, se realizó un modelado de varianzas. Las diferencias entre los tratamientos fueron analizadas mediante comparación de Tukey. Se consideraron significativas aquellas pruebas con $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron efectuados utilizando el software estadístico R e Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.

5 Resultados y discusión

5.1 Caracterización estructural de los *films*

Las condiciones sin agregado de PEG presentaron una estructura lisa (t. 2a). En cambio, las condiciones con agregado de PEG presentaron estructuras porosas (Fig. 2b, c), aunque sus poros no fueron homogéneos en todo el material. No se vieron diferencias estructurales entre las condiciones con diferentes concentraciones de CS o entre las condiciones con diferentes espesores (imágenes no mostradas). Tampoco se identificaron diferencias estructurales entre los distintos tratamientos durante el proceso de síntesis (imágenes no mostradas). Por último, se identificaron estructuras colapsadas sobre sí mismas. El colapso del *film* puede deberse a la preparación del material para analizar, que consistió en la remoción del *film* de la placa a la que

estaba adherido y su posterior liofilizado. Esto pudo implicar un daño o alteración de la estructura interna del *film* previo a su visualización microscópica.

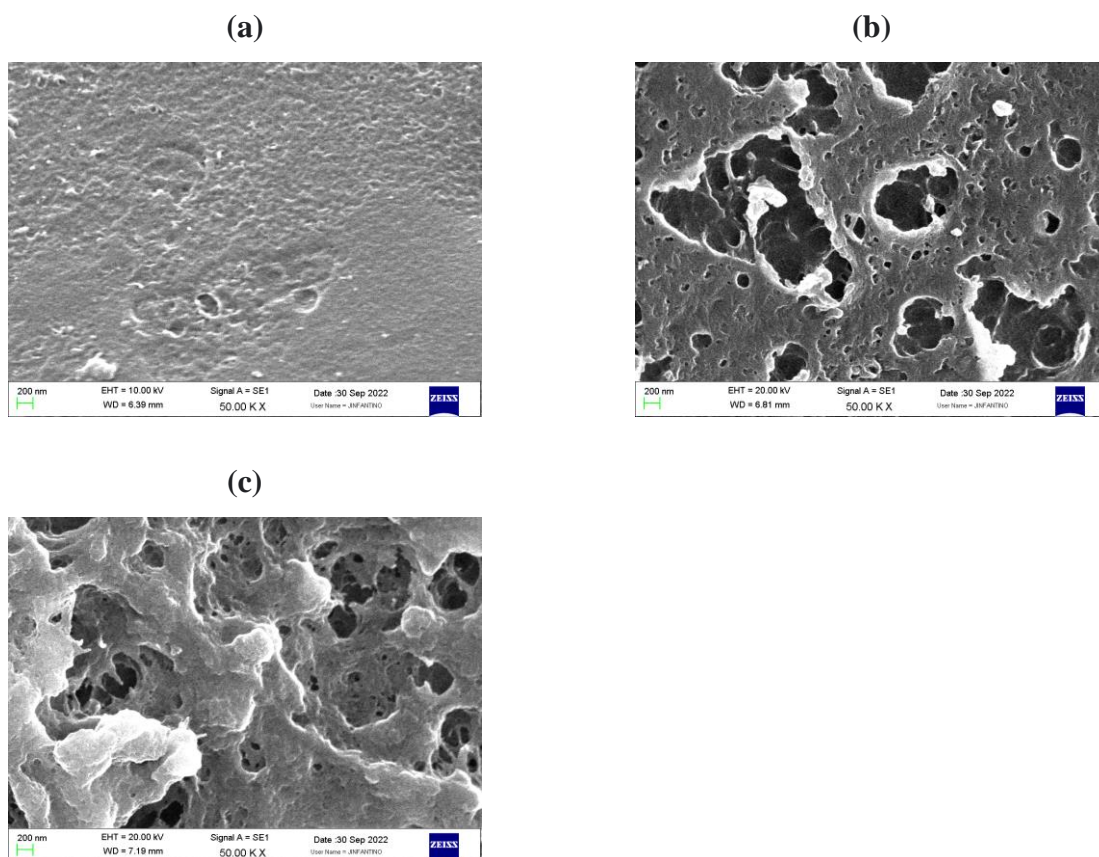


Figura 2. Imágenes de SEM de los films. (a) AC1P0, (b) AC1P1 y (c) AC1P5.

5.2 Estudios de adsorción y elución con proteínas puras

5.2.1 GMP

Las condiciones con mayor capacidad adsortiva fueron AC1P5 y AC1P0 con $83,8 \pm 2,0$ y $72,0 \pm 1,6$ mg GMP/g CS, respectivamente (Gráfico 1 y Tabla 2 en anexo). Las condiciones con mejor recuperación fueron BC1P5 y CC2P5 con $91,2 \pm 8,5$ y $90,4 \pm 5,5$ %, respectivamente (Gráfico 2 y Tabla 2 en anexo). En este caso, interesantemente, se observa que a menor concentración de CS se evidencia un aumento de la capacidad adsortiva (Gráfico 1), siendo los *films* en los que el volumen dispensado fue de 250 μ l los que mostraron las mayores capacidades adsortivas. Por otro lado, el aumento de PEG no mostró variación significativa en la capacidad

adsortiva en las condiciones estudiadas (Gráfico 1). Con el único eluyente testeado, la elución fue mayor al 59% en todos los casos (Gráfico 2). Si bien desde el punto de vista de la elución no son comparables entre sí *films* con diferentes cantidades adsorbidas de GMP, en los casos con los mayores niveles adsorbidos, mostraron también una buena performance para la desorción del GMP en las condiciones testeadas. Los controles sin *films* no mostraron adsorción.

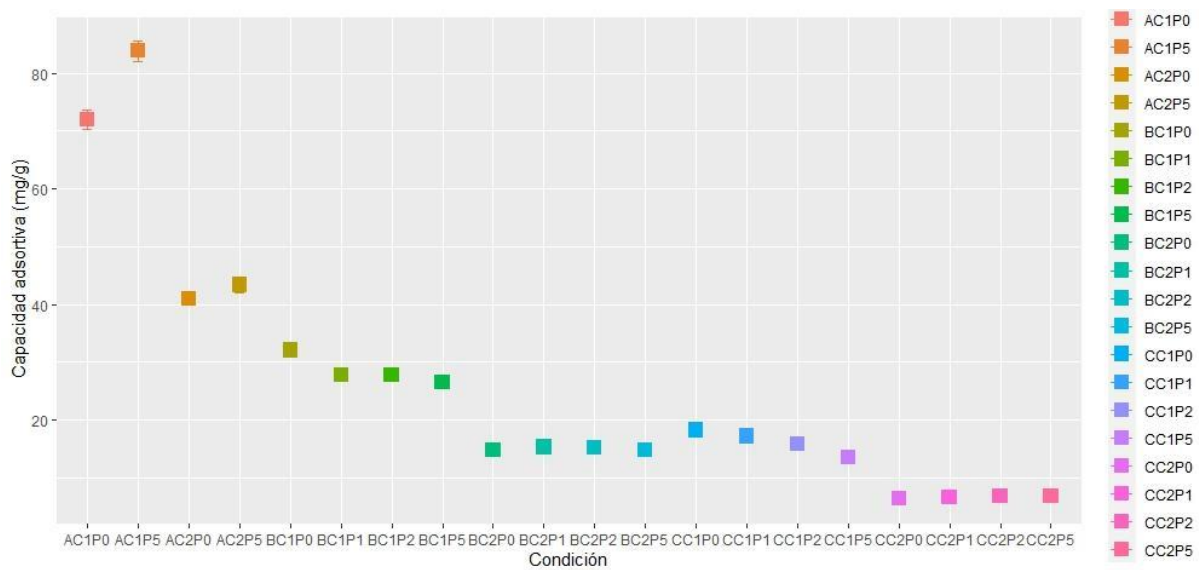


Gráfico 1. Capacidad adsortiva de los films con GMP pura

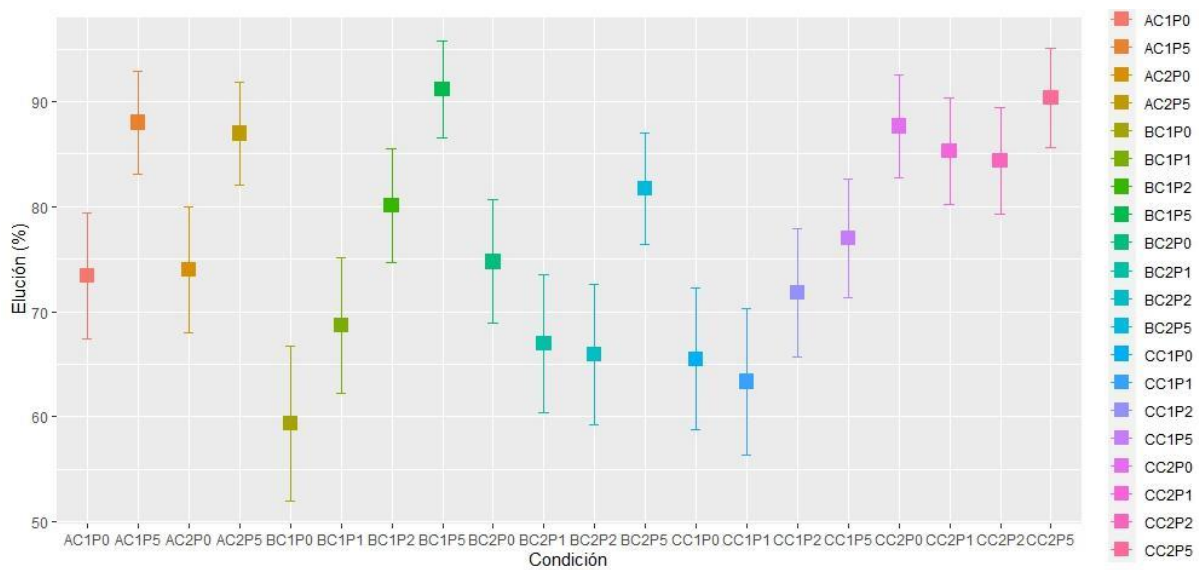


Gráfico 2. Elución de los films con GMP pura

5.2.2 Lz

En los *films* con Cu^{2+} inmovilizado como ligando, las condiciones con mayor capacidad adsorptiva fueron AC1P5 y AC1P1 con $104,5 \pm 2,9$ y $28,5 \pm 3,8$ mg Lz/g CS, respectivamente (Gráfico 3 y Tabla 3 en anexo). La capacidad adsorptiva de la condición AC1P5 es significativamente mayor que las condiciones AC1P1 y AC1P0. Por lo tanto, el aumento de la concentración de PEG generó un aumento significativo de la capacidad adsorptiva en las condiciones de CS 1% (Gráfico 3). Aunque no se observó un aumento significativo para las condiciones con CS 2% (Gráfico 3). A diferencia de lo observado con GMP, en este caso, el agregado de porógeno a la solución filmogénica impactó positivamente en la capacidad adsorptiva. Esto es coherente con lo observado en las fotos obtenidas por SEM, al aumentar la superficie interna del material tras el agregado del porógeno en la síntesis del material.

En los *films* sin Cu^{2+} inmovilizado, las condiciones con mejor capacidad adsorptiva también fueron AC1P5 y AC2P5 con $127,9 \pm 6,6$ y $61,7 \pm 0,9$ mg Lz/ g CS, respectivamente (Gráfico 4 y Tabla 3 en anexo). En ambos casos, en las condiciones de CS 1%, el aumento de PEG generó un aumento significativo de la capacidad adsorptiva. Aunque, en los *films* sin Cu^{2+} , también se observó un aumento significativo en las capacidades adsorptivas para las condiciones de CS 2% (Gráfico 4). En cuanto a la elución, en los *films* sin Cu^{2+} , se observó un porcentaje de elución menor que en los *films* con Cu^{2+} . Las condiciones con mayor porcentaje de elución fueron AC1P5 y AC2P1 con $21,7 \pm 2,3$ y $10,0 \pm 2,3$ %, respectivamente (Gráfico 5 y Tabla 3 en anexo). En los *films* con Cu^{2+} , se observó altos porcentajes de elución en todas sus condiciones (Gráfico 6 y Tabla 3 en anexo).

Los controles sin *films* no mostraron adsorción.

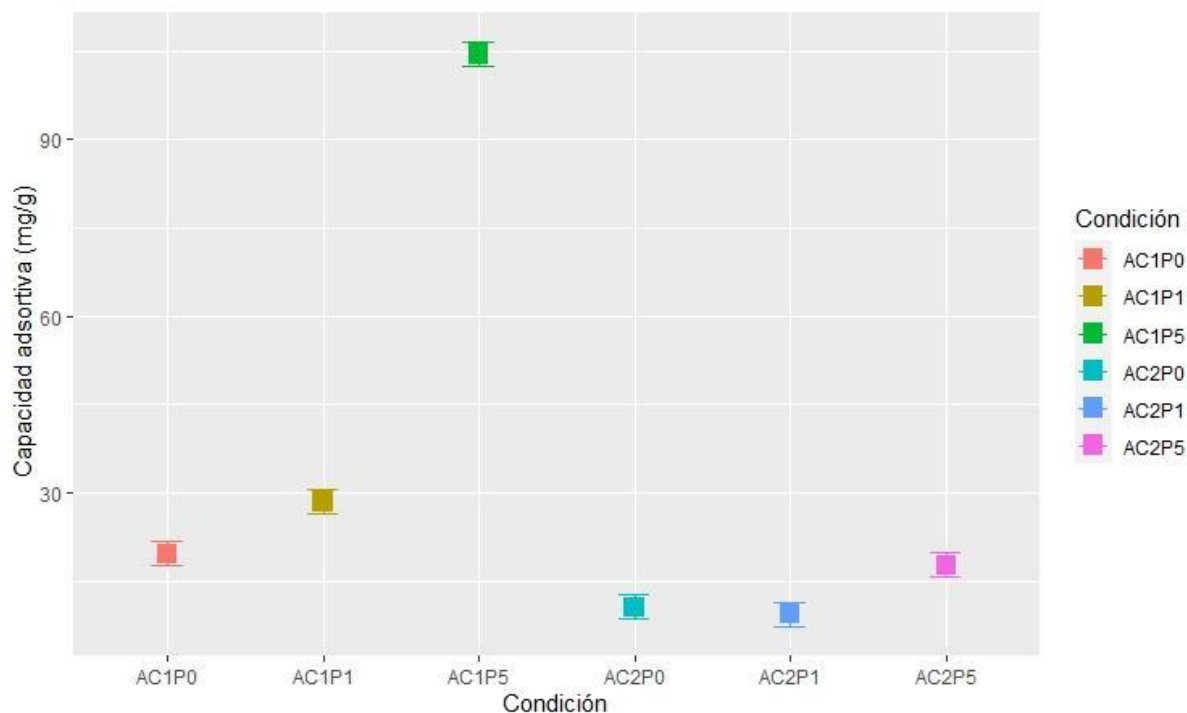


Gráfico 3. Capacidad adsorptiva de los films con Cu^{2+} para Lz pura

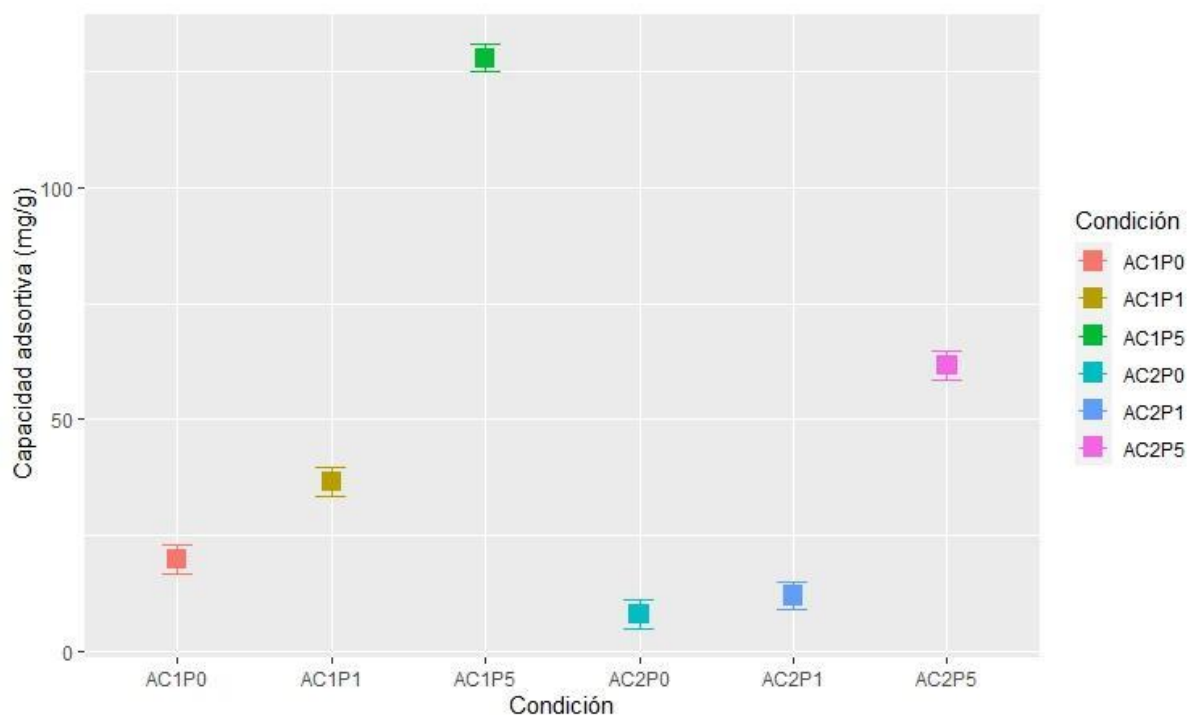


Gráfico 4. Capacidad adsorptiva de los films sin Cu^{2+} para Lz pura

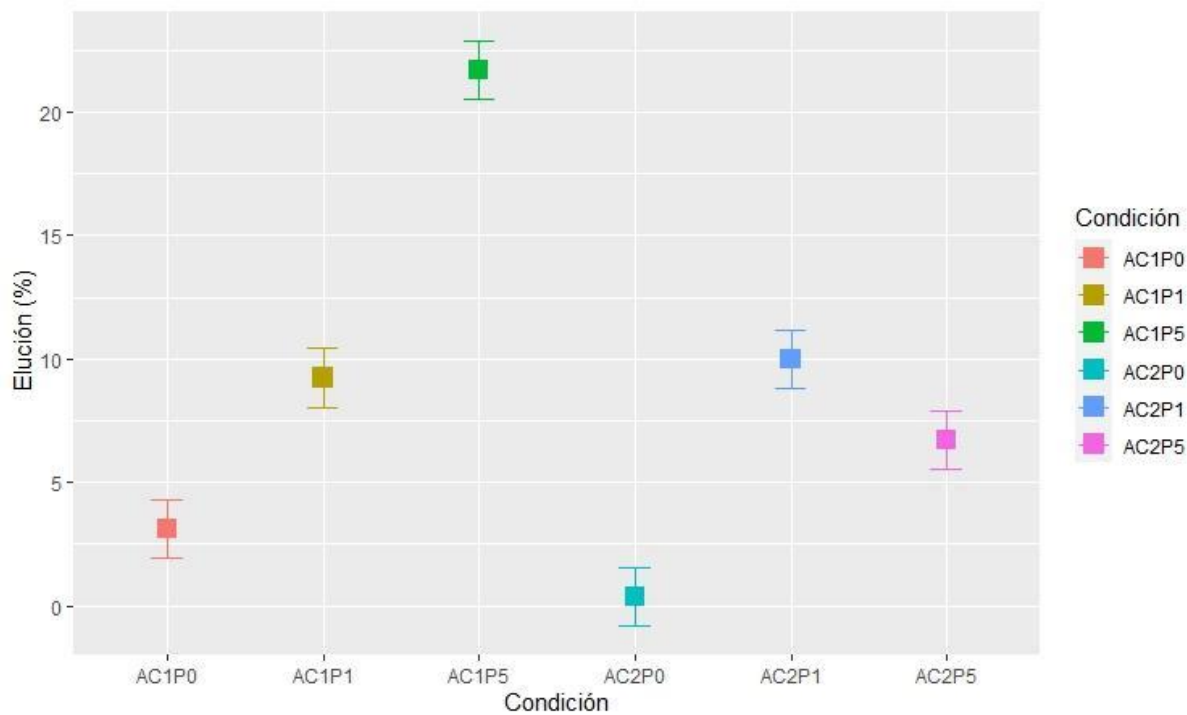


Gráfico 5. Elución de los films sin Cu^{2+} para Lz pura

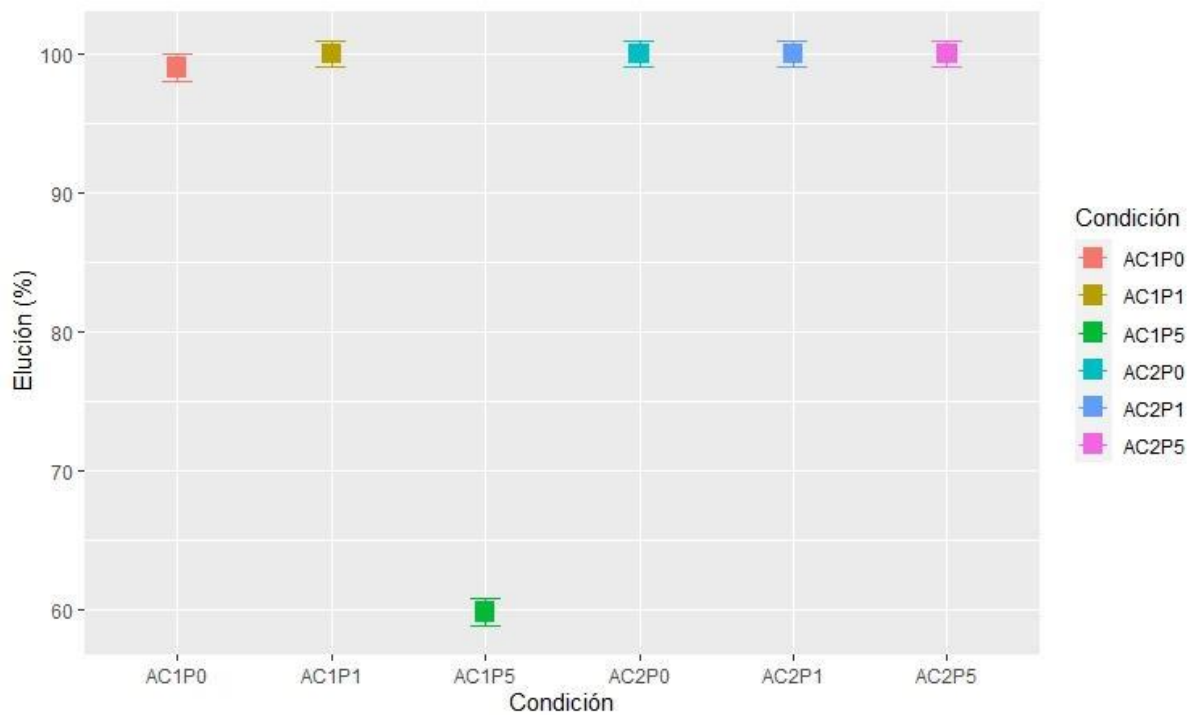
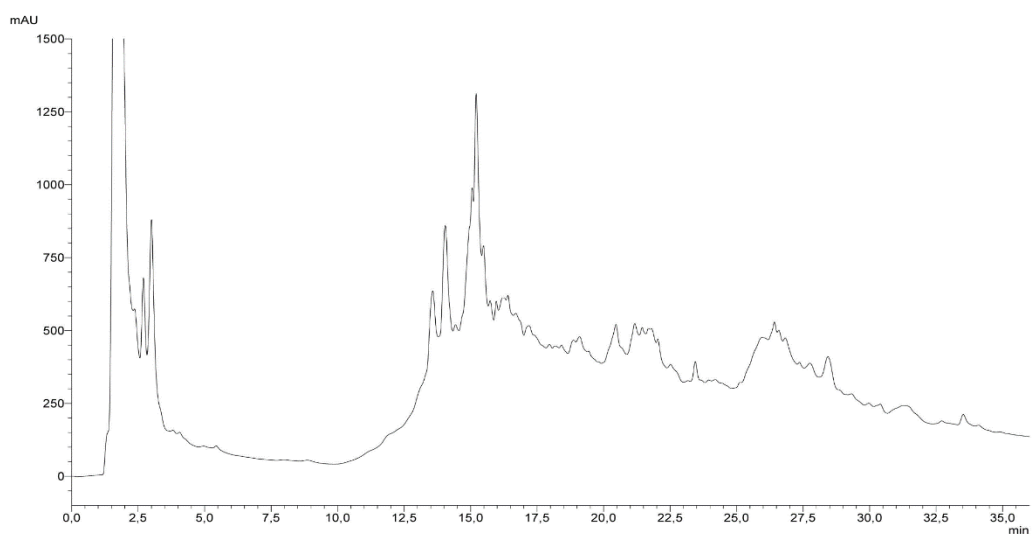


Gráfico 6. Elución de los films con Cu^{2+} para Lz pura

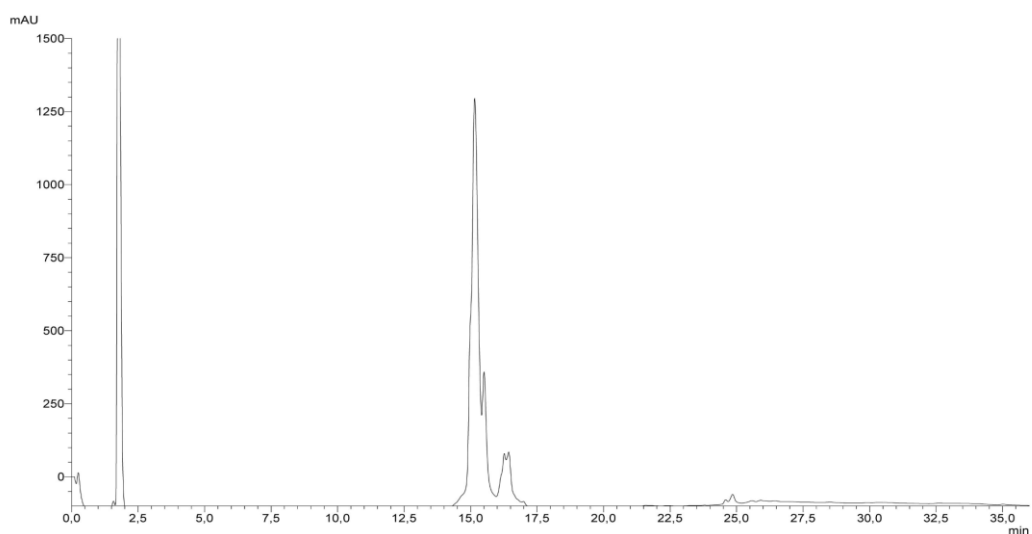
5.2.3 WGA

En la Figura 3 se observa que el patrón de picos de la WGA purificada en este trabajo a partir de germen de trigo, corresponde al patrón de picos de WGA comercial. A partir de estos resultados, la WGA obtenida va ser utilizada como *stock* para los siguientes ensayos.

(a)



(b)



(c)

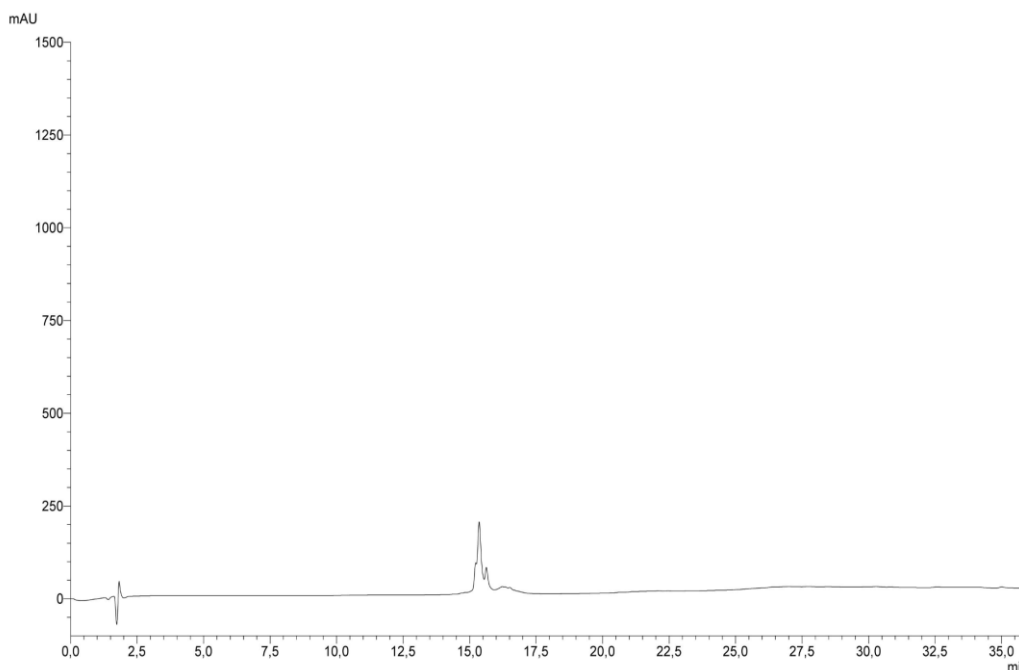


Figura 3. Patrones de HPLC. (a) Extracto de germen de trigo, (b) eluido y (c) WGA comercial

Las condiciones con mayor capacidad adsorptiva fueron AC1P5 y AC1P1 con $66,5 \pm 8,9$ y $63,1 \pm 6,9$ mg WGA/ g CS, respectivamente, y las condiciones con mayor porcentual de elución fueron AC1P5 y AC1P0 con $18,3 \pm 0,8$ y $10,8 \pm 6,2$ %, respectivamente (Gráfico 7, Gráfico 8 y Tabla 4 en anexo). Cabe destacar que la condición AC1P5 fue la condición con mayor capacidad adsorptiva en todos los ensayos de adsorción. Se observó que las condiciones con mejores capacidades adsorptivas correspondieron a 1% p/V CS (Gráfico 7). Por otro lado, el aumento de PEG no provocó un aumento en la capacidad adsorptiva como era lo esperado (Gráfico 7). En la elución, no se observó diferencias significativas entre las distintas condiciones con el eluyente testeado, y en ningún caso superó el 19% (rango 4-19%) (Gráfico 8). Este hecho puede dar cuenta de la fuerte interacción entre la WGA y los *films*, que no logra ser afectada en las condiciones testeadas. Esto puede ser un hecho significativo desde el punto de vista utilitario y de la estabilidad de la lectina adsorbida, considerando aplicaciones donde la WGA requiera ser inmovilizada. Los controles sin *films* no mostraron adsorción.

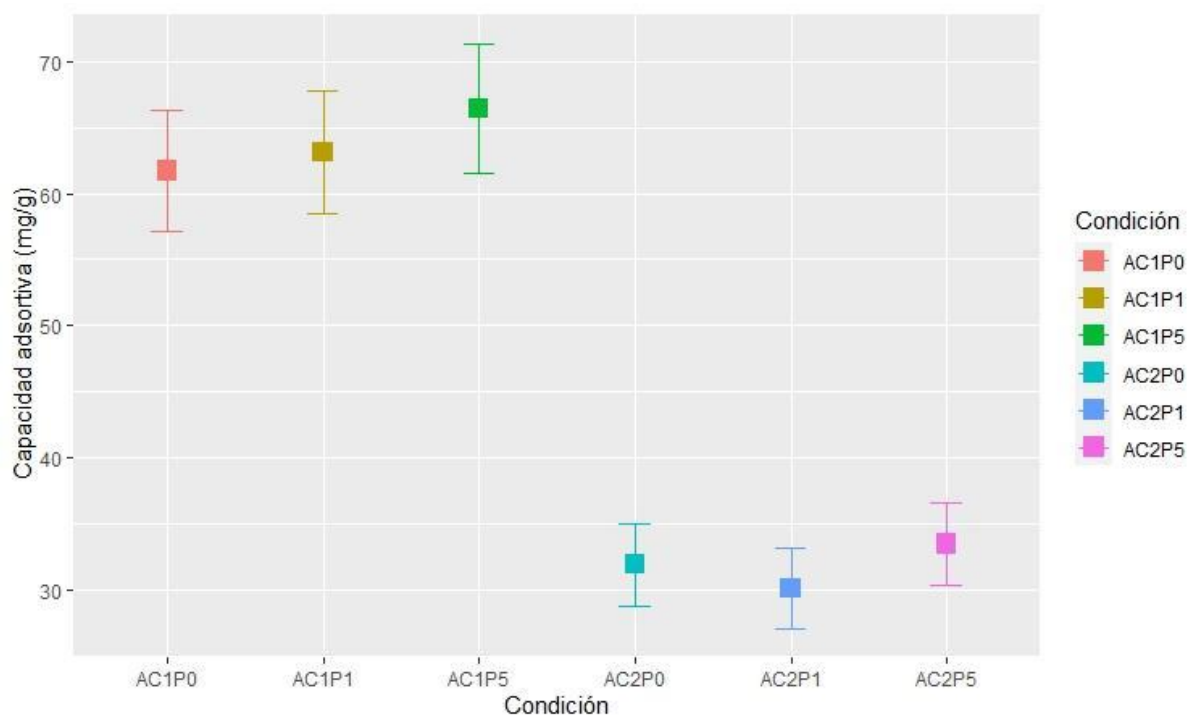


Gráfico 7. Capacidad adsorptiva de los films con WGA pura

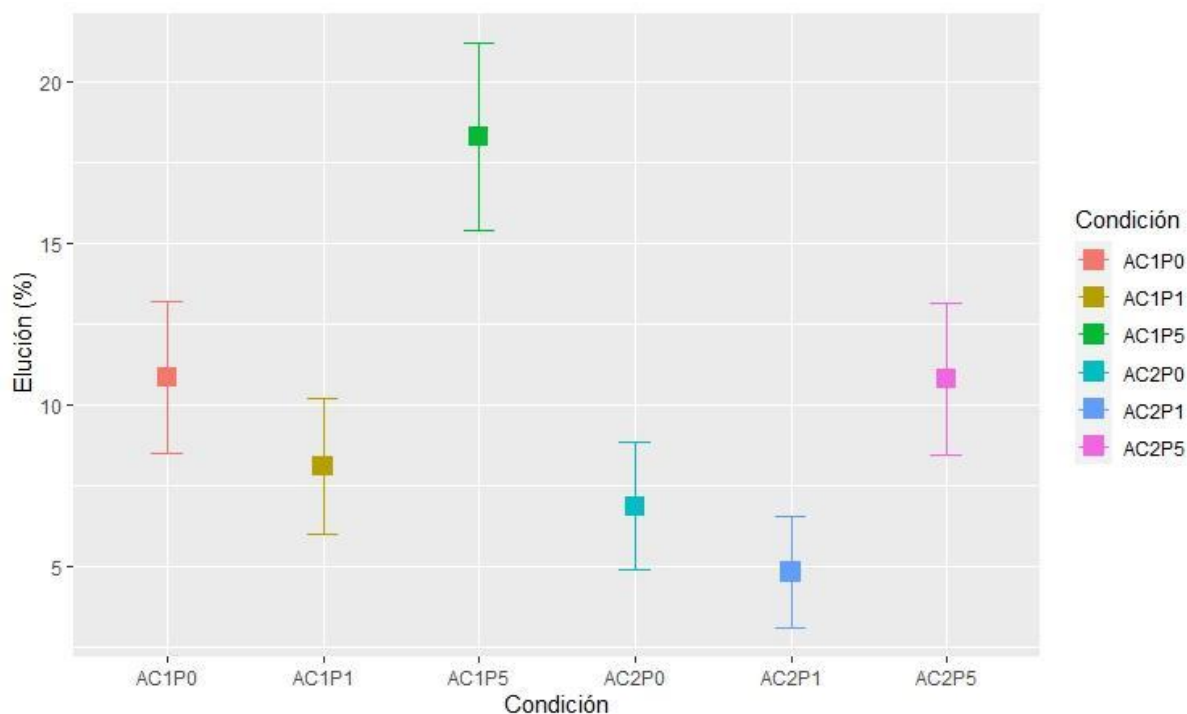


Gráfico 8. Elución de los films con WGA pura

5.3 Estudios de purificación con muestras complejas

5.3.1 Purificación de Lz a partir de clara de huevo

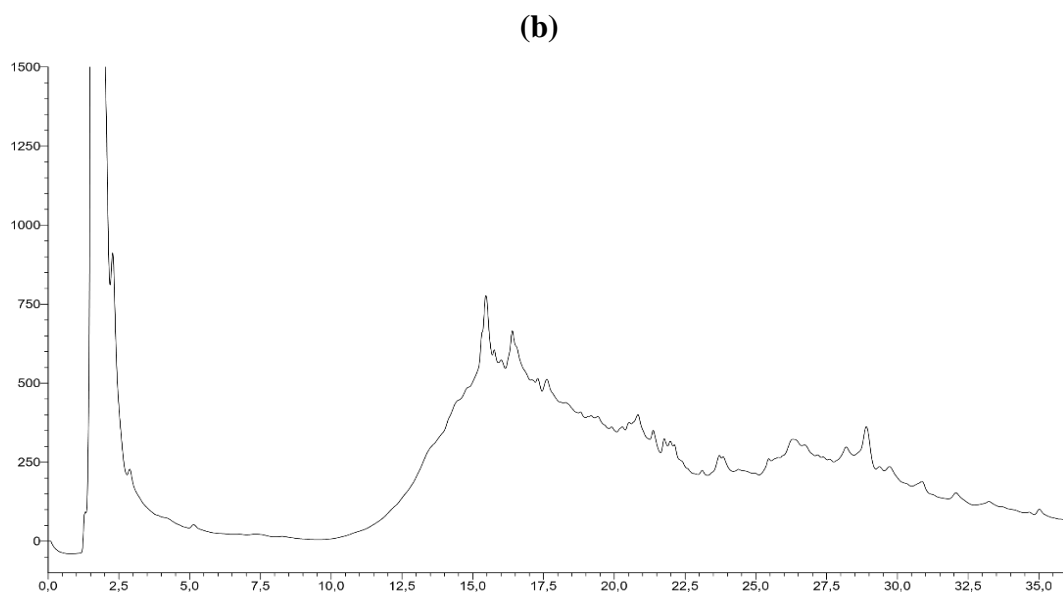
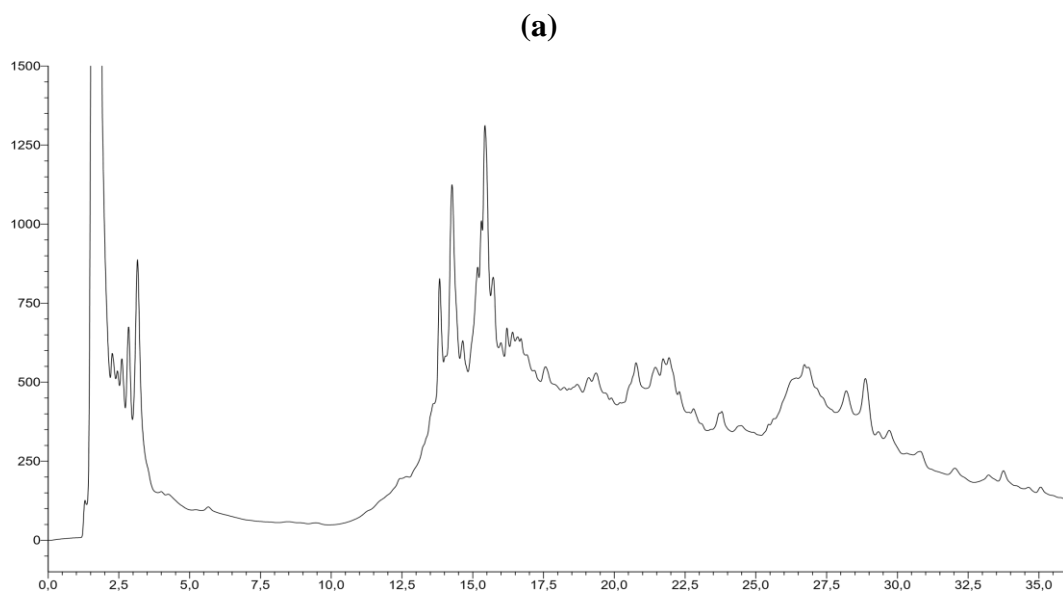
Las condiciones con mayor porcentaje de adsorción fueron AC1P5 y AC2P5 con $94,6 \pm 1,1$ y $92,9 \pm 1,4$ %, respectivamente (Tabla 5). La condición AC1P5 es la condición con la capacidad adsorptiva más alta en los ensayos con Lz pura, en *films* con Cu^{2+} (Grafico 3 y Tabla 3 en anexo). Por otro lado, las eluciones no superaron el 10% (Tabla 5). Por lo tanto, restan realizar estudios de optimización de las condiciones de elución, en el caso de buscar una aplicación en purificación mediante esta estrategia basada en IMAC.

Tabla 5. Adsorción de los *films* con Cu^{2+} para clara de huevo

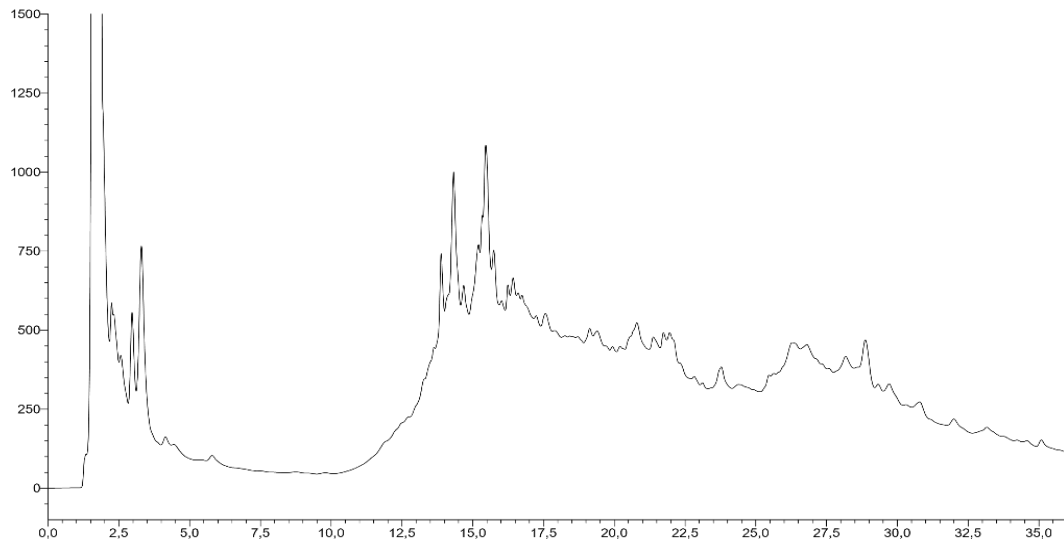
Condición	Adsorción (%)	Elución (%)
AC1P0	$62,8 \pm 13,5$	$4,1 \pm 3,4$
AC1P1	$53,3 \pm 2,7$	$9,6 \pm 5,9$
AC1P5	$94,6 \pm 1,1$	$2,1 \pm 0,2$
AC2P0	$65,4 \pm 5,2$	$0,1 \pm 0,2$
AC2P1	$90,4 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,4$
AC2P5	$92,9 \pm 1,4$	$0,7 \pm 0,8$

5.3.2 Purificación de WGA a partir de germen de trigo

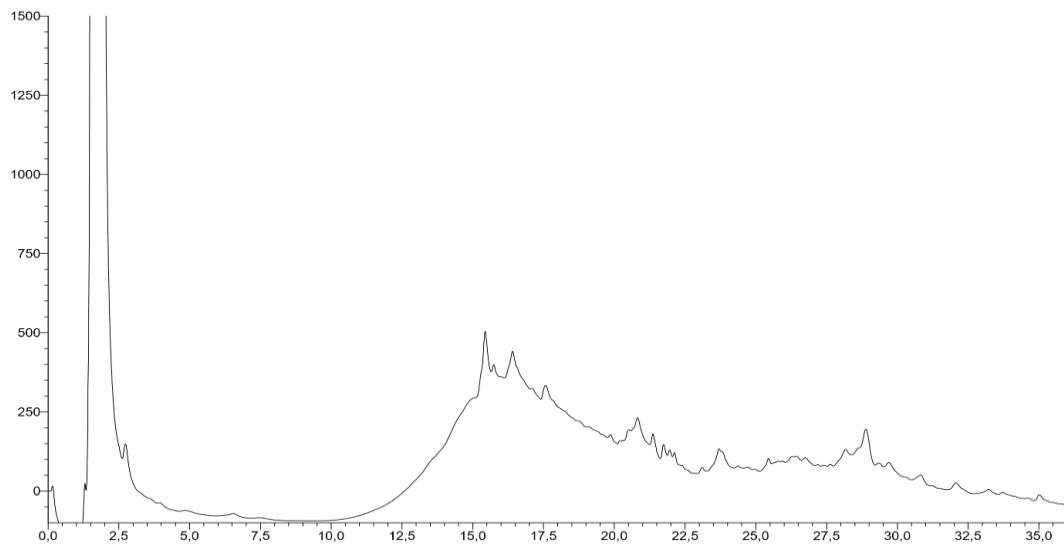
Al evaluar la adsorción de la lectina en forma directa a partir del extracto del germen de trigo, no se observó una adsorción selectiva. En todas las condiciones se observó una disminución del pico de la WGA, aunque también disminuyen otros picos del cromatograma (Figura 4). Esto indica que la adsorción no fue del todo selectiva para adsorber WGA.



(c)



(d)



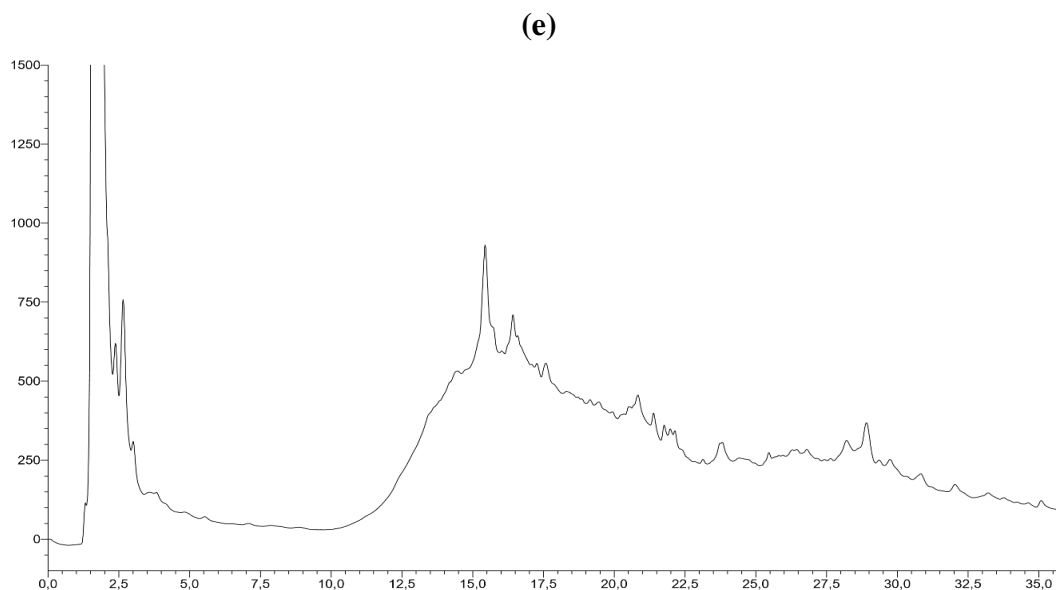


Figura 4. Cromatogramas de purificación de WGA a partir de germen de trigo. (a) Extracto de germen de trigo, (b-e) sobrenadantes de AC1P0, AC1P5, AC2P0 y AC2P5, respectivamente.

Las condiciones con la mejor adsorción fueron AC2P0 y AC1P5 con 51,4 y 37,2 %, respectivamente (Tabla 6). Las eluciones fueron bajas. Por lo tanto, restan realizar estudios de condiciones de elución en el caso de buscar aplicación en purificación. Con estos resultados se podría pensar en aplicaciones de estos *films* para la inmovilización de WGA, directamente a partir del germen de trigo. En el caso de que se requiera la remoción de los contaminantes coadsorbidos, debería testarse diferentes condiciones de lavado que no afecten a la lectina.

Tabla 6. Capacidad adsortiva de los films incubados con el extracto de germen de trigo

Condición	Adsorción (%)	Capacidad adsortiva (mg/g)
AC1P0	34,9	346,5
AC1P5	37,2	369,2
AC2P0	51,4	254,7
AC2P5	36,0	178,4

6 Conclusiones y perspectivas

En la presente tesis se lograron desarrollar y caracterizar *films* de CS, a modo de recubrimientos sobre superficies plásticas, para adsorber diferentes proteínas *target* de interés tecnológico. Se lograron determinar condiciones de síntesis y funcionalización de *films* para maximizar capacidades de adsorción, así como determinar condiciones de adsorción y elución para diferentes proteínas puras. Las condiciones con mayores capacidades adsorptivas resultaron ser las de menor volumen de CS dispensado por pocillo, siendo AC1P5, la condición con mejor capacidad adsorptiva en los ensayos con proteínas puras. Esto puede deberse a una mejor consolidación de la estructura del material a menor volumen dispensado de CS y a una mejor proporción relativa de porógeno en AC1P5 en comparación con otras condiciones. La reducción del volumen de trabajo podría ser una ventaja en el caso de aplicarse al desarrollo de kits de diagnóstico. Por otro lado, el agregado de PEG en la síntesis de los *films* resultó en la formación de la estructura porosa deseada y en un aumento de las capacidades adsorptivas como se demostró en los ensayos con Lz. En función de los resultados obtenidos en los ensayos con muestras complejas, los *films* de CS podrían utilizarse para desarrollo de kits de diagnóstico, gracias a que permitiría la adsorción directa de proteínas de interés a partir de muestras crudas, sin requerir de previas purificaciones. Por otro lado, como surge de los procesos de purificación testeados empleando muestras crudas, restan ajustar las condiciones de lavado y/o elución.

7 Bibliografía

1. Muxika A, Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, de la Caba K (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *Int J Biol Macromol*, 105(Pt 2), 1358-1368.
2. Rinaudo M, Pavlov G, Desbrières J. (1999). Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, 40, 7029–32.
3. R. Lieder, M. Darai, G. Örlygsson y O. E Sigurjonsson (2013). Solution casting of chitosan membranes for in vitro evaluation of bioactivity. *Biol. Proced. Online*, 15, 1-11.
4. Y. Zhang, L. Li, C. Yu, y T. Hei (2011). Chitosan-coated polystyrene microplate for covalent immobilization of enzyme. *Anal Bioanal. Chem*, 401, 2311–2317.
5. J. Wang, L. Wang, H. Yu, Z. Abdin, Y. Chen, Q. Chen, W. Zhou, H. Zhang y X. Chen (2016). Recent progress on synthesis, property and application of modified chitosan: an overview. *Int. J. Biol. Macromol*, 88, 333–344.
6. Ali y S. Ahmed (2018). A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol*, 109, 273–286.
7. M.A. Badawi, N.A. Negm, M.T.H. Abou Kana, H.H. Hefni, M.M. Abdel Moneem (2017). Adsorption of aluminum and lead from wastewater by chitosan-tannic acid modified biopolymers: isotherms, kinetics, thermodynamics and process mechanism. *Int. J. Biol. Macromol*, 99, 465–476.
8. P.L. Kashyap, X. Xiang, P. Heiden (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *Int. J. Biol. Macromol*, 77, 36–51.
9. R. Morsy, S.S. Ali, M. El-Shetehy (2017). Development of hydroxyapatite-chitosan gel sunscreen combating clinical multidrug-resistant bacteria. *J. Mol. Struct*, 1143, 251–258.
10. D. B. Hirsch, M. F. Baieli, N. Urtasun, J. M. Lázaro-Martínez, R. J. Glisoni, M. V. Miranda, O. Cascone y F. J. Wolman (2018). Sulfanilic acid-modified chitosan mini-spheres and their application for lysozyme purification from egg white. *Biotechnol. Progr*, 34(2), 387-396.
11. M. F. Baieli, N. Urtasun, M. V. Miranda, O. Cascone y F. J. Wolman (2014). Isolation of lactoferrin from whey by dye-affinity chromatography with Yellow HE-4R attached to chitosan mini-spheres. *Int. Dairy J*, 39, 53-59.

12. L. F. Bracco, G. J. Levin, N. Urtasun, A. A. Navarro del Cañizo, F. J. Wolman, M. V. Miranda y O. Cascone (2019). Covalent immobilization of soybean seed hull urease on chitosan minispheres and the impact on their properties. *Biocatal. Agric. Biotechnol*, 18, 1-8.
13. M. F. Baieli, N. Urtasun, M. J. Martínez, D. B. Hirsch, A. M. Pilosof, M. V. Miranda, O. Cascone y F. J. Wolman (2017). Affinity chromatography matrices for depletion and purification of casein glycomacropptide from bovine whey. *Biotechnol. Progr*, 33 (1), 171-180.
14. D. B. Hirsch, L. M. Martínez Álvarez, N. Urtasun, M. F. Baieli, J. M. Lázaro- Martínez, R. J. Glisoni, M. V. Miranda, O. Cascone y F. J. Wolman (2020). Lactoferrin purification and whey protein isolate recovery from cheese whey using chitosan mini-spheres. *Int. Dairy J*, 109, 104764.
15. Hirsch DB, Baieli MF, Urtasun N, Lázaro-Martínez JM, Glisoni RJ, Miranda MV, Cascone O, Wolman FJ (2018). Sulfanilic acid-modified chitosan mini-spheres and their application for lysozyme purification from egg white. *Biotechnol Prog*, 34(2):387-396
16. Baieli MF, Urtasun N, Miranda MV, Cascone O, Wolman FJ (2012). Efficient wheat germ agglutinin purification with a chitosan-based affinity chromatographic matrix. *J Sep Sci*, 35(2):231-8.
17. M. S. Saunders y R. K. Pegg (1993). Reactive chitosan coated articles and test KT for immunoassay. Patente USA 5.208.166.
18. Bradford, M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *M., Anal. Biochem*, 72, 248–254.

8 Anexo

Tabla 2. Capacidad adsortiva de los films con GMP pura

Condición	Capacidad adsortiva (mg GMP por g CS)	Elución (%)
AC1P0	72,0 ± 1,6 ^F	73,4 ± 1,7 ^A
AC1P5	83,8 ± 2,0 ^F	88,0 ± 2,8 ^A
AC2P0	41,0 ± 1,8 ^E	74,0 ± 3,5 ^A
AC2P5	43,3 ± 0,8 ^E	87,0 ± 5,1 ^A
BC1P0	32,0 ± 1,1 ^D	59,3 ± 6,0 ^A
BC1P1	27,7 ± 1,6 ^D	68,7 ± 18,1 ^A
BC1P2	27,8 ± 2,4 ^D	80,1 ± 11,6 ^A
BC1P5	26,6 ± 0,4 ^D	91,2 ± 8,5 ^A
BC2P0	14,8 ± 0,7 ^{BC}	74,7 ± 20,1 ^A
BC2P1	15,3 ± 1,0 ^{BC}	67,0 ± 3,4 ^A
BC2P2	15,2 ± 0,5 ^{BC}	65,9 ± 5,5 ^A
BC2P5	14,8 ± 0,4 ^{BC}	81,7 ± 1,6 ^A
CC1P0	18,2 ± 0,1 ^C	65,5 ± 4,7 ^A

CC1P1	17,1 ± 0,0 ^{BC}	63,3 ± 1,1 ^A
CC1P2	15,8 ± 1,0 ^{BC}	71,8 ± 2,6 ^A
CC1P5	13,5 ± 3,0 ^B	77,0 ± 11,7 ^A
CC2P0	6,4 ± 0,0 ^A	87,6 ± 1,3 ^A
CC2P1	6,6 ± 0,2 ^A	85,2 ± 2,0 ^A
CC2P2	6,8 ± 0,0 ^A	84,4 ± 7,9 ^A
CC2P5	6,8 ± 0,3 ^A	90,4 ± 5,5 ^A

Los valores de media con distinta letra fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 3. Capacidad adsortiva de los films con Lz pura

Condición	Films con Cu^{2+}		Films sin Cu^{2+}	
	Capacidad adsortiva (mg Lz/ g CS)	Elución (%)	Capacidad adsortiva (mg Lz/ g CS)	Elución (%)
AC1P0	19,6 ± 6,1 ^{AB}	99,0 ± 1,7 ^B	19,8 ± 6,0 ^A	3,1 ± 1,7 ^{AB}
AC1P1	28,5 ± 3,8 ^B	100,0 ± 0,0 ^B	36,5 ± 9,2 ^B	9,2 ± 3,2 ^B

AC1P5	$104,5 \pm 2,9^C$	$59,8 \pm 3,7^A$	$127,9 \pm 6,6^D$	$21,7 \pm 2,3^C$
AC2P0	$10,6 \pm 3,3^A$	$100,0 \pm 0,0^B$	$8,0 \pm 1,5^A$	$0,4 \pm 0,7^A$
AC2P1	$9,4 \pm 1,0^A$	$100,0 \pm 0,0^B$	$12,0 \pm 0,6^A$	$10,0 \pm 2,3^B$
AC2P5	$17,7 \pm 2,6^A$	$100,0 \pm 0,0^B$	$61,7 \pm 0,9^C$	$6,7 \pm 1,0^B$

Los valores de media con distinta letra fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 4. Capacidad adsortiva de los films con WGA pura

Condición	Capacidad Adsorptiva (mg WGA por g CS)	Elución (%)
AC1P0	$61,7 \pm 2,7^A$	$10,8 \pm 6,2^A$
AC1P1	$63,1 \pm 6,9^A$	$8,1 \pm 2,3^A$
AC1P5	$66,5 \pm 8,9^A$	$18,3 \pm 0,8^A$
AC2P0	$31,9 \pm 6,1^B$	$6,9 \pm 3,2^A$
AC2P1	$30,1 \pm 4,2^B$	$4,8 \pm 1,4^A$

AC2P5	$33,5 \pm 1,7^B$	$10,8 \pm 1,5^A$
-------	------------------	------------------

Los valores de media con distinta letra fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$).