



Martínez, Leandro J.

Nanopartículas poliméricas funcionales como material para purificar proteínas



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Martínez, L. J. (2021). *Nanopartículas poliméricas funcionales como material para purificar proteínas. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3061>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Nanopartículas poliméricas funcionales como material para purificar proteínas

TESIS DOCTORAL

Leandro J. Martínez

ljmartinez2007@yahoo.com.ar

Resumen

La Biotecnología Industrial requiere de procesos más eficientes e integrados que permitan reducir los altos costos de producción. Son especialmente importantes los procesos de recuperación y purificación de bioproductos, donde se encuentran los costos operativos más altos. Dentro de esta área de estudio, la investigación y desarrollo en Nanotecnología para purificar proteínas promete aportar importantes mejoras a partir del desarrollo de nuevos materiales adsorbtivos más eficientes que reemplacen a las columnas cromatográficas.

En este contexto, a lo largo de este Trabajo de Tesis se presenta la preparación y caracterización de nanocompuestos poliméricos (NCPs) funcionales basados en nanopartículas (NPs) de sílica, un silicato de uso industrial de baja toxicidad, modificada con poli metacrilatos para su aplicación en recuperación específica de proteínas a partir de extractos crudos.

Los materiales se prepararon mediante una técnica de polimerización por injerto inducida por radiación ionizante de ^{60}Co . Los nanomateriales obtenidos fueron caracterizados mediante diversas técnicas espectroscópicas. A partir de las mismas se pudo deducir que los NCPs contienen porcentajes variables entre 1 y 45 % p/p de polimetacrilatos con diámetros de partícula entre 60 y 190 nm, de acuerdo a la relación de reactivos iniciales en la preparación. Se obtuvieron cuatro tipos de NCPs con una distribución altamente monodispersa con una superficie del tipo polimérica. Dichos resultados permitieron considerar a los materiales obtenidos como unidades nanométricas compuestas del tipo “*budín con pasas*” de polimetacrilatos conteniendo NPs de sílica en su interior.

Los NCPs obtenidos fueron funcionalizados con grupos sulfónicos, una símil Proteína A y un grupo quelante (Ni^{+2}). La caracterización espectroscópica confirmó la presencia de las modificaciones en los materiales. Los NCPs funcionalizados (NCPs-X) fueron estudiados

para adsorber específicamente proteínas modelo como la Lisozima, Inmunoglobulinas G y una proteína recombinante con etiqueta de histidinas. En todos los casos se obtuvieron capacidades adsorptivas iguales o superiores a las matrices comerciales.

La capacidad de purificación de proteínas de los NCPs-X a partir de extractos crudos de proteínas también resultó en capacidades iguales o superiores a los materiales comerciales. Finalmente se utilizó uno de los NCPs funcionales para integrarlo a un sistema purificación basado en dos fases acuosas del tipo PEG/Fosfato. Todos los sistemas estudiados mostraron un gran aumento de los factores de purificación, asimilando el proceso a un sistema comercial de purificación por cromatografía en columna.

Este trabajo sienta las bases para el desarrollo de nuevos sistemas de purificación en *batch* integrados y escalables en base a NCPs. Estos nuevos sistemas pueden potencialmente reemplazar los sistemas cromatográficos en columna, sin resignar pureza y rendimiento en la obtención de un bioproducto.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
Laboratorio de Materiales Biotecnológicos

Nanopartículas poliméricas funcionales como material para purificar proteínas

**Tesis presentada para obtener el título de Doctor de la
Universidad Nacional de Quilmes, Mención en Ciencia y
Tecnología**

Autor: Lic. Leandro J. Martínez

Director: Dr. Mariano Grasselli

2020

El presente Trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de Materiales Biotecnológicos (LaMaBio) de la Universidad Nacional de Quilmes bajo la dirección del Dr. Mariano Grasselli.

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas que me acompañaron y compartieron conmigo esta aventura científica.

En primer lugar a mi director, Dr. Mariano Grasselli, por haberme seleccionado allá por el 2012 para comenzar con la beca doctoral otorgada por la ANPCyT y brindarme la oportunidad de entrar a un universo totalmente distinto del que venía acostumbrado. Durante este proceso me ha brindado su completo apoyo, paciencia, tiempo y conocimientos. Todo lo aprendido en el transcurso de este tiempo me ha marcado personal y profesionalmente, y me acompañará por el resto de mi vida.

Otro especial agradecimiento a Mirna S, Silvia S y Laura C por su gran apoyo durante la primera etapa de este Trabajo de Tesis. Sin ellas el día a día en el laboratorio hubiera sido mucho más difícil.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) ya que a través de sus becas he podido llevar a cabo la presente Tesis Doctoral.

A las autoridades de la Universidad Nacional de Quilmes por haberme permitido llevar a cabo mis estudios de grado y postgrado, y a todo su personal que día a día trabaja y soporta el trabajo de nosotros, los científicos. Un agradecimiento especial a Bruno y Néstor por su incansable apoyo.

A todos los integrantes que pasaron por el Laboratorio de Materiales Biotecnológicos (LaMaBio), en especial al grupo que siempre aguantó mis chistes y bailes dentro y fuera del laboratorio, y que han hecho muy ameno el desarrollo del presente Trabajo: Flavia Q, Estefi A, Pame K, Claudia G, Costy A, Cony F, Silvia S, Flor R, Mir S y Gonza C. Y también a los chicos del “laboratorio de enfrente”, Andre, Santiago, Hugo, Mati, Sole, Vale y Eli. Todos quedarán en mi recuerdo.

A los compañeros del Laboratorio de Biomembranas de la UNQ, en especial a la Dra. Silvia Alonso y a todo su grupo, que siempre me apoyó y me dio una mano.

Al Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE) de la Facultad de Ciencias Exactas (UBA) y a todos sus investigadores, en especial al Dr. Roberto Candal por su colaboración para realizar los ensayos de medición de tamaño de partícula.

A mi familia, en especial a mis padres Irene y Quique, por ayudarme en esta semejante tarea, por insistir en que nunca baje los brazos y por bancarme en este largo camino del doctorado.

A mis amigos, Juancho A, Cristian B, Yamil M, Javi M y Diego Z, quienes son mis pilares fuera del ámbito científico, y que siempre aportaron su grano de arena para que hoy sea lo que soy.

A mi gran compañera de proyectos y gran amiga Mirna S. Por los viajes, charlas, discusiones, y demás aventuras que hicieron de los años durante el doctorado de los mejores que quedarán en mi recuerdo.

Y por último a mi amor y compañera de vida Sofía L. y a mi hija Luciana M. Por darme todo su amor y hacer realidad nuestro sueño de formar una familia, bancarme largos ratos de escritura, picos de estrés y hacer que cada día sea más lindo.

Mil gracias a todos, sin Uds. no habría llegado a esta instancia.

Producción científica relacionada con este Trabajo de Tesis

Artículos en revistas científicas

Sánchez, M. L., Gimenez, C., Martínez, L. J., Radrizzani, M., & Grasselli, M. (2020). **Disposable Micropipette Tip for Purifying DNA Fragments. Biotechnology and Bioprocess. Engineering**, 1-9.

Sánchez, M. L., Giménez, C. Y., Delgado, J. F., Martínez, L. J., & Grasselli, M. (2017). **Chromatographic matrix based on hydrogel-coated reticulated polyurethane foams, prepared by gamma irradiation**. Radiation Physics and Chemistry, 141, 300-311.

Grasselli, M., Espinoza, S. S., Martínez, L. J., Casajus, G., Siri, M., Alonso, S., & Smolko, E. E. (2015). **Nanostructuring Materials by Ionizing Radiation Technology: Protein Nanoparticle Preparation and Functionalization of Track Etched Membranes**. Nanoscale Radiation Engineering of Advanced Materials for Potential Biomedical Applications, 17.

Martínez, L. J., Sánchez, M. L., Kikot, P., Candal, R., & Grasselli, M. (2014). **Preparation of functional currant-bun-like fumed silica/polymethacrylate nanoparticles by radiation-induced polymerization**. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 463, 110-117.

Trabajos en eventos científico-tecnológicos publicados

Leandro J. Martínez y Mariano Grasselli. **“Nanocompuestos poliméricos funcionales de sílica y polimetacrilatos para purificación de proteínas”**. XVI Encuentro Nacional de Superficies y Materiales Nanoestructurados. Universidad de Buenos Aires (UBA). 09 - 13 de Mayo de 2016

Leandro J. Martínez y Mariano Grasselli. **“Nanopartículas poliméricas funcionales como material para purificar proteínas”**. II Jornada de Doctorandos y Estudiantes Avanzados de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires. 13 - 15 de Octubre de 2015

Leandro J. Martínez y Mariano Grasselli. **“Preparación de Nanopartículas Funcionales Compuestas SiO₂ – Poli (glicidil metacrilato & dietilenglicol metacrilato) Mediante Radiación Ionizante”**. Nano-Córdoba 2014, Córdoba. 22 -24 de Octubre de 2014

Leandro J. Martínez, Estefanía Achilli y Mariano Grasselli. **“Nanopartículas compuestas sílica – polimetacrilato sulfonado como material para la adsorción específica y reversible de proteínas”**. XIV Encuentro Nacional de Superficies y Materiales Nanoestructurados. San Carlos de Bariloche, Río Negro. 14 - 16 de Mayo de 2014

Leandro J. Martínez, Mirna L. Sánchez y Mariano Grasselli. **“Síntesis de nanopartículas funcionales sílica – polimetacrilato mediante radiación ionizante”**. XII Encuentro Nacional de Superficies y Materiales Nanoestructurados. Mar del Plata, Buenos Aires. 8 - 10 de Mayo de 2013

Leandro J. Martínez, Silvia L. Soto Espinoza, Silvia Alonso y Mariano Grasselli. **“Scanning Ion Occlusion Spectroscopy. A new tool to study nanoparticles”**. XLI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. San Javier, Tucumán. 5 - 7 de Diciembre de 2012

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AE: Actividad Específica

AEM: Capacidad de adsorción específica máxima

AFM: *Atomic Force Microscopy*

ATPS: *Aqueous Two Phase Separation*

Av: Avímero (simil- Proteína A)

BCit: Buffer Citrato 10 mM pH=3

BHb: Hemoglobina bovina

BP₁: Buffer Fosfato 50 mM pH=7

BP₂: Buffer Fosfato 50 mM pH=7 NaCl 20 mM

BSA: Albúmina de suero bovino

C*: Concentración de proteínas en el sobrenadante en el equilibrio

CAf: Cromatografía por afinidad

C_f: es la concentración final de proteína en el buffer de elución

CII: Cromatografía de intercambio iónico

CM: Carboximetil

C₀: Concentración inicial de proteína en el buffer de adsorción

DEAE: Dietilaminoetil

DEAEMA: DEAE metacrilato

DLS: *Dynamic light Scattering*

DMA: Dimetilacrilamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

DSP: *Downstream Processing*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FESEM: Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

FI: Fase inferior

FP: Factor de purificación

FS: *Fumed Sílica*

FSup: Fase superior

FS-x&pGMA: NCPs sin purificar (con homopolímero)

FTIR: Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier

FTIR-ATR: FTIR con módulo de reflectancia total atenuada

GFP_{rCys1}: Proteína verde fluorescente con etiqueta N-terminal HCHSHS

GMA: Glicidil metacrilato

IDA: Ácido iminodiacético

IgG: Inmunoglobulina G

IgG: Inmunoglobulina G

IMAC: Cromatografía con iones metálicos inmovilizados

IMAC-Seph: *IMAC Sepharose 6 Fast Flow*

kGy: kilogray

LYZ: Lisozima

MAA: Ácido metacrílico

NCPs: Nanocompuestos poliméricos

NCPs-Av: NCPs con Avímero inmovilizado

NCPs-IDA/Ni⁺²: NCPs con IDA inmovilizado y NiCl₂

NCPs-IDA: NCPs con IDA inmovilizado

NCPs-S: NCPs sulfónicos

NCPs-X: NCPs funcionales

NCs: Nanocompuestos

NPs: Nanopartículas

NS: Sílica nanoparticulada

ON: *Overnight*

PBS: Buffer Fosfato 10 mM pH=7.4, NaCl 137 mM y 2.7 mM KCl

PC: Policarbonato

PE: Polietileno

PEG: Polietilenglicol

PEGDA: Polietilenglicol diacrilato

PET: Polietileno de tereftalato

pGMA: Poli Glicidil metacrilato

PI: Punto isoeléctrico

PM: Peso molecular

PP: Polipropileno

PPM: Patrón de peso molecular

PS: Poliestireno

PU: Poliuretano

PVBT: Polivinil bencil trimetilamonio cloruro

Q: Amonio cuaternario

Q_{máx}: Capacidad de adsorción máxima

RFU: Unidades relativas de fluorescencia

S: Sulfoetil

SDS-PAGE: Electroforesis desnaturalizante en gel de Poliacrilamida

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SIOS: Espectroscopia de Oclusión Iónica

SP: Sulfopropil

SP-Seph: Sulfopropyl-Sepharose

TA: Temperatura ambiente

TCEP: Tris (2-carboxietil) fosfina hidrocloreto

TD: Temperatura de degradación

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TGA: Termogravimetría

THF: Tetrahidrofurano

UE: Unidades enzimáticas

VBTA: Cloruro de vinil bencil trimetilamonio

V₀: Volumen inicial de buffer de adsorción

W: Peso seco de NCPs-X

Y: Rendimiento

Índice general

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

La tecnología.....	1
Nanotecnología y Nanomateriales.....	3
Clasificación de los nanomateriales.....	5
Revolución nanotecnológica.....	9
Aplicaciones de la nanotecnología.....	9
Recuperación y purificación de proteínas.....	11
<i>Cromatografía de intercambio iónico.....</i>	<i>12</i>
<i>Cromatografía de afinidad.....</i>	<i>14</i>
<i>Cromatografía con iones metálicos inmovilizados.....</i>	<i>14</i>
<i>Cromatografía de afinidad para inmunoglobulinas.....</i>	<i>15</i>
Integración de procesos de DSP.....	16
<i>Sistemas de dos fases acuosas.....</i>	<i>17</i>
<i>Cromatografía de lecho expandido.....</i>	<i>18</i>
<i>Sistemas de flujo convectivo.....</i>	<i>19</i>
<i>Sistemas de fibras adsorbentes.....</i>	<i>20</i>
Aplicación de nanomateriales a la purificación de proteínas.....	21
Objetivo del Trabajo de Tesis.....	23

CAPÍTULO 2

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCOMPUESTOS POLIMÉRICOS

2.1 Introducción.....	25
Nanocompuestos.....	25
Nanocompuestos poliméricos en base a silicio.....	27

Silicatos	28
<i>Usos de silicatos</i>	28
Fumed Sílica	29
<i>Aplicaciones de la Fumed Sílica</i>	30
Polímeros	30
<i>Síntesis de polímeros</i>	31
<i>Peso molecular promedio</i>	32
<i>Propiedades estructurales</i>	33
<i>Clasificación de polímeros</i>	33
<i>Glicidil metacrilato</i>	34
<i>Poli glicidil metacrilato</i>	34
Modificación química por injerto	35
Modificación por injerto inducida por radiación ionizante	36
<i>Métodos de polimerización radioinducida</i>	37
Técnicas fisicoquímicas de caracterización	41
<i>Dispersión dinámica de la luz</i>	41
<i>Espectroscopía de oclusión iónica</i>	43
<i>Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier</i>	44
<i>Análisis Termogravimétrico</i>	45
<i>Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo</i>	46
<i>Potencial Z</i>	47
2.2 Materiales y métodos	49
2.2.1 Materiales	49
2.2.2 Metodología	49
<i>Preparación de NCPs</i>	49
<i>Análisis por Dispersión Dinámica de la Luz</i>	50
<i>Análisis por Espectroscopía de Oclusión Iónica</i>	51
<i>Análisis por Espectroscopía FTIR</i>	51
<i>Análisis Termogravimétrico</i>	51

<i>Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo</i>	52
<i>Determinación de Potencial Z</i>	52
2.3 Resultados y Discusión	53
Determinación de la concentración de GMA	53
Determinación del tipo de SiO₂ a utilizar	54
Preparación de compuestos FS-x&pGMA	56
Polimerización del GMA sobre FS	57
Extracción de NCPs	57
Ensayos de caracterización	59
<i>Caracterización por Dispersión Dinámica de la luz</i>	59
<i>Caracterización por Espectroscopía de Oclusión Iónica</i>	61
<i>Caracterización por Espectroscopía FTIR-ATR</i>	61
<i>Análisis Termogravimétrico</i>	64
<i>Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo</i>	65
<i>Determinación del Potencial Z</i>	67
<i>Relación FS/pGMA en los NCPs</i>	68
2.4 Conclusiones parciales	71

CAPÍTULO 3

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCOMPUESTOS POMILÉRICOS FUNCIONALES

3.1 Introducción	73
Interacción de NPs con proteínas	74
Inmovilización de ligandos de afinidad sobre materiales epoxidados	76
NCPs como adsorbentes proteicos	76
3.2 Materiales y Métodos	78
3.2.1 Materiales	78

3.2.2 Metodología.....	78
Incorporación de grupos sulfónicos.....	78
Inmovilización de Avímero.....	79
Incorporación de ácido iminodiacético.....	79
Caracterización de NCPs funcionales.....	80
3.3 Resultados y discusión.....	81
Preparación de NCPs-X.....	81
Caracterización de NCPs-X.....	84
<i>Análisis del tamaño de partícula.....</i>	<i>84</i>
<i>Análisis por Espectroscopía FTIR-ATR.....</i>	<i>86</i>
<i>Análisis Termogravimétrico.....</i>	<i>87</i>
<i>Análisis del Potencial Z.....</i>	<i>89</i>
3.4 Conclusiones parciales.....	91

CAPÍTULO 4

PROPIEDADES ADSORTIVAS DE NANOCOMPUESTOS POLIMÉRICOS FUNCIONALES

4.1 Introducción.....	93
4.2 Materiales y Métodos.....	97
4.2.1 Materiales.....	97
4.2.2 Metodología.....	97
Procedimiento de adsorción/desorción de proteínas.....	97
Capacidad de adsorción máxima.....	99
Capacidad de adsorción específica máxima.....	99
Cinética de adsorción.....	100
Isoterma de Langmuir.....	100

4.3 Resultados y Discusión.....	101
Análisis preliminar de adsorción específica de proteínas	
en NCPs- S.....	101
Estudio de las propiedades adsortivas de NCPs-X.....	103
<i>Propiedades adsortivas de NCPs-S.....</i>	<i>105</i>
<i>Propiedades adsortivas de NCPs-Av.....</i>	<i>108</i>
<i>Propiedades adsortivas de NCPs-IDA/Ni⁺².....</i>	<i>110</i>
4.4 Conclusiones parciales.....	113

CAPÍTULO 5

APLICACIÓN DE NANOCOMPUESTOS POLIMÉRICOS FUNCIONALES

5.1 Introducción.....	115
Esquema de purificación de una proteína.....	115
5.2 Materiales y Métodos.....	117
5.2.1 Materiales.....	117
5.2.2 Metodología.....	117
Procedimiento de adsorción.....	117
Actividad enzimática de Lisozima.....	118
Actividad específica.....	119
Factor de purificación.....	119
Rendimiento.....	119
Sistemas de dos fases acuosas.....	120
Sistemas de dos fases acuosas con NCPs-IDA/Ni⁺².....	120
Electroforesis desnaturalizante en gel de	
poli acrilamida.....	121

5.3 Resultados y Discusión.....	122
Purificación de LYZ a partir de clara de huevo con NCPs-S.....	123
Purificación de IgG a partir de suero de sangre con NCPs-Av.....	125
Purificación de GFP _{PrCys1} a partir de un lisado celular de <i>E. Coli</i> con NCP- IDA/Ni ⁺²	127
Sistemas de dos fases acuosas con NCPs-IDA/Ni ⁺²	129
5.4 Conclusiones parciales.....	133

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

Conclusiones generales del Trabajo de Tesis.....	135
Referencias Bibliográficas.....	139

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

La tecnología

La aplicación de los conocimientos científicos a la vida socio-cultural del hombre es lo que conocemos comúnmente como tecnología. Desde la antigüedad el hombre ha creado continuamente nuevas herramientas que han mejorado su calidad de vida. Desde herramientas muy simples de piedra y posteriormente de diferentes metales y aleaciones hasta llegar en la actualidad a desarrollar, entre otras cosas, computadoras, armas atómicas y vehículos (autos, aviones, satélites y naves espaciales). En determinados momentos históricos se han generado verdaderas *revoluciones tecnológicas*, caracterizadas por el desarrollo de nuevos conocimientos y la implementación de nuevas tecnologías que modificaron de manera muy importante la civilización humana. Podemos citar la revolución industrial en Inglaterra (1780 – 1840) como una de las transformaciones tecnológicas más importantes de la era moderna. Durante esta etapa la capacidad de producción de bienes se incrementó a partir del uso de nuevas fuentes de energía, como la máquina de vapor de James Watt. Posterior a dicha revolución, podemos destacar la revolución norteamericana (1900 – 1950), caracterizada por el desarrollo de la electricidad y por la producción en masa de automóviles.

Si bien algunos autores marcan el año 1543 como el inicio la Revolución Científica, con la edición de la teoría heliocéntrica de Copérnico (Moledo y Olszevicki, 2014), no fue hasta los siglos XIX y XX donde se desarrollaron las disciplinas científicas más específicas como la biología, la química, la medicina y la geología, entre otras. En el área biológica, con la elucidación de la estructura tridimensional del ácido desoxirribonucleico en 1953 por J. Watson y F. Crick se desarrolló una nueva revolución tecnológica denominada *Biotecnología*. La misma tiene como fundamento el estudio y el aprovechamiento económico de los mecanismos e interacciones biológicas presentes en los seres vivos.

La Biotecnología, a su vez, esta interrelacionada con numerosas áreas tecnológicas. Una de las más importantes es la referida a la atención de la salud, tanto en el desarrollo de nuevos tratamientos de enfermedades como con la producción de proteínas recombinantes. También contribuye en otras áreas como la agricultura, con mejoras en cultivos genéticamente modificados; en usos no alimentarios de cultivos, por ejemplo plásticos biodegradables, aceites vegetales y biocombustibles; el cuidado medioambiental a través de, el reciclaje, el tratamiento de residuos y la biorremediación de sitios contaminados por actividades industriales.

Todas estas revoluciones marcaron la historia de la humanidad ya que cada una de éstas impulsó un cambio importante a nivel socio-cultural respecto de la época precedente. Sin embargo, aún sin finalizar el ciclo expansivo de la Biotecnología y con la misma en pleno auge, en los últimos años surgió una nueva rama tecnológica denominada *Nanotecnología*. Uno de los pioneros en este campo fue el estadounidense Richard Feynman (Feynman 1959), premio Nobel de Física en 1965 por sus contribuciones al desarrollo de la electrodinámica cuántica. En su conferencia “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” en la *American Physical Society* (Caltech, 1959), consideró la posibilidad de la manipulación de átomos individuales como una forma más poderosa de química sintética que las usadas en ese momento. La conversación pasó desapercibida y no generó expectativas en los investigadores de la época. Sin embargo, en la década de los noventa la conferencia fue redescubierta y difundida como un acontecimiento fundamental en el campo, probablemente para impulsar la historia de la nanotecnología y la reputación de Feynman.

Hoy en día, existe una tendencia mundial relacionada con la tecnología que se refiere a estudiar, generar y aplicar materiales a escala nanométrica. Nuestro país también ha adoptado a la Nanotecnología dentro del proyecto estratégico de desarrollo en Ciencia y Tecnología a través del decreto 380/2005 del Poder Ejecutivo Nacional. A partir del mismo se creó la Fundación Argentina de Nanotecnología (FAN), cuya responsabilidad principal es fomentar la generación de valor agregado en la producción nacional a través del desarrollo de las nano y micro-tecnologías (Salvarezza 2011).

En las últimas dos décadas se ha registrado un incremento exponencial de publicaciones científicas relacionadas con la preparación y aplicación de nanopartículas inorgánicas (Fortina *et al*, 2007; Salata *et al*, 2004; Ko *et al*, 2016; Petran *et al*, 2016). Es importante destacar que tanto la estabilidad como la toxicidad de los nanomateriales son factores cruciales que limitan su utilidad en las aplicaciones biotecnológicas. Es por esto que en los últimos años, nanopartículas (NPs) basadas en componentes orgánicos han despertado el interés tanto de investigadores como de la industria biotecnológica. Dentro de esta nueva categoría de materiales se encuentran los nanomateriales basados en polímeros naturales como la celulosa (Moon *et al*, 2011) y proteínas (Zhang *et al*, 2002; Espinoza *et al*, 2012), y los basados en polímeros sintéticos (Rao *et al*, 2011).

Nanotecnología y Nanomateriales

Podemos encontrar la siguiente definición sobre nanotecnología en el diccionario español:

“Diseño, caracterización, producción y aplicación de materiales, dispositivos y sistemas mediante el control de su forma y tamaño a escala nanométrica”.

Durante los últimos 30 años, el concepto de realizar investigaciones y desarrollo a escala nanométrica fue variando en relación a los avances de la ciencia, y generando desacuerdos internacionales en cuanto a su definición. La *International Standardization Organization* (ISO) definió a través del Comité Técnico 229 del año 2005 sobre nanotecnologías (ISO/TC 229) que un nanomaterial debe cumplir al menos una de las siguientes afirmaciones (Michael 2005):

1. La comprensión y el control de la materia y de los procesos a nanoescala puede ser no necesariamente por debajo de los 100 nm. Deben aparecer los fenómenos dependientes de la nano-estructuración que permitan aplicaciones novedosas.

2. Utilizar las propiedades de los materiales nanoestructurados que difieren de las propiedades de los átomos individuales, las moléculas y la materia a granel, para crear materiales, dispositivos y sistemas mejorados que exploten estas nuevas propiedades.

En el año 2011 la *Unión Europea* (UE) recomendó definir a un nanomaterial como a cualquier material ya sea natural, incidental o manufacturado que contenga partículas unidas, agregadas o aglomeradas, y en donde al menos el 50% de las partículas presente una o más dimensiones en el intervalo comprendido entre 1 y 100 nm. En casos específicos y cuando se justifique por estudios relacionados con el medio ambiente, salud, seguridad o competitividad, el umbral de la granulometría numérica del 50% puede sustituirse por un umbral comprendido entre el 1% y el 50%.

Según la definición de la UE, quedarían fuera de esta clasificación muchos materiales capaces de adquirir características funcionales propias de la nano-estructuración pero con dimensiones mayores a los 100 nm. Es por esto que la *National Science Foundation* (NSF) definió a la nanotecnología de una forma más general, integrando nano-dispositivos y nano-materiales con sistemas y arquitecturas microscópicas pero que mantengan las propiedades derivadas de la nano-estructuración. La misma acepta que, en algunos casos, una dimensión crítica se puede encontrar por debajo de 0,1 nm (manipulación de átomos) o por encima de los 100 nm, como por ejemplo NPs poliméricas de 100 a 500 nm de diámetro.

Más allá de que actualmente no exista un convenio internacional y unilateral para definir este término, es importante destacar a la Nanotecnología como una tecnología multidisciplinaria que tiene como fin estudiar materiales nanoestructurados con propiedades mecánicas, ópticas, químicas, magnéticas o electrónicas distintas de las que tendría el mismo material en la macroescala. Podemos citar a las ciencias químicas, físicas, biológicas y matemáticas como pilares fundamentales para estudiar y comprender esta nueva rama de la tecnología (Roco *et al*, 1999).

Sumado a la discrepancia por definir a esta nueva revolución tecnológica, recientemente se introdujo el término de *Nanobiotecnología*, la cual es una ramificación de la Nanotecnología con aplicaciones o usos exclusivamente biológicos y/o bioquímicos. En otras palabras, se refiere a la utilización de la nanotecnología como una herramienta para optimizar técnicas y procesos relacionados a la biotecnología.

Clasificación de los nanomateriales

En el ámbito de la física atómica y la química, la configuración electrónica indica la manera en la cual los electrones se estructuran en un átomo de acuerdo con el modelo atómico de Bohr. Esta disposición es importante ya que básicamente determina las propiedades del material. En un nanoobjeto, donde el movimiento de los electrones está limitado a las dimensiones del mismo, la proporción de átomos presentes en la superficie con respecto al interior es muy superior a la de otros objetos de mayores dimensiones. De esta manera, se pueden obtener distintas configuraciones de un mismo objeto (material) con características variables que dependerán exclusivamente de su tamaño (Díaz del Castillo 2012). Un claro ejemplo de esto sucede con los *quantum dots* o puntos cuánticos (partículas compuestas por semiconductores preparadas de Cd y Se) que al ser irradiados con luz UV, re-emiten luz en una longitud de onda específica dependiendo del tamaño del material (**Figura 1.1**).

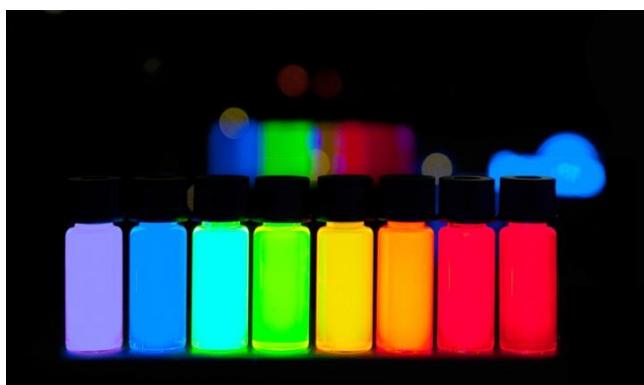


Figura 1.1

Kit comercial producido por PlasmaChem (<https://www.plasmachem.com>)

Quantum dot de ZnCdSeS de diferentes dimensiones, con emisiones en el azul (470-480 nm), cyan (490-500 nm), verde (510-550 nm), amarillo (560-580 nm) y naranja (590-610 nm)

La fabricación a nivel nanométrico exige un enfoque interdisciplinar tanto en la investigación como en los procesos de síntesis. Conceptualmente se pueden considerar dos vías de trabajo, una denominada “*Top – down*” o enfoque de arriba hacia abajo (métodos físicos) y otra “*Bottom – up*” o enfoque de abajo hacia arriba (métodos químicos). Estos términos fueron aplicados en el campo de la Nanotecnología por primera vez en el año 1989 en el *Instituto Foresight* con el fin de distinguir entre la fabricación convencional que diseña nanodispositivos a partir de objetos más grandes (*Top – down*) de los procesos de autoensamblado molecular (*Bottom – up*). Los primeros se basan principalmente en la molienda mecánica y/o el pulverizado de macro/microestructuras hasta llegar a la escala nanométrica. De manera general se puede decir que estos métodos producirán NPs grandes y de distribuciones de tamaño anchas. Por el contrario, NPs producidas por crecimiento a partir de precursores moleculares suelen ser de menor diámetro y distribuciones de tamaño más estrechas (Iqbal *et al*, 2012).

La Agencia de Protección del Medio Ambiente (en inglés: *Environmental Protection Agency*, EPA) es una agencia del gobierno federal de Estados Unidos encargada de proteger la salud humana y proteger el medio ambiente. La misma ha clasificado los nanomateriales actuales según su naturaleza química en cuatro tipos:

➤ **Basados en carbono:** materiales compuestos mayoritariamente por carbono (**Figura 1.2**). Pueden adoptar diversas formas como esferas huecas, elipsoides o tubos. Los nanomateriales de carbono con forma elipsoidal o esférica se conocen como fullerenos, mientras que los cilíndricos reciben el nombre de nanotubos. También pueden adoptar forma laminar, los cuales se denominan láminas monoatómicas de grafeno. Estos materiales tienen potencial aplicación en el desarrollo de recubrimientos, generando materiales más ligeros y resistentes, y en diversas aplicaciones en el campo de la electrónica.

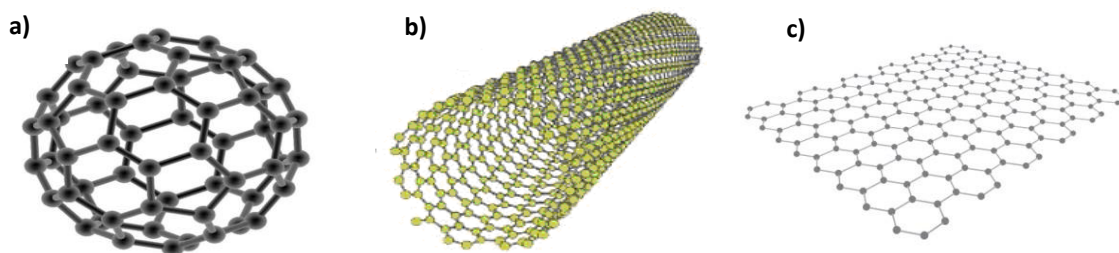


Figura 1.2

Representaciones computacionales de:

a) Fullerenos C_{60} , **b)** Nanotubo de carbono y **c)** Lámina de grafeno
(Extraído de Díaz del Castillo, 2012)

➤ **Dendrimeros:** polímeros ramificados simétricos tridimensionales de tamaño nanométrico, contruidos a partir de unidades monoméricas (**Figura 1.3**). Tienen una estructura química precisa, es decir, los enlaces químicos entre los átomos pueden ser descritos con exactitud. Su superficie posee numerosos extremos que pueden ser adaptados para desempeñar funciones químicas específicas. Los dendrimeros han recibido gran atención en los últimos años debido a su utilización en diversas aplicaciones tales como catálisis a nanoescala, sensores químicos, micelas unimoleculares, imitación de la función de las enzimas, encapsulación de moléculas, reconocimiento molecular, agentes de diagnóstico y también como vehículos para el transporte de genes y fármacos (Patel *et al*, 2013).

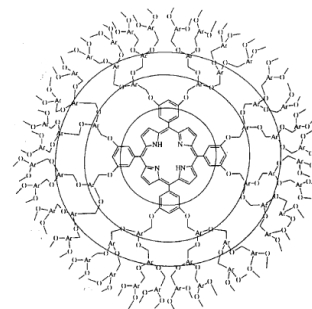


Figura 1.3

Representación esquemática de un dendrímoro porfirínico(Extraído de Montanari *et al*, 1997)

➤ **Basados en metales:** nanomateriales preparados generalmente a partir de precursores moleculares (métodos químicos) entre los que se encuentran los puntos cuánticos, y todo tipo de NPs metálicas (**Figura 1.4**).

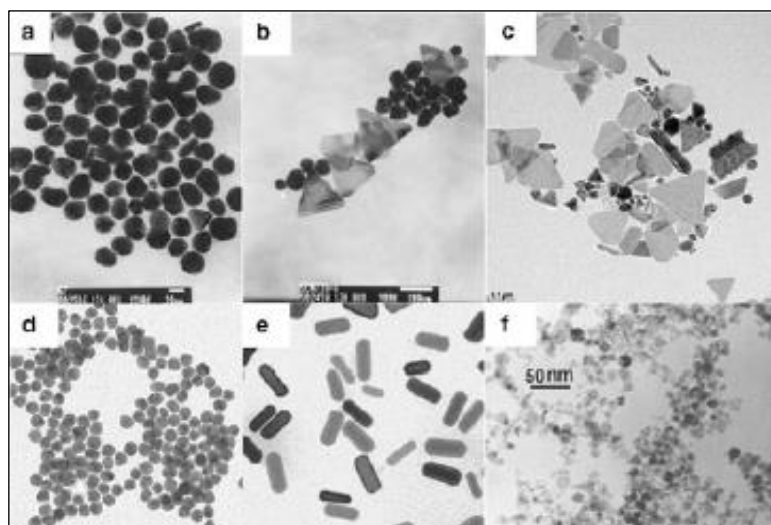


Figura 1.4

Imágenes TEM de:

a), b) y c) NPs de plata esféricas y triangulares; d) y e) NPs de oro esféricas y en forma de bastón; f) NPs esféricas de dióxido de Titanio.
(Extraído de Sondi et al, 2003)

➤ **Compuestos:** Son combinaciones entre distintos tipos de NPs, sean o no del mismo material o tamaño (Figura 1.5). Por ejemplo, NPs de oro se han añadido a numerosos productos, por lo general poliméricos, para generar NPs tipo *core-shell* o nucleo-envoltura que mejoran sus propiedades mecánicas y térmicas.

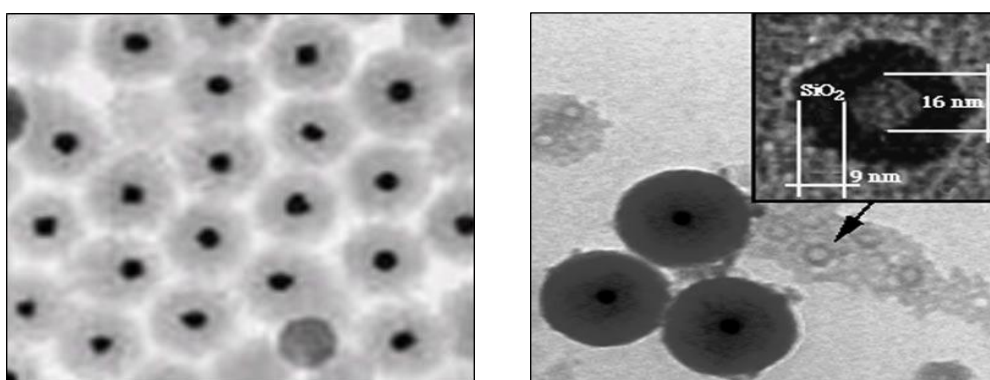


Figura 1.5

Imágenes TEM de NPs de oro recubiertas con sílice (core-shell)

(Extraído de Oldfield et al, 2000)

Revolución nanotecnológica

Aunque la Nanotecnología se encuentra aún en sus primeras etapas de desarrollo, los investigadores consideran que constituirá una auténtica revolución industrial en el siglo XXI, de forma similar a lo sucedido con la Biotecnología y la electrónica en el siglo XX. Cada año se realizan inversiones millonarias a nivel global destinadas a investigación básica en Nanotecnología. Se calculó para el 2014 una inversión global cercana a los 170 billones (10^{12}) de dólares (Dong *et al*, 2016). En el año 2015, el presidente Obama de los Estados Unidos propuso una inversión de 1.5 billones de dólares para el financiamiento de la NNI (*National Nanotechnology Initiative*) (Gao *et al*, 2015). Corea invierte cerca de 200 millones de dólares al año, mientras que Taiwán y China más de cien millones. Al mismo tiempo, se siguen promoviendo iniciativas para seguir aumentando las inversiones, lo que genera aumentos exponenciales en el número de artículos científicos y solicitudes de patentes de invención. No cabe duda de que la Nanotecnología se convirtió en el proyecto científico de mayor financiación mundial, siendo actualmente una de las áreas más prometedoras de la ciencia y tecnología moderna con un gran impacto económico y social (Díaz del Castillo 2012).

Aplicaciones de la nanotecnología

La Nanotecnología se focaliza básicamente en aprovechar una propiedad o característica de algún material manipulado a escala nanométrica para mejorar las cualidades de un sistema macroscópico ya existente. Los avances en ciencia sobre nanomateriales revolucionarán los más diversos sectores productivos. A modo de ejemplo, podemos citar nuevas cremas solares, superficies autolimpiantes y bactericidas, sistemas de almacenamiento de datos, NPs para dosificación de fármacos, nuevos materiales reforzados con nanotubos, biosensores, baterías, y hasta tejidos y nanorecubrimientos “inteligentes”. También se emplean NPs para reforzar materiales o funcionalizar cosméticos, y para conseguir superficies resistentes al rayado, hidrófugas, limpias o estériles (del Castillo Rodríguez 2012).

El injerto selectivo de moléculas orgánicas a través de la nanoestructuración superficial permitirá avanzar en la fabricación de biosensores y de dispositivos electrónicos moleculares. La producción industrial de alimentos es uno de los sectores industriales beneficiados a partir de estos avances a través de la implementación de nanobiosensores que podrían detectar microorganismos patógenos en los alimentos. Por otro lado, los nanocompuestos (NCs), más conocidos en inglés como *nanocomposites*, podrían servir también en la fabricación de alimentos, al incrementar la resistencia mecánica y térmica, y disminuir la transferencia de oxígeno en los productos envasados con este tipo de materiales.

En los últimos años la Nanotecnología también ha generado grandes avances en el campo de la salud. La liberación controlada y dirigida de fármacos, conocida como *drug delivery*, es uno de los campos más activos y prometedores de la nanomedicina. Se trata de sistemas que poseen la capacidad de administrar drogas durante un período prolongado de tiempo a una tasa de liberación controlada, permitiendo niveles constantes del fármaco en el organismo y/o a su vez, direccionando la droga hacia el sitio de acción.

Esta metodología de administración de fármacos posibilita la reducción de los efectos secundarios tóxicos del fármaco y aumenta la eficiencia de la terapia, como fue recientemente demostrado para el Vismodegib (Calienni *et al*, 2019). Las aplicaciones en nanomedicina a corto plazo incluyen las ya mencionadas plataformas para *drug delivery*, agentes mejorados para contraste en los diagnósticos por imágenes, “*nanolabs*” basados en chips capaces de controlar y manipular células individuales, y sondas a nanoescala que permiten rastrear los movimientos de las células y moléculas individuales a medida que se mueven en su entorno (Parashar *et al*, 2008).

La Nanotecnología también ha demostrado tener relevancia en la purificación de macromoléculas biológicas. Un claro ejemplo de esto fue la miniaturización del proceso de purificación de ADN lograda a partir del desarrollo de nuevas técnicas que utilizan nanogramos de una resina de sílice como material adsorbente (Tian *et al*, 2000).

La utilización de nanomateriales en la purificación de proteínas se remonta a principios de los años noventa. Si bien en aquella época no era habitual resaltar el uso o la aplicación de NPs, investigadores estudiaron esferas sub-micrométricas, de diámetros en el orden de 0,3 y 0,9 μm en base a hidrogeles termosensibles con capacidad de adsorción de proteínas termo-dependiente. Los estudios comprobaron que por debajo de cierta temperatura, denominada como “*lower critical solution temperature*” (LCST), la superficie de las microesferas fue capaz de volverse altamente hidrófila, provocando la retención de una gran cantidad de agua en su interior y suprimiendo así la capacidad de adsorción de cualquier otro tipo de biomolécula. Por el contrario, por encima de la LCST las microesferas se tornaron hidrofóbicas y se deshincharon considerablemente, siendo susceptibles a la adsorción de una gran cantidad de proteínas (Kawaguchi *et al*, 1992).

Como se detalló anteriormente, la Nanotecnología puede tener participación en una gran variedad de ramas tecnológicas. De este modo, el objetivo planteado en este Trabajo de Tesis se enfoca específicamente al estudio de materiales poliméricos nanoestructurados aplicados a la recuperación y purificación de proteínas.

Recuperación y purificación de proteínas

A escala industrial la producción de proteínas, tanto naturales como recombinantes, involucra una serie de etapas que se pueden dividir en dos grandes áreas, más conocidas en inglés como *Upstream* and *Downstream* (DSP). La primera involucra los procesos de fermentación y la segunda la recuperación y purificación del producto.

En el estado actual de la tecnología de los bioprocesos se observa un gran avance en los procesos fermentativos aplicados a la industria farmacéutica, principalmente con el desarrollo y el empleo de diferentes técnicas de expresión de proteínas recombinantes. Sin embargo, los procesos de DSP son los que inciden más fuertemente en el costo de producción, en especial los productos

farmacéuticos, donde pueden llegar a generar hasta el 80% de este costo. Es por esto que la Biotecnología moderna requiere del desarrollo de procesos de DSP eficientes que reduzcan los altos costos operativos (D'Souza *et al*, 2013).

La mayoría de los procesos de DSP de bioproductos están basados en separaciones cromatográficas (Jagschies *et al*, 2006). Estas se pueden clasificar en dos grandes grupos principales: *Cromatografía Adsorativa* y *No adsorativa*. En esta última el único método conocido es la *Cromatografía de Exclusión Molecular*. Dentro de las *Cromatografías Adsorativas* existen diferentes técnicas según el principio de adsorción: Cromatografía de adsorción por intercambio iónico (por carga electrostática), Cromatografía de adsorción por interacciones hidrofóbicas, Cromatografía de adsorción de afinidad (por reconocimiento específico) y electroenfoque. A continuación se detallan brevemente los métodos cromatográficos más utilizados y analizados en este trabajo.

Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico (CII) separa las moléculas en base a su carga iónica neta. La separación se lleva a cabo por la competencia entre proteínas con diferente carga superficial por grupos cargados sobre una matriz con carga opuesta. Los grupos funcionales cargados positivamente como dietilaminoetil (DEAE) y amonio cuaternario (Q), por ejemplo, son empleados rutinariamente en Cromatografía de intercambio aniónico, mientras que grupos cargados negativamente como carboximetil (CM), sulfoetil (S) y sulfopropil (SP) son utilizados como intercambiadores de cationes. En la **Tabla 1.1** se muestran algunas de las matrices de intercambio iónico más utilizadas en CII (Cummins *et al*, 2011).

Tabla 1.1
Propiedades de matrices comerciales de Intercambio Iónico
 (Adaptado de Cummins *et al*, 2011)

Matriz	Tipo de intercambiador	Tipo de material	Capacidad de carga (mg/ml)	Diámetro de partícula (μm)
DEAE Sepharose Fast Flow	Aniónico débil	Agarosa	3 – 110	45-165
DEAE Sepharose CL-6B		Agarosa	2 – 170	45-165
DEAE Sephacel		Celulosa	10 – 160	40-160
DEAE Sephadex A-50		Dextrano	2 – 110	40-120
DEAE Trisacryl M		Polímero sintético	80 – 90	40-80
DEAE Bio-Gel A		Agarosa	45	75-150
CM Sepharose Fast Flow	Catiónico débil	Agarosa	15 – 50	45-165
CM Sepharose CL-6B		Agarosa	10 – 120	45-165
CM Trisacryl M		Polímero sintético	90 – 100	40-80
Bio-Rex 70		Polímero sintético	- -	75-150
CM Bio-Gel A		Agarosa	45	75-300
CM Sephadex C-50		Dextrano	7 – 140	40-125
Q Sepharose Fast Flow	Aniónico fuerte	Agarosa	3 – 120	45-165
QAE Sephadex A-50		Dextrano	1,2 – 80	45-125
SP Sepharose Fast Flow	Catiónico fuerte	Agarosa	60	45-165
SP Sephadex A-50		Dextrano	8 – 110	45-125
SP Trisacryl M		Polímero sintético	100	25-70

En una CII, los principales factores a tener en cuenta en la selección de la fase móvil son: (i) la carga del ion *buffer*, (ii) la fuerza iónica del *buffer* y (III) el pH. Por lo general, el *buffer* Tris es utilizado con intercambiadores DEAE, mientras que los *buffers* de fosfatos y acetatos son frecuentemente utilizados con intercambiadores CM. Por otra parte, la fuerza iónica mínima del *buffer* recomendado para intercambio iónico es de aproximadamente 10 mM. El pH de la fase móvil puede ser alterado para favorecer la adsorción o elución de las proteínas. En general el valor del pH es elegido de manera que la proteína adquiera una carga neta contraria a la matriz o fase estacionaria. Esto se logra usualmente ajustando el pH alrededor de 1 unidad arriba o abajo del punto isoeléctrico (pI) de la proteína.

Cromatografía de afinidad

La Cromatografía por afinidad (CAf) es un tipo de cromatografía que se basa en la unión reversible entre la molécula de interés y un ligando bioespecífico inmovilizado en un soporte sólido inerte. Por lo general, los soportes suelen ser matrices de polisacáridos (agarosa, celulosa, dextrano) o matrices sintéticas (poliacrilato, poliacrilamida). El ligando tiene que tener dos características principales: (i) que pueda interaccionar de manera específica con la proteína blanco a través de una unión reversible, y (ii) que pueda ser inmovilizado covalentemente en una matriz de cromatografía conservando su afinidad de unión específica (Grasselli, 2015).

Existen diversas interacciones biológicas frecuentemente utilizadas en la CAf, algunas de las cuales se enumeran a continuación: (i) proteína & anticuerpo, (ii) anticuerpo & antígeno, (iii) polisacárido & lectina / glicoproteína, (iv) ácido nucleico & histonas, (v) hormonas / vitaminas & proteína portadora, (vi) glutatión & glutatión-S-transferasa (GST), (vii) iones metálicos & proteína recombinante con etiqueta de poli (His) / proteína con His en su superficie. A continuación se describen los dos tipos de CAf utilizados en este trabajo de investigación.

Cromatografía con iones metálicos inmovilizados

También conocida por sus siglas en inglés IMAC, es una de las CAf más utilizada en los laboratorios de Ingeniería Genética para obtener proteínas recombinantes purificadas de una manera rápida y sencilla. Esta técnica se basa en la interacción específica por formación de un quelato entre un metal de transición y dos moléculas orgánicas diferentes, a saber: (i) un ligando que lo fije a la matriz y (ii) la molécula de interés a purificar, en nuestro caso una proteína. La capacidad promedio de adsorción de proteínas de las matrices de IMAC es de alrededor de 10 mg/mL.

Los iones involucrados son metales de transición, considerados ácidos de Lewis (aceptores de electrones). Los componentes orgánicos deben contener átomos dadores de electrones como el oxígeno, azufre y nitrógeno. También es

fundamental la disposición espacial de dichos átomos para formar quelatos. Dentro de los aminoácidos con capacidad para interaccionar con iones metálicos están el Glu, Asp, Tyr, Cys, Met, His, Arg y Lys.

La IMAC más difundida es la que utiliza iones Cu^{+2} y Ni^{+2} . Estos cationes, a pH fisiológico, interaccionan fuertemente con la His a través de su grupo funcional Imidazol. Dado que la His es un aminoácido estadísticamente poco frecuente en la superficie de una proteína, es utilizado como una etiqueta de afinidad en los sistemas de expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*. El agregado de cuatro a seis His en el extremo C o N terminal de una proteína permite recuperarla por este método de un caldo proteico con una relativa alta afinidad (en el orden de un 80% de pureza). En la actualidad aproximadamente el 50% de las proteínas para investigación se obtiene y purifica por este sistema.

La elución en la CAf se lleva a cabo interfiriendo con la formación del complejo ternario (ligando&metal&proteína) y se puede realizar de dos maneras distintas: (i) específicamente, agregando un ligando competidor como puede ser Imidazol o EDTA (quelante de iones de mayor afinidad), o (ii) inespecíficamente, reduciendo el pH hasta provocar la protonación del N del Imidazol.

Cromatografía de afinidad para inmunoglobulinas

Existen diferentes ligandos para purificar Inmunoglobulinas (Ig) de una determinada clase por CAf. El ligando más utilizado es la Proteína A de *Staphylococcus aureus*, sin embargo también se utilizan la proteína G de *Streptococcus sp* y la proteína L de *Peptostreptococcus magnus*. En general, las proteínas A y G tienen afinidad por la cadena pesada de las inmunoglobulinas de clase G (IgG), mientras que la proteína L lo hace a cualquier clase de anticuerpo. La Ingeniería Genética permitió obtener estas proteínas de manera recombinante e incluso mejorar sus propiedades como ligando cromatográfico, por ejemplo, eliminando los dominios no deseados o aumentando la resistencia a la degradación en medio alcalino (Kangwa *et al*, 2015). Estas proteínas se inmovilizan de forma covalente sobre la matriz cromatográfica. Las IgG interaccionan a pH fisiológico y baja fuerza iónica y se eluyen acidificando la fase

móvil, siendo necesaria una neutralización de la misma una vez terminado el proceso para mantener estable la proteína de interés.

Integración de procesos de DSP

Un proceso de recuperación y purificación adecuado de una proteína tiene como objetivo un bioproducto con las siguientes características: (i) alto rendimiento, (ii) propiedades fisicoquímicas y biológicas deseadas, (iii) pureza adecuada y (iv) costo razonable. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, los procesos de DSP son actualmente el principal cuello de botella para la comercialización de bioproductos.

El escalado lineal de los tradicionales métodos de DSP ha alcanzado sus límites, generando una incapacidad para cumplir con la demanda actual, no sólo en términos de requerimiento de espacio, sino también en términos de costo, tiempo y recursos del proceso. En consecuencia, existe una demanda de tecnologías integrativas que mejoren la economía del proceso y también reduzcan el tiempo del mismo (D'Souza *et al*, 2013). Esto se puede lograr a través de tecnologías que ofrezcan una reducción en el número de operaciones unitarias durante el aislamiento inicial y en las etapas de purificación, manteniendo una alta recuperación y pureza del producto. En este sentido, surge un nuevo concepto de intensificación de procesos que se refiere a cualquier adaptación u optimización de procesos de DSP que se traduzcan en un menor uso de recursos, incluyendo por ejemplo, un menor consumo de agua, o una menor demanda de energía y por lo tanto un menor impacto ambiental (D'Souza *et al*, 2013). Una estrategia muy utilizada consiste en la integración de las etapas de



Figura 1.6
Comparación entre un proceso de DSP tradicional y uno con integración de procesos

clarificación convencional, la concentración, y la purificación inicial en una sola operación unitaria integradas (**Figura 1.6**).

Hoy en día son cuatro los tipos de tecnologías emergentes e integrativas que se están estudiando: (i) Sistemas de dos fases acuosas, (ii) Cromatografía de lecho expandido, (iii) Sistemas de flujo convectivo y (iv) Sistemas de fibras adsorbentes. Las mismas se detallan brevemente a continuación.

Sistemas de dos fases acuosas

Conocido también como ATPS (*Aqueous Two Phase Separation*). Este proceso consiste en un sistema formado por dos soluciones acuosas de diferentes polímeros, o de un polímero y una sal, a concentraciones que se mantengan inmiscibles entre ellos. Al incorporar una partícula en estos sistemas, como por ejemplo una proteína, ésta se repartirá entre las dos fases (**Figura 1.7**). Esta partición se describe mediante el coeficiente de partición K_d , definido como el cociente entre las concentraciones de la partícula en la fase superior (C_{sup}) e inferior (C_{inf}) del sistema (**Ecuación 1.1**):

$$K_d = \frac{C_{sup}}{C_{inf}} \quad (\text{Ec 1.1})$$

La partición de biomoléculas en ATPS depende de distintos factores, los cuales a su vez, interactúan entre sí, lo que dificulta el modelamiento de este fenómeno. Estas variables se dividen en factores asociados al sistema y los correspondientes a la naturaleza de la partícula en partición. Entre las principales propiedades de los ATPS que afectan la partición de partículas están la temperatura y pH del sistema, los tipos de sales y polímeros utilizados y su concentración y el PM de los polímeros involucrados.

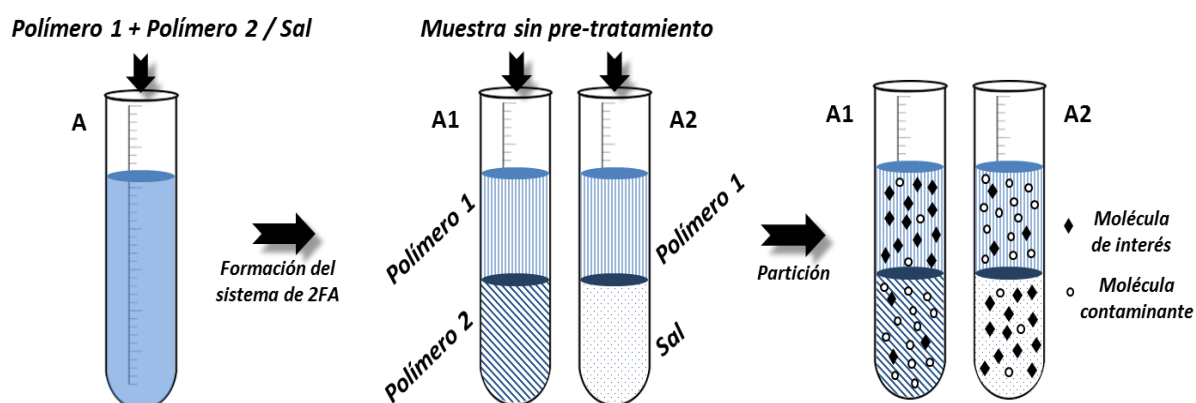


Figura 1.7

Representación esquemática de dos sistemas de dos fases acuosas (A1 y A2)

Pasos: (1) Armado del sistema, (2) Adición de la muestra y (3) Partición según la afinidad por una de las fases (K_d)

Aunque su puesta a punto y optimización suele ser muy laboriosa, en general es una técnica poderosa gracias a su simplicidad, biocompatibilidad y factibilidad de cambio de escala. Además, el método permite una extracción directa de bioproductos a gran escala a partir de un extracto crudo sin pre-tratamiento (Hatti-Kaul, 2000).

Cromatografía de lecho expandido

Conocida también como EBA (*Expanded bed adsorption*). Se diferencia de la cromatografía convencional en que el material adsorbente no está empacado, sino que se encuentra fluidizado por acción de un flujo ascendente de la fase móvil que entra al sistema por la parte inferior de la columna (**Figura 1.8**). Esto permite que tanto grandes partículas biológicas como células enteras o restos celulares, fluyan sin obstáculos a través de los huecos intersticiales entre el material adsorbente. De esta manera, y al igual que con ATPS, se pueden tratar extractos crudos sin pre-tratamiento.

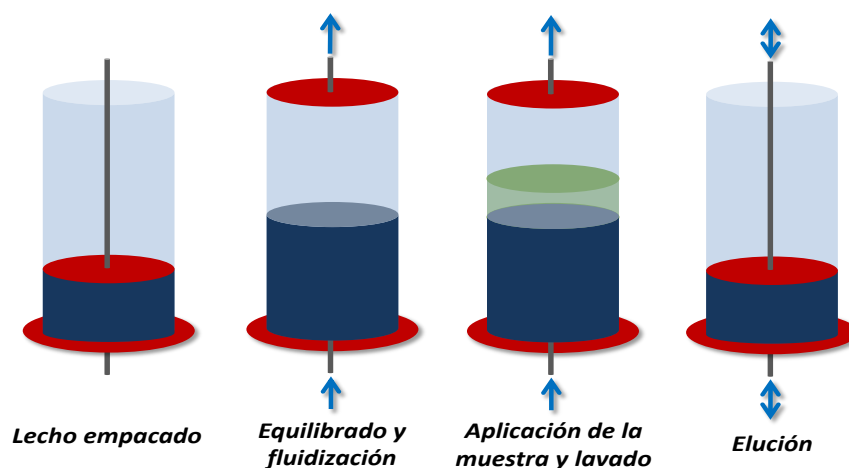


Figura 1.8
Etapas del proceso de la cromatografía de lecho expandido:
 Pasos de Izquierda a Derecha: Equilibrado, Siembra y Elución.

Sistemas de flujo convectivo

Estos sistemas utilizan una fase estacionaria formada por un material poroso de bloque único, conocidos también como columnas monolíticas (Peters *et al*, 1999). Los macroporos en esta estructura están interconectados entre sí permitiendo el transporte de masa sólo por convección por la superficie adsorbente (**Figura 1.9**).

Cabe destacar que la transferencia de masa a través de una columna cromatográfica empacada convencional se basa en dos mecanismos de transporte diferentes. Uno de ellos es la convección, mediante el cual los solutos son transportados por la fase móvil a través de la columna (y entre las partículas adsorbentes). El otro, y no menos importante, es la difusión molecular del soluto hacia el interior de los poros de las partículas adsorbentes. Este último requiere de más tiempo para el transporte de biomoléculas de gran tamaño (como ser anticuerpos, ADN plasmídico o partículas virales) que es aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que el correspondiente a los iones y moléculas pequeñas. Por otro lado, la difusión también se ve afectada porque los poros no son lo suficientemente grandes respecto de las biomoléculas en cuestión ($\text{diámetro del Poro} / \text{diámetro de la biomolecular} \leq 10$). Por lo tanto los procesos difusionales ralentizan la cromatografía en columna empacada frente a las

columnas monolíticas, si se quiere mantener la eficiencia del proceso de adsorción.

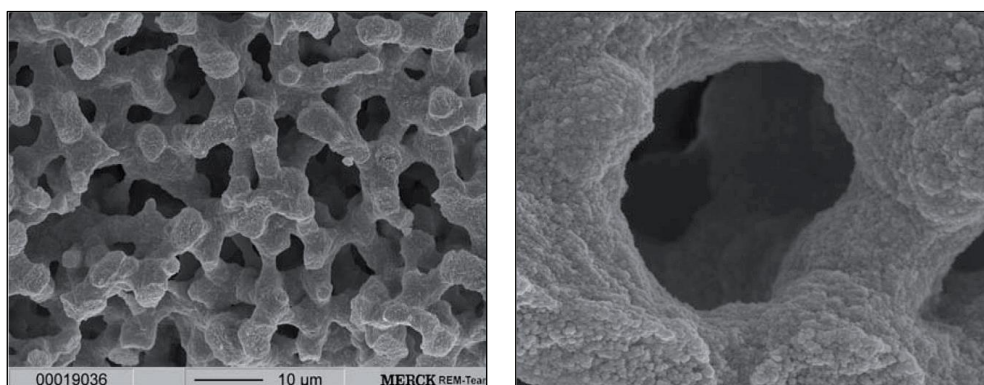


Figura 1.9
Imagen SEM de la estructura porosa de una columna monolítica de sílice (izquierda) y vista aumentada de un macroporo (derecha)
(Extraído de Nuñez *et al*, 2008)

Sistemas de fibras adsorbentes

Tanto la celulosa como otros polímeros naturales han sido tradicionalmente utilizados como materias primas para la preparación de matrices adsorbtivas. Los materiales más conocidos son las micropartículas esféricas utilizadas como adsorbentes cromatográficos y membranas de ultra/microfiltración.

Recientemente se ha propuesto un nuevo sistema adsorbtivo basado en fibras naturales de celulosa. El Laboratorio de Materiales Biotecnológicos (LaMaBio) de la Universidad Nacional de Quilmes junto con la Jacobs University de Bremen han desarrollado un nuevo tipo de material adsorbente del tipo fibroso, compuesto por fibras de celulosa modificadas con ligandos de afinidad (Singh *et al*, 2015). Estas fibras poseen un diámetro diez veces menor a las matrices convencionales, reduciendo el camino difusional y, de esta manera mejorando la cinética de adsorción. La naturaleza fibrosa del material permite la preparación de telas no tejidas (*non woven fabrics*) que son aptas para la captura directa de proteínas de extractos crudos no clarificados (Gavara *et al*, 2015).

Aplicación de nanomateriales a la purificación de proteínas

Por lo general, todas las cromatografías requieren de un soporte o material sólido que cumpla el rol de fase sólida donde se adsorba la molécula de interés. La utilización de NPs como material para adsorber proteínas es una nueva área de estudio que genera gran atención en los investigadores a causa de su extremada alta relación superficie/volumen. Es de esperar que estos nuevos materiales aporten en la búsqueda de soluciones dentro del ámbito de los bioprocesos, de manera de simplificar la recuperación y purificación de proteínas a través de materiales adsortivos más eficientes.

La relación área superficial/volumen de una esfera de diámetro d es $6/d$, por lo tanto a menor diámetro, aumentará su área superficial relativa. En las NPs con un diámetro $<100\text{nm}$, el área superficial relativa es muy elevada, pudiendo superar el valor de $400\text{ m}^2/\text{g}$. Por ejemplo, NPs esféricas con un diámetro de 70 nm a una concentración constante en g/l , proporciona un área superficial total 2,85 veces mayor que NPs con un diámetro de 200 nm a la misma concentración másica. Este aumento en la superficie específica podría ser muy útil en el campo de la purificación de proteínas ya que permitiría aumentar considerablemente la capacidad de adsorción de un mismo tipo de material con sólo disminuir su tamaño de partícula. Cabe destacar que dicha consideración podría ser atribuida solamente a procesos de adsorción superficiales, y no a los materiales del tipo hidrogel adsortivo, en los cuales la adsorción se multiplica exponencialmente con el volumen de hinchamiento del material y del grado de modificación funcional sobre la red polimérica.

Una gran diversidad de nanomateriales con capacidades adsortivas están siendo desarrollados y estudiados a nivel mundial (Ma *et al*, 2006; Anirudhan *et al*, 2012; Zhu *et al*, 2016). Todos estos compuestos funcionalizados superficialmente son, de un modo u otro, capaces de interactuar y conjugarse con macromoléculas más complejas como lo son las proteínas. Como se mencionó anteriormente, estos materiales pueden ser simples o híbridos (dos o más constituyentes). Estos últimos son de mayor interés científico ya que el

material final puede adquirir las características físicas y químicas de todos sus constituyentes. En la **Tabla 1.2** se enumeran algunos ejemplos de investigaciones recientes sobre NPs con diversas capacidades adsorbtivas.

Tabla 1.2
Ejemplos de NPs utilizadas como adsorbentes proteicos

Nanoestructura base	Recubrimiento	Ligando	Diámetro promedio (nm)	Proteína target	Adsorción máxima (mg/g)	Referencia
NPs de Fe ₃ O ₄	SiO ₂	IDA/Cu ²⁺	190	BSA	73	Ma et al, 2006
NPs de Fe ₃ O ₄	Ác. acrílico	Carboxilo	160-200	BSA	105	Liu et al, 2012
NPs de Fe ₃ O ₄	Polietilenimina	IDA/Cu ²⁺	170	BSA	2000	Xia et al, 2014
NPs de CoFe ₃ O ₄	SiO ₂	NTA*/Ni ²⁺	270	Tpv-sHSP**	415	Aygar et al, 2015
NPs de Fe ₃ O ₄ &Au	SiO ₂	MBISA***	75	Lisozima	345	Zhu et al, 2016
LDH****	NPs de Au	---	2-3	Hemoglobina	40	Jin et al, 2012
NPs de celulosa	Poliacrilatos	Ác Poliacrílico	25	Lisozima	150	Anirudhan et al, 2012

* Ácido nitrilotriacético

** Proteína recombinante de shock térmico His-terminal

*** Ácido mercapto-5-bencimidazolesulfónico

**** Láminas dobles de hidróxidos

Estas publicaciones científicas recientes demuestran no sólo el potencial de los materiales nanoestructurados para purificar proteínas, sino que también remarcan el interés de la comunidad científica por aplicar los nuevos conocimientos de la Nanotecnología a los bioprocesos.

Objetivo del Trabajo de Tesis

Dadas las ventajas que presentan los nanomateriales respecto al aumento del área específica y la densidad de partícula, y en particular a los beneficios que presentan los nanomateriales del tipo “*core shell*”, en el presente Trabajo de Tesis se plantea como **Objetivo General** la preparación y caracterización de nuevos nanocompuestos poliméricos (NCPs) funcionales con capacidad para purificar distintos tipos de proteínas.

Para alcanzar dicho objetivo general, se consideraron los siguientes objetivos específicos:

1. *Preparar NCPs mediante la modificación por injerto inducido por radiación ionizante sobre NPs de sílice.*
2. *Caracterizar los NCPs mediante diversas técnicas espectroscópicas.*
3. *Obtener NCPs funcionales (NCPs-X) con capacidades adsorptivas de proteínas de manera específica.*
4. *Desarrollar métodos de purificación y evaluar la funcionalidad de los NCPs-X comparados con matrices comerciales.*
5. *Estudiar la capacidad de purificación de los NCPs-X y su utilización en un sistema integrado de purificación a escala laboratorio.*

Las actividades, los resultados obtenidos, así como su interpretación y conclusiones de este trabajo se exponen en la presente **Tesis Doctoral**.

CAPÍTULO 2

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCOMPUESTOS POLIMÉRICOS

2.1 Introducción

Nanocompuestos

Un nanocompuesto (NC) es un material conformado por dos o más materiales distintos con al menos una de sus dimensiones dentro de la escala nanométrica. La clasificación de los mismos se basa tanto en el tipo como en la distribución espacial de los elementos que lo constituyen. Por lo general, como base o núcleo se suele utilizar un material que aporte mayor densidad al compuesto final. Nanopartículas en base a silicatos (SiO_2) son muy utilizadas para tal fin debido a su alta densidad y a su relativa fácil derivatización a través de la química de los silanoles (Hartwig *et al*, 2005; Kobayashi *et al*, 2007; Demir *et al*, 2010; Jankiewicz *et al*, 2012; Khelifa *et al*, 2013). También se suelen utilizar NPs metálicas con el mismo fin (Jiao *et al*, 2009; Chibac *et al*, 2012; Hong *et al*, 2006). Recientemente se han publicado una gran variedad de artículos relacionados a NCs en base a NPs magnéticas con aplicaciones en el campo de la Biotecnología, como se describe en el **Capítulo 1**. Estos materiales son de gran interés ya que debido a sus propiedades magnéticas, es posible capturar los NCs a través de la acción de un campo magnético externo (Ma *et al*, 2006; Liu *et al*, 2014; Xia *et al*, 2014; Aygar *et al*, 2015; Zhu *et al*, 2016).

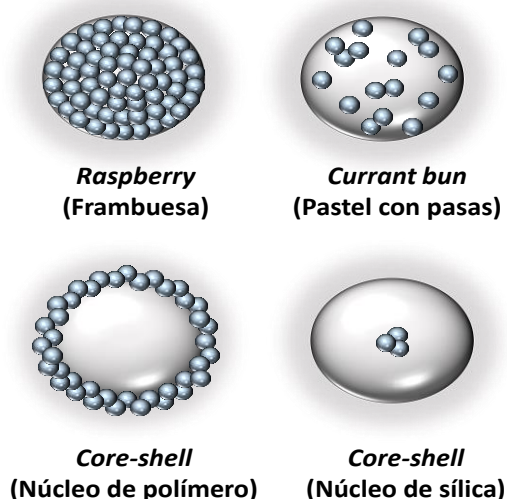


Figura 2.1
Representación esquemática de las posibles morfologías de un NC
Extraído de Zou *et al* (2008)

Dependiendo de sus constituyentes, la morfología de los NCs puede variar desde laminar (Choma *et al*, 2012), en forma de bastón (Guo *et al*, 2009) o en forma de esferas (Kobayashi *et al*, 2007; Choma *et al*, 2011). A su vez, estas últimas pueden clasificarse en función de la química superficial y del tamaño de las partículas inorgánicas que conformen el núcleo (**Figura 2.1**) en: (i) tipo “*frambuesa*” (“*raspberry*”), (ii) tipo “*budín con pasas*” (“*currant bun*”), y (iii) tipo “*núcleo-envoltura*” (“*core-shell*”) (Zou *et al*, 2008).

Por otro lado, el orden de los materiales en el NC puede intercambiarse dependiendo de la finalidad que se busque para el mismo. De esta manera, un material se puede encontrar en el interior o en la superficie de un NC. A modo de ejemplo, se pueden mencionar los NCs en base a NPs de silicio y NPs de oro. Esta combinación de materiales resulta en una alta estabilidad térmica (atribuida a la sílica) sumado a las propiedades magnéticas, eléctricas, ópticas y catalíticas de los nanocristales metálicos de oro. De esta manera, algunos investigadores han desarrollado NCs en base a NPs de silicio recubiertas con NPs de oro más pequeñas (Choma *et al*, 2012), mientras que otros lo han hecho recubriendo NPs de oro con una envoltura de silicio (Xue *et al*, 2007) (**Figura 2.2**).

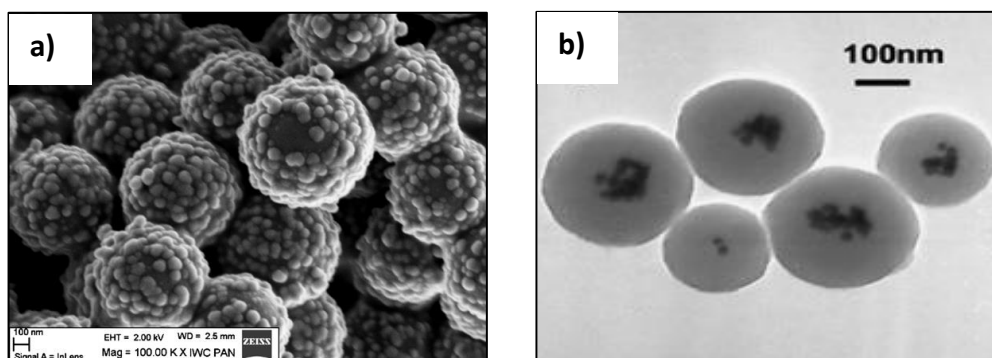


Figura 2.2

Comparación entre distintos tipos de disposición núcleo/envoltura

- (a) Imágenes SEM de NPs de silicio recubiertas con NPs de oro (Extraído de Choma *et al*, 2012);
(b) Imágenes TEM de NPs de oro recubiertas con silicio (Extraído de Xu *et al*, 2007)

Nanocompuestos poliméricos en base a silicio

Compuestos coloidales formados por sílica y polímero representan una nueva categoría de nanocompuestos poliméricos (NCPs) que pueden clasificarse en dos, con núcleo de sílica y cobertura polimérica o viceversa (Zou *et al*, 2008). Una característica importante que adquieren los NCPs es la posibilidad de generar entrecruzamientos entre los distintos tipos de polímeros que lo conforman. De esta manera, se logran importantes mejoras en cuanto a sus características mecánicas y térmicas (Hartwig *et al*, 2005; Mu *et al*, 2009). Sin embargo, la ventaja más importante que aporta una superficie polimérica es su facilidad para ser modificada químicamente mediante reacciones de derivatización. Esto les puede conferir características funcionales específicas, permitiendo así la capacidad para interactuar selectivamente con otras sustancias del medio en el cual se encuentran dispersos. Por lo general se utilizan polímeros con grupos funcionales que permitan una modificación química (hidroxilos, carboxilos, aminos, sulfidrilos), ya sea por sustitución nucleofílica, o por reacciones de adición/condensación. En los últimos años, el poliglicidilmetacrilato (pGMA) ha sido utilizado por un número importante de investigadores (Lei *et al*, 2011; Song *et al*, 2011; Jlassi *et al*, 2015; Rehman *et al*, 2016) gracias a su facilidad para ser derivatizado mediante reacciones de adición sobre los grupos epóxidos del mismo (Kim *et al*, 1996).

En este Capítulo se describirán tanto las técnicas como los procedimientos desarrollados para la preparación y caracterización de NCPs del tipo “*budín con pasas*”, con una base de NPs de sílica y un recubrimiento entrelazado de pGMA. La polimerización de este último se llevó a cabo por un método de modificación por injerto inducido por radiación ionizante. A continuación se describen brevemente tanto las técnicas como los materiales utilizados para la preparación de los NCPs.

Silicatos

Los silicatos pertenecen a un grupo de minerales denominado en geología como petrogénicos, ya que forman parte de la mayoría de las rocas, arcillas y arenas. Están compuestos principalmente por silicio y oxígeno, aunque pueden estar acompañados de otros elementos entre los que destacan aluminio, hierro, magnesio o calcio.

Los silicatos forman materiales basados en la repetición de la unidad tetraédrica SiO_4^{4-} . Las cargas negativas generalmente son compensadas por la presencia de iones de metales alcalinos o alcalinotérreos, así como de otros metales como el aluminio. Los átomos de oxígeno pueden compartirse entre dos de estas unidades SiO_4^{4-} para formar el disilicato $[\text{Si}_2\text{O}_5]^{6-}$. De manera general, los silicatos tendrán como fórmula $[(\text{SiO}_3)^{2-}]_n$ donde todos los átomos de oxígeno están compartidos y por lo tanto la carga está neutralizada, formando una red tridimensional denominada sílice o dióxido de silicio, SiO_2 (Klein 1997).

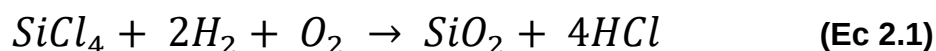
La capacidad de los tetraedros de silicio para unirse por sus vértices se denomina polimerización, la cual es la responsable de la gran variedad de estructuras de silicatos existentes. Los oxígenos que pueden compartirse son de 1 a 4 y a ello se debe la gran diversidad de configuraciones estructurales.

Usos de los silicatos

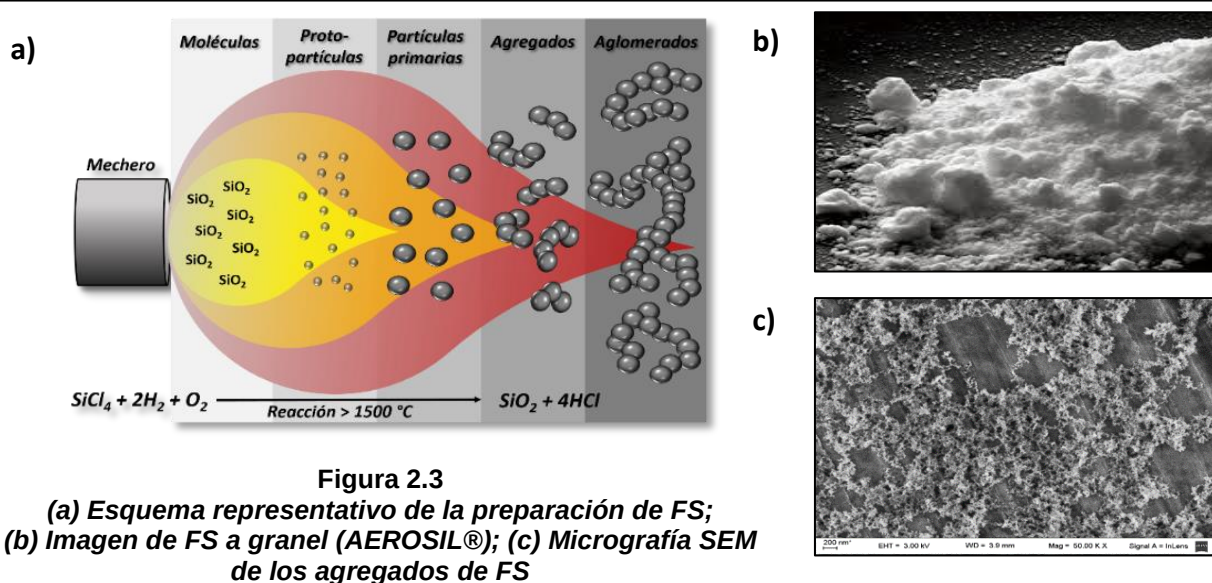
El silicio es el componente central de los silicatos. Debido a sus propiedades únicas, los silicatos tienen muchos usos tecnológicos. Estas propiedades incluyen la capacidad para conducir la electricidad, producir una vibración de alta frecuencia y proporcionar aislamiento térmico. Aunque el silicio es un cristal muy duro, se puede manipular y cortar en tamaños minúsculos, transformándose así en el material perfecto para hacer microchips, dispositivos electrónicos que utilizan tanto computadoras como teléfonos celulares y videojuegos (Regueiro, 2009).

Fumed Sílica

Su nombre comercial es AEROSIL®. Es un producto patentado y registrado por *Degussa AG* en el año 1943 como sílice pirogénica. La *fumed sílica* (FS) se obtiene por combustión del SiCl_4 en una llama de hidrógeno y oxígeno a más de 1500 °C (**Figura 2.3**) según la **Ecuación 2.1** (Zou et al, 2008):



El tamaño de las esferas de SiO_2 depende de los parámetros del proceso y muestran una excelente uniformidad dentro de un mismo lote. El polvo resultante es no poroso, tiene una densidad aparente baja y un área superficial de 50 a 600 m^2/g . Su densidad puede variar entre 160 - 190 kg/m^3 . Los tamaños de las partículas primarias varían entre 5 y 300 nm, las cuales pueden formar agregados ramificados de unas décimas de micra de longitud. Sin embargo esta agregación es menor a la de la sílica estándar, que al presentar más grupos silanoles en su superficie, es más propensa a aglomerarse por interacciones puentes de hidrógeno. Una buena dispersión puede lograrse mediante modificación química de la superficie de las NPs, o mediante aplicación de métodos físicos tales como molino de bolas y tratamientos ultrasónicos (Zou et al, 2008).



Aplicaciones de la Fumed Sílica

Es uno de los pocos nanomateriales utilizados en gran escala en la producción de diversos productos industriales. Su principal uso es como agente espesante universal, aunque también se utiliza como polvo anti apelmazamiento y como agente desecante (Mathias y Wannemacher, 1988). También es muy aplicada en productos cosméticos por sus propiedades ópticas de difusión de luz, y en pasta de dientes, por su capacidad abrasiva. Además se suele utilizar como relleno en elastómeros de silicona, y como regulador de la viscosidad en pinturas, revestimientos, tintas de impresión, adhesivos y resinas de poliéster insaturado. A escala laboratorio, se han estudiado los efectos sobre la conductividad térmica y la capacidad de fractura sobre fibras de vidrio recubiertas con FS hidrofóbica e hidrofílica (Liana *et al*, 2015). Recientemente se realizaron estudios sobre la aplicación de FS para mejorar las capacidades adsortivas de columnas monolíticas utilizadas en cromatografía de interacción hidrofóbica (Aydoğan *et al*, 2016). Sin embargo, el principal interés industrial en este material es su baja toxicidad, característica que le permite ser utilizada para mejorar las propiedades organolépticas de diversos productos alimenticios con altos estándares de calidad. Ingredientes en polvo, tales como sal, especias, condimentos, huevo o leche en polvo, a menudo utilizan FS para evitar el apelmazamiento, mejorar la fluidez y aumentar su estabilidad de almacenamiento.

Polímeros

Los polímeros son macromoléculas, generalmente orgánicas, formadas por la unión covalente de una o más unidades simples llamadas monómeros. Éstos forman largas cadenas que se unen entre sí por fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. Las macromoléculas más simples son cadenas hidrocarbonadas no saturadas, como el polietileno (PE) o el polipropileno (PP), aunque también existen macromoléculas con enlaces dobles o formadas por monómeros que contienen anillos aromáticos y/o

heteroátomos en su estructura, como el tereftalato de polietileno (PET) o el policarbonato (PC).

Dependiendo de su origen, los polímeros pueden ser naturales o sintéticos. Los sintéticos contienen normalmente entre uno y tres tipos de monómeros que se repiten, mientras que los naturales, o biopolímeros (como la celulosa, el ADN o las proteínas) presentan estructuras mucho más complejas. En la actualidad, los polímeros sintéticos constituyen uno de los grupos de materiales de mayor aplicación tecnológica e industrial gracias a la gran versatilidad de sus propiedades. Sin embargo, algunas características como la baja resistencia a temperaturas extremas y la sensibilidad a la luz y otro tipo de radiaciones, limitan sus aplicaciones (Rico, 2012).

Síntesis de polímeros

El proceso de síntesis de un polímero puede realizarse a través de dos métodos principales de acuerdo a los tipos de monómeros involucrados: por **adición** o **condensación** de monómeros (Rico 2012). La polimerización por adición puede transcurrir a través de un mecanismo en el que se formen radicales libres como especies intermedias en el curso de la reacción. En otros casos, la polimerización por adición tiene lugar mediante la formación de iones: carbocationes o carbaniones. En ambos casos, la polimerización transcurre a través de tres etapas: (i) *iniciación*, en la que se forman los monómeros activados; (ii) *propagación*, en la que se adicionan monómeros a la cadena; y (iii) *terminación*, que se caracteriza por la finalización o inactivación del polímero (**Figura 2.4 (a)**). El proceso requiere de monómeros con dobles enlaces carbono-carbono ($C=C$) para continuar con el ciclo de propagación en las reacciones radicalarias. En esta etapa, las cadenas poliméricas se pueden formar por adición de nuevos monómeros a la cadena principal o bien por adición de cadenas cortas que se han formado simultáneamente. El final de la polimerización se produce al agotarse los monómeros y/o cadenas cortas disponibles. En este tipo de polimerización la masa molecular de cada cadena de polímero es un múltiplo exacto de la masa molecular del monómero. Un

ejemplo de polimerización por adición aniónica es la del poliestireno (PS) a partir del estireno, en la cual se utiliza el anión amiduro (NH_2^-) como especie nucleofílica para generar el carbanión iniciador. (**Figura 2.4 (b)**).

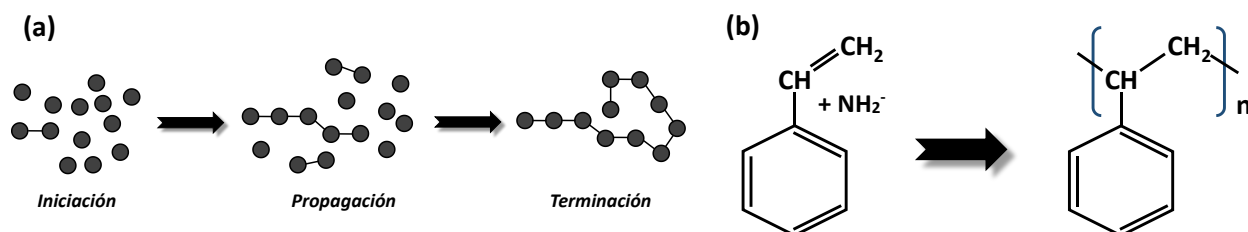


Figura 2.4
(a) Representación esquemática de la polimerización por adición;
(b) Polimerización por adición del PS

Por otro lado, la polimerización por *condensación* es un proceso de unión de dos monómeros o dos cadenas cortas, con la generación de una molécula pequeña como subproducto, como por ejemplo H_2O , CO_2 o un ROH . Un caso típico es la formación de las poliamidas a partir de la reacción de poliaminas y ácidos dicarboxílicos con la generación de agua como subproducto (**Figura 2.5**).



Figura 2.5
Polimerización por condensación para generar una poliamida

Peso molecular promedio

El peso molecular (PM) de los polímeros es una propiedad de fundamental importancia para su aplicación. La utilidad y las propiedades físicas, químicas y mecánicas asociadas a los materiales poliméricos son consecuencia de su PM, del cual dependen de forma considerable.

Debido a las características propias de los polímeros en cuanto a su formación, y a diferencia de los compuestos formados por moléculas pequeñas, una muestra de polímero está constituida por una mezcla de polímeros homogéneos pero con distinta longitud de cadena y en consecuencia, de

diferente PM, por lo que se consideran materiales *polidispersos*. Por lo tanto se pueden determinar un *PM en número promedio* ($\bar{M}_n$) y un *PM en peso promedio* ($\bar{M}_w$) (Mier *et al*, 1997). Solamente las macromoléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos sintetizadas de manera específica por organismos vivos son *monodispersas* ya que presentan un PM definido (López Carrasquero 2004).

Propiedades estructurales

Los enlaces primarios entre los átomos de los propios monómeros y entre ellos son covalentes, con altas energías de enlace (entre 146-628 KJ.mol⁻¹), proporcionando una gran estabilidad a los productos resultantes. Sin embargo la cohesión de los polímeros depende en gran medida de las fuerzas de enlace secundarias (principalmente *Van der Waals* y puente de hidrógeno) que mantienen unidas las cadenas poliméricas entre ellas y son débiles individualmente en relación con las fuerzas del enlace primario. El alto PM de los polímeros permite que estas fuerzas sean lo suficientemente fuertes para impartir resistencia, estabilidad dimensional y otras propiedades mecánicas al material (Callister, 1995).

Clasificación de los polímeros

Los polímeros pueden agruparse en función de la distribución espacial de sus cadenas (**Figura 2.6**). Las cadenas poliméricas pueden estar agrupadas de manera **sencilla**, en forma de cadenas lineales o ramificadas, o de forma **compleja**, formando estructuras reticuladas. Estas ramificaciones determinarán el comportamiento mecánico que presentarán los polímeros en función de la temperatura (Seymour y Carraher, 1995).

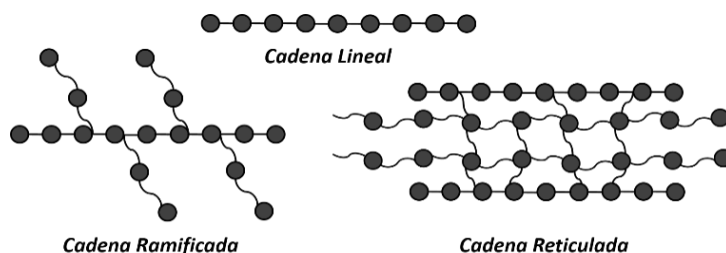


Figura 2.6
Posibles disposiciones estructurales de las cadenas de un polímero

Otro criterio de clasificación es el comportamiento frente a la temperatura. Así, los polímeros se pueden clasificar como: *polímeros termoplásticos*, *polímeros termoestables* y *polímeros elastómeros* (Seymour y Carraher, 1995).

También, los polímeros pueden clasificarse de acuerdo a su composición monomérica. De esta manera, si el polímero es químicamente homogéneo y consta de un sólo tipo de monómero se denomina **homopolímero**. Por el contrario, polímeros formados por dos tipos de monómeros se denominan **co-polímeros** (Seymour y Carraher, 1995).

Glicidil metacrilato

El metacrilato de glicidilo o glicidil metacrilato (GMA) es un éster del ácido metacrílico que contiene un grupo vinilo y un grupo epóxido. Es un monómero muy usado en la preparación de resinas epoxi. Además, se lo utiliza para proporcionar funcionalización epoxi en poliolefinas y otras resinas acrílicas.

Poli glicidil metacrilato

El poli glicidil metacrilato (pGMA) es un polímero que se obtiene por polimerización del glicidilmetacrilato (**Figura 2.7**). El grupo vinilo puede polimerizar por radicales libres mientras que el grupo epóxido puede generar polímeros por condensación en reacciones en medio anhidro. Por lo general, la polimerización más utilizada para la obtención de pGMA es por radicales libres.

De esta forma, los grupos epóxidos permanecen disponibles para reaccionar con compuestos que poseen hidrógenos reactivos, tales como ácidos, bases, aminas primarias y secundarias y alcoholes. (Kim *et al*, 1996; Benaglia *et al*, 2013).

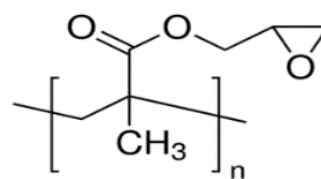


Figura 2.7
Estructura química del pGMA

Modificación química por injerto

También es posible realizar modificaciones de las propiedades de un polímero por la adición de otro polímero distinto, o la incorporación del mismo sobre una superficie como por ejemplo una NP. A este tipo de modificación se la denomina injerto polimérico y muchas veces se realiza para agregar una gran cantidad de grupos funcionales y/o mejorar el recubrimiento superficial de otro polímero que se usa como base. Existen dos enfoques principales para unir químicamente cadenas de un polímero a la superficie de otro material (**Figura 2.8**): (i) por polimerización del monómero *in situ* mediante crecimiento de cadenas poliméricas sobre un iniciador inmovilizado a una superficie ("*grafting from*"); o (ii) por unión covalente de polímeros funcionalizados a una superficie ("*grafting to*") (Minko, 2008).

Por otro lado, existen diferentes técnicas que difieren en la generación de los iniciadores de la polimerización en una superficie. Entre las más utilizadas se encuentran: (i) tratamiento químico; (ii) ozonificación; (iii) foto-polimerización por injerto; (iv) radiación ionizante; y (v) radicales remanentes (Zou *et al*, 2008). La elección de la técnica de modificación dependerá de los materiales utilizados y del objetivo deseado. A continuación se describe la modificación por injerto inducida por radiación ionizante, técnica utilizada en este trabajo para la preparación de los NCPs.

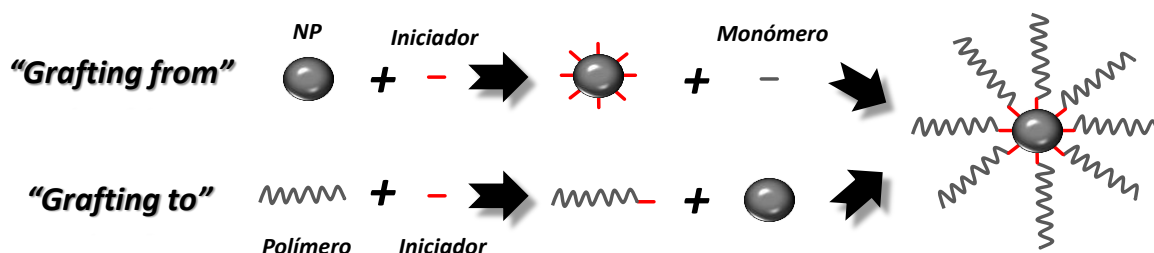


Figura 2.8
Representación esquemática de los enfoques para modificación por injerto.
 Métodos "Grafting from" (arriba) y "Grafting to" (abajo)

Modificación por injerto inducida por radiación ionizante

La irradiación de un material con radiación ionizante (rayos gamma, rayos X, electrones acelerados o haces de iones) conduce a la ionización y excitación del mismo, generando la formación de compuestos intermediarios muy reactivos (iones, electrones libres, radicales y/o estados excitados). Éstos pueden seguir varios caminos de reacción, dando lugar a reordenamientos y/o formación de nuevos enlaces. Estas reacciones pueden culminar en la formación de productos oxidados, adición de moléculas, escisión de cadenas principales (degradación) o entrecruzamiento (*cross-linking*). El grado de estas transformaciones depende de la estructura del material base y de las condiciones de la muestra antes, durante y después de la irradiación (Meisl *et al*, 2004). De esta manera exponiendo el material base, excitado por radiación ionizante, a una solución de monómeros se pueden obtener polimerizaciones por injerto del material; proceso que se denomina "*grafting*". Así se puede polimerizar un monómero sin el uso de catalizadores y bajo condiciones independientes de la temperatura, presión, y estado del material (gas, líquido o sólido).

Las fuentes de radiación ionizante pueden ser de naturaleza corpuscular (α , β , protones, neutrones, electrones o iones acelerados) o electromagnética (rayos γ o rayos X). Actualmente, los electrones acelerados y los rayos γ son el tipo de radiación ionizante más comúnmente utilizada en la industria para la modificación química de materiales (Chmielewski *et al*, 2004). La naturaleza de ambos es muy distinta. Mientras que los electrones acelerados son producidos en vacío y acelerados por un campo eléctrico, los rayos γ se producen por el

decaimiento de un nucleón de un nivel o estado excitado a otro de menor energía y/o por desintegración de isótopos radiactivos.

El Cobalto-60 (^{60}Co) es un isótopo radiactivo del cobalto, con un periodo de semidesintegración de 5,27 años. El ^{60}Co decae por desintegración beta al isótopo estable Níquel-60 (^{60}Ni). En el proceso de desintegración, el ^{60}Co emite un electrón con una energía de 315 keV y luego el núcleo activado de ^{60}Ni emite dos rayos γ con energías de 1,17 y 1,33 MeV, respectivamente. El rango de velocidad de dosis que se puede obtener con una fuente de ^{60}Co es de 0,1 a 20 KGy/h. Esta radiación γ es muy utilizada para radioesterilización gracias a su alto poder de penetración y de ionización; siendo esta una de las principales aplicaciones. Por ejemplo, para la esterilización de productos médicos, la dosis de empleada suele ser del orden a los 25 kGy, según la recomendación de la Norma ISO 13409 (Barrera Barroso *et al*, 2005).

El principal efecto de la radiación γ en la modificación de materiales radica en su capacidad para generar radicales libres (radiólisis) en el material propiamente dicho y/o el solvente que lo contiene. Se ha demostrado que el potencial para generar radiólisis en suspensiones acuosas de NPs de silicio irradiadas con radiación γ no se ve afectado hasta una concentración de 50 % P/v (Meisl *et al*, 2004).

Métodos de polimerización radioinducida

Existen tres métodos principales de modificación por injerto inducida por radiación ionizante, dos de los cuales se realizan en dos pasos, y otro sólo en uno (Bhattacharya *et al*, 2004; Nasef and Hegazy 2004):

➤ **Pre-irradiación en vacío:** El material base a modificar es inicialmente irradiado en vacío y finalmente puesto en contacto con una solución de monómero (**Figura 2.9**). Es muy importante conservar activos los radicales formados durante la irradiación. Para ello es recomendable trabajar por debajo de la temperatura de transición vítrea (T_g) del polímero irradiado y en una atmósfera libre de oxígeno. La principal ventaja de este método es la baja

formación de homopolímero. Sin embargo, la alta dosis de energía requerida (del orden de 200 KGy) puede afectar la integridad del material base.

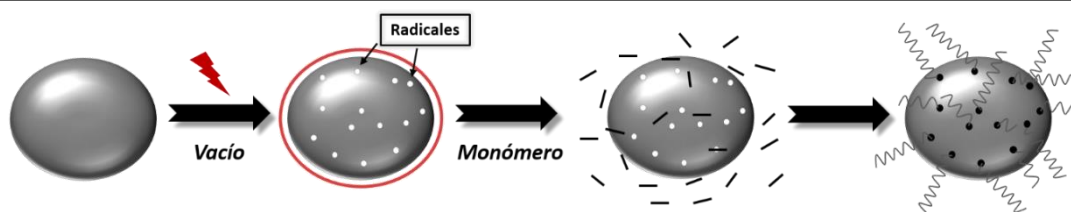


Figura 2.9

Esquema del proceso de injerto por el método de pre-irradiación en vacío

➤ **Pre-irradiación en aire o peroxidación:** Es un método similar al anterior, salvo que el material base es irradiado en aire, el cual está compuesto mayormente por nitrógeno y oxígeno (**Figura 2.10**). Este último reacciona formando peróxidos e hidroperóxidos. En un segundo paso, los peróxidos se descomponen térmicamente liberando radicales libres, que inician la polimerización. Debido a esto, es necesario que el material base sea termoestable a altas temperaturas. También es aconsejable utilizar inhibidores de la homo-polimerización. La ventaja de esta técnica es que los peróxidos intermedios pueden almacenarse durante largos períodos de tiempo antes de realizar el proceso de *grafting*.

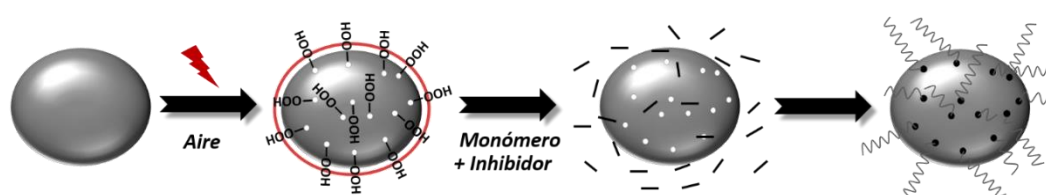


Figura 2.10

Esquema del proceso de injerto por el método de pre-irradiación en aire

➤ **Método directo o en simultáneo:** El material base es directamente irradiado en presencia de un monómero, el cual puede encontrarse en forma de vapor, de líquido o en solución (**Figura 2.11**). La irradiación puede llevarse a cabo tanto en aire, en vacío o bajo una atmósfera inerte (por ejemplo, N_2). La polimerización se inicia a partir de la formación de radicales libres generados en el material base. Las ventajas de este método son dos: (i) requiere de baja dosis

de energía (de 2-20 KGy) comparado con los métodos anteriores y (ii), consiste de un proceso en un solo paso, lo cual reduce tanto costos operativos como errores experimentales. Aunque existe una alta posibilidad de desactivación de radicales activos por recombinación mutua entre dos unidades, comparado con los otros métodos es el que resulta en mayores rendimientos de injerto ya que no se pierden radicales libres a través de reacciones de descomposición.

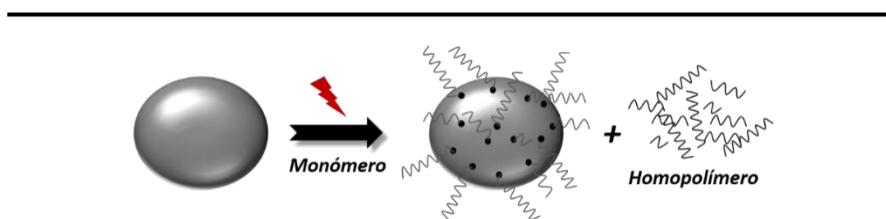


Figura 2.11
Esquema del proceso de injerto por el método en simultáneo

En este método, los niveles de homo-polimerización aumentan a medida que la concentración del monómero es mayor. En algunos casos es necesario agregar un inhibidor para retardar la homo-polimerización en la fase líquida (Clough, 2001).

Como la radiación ionizante no es selectiva, es necesario considerar su efecto sobre todos los componentes del sistema. Entre los aspectos más importantes a tener en cuenta durante un proceso de *grafting* en simultáneo se destacan: (i) la composición química del material base, (ii) el tipo de monómero, (iii) el solvente, (iv) el pH, (v) la temperatura, (vi) el método de irradiación, (vii) los aditivos agregados tales como inhibidores, sales y agentes de reticulación, (viii) la dosis total y (ix) la velocidad de dosis (Hongfei *et al*, 1992).

Se han realizado una gran cantidad de estudios para determinar la efectividad de cada método de irradiación. En uno de ellos se cuantificó el rendimiento del injerto de N,N dimetilacrilamida (DMAA) sobre caucho natural utilizando las tres técnicas de injerto (en simultáneo, por peroxidación y pre-irradiación). Los mayores niveles de modificación obtenidos fueron del 42 % P/p por la técnica de peroxidación, 29 % P/p para la técnica en simultáneo y del 13 % P/p para el método de pre-irradiación (Razzak *et al*, 1993). Aunque no siempre

una mayor modificación significa un producto mejor, en todos los casos se requiere estudiar las propiedades funcionales para determinar la mejor condición.

En general, el método de peroxidación (pre-irradiación en aire) es el que ofrece mejores condiciones de procesamiento industrial en lote dado los mayores porcentajes de *grafting*, la simplicidad de almacenamiento y la posibilidad de dividir el proceso en etapas en caso de ser necesario. Por otro lado, la simplicidad del método en simultáneo radica en la posibilidad de realizar el proceso en una sola etapa y con baja dosis de irradiación.

Desde hace más de 30 años se estudia la utilización de la radiación γ como método para la modificación química de materiales. Sin embargo esta técnica continua siendo investigada dada la gran cantidad de variables y condiciones experimentales que se pueden realizar que conducen a diferentes productos. En la **Tabla 2.1** se detallan algunos materiales obtenidos por *grafting* radioinducido que fueron utilizados para purificar proteínas.

Tabla 2.1
Publicaciones sobre materiales obtenidos por irradiación para purificar proteínas

Material adsorativo base	Tipo de irradiación	Método de irradiación	Monómero / Ligando	Referencia
Película de PE	Radiación γ	Pre-irrad. líquida	GMA/DEAEMA/VBTAC	Lee <i>et al</i> , 1994
Fibra hueca de PE	e^- acelerados	Pre-irrad. en N ₂	pGMA&DEA	Tsuneda <i>et al</i> , 1995
Fibra hueca de PE	Radiación γ	Simultáneo en N ₂	pGMA/IDA	Grasselli <i>et al</i> , 1999
Fibras de celulosa	Radiación γ	Simultáneo en aire	PVBT	Kumar <i>et al</i> , 2006
Fibra hueca de PS	Radiación γ	Simultáneo en N ₂	pGMA&DMA/Colorantes	Wolman <i>et al</i> , 2006
Films de MAA y PEGDA	Radiación γ	Simultáneo en N ₂	pGMA/Na ₂ SO ₃	Bibi <i>et al</i> , 2011
Fibras de celulosa	Radiación γ	Simultáneo en N ₂	pGMA&DMA/Na ₂ SO ₃	Gavara <i>et al</i> , 2012
Esponjas de PU	Radiación γ	Simultáneo en N ₂	pGMA/Na ₂ SO ₃	Sánchez <i>et al</i> , 2017

Técnicas fisicoquímicas de caracterización

El desarrollo actual de la Nanotecnología no sería posible sin la caracterización de los materiales a través de diferentes técnicas microscópicas y espectroscópicas, tales como Microscopia Electrónica de Barrido, de Transmisión, Espectroscopia Infrarroja, etc. De esta manera se pueden describir las propiedades de los nanomateriales tales como estructura, composición, morfología, propiedades térmicas, etc., que posteriormente servirán para encontrar una aplicación específica a los mismos. A continuación se detallan brevemente las técnicas utilizadas para caracterizar y estudiar las propiedades de los sistemas nanoestructurados preparados en este Trabajo de Tesis.

Dispersión Dinámica de la Luz

La dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés "*Dynamic light Scattering*"), es una técnica físico-química empleada para determinar la distribución de tamaños de partículas en suspensión o de dispersiones coloidales. Es muy eficaz para mediciones de poblaciones monodispersas. Sin embargo, también permite analizar muestras con distribuciones muy variadas de masas moleculares, por ejemplo, una proteína nativa y agregados de distintos tamaños (Sartor 2003).

Cuando un haz de luz monocromático (láser) incide sobre una suspensión de partículas, el movimiento Browniano de las mismas genera un efecto *Doppler* sobre la frecuencia aparente de la onda, dispersándola en diferentes direcciones e intensidades. Estos cambios en el ángulo de incidencia y en la intensidad de la difracción se denominan patrones de difracción y están relacionados directamente con el tamaño de la partícula. Por lo general, partículas más pequeñas difractan a mayor ángulo con menor intensidad, mientras que partículas más grandes producen bajo ángulo y mayor intensidad (**Figura 2.12**). Con el análisis de estas fluctuaciones es posible obtener la velocidad del movimiento Browniano y, finalmente, mediante la aplicación de un algoritmo y de un modelo apropiado se obtiene información acerca de la distribución del tamaño

de partícula. En general es una técnica cuyo rango óptimo de medición es en el orden de partículas sub-micrométricas, aunque permite medir partículas con tamaños menores a un nanómetro o mayores al micrón (Goldburg, 1999).

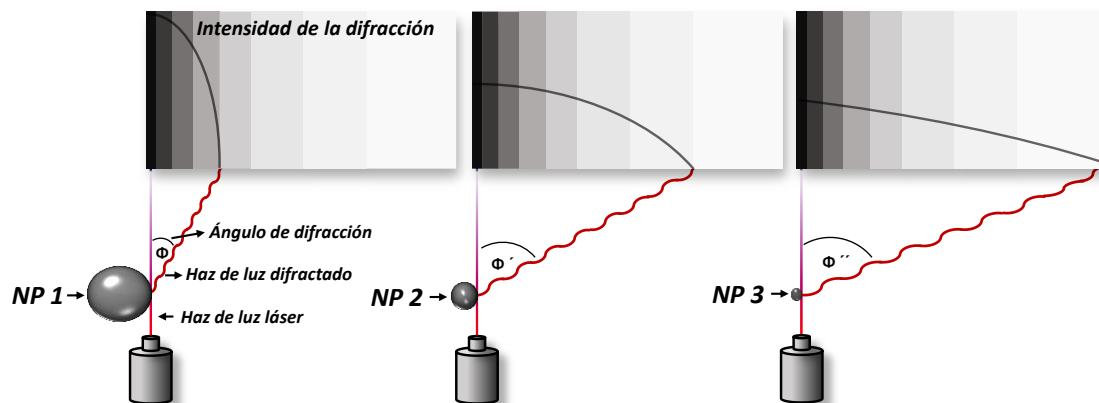


Figura 2.12
Patrones de difracción generados por NPs de distinto tamaño ($NP1 > NP2 > NP3$)

Por lo general, los equipos comerciales de DLS operan a un ángulo de incidencia de 90° y utilizan una fuente laser de luz roja (675 nm). En la **Figura 2.13** se encuentra una representación esquemática de un equipo DLS.

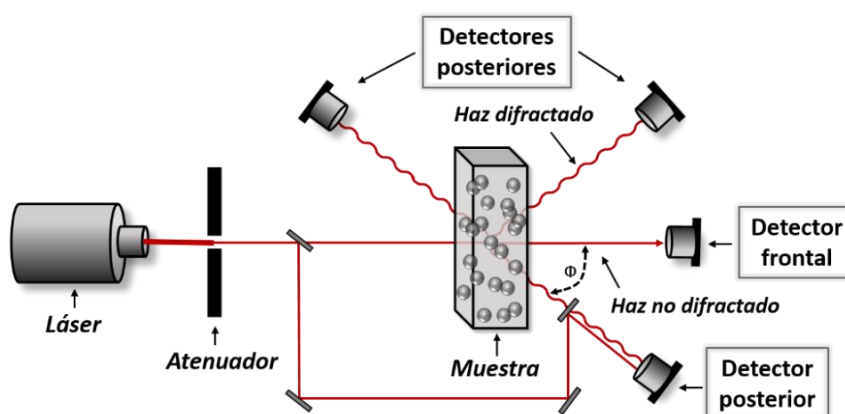


Figura 2.13
Esquema de un equipo estándar para medir DLS

La determinación de la distribución de tamaño partículas es actualmente un problema que va adquiriendo cada vez mayor importancia ya que en la práctica no existe un tamaño o diámetro único de partícula, sino que el mismo representa a un conjunto de partículas similares. Esto implica que para una misma medida de tamaño nominal, existe un porcentaje con un tamaño mayor y otro con un tamaño menor al valor nominal. Otra consideración a tener en cuenta en un estudio de caracterización es la variación en el valor promedio de partícula obtenido al emplear distintas técnicas de medición. Por ejemplo, mediciones por DLS de partículas monodispersas suelen ser levemente superiores a los valores nominales de la misma muestra obtenidos por TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) dado que por DLS se mide el radio hidrodinámico de partículas en suspensión (Salinas-Salas *et al*, 2005).

Por otro lado, analizar muestras polidispersas solamente por DLS suele ser insuficiente. Por lo general, se requiere una combinación de técnicas adicionales para analizar mezclas de partículas con distribuciones de tamaño de partículas amplias (Provder, 1997). En estos casos, la técnica de microscopia por fuerza atómica (AFM, *Atomic Force Microscopy*) que tiene la capacidad de identificar la presencia de partículas de diversas formas y tamaños, convirtiéndose en una técnica complementaria de análisis (Hoo *et al*, 2008).

Espectroscopia de Oclusión Iónica

La técnica Espectroscopia de Oclusión Iónica (*Scanning Ion Occlusion Spectroscopy* o SIOS) es una nueva técnica que permite determinar la cantidad y tamaño partículas de una suspensión. La técnica se basa en el bloqueo momentáneo en una señal eléctrica de una celda separada por una membrana con un único poro, siendo su límite menor de detección de partículas de 80 nm de diámetro. La intensidad de la señal está estrechamente relacionada con el diámetro de partícula que bloquea el poro (Roberts *et al*, 2010). Este bloqueo es interpretado y decodificado por el software del equipo a través de la comparación con un patrón de NPs (suministrado por el fabricante) y finalmente traducido en el histograma de la muestra a estudiar (**Figura 2.14**).

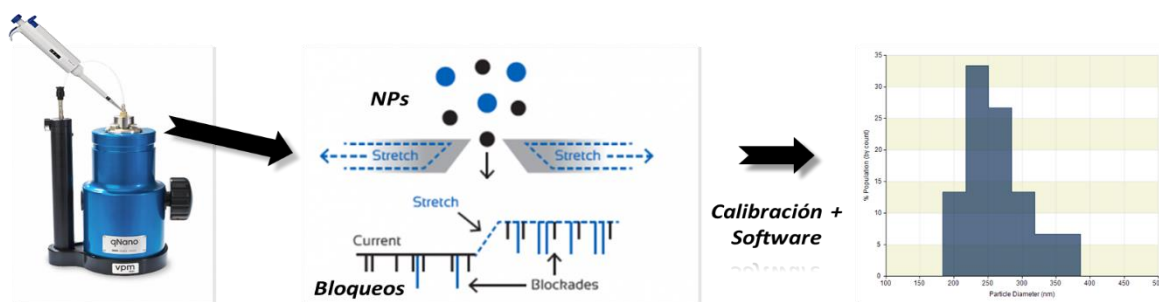


Figura 2.14

Técnica Espectroscópica de Oclusión Iónica

a) Equipo qNano, b) NPs atravesando el poro de la membrana, c) Histograma del tamaño de partícula
 Imágenes extraídas de la página <http://izon.com/how-trps-works/>

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

La incidencia de la radiación infrarroja (IR) produce vibraciones, extensiones y contracciones de los enlaces químicos en longitudes de onda definidas, que pueden identificarse por comparación contra patrones de grupos funcionales conocidos. La FTIR es una de las técnicas espectroscópicas más utilizadas para analizar modificaciones químicas en polímeros ya que el análisis de los espectros resultantes en diferentes etapas de la modificación permite detectar e identificar la incorporación de grupos funcionales en el nuevo material (Nitschke *et al*, 1997; Belfer *et al*, 2000; Pandey *et al*, 1999).

La técnica ATR (Reflectancia total atenuada) es una herramienta acoplada al FTIR tradicional que permite analizar muestras en estado sólido o líquido sin acondicionamiento previo. En este método, el haz de luz IR atraviesa el cristal del módulo ATR y penetra la muestra en contacto con el cristal en el orden de unos pocos micrones. El haz se refleja internamente formando una onda de energía evanescente que decae rápidamente con la distancia (**Figura 2.15**). Una parte de la energía de esta onda evanescente es absorbida por la muestra mientras que el haz remanente viaja hasta el detector, por lo que se obtienen espectros de IR de absorbancia.

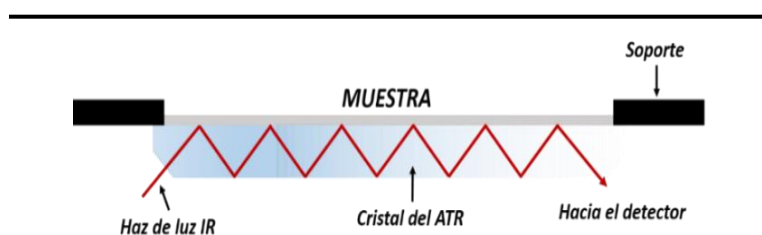


Figura 2.15
Representación del módulo de ATR

Análisis Termogravimétrico

Cuando un material es sometido a un programa de calentamiento controlado, tanto su estructura como su composición química sufren cambios como la fusión, solidificación, cristalización, oxidación, descomposición, cambio de fase, entre otros. Estas transformaciones se pueden medir, estudiar y analizar midiendo la variación de las distintas propiedades físicas o mecánicas de la materia en función de la temperatura.

El análisis por Termogravimetría (TGA) está basado en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando se la somete a un cambio de temperatura en una atmósfera controlada. Es una técnica muy utilizada en polímeros, alimentos y productos farmacéuticos, y permite obtener información de la

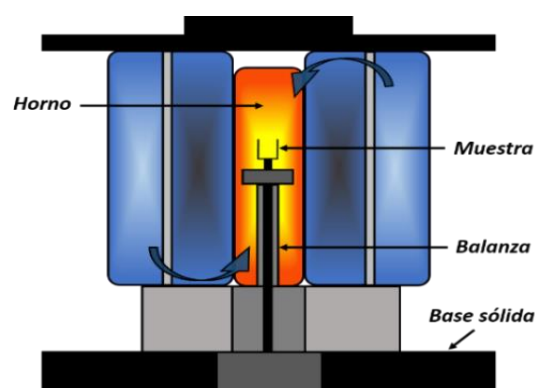


Figura 2.16
Representación de un horno para TGA

heterogeneidad, constitución, elementos estructurales y durabilidad del compuesto (Jiang *et al*, 1999; Cochez *et al*, 2000). Los hornos especialmente diseñados permiten controlar el calentamiento y enfriamiento con una alta precisión, en un intervalo de temperatura de -150°C hasta 2400°C (**Figura 2.16**).

Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

La microscopía electrónica de barrido (SEM, ó *Scanning Electron Microscopy*) es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. A diferencia de la microscopía óptica, para formar una imagen utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz.

El bombardeo de una superficie con un haz de electrones de baja energía produce emisión de electrones secundarios, electrones retro dispersados y rayos X. Los electrones secundarios son emitidos por los átomos que se encuentran en la superficie interna del material. La intensidad con que son emitidos es utilizada para generar una imagen tridimensional de la superficie. Mientras menor sea el diámetro del haz de electrones primarios con que se bombardea la muestra, mayor será la resolución de la imagen final. Por otro lado, los electrones retro dispersados son los electrones primarios que fueron reflejados por la superficie del material. También pueden utilizarse para obtener una imagen superficial, aunque con menor resolución comparado con los electrones secundarios (Goldstein et al, 1992).

La interacción de los electrones primarios con el material también resulta en la emisión de rayos X. Éstos tienen niveles de energía característicos para cada elemento. Es por esto que su detección puede utilizarse para realizar un análisis elemental del material analizado. Esta técnica, denominada EDX (del inglés *Energy Dispersive X-Ray*) permite identificar todos los elementos sin dañar la muestra excepto el H, He y el Li, de acuerdo a la energía de los rayos X (Goldstein et al, 1992).

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM), es un instrumento que al igual que el SEM es capaz de ofrecer una amplia variedad de información procedente de la superficie de la muestra, pero con mayor resolución y con un rango de energía mucho mayor. La mayor diferencia entre un FESEM y un SEM reside en el sistema generación de electrones. El FESEM utiliza como fuente de electrones un cañón de emisión de campo que proporciona haces de electrones de alta y baja energía muy focalizados, lo que

mejora notablemente la resolución espacial y permite trabajar a muy bajos potenciales de campo (0.02 - 5 kV). Esto ayuda a minimizar el efecto de carga en muestras no conductoras (como son los polímeros) y a evitar daños en la misma por el haz electrónico.

Potencial Z

Cuando una superficie cargada está en contacto con una fase líquida, se desarrolla un potencial eléctrico en la interfase. En consecuencia, se forma una doble capa con grupos ionizables unidos a la superficie y una capa de contraiones en fase líquida débilmente unidos. Esta primera capa, o capa fija, interacciona débilmente con la segunda capa móvil, de carga opuesta y en contacto con la masa líquida (**Figura 2.17**). El potencial Z consiste en la diferencia de potencial a través de esta doble capa (Harvey, 2000). A pesar de que existen comercialmente dispositivos para medir el potencial Z, sólo es posible realizarlo sobre partículas en suspensión o en membranas, y no en materiales poliméricos de mayor espesor.

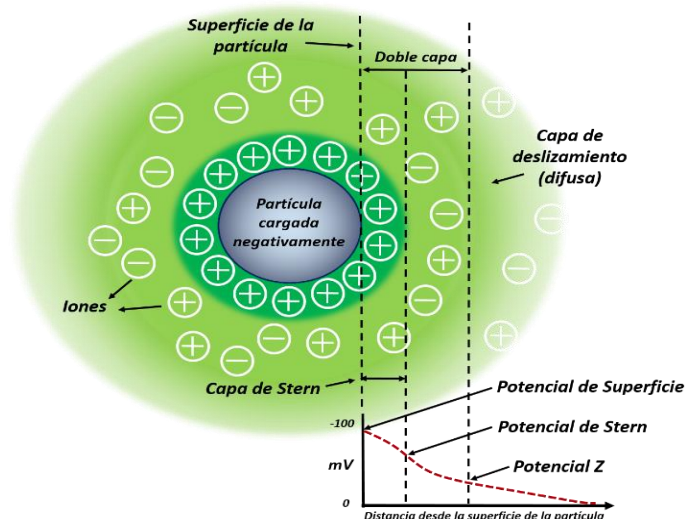


Figura 2.17
Representación esquemática de la doble capa y del potencial Z de una partícula con carga negativa

Las partículas coloidales están sometidas a fuerzas de atracción y repulsión, y existe un balance entre dichas fuerzas. El movimiento Browniano produce colisión entre las partículas y si las fuerzas de atracción predominan, las partículas se aglomeran después de la colisión. En caso contrario, si las fuerzas de repulsión predominan las partículas permanecerán separadas. Las fuerzas de atracción son las de *Van der Waals*, en tanto que las fuerzas de repulsión provienen de la interacción entre las dobles capas eléctricas que rodean a las partículas y son las que definen la estabilidad del sistema. Teóricamente, un valor absoluto de potencial $Z > 25$ mV (**Figura 2.18**) es suficiente para mantener al sistema estable y evitar la aglomeración de las partículas coloidales (Hunter, 2013).

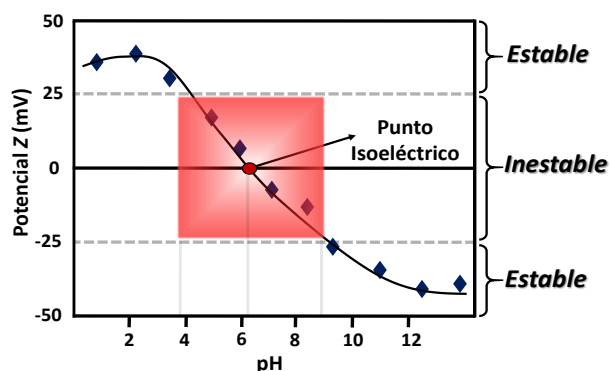


Figura 2.18
Representación esquemática de la zona de estabilidad para un sistema coloidal

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Materiales

Se utilizó sílica nanoparticulada (NS) con diámetro de partícula de 20 nm (Sigma Aldrich, N° de producto: 637238) y *Fumed Sílica* (FS) con diámetro de partícula primaria de 14 nm (Sigma Aldrich, N° de producto: S5505). Como monómero se utilizó Glicidilmetacrilato (GMA) 97,0 % marca Sigma Aldrich. Las muestras se prepararon en frascos de vidrio de 20 ml de capacidad con cierre hermético a presión. La extracción de los NCPs se realizó con Tetrahidrofurano (THF) 99,9 % marca Merck Millipore. El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico, adquiridos por un distribuidor local (MERK, ICN Biomedicals y ANEDRA). Todos los ensayos se realizaron con agua desionizada y filtrada con filtro de 0,22 μm .

2.2.2 Metodología

Preparación de NCPs

Los NCPs se prepararon mediante una técnica de polimerización por injerto inducida por radiación ionizante, utilizando una fuente gamma de ^{60}Co . Se preparó una suspensión 50 mg/ml de FS en agua, denominada como “Stock FS”, que se utilizó como suspensión madre. Previo a su utilización, la misma se trató durante 15 min en un baño ultrasónico para asegurarse una óptima dispersión.

Las muestras se prepararon en viales de vidrio de 20 ml de capacidad conteniendo el monómero GMA y la cantidad correspondiente de FS, y fueron degaseados con N_2 durante 15 min utilizando un difusor de aire. Luego, se sellaron herméticamente con una tapa de goma y precinto de aluminio. Posteriormente las suspensiones se dispersaron con un agitador tipo vórtex (*Thermolyne Type 37600*) por 30 s y finalmente en un baño ultrasónico (TESLAB - TB02) durante 15 min. El volumen final de cada preparación fue de 15 ml. Las muestras se irradiaron a temperatura ambiente (TA) en la Planta de Irradiación

Semi Industrial del Centro Atómico Ezeiza (PISI – CNEA Ezeiza). Las mismas recibieron una dosis total de 10 KGy a una tasa de dosis de 1 KGy/h.

Luego de la irradiación los viales se mantuvieron en reposo durante 1 h. A continuación se reemplazó 10 ml del sobrenadante acuoso de cada vial por 10 ml de THF. Los viales fueron sellados nuevamente y mantenidos en agitación constante en un ROTOLAB durante 12 hs. Luego, los viales se mantuvieron en reposo nuevamente durante 1 h. La dispersión de NCPs (sobrenadante) se fraccionó en tubos *Eppendorf* de 2 ml utilizando una micropipeta p1000, evitando remover el precipitado. Los NCPs se lavaron con H₂O destilada mediante tres ciclos de centrifugación/resuspensión a 10.000 RPM durante 5 min en una centrífuga HERMLE Z200a. Entre paso y paso, los NCPs se resuspendieron con un agitador vórtex y finalmente aplicando turbulencia mediante el flujo de una punta de micropipeta (p1000). Luego, las suspensiones de NCPs se concentraron con un equipo *SpeedVac* (Savant *SpeedVac* AES2010 - Centrifugal Evaporator 220) durante aproximadamente 4 h sin calefacción. Finalmente, se resuspendieron con H₂O en un volumen final de 2 ml, se traspasaron a un frasco limpio y se almacenaron a TA hasta su utilización.

Análisis por Dispersión Dinámica de la Luz

El diámetro hidrodinámico promedio de los NCPs se determinó por DLS en un 90 Plus – Particle Size Analyzer (*Brookhaven Instruments Corporation*). Las mediciones se realizaron a 25 °C sobre muestras diluidas con H₂O desionizada y previamente dispersadas en baño de ultrasonido durante 5 min. Cada medición del diámetro de partícula fue el promedio de 3 lecturas consecutivas de 30 s cada una sobre la misma muestra. Para obtener un valor representativo de cada preparación, se promediaron 5 mediciones sobre distintas muestras del mismo *batch* de irradiación.

Análisis por Espectroscopía de Oclusión Iónica

El diámetro de partícula se midió mediante Espectroscopía de Oclusión Iónica en un *qViro* marca IZON. Previo a la medición se realizó una dilución 1:2000 de los NCPs, utilizando el *buffer* suministrado por el fabricante. Una alícuota de 40 µl de cada dilución se cargó en la cámara del *qViro* conteniendo una membrana NP200. La apertura de la misma se reguló en aproximadamente 47 mm. El voltaje utilizado fue de 0.22 V, mientras que la presión aplicada fue de 14 cm de H₂O. Luego de la medición, cada muestra de NCPs se calibró con un patrón estándar de 217 nm con una concentración de 1.0×10^{11} partículas por ml, también suministrado por el fabricante. El ensayo se realizó por triplicado, con un recuento de partículas de 500 partículas por ensayo.

Análisis por Espectroscopía FTIR

La presencia del polímero en los NCPs se determinó utilizando un equipo FTIR Shimadzu IRAffinity, equipado con un módulo Gladi ATR (PIKE Technologies, INC). Previo a la medición, los NCPs se concentraron por centrifugación y se secaron en estufa a 50 °C hasta peso constante. Los espectros de absorbancia promediaron 64 barridos con un ancho espectral de 500 a 4000 cm⁻¹, y se analizaron mediante el software IR-Solution. Se analizaron muestras correspondientes a la FS original, al pGMA y a los NCPs.

Análisis Termogravimétrico

El porcentaje de matriz polimérica en los NCPs se determinó por TGA en un TA Q500 (*TA Instruments*). Por cada medición, se utilizaron 30 mg de NCP previamente concentrados por centrifugación. Las mediciones se realizaron bajo una atmósfera de N₂ y con una curva de calentamiento de 10 °C/min, desde 25 hasta 800 °C. Tanto las curvas de descomposición como las derivadas de las mismas se analizaron mediante el software provisto por TA Instruments. Se estudiaron muestras de pGMA y NCPs.

Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

La estructura y distribución de los NCPs se determinó mediante FESEM en un Carl Zeiss supra 40 NTS, perteneciente al centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Los NCPs se diluyeron en H₂O y se colocaron gota a gota sobre una cinta de carbono autoadhesiva adherida al pedestal porta muestras utilizado por el equipo. Luego las muestras se secaron a 50 °C hasta evaporación total y finalmente se analizaron con una energía de haz de 3.0 kV de energía. Se obtuvieron distintas magnificaciones de acuerdo al diámetro promedio de las partículas y a la resolución del microscopio. Se estudiaron muestras correspondientes a la FS original, al pGMA, al compuesto FS-x&pGMA y a los NCPs.

Determinación del Potencial Z

La determinación del potencial Zeta y de la movilidad electroforética de los NCPs se realizó en un 90 Plus – Particle Size Analyzer (*Brookhaven Instruments Corporation*). Las mediciones se realizaron a 25 °C, con un ángulo de medida de 90°. Previo a la medición, las muestras se diluyeron en KCl 10⁻³ M y se dispersaron por ultrasonido durante 5 min. Luego se obtuvieron medidas del potencial Z a distintos valores de pH mediante la adición de HCl o KOH 10⁻³ M.

2.3 Resultados y Discusión

El objetivo de este Capítulo plantea la preparación y caracterización de NCPs del tipo “*budín con pasas*”, con una base de NPs de FS y un recubrimiento entrelazado de pGMA.

Para ello se plantea el uso de la radiación ionizante como iniciadora de la polimerización en una muestra constituida por una solución de monómero acrílico muy diluido conteniendo además NPs de sílica en suspensión. Se espera que la hidrofobicidad del monómero disuelto en agua, lo reparta hacia la superficie de las NPs de manera que, en una alta proporción, la polimerización ocurra en la cercanía de las NPs y de esta manera obtener un material compuesto.

Como paso previo a la obtención de los materiales compuestos se estudiaron las condiciones en donde los reactivos se encuentran mezclados y suspendidos de manera estable (por lo menos durante el periodo de irradiación), dado que el sistema es heterogéneo.

Determinación de la concentración de GMA

Los monómeros acrílicos tienen una baja solubilidad de agua, sin embargo estas cantidades podrían ser suficientes para el objetivo de este trabajo. El GMA tiene una solubilidad en agua de 5 g/L a 20 °C, que corresponde a una concentración molar de 140 mM, con lo cual se fijó en 100 mM la concentración máxima a ensayar. La FS se preparó en suspensiones de 50 mg/ml, ya que se observó una buena dispersión hasta esta concentración.

De esta manera se seleccionaron seis condiciones de muestras a irradiar utilizando la suspensión de FS 50 mg/ml y concentraciones variables de GMA correspondientes a 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM y 100 mM. Las muestras degaseadas fueron irradiadas con una dosis adsorbida total de 10 KGy a una tasa de dosis de 1 kGy/h. Las muestras se prepararon en un volumen final de 15

ml en frascos de vidrio con cierre hermético para evitar entrada de oxígeno. Los reactivos se dispersaron con un agitador tipo vórtex y baño ultrasónico.

Las muestras irradiadas, conteniendo concentraciones menores o iguales a 20 mM de GMA inicial, resultaron en productos del tipo particulado. Por el contrario, concentraciones mayores de GMA resultaron en productos tipo gel (**Figura 2.19**). Estos últimos fueron descartados. En base a los resultados obtenidos se seleccionó la concentración inicial de GMA **20 mM** para utilizar en la preparación de NCPs.

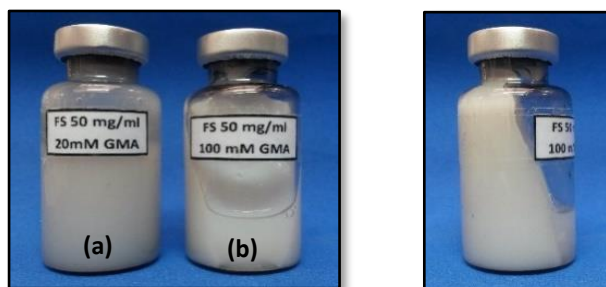


Figura 2.19
Aspecto de las muestras irradiadas conteniendo FS (50mg/ml) y:
Izquierda: (a) GMA 20 mM, (b) GMA 100 mM
Derecha: 100 mM de GMA (foto (b) de perfil)

Determinación del tipo de SiO₂ a utilizar

Una vez determinada la concentración de GMA, se estudió el tipo y la cantidad de material base para los NCPs. Cabe mencionar que para tal fin se utilizaron silicatos comerciales, muy bien caracterizados y estandarizados.

Una consideración de importancia fue la estabilidad de la suspensión hasta su irradiación. Para que la reacción sea reproducible, el material base debe mantenerse completamente en suspensión hasta su irradiación. Por lo general, sin tener en cuenta el tiempo de traslado, las muestras son irradiadas dentro de las 72 h desde su preparación. Por dicho motivo, el material base nanoparticulado debería mantenerse en suspensión por un período de tiempo similar.

Inicialmente se estudiaron preparaciones con SiO₂ nanoparticulado de 20 nm de diámetro de partícula, superficie específica de 590-690 m²/g y densidad

de 2,2 a 2,6 g/cm³. La suspensión acuosa de este material, más allá de su tamaño nanométrico, sedimenta en período de aproximadamente 24 h en las condiciones estudiadas. Debido a esto se decidió reemplazar el SiO₂ nanoparticulado por otro material similar, pero que sea capaz de permanecer en suspensión durante más tiempo. Para ello se utilizó *Fumed Sílica* (FS), un tipo de SiO₂ nanoparticulado de 14 nm de diámetro de partícula obtenido a partir del tratamiento a altas temperaturas del SiCl₄. Dicho nanomaterial tiene una superficie específica de 200 m²/g, aproximadamente tres veces menor que la del SiO₂ nanoparticulado convencional. Sin embargo, este material se mantiene en suspensión por más de 72 h en estas condiciones de trabajo. En la **Figura 2.20** se muestran suspensiones de SiO₂ nanoparticulado y de FS a tiempo cero y a las 72 h de reposo, ambas a una concentración de 50 mg/ml en agua.

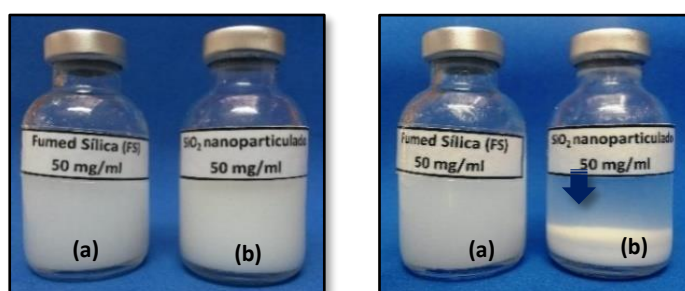


Figura 2.20
Determinación del tipo de SiO₂
Suspensiones en agua (50 mg/ml) de: **(a)** FS y **(b)** SiO₂ 20 nm
Izquierda: Tiempo cero. **Derecha:** 72 h de sedimentación.

Preparación de compuestos FS-x&pGMA

Una vez determinados el tipo de material base y la cantidad monómero máxima para el recubrimiento, se estudió la cantidad de FS a utilizar en la preparación de los NCPs. Con el propósito de evaluar el efecto de la aglomeración de las NPs de FS durante la polimerización se ensayaron cuatro preparaciones diferentes, cada una conteniendo una cantidad constante de GMA (20 mM) y diferentes concentraciones de FS. La composición global de las diferentes condiciones se encuentra en la **Tabla 2.2**. En la **Figura 2.21** se encuentran las muestras previo a la irradiación. En la misma se aprecian

claramente dos aspectos: (i) la completa solubilidad del GMA en agua bajo estas condiciones, y (ii) el incremento en la concentración de FS.

Tabla 2.2
Composición de las muestras para la preparación de NCPs

Muestra	FS (mg/ml)	GMA (mg)	FS (mg)	Vol. Final (ml)
FS2	1,5	43	22,5	15
FS9	6	43	90	15
FS27	18	43	270	15
FS54	36	43	540	15



Figura 2.21
Estado de las muestras previo a la irradiación
De izquierda a derecha: FS2; FS9; FS27 y FS54

Cabe destacar que las condiciones de reacción utilizadas para la preparación de los NCPs se encuentran dentro de lo que se considera actualmente según la literatura internacional como “suaves” y amigables con el medio ambiente, ya que no se utilizan solventes orgánicos durante la preparación de los mismos (Pace *et al*, 2011). Esto es sumamente importante ya que no sólo se disminuyen los riesgos por parte del operador durante la preparación de las muestras, sino que también se reduce el impacto ambiental.

Polimerización del GMA sobre FS

Una vez preparadas todas las muestras, se procedió a la polimerización del monómero por irradiación empleando una fuente gamma de ^{60}Co en la *Planta*

de *Irradiación Semi Industrial* (PISI) del Centro Atómico Ezeiza. Las muestras recibieron una dosis de 10 kGy a una velocidad de 1 kGy/h. Estas condiciones de irradiación utilizadas generan suficiente cantidad de radicales libres para consumir completamente todas las unidades monoméricas (Grasselli *et al*, 2001).

Un indicativo del proceso de polimerización fue la decantación del material después de irradiado (**Figura 2.22**). Este hecho puede deberse al aumento de la densidad del compuesto polimerizado, principalmente a causa del entrecruzamiento entre el homopolímero y los compuestos formados entre la FS y el pGMA, denominados como FS-x&pGMA (Seymour and Carraher, 1995). Cabe recordar que durante la irradiación se forma gran cantidad de homopolímero. A su vez, la estabilidad de las nuevas suspensiones dependerá del tamaño y características superficiales de los mismos, generando así el fenómeno de precipitación en algunos casos. (Callister, 1995).

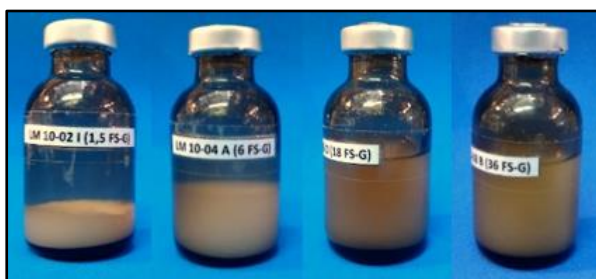


Figura 2.22
Compuestos FS-x&pGMA luego de la irradiación
De izquierda a derecha: FS2, FS9, FS27 y FS54

Extracción de NCPs

Con motivo de obtener dispersiones coloidales de NCPs, los compuestos FS-x&pGMA (con homopolímero) obtenidos luego de la irradiación se purificaron con THF, un solvente polar ampliamente utilizado como disolvente en la industria de polímeros (Cancho Rodríguez 2003, González 2008).

El proceso se llevó a cabo sobre los mismos viales que fueron utilizados para la preparación de las muestras. Para ello se realizó primero una extracción con THF y luego lavados con H₂O, mediante tres ciclos de resuspensión/centrifugación para eliminar el homopolímero. Posteriormente se redujo el volumen hasta alcanzar aproximadamente un 25 % del volumen inicial

para eliminar restos de solvente y se resuspendieron en un volumen final de 2 ml con H₂O.

Luego de este procedimiento todas las preparaciones resultaron en suspensiones coloidales de NCPs. En la **Figura 2.23** se muestran dos imágenes, una correspondiente a los NCPs de la condición FS9 y otra donde se aprecia el fenómeno de dispersión de la luz láser, denominado efecto Tyndall.

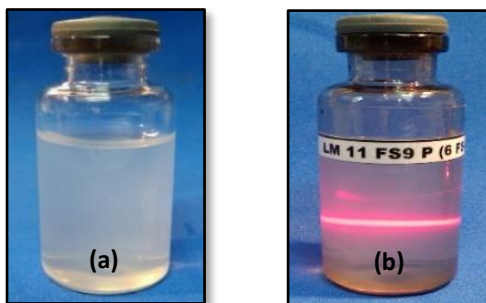


Figura 2.23
Aspecto de los NCPs purificados
(a) NCPs FS9 y **(b)** Efecto Tyndall sobre NCPs FS9

Ensayos de caracterización

Los NCPs preparados se caracterizaron mediante diversas técnicas, cuyos resultados se describen a continuación.

Caracterización por Dispersión Dinámica de la Luz

El diámetro de partícula de los NCPs se determinó utilizando DLS. En la **Tabla 2.3** se muestra el diámetro promedio de cada muestra. El promedio de las mediciones tuvo un desvío estándar menor al 10 %, con un máximo del 13 % para la condición FS54. Todas las muestras mostraron tamaños entre 60 y 190 nm. Se observa una correlación inversa entre el tamaño de partícula y la concentración inicial de FS, siendo la de mayor diámetro la correspondiente a la menor concentración inicial de FS. Mediante esta técnica se pudo comprobar tanto la homogeneidad como el tamaño nanométrico de los NCPs.

Tabla 2.3
Tamaño de partícula promedio de los NCPs

<i>Muestra</i>	<i>FS (mg/ml)</i>	<i>Diámetro de partícula promedio (nm)</i>	<i>Rango de diámetro de los agregados (nm)</i>
FS2	1,5	190 +/- 15	580 – 760
FS9	6	115 +/- 7	220 – 270
FS27	18	85 +/- 8	300 – 390
FS54	36	60 +/- 8	220 – 280

Como se mencionó anteriormente, se detectó una disminución en el diámetro de partícula de los NCPs a concentraciones mayores de FS inicial. Esto puede deberse a la agregación de la FS al momento de la polimerización debido a la atracción electrostática de los silanoles superficiales. Por ende, a mayor cantidad inicial de FS, mayor efecto de aglomeración. De esta manera, siendo la concentración de monómero constante en todas las condiciones, la proporción de recubrimiento polimérico en cada NCP será menor, resultando así en mayor cantidad de partículas pero de menor diámetro. Por el contrario, concentraciones

menores de FS permitirán al GMA polimerizar entre NPs de FS más dispersas, permitiendo la formación de NCPs de mayor tamaño pero en menor cantidad.

En la **Figura 2.24** se encuentran los histogramas correspondientes a las cuatro condiciones de preparación. En los mismos se representa la intensidad de la señal en función del diámetro de partícula. A pesar de que no se utilizó ningún tipo de surfactante para mantener estable a los NCPs, en todos los casos se observó una distribución normal, altamente monodispersa y con escasa formación de agregados. A priori, la escasa formación de agregados y la alta estabilidad de los NCPs sería un indicativo de un alto valor absoluto en el potencial Z de los NCPs (Hunter, 2013).

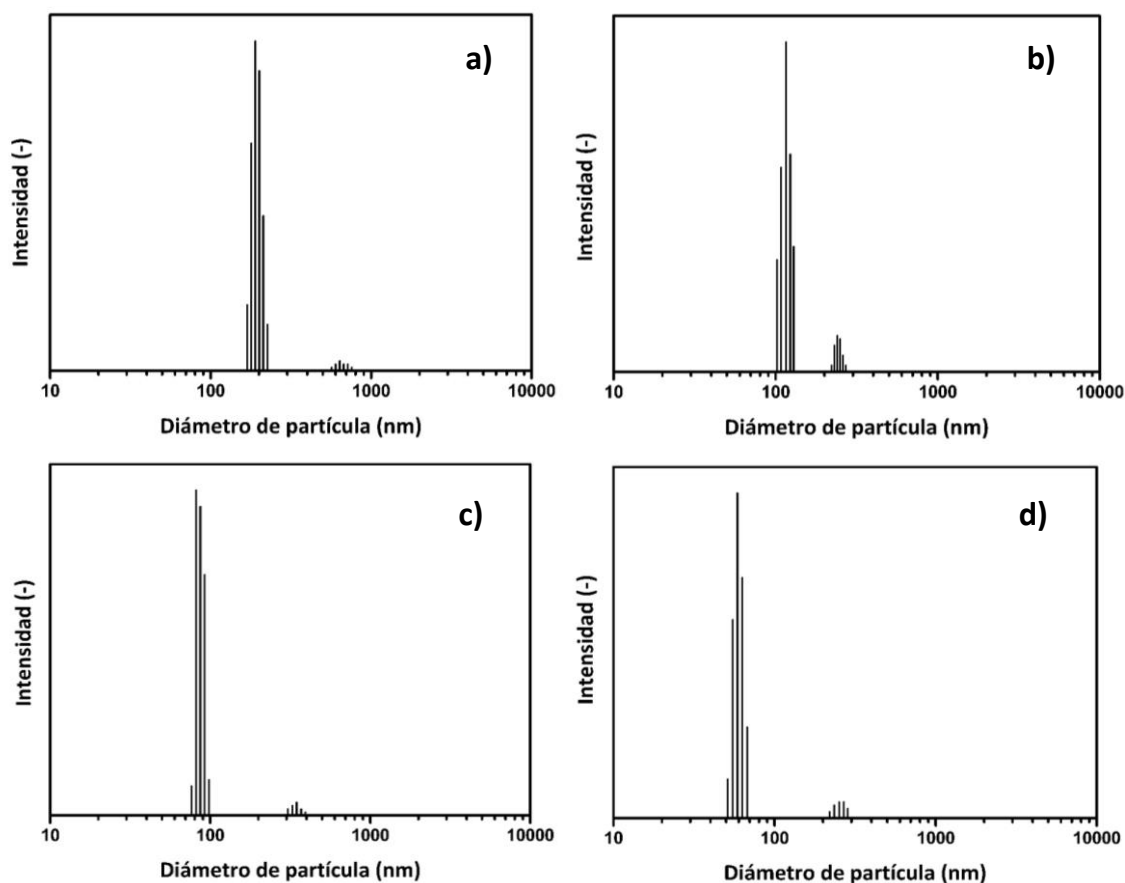


Figura 2.24
Distribución del tamaño de partícula de los NCPs de acuerdo a mediciones por DLS
(a) FS2, (b) FS9, (c) FS27 y (d) FS54

Caracterización por Espectroscopía de Oclusión Iónica

Se utilizó una nueva técnica de caracterización de nano y micropartículas denominada *Scanning Ion Occlusion Spectroscopy* (SIOS) para medir el tamaño de partículas de los NCPs. El equipo *qViro* permite mediciones de partículas individuales de alto rendimiento a medida que los coloides y / o analitos biomoleculares son conducidos de uno a la vez a través de nanoporos. Las partículas que cruzan el poro se detectan como un cambio transitorio en el flujo de corriente iónica, el cual se detecta como un bloqueo temporal y cuya amplitud depende de la magnitud del bloqueo. Como la magnitud del bloqueo es proporcional al tamaño de partícula, se puede lograr un tamaño de partícula preciso después de la calibración con un estándar conocido. En el caso de los NCPs, las pruebas realizadas no generaron resultados confiables ni reproducibles dado que se registraron una escasa cantidad de bloqueos en la señal (**Figura 2.25 (a)**) posiblemente debido a la obstrucción del poro por compactación de NCPs. Por otro lado, como era de esperar las NPs de calibración presentaron gran cantidad de bloqueos en la señal (**Figura 2.25 (b)**).

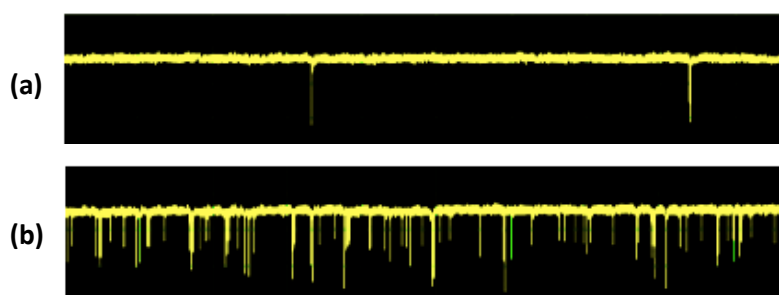


Figura 2.25
Captura de los bloqueos producidos por el paso de NPs a través del poro.
(a) NCPs FS9, **(b)** NPs Estándar de PE (227 nm)

Caracterización por Espectroscopía FTIR-ATR

Para comprobar la presencia del pGMA en los NCPs se recurrió a la técnica FTIR acoplada a un módulo ATR. En base a bibliografía y reportes previos de otros autores, es de esperar que los espectros correspondientes a los NCPs presenten señales correspondientes a los grupos funcionales

característicos de cada uno de los materiales que los conforman (FS y pGMA). Sin embargo, sólo se detectó pGMA en los NCPs de la condición FS2 y en menor medida en la FS9, lo cual fue un indicativo de una cantidad insuficiente de polímero para ser detectado por este método en las otras dos condiciones de preparación (FS27 y FS54), cuyos espectros fueron similares a los de la FS original (**no representados**). En la **Figura 2.26** se encuentran los espectros correspondientes a la FS, al homopolímero pGMA y a las muestras FS2 y FS9.

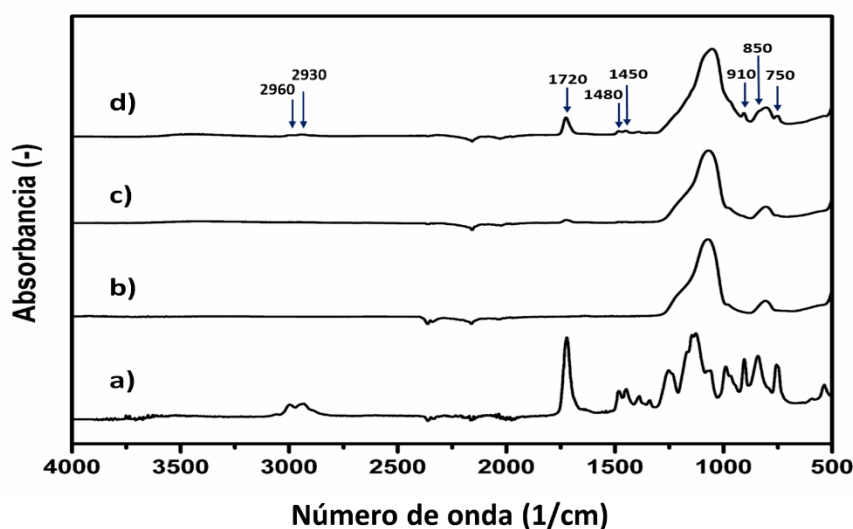


Figura 2.26
Espectros de FTIR-ATR correspondientes a muestras secas
de: (a) pGMA; (b) FS; (c) NCPs FS9 y (d) NCPs FS2

El espectro **(a)** de la **Figura 2.26** presentó una señal fuerte en 1720 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) del éster del pGMA. A su vez se detectaron las señales correspondientes a las bandas vibracionales de estiramiento del metilo (CH_3) entre 2960 y 2930 cm^{-1} y de torsión entre 1480 y 1450 cm^{-1} . Las bandas vibracionales de torsión en fase del $-(\text{CH}_2)_2-$ se detectaron en los 750 cm^{-1} . También se detectaron las siguientes señales correspondientes a las bandas vibracionales del anillo oxirano: de estiramiento en 1250 cm^{-1} y de deformación simétrica y asimétrica en 850 y 910 cm^{-1} respectivamente. (Lien-Vien *et al*, 1991).

El espectro **(b)** de la **Figura 2.26** presentó el espectro característico del SiO_2 , con dos señales bien definidas entre los 1000 y 1250 cm^{-1} y otra entre los

750 y 920 cm^{-1} . La primera (entre 1000 y 1100 cm^{-1}) corresponde las bandas vibracionales de estiramiento simétricas y asimétricas del Si-O-Si. La segunda (entre 830 y 920 cm^{-1}) de menor intensidad, corresponde al estiramiento de los silanoles (Si-O-H) (Demir *et al*, 2010).

Las NCPs FS9 y FS2 (**Figura 2.26 (c) y (d)**) presentaron los picos característicos de la FS, atribuidos principalmente al SiO_2 . Sin embargo, pese a la gran intensidad de estas señales, la presencia de matriz polimérica se pudo detectar en la muestra FS2 a partir de la banda vibracional correspondiente al grupo carbonilo del pGMA en los 1720 cm^{-1} . También se detectaron señales de muy baja intensidad correspondientes al estiramiento y torsión del $-\text{CH}_3-$ entre 2960 y 2930 cm^{-1} y 1480 y 1450 cm^{-1} respectivamente, a la de torsión en fase del $-(\text{CH}_2)_2-$ en 750 cm^{-1} y a la deformación simétrica y asimétrica del grupo epóxido (850 y 910 cm^{-1} respectivamente) (Eckert *et al*, 2000; Omer-Mizrahi *et al*, 2007; Demir *et al*, 2010). Dichas señales revelaron no sólo la presencia del pGMA en los NCPs sino también la disponibilidad de los grupos epóxidos para posteriores reacciones de acoplamiento nucleofílico.

Más allá de que se detectaron los grupos funcionales correspondientes a ambos componentes de los NCPs, y aunque se supone que el pGMA se une covalentemente a la FS (Eckert *et al*, 2000) mediante esta técnica de caracterización no se pudo asegurar si el polímero se encuentra en forma de injerto o de recubrimiento sobre las partículas de FS (**Figura 2.27**) ya que la señal correspondiente al grupo Si-O-CH₂- (820 cm^{-1}) en la muestra FS2 se solapa con la del grupo epóxido (850 cm^{-1}).

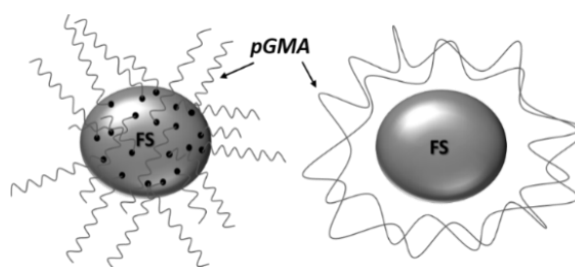


Figura 2.27
Representación esquemática de los posibles estados del pGMA sobre la FS
Izquierda: Injerto, Derecha: Recubrimiento

Análisis Termogravimétrico

La proporción de matriz polimérica/sustrato inorgánico en los NCPs se determinó por TGA. Los ensayos revelaron presencia de materia orgánica en todas las muestras, con porcentajes variables entre 1 y 45 % de acuerdo a las condiciones iniciales de preparación (**Tabla 2.4**). Además, se determinó que un incremento en la cantidad inicial de FS genera un descenso progresivo en las cantidades de materia orgánica hasta cerca del 1% P/P de contenido, de manera proporcional al descenso en el tamaño de partícula detectado por DLS.

Tabla 2.4
Porcentaje de matriz polimérica en los NCPs

<i>Muestra</i>	<i>FS (mg/ml)</i>	<i>Matriz polimérica (%)</i>	<i>1^{er} TD (°C)</i>
pGMA	0	97,5	190
FS2	1,5	44	210
FS9	6	17	250
FS27	18	7	290
FS54	36	1	ND

En el gráfico **(a)** de la **Figura 2.28** se representa la pérdida de masa de los NCPs en función de la temperatura de degradación (TD). Cabe destacar que los gráficos se esquematizan partir de los 150 °C con el fin de descartar variaciones por la presencia de agua adsorbida por los NCPs (Barreto *et al*, 2003). En todos los casos se observó un aumento en la 1^{er} TD a medida que disminuye la proporción de materia orgánica y aumenta la cantidad de FS en el NCP. Este aumento en la estabilidad térmica se atribuyó a la interacción de la red polimérica con la FS (Demir *et al*, 2010), material que puede resistir temperaturas de hasta 1500 °C sin fundirse. En el caso de los NCPs de la condición FS54 no se pudo determinar la 1^{er} TD dada la escasa cantidad de polímero en el NCP.

En el gráfico **(b)** de la **Figura 2.28** se representa la velocidad de degradación (derivada de la pérdida de masa) en función de la temperatura. A partir del mismo se observó que el proceso de descomposición orgánica implicó

dos etapas bien definidas. Según se describe en literatura (Demir *et al*, 2010), la primera etapa corresponde a la despolimerización del pGMA, mientras que la segunda se refiere a la descomposición de los grupos éster del GMA. Por otro lado, se observó un desplazamiento generalizado en la temperatura de degradación hacia temperaturas mayores sobre los NCPs de mayor concentración de FS, similar a lo observado en el gráfico (a), y atribuido a la interacción de la red polimérica con la FS.

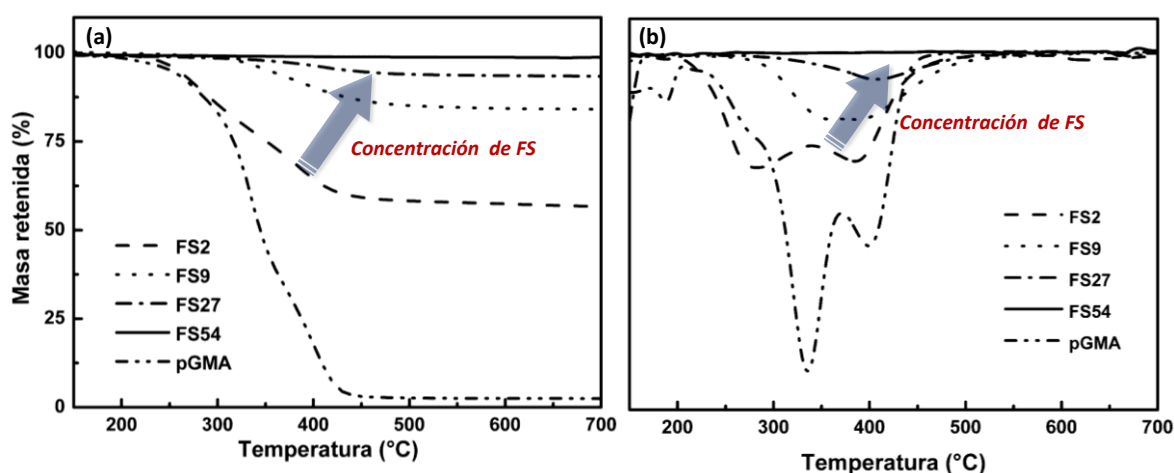


Figura 2.28
(a) Pérdida de masa vs. Temperatura de los NCPs
(b) Velocidad de descomposición vs. Temperatura de los NCPs

Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

Para determinar tanto la morfología como la estructura de los NCPs se realizaron estudios por FESEM. En la **Figura 2.29** se encuentran micrografías correspondientes al homopolímero pGMA, a la FS original, a los compuestos sin purificar y a los NCPs FS9.

Las mayoría de las micrografías representadas en la **Figura 2.29** presentaron características que *a priori* eran de esperar: el homopolímero pGMA con una superficie lisa (**Figura 2.29 (a)**); las NPs de FS en “*paquetes aglomerados*” de hasta 300 nm de diámetro de acuerdo a lo que describe el fabricante (**Figura 2.29 (b)**); y el híbrido FS9&pGMA sin purificar se observa con una estructura heterogénea y una superficie lisa (**Figura 2.29 (c)**). Al analizar las

micrografías de los NCPs FS9 (**Figura 2.29 (d)**) se detectó una distribución altamente monodispersa aunque en un estado de aglomeración. Este hecho se observó en todas las micrografías realizadas y puede atribuirse al proceso de secado de las muestras durante su ensamble en el porta muestra del FESEM. Más allá de esto, se pudo observar a los NCPs con una morfología irregular del tipo esférica y una superficie lisa, lo que hace suponer a los mismos como “paquetes de FS” de distintas concentraciones (según la condición inicial de preparación), recubiertos con pGMA.

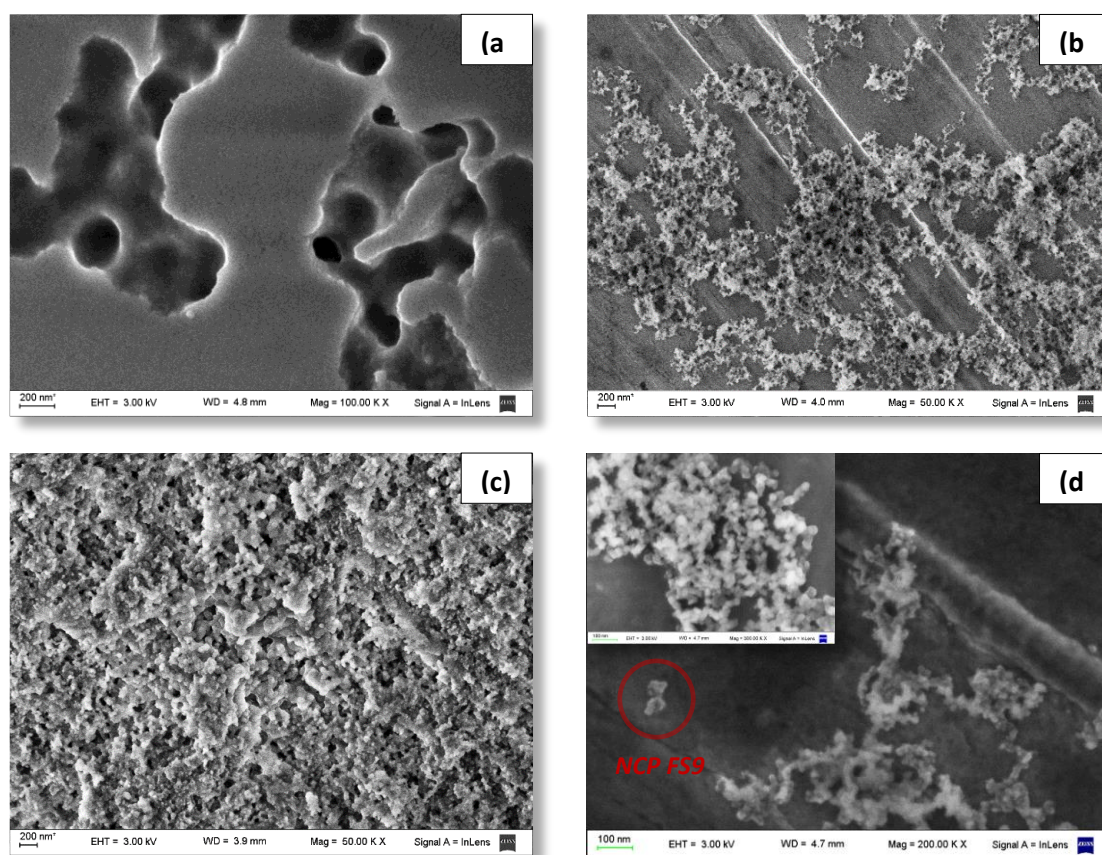


Figura 2.29

Micrografías FESEM de muestras secas correspondientes a:
(a) pGMA; **(b)** FS original; **(c)** Compuesto híbrido FS9&pGMA y **(d)** NCPs FS9

Si bien no se ha podido capturar gran cantidad de imágenes de NCPs individuales, el tamaño de partícula calculado para los NCPs obtenido por FESEM se estimó en el orden de un 20% menor a los resultados obtenidos por DLS. Esta diferencia puede ser atribuida al hinchamiento por la hidratación de la red polimérica (Refojo *et al*, 1971; Omer-Mizrahi *et al*, 2007; Mattiasson, 2009).

Determinación del Potencial Z

Para estudiar la estabilidad tanto de las dispersiones de FS como de los NCPs se realizaron determinaciones del potencial Z en todo el rango de pH, de acuerdo al procedimiento detallado en M&M. Cabe recordar que un valor absoluto de potencial Z mayor a 25 mV es teóricamente suficiente para mantener al sistema estable y evitar la aglomeración de las partículas coloidales que los conforman (Hunter, 2013).

En la **Figura 2.30** se representa la variación del potencial Z en función del pH de muestras correspondientes a la FS y NCPs FS9. Un dato importante obtenido a partir de este tipo de ensayos es el valor del pH al cual el material se encuentra con carga superficial igual a cero (Punto isoeléctrico PI, ó pH_{pie}). Según datos de bibliografía (Deckman and Dunsmuir, 1982) el pH_{pie} teórico para el SiO_2 es 2,0. Sin embargo, a partir del gráfico **(a)** de la **Figura 2.30** se estableció un pH_{pie} de la FS alrededor de 3,0 ($\text{pH}_{\text{pie/FS}} \sim 3,0$). Por otro lado, se observó que los valores del potencial Z disminuyeron a medida que el pH aumenta, de acuerdo a la variación en la densidad de la carga superficial de los silanoles de la FS.

La curva del potencial Z correspondiente a los NCPs (**Figura 2.30 (b)**) fue más plana y constante en comparación con la curva de la FS, indicando una menor afección por parte de la superficie polimérica hacia los cambios de pH. Dada la naturaleza neutra de la superficie polimérica del pGMA, se esperaba un potencial Z en torno a 0 mV (entre +5 mV y -5 mV) (Li and Armes, 2010). Sin embargo, se obtuvieron valores negativos en todo el rango de pH (entre -7 mV y -22 mV) con tendencia hacia una meseta para valores de pHs mayores a 8,0. Esto estaría indicando algún tipo de ionización durante la preparación de los NCPs. Este potencial Z sería el responsable de favorecer la dispersión de los NCPs sin el agregado de algún surfactante.

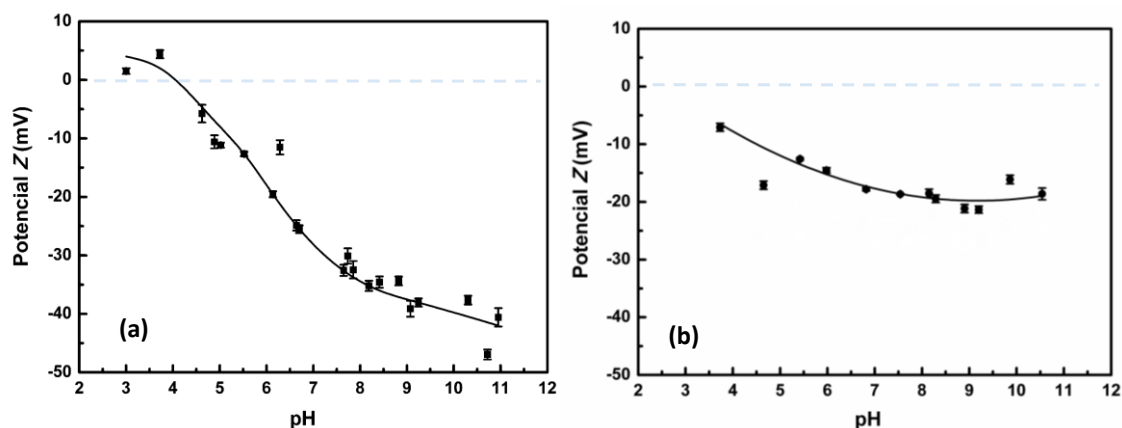


Figura 2.30
Variación del potencial Z (mV) vs. pH correspondiente a suspensiones coloidales de:
(a) FS, y (b) NCPs FS9

Relación FS/pGMA en los NCPs

Una vez determinados el diámetro de partícula y la proporción de materia orgánica en cada NCP, se intentó establecer una relación entre la cantidad de FS, la matriz polimérica y el diámetro de partícula. Para ello se representó el diámetro de partícula en función de la relación pGMA/FS correspondiente a los datos obtenidos por TGA (**Figura 2.31**). Como resultado se detectó un aumento en el diámetro de partícula hacia mayores proporciones de matriz polimérica. Sin embargo, no fue una correlación lineal ya que la misma se acercó a una meseta hacia valores de materia orgánica mayores al 50 % P/P .

Otro dato que se intentó estimar a partir de los datos de TGA y DLS fue la cantidad de NPs de FS presentes por cada unidad de NCP. Dicha estimación se realizó considerando a los NCPs como esferas de pGMA conteniendo NPs de FS en su interior, en una estructura del tipo “núcleo-envoltura” según el modelo de Zou *et al* (2008). Los resultados obtenidos se encuentran en la **Tabla 2.4**. Para realizar la estimación, primero se calculó el volumen de la esfera correspondiente a partir del diámetro de partícula de cada NCP. Luego se calculó el volumen total de las NPs de FS dentro de cada NCP. Para ello, se calculó el % de NPs de FS según el análisis de TGA. Finalmente se relaciona el volumen total de las NPs de FS con el volumen correspondiente a una unidad de FS (14 nm).

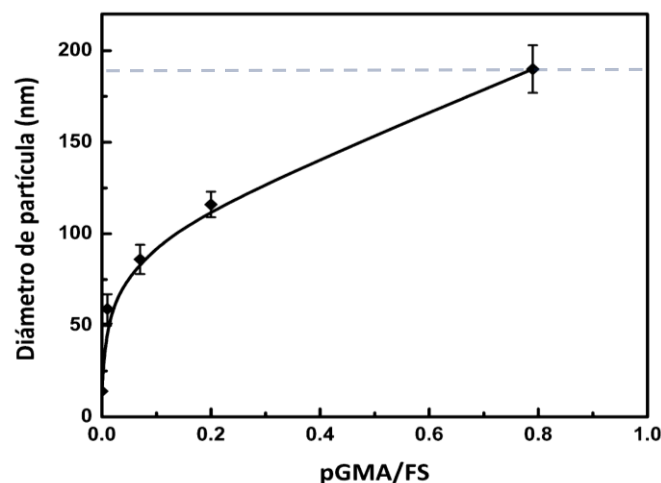


Figura 2.31
Diámetro de partícula (nm) vs. Relación pGMA/FS en

Tabla 2.4
Cantidad de unidades de FS por cada unidad de NCP

Muestra	Matriz polimérica (%) ¹	Diámetro de partícula (nm) ²	Unidades de FS por cada NCP
FS2	44,1	190 +/- 15	1400 +/- 112
FS9	17	115 +/- 7	523 +/- 42
FS27	6,8	85 +/- 8	247 +/- 20
FS54	1	60 +/- 8	78 +/- 6

¹ Determinado por TGA. ² Determinado por LDS

De la **Tabla 2.4** se puede deducir que la cantidad de NPs de FS calculada por cada unidad de NCP resultó extremadamente alta, lo cual indicaría que se podrían estimar a los NCPs no como sistemas “núcleo-envoltura” sino como un modelo tipo “budín con pasas”.

En base a los resultados obtenidos se propone para los NCPs un modelo de estructuras nanométricas compuestas por pGMA conteniendo aglomerados de NPs de FS en su interior, en una conformación espacial que depende de la cantidad inicial de FS. En la **Figura 2.32** se representa un esquema global para

la preparación de NCPs que se ajusta a los resultados experimentales obtenidos. En el mismo, se diferencian las 3 etapas principales: preparación, polimerización y obtención de NCPs. Además, se resalta la diferencia de los NCPs preparados a baja y alta concentración inicial de FS.

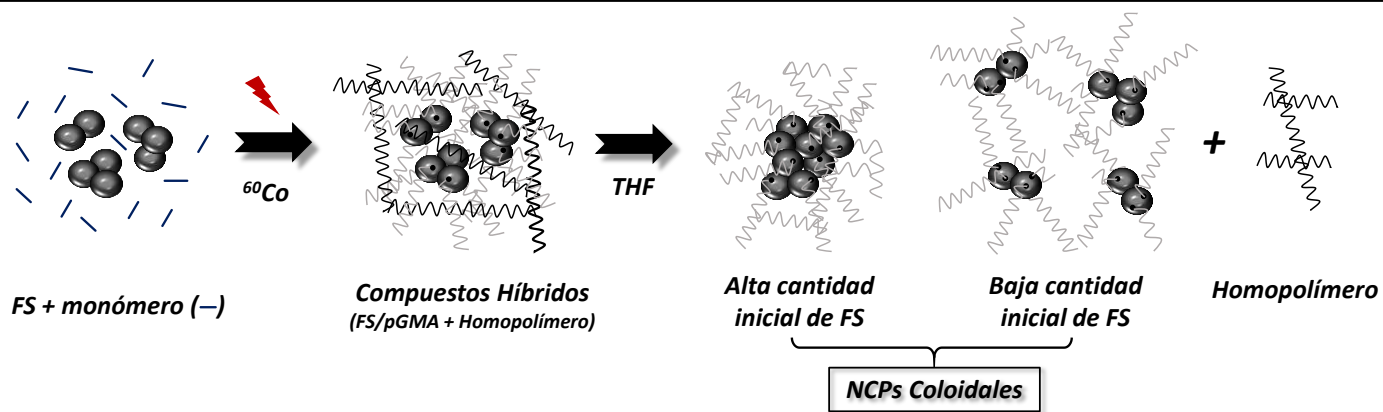


Figura 2.32

Esquema de la preparación de los NCPs de acuerdo a los resultados obtenidos

2.4 Conclusiones parciales

En este Capítulo se detalló la preparación de NCPs en base a FS y pGMA mediante una técnica de polimerización por injerto inducida por radiación ionizante por el método en simultáneo.

Las técnicas de caracterización permitieron obtener la siguiente información acerca de los NCPs:

- Se determinó que los NCPs presentaron una distribución homogénea con escasa formación de agregados. Los diámetro de partícula variaron de acuerdo a la relación inicial de FS/GMA entre 60 y 190 nm.
- Se confirmó que los NCPs están compuestos por una cantidad variable entre 1 y 45 % p/p de materia orgánica.
- Se comprobó la presencia de pGMA en los NCPs.
- Los NCPs presentan una superficie típica de polímeros, con una morfología esférica y una distribución altamente monodispersa.
- Los NCPs tienen un potencial de superficie negativo, pero no tan pronunciado como la FS.

CAPÍTULO 3

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCOMPUESTOS POLIMÉRICOS FUNCIONALES

3.1 Introducción

La adsorción de proteínas sobre diferentes superficies es un tema de estudio en muchas áreas de la Biotecnología moderna y por sobre todo en el campo de los biomateriales. En general, cuando un material está en contacto con una solución de proteínas, estas se adsorben prácticamente a cualquier superficie, por lo que es fundamental una comprensión adecuada de las fuerzas motrices y de la cinética involucrada según la finalidad de dicho proceso. Por ejemplo, en algunas aplicaciones dentro de los bioprocesos, la inmovilización de proteínas sobre un material es favorecida para enzimas, que son utilizadas como catalizadores inmovilizados. En otros casos, la adsorción de proteínas se debe prevenir para evitar la adherencia de bacterias, de interés en biomateriales para aplicaciones médicas. Por otro lado, en el ámbito de la purificación de proteínas se requiere una interacción definida y reversible entre las biomoléculas y el material (Welsch *et al*, 2013).

El estudio del proceso de conjugación de proteínas sobre NPs (NP&proteína) ha derivado en una diversidad de nuevas aplicaciones en medicina, como por ejemplo, en nanomateriales para el diagnóstico por imágenes, en biocatálisis, en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de drogas, entre otros. Sin embargo, los conjugados NP&proteína no se limitan solo a aplicaciones biológicas, sino que han alcanzado muchos otros campos como por ejemplo la ciencia de los materiales, con el diseño de nanosensores, celdas de biocombustible y nuevas herramientas para nanomontaje (Aubin-Tam *et al*, 2008).

Interacción de NPs con proteínas

En general, las interacciones de NPs con proteínas pueden clasificarse en cuatro categorías según el mecanismo de interacción: (i) adsorción electrostática, (ii) por interacción específica con un ligando unido a la superficie de la NP, (iii) conjugación mediante afinidad específica de la proteína por un ligando y (iv) mediante una reacción directa con átomos de la superficie de la NP (Aubin-Tam *et al*, 2008). A continuación se describen brevemente estas cuatro estrategias:

➤ **Por adsorción electrostática:** es el método más utilizado ya que no requiere una reacción química. Para que la adsorción se lleve a cabo, las NPs y las cadenas polipeptídicas deben poseer cargas opuestas de modo que se atraigan mutuamente. La interacción puede ser modulada por variaciones de pH o por regulación de la fuerza iónica del medio. Debido a que es una interacción no específica, las proteínas pueden interactuar con la NP en cualquier orientación (**Figura 3.1 (a)**).

➤ **Por unión covalente con ligandos de la NP:** consiste en la unión covalente entre algún grupo funcional de una proteína y las NPs mediante una reacción química específica (**Figura 3.1 (b)**). Mediante el control de la química superficial es posible obtener NPs con múltiples y variados tipos de proteínas.

➤ **Por afinidad específica de la proteína por un cofactor:** esta estrategia se suele llamar bioetiquetado y se basa en una unión específica mediante bioconjugación (**Figura 3.1 (c)**). El etiquetado más utilizado es mediante la incorporación biotina, la cual permite una unión específica con la proteína avidina o estreptavidina. Cabe destacar que si bien esta interacción es fuerte, no llega a ser covalente. Esta técnica es ampliamente utilizada ya que se pueden lograr nexos muy específicos debido a la amplia variedad de compuestos conjugados con biotina. Otros métodos para unir NPs a una proteína específica pueden ser mediante el uso de anticuerpos.

➤ **Reacción directa con átomos de la superficie:** consiste en la reacción directa de un grupo químico de la proteína (por lo general tioles) con átomos de la superficie de las NPs (**Figura 3.1 (d)**). Este tipo de unión no necesita de un ligando específico, por lo que generalmente resulta en conformaciones específicas de la proteína sobre las NPs. Debido a esto, este tipo de enlaces son muy utilizados en NPs destinadas a ser utilizadas como biosensores, donde los procesos de detección son sensibles en la escala nanométrica.

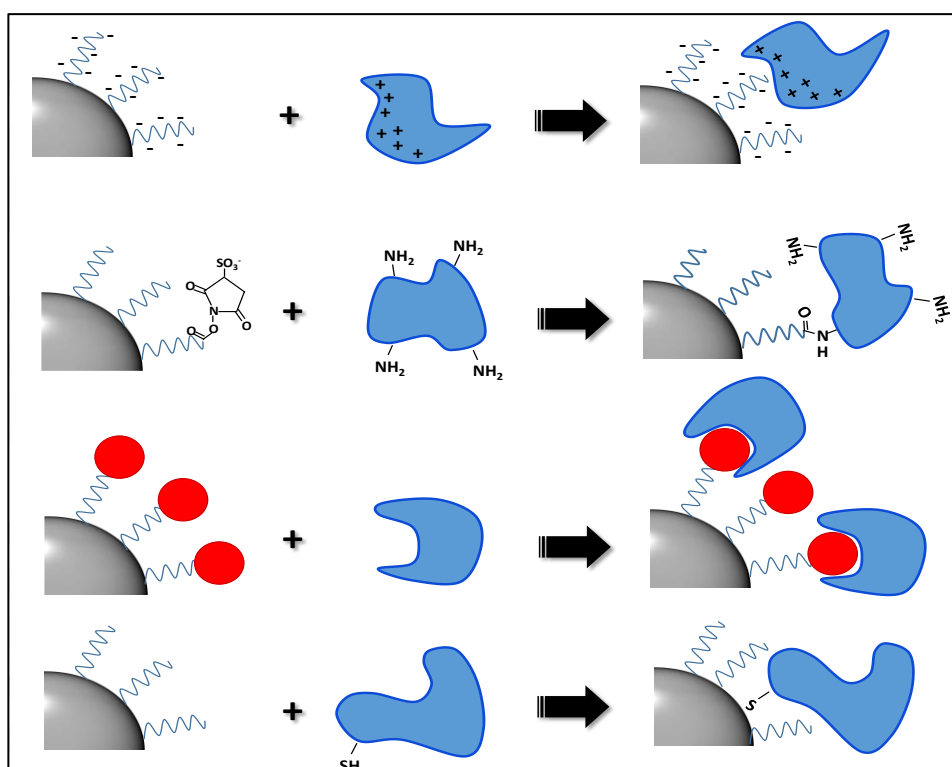


Figura 3.1

Estrategias de interacción entre NPs y proteínas

(a) Adsorción electrostática, (b) Unión covalente del ligando a la superficie de la NP, (c) Conjugación mediante afinidad específica, y (d) Enlace directo con la superficie de la NP.

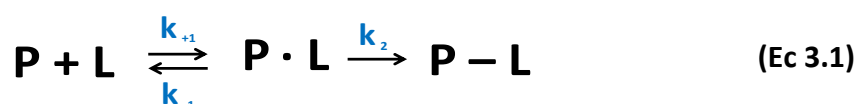
(Extraído de Aubin-Tam et al, 2008)

Las proteínas también pueden ser unidas químicamente a los diferentes tipos de NPs utilizando moléculas bifuncionales. En este caso, las NPs necesitan ser previamente derivatizadas con grupos funcionales, tales como ácidos carboxílicos, grupos hidroxilo, sulfhídricos o aminos, entre otros.

Inmovilización de ligandos de afinidad sobre materiales epoxidados

Los materiales que contienen grupos epoxi activados permiten desarrollar protocolos que no requieren reactivos especiales para la inmovilización de moléculas como proteínas, nucleótidos o ligandos de afinidad. Los grupos epóxido son altamente estables a valores de pH neutros, incluso en condiciones húmedas. Por lo tanto, estos materiales pueden almacenarse durante largos períodos de tiempo (Mateo *et al*, 2000).

La reacción entre ligandos de afinidad y grupos epóxidos sobre un material puede representarse de una manera sencilla de acuerdo a la **Ecuación 3.1**:



donde P es el ligando de afinidad en solución, L es la fase estacionaria conteniendo grupos epóxido, P•L es el enlace ligando en la fase estacionaria, y P – L es el ligando unido covalentemente a la superficie mediante la reacción con los grupos epóxidos. Según este modelo, cualquier perturbación en la mezcla de inmovilización que desplace el equilibrio para aumentar la proporción de [P•L]/[P] [L], aumentará la concentración de ligando cerca de los grupos epóxido a lo largo de la superficie del soporte. Por otro lado, el aumento en la concentración de P•L puede resultar en aumentos en las tasas de producción del producto P – L (Wheatley *et al*, 1999).

NCPs como adsorbentes proteicos

En el **Capítulo 2** se detalló la preparación y caracterización de NCPs del tipo “budín con pasas” con una morfología esférica y una distribución altamente monodispersa. Los diámetros de partícula fueron entre 60 y 190 nm de acuerdo a las condiciones iniciales de preparación.

Como se describió anteriormente, para que un nanomaterial pueda ser utilizado como adsorbente proteico debe tener una superficie funcional. En nuestro caso particular una superficie que interactúe específica y reversiblemente con algún tipo de biomolécula. Los NCPs preparados pueden modificarse químicamente mediante reacciones de sustitución nucleofílica sobre los grupos epóxidos del pGMA (Kim *et al*, 1996). Los ligandos a inmovilizar fueron seleccionados para que los NCPs adquirieran características químicas similares a las de los materiales cromatográficos utilizados para la purificación de proteínas. De esta manera, bajo condiciones de reacción específicas, el epóxido del pGMA puede reaccionar con, por ejemplo, sulfito de sodio, proteína A recombinante y ácido iminodiacético (IDA) para obtener NCPs aniónicos o de afinidad por inmunoglobulinas y proteínas recombinantes con etiqueta de histidinas respectivamente (Hermanson, 2013). Cabe mencionar que la Proteína A recombinante utilizada se la denominará en adelante Avímero (Av). Esta es una proteína recombinante construida genéticamente por la unión de dos dominios B de la proteína A de *Staphylococcus Aureus* más una etiqueta de His y Cys según se describe en Kangwa *et al*, 2015. Esta etiqueta permite la purificación del Av mediante la cromatografía IMAC y simultáneamente dispone de grupos tioles libres para la inmovilización orientada de la proteína (Kikot *et al*, 2014). A continuación se detalla tanto la preparación como la caracterización de los NCPs funcionales (NCPs-X).

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Materiales

La modificación con ligandos de afinidad se realizó sobre los NCPs FS9. Los reactivos utilizados fueron: Sulfito de sodio (Na_2SO_3) $\geq 98,0\%$ marca Biopack, Ácido Iminodiacético (IDA) $\geq 98,0\%$ marca Sigma-Aldrich, Cloruro de níquel (II) hexahidratado ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) $\geq 98,0\%$ marca Merck, y Avímero. Este último fue donado gentilmente por el Prof. Dr. Marcelo Fernández Lahore del Laboratorio de *Downstream Bioprocessing* de la Universidad Jacobs de Bremen, Alemania. El resto de los reactivos fueron de grado analítico. Todos los ensayos se realizaron con agua desionizada y filtrada con filtro de $0,22\ \mu\text{m}$.

3.2.2 Metodología

Incorporación de grupos sulfónicos

NCPs sulfónicos (**NCPs-S**) se prepararon mediante la reacción de los grupos epóxido del pGMA con sulfito de sodio de acuerdo al protocolo descrito por Ventura *et al*, 2008. Para ello, una parte de la suspensión de NCPs purificados y tres partes de una mezcla compuesta por sulfito de sodio/isopropanol/agua (10/15/75 P/P) se colocaron en viales de vidrio de 20 ml. Luego se sellaron herméticamente con tapa de goma y precinto metálico, y se agitaron a $40\ ^\circ\text{C}$ en un horno eléctrico ORL (modelo SD CAF 404) durante 12 h. A continuación, los NCPs-S se fraccionaron en tubos *Eppendorf* de 2 ml y se lavaron mediante tres ciclos de centrifugación/resuspensión con 2 ml de H_2O destilada a 10.000 RPM durante 5 min en una centrífuga HERMLE Z200a. A continuación, los NCPs-S se resuspendieron en 2 ml de ácido sulfúrico 0,5 M y se agitaron durante 3 h a $40\ ^\circ\text{C}$ en un baño termostático con agitación orbital modelo HZ-9613. Luego se lavaron nuevamente mediante tres ciclos de centrifugación/resuspensión con 2 ml de H_2O destilada. Finalmente se resuspendieron en 2 ml de *buffer Fosfato 50 mM pH 7,0*. Por último se transvasan a un vial limpio de 20 ml y se almacenaron a TA (máximo 30 d) hasta su utilización.

Inmovilización de Avímero

NCPs con Avímero inmovilizado (**NCPs-Av**) se prepararon mediante la reacción de los grupos epóxido del pGMA con las cisteínas presentes en la secuencia terminal del Av según el protocolo descrito por Hermanson, 2013. Para ello, los NCPs purificados se fraccionaron en tubos *Eppendorf* de 2 ml y se concentraron por centrifugación a 10.000 RPM durante 5 min. El sobrenadante se descartó y los NCPs se resuspendieron en 1 ml de DMSO utilizando un agitador vórtex y finalmente aplicando turbulencia mediante el flujo de una punta de micropipeta p1000. Los tubos se incubaron a TA durante 30 min y se centrifugaron nuevamente. A continuación, el sobrenadante se descartó y los NCPs se resuspendieron en 1 ml de una mezcla compuesta por glicerol 10 %, TCEP 150 μ M y Avímero (2 mg/ml) en *buffer PBS* (*buffer fosfato salino 10 mM*, pH 7,4). Los tubos se mantuvieron en rotación constante a TA durante 4 h en un ROTOLAB. Luego se colocaron en la heladera (4 °C) durante 12 h. Finalmente, los NCPs-Av se lavaron mediante tres ciclos de resuspensión/centrifugación con 2 ml de Tween 20 al 0,05% en *buffer PBS* y finalmente con 2 ml de *buffer PBS*. Por último, los NCPs-Av se transvasan a un vial limpio de 20 ml y se almacenaron a 4 °C (máximo 30 d) hasta su utilización.

Incorporación de ácido iminodiacético (IDA)

NCPs con ligando IDA/ Ni^{+2} (**NCPs-IDA/ Ni^{+2}**) se prepararon mediante la reacción de los grupos epóxido del pGMA con IDA según adaptaciones de los protocolos descritos por Ventura *et al*, 2008 y Carbajal *et al*, 2009. Para ello, NCPs purificados se concentraron por centrifugación a 10.000 RPM durante 5 min y se resuspendieron en 2 ml de una mezcla de IDA 1 M pH 10,0/DMSO (1:1) utilizando un agitador vórtex y finalmente aplicando turbulencia mediante el flujo de una punta de micropipeta p1000. Las muestras se transvasan a un vial de 20 ml (7 tubos/vial), se sellaron herméticamente y se incubaron a 80 °C durante 12 h en un baño termostático con agitación orbital modelo HZ-9613. Luego de la reacción, los NCPs-IDA se fraccionaron en tubos *Eppendorf* de 2 ml junto con 0,1 ml de 6-mercaptopetanol y se incubaron a 40 °C durante 2 h en un horno eléctrico ORL modelo SD CAF 404. Los NCPs-IDA se lavaron mediante 5 ciclos

de centrifugación/resuspensión con 2 ml de H₂O. Finalmente, se resuspendieron en 1 ml de NiCl₂ 0,5 M (sólo cuando los NCPs-IDA se utilizaron para purificar proteínas) y se incubaron a TA durante 2 h en un ROTOLAB. Los NCPs-IDA/Ni⁺² se lavaron mediante 3 ciclos de centrifugación/resuspensión con 2 ml de H₂O y finalmente se resuspendieron en 2 ml de *buffer Fosfato 50 mM pH 7,0*. Por último se transvasan a un vial limpio de 20 ml y se almacenaron a TA (máximo 30 d) hasta su utilización.

Caracterización de NCPs funcionales

Los NCPs funcionales (**NCPs-X**) se caracterizaron mediante las mismas técnicas que se utilizaron para caracterizar los NCPs, descritas en el **Capítulo 2**.

3.3 Resultados y Discusión

El objetivo de este Capítulo plantea la preparación y caracterización de NCPs-X. Los mismos se prepararon mediante reacciones de sustitución nucleofílica entre los grupos epóxidos del pGMA y diferentes ligandos, tales como sulfito de sodio, Avímero e IDA/ NiCl_2 según se describen en la **Figura 3.2**.

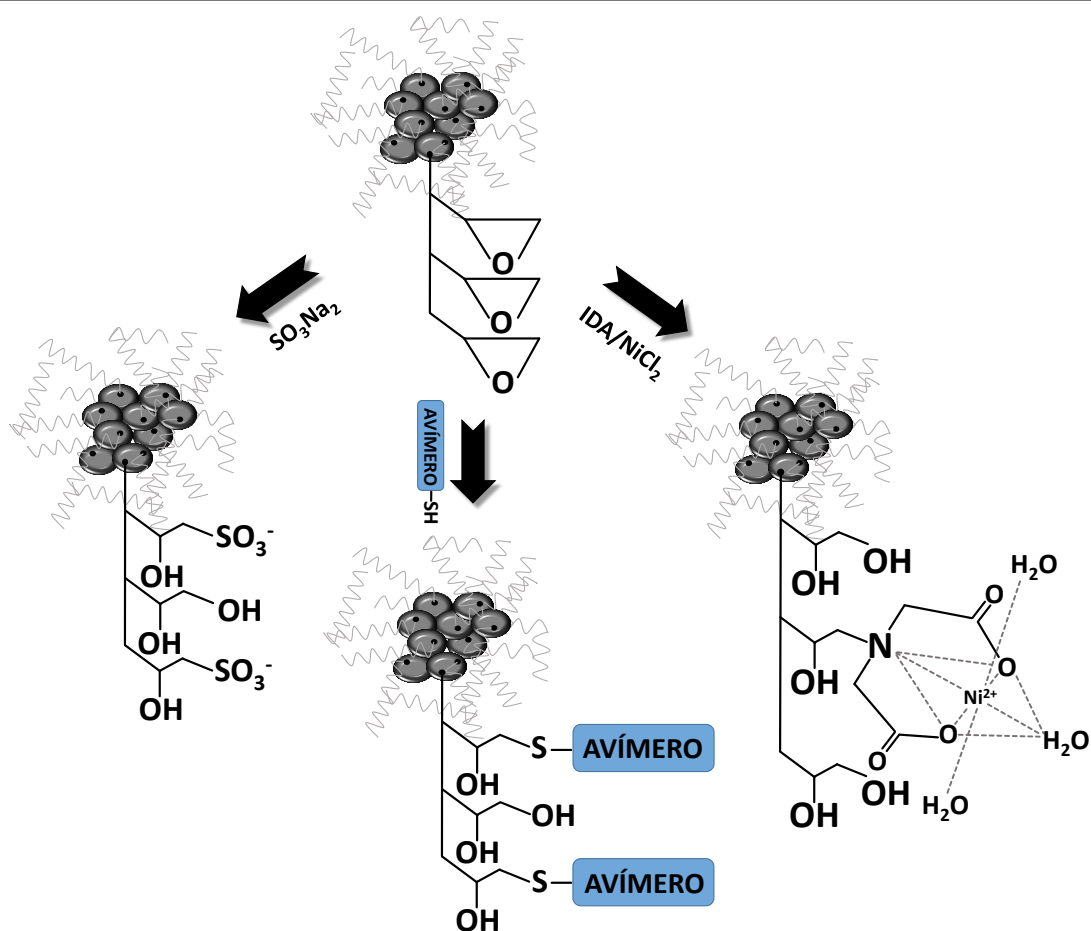


Figura 3.2
Representación esquemática de la preparación de NCPs-S, NCPs-Av y NCPs-IDA/ Ni^{2+} a partir de NCPs

Preparación de NCPs-X

Dado que el aumento en la concentración de ligando en la mezcla de reacción conduce a un aumento en la velocidad de la misma, la preparación de los NCPs-X se realizó en condiciones de un gran exceso de ligandos. De esta

manera el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la formación de producto. En la **Tabla 3.1** se encuentran las condiciones de reacción utilizadas para la preparación de los diferentes NCPs-X. Como se observa en la tabla las condiciones para el Av son de baja temperatura para evitar la desnaturalización proteica.

Tabla 3.1
Condiciones de reacción para la derivatización de NCPs

<i>Tipo de NCP-X</i>	<i>Ligando incorporado</i>	<i>Medio de reacción</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (h)</i>
NCPs-S	SO ₃ ⁻	SO ₃ Na ₂ /Isopropanol/H ₂ O (10/15/75 % P/P)	40	12
NCPs-Av	Avímero	Glicerol 10 %/ TCEP 0,15 mM/Avímero (2 mg/ml en PBS)	4	16
NCPs-IDA/Ni⁺²	IDA/ Ni ⁺²	DMSO/IDA 1 M pH=10 (1:1 v/v) - NiCl ₂ 0,5 M	80	12

Cabe destacar que los epóxidos u anillos oxiranos son éteres cíclicos sobre dos carbonos adyacentes con ángulos de enlace de 60°, lo cual aporta al conjunto una gran tensión y por lo tanto una elevada reactividad. Ésta se libera al provocar la apertura del anillo, dando lugar a la protonación del oxígeno del anillo epoxídico seguida de un ataque nucleofílico de una molécula entrante (Xue *et al*, 1986). La inmovilización de ligandos de afinidad sobre materiales epoxi activados suele potenciarse en medios que contengan altas concentraciones de ciertas sales, como el sulfato de amonio y el fosfato de potasio. Se cree que esta mejora se produce debido a una interacción hidrófoba inducida por la sal entre el ligando y la superficie de la fase estacionaria (Wheatley *et al*, 1999).

En todos los casos, las reacciones resultaron en suspensiones coloidales de NCPs-X, de aspecto y color similar a los NCPs sin modificar (**Figura 3.2**). Cabe mencionar que, aunque se mantuvo agitación constante durante el proceso, se observaron algunos grumos por aglomeración de NCPs luego de las reacciones de derivatización. Sin embargo, los NCPs-X se redispersaron luego del proceso de lavado.

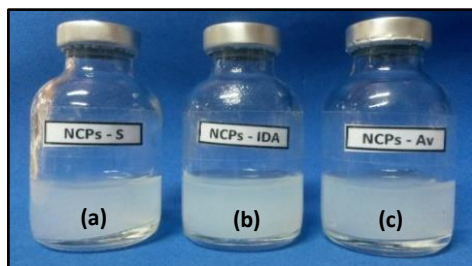


Figura 3.2
NCPs-X derivados de los NCPs FS9
(a) NCPs-S; (b) NCPs-IDA/ Ni^{+2} ; (c) NCPs-Av

Como se mencionó anteriormente, los materiales que contienen grupos epóxido son capaces de reaccionar con diferentes grupos nucleófilos presentes en la superficie de una proteína (por ejemplo, grupos amino, hidróxidos o tioles) para formar enlaces covalentes de mucha estabilidad, tales como enlaces amino secundarios, enlaces éter o tioéter. En el caso de proteínas que posean tioles libres (como es el caso del Av que posee Cys en el C-term de la proteína), estos serán los grupos más reactivos. De esta manera la funcionalidad del Av no será modificada por el proceso de inmovilización en los NCPs-Av y su posterior uso como adsorbentes de inmunoglobulinas.

A pesar de la elevada reactividad de los grupos epoxi, siempre se espera que queden grupos remanentes sin reaccionar. Los grupos residuales fueron hidrolizados para evitar otras reacciones durante el proceso de adsorción de proteínas. Para ello, los NCPs-IDA/ Ni^{+2} se incubaron con β -mercaptoetanol, mientras que los NCPs-S se hidrolizaron por tratamiento con ácido sulfúrico. En el caso de los NCPs-Av no se realizó ninguna reacción adicional para evitar la desnaturalización del Av.

Caracterización de NCPs-X

Análisis del tamaño de partícula

El diámetro de partícula promedio de los NCPs-X se analizó mediante DLS como se describe en el Capítulo anterior. Para obtener un tamaño representativo de cada modificación se promediaron 3 mediciones sobre muestras correspondientes a diferentes reacciones de derivatización. Los resultados obtenidos se detallan en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2
Tamaño de partícula promedio de los NCPs-X

<i>Tipo de NCP-X</i>	<i>Diámetro de partícula (nm)</i>	<i>Rango de diámetro de los agregados (nm)</i>
NCPs-S	335 +/- 60	1500 - 2500
NCPs-Av	560 +/- 90	2600 - 4500
NCPs-IDA/Ni⁺²	440 +/- 15	2500 - 4000

Tomando como referencia el diámetro de partícula promedio de los NCPs FS9 (115 +/- 7 nm), los NCPs-S incrementaron aproximadamente 3 veces su tamaño inicial (335 +/- 60 nm), mientras que para los NCPs-Av (560 +/- 90 nm) y los NCPs-IDA/Ni⁺² (440 +/- 15 nm) el incremento fue de 5 y 4 veces respectivamente. Los NCPs-Av fueron los de mayor aumento posiblemente por la incorporación de un ligando de alto PM (del orden de 14 kDa). Por otro lado, los agregados de NCPs-X también aumentaron el tamaño, siendo éstos del orden de 5 a 10 veces el tamaño de la partícula primaria.

En la **Figura 3.3** se muestran los histogramas correspondientes a las mediciones por DLS de los NCPs-X. Se puede observar que todas las reacciones de derivatización resultaron en suspensiones con un marcado incremento en el diámetro de partícula con respecto al tamaño original. Este fenómeno puede deberse a la capacidad del pGMA para generar hidrogeles, por el hinchamiento en la red polimérica de los NCPs luego de la modificación química con los ligandos de afinidad (Refojo *et al*, 1971; Omer-Mizrahi *et al*, 2007). Cabe destacar que los hidrogeles poliméricos son materiales reticulados que poseen la capacidad de adsorber grandes cantidades de agua sin disolverse. Esta

característica proviene de los grupos funcionales hidrofílicos unidos a la cadena principal del polímero, mientras que la resistencia a la disolución surge del entrecruzamiento entre ramificaciones de la cadena principal (Mattiasson, 2009). Si bien la señal correspondiente a los agregados es más intensa esto no refleja la proporción de éstos en la suspensión.

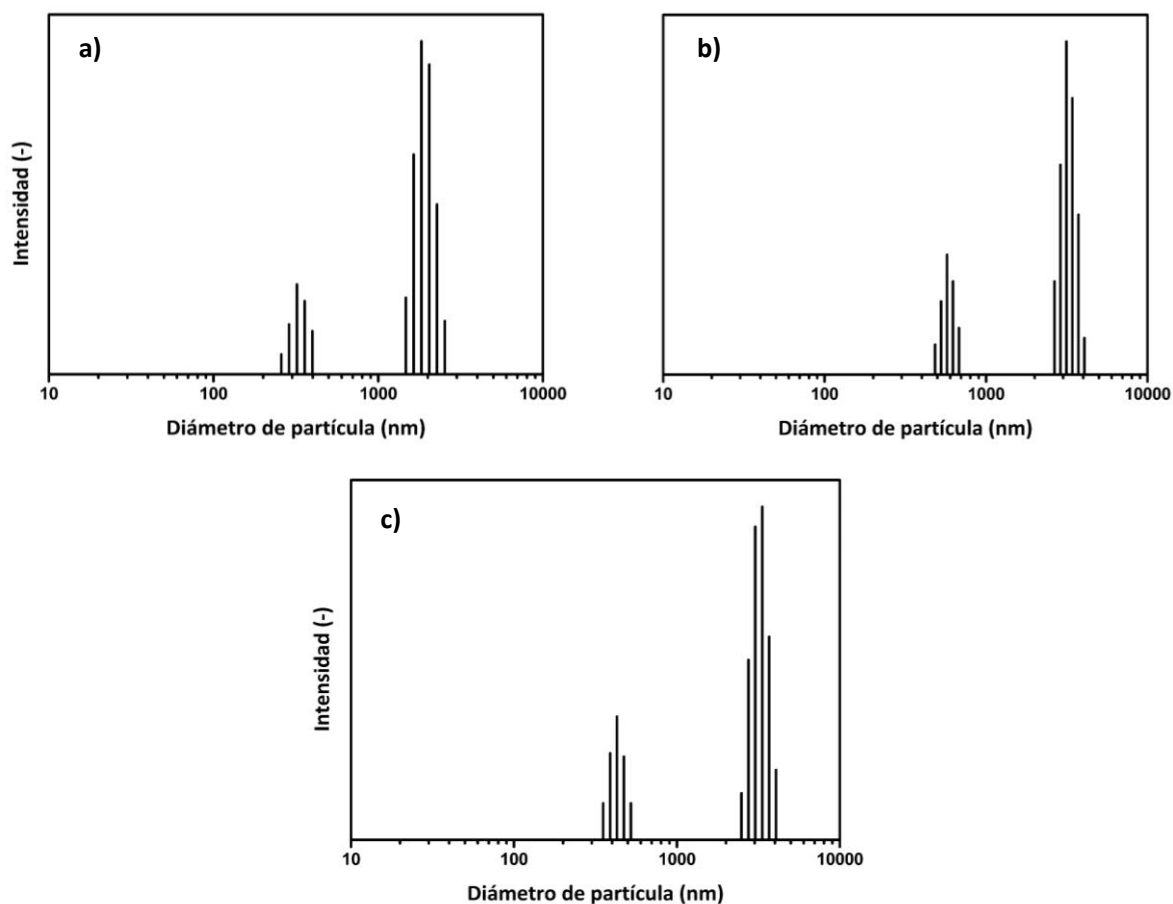


Figura 3.3
Distribución del tamaño de partícula de acuerdo a mediciones por DLS
 (a) NCPs-S, (b) NCPs-Av y (c) NCPs-IDA/Ni⁺²

En desarrollos previos realizados en el Laboratorio de Materiales Biotecnológicos (LaMaBio) se obtuvieron membranas de fibra hueca injertadas con pGMA y derivatizadas con diferentes densidades de grupos sulfónicos. Los autores detectaron una relación inversa entre la tasa de flujo de permeación y la capacidad de adsorción estática de proteínas, fenómeno atribuido al hinchamiento del injerto generado por los grupos sulfónicos sobre la red polimérica del pGMA (Ventura *et al*, 2008).

Análisis por Espectroscopia FTIR-ART

Se utilizó la espectroscopia FTIR con el módulo ATR para determinar la incorporación de los ligandos de afinidad sobre los NCPs (**Figura 3.4**). En el gráfico se representa el espectro correspondiente a los NCPs FS2 a fin de hacer más notoria la diferencia entre los NCPs y los NCPs-X. La primera observación en los espectros de los NCPs-X fue la desaparición de las señales correspondientes al grupo epóxido del pGMA (de estiramiento en 1250 cm^{-1} , y de deformación simétrica y asimétrica en 850 y 910 cm^{-1} respectivamente), lo cual fue indicativo de la apertura del anillo oxirano en todas modificaciones ensayadas.

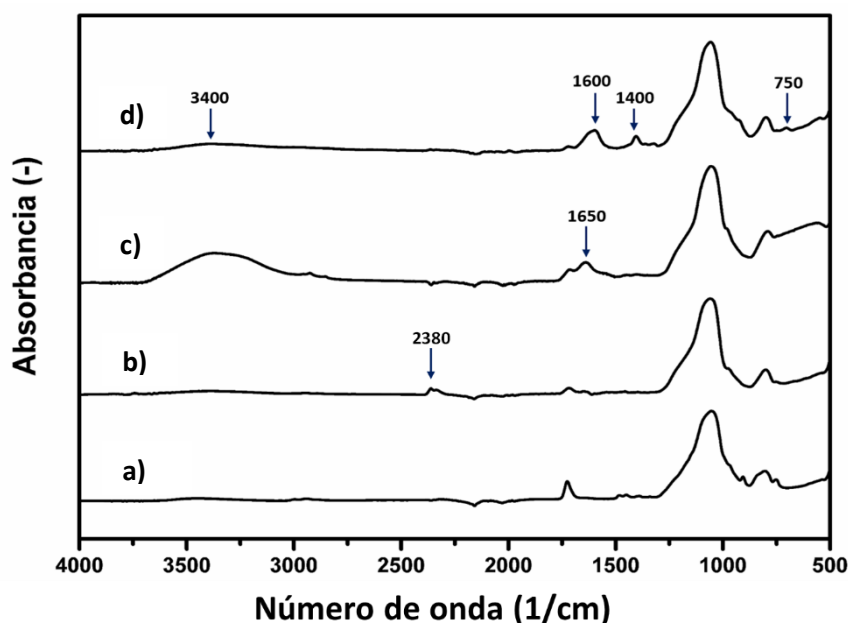


Figura 3.4
Espectros de ATR-FTIR correspondientes a muestras secas de:
(a) FS2; (b) NCPs-S; (c) NCPs-Av y (d) NCPs-IDA/ Ni^{+2}

No en todos los casos se detectaron los nuevos grupos funcionales incorporados. En el caso de los NCPs-S (**Figura 3.4 (b)**), las señales de estiramiento correspondientes al ácido sulfónico ($\text{R-SO}_2\text{-OH}$) en 1150 cm^{-1} se solaparon con el pico correspondiente al Si-O-Si de la FS (1080 cm^{-1}). Sin embargo, se detectó una señal débil en 2380 cm^{-1} atribuida al estiramiento del ácido sulfónico anhídrido ($-\text{SO}_3\text{H}$). Por otro lado, el espectro de los NCPs-Av

(Figura 3.4 (c)) presentó una señal importante en 1650 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace peptídico ($\text{O}=\text{C}-\text{NH}$), y una banda ancha entre los 3200 y 3500 cm^{-1} atribuida al estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos aminos ($\text{N}-\text{H}$): aminas primarias ($\text{R}-\text{NH}_2$) entre 3350 y 3500 cm^{-1} y aminas secundarias ($\text{R}-\text{NH}-\text{R}$) entre 3200 y 3350 cm^{-1} . En este rango de número de onda también suele aparecer un pico ancho correspondiente al estiramiento del hidrógeno del OH. En el espectro de los NCPs-IDA/ Ni^{+2} (Figura 3.4 (d)) se detectaron dos señales de estiramiento bien definidas en 1600 y 1400 cm^{-1} correspondientes al carboxilato (CO_2^-), y dos señales débiles en 3400 y 710 cm^{-1} atribuidas a la amina secundaria del IDA ($\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2$).

Tanto en los NCPs-Av como en los NCPs-IDA, las señales en los espectros fueron suficientes para asegurar la incorporación de los ligandos de afinidad. Sin embargo, en los NCPs-S fue necesario realizar estudios complementarios para confirmar la incorporación de los grupos sulfónicos.

Análisis Termogravimétrico

La estabilidad térmica de los NCPs-X se determinó mediante TGA. En el gráfico (a) de la Figura 3.5 se representa la pérdida de masa de los NCPs-X en función de la temperatura. En todos los casos se observó una pérdida de masa global con respecto a los NCPs FS9. La misma fue de aproximadamente 20, 25, y 30 % para los NCPs-Av, NCPs-S, y NCPs-IDA/ Ni^{+2} respectivamente (Tabla 3.3). Esta disminución, producto de las reacciones de derivatización, podría tomarse como un parámetro de referencia acerca de la cantidad de ligando incorporado sobre los NCPs FS9. De este modo, a mayor pérdida de materia orgánica se puede suponer un mayor porcentaje de modificación. Por ejemplo, en el caso de los NCPs-Av, que resultaron en el menor porcentaje de pérdida de masa, se puede suponer una menor incorporación de ligando debido al impedimento estérico generado por el ligando de alto PM (Avímero) para reaccionar con los epóxidos del pGMA.

Por otro lado se observó que la degradación orgánica en los NCPs-Av comenzó a 240 °C , similar a lo ocurrido con los NCPs FS9 (250 °C), indicando

nuevamente que la cantidad incorporada de Av no afectó significativamente la estabilidad térmica del nanocompuesto original. En los otros casos, la degradación comenzó a temperaturas menores, siendo 190 °C en el caso de los NCPs-S y 180 °C en los NCPs-IDA.

Taba 3.3
Porcentaje de matriz polimérica en los NCPs-X

<i>Tipo de NCP-X</i>	<i>Matriz polimérica (%)</i>	<i>1^{er} TD (°C)</i>
<i>NCPs FS9</i>	16,9	250
<i>NCPs-S</i>	12,4	190
<i>NCPs-Av</i>	13,7	240
<i>NCPs-IDA/Ni⁺²</i>	11,6	180

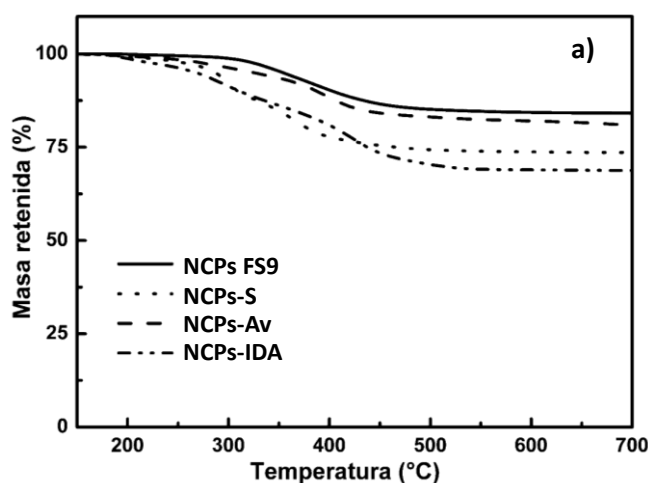


Figura 3.5 (a)
Pérdida de masa (%) de NCPs-X vs. Temperatura (°C)

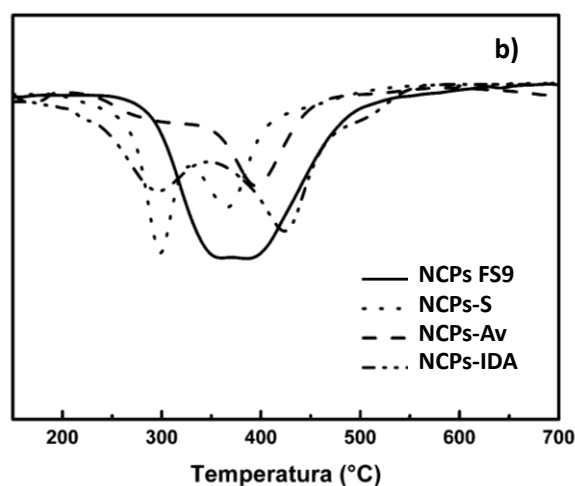


Figura 3.5 (b)
Velocidad de descomposición de NCPs-X vs. Temperatura (°C)

En el gráfico **(b)** de la **Figura 3.5** se representa la velocidad de degradación de los NCPs-X (obtenida a partir de la derivada de la pérdida de masa) en función de la temperatura. Al igual que en el gráfico **(a)**, en todas las derivatizaciones se observaron diferentes patrones de degradación, con mayor definición que en los NCPs FS9. En los NCPs-S el mismo fue similar al de los NCPs FS9 pero con un desplazamiento en la primera zona de degradación hacia temperaturas menores (190 °C), indicando una baja en la estabilidad del NCP

debido a la incorporación de los grupos sulfónicos (Jiang *et al*, 1999). En los NCPs-Av las dos zonas de degradación se mantuvieron similares a las de los NCPs FS9, pero con menor intensidad y un leve desplazamiento hacia temperaturas menores en la primera zona de degradación, el cual podría estar relacionado con la pérdida de agua asociada a la proteína incorporada (Barreto *et al*, 2003). Los NCPs-IDA/ Ni^{+2} presentaron un proceso de degradación en tres etapas, similar a los NCPs FS9, pero con el agregado de un pico de degradación a aproximadamente 470 °C, atribuida a los enlaces del pGMA con el IDA (Chang *et al*, 2005).

Análisis del Potencial Z

Si bien la determinación del Potencial Z es utilizada comúnmente para determinar la estabilidad de un sistema coloidal, en este caso se valió de la misma para detectar un cambio hacia composiciones más electronegativas en la superficie de los NCPs-S a causa de la incorporación de los grupos sulfónicos (Ventura *et al*, 2008).

En el gráfico de la **Figura 3.6** se representan las curvas de potencial Z de los NCPs FS9 y de los NCPs-S. Como ya se analizó en el **Capítulo 2**, las curvas correspondientes a los NCPs FS9 fueron planas y constantes, y tuvieron un potencial Z negativo en todo el rango de pH con variaciones entre -7 mV y -20 mV indicando algún tipo de ionización durante la preparación de los mismos. Por otro lado, la curva correspondiente a los NCPs-S varió entre -15 mV y -25 mV en todo el rango de pH. Tomando como referencia la zona de pH entre 6.0 y 8.0, los valores de Potencial Z variaron de aproximadamente -15 mV en los NCPs a -25 mV en los NCPs-S. Este incremento en el valor absoluto del potencial Z no sólo confirmó la incorporación de grupos sulfónicos en la matriz polimérica de los NCPs sino que también confirmó la estabilidad de los NCPs-S como sistemas coloidales (Hunter, 2013).

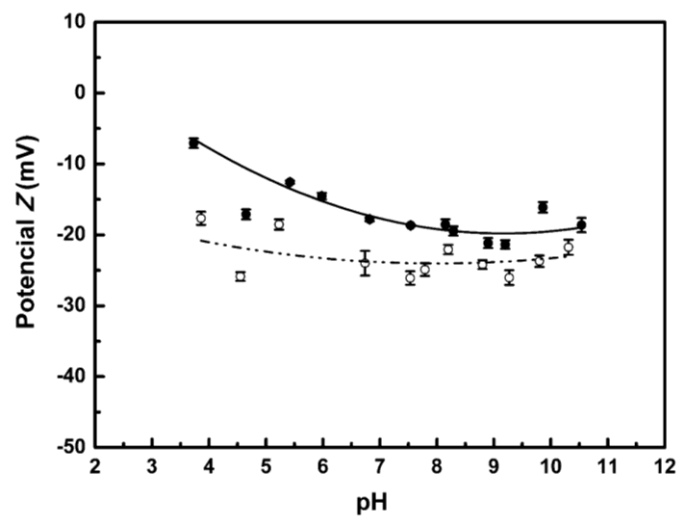


Figura 3.6
Variación del potencial Z (mV) vs. pH correspondiente a:
NCPs FS9 (•) y NCPs-S (○)

3.4 Conclusiones parciales

En este Capítulo se detalla la preparación de NCPs-X conteniendo sulfito de sodio, Av e IDA/ NiCl_2 , mediante reacciones de sustitución nucleofílica entre los grupos epóxidos del pGMA y los diferentes ligandos de afinidad.

Las técnicas de caracterización permitieron obtener la siguiente información acerca de los NCPs-X:

- Los diámetros de los NCPs-X se incrementaron por la incorporación de los diferentes ligandos específicos.
- Los ligandos de afinidad en los NCPs-X fueron detectados mediante FTIR-ATR.
- Se corroboró la característica de material compuesto por una parte inorgánica y otra orgánica.
- Se confirmó la incorporación de cargas negativas en los NCPs-S.

CAPÍTULO 4

PROPIEDADES ADSORTIVAS DE NANOCOMPUESTOS POLIMÉRICOS FUNCIONALES

4.1 Introducción

Actualmente, las proteínas se han incorporado al mercado farmacéutico como productos terapéuticos. La historia de su desarrollo como productos industriales se remonta hasta hace más de medio siglo. El fraccionamiento de plasma sanguíneo fue la primera industria biofarmacéutica a gran escala con una producción anual en la escala de 100 toneladas (Buchacher and Iberer 2006; Kelley 2007).

La principal herramienta de purificación en esta industria fue la precipitación con disolventes orgánicos, sin embargo esta metodología está siendo reemplazada por procesos basados en la separación cromatográfica. Los anticuerpos policlonales y otros sueros anti-toxinas extraídos de fuentes animales son otros ejemplos de productos biofarmacéuticos purificados por una combinación de precipitación y filtración.

Durante el período 2010-2014 sólo en EE.UU. se aprobaron 54 nuevos productos biológicos entre los que se encuentran 17 anticuerpos monoclonales (mAbs), 9 hormonas, 8 proteínas relacionadas con la sangre y 6 enzimas (Walsh, 2014). Los biofarmacéuticos actuales son producidos casi exclusivamente mediante tecnología de ADN recombinante, siendo la cromatografía adsorptiva en columna la metodología más utilizada en la purificación de este tipo de productos biofarmacéuticos (Carta and Jungbauer, 2010).

Todos los fenómenos que intervienen en un proceso cromatográfico han sido ampliamente descritos en el pasado (Schweich, 1981). El principal cuello de botella que surge de los procesos convencionales de adsorción de proteínas en columna es la baja eficiencia de transferencia de masa, consecuencia de la difusión molecular hacia el interior de los poros de las partículas, especialmente

en la escala preparativa. Esto es importante para las macromoléculas ya que la difusión molecular disminuye con el cuadrado del tamaño de la misma.

Con el fin de mejorar la eficiencia en la transferencia de masa, se han desarrollado nuevos materiales convectivos, como las membranas adsortivas y las columnas monolíticas. Estos han resuelto en gran medida el problema de la reducida transferencia de masa de los sistemas empacados (Afeyan *et al*, 1991; Svec *et al*, 1996). La recuperación y purificación de proteínas utilizando estos materiales demostraron tener una productividad más alta (que depende directamente de la capacidad e inversamente del tiempo del proceso) en experimentos a escala laboratorio. Sin embargo, su translación a aplicaciones industriales es muy lenta o nula. Si bien estos materiales reducen el tiempo del proceso, la capacidad adsortiva es menor, lo que se traduce en que la productividad no sea suficientemente mayor como para reemplazar lo existente.

En los últimos años ha crecido considerablemente la utilización a pequeña escala de materiales magnéticos funcionalizados como adsorbentes proteicos en combinación con técnicas de separación magnética (**Figura 4.1 (a)**). Dado que las partículas magnéticas pueden funcionalizarse con cualquiera de los ligandos utilizados en cromatografía (afinidad, pseudoafinidad, intercambio iónico, hidrofóbico, etc.), la purificación de proteínas mediada por este tipo de materiales puede aplicarse en cualquier etapa de un proceso de purificación de proteínas, incluso pueden utilizarse a partir de extractos crudos de células, suero o extractos de plantas (Hubbich *et al*, 2001). Al utilizarse la atracción magnética como método de separación del material adsorbente, se pueden eliminar las diversas etapas del pretratamiento de la muestra (especialmente la centrifugación, filtración y separación de membrana) que normalmente son necesarias para acondicionar un extracto antes de su aplicación en columnas de cromatografía de lecho empacado.

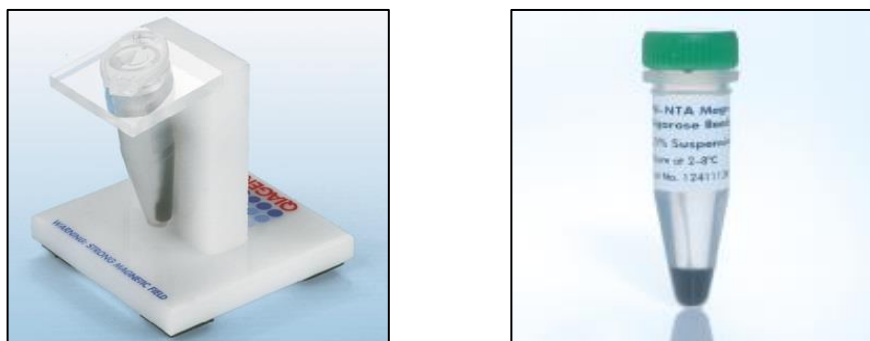


Figura 4.1
(a) Kit de perlas magnéticas QIAGEN separadas magnéticamente.
(b) Suspensión al 5% de perlas magnéticas de agarosa modificadas con grupos NTA/ Ni^{+2} , marca QIAGEN.
Imágenes extraídas de <https://www.qiagen.com/us>

Las separaciones magnéticas son rápidas, suaves, y fáciles de automatizar y su uso se ha expandido tanto en el ámbito de bioseparaciones, secuenciación, diagnóstico y administración de medicamentos (Elingarami *et al*, 2011). Sin embargo, a pesar de estas cualidades, hasta el momento se han publicado pocos intentos de escalar las operaciones magnéticas en Biotecnología. La mayoría de las partículas magnéticas comerciales (**Figura 4.1 (b)**) son de tamaño micrométrico (20-70 μm), con capacidades de adsorción relativamente bajas, que en la mayoría de los casos no superan los 25 mg de proteína por gramo de material. Esta es una de las razones de su baja aplicación en sistemas de purificación industrial, acotando su uso sólo a nivel analítico.

El uso de NPs poliméricas (ó de NCPs) en purificación de proteínas ha tenido un gran auge en los últimos años debido a que por su tamaño nanométrico, las capacidades de adsorción en este tipo de materiales suelen aumentar por el incremento exponencial de su superficie específica (Lynch *et al*, 2008). Adicionalmente los polímeros presentan una gran versatilidad para ser modificados químicamente mediante reacciones de derivatización.

Sin embargo, al disminuir el diámetro de las partículas adsorbentes aparecen otros factores a tener en cuenta, como la agregación y hasta compactación de las NPs durante el proceso. Este inconveniente podría prevenirse utilizando agentes surfactantes durante o luego del proceso de

síntesis, lo cual estabiliza la superficie de las NPs (Márquez *et al*, 2017). Sin embargo, estos surfactantes deberán eliminarse o inactivarse por completo de la suspensión de NPs para aplicaciones en la purificación de proteínas.

En el **Capítulo 3** se detalló la preparación y caracterización de NCPs funcionales. De esta manera se obtuvieron tres tipos de materiales adsortivos: NCPs sulfónicos (**NCPs-S**) para adsorber proteínas de carga neta positiva; con Avímero inmovilizado (**NCPs-Av**) para adsorber Inmunoglobulinas; y con grupos IDA/ Ni^{+2} (**NCPs-IDA/ Ni^{+2}**) capaces de adsorber proteínas recombinantes etiquetadas con histidinas. A continuación se describen los resultados obtenidos de la utilización de los NCPs-X como adsorbentes proteicos sobre proteínas estándar como Lisozima (LYZ), Inmunoglobulina G y una proteína recombinante verde fluorescente con una etiqueta de histidinas modificada (GFPrCys1).

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Materiales

Como material adsorbente se utilizaron los **NCPs-S**, **NCPs-Av** y **NCPs-IDA/Ni⁺²**, cuya preparación se detalló en el **Capítulo 3**. Para la comparación se utilizó *Sulfopropyl-Sepharose* (SP-Seph) e *IMAC Sepharose 6 Fast Flow* (IMAC-Seph) ambas marca GE Healthcare. Todos los ensayos se realizaron con agua desionizada y filtrada con filtro de 0,22 μm . Los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Las proteínas puras utilizadas para los ensayos de adsorción fueron: (i) *Lisozima* (Hansozyme®), en adelante LYZ, donada gentilmente por Christian Hansen Argentina, (ii) *Inmunoglobulina G*, de grado farmacéutico, y (iii) GFPcys1 recombinante, expresada y purificada según se describe en Kikot *et al*, 2014.

4.2.2 Metodología

Procedimiento de adsorción/desorción de proteínas

Los NCPs-X se fraccionaron en tubos *Eppendorf* de 2 ml y se utilizaron como material para adsorber/desorber proteínas mediante el siguiente protocolo de adsorción en *batch*:

I. Equilibrado: Aproximadamente 200 mg de NCPs-X se resuspendieron en 1 ml de *buffer de equilibrado* y se agitaron en un ROTOLAB a TA durante 15 min. Finalmente, los NCPs-X se centrifugaron a 10.000 RPM durante 5 min en una microcentrífuga HERMLE Z200a y se descartó el sobrenadante. Los *buffers de equilibrado* fueron **BP₁**: *buffer Fosfato 50 mM pH=7* en el caso de los NCPs-S; **PBS**: *buffer Fosfato 10 mM pH=7.4, NaCl 137 mM y 2.7 mM KCl* en el caso de los NCPs-Av; y **BP₂**: *buffer Fosfato 50 mM pH=7,0 NaCl 20 mM* en el caso de los NCPs-IDA/Ni⁺².

II. Adsorción: Los NCPs-X equilibrados se resuspendieron en 1,5 ml de *buffer de adsorción* (con una determinada concentración inicial de proteína, C_0) y se agitaron en un ROTOLAB a TA durante 60 min. Luego del proceso de adsorción, los NCPs-X&proteína se centrifugaron a 10.000 RPM durante 5 min. Finalmente se midió la Ab_{280nm} utilizando un espectrómetro Nanodrop 1000 para determinar la concentración de proteínas en el sobrenadante (C^*). Los coeficientes de extinción molar (ϵ) utilizados para el cálculo de la concentración de proteínas fueron: (i) LYZ = 2,4 ml/mg; (ii) IgG = 1,32 ml/mg; (iii) *GFPcys1* = 0,814 ml/mg. Los *buffers de adsorción* fueron **BP₁ + LYZ** en el caso de los NCPs-S; **PBS + IgG** en el caso de los NCPs-Av; y **BP₂ + GFPcys1** en el caso de los NCPs-IDA/ Ni^{+2} .

III. Lavado: Los NCPs-X&proteína se resuspendieron en 1,5 ml de *buffer de lavado* y se agitaron en un ROTOLAB a TA durante 5 min. Luego se centrifugaron a 10.000 RPM durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El proceso de lavado se repitió tres veces. Los *buffers de lavado* fueron los mismos que para el equilibrado, siendo **BP₁**: *buffer Fosfato 50 mM pH=7* en el caso de los NCPs-S; **PBS**: *buffer Fosfato 10 mM pH=7.4, NaCl 137 mM y 2.7 mM KCl* en el caso de los NCPs-Av; y **BP₂**: *buffer Fosfato 50 mM pH=7 NaCl 20 mM* en el caso de los NCPs-IDA/ Ni^{+2} .

IV. Elución: Los NCPs-X&proteína lavados se resuspendieron en 1,5 ml de *buffer de elución* y se agitaron en un ROTOLAB a TA durante 60 min. Luego del proceso de elución, los NCPs-X se centrifugaron a 10.000 RPM durante 5 minutos. Finalmente se midió la Ab_{280nm} para determinar la concentración de proteínas eluidas (C_f) utilizando un espectrómetro Nanodrop 1000. Los *buffers de elución* fueron **BP₁ + NaCl 1M** en el caso de los NCPs-S; **BCit**: *buffer Citrato 10 mM pH= 3,0* en el caso de los NCPs-Av; y **BP₂ + Imidazol 1M** en el caso los NCPs-IDA/ Ni^{+2} .

Capacidad de adsorción máxima

La capacidad de adsorción máxima ($Q_{\text{máx}}$) se calculó de acuerdo a la **Ecuación 4.1** como la cantidad total de proteínas adsorbidas en función de la cantidad de NCP-X.

$$Q_{\text{máx}} = \frac{(C_0 \times V_0) - (C^* \times V_0)}{W} \quad (\text{Ec 4.1})$$

donde C_0 es la concentración inicial de proteína en el *buffer de adsorción* (mg/ml), V_0 es el volumen inicial de *buffer de adsorción* (ml), C^* es la concentración de proteínas en el sobrenadante luego del proceso de adsorción (mg/ml), y W es el peso seco (g) de los NCPs-X.

Capacidad de adsorción específica máxima

La capacidad de adsorción específica máxima (AEM) se calculó de acuerdo a la **Ecuación 4.2** como la cantidad de proteína eluída luego de los lavados en función de la cantidad de NCPs-X.

$$AEM = \frac{(C_f \times V_0)}{W} \quad (\text{Ec 4.2})$$

donde C_f es la concentración final de proteína en el *buffer de elución* (mg/ml), V_0 es el volumen de *buffer de elución* (ml), y W es el peso seco (g) de los NCPs-X.

El peso seco (W) de los NCPs-X se calculó al finalizar cada proceso de purificación. Para ello, los tubos *Eppendorf* utilizados en cada ensayo fueron identificados y tarados previamente en una balanza analítica. Al finalizar el proceso, los NCPs-X se secaron en estufa a 60 °C hasta peso constante (aprox. 120 min). A continuación los tubos *Eppendorf* se dejaron a TA y se pesaron nuevamente. La diferencia entre el peso final y la tara de los tubos corresponde al peso seco del material.

Cinética de adsorción

Aproximadamente 100 mg de NCPs-X se equilibraron según el paso 1 del protocolo de adsorción. A continuación se incubaron en *buffer de adsorción* conteniendo la proteína modelo para cada NCP-X, y se agitaron en un ROTOLAB a TA durante un tiempo total de 60 min. La concentración de proteínas en el sobrenadante se midió con un espectrómetro Nanodrop 1000 en intervalos de 5 min durante 15 min, y luego cada 15 min hasta alcanzar los 60 min. En cada medición, los NCPs-X se centrifugaron a 10.000 RPM durante 5 min, a continuación se resuspendieron y se incubaron nuevamente en el ROTOLAB hasta la próxima medición. Finalmente se graficó la relación de la concentración inicial con respecto a la concentración de cada medición (C^*/C_0) en función del tiempo de incubación mediante un ajuste sigmoïdal con el programa ORIGIN PRO 8 (**Ecuación 4.3**).

$$y = A2 + (A1 - A2)/(1 + \exp((x - x_0)dx)) \quad (\text{Ec 4.3})$$

Isoterma de Langmuir

Aproximadamente 200 mg de NCPs-X se equilibraron según el paso 1 del protocolo de adsorción. Luego se incubaron en *buffer de adsorción* conteniendo distintas concentraciones de *proteína modelo* (según el tipo de NCPs-X) y se agitaron en un ROTOLAB a TA durante 60 min. Luego del proceso de adsorción, los NCPs-X&proteína se centrifugaron a 10.000 RPM durante 5 min. Finalmente se midió la Ab_{280nm} utilizando un espectrómetro Nanodrop 1000 para determinar la concentración de proteínas en el sobrenadante (C^*). Por otro lado se determinó la $Q_{\text{máx}}$ de acuerdo a la **Ec 4.1**. Por último se representó la isoterma de adsorción (Q^* vs C^*) con un ajuste matemático no lineal según la ecuación del Langmuir (**Ecuación 4.4**).

$$Q^* = (Q_{\text{máx}} \times C^*)/(K_d + C^*) \quad (\text{Ec 4.4})$$

4.3 Resultados y discusiones

Con el objetivo de desarrollar nuevos materiales adsorbentes para aplicarlos a la purificación de proteínas, se prepararon nanomateriales poliméricos funcionales del tipo “*budín con pasas*” descrito en los Capítulos anteriores. Se obtuvieron NCPs sulfónicos (**NCPs-S**); con Avímero inmovilizado (**NCPs-Av**) y con grupos IDA/ Ni^{+2} (**NCPs-IDA/ Ni^{+2}**) con potenciales capacidades de adsorber diferentes proteínas. En este Capítulo se evalúan las características adsortivas de estos NCPs-X utilizando un protocolo de adsorción en *batch* y condiciones de adsorción específicas para cada dupla NCP-X/*proteína modelo*.

Análisis preliminar de adsorción específica de proteínas en NCPs-S

En una primera instancia se utilizaron los cuatro NCPs descritos en el **Capítulo 2** (FS2, FS9, FS27 y FS54) a los cuales se le realizó la derivatización con grupos sulfónicos, según se describe en el **Capítulo 3**. Como proteína modelo se utilizó la LYZ, que posee un $\text{pI} = 11.35$ y, en las condiciones de trabajo, se adsorbe por interacción electrostática a matrices que contienen grupos ácidos, como el sulfónico. Aproximadamente 200 mg de material se incubaron con LYZ 12 mg/ml en *buffer Fosfato 50 mM pH 7,0*. Después de los lavados con el mismo *buffer* sin la proteína, se eluyó por incubación con *buffer Fosfato 50 mM pH 7,0 NaCl 1M*.

Se determinaron dos parámetros de adsorción, la capacidad máxima de adsorción $Q_{\text{máx}}$, y la **AEM**. Esta última corresponde a la adsorción específica y reversible de la proteína al material. En la **Tabla 4.1** se encuentran los resultados obtenidos junto con los valores del diámetro de partícula promedio y el porcentaje de matriz polimérica del NCP. Las capacidades de adsorción de todos los materiales aumentaron proporcionalmente tanto con el aumento en el diámetro del NCP como con la proporción de matriz polimérica. Por este motivo, se descartó que la adsorción ocurre por un proceso de adsorción superficial sobre

los NCPs. Este comportamiento adsorptivo es característico de materiales tipo hidrogel.

Tabla 4.1
 $Q_{\text{máx}}$ y AEM utilizando NCPs FS54, FS27, FS9 y FS2 sulfónicos

NCP	Diám. de partícula inicial (nm)	Matriz polimérica inicial (%)	$Q_{\text{máx}}$ (mg LYZ /g NCP-S)	AEM (mg LYZ /g NCP-S)
FS 54	60 +/- 8	1	146 +/- 13	30 +/- 5
FS 27	85 +/- 8	7	165 +/- 16	78 +/- 9
FS 9	115 +/- 7	17	455 +/- 33	268 +/- 23
FS 2	190 +/- 15	44	666 +/- 15	230 +/- 13

En la **Figura 4.1** se muestra como varia la $Q_{\text{máx}}$ y **AEM** en función del diámetro de partícula original de los NCPs. De dicho gráfico se observan claramente dos aspectos: (i) la $Q_{\text{máx}}$ fue mayor a la AEM en todos los casos y (ii) la $Q_{\text{máx}}$ aumenta con el incremento en el diámetro de partícula. Los valores de adsorción máxima alcanzaron valores de hasta casi cinco veces en el caso de los FS2 comparado con los FS54. Cabe mencionar que los NCPs de mayor diámetro de partícula son los de mayor porcentaje de matriz polimérica, llegando hasta casi un 45% de materia orgánica en el caso de los FS2. Por dicha condición se observa un aumento de la adsorción inespecífica, favorecida por su capacidad de actuar como un hidrogel (Castillo *et al*, 1985). Por el contrario, la **AEM** (luego de los lavados) no fue directamente proporcional al aumento de matriz polimérica, siendo la condición FS9 (con un diámetro de partícula inicial de 115 +/- 7 nm y un porcentaje de matriz polimérica de 17 %) la de mayor capacidad de adsorción específica sobre la proteína LYZ. En base a estos resultados se seleccionó el material **NPC FS9** para continuar con los estudios de las propiedades adsorptivas de los NCPs-X.

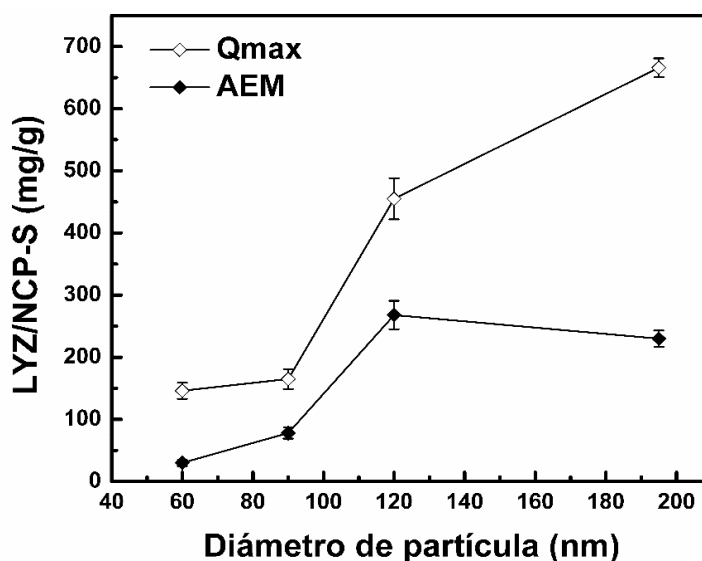


Figura 4.1

Capacidad de adsorción de LYZ vs diámetro de partícula inicial.

♦) Capacidad de adsorción específica máxima (AEM) y (◇) Capacidad de adsorción máxima (Q_{máx})

Estudios de las propiedades adsortivas de NCPs-X

El estudio de las propiedades adsortivas se realizaron en *batch*. A diferencia de la cromatografía en columna, la fase estacionaria (material adsorbente) como la muestra a purificar se disponen en un contenedor y se dejan interaccionar hasta alcanzar un estado de equilibrio (Skidmore *et al*, 1990). Para las etapas de lavado y elución el material adsorbente debe ser sedimentado para separar fácilmente la fase móvil. En estos estudios a escala laboratorio se utilizó una microcentrífuga para acelerar el proceso. Es importante remarcar que los NCPs-X poseen una mayor densidad por el contenido de FS, reduciendo el tiempo de separación.

Una vez seleccionada la condición de preparación FS9, se realizaron las derivatizaciones detalladas en el **Capítulo 3** (NCPs-S, NCPs-Av y NCPs-IDA/Ni⁺²). De este modo, utilizando el protocolo descrito en M&M de este Capítulo y las condiciones de adsorción detalladas en la **Tabla 4.2**, se determinaron tanto la capacidad de adsorción máxima (Q_{máx}), la isoterma de Langmuir, la AEM y la cinética de adsorción para cada uno de los sistemas.

Tabla 4.2
Buffers utilizados para la adsorción/desorción de los tres sistemas
NCPs-X&proteína target

<i>Tipo de NCPs-X</i>	<i>Equilibrado</i>	<i>Adsorción</i>	<i>Lavado</i>	<i>Elución</i>
NCPs-S	BP ₁	BP ₁ + LYZ	BP ₁	BP ₁ + NaCl 1M
NCPs-Av	PBS	PBS + IgG	PBS	BCit
NCPs-IDA/Ni⁺²	BP ₂	BP ₂ + GFPrCys1	BP ₂	BP ₂ + Imidazol 1M

El dato del peso seco (**W**) de cada NCPs-X, necesario para obtener tanto la **Q_{máx}** como la **AEM**, se calculó al finalizar cada proceso de purificación. Cabe destacar que los NCPs-X deshidratados pierden la capacidad de rehidratación, quedando los mismos como una capa de film polimérico. Por lo tanto, todos los materiales utilizados en este tipo de ensayos fueron descartados dado que no fue viable su reutilización para purificar proteínas. No obstante se realizaron ensayos para determinar el grado de reutilización de los mismos (sin desecarlos), obteniendo resultados reproducibles y sin pérdida de rendimiento significativo en 3 usos consecutivos.

Cabe mencionar que como medida de control en cuanto a efectividad, los ensayos se realizaron comparando los NCPs-X con una matriz comercial de similares propiedades adsorbtivas. Para ello, todos los procesos de adsorción se realizaron bajo las mismas condiciones experimentales. En el caso de los NCPs-S, el material seleccionado fue la *Sulfopropyl-Sepharose* (SP-Seph). En el caso de los NCPs-IDA/Ni⁺² el material utilizado fue la *IMAC Sepharose 6 Fast Flow* (IMAC-Seph). Para el caso de los NCPs-Av se realizó una comparación con datos de bibliografía.

Propiedades adsortivas de los NCPs-S

Los NCPs-S fueron utilizados para adsorber/desorber LYZ, una proteína estándar que se presenta catiónica prácticamente en todo el rango de pH debido a su elevado punto isoeléctrico. Para ello se utilizó un *buffer* a pH 7,0 (BP₁).

Se realizó un estudio experimental de adsorción para determinar la isoterma de adsorción según el protocolo descrito en M&M. En este caso, el ensayo se realizó con una cantidad constante de material adsorbtivo y distintas concentraciones de LYZ (4, 6, 10, 14 y 18 mg/ml) en *buffer fosfato* 50 mM pH=7,0. Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de la Isoterma de Langmuir (**Figura 4.2**) mediante regresión no-lineal.

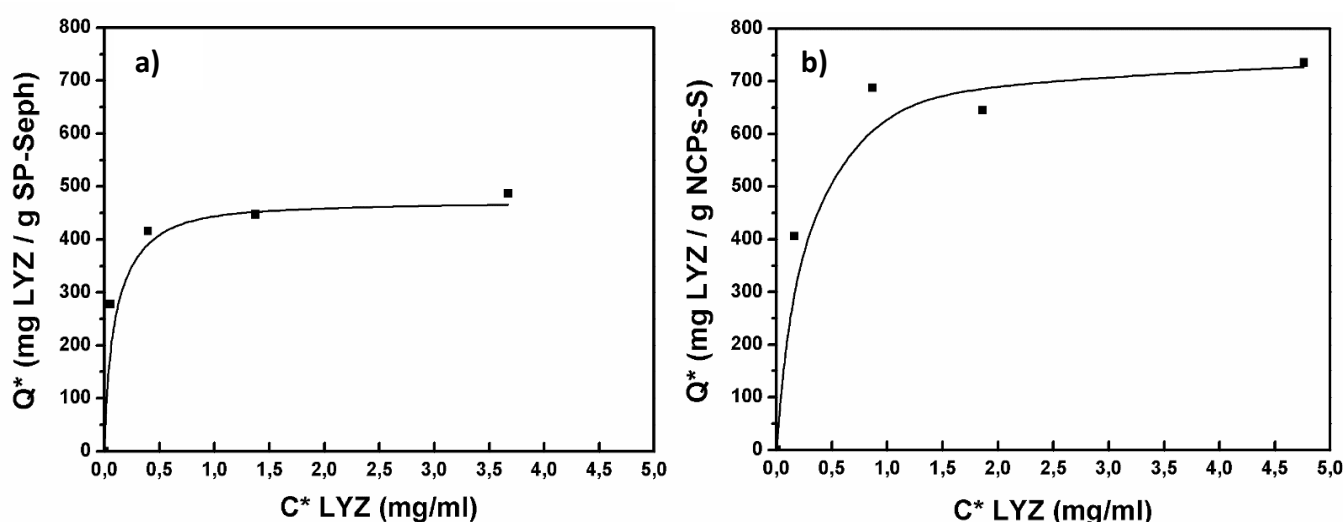


Figura 4.2
Representación de la Isoterma de Langmuir:
(a) Matriz comercial, SP-Seph y (b) NCPs-S

Los valores máximos de adsorción calculados a partir de las isotermas de cada material fueron de 470 ± 13 para la matriz comercial SP-Seph, y de 748 ± 7 mg/g para los NCPs-S. Estos últimos mostraron una excelente capacidad respecto a la matriz comercial (60% mayor). Otros materiales preparados a partir de micro-criogeles de poliacrilamida de entre 10 y 80 μ m de diámetro reportaron capacidades de adsorción de LYZ de 285 mg/g a 15°C y de 363 mg/g a 35°C (Mól et al, 2017), mucho menores que los obtenidos en este trabajo para los NCPs-S.

En la **Figura 4.3** se encuentra una imagen en la que se pueden diferenciar los NCPs-S durante el proceso de adsorción. Mientras que los NCPs-S con LYZ adsorbida (**Figura 4.3 (a)**) tienden a una coloración blanca, los NCPs-S sin LYZ (**Figura 4.3 (b)**) mantienen su aspecto translúcido característico.



Figura 4.3
Imagen de los NCPs-S:
(a) Con LYZ, (b) Sin LYZ adsorbida

Otro dato importante que se obtiene de la isoterma es la constante de disociación (K_d) de una proteína por cierto ligando específico. Cabe destacar que a menor valor de K_d , mayor es la afinidad hacia el material adsortivo. Los valores calculados a partir de la **Ec 4.4** fueron de $0,037 \pm 0,007$ mg/g para la matriz comercial SP-Seph y de $0,138 \pm 0,008$ mg/g para los NCPs-S. Como ambos materiales presentan el mismo tipo de ligando (sulfónico), se puede deducir que los NCPs-S tienen casi cuatro veces menos afinidad por la LYZ que la matriz comercial SP-Seph. Sin embargo, esta menor afinidad no invalida al material para su uso en purificación de proteínas.

Los valores obtenidos para la **AEM** fueron de 266 ± 7 mg/g en el caso de los NCPs-S, mientras que para la matriz comercial SP-Seph fue de 358 ± 20 mg/g. En este caso los valores fueron a la inversa de las $Q_{\text{máx}}$, confirmando el efecto por la K_d más baja por parte de la SP-Seph.

Por otro lado, se estudió la cinética de adsorción de ambos materiales (**Figura 4.4**). Para ello se utilizó aproximadamente 200 mg de material adsortivo y una solución de incubación compuesta por LYZ 10 mg/ml en *buffer fosfato* 50 mM, pH=7.0. Luego de la incubación, se determinó la cantidad de proteína remanente en la solución de incubación en intervalos hasta alcanzar los 60 min. Este estudio permite estimar la transferencia de masa a través del material adsortivo, es decir, la dificultad que presenta la LYZ para atravesar el material y alcanzar el ligando específico.

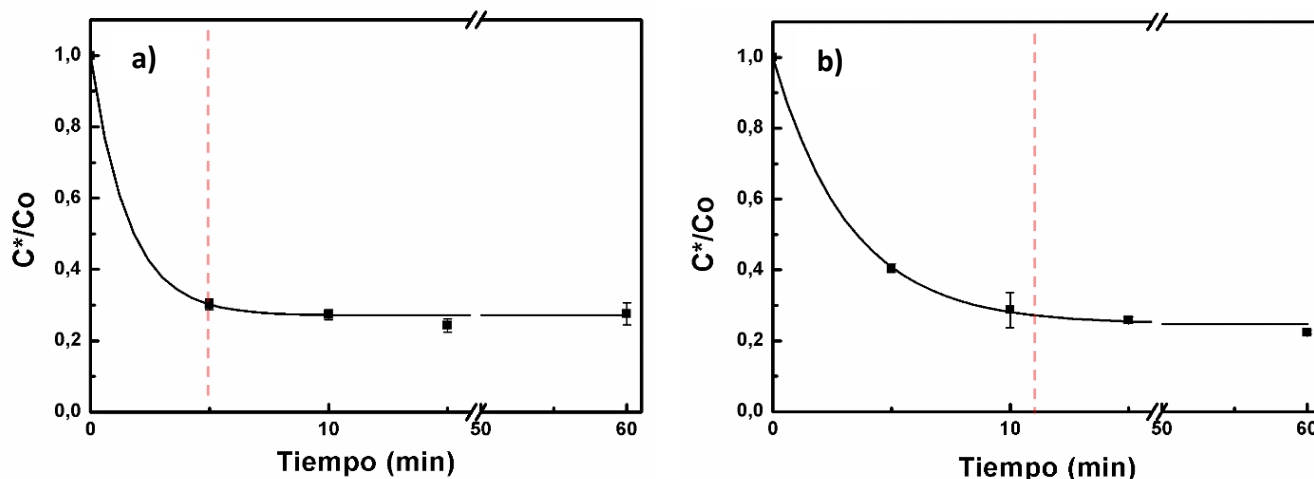


Figura 4.4
Cinética de adsorción
(a) Matriz comercial SP-Sepharose y (b) NCPs-S

De la **Figura 4.4** se observa que el 95% del total de proteínas adsorbidas se alcanza a los 5 min de incubación con el material comercial (SP-Sepharose), mientras que con los NCPs-S el mismo porcentaje se alcanza aproximadamente a los 11 min. Si bien se esperaba una cinética más rápida para las NCPs, básicamente por su menor diámetro, es posible que la menor afinidad por la proteína sea la causante de este comportamiento.

Desde el punto de vista experimental, aunque el tiempo de contacto necesario para la adsorción fue mayor para el caso de los NCPs-S, este tiempo se mantiene dentro del rango de los minutos para el proceso adsorptivo en *batch*.

Propiedades adsortivas de los NCPs-Av

Los NCPs-Av se utilizaron para adsorber/desorber Inmunoglobulina G (IgG) humana. Cabe destacar que la IgG, con un peso molecular de 150 kDa, es la inmunoglobulina más abundante del suero con una concentración de 600-1800 mg por cada 100 ml, y constituye el 80 % de las inmunoglobulinas totales.

En una primera instancia se determinó la isoterma de adsorción por el ajuste de Langmuir de la misma manera que con los NCPs-S (**Figura 4.5**). El ensayo de adsorción se realizó con una cantidad constante de material adsorativo (aprox. 200 mg de NCPs-Av) y distintas concentraciones de IgG de grado comercial en *buffer* PBS. El protocolo de adsorción fue el descrito en M&M de este Capítulo.

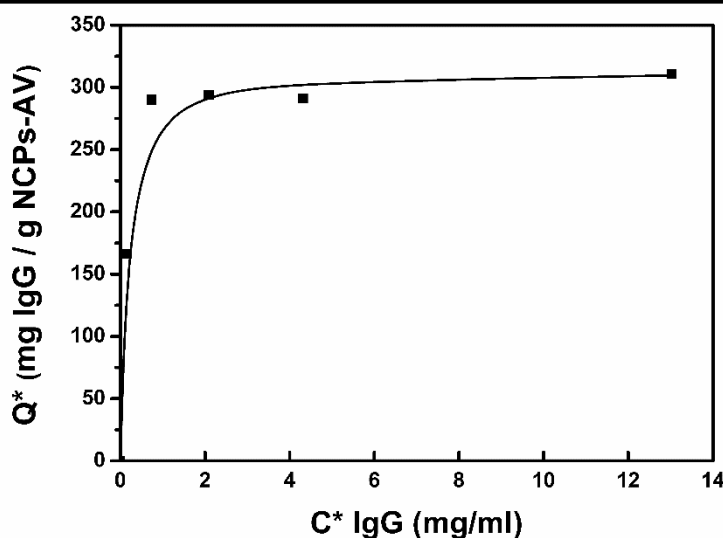


Figura 4.5
Representación de la Isotherma de Langmuir para los NCPs-Av

La capacidad de adsorción máxima ($Q_{\text{máx}}$) determinada para dicho material fue de 312 ± 9 mg/g mientras que la **AEM** fue de 107 ± 6 mg/g. En cuanto a los valores para la constante de afinidad (K_d) fue de $0,118 \pm 0,025$ mg/g. Las matrices comerciales como la “*rProtein A Sepharose® Fast Flow*” de *GE Healthcare*, con un diámetro de partícula promedio de 90 μm , reportan capacidades de adsorción de IgG humano en el orden de los 50 mg/g y un valor de K_d promedio de 0,095 mg/g (Chase *et al*, 1992). Los NCPs-Av, con un valor similar de K_d , serían el doble de eficientes que el producto comercial. Esto podría

deberse al aumento de la efectividad del Av comparado con la *Proteína A* recombinante estándar utilizada como ligando en la matriz comercial. Cabe recordar que el Av corresponde a una proteína sintética formada por solo dos dominios B de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (Kangwa *et al*, 2015).

Por otro lado, se determinó la cinética de adsorción para los NCPs-Av (Figura 4.6). Para dicho ensayo, al igual que con los NCPs-S, se utilizó aproximadamente 200 mg de material adsorbtivo y una solución de incubación compuesta por la proteína IgG a una concentración de 2,5 mg/ml en *buffer PBS*.

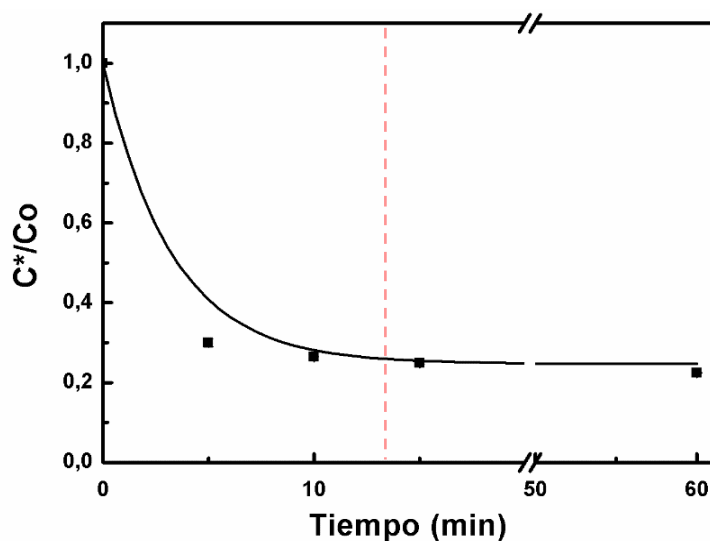


Figura 4.6
Cinética de adsorción para los NCPs-Av

Luego de la incubación, se determinó la cantidad de proteína remanente en la solución de incubación en intervalos hasta alcanzar los 60 min. Del gráfico de la **Figura 4.6** se observó que el 95% de la proteína IgG se absorbió aproximadamente a los 14 min de la incubación inicial. Comparando con los NCPs-S, los NCPs-Av requirieron de un 25% más de tiempo en alcanzar el 95% de proteínas adsorbidas. Dicha diferencia podría deberse a la mayor especificidad de interacción entre ambos materiales. Sin embargo, la misma no resultó en un aumento significativo en el tiempo de adsorción por parte de los NCPs-Av.

Propiedades adsortivas de los NCPs-IDA/Ni⁺²

Los NCPs-IDA/Ni⁺² se utilizaron para adsorber/desorber una variante de la proteína verde fluorescente recombinante (o GFP, por sus siglas en inglés) conteniendo una Cys en la etiqueta de His terminal denominada GFPrCys1 (Kikot *et al*, 2014).

Cabe mencionar que en una primera instancia se utilizó Cu⁺² para formar el complejo con el IDA de los NCPs. Si bien los NCPs-IDA/Cu⁺² (**Figura 4.7**) se mantuvieron estables hasta el momento de la elución, luego de realizar los primeros ensayos se observó una coloración azul intensa en el *buffer de elución*, indicado algún tipo de inestabilidad en la formación del complejo IDA/Cu⁺². Dichos inconvenientes no se observaron cuando se utilizó Ni⁺² como ion metálico, siendo los resultados obtenidos reproducibles.



Figura 4.7
Imagen de los NCPs-IDA/Cu⁺² previo a su utilización

Al igual que con los otros materiales, en una primera instancia se determinó la isoterma de adsorción por el ajuste de Langmuir (**Figura 4.8**). El ensayo se realizó con una cantidad constante de material adsortivo (aprox. 200 mg de NCPs-IDA/Ni⁺²) y distintas concentraciones de GFPrCys1 en *buffer fosfato* 50 mM, NaCl 20 mM pH =7.0. El protocolo de adsorción fue el descrito en M&M.

Los valores de $Q_{\text{máx}}$ calculados a partir de las isotermas de cada material fueron de 46 $\pm$ 5 mg/g para la matriz comercial IMAC-Seph, y de 136 $\pm$ 16 mg/g para los NCPs-IDA/Ni⁺². Se obtuvo una mejora de casi 3 veces en la $Q_{\text{máx}}$ de los NCPs-IDA/Ni⁺² respecto del producto comercial. Dicho comportamiento, al igual que lo sucedido con los NCPs-S, podría deberse al carácter del tipo hidrogel que presentan los NCPs, generando así una capacidad para “almacenar” mayor cantidad de proteína en su red interior. Las K_d fueron de 0,29 $\pm$ 0,13 mg/g para la matriz comercial IMAC- Seph y de 0,14 $\pm$ 0,08 mg/g en el caso de los NCPs-IDA/Ni⁺². Considerando el error experimental, ambos materiales presentaron un K_d similar. Los valores de **AEM** obtenidos para ambos materiales estuvieron en

el mismo rango que la $Q_{\text{máx}}$. Mientras que para la matriz comercial IMAC- Seph la **AEM** fue de 41 ± 2 mg/g, para los NCPs-IDA/ Ni^{+2} fue de 122 ± 4 mg/g.

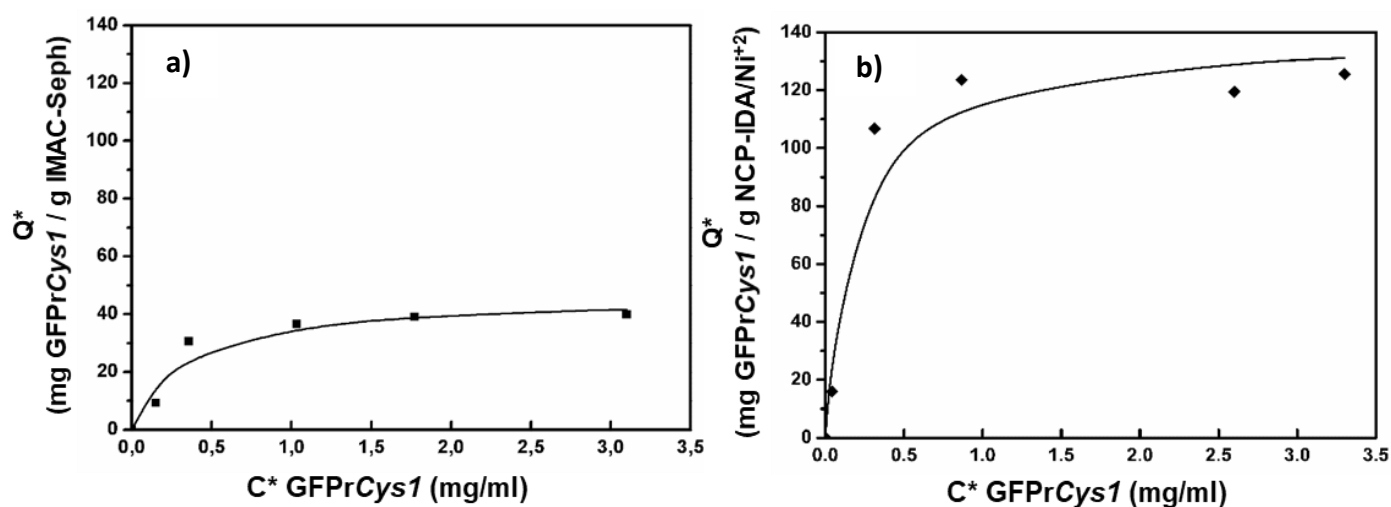


Figura 4.8
Representación de la Isotherma de Langmuir:
(a) Matriz comercial IMAC-Seph y **(b)** NCPs-IDA/ Ni^{+2}

También se determinó la cinética de adsorción para ambos materiales (Figura 4.9). Para ello, al igual que con los otros materiales, se analizó la cantidad de proteína remanente en solución luego de la incubación y se la expresó como una fracción de la cantidad de proteína inicial en función del tiempo de adsorción. Se utilizó aproximadamente 200 mg de material adsorbtivo y una concentración inicial de 2,5 mg/ml de proteína GFPPrCys1 en *buffer fosfato* 50 mM pH =7.0 NaCl 20 mM.

Se observó que el 95% de las proteínas se adsorbió aproximadamente en 15 min en la IMAC-Seph, mientras que el mismo porcentaje de adsorción se alcanzó a los 14 min en los NCPs-IDA/ Ni^{+2} . Dichos resultados concuerdan con los valores de K_d obtenidos a partir del ajuste de cada isoterma, y dan una idea de que la velocidad de la adsorción fue similar para ambos materiales.

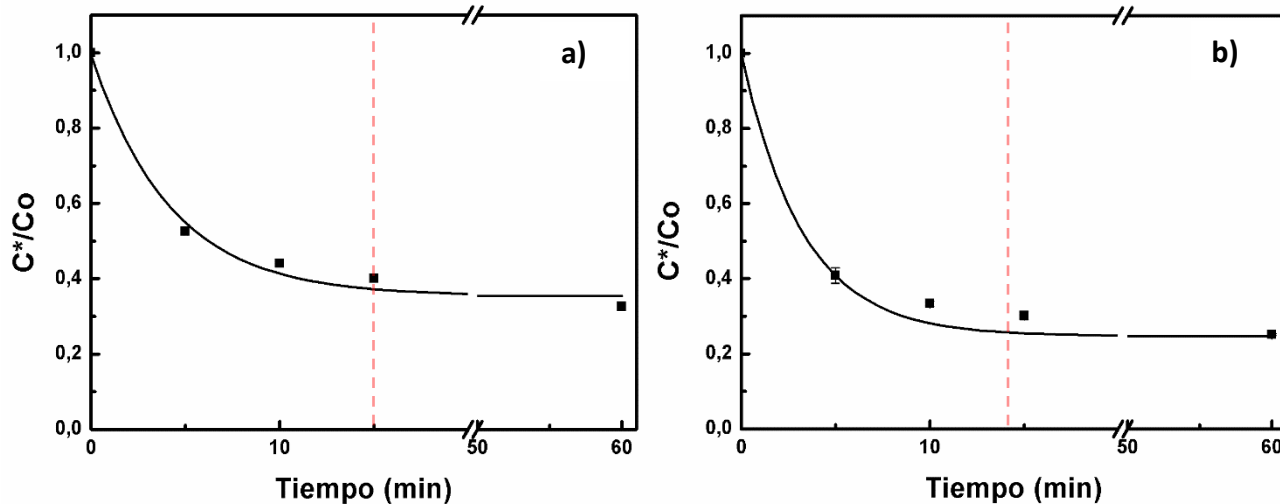


Figura 4.9
Cinética de adsorción
 (a) Matriz comercial IMAC-Seph y (b) NCPs-IDA/ Ni^{+2}

En la **Figura 4.10** se puede observar a ambos materiales adsorbidos con la GFPPrCys1 luego del proceso de centrifugación. En todos los casos el precipitado del material fue mejor para los NCPs-X, que resultaron en una mejor formación de pellet debido a su menor tamaño y mayor densidad.

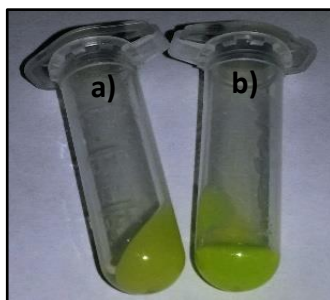


Figura 4.10
Imagen de los materiales durante la
adsorción de GFPPrCys1
 (a) NCPs-IDA/ Ni^{+2} y (b) IMAC-Seph

4.4 Conclusiones parciales

En este Capítulo se describió el estudio de las propiedades adsorptivas de los NCPs-X. Para ello se realizó un protocolo en *batch* con separación de los NCPs mediante centrifuga y condiciones de adsorción específicas para cada dupla ligando/proteína objetivo.

Los estudios de adsorción permitieron obtener la siguiente información acerca de los NCPs-X:

- Los NCPs-S fueron capaces de adsorber la proteína LYZ con una $Q_{\text{máx}}$ mayor a 700 mg/g, sin embargo con una menor afinidad que la matriz comercial. Si bien esta disminución de la afinidad no invalidó a los NCPs-S para adsorber LYZ, la **AEM** se vio disminuida.
- Los NCPs-Av adsorbieron la proteína IgG con una **AEM** 100% mayor respecto a lo reportado para una matriz estándar, aunque su afinidad resultó menor a la esperada.
- Los NCPs-IDA/ Ni^{+2} fueron capaces de adsorber la proteína GFPrCys1 con una $Q_{\text{máx}}$ cerca de 3 veces mayor y una afinidad similar a una matriz comercial estándar.

CAPÍTULO 5

APLICACIÓN DE NANOCOMPUESTOS POLIMÉRICOS FUNCIONALES

5.1 Introducción

La purificación de proteínas involucra a una serie de técnicas que permiten aislar un sólo tipo de proteína de una mezcla compleja. Las proteínas pueden ser obtenidas de tejidos o un cultivo celular, típicamente bacterias, levaduras o células de mamífero, donde es expresada de forma natural o recombinante. Una purificación de proteínas implica aislarla de la mezcla en base a diferencias en sus propiedades fisicoquímicas. El grado de purificación dependerá de su aplicación final. En general se requiere de un alto grado de pureza cuando se utiliza con fines de investigación o terapéuticos; sin embargo para usos industriales sólo será necesario cumplir con los requerimientos de actividad catalítica.

Cuando se requiere escalar el proceso de purificación, surge la necesidad de optimizar el esquema de purificación para recuperar la mayor cantidad de proteína funcional con la menor cantidad de contaminantes y en el menor número de pasos posible (Ritchie, 2012).

Esquema de purificación de una proteína

Al planificar un esquema de purificación de proteínas es muy importante tener en claro la finalidad del producto. Tanto la cantidad como la calidad deben ser suficientes para su aplicación. Además, se debe tener en cuenta la información biofísica de la misma para evitar procesos como la desnaturalización, agregación, degradación y/o hidrólisis que afecten su funcionalidad y estabilidad. Un planeamiento cuidadoso que permita purificar la proteína tan rápido como sea posible y bajo condiciones controladas maximizará las chances de realizar una purificación exitosa (Bonner, 2007).

Como se detalló en el **Capítulo 1**, la mayoría de los procesos de purificación de proteínas con materiales adsorbentes micro/macro estructurados se realizan en columna. Sin embargo, cuando el material adsorbente son partículas nanoestructuradas se debe recurrir a un método de purificación en *batch* por inconvenientes de compactación del lecho. Los materiales poliméricos nanoestructurados son altamente susceptibles a la compactación debido a la mayor cantidad de puntos de interacción entre partículas. Además, su recuperación elástica suele ser menor mientras menor sea su tamaño de partícula (Nokhodchi *et al*, 1995).

En el **Capítulo 4** se evaluaron las capacidades adsortivas de los NCPs-X utilizando proteínas puras mediante un protocolo en *batch*, con separación por centrifugación. En este Capítulo se evaluará la capacidad de dichos materiales para purificar proteínas a partir de mezclas complejas de proteínas. En el caso de los NCPs-S se purificará LYZ de clara de huevo, con los NCPs-Av se purificará IgG de suero sanguíneo, mientras que con los NCPs-IDA/Ni⁺² se purificará GFP_{PrCys1} recombinante de un lisado celular de *E. coli*.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Materiales

Como material adsorbente se utilizaron los NCPs-S, NCPs-Av y NCPs-IDA/Ni⁺², cuya preparación se detalló en el **Capítulo 3**. Para los ensayos de purificación se utilizaron los siguientes extractos crudos de proteínas: (i) clara de huevo; (ii) suero sanguíneo humano; y (iii) lisado celular de un clon de *E. coli* con capacidad para expresar GFP_{PrCys1}. Para el ensayo de actividad de LYZ se utilizaron células liofilizadas de *Micrococcus lisodeikticus*, marca *Sigma Aldrich*.

Para armar sistemas de dos fases acuosas se utilizó Polietilenglicol (PEG) 600 100%; PEG 1540, solución al 50% *w/w* en agua destilada; y PEG 8000, solución al 50% *w/w* en agua destilada, todos marca *Merck Millipore*. La electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó en una cuba electroforética *Protean II*, marca BIORAD. Todos los ensayos se realizaron con agua desionizada y filtrada con filtro de 0,22 μ m. El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

5.2.2 Metodología

Procedimiento de adsorción

El procedimiento de adsorción se realizó en *batch* en cuatro etapas: (i) equilibrado; (ii) adsorción; (iii) lavado y (iv) elución, de acuerdo a lo descrito en el **Capítulo 4**. Se utilizó aproximadamente 200 mg de NCPs-X y un volumen de muestra de 1,5 ml. Las proteínas totales fueron determinadas según el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para preparar la muestra de clara de huevo se utilizó un huevo de gallina del cual se descartó la yema, y la clara se diluyó 1/5 en buffer Glicina-NaOH 0,1 M pH= 10,0. La muestra se homogeneizó y se incubó ON a 5 °C. Esta solución se utilizó para la adsorción con los NCPs-S. Los lavados se realizaron con *buffer Glicina-NaOH 0,1 M pH=10,0* mientras que para la elución se utilizó *buffer Glicina-NaOH 0,1 M pH=10,0 NaCl 1M*.

La muestra de suero sanguíneo se preparó a partir de una muestra de sangre de un donante anónimo, la cual se dejó a TA durante 5-7 min y luego se centrifugó a 3000 RPM durante 15 min para separar los coágulos. El suero se separó a otro tubo de plástico y se lo diluyó 1/10 en *buffer PBS*. Esta solución se utilizó para la adsorción con los NCPs-Av. Los lavados se realizaron con *buffer PBS* mientras que la elución se realizó en *buffer Citrato 10 mM pH = 3,0*.

El lisado celular se preparó según se describe en Kikot *et al*, 2014 a partir de un cultivo de *E. Coli* recombinante con capacidad para producir GFPrCys1. La ruptura celular se llevó a cabo por ultrasonido en *buffer Fosfato 50 mM pH=7,0 NaCl 20 mM*. Dicha solución se utilizó para la adsorción con los NCPs-IDA/Ni²⁺. Para los lavados se utilizó *buffer Fosfato 50 mM pH=7,0 NaCl 20 mM*, mientras que para la elución se utilizó *buffer Fosfato 50 mM pH=7,0 NaCl 20 mM, Imidazol 1 M*.

Actividad enzimática de Lisozima

Microorganismos *Micrococcus lisodeikticus* se suspendieron en *buffer Fosfato 30 mM, pH = 7.0* a una concentración de 1 mg/ml (**suspensión A**). Luego se agregaron 10 µl de solución de LYZ (**muestra**) y 190 µl de la suspensión A en un pocillo de microplaca de 96 wells. A continuación, se midió la Ab_{490 nm} cada 1 min durante 5 min totales en un lector de microplaca SPECTROstar marca BMG LABTECH y se graficó la variación de DO₄₉₀ en función del tiempo. Finalmente se calculó la cantidad de unidades enzimáticas (UE) por mL de cada muestra como la cantidad de enzima que en presencia de sustrato y en las condiciones ya descritas produce una variación de absorbancia de 0,1 unidades por minuto (**Ec 5.1**).

$$UE/ml = \Delta D.O./min \times 1000 \quad (\text{Ec 5.1})$$

Actividad específica

La Actividad Específica (**AE**), que relaciona las unidades enzimáticas con la masa total de proteínas, se calculó de acuerdo a la **Ec. 5.2**.

$$AE = \frac{\text{Actividad enzimática}}{\text{Proteínas totales}} \quad (\text{Ec. 5.2})$$

Donde la **AE** se expresa en UE/mg, la actividad enzimática en UE/ml y la cantidad de proteínas totales en mg/ml.

Para el caso particular de la *GFP_{PrCys1}* la actividad enzimática se reemplazó por la fluorescencia emitida en 508 nm (en Unidades Relativas, RFU) medida con un espectrofluorómetro *Nanodrop 3300*, marca THERMO SCIENTIFIC.

Factor de purificación

El factor de purificación (**FP**), que relaciona la AE de la muestra con respecto a la AE inicial, se calculó de acuerdo a la **Ec. 5.3**.

$$FP = \frac{AE \text{ muestra recuperada}}{AE \text{ muestra original}} \quad (\text{Ec. 5.3})$$

Donde **FP** es un valor sin unidades que representa la calidad del paso de purificación.

Rendimiento

El rendimiento (**Y**), que relaciona las unidades enzimáticas totales recuperadas respecto a las unidades enzimáticas totales de la muestra, se calculó de acuerdo a la **Ec. 5.4**.

$$Y \% = \frac{\text{Unidades enzimáticas recuperadas}}{\text{Unidades enzimáticas originales}} \times 100 \quad (\text{Ec. 5.4})$$

Sistema de dos fases acuosas

Se estudiaron tres sistemas de dos fases acuosas (ATPS) compuestos por PEG de diferentes PM (600, 1540, 8000) y *buffer Fosfato 3 M pH= 7.0*. Cada sistema se preparó por triplicado en tubos *Eppendorf* de 2 ml de capacidad. A continuación se agregó 200 μ l de extracto crudo de *E. coli* recombinante, se agitó a TA en un agitador tipo vortex durante 60 s y finalmente en un ROTO-LAB durante 15 min. Luego del proceso de partición, las muestras se centrifugaron a 14.000 RPM durante 15 min. La fase superior (FSup) se separó de la fase inferior (FI) y se reservó en un *Eppendorf* de 1,5 ml de capacidad. La cantidad de la GFP_{PrCys1} se determinó en base a las RFU. Las proteínas totales tanto del extracto crudo como de cada fase se determinaron mediante el método de Bradford.

Sistema de dos fases acuosas con NCPs-IDA/Ni⁺²

A cada uno de los sistemas de ATPS se le adiciona una cantidad aproximada de 200 mg de NCPs-IDA/Ni⁺² equilibrados previamente en *buffer Fosfato 50 mM, pH=7.0* y 200 μ l de extracto crudo de *E. coli* recombinante. Las muestras se agitaron a TA en un agitador tipo Vortex durante 60 s y finalmente en un ROTO-LAB durante 30 min. Luego del proceso de adsorción/partición, las muestras se centrifugaron a 14.000 RPM durante 15 min. La FSup se separó y se reservó en un *Eppendorf* de 1,5 ml de capacidad. Los NCPs-IDA/Ni⁺²&proteína se extrajeron de la interfase con una micropipeta. Sobre éstos se realizaron los lavados y la elución de la misma manera que se detalló en el protocolo de adsorción del **Capítulo 4**. La cantidad de la GFP_{PrCys1} se determinó en base a las RFU como se describe previamente. Las proteínas totales del extracto crudo, de cada fase y de la elución fueron determinadas mediante el método de Bradford.

Electroforesis desnaturalizante en gel de poli acrilamida

La pureza de las proteínas purificadas se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). El gel de corrida (“*Running gel*”) se preparó al 12% mientras que el gel de apilamiento (“*Stacking gel*”) se preparó al 5%. Las condiciones electroforéticas fueron de 120 min a 12 mA/gel. El patrón de peso molecular (PPM) se preparó de la siguiente manera: (i) LYZ (14.3 kDa) 1 mg/ml; (ii) Ovoalbúmina (45 kDa) 1,2 mg/ml; y (iii) BSA (66 kDa) 1 mg/ml. Las muestras sembradas en el gel fueron previamente estandarizadas a 1 unidad de DO por ml.

La tinción del gel se realizó con una solución de teñido *Coomasie-Blue* R250 0,3% en Metanol: Ac. Acético: Agua (3:1:6) en agitación con un agitador orbital Modelo SK-O 330 Pro, marca *Dragon Lab* a 50 RPM durante 60 min. El desteñido se realizó con una solución de Metanol: Etanol: Agua (3:1:6) durante 2 h. Este paso se repitió hasta obtener una coloración adecuada de las bandas en el gel.

Las muestras con alta fuerza iónica fueron desaladas mediante Cromatografía de Exclusión Molecular. Para ello se utilizó una columna *PD10* conteniendo *Sephadex G-25* de *GE Healthcare Life Sciences*, siguiendo el protocolo que describe el producto.

5.3 Resultados y discusión

Los resultados promisorios en cuanto a capacidad adsortiva de los NCPs-X obtenidos en el **Capítulo 4**, me llevaron a estudiar el comportamiento de estos nuevos materiales con muestras complejas. A continuación se detallan los resultados obtenidos al utilizar los materiales desarrollados en este Trabajo de Tesis para purificar proteínas a partir de extractos crudos de proteínas.

Purificación de LYZ a partir de clara de huevo con NCPs-S

Como prueba final para estudiar la capacidad de los NCPs-S se purificó LYZ a partir de la clara de un huevo diluida en *buffer Glicina-NaOH 0,1 M pH=10,0*. El procedimiento para la adsorción/desorción fue el mismo que el mencionado en el **Capítulo 4**. Los lavados se realizaron con el mismo *buffer de dilución*, mientras que la elución se realizó agregando NaCl 1 M a dicho *Buffer*. Luego del proceso de elución se utilizó una columna PD10 para reemplazar el *buffer de elución* por *buffer Fosfato 50 mM pH=7* y así asegurar la estabilidad de la proteína.

Dado que la LYZ posee un elevado punto isoeléctrico (10,7) y que prácticamente es la única proteína con ese valor de PI en la clara de huevo, se decidió utilizar un *buffer de adsorción* con pH alcalino. De este modo, la mayoría de las proteínas tienen una carga neta negativa al momento de la adsorción y por lo tanto no interaccionan con la matriz (también de carga neta negativa), lo que optimiza la capacidad del material adsorbente hacia la LYZ que estará con carga neta positiva. Los resultados obtenidos se detallan en el cuadro de purificación de la **Tabla 5.1**, donde se muestran como aumenta la **AE** y **FP**. Paralelamente se realizó una adsorción en las mismas condiciones con la matriz comercial SP-Seph para poder comparar el **FP** y **Y**.

Al analizar la **Tabla 5.1** se puede observar que el rendimiento con los NCPs-S fue mayor que el obtenido con la matriz comercial (72% vs 68%), resultado que concuerda con la mayor $Q_{\text{máx}}$ de los NCPs-S. Sin embargo el **FP** fue menor que el obtenido con la matriz comercial (18 vs 21), lo que indicaría una probable adsorción inespecífica de proteínas dentro del hidrogel de los NCPs-S.

La **AEM** para los NCPs-S bajo estas condiciones de purificación (directamente de un extracto crudo) fue de 215 mg/g $\pm$ 6 mg/g, mientras que para la matriz comercial SP-Seph fue de 300 mg/g $\pm$ 18 mg/g. En ambos casos, se obtuvo un valor considerablemente menor que al utilizar proteínas puras, como es de esperar, por la presencia de proteínas contaminantes.

Tabla 5.1
Cuadro de purificación de LYZ a partir de clara de huevo con NCPs-S y
matriz comercial SP-Seph

<i>Muestra</i>	<i>Proteínas totales</i> (mg)	<i>Act. enzimática</i> (UE/ml)	<i>AE</i> (UE/mg)	<i>Y</i> (%)	<i>FP</i>
Clara de huevo	21,83	2060	141	---	---
Elución NCPs-S	0,71	1491	2501	72	18
Elución SP-Seph	0,89	1397	2934	68	21

Para corroborar la efectividad del proceso adsorptivo se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 12%. En la **Figura 5.1** se puede observar claramente el proceso de adsorción/desorción de la lisozima (LYZ) respecto del extracto crudo original (calle 2). Por un lado, en las calles 3 y 5, correspondientes a la post-incubación con NCPs-S y SP-Seph respectivamente, prácticamente no se detecta la banda correspondiente a la LYZ. Por el contrario, en las calles 4 y 6, correspondientes a los eluidos de NCPs-S y SP-Seph se puede observar la desorción de la LYZ (recuadro en rojo) con muy pocas proteínas contaminantes con respecto a la calle del extracto crudo original (calle 2).

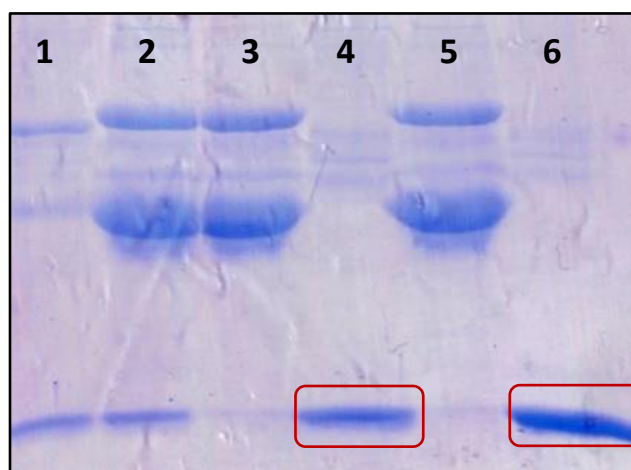


Figura 5.1
SDS-PAGE al 12%. Purificación de Lisozima a partir de clara de huevo utilizando
NCPs-S y SP-Seph.
Calles: 1: PPM, **2:** Clara de huevo, **3:** Post incubación NCPs-S, **4:** Elución NCPs-S, **5:** Post incubación matriz comercial SP-Seph, **6:** Elución matriz comercial SP-Seph.

Purificación de IgG a partir de suero de sangre con NCPs-Av

Como prueba final para analizar la efectividad de los NCPs-Av se purificó IgG a partir de suero sanguíneo. El suero fue diluido al décimo con *buffer PBS* y se realizó la adsorción/desorción descrita en el **Capítulo 4**. Los lavados se realizaron con *buffer PBS* mientras que la elución se realizó en *buffer Citrato 10 mM pH = 3,0*. Luego del proceso de elución se utilizó una columna PD10 para reemplazar el *buffer de elución* por *buffer PBS* y así asegurar la estabilidad de la proteína.

En comparación con la **AEM** obtenida al adsorber/desorber IgG pura (107 $\pm$ 6 mg/g), y al igual que lo sucedido con los NCPs-S, la **AEM** obtenida utilizando suero sanguíneo se redujo en un 50% aproximadamente hasta alcanzar los 51 $\pm$ 7 mg/g, posiblemente debido a la presencia de proteínas contaminantes.

Cabe mencionar que el cuadro de purificación correspondiente al proceso de adsorción no se pudo realizar por no contar con un método para cuantificar la actividad de la IgG. Sin embargo, se realizó un gel de SDS-PAGE para visualizar la efectividad del proceso adsortivo (**Figura 5.2**). Al igual que con los NCPs-S, en la imagen correspondiente al SDS-PAGE se pudo observar claramente el proceso de adsorción/desorción de la IgG hacia el material adsortivo. Por un lado, en la calle 3 se detectó la ausencia de la banda correspondiente a la IgG, indicando la adsorción hacia el material adsortivo. Mientras tanto, en la calle 4 se observó la desorción de la proteína (recuadro en rojo), con una pureza similar a un producto comercial (calle 5).

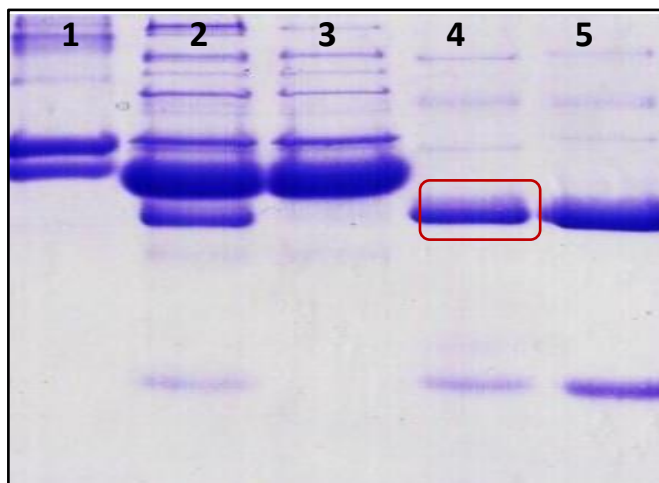


Figura 5.2

SDS-PAGE al 12%. Purificación de IgG a partir de suero sanguíneo utilizando NCPs-Av
Calles: 1: PPM, 2: Suero sanguíneo, 3: Post incubación NCPs-Av, 4: Elución NCPs-Av, 5: IgG comercial

Obs: En el PPM no se observa la banda de la LYZ.

Purificación de GFPrCys1 a partir de un lisado celular de *E. Coli* con NCPs-IDA/Ni⁺²

Como prueba final para analizar la capacidad de los NCPs-IDA/Ni⁺² se purificó GFPrCys1 recombinante a partir un extracto crudo de *E. coli*. La descripción del proceso de fermentación, recuperación y lisado del cultivo celular fue previamente publicado por Kikot *et al*, 2014.

Al igual que con los demás materiales, el procedimiento de adsorción fue el mismo que el mencionado en el **Capítulo 4**, realizando la elución con *Imidazol* 1M. En la **Figura 5.3** se encuentra una imagen de los NCPs-IDA/Ni⁺² luego de la incubación con el extracto crudo de *E. coli* en la cual se aprecia una coloración verde por la presencia de la GFPrCys1. En el cuadro de purificación de la **Tabla 5.2** se resumen los parámetros del proceso. Cabe recordar que este ensayo también se realizó en comparación con la matriz comercial IMAC-Seph.



Figura 5.3
Imagen de los NCPs-IDA/Ni⁺² luego del proceso de adsorción con lisado celular de *E. Coli*.

Tabla 5.2
Cuadro de purificación de GFPrCys1 a partir de un lisado celular de *E. Coli* con NCPs-IDA/Ni⁺² y matriz comercial IMAC-Seph

<i>Muestra</i>	<i>Proteínas totales</i> (mg)	<i>Act. enzimática</i> (RFU/ml)	<i>AE</i> (RFU/mg)	<i>Y</i> (%)	<i>FP</i>
Extracto crudo	12,34	599750	48587	---	---
Elución NCPs-IDA/Ni ⁺²	1,22	583803	480448	10	10
Elución IMAC-Seph	1,24	638802	516212	10	11

Como se puede observar en el cuadro de purificación de la **Tabla 5.2**, el rendimiento (*Y*) fue bajo para ambos materiales (aprox. 10%) lo que indicaría una gran pérdida de proteína no específica durante los lavados. Sin embargo, la medida de la fluorescencia del extracto crudo no es muy específica. También podría aportar a la fluorescencia otras sustancias fluorescentes e incluso

proteína hidrolizada. Prueba de ello puede ser que el **FP** y **Y** de la matriz comercial es muy similar.

La **AEM** para los NCPs-IDA/ Ni^{+2} bajo estas condiciones de purificación fue de $84 \text{ mg/g} \pm 3 \text{ mg/g}$, mientras que para la matriz comercial IMAC-Seph fue de $38 \text{ mg/g} \pm 3 \text{ mg/g}$. Al igual que con los NCPs-S, la **AEM** de los NCPs-IDA/ Ni^{+2} a partir de un extracto crudo de proteínas fue considerablemente menor que al utilizar proteínas puras, posiblemente debido al efecto de la biomasa y del resto de las proteínas contaminantes presentes en la solución de incubación.

Para corroborar cada paso del proceso adsorptivo se realizó un SDS-PAGE (**Figura 5.4**). Al igual que con los otros materiales, previo a dicho análisis se desalaron las muestras. A partir de la imagen del gel se observó una alta concentración de GFPrCys1 en las calles correspondientes a la elución de ambos materiales (recuadro en rojo de las calles 4 y 6). Por otro lado, se observó una diferencia en las calles correspondientes al remanente de proteínas luego de la adsorción: la calle 3 (post-incubación NCPs-IDA/ Ni^{+2}) presentó impurezas con menor intensidad que la calle 5 (post-incubación IMAC-Seph), probablemente debido a la mayor $Q_{\text{máx}}$ por parte de los NCPs-IDA/ Ni^{+2} .

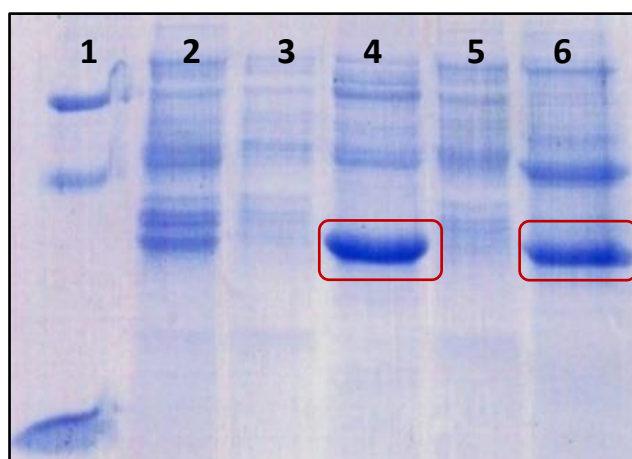


Figura 5.4

SDS-PAGE al 12%. Purificación de GFPrCys1 a partir de un lisado celular de *E. Coli* utilizando NCPs-IDA/ Ni^{+2} y IMAC-Seph

Calles: 1: PPM, 2: Lisado *E. coli*, 3: Post incubación NCPs-IDA/ Ni^{+2} , 4: Elución NCPs-IDA/ Ni^{+2} , 5: Post incubación IMAC-Seph, 6: Elución IMAC-Seph

En términos generales, luego de analizar los resultados obtenidos al purificar GFPrCys1 se pudo concluir que el comportamiento de ambos materiales fue similar para las condiciones de adsorción utilizadas en este ensayo.

Sistemas de dos fases acuosas con NCPs-IDA/Ni⁺²

Como se detalló en el Capítulo 1, las Tecnologías Integrativas aplicadas a la purificación de proteínas es un concepto de gran interés en el área del DSP (D'Souza *et al*, 2013). Existen diferentes posibilidades para reducir el número de pasos de un proceso de purificación. Uno de estos métodos es el sistema de dos fases acuosas (ATPS). Estos están formados por soluciones concentradas de dos polímeros o un polímero y una sal, que forman un sistema bifásico con un entorno de extracción muy suave, capaz de conservar las propiedades funcionales de las macromoléculas. Los diferentes componentes de un extracto, el material particulado (incluyendo desechos celulares) y las sustancias solubles que incluyen a las proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y pigmentos particionan diferencialmente entre las fases. Dicho proceso permite la purificación del producto de interés incluso a partir de extractos crudos. A los efectos de obtener una mayor purificación, pueden diseñarse procesos extractivos en varias etapas, o bien incrementar la selectividad del sistema por unión de ligandos de afinidad a uno de los polímeros constituyente del sistema (Li *et al*, 2002).

Con el propósito de mejorar el grado de purificación de GFPrCys1 se evaluó el efecto generado de agregar NCPs-IDA/Ni⁺² a sistemas de ATPS formados por PEG/Fostatos. Para ello, se extrajo GFPrCys1 utilizando los sistemas detallados en la **Tabla 5.3** con y sin el agregado de NCPs-IDA/Ni⁺². Las proteínas totales de cada fase se determinaron por el método de Bradford, mientras que la actividad enzimática se calculó en base a las RFUs. Finalmente se calculó el **FP** obtenido en cada sistema y se realizó un SDS-PAGE para comprobar la efectividad del ensayo.

En una primera instancia se determinó hacia qué fase particionan los NCPs en cada uno de los sistemas de ATPS detallados en la **Tabla 5.3** (sin extracto crudo de *E. coli*). Para ello, 200 mg de NCPs-IDA/Ni⁺² se agregaron a cada sistema, se mezclaron y separaron las fases. Como se puede observar en la **Figura 5.5 (a)**, en todos los sistemas de ATPS los NCPs-IDA/Ni⁺² quedaron retenidos por completo en la interfase, lo que facilitó su posterior extracción sin generar mayores inconvenientes.

Tabla 5.3
Sistemas de ATPS utilizados para purificar GFPrCys1 a partir de un lisado celular de *E. coli*.

<i>Sistema ATPS</i>	<i>SISTEMA 1</i> PEG 600 (100%)	<i>SISTEMA 2</i> PEG 1540 (50%)	<i>SISTEMA 3</i> PEG 8000 (50%)
PEG (g)	0,8	1,4	1,5
Buffer Fosfato 3M, pH 7,0 (g)	0,7	1,8	1,4
Extracto crudo <i>E.coli</i> (ml)	0,2	0,2	0,2
NCPs-IDA/Ni ⁺² (g)	0,2	0,2	0,2

A continuación se realizó la purificación de la GFPrCys1 utilizando todos los componentes detallados en la **Tabla 5.3**. Se evaluó la diferencia en el **FP** de cada sistema con y sin el agregado de los NCPs-IDA/Ni⁺². El protocolo de extracción en ATPS fue igual que el proceso de adsorción realizado previamente. En la **Figura 5.5 (b)** se observa a simple vista que la GFPrCys1 particionó mayoritariamente hacia la FSup en los sistemas sin NCPs-IDA/Ni⁺². Cuando se agregan los NCPs-IDA/Ni⁺² estos capturan la proteína y la retienen en la interfase de cada sistema (**Figura 5.5 (c)**). Finalmente se extrajo la FSup, se recuperaron los NCPs y se continuó con el protocolo habitual hasta la elución de la GFPrCys1 de estos últimos.

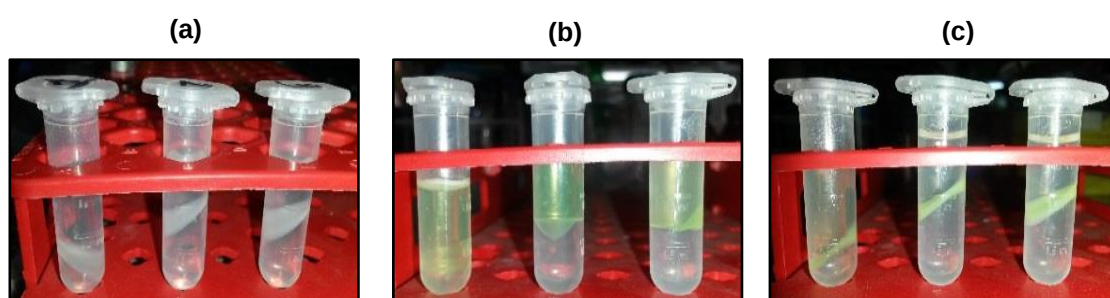


Figura 5.5
Imágenes de los sistemas de ATPS con/sin NCPs-IDA/Ni⁺²
(a): ATPS con NCPs-IDA/Ni⁺², (b): ATPS con extracto crudo de *E. Coli* (GFPrCys1 particiona en la FSup), (c): ATPS con NCPs-IDA/Ni⁺²&GFPrCys1

Tabla 5.4
Cuadro de purificación de GFP_{PrCys1} a partir de un lisado celular de *E. coli* utilizando ATPS con y sin agregado de NCPs-IDA/Ni⁺²

<i>Muestra</i>	<i>Sistema ATPS</i>	<i>Proteínas Totales</i> (mg)	<i>Act. enzimática</i> (RFU/ml)	<i>AE</i> (RFU/mg)	<i>Y</i> (%)	<i>FP</i>
<i>Extracto crudo</i>	---	1,65	433407	48587	---	---
<i>Sin NCPs-IDA/Ni⁺²</i>	1	0,43	174695	404387	67	8
	2	0,38	68892	180392	42	4
	3	0,34	29523	86074	17	2
<i>Elución NCPs-IDA/Ni⁺²</i>	1	1,25	264807	883004	76	18
	2	1,32	296728	502048	80	10
	3	1,43	500212	749381	87	15

Al analizar los resultados de la **Tabla 5.4** se observa que para los sistemas sin NCPs, el sistema N°1 fue el de mayor **FP** (FP=8). Este es un valor de **FP** típico de estos sistemas, donde mayormente se reduce la concentración de proteínas contaminantes (Li *et al*, 2002).

Otro aspecto observado de la **Tabla 5.4** fue que el **FP** aumentó en todos los sistemas de ATPS suplementados con NCPs-IDA/Ni⁺². En este sentido, el sistema N°1 fue nuevamente el de mayor **FP**, siendo 10 veces mayor que el sistema sin NCPs. Sin embargo, el sistema N°3 fue el que presentó la mayor diferencia luego del agregado de los NCPs, alcanzando una variación en el **FP** de 13 veces.

Finalmente, la pureza de las muestras se verificó mediante un SDS-PAGE (**Figura 5.6**). En el mismo se pueden comparar las eluciones correspondientes a los 3 sistemas de ATPS con NCPs, la elución de una adsorción utilizando sólo NCPs-IDA/Ni⁺² y la elución de una columna conteniendo la matriz comercial IMAC-Sep. Se detectó una menor presencia de proteínas contaminantes en las calles correspondientes a los sistemas de ATPS con NCPs (calles 3, 4 y 5) en comparación con la elución directa de NCPs-IDA/Ni⁺²(calle 6), lo cual reflejó el mayor **FP** obtenido al utilizar el sistema integrado de purificación. Analizando en detalle las eluciones de los tres sistemas, la correspondiente al sistema N°1 (calle 3) presentó un menor contenido de proteínas contaminantes, confirmando

el **FP** más alto de los tres sistemas (**Tabla 5.4**) y presentando un aspecto similar a la purificación en columna con la matriz comercial IMAC-Seph (calle 7). Cabe destacar que en una purificación en columna habitualmente se realizan eluciones con concentraciones escalonadas de *Imidazol* (por ejemplo, tres eluciones con 10 mM, 100 mM y 1M de *Imidazol* en *buffer Fosfato 50 mM pH=7,0 NaCl 20 mM* sucesivamente) de manera que en las primeras eluciones se eliminan proteínas contaminantes y que la elución final esté más concentrada en la proteína de interés. De esta manera, es de esperar un mayor **FP** en procesos en columna respecto a los en *batch*.

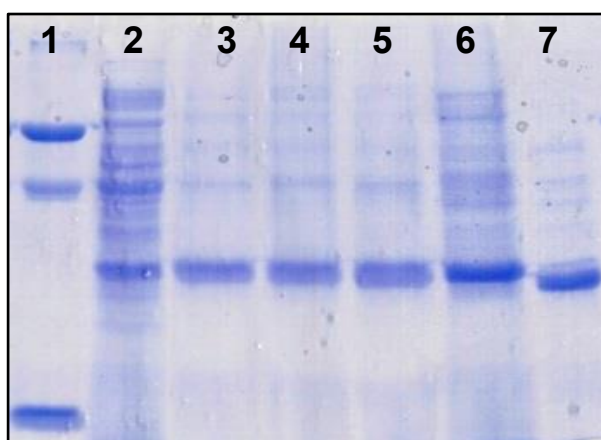


Figura 5.6

SDS-PAGE al 12%. Purificación de GFPrCys1 mediante sistemas de ATPS con NCPs-IDA/Ni⁺²
Calles: 1: PPM, 2: Ext. Crudo *E. coli*, 3: Elución Sistema 1, 4: Elución Sistema 2, 5: Elución Sistema 3, 6: Elución GFPrCys1 con NCPs-IDA/Ni⁺² directa, 7: GFPrCys1 purificada con IMAC-Seph en columna.

Estos resultados demostraron no sólo la eficacia de integrar dos métodos distintos de purificación en simultáneo, si no que se pueden obtener resultados similares a un proceso de purificación en columna.

5.4 Conclusiones parciales

En este Capítulo se detalló la capacidad de los NCPs-X para purificar proteínas a partir de extractos complejos de proteínas utilizando un sistema de adsorción/desorción en *batch*.

Los ensayos de purificación permitieron obtener la siguiente información acerca de los NCPs-X:

- Los NCPs-S fueron capaces de adsorber la proteína LYZ directamente de la clara de huevo de manera similar a un material adsorativo comercial.
- Los NCPs-Av purificaron la proteína IgG del suero sanguíneo con un nivel de pureza similar a muestras comerciales.
- Los NCPs-IDA/Ni⁺² fueron capaces de purificar la proteína GFPrCys1 recombinante a partir de un extracto crudo de *E. coli* con niveles de pureza y recuperación similares a los obtenidos con un material adsorativo comercial equivalente.
- La adición de NCPs-IDA/Ni⁺² a un sistema convencional de ATPS aumentó considerablemente el **FP** en los tres sistemas estudiados, siendo uno de ellos de 13 veces mayor que el mismo sistema sin NCPs.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

Conclusiones generales del Trabajo de Tesis

En el presente Trabajo de Tesis se planteó la preparación y caracterización de nuevos nanocompuestos poliméricos (NCPs) funcionales con capacidad para purificar distintos tipos de proteínas.

En el **Capítulo 1** se realizó una breve introducción a la Nanotecnología así como también se resumieron los actuales objetivos y las perspectivas a futuro en el ámbito del *Downstream Processing*.

En el **Capítulo 2** se detalló la preparación de NCPs en base a FS y pGMA mediante una técnica de polimerización por injerto inducida por radiación ionizante utilizando un método de irradiación simultáneo. En una primera instancia se determinaron las condiciones óptimas para la preparación de cuatro tipos de NCPs. Posteriormente, utilizando diferentes técnicas de caracterización de materiales se demostró que los NCPs son unidades nanométricas compuestas por pGMA (entre 1 % y 45 % de acuerdo a su preparación) conteniendo aglomerados de NPs de FS en su interior, en una estructura del tipo “budín con pasas”.

En el **Capítulo 3** se detalló la preparación y caracterización de NCPs funcionales conteniendo ligandos sulfónicos, Avímero (Proteína A simil) y el complejo IDA/Ni⁺². Las técnicas de caracterización permitieron comprobar la incorporación de los ligandos de afinidad en los NCPs.

En el **Capítulo 4** se detalló el estudio de las propiedades adsortivas de los NCPs funcionales utilizando proteínas modelo como la Lisozima, Inmunoglobulina G y una proteína recombinante con una etiqueta de His (GFPrCys1). En todos los casos los NCPs mostraron capacidades adsortivas

superiores a matrices cromatográficas estándar en similares condiciones de trabajo.

En el **Capítulo 5** se estudió la capacidad de los NCPs funcionales para purificar proteínas a partir de extractos complejos de proteínas, como la clara de huevo, el suero sanguíneo o el lisado de bacterias recombinantes, utilizando un protocolo de adsorción/desorción en *batch*. Se analizaron los factores de purificación y rendimiento de los procesos. En todos los casos los parámetros estudiados fueron iguales o mejores a los obtenidos con las matrices comerciales.

Finalmente se analizó el uso de NCPs-IDA/Ni⁺² para generar un sistema integrado de purificación en un sistema dos fases acuosas del tipo PEG/Fosfato. Se analizó la purificación de GFP_{PrCys1} de un lisado de *E. coli* en estos sistema de dos fases. Se lograron mejoras en el Factor de Purificación de 6 a 13 veces mayores luego del agregado de los NCPs, alcanzando un valor máximo de 18 para el sistema N° 1. Mediante SDS-PAGE se comprobó que dichos resultados fueron similares a los que se obtienen purificando la muestra por cromatografía en columna.

Se avizora que los NCPs se pueden aplicar al desarrollo de métodos rápidos de purificación en *batch* de proteínas a escala laboratorio, o escalarlos en sistemas de dos fases acuosas.

En conclusión, se obtuvieron materiales compuestos nanoestructurados y funcionales en base a FS y pGMA mediante una técnica de polimerización por injerto radioinducida y modificados con diferentes ligandos de afinidad. Estos materiales nanoestructurados fueron capaces de purificar proteínas directamente de extractos crudos, con capacidades adsortivas similares a los materiales cromatográficos comerciales. Este trabajo sienta las bases para el desarrollo de nuevos sistemas de purificación en *batch* integrados y escalables en base a NCPs. Estos nuevos sistemas pueden potencialmente reemplazar los sistemas cromatográficos en columna, sin resignar pureza y rendimiento en la obtención de un bioproducto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afeyan, N. B., Fulton, S. P., & Regnier, F. E. (1991). Perfusion chromatography packing materials for proteins and peptides. *Journal of Chromatography A*, 544, 267-279.
- Anirudhan, T. S., & Rejeena, S. R. (2012). Poly (acrylic acid)-modified poly (glycidylmethacrylate)-grafted nanocellulose as matrices for the adsorption of lysozyme from aqueous solutions. *Chemical engineering journal*, 187, 150-159.
- Aubin-Tam, M. E., & Hamad-Schifferli, K. (2008). Structure and function of nanoparticle–protein conjugates. *Biomedical Materials*, 3(3), 034001.
- Aydoğan, C., & El Rassi, Z. (2016). Monolithic stationary phases with incorporated fumed silica nanoparticles. Part I. Polymethacrylate-based monolithic column with incorporated bare fumed silica nanoparticles for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1445, 55-61.
- Aygar, G., Kaya, M., Özkan, N., Kocabıyık, S., & Volkan, M. (2015). Preparation of silica coated cobalt ferrite magnetic nanoparticles for the purification of histidine-tagged proteins. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 87, 64-71.
- Barreto, P. L. M., Pires, A. T. N., & Soldi, V. (2003). Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation and Stability*, 79(1), 147-152.
- Barroso, L. B., Abreu, I. O., Nápoles, D. R., & Rodríguez, Y. G. (2005). Empleo de las radiaciones gamma como método de esterilización en biomateriales. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 36.
- Belfer, S., Fainchtein, R., Purinson, Y., & Kedem, O. (2000). Surface characterization by FTIR-ATR spectroscopy of polyethersulfone membranes-unmodified, modified and protein fouled. *Journal of Membrane Science*, 172(1-2), 113-124.

-
- Benaglia, M., Alberti, A., Giorgini, L., Magnoni, F., & Tozzi, S. (2013). Poly (glycidyl methacrylate): a highly versatile polymeric building block for post-polymerization modifications. *Polymer Chemistry*, 4(1), 124-132.
- Bhattacharya, A., & Misra, B. N. (2004). Grafting: a versatile means to modify polymers: techniques, factors and applications. *Progress in polymer science*, 29(8), 767-814.
- Bibi, N. S., Gavara, P. R., Espinosa, S. L. S., Grasselli, M., & Fernández-Lahore, M. (2011). Synthesis and performance of 3D-Megaporous structures for enzyme immobilization and protein capture. *Biotechnology progress*, 27(5), 1329-1338.
- Bonner, P. L. R. (2007). *Protein purification (the basics)*. Nottingham Trent University. First edition by Taylor and Francis group.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buchacher, A., & Iberer, G. (2006). Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma—aspects of yield and virus safety. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 1(2), 148-163.
- Calienni, M. N., Febres-Molina, C., Llovera, R. E., Zevallos-Delgado, C., Tuttolomondo, M. E., Paolino, D. & Montanari, J. (2019). Nanoformulation for potential topical delivery of Vismodegib in skin cancer treatment. *International journal of pharmaceutics*, 565, 108-122.
- Callister, W. D. (1995). *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales* (Vol. 1). Reverté.
- Cancho Rodríguez, S. M. (2003). *Disoluciones de polímeros: efecto de los enlaces de hidrógeno sobre sus propiedades termofísicas* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones).
- Carbajal, M. L., Espinoza, S. L. S., Valdez, S. N., Poskus, E., Smolko, E. E., & Grasselli, M. (2009). Arsenical grafted membranes for immobilization of

thioredoxin-like proteins. *Reactive and Functional Polymers*, 69(11), 816-820.

Carta, G., & Jungbauer, A. (2020). *Protein chromatography: process development and scale-up*. John Wiley & Sons.

Castillo, E. J., Koenig, J. L., Anderson, J. M., & Lo, J. (1985). Protein adsorption on hydrogels: II. Reversible and irreversible interactions between lysozyme and soft contact lens surfaces. *Biomaterials*, 6(5), 338-345.

Chang, T. C., Shih, C. C., Yin, C. P., Chen, H. B., & Wu, T. R. (2005). Characterization of hydrophilic poly (methyl methacrylate) s containing iminodiacetic acid and their complexes. *Polymer degradation and stability*, 87(1), 87-94.

Chase, H. A., & Draeger, N. M. (1992). Affinity purification of proteins using expanded beds. *Journal of Chromatography A*, 597(1-2), 129-145.

Chibac, A., Melinte, V., Buruiana, T., Balan, L., & Buruiana, E. C. (2012). One-pot synthesis of photocrosslinked sol–gel hybrid composites containing silver nanoparticles in urethane-acrylic matrixes. *Chemical engineering journal*, 200, 577-588.

Chmielewski, A. G., & Haji-Saeid, M. (2004). Radiation technologies: past, present and future. *Radiation physics and chemistry*, 71(1-2), 17-21.

Choma, J., Dziura, A., Jamiola, D., Nyga, P., & Jaroniec, M. (2011). Preparation and properties of silica–gold core–shell particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 373(1-3), 167-171.

Choma, J., Jamiola, D., Nyga, P., & Jaroniec, M. (2012). Synthesis of rod-like silica–gold core-shell structures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 393, 37-41.

Clough, R. L. (2001). High-energy radiation and polymers: A review of commercial processes and emerging applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 185(1-4), 8-33.

-
- Cochez, M., Ferriol, M., Weber, J. V., Chaudron, P., Oget, N., & Mieloszynski, J. L. (2000). Thermal degradation of methyl methacrylate polymers functionalized by phosphorus-containing molecules I. TGA/FT-IR experiments on polymers with the monomeric formula $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ ($\text{R} = \text{H}, (\text{CH}_2)_4\text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5\text{Br}, \text{C}_{10}\text{H}_7$). *Polymer degradation and stability*, 70(3), 455-462.
- Cummins, P. M., Dowling, O., & O'Connor, B. F. (2011). Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. In *Protein Chromatography* (pp. 215-228). Humana Press.
- D'Souza, R. N., Azevedo, A. M., Aires Barros, M. R., Krajnc, N. L., Kramberger, P., Carbajal, M. L. & Fernandez Lahore, M. (2013). Emerging technologies for the integration and intensification of downstream bioprocesses.
- Deckman, H. W., & Dunsmuir, J. H. (1982). Natural lithography. *Applied Physics Letters*, 41(4), 377-379.
- Demir, M. M., Altın, B., & Özçelik, S. (2010). Composites of reactive silica nanoparticles and poly (glycidyl methacrylate) with linear and crosslinked chains by in situ bulk polymerization. *Composite Interfaces*, 17(9), 831-844.
- Díaz del Castillo, F. (2012). Introducción a los nanomateriales. *FES Cuautitlán, Departamento de Ingeniería, Lecturas de Ingeniería*, 20, 4-14.
- Dong, H., Gao, Y., Sinko, P. J., Wu, Z., Xu, J., & Jia, L. (2016). The nanotechnology race between China and the United States. *Nano Today*, 11(1), 7-12.
- Eckert, A. W., Gröbe, D., & Rothe, U. (2000). Surface-modification of polystyrene-microtitre plates via grafting of glycidylmethacrylate and coating of polyglycidylmethacrylate. *Biomaterials*, 21(5), 441-447.
- Elingarami, S., & Zeng, X. (2011). A short review on current use of magnetic nanoparticles for bio-separation, sequencing, diagnosis and drug delivery. *Advanced Science Letters*, 4(11-12), 3295-3300.

- Espinoza, S. L. S., Sánchez, M. L., Risso, V., Smolko, E. E., & Grasselli, M. (2012). Radiation synthesis of seroalbumin nanoparticles. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(9), 1417-1421.
- Fortina, P., Kricka, L. J., Graves, D. J., Park, J., Hyslop, T., Tam, F., ... & Waldman, S. A. (2007). Applications of nanoparticles to diagnostics and therapeutics in colorectal cancer. *Trends in biotechnology*, 25(4), 145-152.
- Gao, Y., Jin, B., Shen, W., Sinko, P. J., Xie, X., Zhang, H., & Jia, L. (2016). China and the United States—global partners, competitors and collaborators in nanotechnology development. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(1), 13-19.
- Gavara, P. R., Bibi, N. S., Sanchez, M. L., Grasselli, M., & Fernandez-Lahore, M. (2015). Chromatographic characterization and process performance of column-packed anion exchange fibrous adsorbents for high throughput and high capacity bioseparations. *Processes*, 3(1), 204-221.
- Gavara, P. R., Cabrera, R., Vennapusa, R. R., Grasselli, M., & Fernandez-Lahore, M. (2012). Preparation, characterization, and process performance of composite fibrous adsorbents as cation exchangers for high throughput and high capacity bioseparations. *Journal of Chromatography B*, 903, 14-22.
- Goldburg, W. I. (1999). Dynamic light scattering. *American Journal of Physics*, 67(12), 1152-1160.
- Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W., Scott, J. H. J., & Joy, D. C. (2017). *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer.
- González, I., León, M., Díaz, D., & Oliva, H. (2008). Efecto del disolvente en la copolimerización por injerto del estireno y metacrilato de n-butilo sobre el polibutadieno. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 9(3), 277-283.
- Grasselli, M., & Maffia, P. (Eds.). (2015). *Proteínas puras: entre el laboratorio y la industria*. Universidad Nacional de Quilmes.

-
- Grasselli, M., del Cañizo, A. A. N., Camperi, S. A., Wolman, F. J., Smolko, E. E., & Cascone, O. (1999). Immobilized metal ion affinity hollow-fibre membranes obtained by the direct grafting technique. *Radiation Physics and Chemistry*, 55(2), 203-208.
- Grasselli, M., Smolko, E., Hargittai, P., & Sáfrány, Á. (2001). From microspheres to monoliths: Synthesis of porous supports with tailored properties by radiation polymerization. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 185(1-4), 254-261.
- Guo, X., Liu, X., Xu, B., & Dou, T. (2009). Synthesis and characterization of carbon sphere-silica core-shell structure and hollow silica spheres. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 345(1-3), 141-146.
- Hartwig, A., Sebald, M., & Kleemeier, M. (2005). Cross-linking of cationically polymerised epoxides by nanoparticles. *Polymer*, 46(7), 2029-2039.
- Harvey, D. (2000). *Modern analytical chemistry*. Boston: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Hatti-Kaul, R. (2001). Aqueous two-phase systems. *Molecular biotechnology*, 19(3), 269-277.
- Hermanson, G. T. (2013). *Bioconjugate techniques*. Academic press.
- Hong, R. Y., Qian, J. Z., & Cao, J. X. (2006). Synthesis and characterization of PMMA grafted ZnO nanoparticles. *Powder Technology*, 163(3), 160-168.
- Hongfei, H., Xiaohong, L., & Jilan, W. (1992). Effect of acid on radiation grafting of functional monomers onto silicone rubber. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 39(6), 513-516.
- Hoo, C. M., Starostin, N., West, P., & Mecartney, M. L. (2008). A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(1), 89-96.

- Hubburch, J. J., Matthiesen, D. B., Hobley, T. J., & Thomas, O. R. (2001). High gradient magnetic separation versus expanded bed adsorption: a first principle comparison. *Bioseparation*, 10(1-3), 99-112.
- Hunter, R. J. (2013). *Zeta potential in colloid science: principles and applications* (Vol. 2). Academic press.
- Iqbal, P., Preece, J. A., & Mendes, P. M. (2012). Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. *Supramolecular chemistry: from molecules to nanomaterials*.
- Jagschies, G., Gronberg, A., Bjorkman, T., Lacki, K., & Johansson, H. J. (2006). Technical and economical evaluation of downstream processing options for monoclonal antibody (MAb) production. *Biopharm international*.
- Jankiewicz, B. J., Jamiola, D., Choma, J., & Jaroniec, M. (2012). Silica–metal core–shell nanostructures. *Advances in colloid and interface science*, 170(1-2), 28-47.
- Jiang, D. D., Yao, Q., McKinney, M. A., & Wilkie, C. A. (1999). TGA/FTIR studies on the thermal degradation of some polymeric sulfonic and phosphonic acids and their sodium salts. *Polymer degradation and stability*, 63(3), 423-434.
- Jiao, W., Liu, Y., & Qi, G. (2009). Studies on mechanical properties of epoxy composites filled with the grafted particles PGMA/Al₂O₃. *Composites Science and Technology*, 69(3-4), 391-395.
- Jin, L., He, D., Li, Z., & Wei, M. (2012). Protein adsorption on gold nanoparticles supported by a layered double hydroxide. *Materials Letters*, 77, 67-70.
- Jlassi, K., Chandran, S., Mičušík, M., Benna-Zayani, M., Yagci, Y., Thomas, S., & Chehimi, M. M. (2015). Poly (glycidyl methacrylate)-grafted clay nanofiller for highly transparent and mechanically robust epoxy composites. *European Polymer Journal*, 72, 89-101.
- Kangwa, M., Yelemene, V., Polat, A. N., Gorrepati, K. D. D., Grasselli, M., & Fernández-Lahore, M. (2015). High-level fed-batch fermentative expression

of an engineered Staphylococcal protein A based ligand in *E. coli*: purification and characterization. *AMB Express*, 5(1), 1-10.

Kawaguchi, H., Fujimoto, K., & Mizuhara, Y. (1992). Hydrogel microspheres III. Temperature-dependent adsorption of proteins on poly-N-isopropylacrylamide hydrogel microspheres. *Colloid and Polymer Science*, 270(1), 53-57.

Kelley, B. (2007). Very large scale monoclonal antibody purification: the case for conventional unit operations. *Biotechnology progress*, 23(5), 995-1008.

Khelifa, F., Druart, M. E., Habibi, Y., Bénard, F., Leclère, P., Olivier, M., & Dubois, P. (2013). Sol-gel incorporation of silica nanofillers for tuning the anti-corrosion protection of acrylate-based coatings. *Progress in Organic Coatings*, 76(5), 900-911.

Kikot, P., Polat, A., Achilli, E., Fernandez Lahore, M., & Grasselli, M. (2014). Immobilized palladium (II) ion affinity chromatography for recovery of recombinant proteins with peptide tags containing histidine and cysteine. *Journal of Molecular Recognition*, 27(11), 659-668.

Kim, M., Kiyohara, S., Konishi, S., Tsuneda, S., Saito, K., & Sugo, T. (1996). Ring-opening reaction of poly-GMA chain grafted onto a porous membrane. *Journal of membrane science*, 117(1-2), 33-38.

Klein, C., & Hurlbut, C. S. (1997). *Manual de mineralogía* (Vol. 2). Reverté.

Ko, J. A., & Lim, H. B. (2016). Metal-doped inorganic nanoparticles for multiplex detection of biomarkers by a sandwich-type ICP-MS immunoassay. *Analytica chimica acta*, 938, 1-6.

Kobayashi, Y., Imai, J., Nagao, D., Takeda, M., Ohuchi, N., Kasuya, A., & Konno, M. (2007). Preparation of multilayered silica-Gd-silica core-shell particles and their magnetic resonance images. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 308(1-3), 14-19.

Kumar, V., Bhardwaj, Y. K., Jamdar, S. N., Goel, N. K., & Sabharwal, S. (2006). Preparation of an anion-exchange adsorbent by the radiation-induced grafting of vinylbenzyltrimethylammonium chloride onto cotton cellulose and

its application for protein adsorption. *Journal of applied polymer science*, 102(6), 5512-5521.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lee, W., Saito, K., Furusaki, S., Sugo, T., & Makuuchi, K. (1993). Design of urea-permeable anion-exchange membrane by radiation-induced graft polymerization. *Journal of membrane science*, 81(3), 295-305.

Lei, L., Liu, X., Li, Y., Cui, Y., Yang, Y., & Qin, G. (2011). Study on synthesis of poly (GMA)-grafted Fe₃O₄/SiO_x magnetic nanoparticles using atom transfer radical polymerization and their application for lipase immobilization. *Materials Chemistry and Physics*, 125(3), 866-871.

Li, Y., & Armes, S. P. (2010). RAFT synthesis of sterically stabilized methacrylic nanolatexes and vesicles by aqueous dispersion polymerization. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(24), 4042-4046.

Li, Y., & Beitle, R. R. (2002). Protein purification via aqueous two-phase extraction (ATPE) and immobilized metal affinity chromatography. Effectiveness of salt addition to enhance selectivity and yield of GFPuv. *Biotechnology progress*, 18(5), 1054-1059.

Lian, T. W., Kondo, A., Kozawa, T., Ohmura, T., Tuan, W. H., & Naito, M. (2015). Effect of fumed silica properties on the thermal insulation performance of fibrous compact. *Ceramics International*, 41(8), 9966-9971.

Lien-Vien, E., Colthup, N. B., Fatekey, W. G., & Grassell, J. G. (1991). *The handbook of infrared and raman characteristic frequencies of organic molecules* Academic. New York.

Liu, X. Y., Zheng, S. W., Hong, R. Y., Wang, Y. Q., & Feng, W. G. (2014). Preparation of magnetic poly (styrene-co-acrylic acid) microspheres with adsorption of protein. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 443, 425-431.

López Carrasquero, F. (2004). *Fundamentos de polímeros*. Escuela Venezolana para la enseñanza de la Química. Mérida, 49-51.

-
- Lynch, I., & Dawson, K. A. (2008). Protein-nanoparticle interactions. *Nano today*, 3(1-2), 40-47.
- Ma, Z., Guan, Y., & Liu, H. (2006). Superparamagnetic silica nanoparticles with immobilized metal affinity ligands for protein adsorption. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 301(2), 469-477.
- Márquez, M., Carbajal-Franco, G. & Ávila, A. (2017). Influencia del surfactante en las propiedades morfológicas y eléctricas de nanopartículas de óxido de hierro. *Revista de Energía Química y Física*, Vol.4 No.13 19-30.
- Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2000). Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*, 1(4), 739-745.
- Mathias, J., & Wannemacher, G. (1988). Basic characteristics and applications of aerosil: 30. The chemistry and physics of the aerosil Surface. *Journal of colloid and interface science*, 125(1), 61-68.
- Mattiasson, B., Kumar, A., & Galeaev, I. Y. (Eds.). (2009). *Macroporous polymers: production properties and biotechnological/biomedical applications*. CRC Press.
- Meisel, D. (2004). Basics of radiation chemistry in the real world: nanoparticles in aqueous suspensions. *Advances in radiation chemistry of polymers*, 5.
- Michael, David. (2005). ISO /TC 229 Nanotechnologies. <https://www.iso.org/committee/381983.html>
- Mier Buenhombre, J. L., Artiaga, R., & García Soto, L. (1997). *Síntesis de Polímeros. Pesos moleculares. Conformación y configuración*.
- Minko, S. (2008). Grafting on solid surfaces: "Grafting to" and "grafting from" methods. In *Polymer surfaces and interfaces* (pp. 215-234). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Mól, P. C. G., Veríssimo, L. A. A., Eller, M. R., Minim, V. P. R., & Minim, L. A. (2017). Development of an affinity cryogel for one step purification of

lysozyme from chicken egg white. *Journal of Chromatography B*, 1044, 17-23.

Moledo, L., & Olszewicki, N. (2014). *Historia de las ideas científicas: de Tales de Mileto a la Máquina de Dios* (No. 001 (091)). Planeta., FEYNMAN, R. P. There's plenty of room at the bottom, available at Caltech, 1959.

Montanari, M. L. C., Montanari, C. A., Piló-Veloso, D., Beezer, A. E., & Mitchell, J. C. (1998). Sistemas transportadores de drogas. *Química nova*, 21(4), 470-476.

Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., & Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 3941-3994.

Mu, Y., Qiu, T., & Li, X. (2009). Monodisperse and multilayer core-shell latex via surface cross-linking emulsion polymerization. *Materials Letters*, 63(18-19), 1614-1617.

Nasef, M. M., & Hegazy, E. S. A. (2004). Preparation and applications of ion exchange membranes by radiation-induced graft copolymerization of polar monomers onto non-polar films. *Progress in Polymer Science*, 29(6), 499-561.

Nitschke, M., & Meichsner, J. (1997). Low-pressure plasma polymer modification from the FTIR point of view. *Journal of applied polymer science*, 65(2), 381-390.

Nokhodchi, A., Rubinstein, M. H., & Ford, J. L. (1995). The effect of particle size and viscosity grade on the compaction properties of hydroxypropylmethylcellulose 2208. *International journal of pharmaceutics*, 126(1-2), 189-197.

Núñez, Ó. (2008). Columnas monolíticas de base sílice: propiedades, preparación, modificaciones químicas y aplicaciones en cromatografía de líquidos. *Cromatografía y técnicas afines*, 29(2), 59-77.

Oldfield, G., Ung, T., & Mulvaney, P. (2000). Au@ SnO₂ core-shell nanocapacitors. *Advanced Materials*, 12(20), 1519-1522.

-
- Omer-Mizrahi, M., & Margel, S. (2007). Synthesis and characterization of spherical and hemispherical polyepoxide micrometer-sized particles of narrow size distribution by a single-step swelling of uniform polystyrene template microspheres with glycidyl methacrylate. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 45(20), 4612-4622.
- Pace, V., Alcántara, A. R., & Holzer, W. (2011). Highly efficient chemoselective N-TBS protection of anilines under exceptional mild conditions in the eco-friendly solvent 2-methyltetrahydrofuran. *Green Chemistry*, 13(8), 1986-1989.
- Pandey, K. K. (1999). A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, 71(12), 1969-1975.
- Parashar, U. K., Saxena, P. S., & Srivastava, A. (2008). Role of nanomaterials in biotechnology. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(2), 81-87.
- Patel, H. N., & Patel, P. M. (2013). Dendrimer applications—a review. *Int J Pharm Bio Sci*, 4(2), 454-463.
- Peters, E. C., Svec, F., & Fréchet, J. M. J. (1999). Rigid macroporous polymer monoliths. *Advanced Materials*, 11(14), 1169-1181.
- Petran, A., Radu, T., Culic, B., & Turcu, R. (2016). Tailoring the properties of magnetite nanoparticles clusters by coating with double inorganic layers. *Applied Surface Science*, 390, 1-6.
- Provder, T. (1997). Challenges in particle size distribution measurement past, present and for the 21st century. *Progress in organic coatings*, 32(1-4), 143-153.
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Progress in polymer science*, 36(7), 887-913.

- Razzak, M. T., Tabata, Y., & Otsuhata, K. (1993). Modification of natural rubber by different grafting techniques. *Radiation Physics and Chemistry*, 42(1-3), 57-60.
- Refojo, M. F. (1971). The swelling implant. *Journal of biomedical materials research*, 5(2), 179-188.
- Regueiro, M. (2009). Del pedernal al microchip: la historia del uso de los minerales industriales.
- Rehman, F., Rahim, A., Airoidi, C., & Volpe, P. L. (2016). Preparation and characterization of glycidyl methacrylate organo bridges grafted mesoporous silica SBA-15 as ibuprofen and mesalamine carrier for controlled release. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 970-979.
- Rico, M. B., & Gomis, A. M. (2012). Tecnología de polímeros: Procesado y propiedades. Publicaciones de la Universidad de Alicante.
- Ritchie, C. (2012). Protein purification. Iowa State University, United States. *Mater Methods*, 2, 134.
- Roberts, G. S., Kozak, D., Anderson, W., Broom, M. F., Vogel, R., & Trau, M. (2010). Tunable nano/micropores for particle detection and discrimination: scanning ion occlusion spectroscopy. *Small*, 6(23), 2653-2658.
- Roco, M. C. (1999). Nanoparticles and nanotechnology research. *Journal of Nanoparticle Research*, 1(1), 1.
- Salata, O. V. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology*, 2(1), 3.
- Salinas-Salas, G., Stintz, M., & Wessely, B. (2005). Aplicación del método fotométrico para la detección de la distribución de tamaño de micro partículas. *Información tecnológica*, 16(4), 59-68.
- Salvarezza, R. C. (2011). Situación de la difusión de la nanociencia y la nanotecnología en Argentina. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 4(2).

-
- Sánchez, M. L., Giménez, C. Y., Delgado, J. F., Martínez, L. J., & Grasselli, M. (2017). Chromatographic matrix based on hydrogel-coated reticulated polyurethane foams, prepared by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 141, 300-311.
- Sartor, M. (2003). *Dynamic light scattering*. University of California: San Diego, CA, USA, 2-21.
- Schweich, D., & Sardin, M. (1981). Adsorption, partition, ion exchange and chemical reaction in batch reactors or in columns—A review. *Journal of Hydrology*, 50, 1-33.
- Seymour, R. B., & Carraher, C. E. (1995). *Introducción a la química de los polímeros*. Reverté.
- Singh, N. K., Dsouza, R. N., Sánchez, M. L., Verma, S., Achilli, E., Vennapusa, R. R., ... & Fernández-Lahore, M. (2015). Preparation and characterization of grafted cellulosic fibers and their applications in protein purification. *Separation and Purification Technology*, 143, 177-183.
- Skidmore, G. L., Hortsman, B. J., & Chase, H. A. (1990). Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose® FF. *Journal of Chromatography A*, 498, 113-128.
- Sondi, I., Goia, D. V., & Matijević, E. (2003). Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 260(1), 75-81.
- Song, X. J., Hu, J., & Wang, C. C. (2011). Synthesis of highly surface functionalized monodispersed poly (St/DVB/GMA) nanospheres with soap-free emulsion polymerization followed by facile “click chemistry” with functionalized alkylthiols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 380(1-3), 250-256.
- Svec, F., & Frechet, J. M. (1996). New designs of macroporous polymers and supports: from separation to biocatalysis. *Science*, 273(5272), 205-211.

- Tian, H., Hühmer, A. F., & Landers, J. P. (2000). Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format. *Analytical biochemistry*, 283(2), 175-191.
- Tsuneda, S., Saito, K., Mitsuhashi, H., & Sugo, T. (1995). Novel ion-exchange membranes for electrodialysis prepared by radiation-induced graft polymerization. *Journal of The Electrochemical Society*, 142(11), 3659.
- Ventura, A. M., Lahore, H. M. F., Smolko, E. E., & Grasselli, M. (2008). High-speed protein purification by adsorptive cation-exchange hollow-fiber cartridges. *Journal of Membrane Science*, 321(2), 350-355.
- Walsh, G. (2014). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature biotechnology*, 32(10), 992-1000.
- Welsch, N., Lu, Y., Dzubiella, J., & Ballauff, M. (2013). Adsorption of proteins to functional polymeric nanoparticles. *Polymer*, 54(12), 2835-2849.
- Wheatley, J. B., & Schmidt Jr, D. E. (1999). Salt-induced immobilization of affinity ligands onto epoxide-activated supports. *Journal of Chromatography A*, 849(1), 1-12.
- Wolman, F. J., Grasselli, M., & Cascone, O. (2006). Rapid neutral protease purification by dye-affinity membrane chromatography. *Process Biochemistry*, 41(2), 356-361.
- Xia, T., Guan, Y., Yang, M., Xiong, W., Wang, N., Zhao, S., & Guo, C. (2014). Synthesis of polyethylenimine modified Fe₃O₄ nanoparticles with immobilized Cu²⁺ for highly efficient proteins adsorption. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 443, 552-559.
- Xue, J., Wang, C., & Ma, Z. (2007). A facile method to prepare a series of SiO₂@Au core/shell structured nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 105(2-3), 419-425.
- Zhang, S., Marini, D. M., Hwang, W., & Santoso, S. (2002). Design of nanostructured biological materials through self-assembly of peptides and proteins. *Current opinion in chemical biology*, 6(6), 865-871.

-
- Zhu, X., Zhang, L., Fu, A., & Yuan, H. (2016). Efficient purification of lysozyme from egg white by 2-mercapto-5-benzimidazolesulfonic acid modified Fe₃O₄/Au nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 213-217.
- Zou, H., Wu, S., & Shen, J. (2008). Polymer/silica nanocomposites: preparation, characterization, properties, and applications. *Chemical reviews*, 108(9), 3893-3957.