

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS MATRICES CROMATOGRÁFICAS A BASE DE QUITOSANO Y SU APLICACIÓN A LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES

Daniela B. Hirsch (1), María F. Baieli (1), Nicolás Urtasun (1), Juan M. Lazaro Martinez (2), Romina J. Glisoni (1), Federico J. Wolman (1)

(1) Instituto de Nanobiotecnología – NANOBIOTEC (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junín 956 (1113), CABA, Argentina

(2) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Química Orgánica/ Instituto IQIFIB (UBA-CONICET)

daniela.b.hirsch@gmail.com

Uno de los desafíos del *downstream processing* es contar con matrices cromatográficas y procedimientos que posibiliten la purificación de proteínas mediante operaciones sencillas y con una economía favorable, más aún cuando se trata de proteínas de valor medio en el mercado. Siendo la Argentina un país productor de bienes primarios agroindustriales, con la consiguiente generación de subproductos, resulta interesante la posibilidad de aislar a partir de éstos proteínas comercializables para diferentes aplicaciones (industria alimenticia, nutracéutica, cosmética, farmacéutica, etc.). En este sentido, el grupo de trabajo se ha focalizado en el desarrollo de nuevos materiales cromatográficos a partir de quitosano, polímero derivado de la quitina, obtenido de las cáscaras de crustáceos. Dichos materiales, con el formato de mini esferas de entre 0.8 y 1.6 mm de diámetro, pueden ser modificados químicamente para incorporar diferentes ligandos capaces de establecer distintos tipos de interacciones con las proteínas blanco. Siendo la cromatografía de intercambio iónico una de las más utilizadas a nivel industrial, hemos desarrollado matrices cromatográficas de intercambio catiónico a partir de las mini esferas de quitosano. Se reporta aquí, la síntesis y caracterización de las nuevas matrices desarrolladas y su aplicación a la purificación de proteínas, tomando como modelos la lactoferrina –proteína de alto valor comercial presente en suero de queso- y la lisozima –proteína con actividad antimicrobiana obtenida principalmente de clara de huevo y de amplio uso a nivel industrial.

Metodologías:

Las mini esferas se obtuvieron por goteo de una solución al 2% de quitosano de peso molecular medio disuelto en ácido acético al 2% sobre solución de NaOH 2M. Una vez formadas las mini esferas, fueron entrecruzadas utilizando agentes bifuncionales –epiclorhidrina– con concentraciones 0.25 M y posteriormente derivatizadas mediante un segundo tratamiento con el agente bifuncional, pero con una concentración 10 veces mayor a la utilizada para el

entrecruzamiento. Una vez finalizada esta reacción (16 horas 60°C), el ligando dotado de un grupo sulfónico fue acoplado a la matriz. Las mini esferas obtenidas fueron analizadas por RMN de sólidos, análisis elemental y potencial zeta, previa fragmentación a tamaños micrométricos de las mismas. Las capacidades máximas de adsorción de proteínas se estudiaron mediante la realización de isotermas de adsorción y se establecieron las condiciones para la elución de las proteínas unidas a las mini esferas.

Resultados:

Los análisis de ss-RMN evidenciaron las modificaciones realizadas sobre las mini esferas, confirmando la presencia del ligando. Asimismo, al fragmentar la matriz hasta obtener una suspensión de partículas micro/nano métricas y realizar sobre éstas curvas de potencial zeta en función del pH, se revela la naturaleza “zwitteriónica” de las mismas, al poseer cargas netas negativas a valores de pH superiores a 5.7 y positivas por debajo de este valor.

Las capacidades máximas de adsorción por gramo de material cromatográfico, fueron de 80,62 +/- 2,01 mg para lisozima y de 52,58 +/- 5,92 mg para lactoferrina. Las mejores condiciones para la elución de la lisozima fueron utilizando NaCl 1,5 M en buffer de fosfatos pH 7,0 adicionado de propilenglicol al 25% (90.8 % elución) y ácido acético 0,1 M (100% elución). En el caso de la lactoferrina, la mejor condición para su elución fue utilizando NaCl 1M en buffer de acetatos pH 5,0 (93% elución).

Conclusiones:

En el presente trabajo se logró demostrar la posibilidad de generar matrices cromatográficas de intercambio catiónico de naturaleza zwitteriónica a partir de un subproducto industrial, como es el quitosano, mediante reacciones químicas sencillas, con potencial aplicación a la purificación industrial de proteínas. Más aún, dada las dimensiones, densidad y resistencia mecánica de las matrices, las mismas pueden ser utilizadas mediante operaciones sencillas y por consiguiente con bajos costos operativos.

