



Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

“Caracterización de nuevos materiales para su
aplicación en el aislamiento y purificación de
macromoléculas”

Presentada por: Lic. María Emilia Brassesco

Director: Dr. Guillermo A. Picó

Rosario, Argentina.

2019

“Caracterización de nuevos materiales para su aplicación en el aislamiento y purificación de macromoléculas”

Lic. María Emilia Brassesco

Licenciada en Biotecnología, Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Departamento Tecnología, Área Procesos Biotecnológicos, y el Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos (IPROBYQ-CONICET), dependientes de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01/02/2015 y el 01/02/2019, bajo la dirección del Dr. Guillermo A. Picó.

Nombres y firmas del Director y de los integrantes del Jurado de Tesis:

Director: Dr. Guillermo A. Picó.....

Jurado:.....

Jurado:.....

Jurado:.....

Defendida:.....

'Empieza por el principio, y sigue hasta llegar al final: allí te paras'

A mi familia....

Agradecimientos

En todo este tiempo recorrido crecí, crecí mucho, no sólo profesional sino también personalmente y, no tengo duda que, cada cosa vivida, cada etapa superada, cada pequeño fracaso y cada éxito logrado, no hubieran sido posibles sino fuese por todas las hermosas personas que conocí y con las que compartí momentos inolvidables que atesoraré en mi corazón para toda la vida. Por eso en este pequeño texto quiero nombrar y agradecer profundamente a cada uno de ellos.

En primer lugar, a Guillermo, “el Jefe”, por esa gran capacidad de liderazgo, por la cual has sabido manejar a esta pequeña rebelde que te hizo enojar varias veces pero que logró mucho más de lo que se esperaba, todo gracias a vos “Boss”. Te quiero mucho.

A mi familia, a la cual dedico cada una de estas páginas, por la cual soy lo que soy y espero tenerlos siempre apoyándome en todas mis locuras, Abu “Mema”, vos estas siempre acá con nosotros. Mami, Papi, Fede, Lolo y Tía Gaby los amo. Familia Pacher, Ise, Lourdes son mi familia también, los quiero mucho.

En este párrafo voy a agradecer a mis amigas, a las de siempre y a las que el recorrido de la facultad me dejó. Emi, Feni, Marian, Geor, Meli, Pau, Luci, Vale, Ana, Joa y Carli las amo a todas. Son mis locas lindas con las que sé que este donde este y pase lo que me pase puedo hablar, llorar, gritar, reír y cantar. Las de fierro.

Ahora les toca mi atención y mis gracias a ellos, a los que con solo mirarnos ya sabemos lo que pensamos, con los que me siento más yo que nunca, seguramente porque somos todos iguales. Rami, Alcho, Cin, Estefi, Gaby, Juan, Juli, Mati, Juli, Mavi, Nata, Sele y Vale los amo con locura y espero tenerlos conmigo para siempre.

A Gise, Diana, Mauri, Anto, Fiore, Germán, Romi, Pilar, Seba, Nacho, Eze, Caro, Deby, Juli, Coco, Barbi, Pao, Juli, Vicky, Gero, Nati, Joel, Adri, Lari, Esteban con los

que pase grandes momentos y compartimos muchas risas, cervezas, charlas. Gracias por hacer mejores los días de trabajo.

A Lorenzo y Pablo, gallegos más lindos en la vida no pude encontrar. Como te dije una vez Lorenzo: me gusta mucho como soy cuando estoy con Uds. Fue una etapa hermosa. Los quiero mucho y voy a estar agradecida toda la vida.

Ao Artur, Cata, Ale, Vasco, Eli, Gaby, Jana, Helder, Bia, Miguel, Ashok, Isa, Sil, Vi, Arlete, Sabela, Sara, Kiki, muito obrigada por tudo. Fui muito feliz no INL e conheci pessoas 5 estrelas como disse me uma vez meu sabio amigo Artur. Gosto muito de todos.

Anabella, nao tenho palavras para te disser Obrigada. Foste uma das melhores coisas que a viagem deixara me. Espero ser tua amiga sempre. Amo te muito.

A nanu, va un párrafo aparte, por tu generosidad, tu paciencia, tu amistad incondicional. Amiga sabes lo que te amo y sos lo mejor que me llevo de esta etapa. Siempre juntas.

Seguramente me olvido de nombrar a alguien, pero gracias a todos por formar parte de esta etapa de mi vida. Y citando a don sombrero y esta gran historia: “El secreto, querida Alicia, es rodearse de personas que te hagan sonreír el corazón. Es entonces y sólo entonces que estarás en el País de las Maravillas”, puedo decir que en muchos momentos encontré mi País de las Maravillas.

Publicaciones, presentaciones a congresos, becas y subsidios recibidos

Publicaciones en revistas internacionales con referato:

- **M. Emilia Brassesco**, Nadia Voitovich Valetti, Guillermo Picó. (2019) Prediction of breakthrough curves in packed-bed column as tool for lysozyme isolation using a green bed. *Polymer Bulletin*. Pages 1-17. Online ISSN: 1436-2449. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00289-019-02683-5>.
- Pilar Aravena, **M. Emilia Brassesco**, Barbara Bosio, Guillermo Picó, Nadia Voitovich Valetti. (2018) Chemically modified alginate bead matrix for efficient adsorptive recovery of trypsin from fresh bovine pancreas. *Biotechnology Progress*. Volume 34, Issue 5 Pages 1269-1277. ISSN: 1520-6033. DOI: <https://doi.org/10.1002/btpr.2717>.
- **M. Emilia Brassesco**; Nadia Voitovich Valetti; Guillermo A. Picó. (2018) Control of the adsorption properties of alginate - guar gum matrix functionalized with epichlorohydrin through the addition of different flexible chain polymers as toll for the chymotrypsinogen isolation. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier Science Bv. 2017 vol.96 n°. p111 – 117. ISSN: 0141-8130. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.087>.
- **M. Emilia Brassesco**; Nadia Voitovich Valetti; Guillermo Picó. (2017) Molecular mechanism of lysozyme adsorption onto chemically modified alginate guar gum matrix. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier Science Bv. 2017 vol.115 n°. p494 - 500. ISSN: 0141-8130. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.029>.
- Ana C Santos Leite Da Silva; Nadia Voitovich Valetti; **M. Emilia Brassesco**; José A Teixeira; Guillermo Picó. (2016) Adsorption of peroxidase from *Raphanus sativus* L onto alginate-guar gum matrix: Kinetic, equilibrium and thermodynamic analysis. *Adsorption Science & Technology*.: Multi Science Publ Co Ltd. 2016 vol.34 n°6. p388 - 402. ISSN: 0263-6174. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0263617416659287>.
- Nadia Voitovich Valetti; **M. Emilia Brassesco**; Guillermo A. Picó. (2016) Polyelectrolytes-protein complexes: a viable platform in the downstream processes of industrial enzymes at scaling up level. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Londres: John Wiley & Sons Ltd. 2016 vol. ISSN: 0268-2575. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.5050>.

Capítulo de Libro:

- Nadia Voitovich Valetti; **Maria Emilia Brassesco**; Guillermo A. Picó. Applications of Adsorption and Ion Exchange Chromatography in Waste Water Treatment. Millersville PA: Materials Research Forum LLC. 2017. pag.310. isbn 978-1-945291-32-6.

Presentaciones a congresos nacionales e internacionales:

- **M.E. Brassesco**, P. Fuciños, L. Pastrana, G. Picó. Development and characterization biodegradable ion-exchangers based on alginate microparticles for protein purification. Polymar: 2nd Conference for Early Stage Researchers in Polymer Science through the Aegean Sea. October 2018.
- **M.E. Brassesco**, P. Fuciños, L. Pastrana, G. Picó. Desarrollo y caracterización de una matriz de adsorción eficiente basada en micropartículas de alginato para la purificación de proteínas. Presentación Oral. V Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. Agosto 2018. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.
- **Maria Emilia Brassesco**; Nadia Voitovich Valetti; Pablo Fuciños; Lorenzo Pastrana; Guillermo A. Picó. Estudio de la interacción entre el quimotripsinógeno y lecho compuesto por polímeros naturales con elevada capacidad adsorptiva de proteínas. Presentación Oral. XII Simposio Argentino de Polímeros. 2017. Los Cocos, Córdoba, Argentina.
- **Maria Emilia Brassesco**; Nadia Voitovich Valetti; Guillermo A. Picó. Adsorción de Lisozima en columna de lecho empacado formada por matrices poliméricas naturales. Argentina. CABA. 2016. Libro. Resumen. Simposio. IV Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos.
- **M. Emilia Brassesco**, Nadia Voitovich Valetti, Guillermo Picó. “Matrices de polielectrolitos naturales: su potencial aplicación en la bioseparación de enzimas a nivel industrial”. Bioiberoamérica 2016, Salamanca, España.
- N. Voitovich Valetti, **ME Brassesco**, G Picó. “Estudio de la adsorción de quimotripsina sobre una matriz insoluble de alginato y goma guar”. Ciclo de Divulgación de trabajos Científicos 2015. Facultad de Bioquímica y Farmacia (FBIOyF), UNR, Rosario, Santa Fe, Argentina.
- **M. Emilia Brassesco**, Nadia Voitovich Valetti y Guillermo Picó. “Matrices poliméricas biodegradables: su aplicación en al aislamiento de enzimas a nivel industrial”. IX jornada de Ciencia y Tecnología 2015. Secretaría de Ciencia y Tecnología UNR, Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Ana Catarina Santos Leite da Silva, Nadia Voitovich Valetti, **M. Emilia Brassesco**, Jose António Couto Texeira, Guillermo A. Picó. “Caracterización de matrices de polielectrolitos naturales con alta capacidad de adsorber proteínas y su aplicación para recuperar enzimas”. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, junio 2015, Guadalajara, Jalisco, México.

Para la realización de esta tesis se recibieron las siguientes becas de entidades públicas:

- Beca Agencia, FONCyT. Inicio: 1 de febrero de 2015.
- Beca de Finalización, CONICET. Inicio: 1 de abril de 2018.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el marco de los siguientes subsidios:

- Fondo Nacional de Ciencia y Técnica (FonCyT) PICT 2013-271 Proyectos Argentina innovadora 2020. Nuevas matrices poliméricas biodegradables de alta capacidad de adsorción y baja interacción con la biomasa para la purificación de enzimas de importancia biotecnológica
- Fondo Nacional de Ciencia y Técnica (FonCyT) PICT 2015-0083: “Biomasa residual de la industria agrícola local, su potencial aplicación como bioadsorbente de bajo costo y alto rendimiento”. Director G. Picó
- CONICET - Proyectos P-UE BD20160041CO (2017-2021). Director G. Picó. Desarrollo de procesos químicos y biotecnológicos innovadores que agregan valor a subproductos y residuos de la producción agropecuaria.

Estancias en el exterior

- Tareas de Investigación y desarrollo. Lugar: International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL), Braga, Portugal. Tema: “Producción de micropartículas poliméricas”. Fecha: Enero a abril de 2017. Director: Lorenzo Pastrana.
- Tareas de Investigación y desarrollo. Lugar: International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL), Braga, Portugal. Tema: “Caracterización de micropartículas poliméricas para su aplicación como lechos de intercambio iónico”. Fecha: septiembre 2017 a marzo de 2018. Director: Lorenzo Pastrana

Además, durante el período de esta Tesis se llevaron a cabo colaboraciones que dieron lugar a las siguientes publicaciones:

Publicaciones en revistas internacionales con referato:

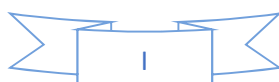
- Paola Camiscia, Enrique D.V. Giordano, **M. Emilia Brassesco**, Pablo Fuciños, Lorenzo Pastrana, M.F. Cerqueira, Guillermo A. Picó, Nadia Voitovich Valetti. (2018) Comparison of soybean hull pre-treatments to obtain cellulose and chemical derivatives: Physical chemistry characterization. *Carbohydrate Polymers. Elsevier Sci Ltd.* ISSN: 0144-8617. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.125>.

Presentaciones a congresos internacionales:

- Caroline Ivanne Le Roy, **M. Emilia Brassesco**, Paula Jáuregui, Guillermo Picó. “Physicochemical characterization of a waste from argentine agriculture: Soybean Hull as potential tool for bioadsorption applied to the downstream processes of enzymes”. Bioiberoamérica 2016, Salamanca, España.
- Nadia Voitovich, **M. Emilia Brassesco**, M. Victoria Maglione, M. Julia Boggione, Beatriz Farruggia and Guillermo Picó. “Production and isolation of catalase and endoglucanase from *Aspergillus niger* by solid fermentation using agricultural wastes”. Total Food 2014 Norwich England.

Índice

Índice.....	I
Abreviaturas, símbolos y palabras tomadas del extranjero.....	VIII
i) Abreviaturas	VIII
ii) Palabras tomadas del extranjero.....	VIII
Resumen.....	X
1. Introducción.....	1
1.1. La bioseparación	1
1.1.1. Metodologías aplicadas para la bioseparación	3
1.2. Adsorción.....	3
1.2.1. Cinética de adsorción.....	6
1.2.2. Isotermas de adsorción	9
1.3. Adsorción en lecho empacado o fijo.....	10
1.4. Producción de partículas de menor tamaño para su empleo en operaciones unitarias.....	15
1.5. Polímeros de Cadena Flexible	18
1.5.1. Los polielectrolitos	19
1.6. Polímeros usados en este trabajo	20
1.6.1. Alginato	20
1.6.1.1. Estructura y fuentes de obtención	20
1.6.1.2. Propiedades y aplicaciones.....	21
1.6.1.3. Hidrogeles de Alginato.....	22
1.6.2. Goma Guar	24
1.6.2.1. Estructura y fuentes de obtención	24
1.6.2.2. Propiedades y aplicaciones.....	25
1.6.3. Poli (vinil pirrolidona) PM 360,000 g/mol.....	25



1.6.3.1.	Estructura y síntesis.....	26
1.6.4.	Poli(vinil alcohol) PM 9,000-10,000 g/mol, 80% hidrolizado.....	26
1.6.5.	Poloxámeros.....	27
1.6.5.1.	Pluronic F68.....	28
1.7.	Proteínas usadas en este trabajo.....	28
1.7.1.	Lisozima.....	28
1.7.2.	Quimotripsinógeno.....	30
2.	Objetivos.....	32
3.	Materiales y Métodos.....	34
3.1.	Reactivos químicos.....	34
3.2.	Preparación de las soluciones de trabajo.....	34
3.2.1.	Proteínas.....	34
3.2.2.	Polímeros.....	35
3.2.3.	Solución de Rojo Congo.....	35
3.2.4.	Soluciones Reguladoras de pH.....	35
3.3.	Preparación de matrices insolubles Alg-GG.....	36
3.4.	Entrecruzamiento de las matrices de Alg-GG.....	36
3.5.	Preparación de matrices insolubles Alg-GG-PCF.....	37
3.6.	Preparación de micropartículas.....	37
3.6.1.	Secado por Pulverización (Spray Drying).....	38
3.6.2.	Gelificación Ionotrópica (Encapsulador).....	39
3.7.	Entrecruzamiento de las micropartículas de Alg, Alg-PVP y Alg-PVA.....	40
3.8.	Metodologías.....	40
3.8.1.	Caracterización de las matrices insolubles de Alg-GG y Alg-GG-PCF... ..	40
3.8.1.1.	Insolubilidad de la matriz obtenida.....	40
3.8.1.2.	Masa de agua retenida por las matrices obtenidas.....	41
3.8.1.3.	Determinación del pHzpc de cada matriz.....	41

3.8.1.4.	Curva de titulación ácido – base	42
3.8.1.5.	Determinación del área de superficie específica	42
3.8.1.6.	Espectroscopía FTIR.....	43
3.8.1.7.	Microscopía electrónica de barrido	44
3.8.2.	Caracterización de las micropartículas de Alg	45
3.8.2.1.	Microscopía electrónica de barrido	45
3.8.2.2.	Microscopía óptica	45
3.8.2.3.	Espectroscopia RAMAN.....	46
3.8.2.4.	Potencial Zeta.....	48
3.8.2.5.	Análisis Térmico	48
3.8.3.	Cuantificación de Lisozima y Quimotripsinógeno.....	52
3.8.3.1.	Absorbancia a 280 nm.....	52
3.9.	Estudio de la adsorción en batch de LZ y QTg sobre matrices poliméricas....	53
3.9.1.	Determinación de las condiciones de adsorción en batch de LZ sobre la matriz Alg-GG.....	53
3.9.2.	Determinación de las condiciones de adsorción de QTg sobre matrices Alg-GG-PCF a partir de diseño estadístico experimental	54
3.9.2.1.	Secuencia de Fibonacci	55
3.9.3.	Determinación de las condiciones de adsorción de QTg sobre micropartículas de Alg-PVP/Alg-PVA a partir de diseño estadístico experimental	55
3.9.4.	Caracterización de la cinéticas del proceso de adsorción.....	56
3.9.5.	Isotermas de adsorción	56
3.9.6.	Determinación de las condiciones de desorción.....	57
3.9.7.	Cinética de la desorción.....	58
3.9.8.	Ciclos de reutilización de la matriz	58
3.10.	Adsorción en lecho empacado: estudio del proceso de captación de LZ sobre la matriz Alg-GG	58
3.11.	Aplicación de los resultados obtenidos	59

3.11.1. Fuente de obtención de LZ	59
3.11.2. Purificación de la enzima	60
3.11.3. Evaluación de la capacidad de las micropartículas de Alg para la recuperación de QTg y LZ en una mezcla de proteínas.....	60
3.12. Manejo de los datos experimentales.....	61
4. Resultados y discusión: Adsorción de Lisozima en matriz de Alginato-Goma Guar	62
4.1. Caracterización de la matriz obtenida.....	62
4.1.1. Insolubilidad	62
4.1.2. Masa de agua retenida por las matrices	63
4.1.3. Espectroscopía FTIR	64
4.2. Estudio de la adsorción en batch de LZ sobre la matriz Alg-GG	65
4.2.1. Determinación de las condiciones de adsorción en batch	65
4.2.2. Caracterización de la cinética del proceso de adsorción	66
4.2.3. Isotermas de adsorción	75
4.2.4. Determinación de las condiciones de desorción.....	79
4.2.5. Reutilización de la matriz.....	81
4.3. Aplicación de los resultados obtenidos.....	82
4.4. Adsorción en lecho empacado: funcionalidad de la columna para el proceso de captación de LZ	83
4.4.1. Efecto de la altura del lecho	83
4.4.2. Efecto del caudal	84
4.4.3. Efecto de la concentración inicial de LZ.....	85
4.5. Modelización matemática de las curvas de rupturas.....	86
4.6. Aplicación de los resultados obtenidos para la purificación de LZ sobre lecho empacado	91
4.7. Discusión final y Conclusiones: Adsorción de Lisozima en matriz de Alginato- Goma Guar.....	96

5. Resultados y discusión: Adsorción de Lisozima y Quimotripsinógeno en matrices de Alginato-Goma Guar y Alginato-Goma Guar-Polímero de cadena flexible.....	100
5.1. Obtención de matrices insolubles empleando polímeros naturales y PCF	100
5.2. Caracterización de las matrices obtenidas	100
5.2.1. Masa de agua retenida (%H ₂ O)	101
5.2.2. Determinación del pH _{zpc}	102
5.2.3. Determinación del número de grupos ácidos titulables presentes en la matriz.....	103
5.2.4. Microscopía electrónica de barrido	104
5.2.5. Determinación del área de superficie específica	105
5.3. Estudio de la adsorción de LZ sobre las matrices Alg-GG/PCF	106
5.3.1. Determinación de la capacidad de adsorción de LZ sobre cada matriz..	106
5.3.2. Cinética de adsorción de LZ en matrices ALG-GG/PCF	107
5.3.3. Isotermas de adsorción de LZ en matrices de Alg-GG/PCF	111
5.3.4. Determinación de las condiciones de desorción.....	116
5.3.5. Cinética de desorción.....	117
5.4. Aplicación de los resultados obtenidos.....	118
5.4.1. Purificación de la enzima	118
5.5. Estudio de la adsorción de QTg sobre las matrices Alg-GG-PCF	120
5.5.1. Optimización de la adsorción de QTg en matrices ALG-GG	120
5.5.1.1. Sucesión de Fibonacci.....	123
5.5.2. Cinética de adsorción del QTg en los lechos de ALG-GG	123
5.5.3. Isotermas de adsorción del QTg en los lechos de ALG-GG	126
5.5.4. Determinación de las condiciones de desorción.....	127
5.5.5. Cinética de desorción.....	129
5.5.6. Reutilización de la matriz.....	129

5.6. Discusión final y Conclusiones: Adsorción de Lisozima y Quimotripsinógeno en matrices de Alginato-Goma Guar y Alginato-Goma Guar-Polímero de cadena flexible	132
6. Resultados y discusión: Adsorción de Lisozima y Quimotripsinógeno en micromatrices de Alginato y Alginato-Polímeros de cadena flexible.....	135
6.1. Caracterización física de micropartículas	135
6.1.1. Morfología, tamaño y carga eléctrica superficial de micropartículas	135
6.1.2. Espectroscopia Raman.....	137
6.1.3. Análisis térmico.....	140
6.2. Estudio de la capacidad de adsorción de las micropartículas	143
6.2.1. Isotermas de adsorción	143
6.2.2. Determinación de las condiciones de desorción.....	145
6.3. Estudio de la adsorción de QTg en matrices de micropartículas de Alg-PVA y Alg-PVP.....	146
6.4. Análisis del tamaño de las micropartículas de Alg, Alg-PVP y Alg-PVA entrecruzadas con dos volúmenes de Epi.	148
6.5. Aplicación de los resultados obtenidos.....	149
6.5.1. Eficiencia de las micropartículas de Alg entrecruzadas con Epi en la recuperación de QTg y LZ en una mezcla de proteínas.....	149
6.5.2. Estudio de la recuperación de QTg en una mezcla de proteínas sobre matrices formadas por micropartículas de Alg, Alg-PVP, Alg-PVA y Alg-PVP-PVA.....	151
6.6. Discusión final y Conclusiones: Adsorción de Quimotripsinógeno y Lisozima en micromatrices de Alg y Alg-Polímero de cadena flexible.....	153

7. Referencias Bibliográficas..... 156

Abreviaturas, símbolos y palabras tomadas del extranjero

i) Abreviaturas

Abs	Absorbancia
Alg	Alginato de sodio
BDST	Tiempo de Servicio de la Altura de un Lecho
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CAT	Catalasa
CCD	Dispositivo de carga acoplada
Cit	Buffer citrato de sodio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Epi	Epiclorhidrina; 1-Cloro-2,3-Epoxipropano
GG	Goma Guar
MTZ	Zona de transferencia de masa
LZ	Lisozima
OVO	Ovoalbúmina
PCF	Polímero de cadena flexible
PE	Polielectrolito
Pi	Buffer fosfato de sodio
Plur68	Pluronic® F68
PVA	Polivinilalcohol o Alcohol Polivinílico
PVP	Polivinilprrolidona
QTg	Quimotripsinógeno
R ²	Coefficiente de determinación
RC	Rojo Congo
SS/Σ	Sumatoria de cuadrados del error
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en medio desnaturalizante

ii) Palabras tomadas del extranjero

Batch	En lote o tanque agitado
-------	--------------------------

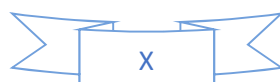
BDST	Del inglés: Bed Depth Service Time model. Tiempo de Servicio de la Altura de un Lecho
Buffer	Solución reguladora del pH
CCD	Del inglés: charge couple device. Dispositivo de carga acoplada
Delivery	Transporte
Plateau	Zona de meseta donde el valor de una variable se mantiene constante
SDS-PAGE	Del inglés: Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
Spray Drying	Secado por pulverización
Spray Dryer	Secador por pulverización

Resumen

En la actualidad, existe una gran necesidad de desarrollar nuevas herramientas y métodos en el área de la bioseparación. Una de las principales demandas de las industrias alimenticia, textil, papelería, cosmética y farmacéutica, es la disposición de grandes cantidades de enzimas y, en algunos casos, con altos grados de pureza, ya que estas presentan ventajas tanto a nivel velocidad y costo de producción, como así también en el rendimiento del proceso y el bajo impacto negativo en el medio ambiente. Así, surge la búsqueda de nuevas técnicas bioseparativas para la obtención de enzimas.

En los últimos años, los procesos de adsorción han sido ampliamente desarrollados para su uso en la recuperación de macromoléculas. Esta técnica hace uso de la capacidad de adsorción de una fase sólida para unir moléculas presentes en una solución. La adsorción puede ser llevada a cabo en tanque agitado, donde el sistema llega a un equilibrio en la concentración de adsorbato tanto en el adsorbente como en la solución; o en columna donde, dependiendo del sentido del flujo de la solución, puede clasificarse como lecho empacado, lecho expandido o fluidizado. El principal problema de esta técnica es que las matrices de adsorción comerciales existentes presentan costos elevados y una vida útil corta, por lo que es deseable diseñar nuevos sistemas rentables y con alta capacidad de adsorción. El uso de polímeros naturales para obtener matrices con capacidad de adsorber proteínas es una excelente opción, ya que son fáciles de preparar, rentables y no contaminantes.

En este trabajo se desarrollaron, en una primera parte, matrices de Alginato y Goma Guar, dos polímeros naturales, a partir de la gelificación de una solución de dichos polisacáridos cuando entra en contacto con una solución de CaCl_2 . Las esferas obtenidas fueron entrecruzadas covalentemente con Epiclorohidrina, con el objetivo de aumentar su estabilidad evitando su disolución. Se caracterizaron morfológica y estructuralmente,



verificando su tamaño promedio de 2 mm, su alta hidrofiliidad o capacidad para retener agua y la reacción exitosa entre los grupos OH del Alginato y los grupos epoxi de la Epiclorohidrina a partir del análisis del espectro de Infrarrojo (FT-IR) de las matrices tratadas químicamente.

Se estudiaron la cinética y las isotermas de adsorción de la Lisozima en la matriz polimérica. La cinética de adsorción siguió un modelo de *pseudo* primer orden, mientras que la isoterma de adsorción en el equilibrio pudo representarse mediante el modelo de Freundlich. La cantidad máxima de Lisozima adsorbida en esta matriz fue de aproximadamente 2,4 mg por g de matriz hidratada a pH 7,0. El mecanismo de adsorción se asoció a un proceso de difusión simple con una interacción Coulombica débil entre la proteína y la matriz. La presencia de NaCl 0,3 M indujo un desplazamiento total de la Lisozima desde la matriz. Bajo esta condición, el porcentaje de proteína desorbida fue del 95%. Se realizaron ciclos sucesivos de adsorción-desorción por lavado y los resultados mostraron la reversibilidad del proceso y la utilidad del método para la purificación y separación de enzimas. También, se estudió la adsorción y desorción de Lisozima en lecho empacado utilizando la matriz Alginato-Goma Guar. Se concluyó que los modelos de Thomas y Tiempo de Servicio de la Altura del Lecho ajustaron correctamente a los datos experimentales de las curvas de rupturas con altos coeficientes de correlación. Se llevó a cabo un último paso para la purificación de Lisozima a partir de clara de huevo como fuente natural, obteniéndose un 75% de rendimiento y un factor de purificación de alrededor de 15 cuando se trabajó en columna de lecho empacado.

En una segunda parte, se abordó la obtención y caracterización de la matriz de Alginato-Goma Guar entrecruzada con Epiclorohidrina en presencia de diferentes polímeros de cadena flexible: alcohol polivinílico, polivinilpirrolidina y Pluronic® F68. Las matrices obtenidas se usaron para la adsorción de Lisozima y Quimotripsinógeno, y

mostraron, para ambas proteínas, una captación creciente en presencia de los polímeros de cadena flexible en el sentido: ninguna < Pluronic® F68 < polivinilpirrolidina < alcohol polivinílico. Se encontró que, en todos los casos, el proceso de adsorción sigue un modelo de cinética de *pseudo* primer orden y no se encuentra influenciado por el tipo de polímero y que el modelo de Freundlich es el más adecuado para el ajuste de los datos experimentales. Se confirmó que, la adición de alcohol polivinílico y polivinilpirrolidina mostraron la mayor capacidad de adsorción para ambas proteínas comparadas frente a la matriz Alginato-Goma Guar. Esto se debe a un incremento en la rigidez del gel causada por la formación de enlaces puente hidrógeno entre los polisacáridos y los polímeros sintéticos. Finalmente, se obtuvo un recupero de 79% y un factor de purificación de 17 veces de Lisozima desde la clara de huevo en un sistema de lecho empacado con la matriz Alginato-Goma Guar-alcohol polivinílico. Esto verificó que la presencia de este polímero provoca cambios estructurales en la matriz que beneficia la adsorción de macromoléculas desde su fuente natural.

Por último, se obtuvieron micropartículas de Alginato mediante secado por pulverización (Spray Drying) y se entrecruzaron químicamente con Epiclorohidrina. Las micropartículas se caracterizaron por su tamaño, morfología superficial (SEM), potencial zeta, análisis térmico (TGA/DSC) y espectroscopia Raman. Las micropartículas resultantes presentaron tamaños promedios de 700 nm y un valor de potencial zeta de -84 mV. La capacidad de adsorción de la matriz se estudió utilizando Lisozima y Quimotripsinógeno como proteínas modelo. Las isotermas de equilibrio fueron descritas por los modelos de Langmuir y Hill, respectivamente. Las capacidades máximas de adsorción para la Lisozima y el Quimotripsinógeno fueron 1880 y 3034 mg/g de micropartículas de Alginato, respectivamente. Finalmente, se estudió la capacidad de selección de las micropartículas de Alginato para ambas proteínas a partir de una mezcla

compleja de proteínas. Luego de un ciclo de adsorción, lavado y desorción, se verificó, por SDS-PAGE, la separación de las proteínas modelos con respecto a las proteínas totales presentes en el sistema.

Introducción

1. Introducción

1.1. La bioseparación

El proceso de bioseparación de proteínas se refiere a la *purificación y concentración* de una proteína a partir de un producto complejo de diversas procedencias como puede ser animal, microbiana o vegetal.

Siguiendo esta definición, las operaciones que comprenden los procesos biotecnológicos a escala comercial se han dividido, tradicionalmente, en:

- Operaciones previas (upstream processing), dentro de las cuales se incluyen los pasos de obtención de la proteína de interés ya sea mediante utilización de biorreactores, fermentadores o a partir de una fuente natural.
- Operaciones posteriores o bioseparaciones (downstream processing), que involucran la recuperación, purificación y concentración de los productos provenientes de la etapa anterior [1].

Con los avances de la ciencia moderna, principalmente en el campo de la biotecnología, la obtención de enzimas y otras proteínas de interés es materia corriente en gran parte de los laboratorios y empresas del mundo. En general, la macromolécula de interés se encuentra diluida en un sistema complejo junto con otras macromoléculas y, en algunos casos, otros componentes celulares. Uno de los principales desafíos con los que se enfrenta la biotecnología moderna es encontrar la capacidad de separar y purificar la macromolécula de interés del resto de componentes no deseados.

En los últimos años, la bioseparación ha adquirido mayor importancia debido a la creciente necesidad de disponer de grandes cantidades de proteínas con diversos grados de pureza dependiendo del uso final que se le vaya a dar. Sin embargo, muchos de los métodos de separación conocidos permiten obtener proteínas con un grado de pureza aceptable a escala de laboratorio, pero son muy difíciles de aplicar a nivel de macroescala.

En la actualidad, existe un creciente interés de las empresas en desarrollar procesos escalables y eficientes que permitan llevar rápidamente al mercado productos nuevos y económicos [2, 3]. Es importante destacar que el costo final del proceso de bioseparación es tan significativo como su eficiencia, ya que el mismo puede llegar a representar hasta el 80% del costo total de obtención del producto [4].

Durante las etapas de separación se pueden explotar las diferencias en las propiedades químicas, estructurales y funcionales entre la proteína de interés y otras proteínas en la mezcla en bruto. Estas propiedades incluyen el tamaño, forma, punto isoeléctrico, distribución de carga eléctrica, hidrofobicidad, solubilidad, densidad, afinidad de unión a ligando, metal de unión, asociación reversible, modificaciones post-traduccionales y las secuencias o estructuras específicas. Mediante la explotación de estas variaciones en las propiedades físicas y químicas entre las proteínas, varias metodologías pueden ser aplicadas para diseñar un esquema de purificación viable [5]. Dentro de este campo, el objetivo a lograr es el mayor grado de pureza posible con el menor número de operaciones unitarias. La disminución del número de pasos es crítica ya que en cada etapa de purificación aplicada se pierde parte de la proteína de interés y, además, para proteínas inestables la disminución del tiempo total del proceso es muy importante para mantener su estructura y actividad catalítica en el caso de enzimas [6].

Otro aspecto para tener en cuenta en cualquier proceso de bioseparación a macroescala, es el efecto que tenga el proceso sobre el medio ambiente. Una metodología que utilice productos tóxicos o contaminantes no podrá ser aplicada aun cuando rinda buenos resultados en cuanto a la purificación.

En resumen, un proceso bioseparativo eficaz será aquel que alcance un buen rendimiento y purificación, con el menor número de operaciones unitarias, que lleve el menor tiempo posible, menor costo y que tenga mínimo impacto sobre la estructura y

actividad biológica de la proteína de interés y el medio ambiente [7]. Estas variables no pueden ser maximizadas todas al mismo tiempo de manera que, dependiendo del objetivo final que se le vaya a dar a la proteína, será la variable más importante a tener en cuenta.

1.1.1. Metodologías aplicadas para la bioseparación

Existen diversas metodologías disponibles para realizar bioseparación de proteínas. Algunas de ellas, como la precipitación con sales de amonio [8] y las técnicas cromatográficas: de afinidad [9], filtración en gel [8], entre otras, no pueden ser aplicadas a gran escala debido al costo, a la gran cantidad de reactivos necesaria, al equipamiento que se requiere y a la gran cantidad de desechos que generan. Sin embargo, existen algunas técnicas que sí permiten su aplicación en macroescala. Entre ellas podemos nombrar [10]: la filtración con membranas, extracción líquido-líquido [11], precipitación usando polielectrolitos [12, 13] y adsorción [14-16]. Estas metodologías son sencillas, requieren equipamientos simples y, en la mayoría de los casos, no utilizan grandes cantidades de reactivos. El grado de purificación y rendimiento alcanzado con las mismas por separado es bajo (variando entre 40-80% para el rendimiento y entre 1-6 para el factor de purificación), pero en combinación pueden dar muy buenos resultados.

1.2. Adsorción

La adsorción es una de las operaciones unitarias más utilizadas para la etapa de concentración y purificación de macromoléculas a partir de homogenados de tejidos animales y vegetales o a partir de caldos de cultivo.

En el proceso de adsorción pueden distinguirse dos protagonistas principales: el adsorbente y el adsorbato. Según las características que posean cada uno de estos componentes se podrán obtener distintas características para el proceso de adsorción. La Fig. 1.1 presenta un esquema simplificado del proceso de adsorción.

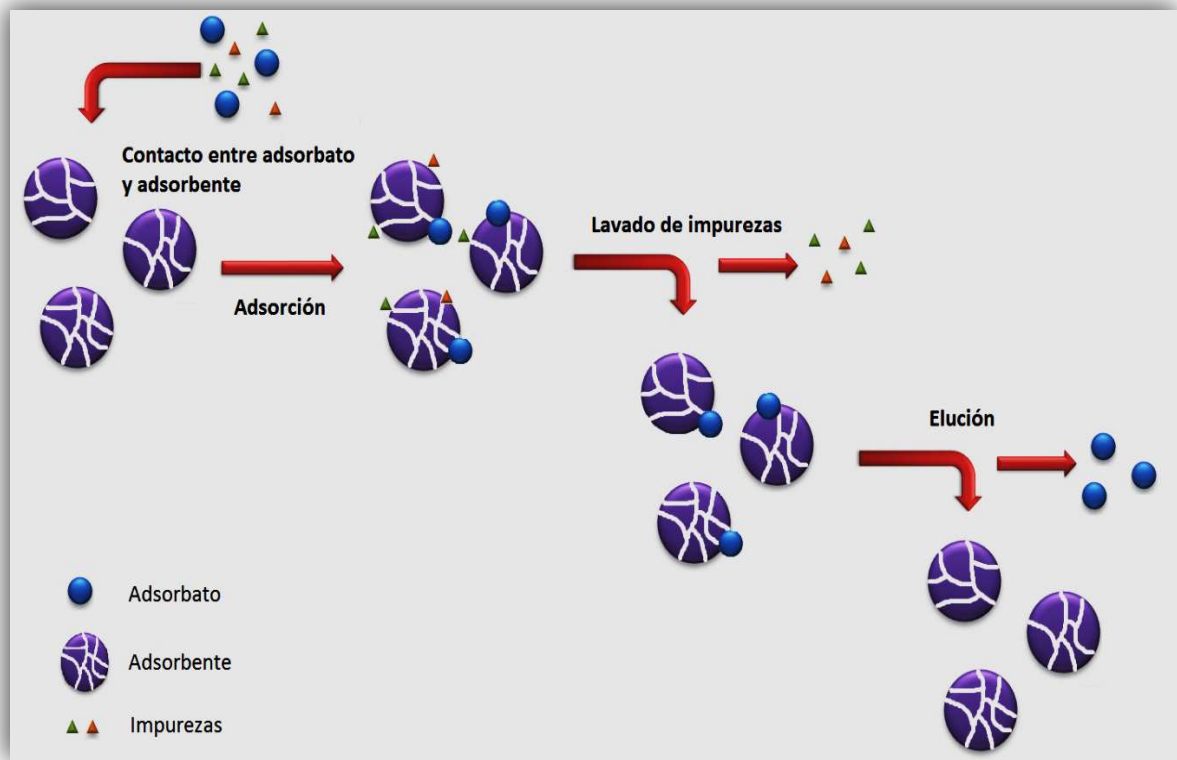


Figura 1.1: Esquema simplificado del proceso de adsorción.

Pueden distinguirse cuatro etapas fundamentales en el proceso de adsorción: una primera etapa de contacto entre adsorbato y adsorbente seguida de la adsorción propiamente dicha. Luego, una etapa de lavado para eliminar impurezas y material adsorbido inespecíficamente y, por último, una etapa de elución para recuperar el adsorbato en fase líquida. Una quinta etapa, que no siempre es posible pero que tiene una gran importancia desde el punto de vista económico y de disminución de desechos, es la regeneración de la matriz adsorbente para ser utilizada en un nuevo ciclo de adsorción.

La adsorción sobre sólidos puede clasificarse en: adsorción física (fisisorción) y adsorción química (quimisorción), aunque no hay una clara división entre las mismas. El proceso de adsorción física es un fenómeno de superficie en el cual las moléculas de soluto (adsorbato) se concentran en una superficie sólida (adsorbente) debido a fuerzas intermoleculares entre el adsorbato y el adsorbente. Las fuerzas intermoleculares implicadas en general son del tipo de Van der Waals, electrostáticas o interacciones hidrofóbicas, debido a la naturaleza de estas fuerzas, el fenómeno de adsorción es fácilmente reversible. En la quimisorción se produce una reacción química en la superficie del adsorbente y, el adsorbato se mantiene unido a través de enlaces químicos relativamente fuertes. Otra característica importante es que la adsorción física no es específica mientras que la quimisorción es similar a las reacciones químicas ordinarias en cuanto a su elevada especificidad [17].

La adsorción de proteínas puede realizarse trabajando en tanque agitado o batch, en lecho empacado o fijo, en lecho expandido y en lecho fluidizado. Dependiendo del tipo de sistema con el que se trabaje serán los parámetros de interés a determinar.

Los estudios de adsorción en disolución mediante experiencias en batch proporcionan una medida de la eficacia de adsorción en la purificación de macromoléculas, así como la capacidad máxima de adsorción. Tales experimentos consisten en colocar una cantidad determinada de adsorbente en contacto con la solución que contiene la macromolécula que se quiere aislar, manteniéndola en suspensión mediante agitación el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción. En estos casos, la caracterización del sistema tiene que ser abordada desde dos puntos de vista: la cinética de adsorción y el estudio de la adsorción en el equilibrio, es decir, la obtención de las isothermas de adsorción.

1.2.1. Cinética de adsorción

La cinética describe la velocidad de adsorción del adsorbato en el adsorbente y determina el tiempo en que se alcanza el equilibrio. La velocidad a la cual la adsorción tiene lugar es de fundamental importancia cuando se diseñan sistemas de adsorción en batch [18]. La transferencia de un soluto desde el seno de una solución hasta la superficie de una partícula sólida porosa puede ser descrita por los siguientes pasos, los cuales son mostrados en la figura 1.2 [19]:

- Etapa 1: difusión del adsorbato a través de la capa límite seguida de la adsorción en la superficie externa del adsorbente.
- Etapa 2: difusión intra-partícula, es decir, la difusión del adsorbato a través del interior de los poros del adsorbente.
- Etapa 3: reacción de superficie, que es la fijación del adsorbato en la superficie interna del adsorbente.

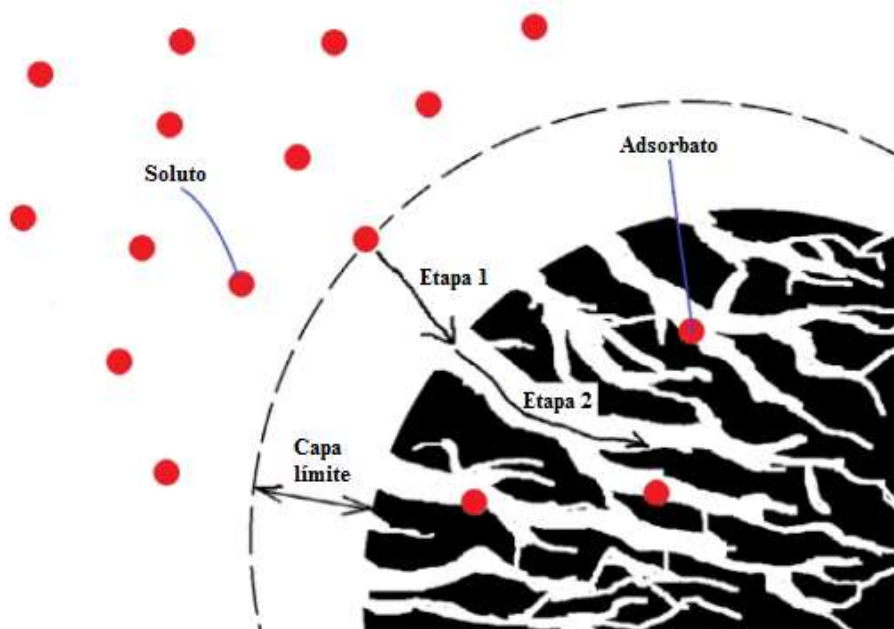


Figura 1.2: Adsorción de una molécula de adsorbato en la superficie interna de una matriz adsorbente porosa. Etapa 1: difusión a través de la capa límite, y etapa 2: difusión a través de los poros.

Existen diferentes modelos cinéticos para el ajuste de los datos experimentales, los mismos se detallan en la tabla 1.I.

Tabla 1.I: Modelos cinéticos aplicados al proceso de adsorción en batch.

Modelo cinético	Ecuación	Parámetros
Pseudo-primer orden [20]	Forma no lineal: $q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t})$ (1) Forma lineal: $\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t$ (2)	q_t (mg/g)=cantidad de adsorbato adsorbida a un tiempo t q_e (mg/g)= máxima capacidad de adsorción del adsorbente en esa condición k_1 (min ⁻¹)= Constante de velocidad de pseudo-primer orden t (min)= tiempo
Pseudo-segundo orden [21]	Forma no lineal: $q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t}$ (3) Forma lineal: $\frac{t}{q_t} = \left(\frac{1}{k_2 q_e^2} \right) + \frac{t}{q_e}$ (4)	q_t , q_e y t poseen el mismo significado que en el modelo de pseudo-primer orden k_2 (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)= constante de velocidad del modelo $k_2 \cdot q_e^2$ = velocidad inicial de adsorción
Weber-Morris [18]	$q_t = K_{id} t^{0,5} + C$ (5)	K_{id} (mg.g ⁻¹ .min ^{-0,5})= coeficiente de difusión interna C constante relacionada con el efecto de la capa límite, dando una idea del espesor de la misma

El modelo de *pseudo*-primer orden asume que la etapa limitante del proceso de adsorción será la transferencia de masa desde el seno de la solución hacia la superficie del adsorbente [22]. El de *pseudo*-segundo orden plantea al proceso de adsorción como una reacción química en la cual la etapa limitante de la velocidad es la interacción del adsorbente y el adsorbato ya sea mediante formación de enlaces covalentes o mediante interacción iónica [23]. El modelo de Weber y Morris, por su parte, ayuda a identificar el mecanismo de difusión, con el propósito de conocer el mecanismo molecular involucrado en el proceso de adsorción. Este modelo considera que el paso limitante de la velocidad

en los sistemas que ajustan a dicha ecuación es la difusión intra-partícula de las moléculas de adsorbato en el adsorbente [23]. Generalmente los gráficos que se obtienen muestran multilinealidad durante todo el período de adsorción y proporcionan un mejor ajuste si no se fuerza a la gráfica lineal a pasar a través del origen. La multilinealidad indica múltiples mecanismos que controlan o limitan la velocidad del proceso de adsorción. Cada segmento lineal representa un mecanismo de control o varios mecanismos de control simultáneos.

Cuando se observa la linealidad de las gráficas q_t vs $t^{0.5}$, se pueden encontrar tres situaciones:

- La ordenada de la gráfica q_t vs $t^{0.5}$ es igual a cero, es decir, la gráfica lineal pasa por el origen ($C=0$). Significa que la cinética de adsorción se rige por la difusión intra-partícula o por la reacción superficial. La influencia de otros procesos es despreciable [24].
- La ordenada de la gráfica q_t vs $t^{0.5}$ tiene un valor positivo ($C>0$). Se puede asumir nuevamente que la difusión intra-partícula o la reacción superficial gobierna las cinéticas de adsorción en la región lineal. Sin embargo, uno de estos mecanismos está precedido por un proceso cinético muy rápido que es responsable del rápido incremento observado en la región inicial de la isoterma cinética. Cuanto mayor sea el valor de C , mayor será la resistencia a la difusión a través de la película de líquido.
- La ordenada de la gráfica q_t vs $t^{0.5}$ tiene un valor negativo ($C<0$). Tal comportamiento podría explicarse asumiendo que hay otro proceso que influye en la cinética de adsorción, pudiendo deberse al cambio de la concentración de adsorbato cerca de la superficie de adsorción. Esto generaría un efecto combinado del control de la velocidad por difusión a través de la capa límite y por la reacción en la superficie del adsorbente [25].

1.2.2. Isotermas de adsorción

Las isotermas de adsorción representan gráficamente la capacidad de adsorción (Q) en función de la concentración de adsorbato en la fase líquida, en el equilibrio y a temperatura constante [26]. La obtención y evaluación de las isotermas de adsorción es importante ya que permiten evaluar la capacidad de adsorción de un determinado sistema, bajo distintas condiciones. Además, existen diversos modelos matemáticos de isotermas que permiten ajustar los datos experimentales y obtener parámetros que, dependiendo del modelo utilizado, permiten describir el tipo de adsorción y obtener los parámetros termodinámicos del proceso.

Existen diferentes modelos matemáticos para las isotermas de adsorción, cada uno basado en consideraciones, supuestos y aproximaciones diferentes [27]. En la tabla 1.II se representan algunos de los modelos más utilizados.

Tabla 1.II: Modelos de isotermas más utilizados para la adsorción en el equilibrio.

Modelo	Ecuación	Parámetros
Langmuir	$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (6)$	C_e concentración de equilibrio de adsorbato (mg/L), q_e cantidad de adsorbato adsorbida por gramo de adsorbente en el equilibrio (mg/g), q_m capacidad máxima de la monocapa (mg/g) y K_L constante de Langmuir (L/mg).
Freundlich	$q_e = K_f C_e^{\frac{1}{n}} \quad (7)$	q_e y C_e mismo significado que en modelo de Langmuir, K_f constante de Freundlich ($\text{mg}^{1-\frac{1}{n}} \text{L}^{\frac{1}{n}} \text{g}^{-1}$) y n intensidad de la adsorción.
Hill	$q_e = \frac{q_m C_e^n}{K_H + C_e^n} \quad (8)$	q_m máxima capacidad de adsorción del adsorbente (mg/L), K_H constante de Hill y n coeficiente de cooperatividad de Hill para la interacción.

Los modelos de Langmuir y Freundlich son los más frecuentemente utilizados para el modelado de los datos experimentales debido a su simplicidad y facilidad de

interpretación [26]. En el corriente trabajo se llevaron a cabo dichos ajustes además del modelo de Hill.

El modelo de Langmuir describe cuantitativamente la formación de una monocapa de adsorbato sobre la superficie externa del adsorbente.

La aplicación de este modelo se basa en las siguientes hipótesis [28]:

- Sólo se adsorbe una monocapa de adsorbato
- La adsorción tiene lugar en sitios específicos y los mismos son homogéneos
- Una vez que un sitio está ocupado, no hay más adsorción en el mismo
- La energía de la adsorción es constante y no depende del número de sitios ocupados
- No hay interacción entre las moléculas adsorbidas en sitios vecinos.

El modelo de Freundlich, por otra parte, es empírico y se utiliza para describir la adsorción en multicapas, con interacción entre las moléculas adsorbidas. El modelo supone que los sitios más fuertes se ocupan primero y que la fuerza de la interacción disminuye a medida que los sitios son ocupados [26].

Finalmente, el modelo de Hill describe la adsorción competitiva no ideal [29]. El mismo fue desarrollado para explicar la unión del O_2 a la hemoglobina pero luego fue aplicado a diferentes sistemas [30]. El modelo asume a la adsorción como un fenómeno cooperativo donde la unión del ligando en un sitio del adsorbente puede influenciar a los demás sitios de unión en el mismo.

1.3. Adsorción en lecho empacado o fijo

En los últimos años, la adsorción en columnas de lecho empacado se ha convertido en una técnica popular debido a su simplicidad, a la disponibilidad de una amplia gama de adsorbentes, y porque se ha demostrado que es un proceso eficaz y atractivo para la

recuperación de proteínas desde diferentes tipos de biomasa [31]. La aplicación de esta operación continua para la recuperación de proteínas a gran escala permite tratar grandes volúmenes de efluente en un período más corto de tiempo. Este proceso puede escalarse fácilmente de laboratorio a planta piloto, es fácil de monitorear y operar, y, es efectivo para la adsorción/desorción cíclica, ya que depende del gradiente de concentración como fuerza motriz para la adsorción.

Los estudios de adsorción en una columna de lecho fijo, a diferencia de los experimentos en batch, no funcionan bajo condiciones de equilibrio debido a que continuamente ingresa a la columna una disolución de alimentación, donde se establece un proceso de transferencia de masa permanente entre una fase móvil que contiene el adsorbato y la fase sólida del lecho adsorbente. En la figura 1.3 se muestra el esquema de una columna empacada con un material adsorbente en contacto con un líquido que contiene un soluto (adsorbato) de concentración C_0 . Inicialmente la parte inferior del adsorbente remueve rápidamente el soluto, así que el fluido que sale de la columna está prácticamente libre de adsorbato. Durante el proceso, a medida que la solución entra en contacto con el adsorbente, cada una de sus partículas va acumulando adsorbato hasta alcanzar la saturación. Éste tiene lugar en una zona del lecho conocida como zona de adsorción o de transferencia de masa (MTZ). Esta región separa la zona virgen del adsorbente de la zona de saturación y es donde ocurre la mayor parte del cambio de concentración. Cuando la MTZ sale de la columna, el lecho está completamente saturado y la concentración a la salida (C) es la misma de la entrada (C_0) [32].

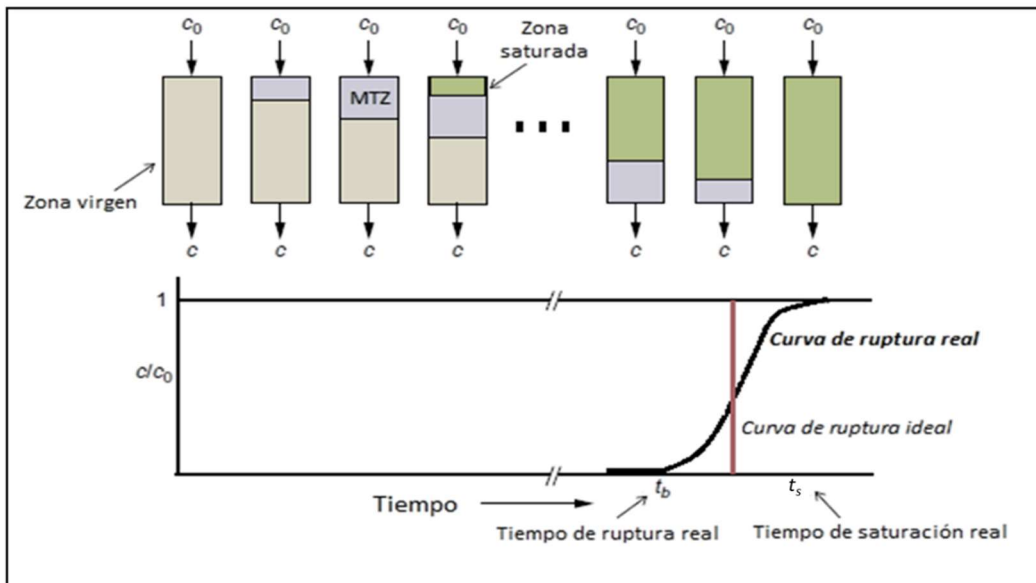


Figura 1.3: Curva de ruptura típica mostrando el movimiento de la zona de transferencia de masa (MTZ).

La forma que presenta la curva de ruptura ayuda a identificar el mecanismo limitante de la velocidad del proceso de adsorción. En el caso ideal, la MTZ es infinitamente estrecha y la curva de ruptura presenta una línea vertical entre el punto de ruptura y el punto de saturación. En la práctica, debido a la existencia de resistencias a dicha transferencia de materia, la curva presenta una forma sigmoidea y la disminución de la pendiente (curva sigmoidea más “aplanada”) indica que la MTZ se extiende a través de una gran parte de la columna y es propensa a ampliarse a medida que progresa la operación debido a que los mecanismos de difusión empiezan a controlar el proceso. Antes de que la adsorción en sí tenga lugar, aparecen las siguientes etapas de transferencia de materia:

-*Transferencia de materia entre partículas:* se refiere a la difusión y mezcla del adsorbato en el fluido que ocupa los espacios entre las partículas y puede tener lugar a lo largo de la dirección del flujo (*dispersión axial*) y en la dirección perpendicular (*dispersión radial*). Generalmente en un lecho fijo la dispersión radial se ignora, ya que

el diámetro del lecho es lo suficientemente superior al diámetro de la partícula (varios órdenes de magnitud mayor).

-Transferencia de materia en la interfase: se trata de la transferencia en la película líquida del fluido que rodea a la partícula de sólido. La fuerza impulsora de esta etapa es el gradiente de concentración en la interfase y suele ser el paso limitante del proceso de adsorción en muchos casos.

-Transferencia de materia en la partícula: consiste en la difusión del adsorbato en el sólido (en la superficie y en los poros del mismo).

La cantidad de soluto adsorbido por gramo de adsorbente en el punto de ruptura, q_b (mg. g⁻¹) puede obtenerse a partir de la siguiente ecuación:

$$q_b = \frac{C_0 Q}{m} \int_0^{t_b} \left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right) dt \quad (9)$$

Donde C_0 es la concentración inicial o de entrada a la columna (mg/mL), Q_v es el flujo volumétrico (mL/min) y m es la masa de adsorbente [33]. El tiempo de ruptura, t_b (min), en este caso, fue definido como el tiempo en el que la concentración del efluente de la columna alcanza cierta concentración límite, que generalmente representa el 5% de la concentración del afluente. En otras palabras, t_b , es el tiempo en el que la relación C/C_0 vale 0,05.

El tiempo de saturación, t_s (min), es el tiempo en que la columna deja de ser eficiente. Pueden adoptarse diferentes criterios, en este caso fue cuando la relación C/C_0 es 0,95.

El criterio más importante en el diseño de una columna de adsorción es la predicción de la curva de ruptura o la forma del frente de onda de adsorción, lo cual determina la longitud del lecho, la vida útil y su tiempo de regeneración. Puede analizarse el efecto de varias condiciones experimentales: la concentración de alimentación (C_0), el flujo volumétrico (Q_v) y la altura del lecho (Z), sobre la capacidad de adsorción en columna, manteniendo la temperatura y pH constantes, y estudiarse, a partir de las

gráficas obtenidas, el comportamiento de la proteína en el sistema en cuestión. De igual manera, los resultados obtenidos se pueden comparar con varios modelos de predicción del tiempo de servicio de la columna. Algunos de estos modelos se discuten a continuación:

Tabla 1.III: Modelos matemáticos que permiten describir las curvas de ruptura.

Modelo	Ecuación	Parámetros
Thomas [34, 35]	$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{k_{TH}q_s m}{Q_V} - k_{TH}C_0 t\right)} \quad (10)$	k_{TH} constante de velocidad del modelo de Thomas (mL/(mg.min)), q_s concentración máxima en fase sólida del soluto (mg/g), m (g) masa del adsorbente
Yoon-Nelson [36, 37]	$\frac{C_0}{C} = \frac{1}{1 + (\exp(k_{YN}(t_{0.5} - t)))} \quad (11)$	k_{YN} constante de velocidad del modelo Yoon-Nelson (1/min), $t_{0.5}$ tiempo requerido para retener el 50% del adsorbato inicial (min)
Dosis Respuesta Modificado [38, 39]	$\frac{C}{C_0} = 1 - \frac{1}{1 + (C_0 Q_V t / q_s m)^{a_{mdr}}} \quad (12)$	a_{mdr} constante de modelo de dosis-respuesta modificado, q_s concentración máxima en fase sólida del soluto (mg/g), m (g) masa del adsorbente.
Tiempo de Servicio de la Altura de un Lecho (BDST) [40]	<p>Forma no lineal:</p> $\ln\left(\frac{C_0}{C} - 1\right) = \ln\left[\exp\left(k_{BA}N_0 \frac{Z}{U}\right) - 1\right] - k_{BA}C_0 t \quad (13)$ <p>Forma lineal:</p> $t = a Z + b \quad (14)$ <p>Dónde,</p> $a = \frac{N_0}{C_0 U} \quad (15)$ <p>Y,</p> $b = \frac{1}{k C_0} \ln\left(\frac{C_0}{C} - 1\right) \quad (16)$	k_{BA} constante de velocidad de adsorción de la columna (mL/min.mg), Z es la longitud del lecho (cm), N_0 capacidad de adsorción del lecho (mg/mL) y U velocidad de flujo lineal de la alimentación al lecho (cm/min).

- *Modelo de Thomas:* es uno de los modelos de adsorción más general y ampliamente utilizado para describir curvas de ruptura. Este modelo asume la cinética de Langmuir de adsorción-desorción, no tiene en cuenta la dispersión axial, y se deriva de la suposición de que la adsorción es la fuerza impulsora de la velocidad [39, 41].

- *Modelo de Yoon-Nelson:* asume que la velocidad con la que disminuye la probabilidad de adsorción para cada molécula de adsorbato es proporcional a la

probabilidad de adsorción del adsorbato y a la probabilidad de que no se adsorba sobre el adsorbente. [39].

- *Modelo Dosis Respuesta Modificado:* Este modelo, que ha sido comúnmente utilizado en farmacología para describir cómo reacciona un sistema ante un determinado estímulo, es empleado en la actualidad para describir los procesos de biosorción en columna [42, 43].

- *Modelo del tiempo de servicio de la altura de un lecho (BDST) [44].* Este modelo supone que la difusión intra-partícula y la resistencia de masa externa son insignificantes y que la cinética de adsorción está controlada por la reacción superficial entre el soluto en la disolución y el adsorbente que no ha sido usado [44]. La capacidad dinámica del lecho N_0 puede evaluarse a partir de la pendiente de la gráfica (a) y la constante de velocidad de adsorción, K puede calcularse a partir de la ordenada al origen (b). También se puede determinar la altura del lecho (Z_0) ajustando $t = 0$, por lo que la ecuación (13) se reduce a:

$$Z_0 = \frac{U}{kN_0} \ln\left(\frac{C_0}{C} - 1\right) \quad (17)$$

1.4. Producción de partículas de menor tamaño para su empleo en operaciones unitarias

En los últimos años, el control tanto de la morfología como del tamaño de las partículas ha comenzado a recibir mayor atención entre la comunidad científica. El cambio de formas ha provocado propiedades químicas y físicas sin precedentes [45]. Los esfuerzos hacia la funcionalización, formulación y producción de la morfología se han centrado en hacerlos aplicables en la industria [46]. Se han propuesto muchos métodos alternativos para realizar la producción de partículas con una morfología controlable: molienda mecánica, precipitación, liofilización, secado por congelación, secado por aspersion, pirólisis, fluido supercrítico, métodos basados en emulsión y una combinación

simple de síntesis de procesos químicos. El tamaño de partícula controlable dentro del rango deseado también es posible bajo condiciones específicas. Debemos tener en cuenta las diferentes escalas determinadas respecto al tamaño de las partículas: nanoescala (10 nm), ensambles moleculares de mesoescala (100 nm), microescala (1000 nm) y macroescala. El tamaño más pequeño de partícula determina tanto una mayor resistencia mecánica como un área superficial más grande, lo que lleva a un mayor número de moléculas en las interfaces de partículas y representa una ventaja con respecto a partículas de mayor tamaño. Otros factores importantes que pueden influir en la elección del tamaño de partícula y la morfología incluyen la complejidad técnica del proceso de fabricación, la economía de la producción y la escalabilidad del proceso [47]. En este sentido, ya se han desarrollado partículas a escala micro a partir de polímeros naturales, los cuales son económicos, biodegradables, fáciles de manipular y escalar, como es el caso del Alginato [48]. Los términos específicos utilizados para describir el tamaño de partícula y la morfología de los hidrogeles de alginato [49] se describen en la Figura 1.4:

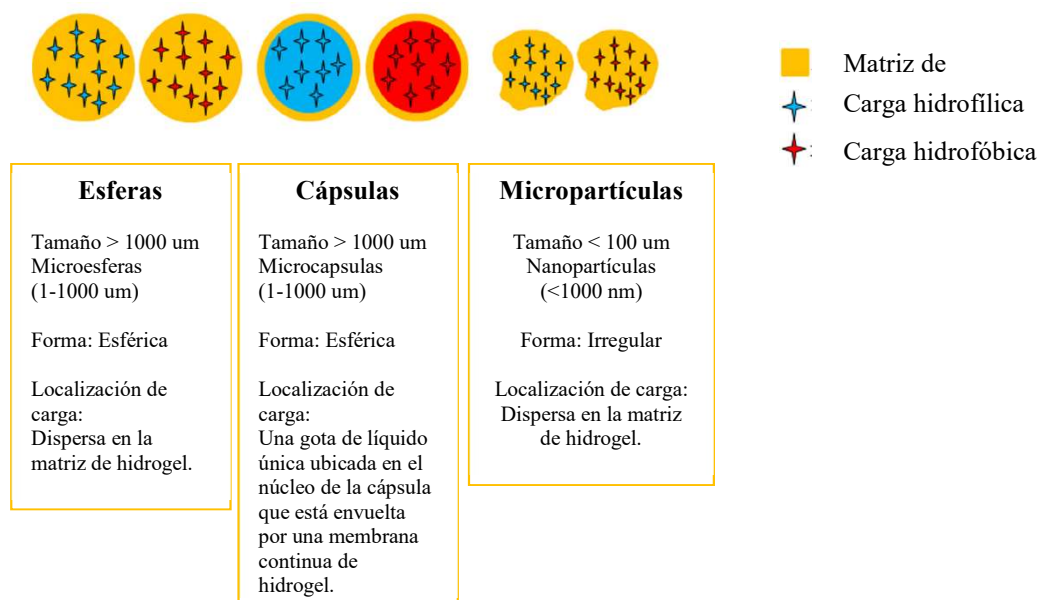


Figura 1.4: Diseños de partículas de hidrogeles de alginato y sus características.

Técnicas como la pulverización por aire a través de una punta vibratoria (Spray Dryer) [50] o la gelificación ionotrópica [51] son comúnmente utilizadas para la obtención de las nano y micro partículas de hidrogeles de Alginato. La técnica de secado por pulverización se ha vuelto un método atractivo a nivel industrial debido a su alta productividad. De acuerdo con la literatura, el principio de este método es producir partículas de tamaño pequeño mediante atomización y eliminación de solventes [52]. Generalmente, la ruptura de la gota se produce en condiciones turbulentas lo que genera una amplia distribución de tamaño de las partículas formadas y lo hace útil en aplicaciones que no requieren un control estricto sobre la distribución de tamaños, por ejemplo, el desarrollo de biosorbentes.

En general, el tamaño de gota generado por el atomizador es principalmente proporcional al caudal de líquido, la tensión superficial, la densidad y la viscosidad de la solución. La clave para el éxito de la conversión de gota a partícula utilizando este método es optimizar las condiciones del proceso, como son el caudal de aire, la presión y la temperatura [47]. El proceso de calentamiento debe controlarse a una temperatura específica para asegurarse de que el solvente se elimine completamente de la gota. Debido a que una sola gota produce una partícula, el tamaño de la gota y la cantidad de disolvente en ella son relativos al diámetro final de la partícula sintetizada. En resumen, es posible controlar el diámetro exterior de la partícula, cambiando el tamaño de la gota [53] y ajustando la concentración inicial de la solución.

Además, el control de menores tamaños de partícula es la mejor solución para superar los problemas asociados con el uso de materiales caros. Un material nanométrico puede obtener el área de superficie máxima de un material porque el valor de la porción interna de la partícula se pierde relativamente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que al disminuir demasiado el tamaño pueden perderse características importantes del

material, como así también pueden ser difíciles de manejar en una producción a mayor escala [54, 55]. Por esto, muchas veces, las micropartículas porosas tienen más utilidad que las nanopartículas para aplicaciones industriales debido a sus procesos rentables de reutilización y reciclaje.

Por todo esto, podemos decir que, los tipos de materiales y sus concentraciones iniciales, la selección de las condiciones del proceso y la adición de materiales de apoyo juegan un papel importante en la producción de partículas con diversos tamaños y morfologías, los cuales pueden ser utilizados exitosamente en la bioseparación por sorción de macromoléculas.

1.5. Polímeros de Cadena Flexible

Los polímeros son macromoléculas formadas por la repetición de unidades estructurales, denominadas monómeros, unidas entre ellas mediante enlaces covalentes hasta alcanzar un peso molecular desde 5 a 500 kDa [56].

Los polímeros de cadena flexible (PCF) constituyen un grupo amplio de sustancias que poseen diversos grupos funcionales. Su principal característica, que permite agruparlos dentro de este grupo, es la presencia de enlaces simples entre sus átomos lo que les da la posibilidad de rotar libremente alrededor del esqueleto de la molécula y adoptar diversas conformaciones. Esta particularidad permite que adquieran una estructura del tipo random coil en solución [57].

No hay una clasificación universal de los PCF por lo que pueden clasificarse en base a cualquiera de las siguientes categorías [58]:

- la estructura de polímero (lineal, de cadena ramificada);
- el tipo de polimerización (suma, polímeros de condensación);
- biodegradabilidad.

Sin embargo, la mayoría de los autores coinciden en que los PCF se pueden agrupar en tres grandes grupos según la fuente de obtención:

- Naturales;
- Semi-sintéticos:
- Sintéticos.

Los PCF provenientes de la síntesis industrial no son degradables, por lo tanto, no se pueden descartar en el medio ambiente; algunos son tóxicos y otros no lo son, como por ejemplo los polietilenglicoles. La mayoría de los polímeros provenientes de fuentes naturales son polisacáridos biodegradables y no tóxicos. No se encuentran en la naturaleza como se emplean, sino que derivan de un tratamiento químico que los modifica haciendo que sean solubles en un medio acuoso. Por lo antes expuesto, los PCF naturales han adquirido mayor importancia biotecnológica en los últimos tiempos.

Dentro de esta clasificación, además, los PCF pueden ser divididos en dos categorías, dependiendo del tipo de grupos funcionales presentes en la molécula: los que poseen grupos ionizables que les dan carga eléctrica o polielectrolitos (PE) y los que poseen sustituyentes sin carga eléctrica.

1.5.1. Los polielectrolitos

Los PE son macromoléculas que poseen un número relativamente grande de grupos funcionales que se encuentran cargados eléctricamente o, en determinadas condiciones, adquieren carga eléctrica [59]. Pueden ser tanto policationes, polianiones o polianfolitos, ya que la carga neta de los mismos depende de los grupos funcionales que poseen, los cuales pueden estar cargados negativa o positivamente [60].

Pueden ser sintéticos o naturales pero cuando la estructura secundaria es ausente en los segundos, no hay diferencias de comportamiento entre ellos [61]. La importancia de esta diferenciación, en este caso, se debe a que el desarrollo de métodos que utilicen PE

naturales y no contaminantes es central a esta investigación. Ejemplos de PE sintéticos son: ácidos poliacrílicos y metaacrílicos, poliestireno, polivinilsulfonatos y las diferentes clases de Eudragit®. Dentro de los naturales podemos nombrar el chitosan, el carragenano (Carr), el alginato (Alg), la carboximetilcelulosa, entre otros.

1.6. Polímeros usados en este trabajo

1.6.1. Alginato

1.6.1.1. Estructura y fuentes de obtención

Los alginatos (Alg) son polímeros de abundancia en la naturaleza y se encuentran principalmente como componentes estructurales en las algas pardas marinas (donde puede llegar a representar el 40% de su peso seco) y como polisacáridos en las cápsulas de las bacterias del suelo [62, 63].

Se trata de una familia de copolímeros lineales compuestos por bloques de ácido β -D-Manúronico (M) y α -L-gulurónico unidos por enlaces (1,4). Los bloques pueden estar compuestos de residuos G consecutivos, residuos M consecutivos o residuos M y G alternados (Figura 1.5). Dependiendo la fuente de la cual se extrae el Alg el mismo posee diferente contenido de M y G como así también posee diferencias en el largo de los bloques [64].

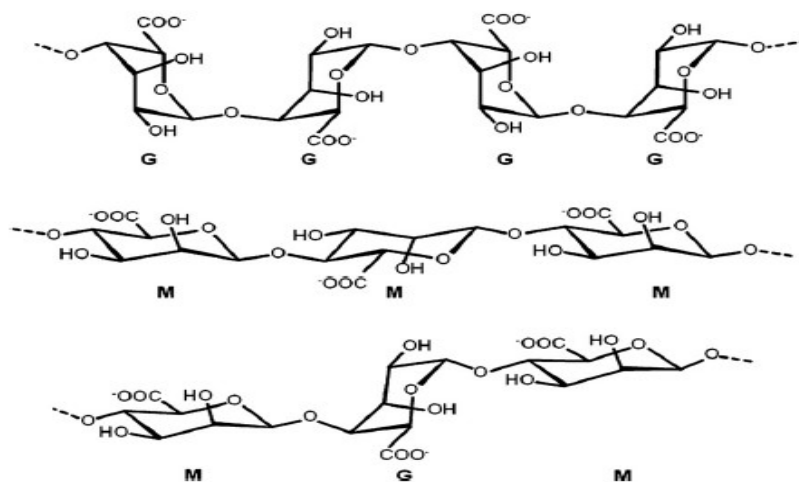


Figura 1.5: Estructura química del bloque G, bloque M y bloque alternado en el Alg.

El peso molecular de los Alg varía entre 32,000 y 400,000 g/mol. Si bien su solubilidad en agua se verá afectada por la fuerza iónica del medio, que ejercerá un efecto importante especialmente en la extensión de la cadena del polímero y en su viscosidad [65], el factor que afecta principalmente a la solubilidad del mismo es el pH del solvente, que determinará la presencia o no de cargas en los residuos que lo componen. Las constantes de disociación de los monómeros de los ácidos manurónicos y gulurónicos son de 3,38 y 3,65 respectivamente. Por lo tanto, los Alg tienden a estar cargados negativamente en un amplio rango de pH [66].

1.6.1.2. Propiedades y aplicaciones

El Alg es soluble en agua a pH mayores a 3,50, y cuando el pH disminuye por debajo de 3,0 forma hidrogeles debido a la protonación de los grupos carboxilo [64]. También posee la capacidad de formar geles en presencia de cationes divalentes como el Ca^{2+} , que puede coordinarse con dos cadenas simultáneamente en un proceso de gelificación ionotrópica o entrecruzamiento iónico. Esta capacidad de los Alg de hidratarse en agua dando lugar a soluciones viscosas, dispersiones o geles permite utilizarlos como espesantes, estabilizantes, gelificantes y formadores de películas. También se ha encontrado que son muy útiles para la bioseparación de proteínas, estando en su forma gelificada [16] o en solución [66-68]. Además, tienen múltiples aplicaciones en la remoción de contaminantes del agua [69].

La industria alimentaria hace ampliamente uso de los Alg, ya que son polímeros comestibles que prácticamente carecen de sabor. Se utilizan por ejemplo para obtener piezas de fruta para su uso en repostería, o incluso piezas con forma definida como aros de cebolla o guindas. También se emplean en la fabricación de aceitunas rellenas de anchoa o de pimienta.

Asimismo, son utilizados en la industria farmacéutica para el delivery de drogas [70-72]. Son bien tolerados en contacto con la piel, refrescantes y lubricantes. Además, se incorporan en jabones y cremas de afeitar como suavizantes y estabilizantes de la espuma. Otros usos de los Alg son en soldaduras, vendajes bioactivos, moldes dentales, dispensadores de herbicidas, entre otros [73-75].

Por último, este polímero posee las ventajas de estar ampliamente disponible, ser biodegradable y no tóxico.

1.6.1.3. Hidrogeles de Alginato

La propiedad más importante que presenta el Alg es su capacidad para formar geles por reacción con cationes divalentes. Las esferas de Alg se pueden obtener mediante entrecruzamiento iónico, a partir del goteo de una solución de Alg de sodio en una solución de cationes divalentes, tales como Ca^{2+} . Este método puede tener lugar en condiciones suaves, por lo que es ideal para el atrapamiento de materiales sensibles. La gelificación de Alg se produce por intercambio de iones sodio de los ácidos gulurónico (G) bloqueados por los cationes multivalentes, y el apilamiento de estos bloques G para formar una estructura característica "egg-box" (Figura 1.6) [76].

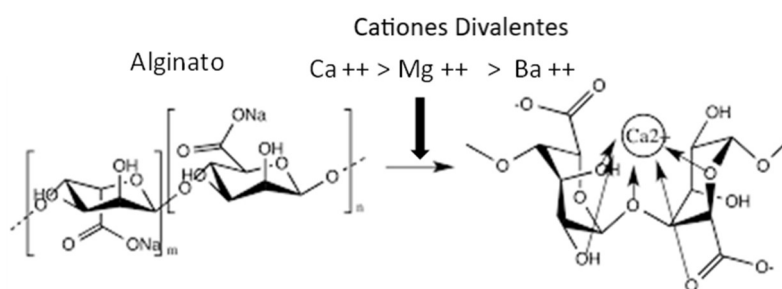


Figura 1.6: Representación gráfica de la gelificación de Alg.

Cada cadena puede estar vinculada con muchas otras cadenas, dando como resultado la formación de una red de gel tridimensional. Estos geles pueden tener un contenido de agua superior al 95% y pueden ser tratados con calor sin ser fundidos.

Diversos cationes muestran diferente afinidad por el Alg, donde el calcio se utiliza con más frecuencia para la gelificación del mismo, pero no forma los lazos más fuertes con Alg. Los cationes monovalentes y los iones Mg^{2+} no dan lugar a la formación de una red de gel tridimensional. La gelificación de soluciones de Alg con cationes puede ocurrir a través de la gelificación externa, la gelificación interna y la gelificación tras el enfriamiento. Para la gelificación externa, el Alg se gotea a menudo en un baño que contiene cationes, tales como una solución de cloruro de calcio. Los cationes se difunden desde la fase continua en el interior de las gotitas de Alg, y forman una matriz de Alg gelificado, la migración es desde el exterior hacia el centro de la gotita de Alg. Este método también se conoce como "método de difusión". La gelificación interna, "ajuste interno" o "gelificación in situ", hace uso de una sal de calcio insoluble en agua, como $CaCO_3$, que se mezcla con la solución de Alg. Los iones de calcio son liberados posteriormente desde el interior de la fase de Alg mediante la reducción del pH del sistema y/o aumentando la solubilidad de la fuente de calcio, resultando en la formación de un gel de Alg. El intervalo de pH de trabajo de la matriz es limitado y cuando el calcio se pierde por la matriz, el complejo Alg-calcio se destruye, siendo el Alg soluble. Por último, a través de un tratamiento químico de los polielectrolitos por unión covalente entre un reactivo y grupos químicos del polisacárido, se obtiene una matriz no soluble en cualquier pH independientemente de la presencia de Ca^{2+} .

Una de las desventajas de trabajar con los geles detallados anteriormente es que, si se modifican las condiciones del medio, los mismos pueden disolverse. Para sortear este problema, puede llevarse a cabo un entrecruzamiento de los mismos con algún reactivo químico como glutaraldehído o epíclorhidrina (1-Cloro-2,3-epoxipropano; Epi), de forma tal que se formen interacciones covalentes entre las moléculas de polímero (Figura 1.7)

[77]. De esta forma la matriz será estable en ausencia de los iones que formaron el complejo, o frente a variaciones de pH o fuerza iónica.

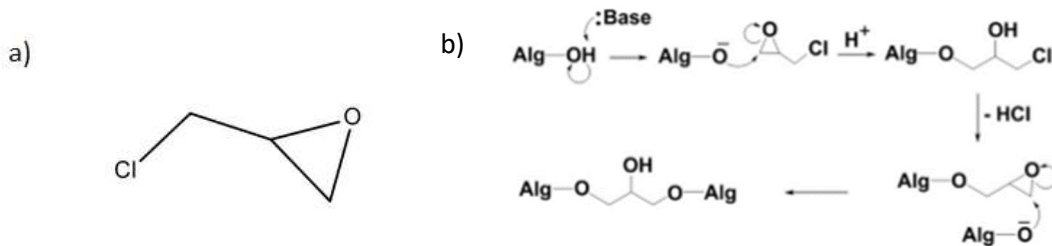


Figura 1.7: a) Estructura de la Epi, b) Entrecruzamiento de Alg tratado con Epi.

La matriz esférica así obtenida es permeable a pequeñas moléculas y macromoléculas y pueden interactuar con ella por diferencia en su carga eléctrica. Por lo tanto, esta matriz puede actuar como un adsorbente de intercambio iónico de diferentes moléculas. Sin embargo, las matrices de Alg tienen una capacidad limitada, que depende en parte de su porosidad y la distancia entre las cadenas poliméricas.

1.6.2. Goma Guar

1.6.2.1. Estructura y fuentes de obtención

La goma guar (GG), también conocida como goma Cyamopsis, es un polímero natural obtenido a partir del endosperma de la semilla de la planta de guar (*Cyamopsis tetragonaloba*).

Está compuesta por cadenas largas y rectas de unidades de α -D-manopiranosido unidas mediante enlace glicosídico β -D-(1-4). Unidos a lo largo de la cadena, hacia ambos lados, se encuentran unidades de α -D-Galactopiranososa (Figura 1.8). El peso molecular de la GG es difícil de estimar, pero se puede decir que se encuentra en el rango de 200-300 KDa. [78].

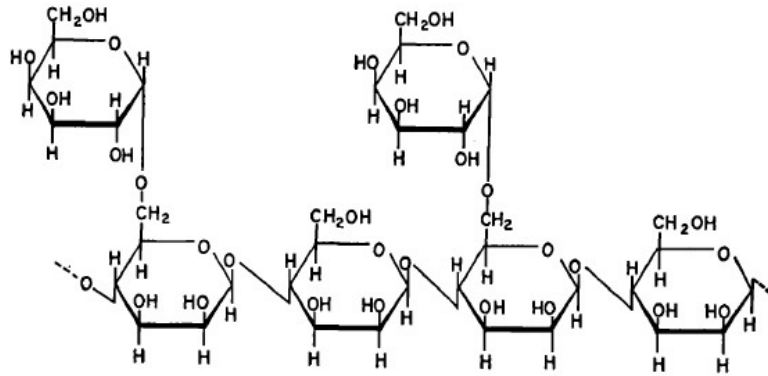


Figura 1.8: Estructura de la GG.

1.6.2.2. Propiedades y aplicaciones

La GG es soluble en agua dando soluciones de elevada viscosidad y estabilidad. Además, posee la capacidad de formar geles en presencia de borato de sodio o Ca^{2+} . Los grupos hidroxilo de los residuos de manopiranosido pueden ser modificados fácilmente, mediante esterificaciones, carboxilaciones, etc, por lo que esta goma es altamente versátil y útil en una gran variedad de aplicaciones industriales [79, 80].

Es no tóxica y biodegradable. Es utilizada como estabilizante y espesante en diversos productos alimenticios, en cosmética, en pastas dentífricas y cremas de afeitar, en la industria de la cerámica como agente fijador y espesante, en la preparación de matrices para adsorción de enzimas y en la industria farmacéutica para el delivery de drogas y como aglutinante en la manufactura de comprimidos [78, 80-82].

1.6.3. Poli (vinil pirrolidona) PM 360,000 g/mol

La N-vinil-2-pirrolidona (N-VP) es un monómero hidrofílico y no iónico, cuya polimerización es fácilmente iniciada a través de radicales térmicos o fotoquímico. La polivinil pirrolidona (PVP) es un polímero sintético de la vinilpirrolidinona, que actúa como un surfactante no-iónico. Es higroscópico, amorfo, suministrado como polvo blanco de flujo libre con olor característico débil en solución acuosa. Tiene también

potenciales aplicaciones en Biomedicina. La razón principal del éxito en la aplicación de PVP es su excelente biocompatibilidad con tejidos vivos y su citotoxicidad extremadamente baja [83]. Una de las principales propiedades del PVP es formar hidrogeles tridimensionales con la capacidad de absorber altas cantidades de agua [84]. Estos hidrogeles poliméricos biocompatibles han sido utilizados para sistemas de liberación controlada. Muchos trabajos han llevado a cabo reacciones de injerto de N-VP sobre sílice [85], película de polipropileno [86] o de gelatina [87].

1.6.3.1. Estructura y síntesis

La PVP es un polímero vinílico que se obtiene a partir del monómero vinilpirrolidona, por polimerización vinílica por radicales libres, como se muestra en la Figura 1.9.

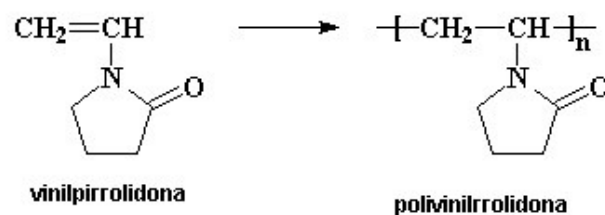


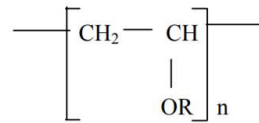
Figura 1.9: Estructura química del PVP obtenida a partir del monómero N-VP.

1.6.4. Poli(vinil alcohol) PM 9,000-10,000 g/mol, 80% hidrolizado

El alcohol polivinílico (PVA) es un polvo granular inodoro y sin sabor, translúcido, blanco o crema. Es utilizado como barrera contra la humedad para tabletas de suplementos alimenticios y para alimentos secos.

El PVA es obtenido por la polimerización del acetato de vinilo seguido de una hidrólisis parcial, la cual se basa en la sustitución parcial del grupo éster en el acetato de vinilo por el grupo hidroxilo y es completada por la adición gradual de hidróxido de sodio acuoso (agente saponificante). Por último, se precipita, se lava y se seca. El grado de hidrólisis es determinado por el momento en el que se detiene la reacción de

saponificación [88]. La estructura del PVA (parcialmente hidrolizado) se muestra en la figura 1.10.



Donde R = H o COCH₃

Figura 1.10: Estructura química del PVA parcialmente hidrolizado.

Es un polímero biocompatible soluble en agua. El PVA tiene varias propiedades útiles, incluyendo su no toxicidad, biocompatibilidad, alta hidrofobicidad, capacidad de formar fibras/películas, y la resistencia química y mecánica [89].

1.6.5. Poloxámeros

Los términos poloxámero, polietileno-propileno glicol o nombres comerciales como Supronic®, Pluronic® o Tetronic® se han introducido en 1950 para nombrar al tribloque no-iónico representado en la figura 1.11. Desde entonces son muy famosos por ser utilizados en diversas aplicaciones farmacéuticas.

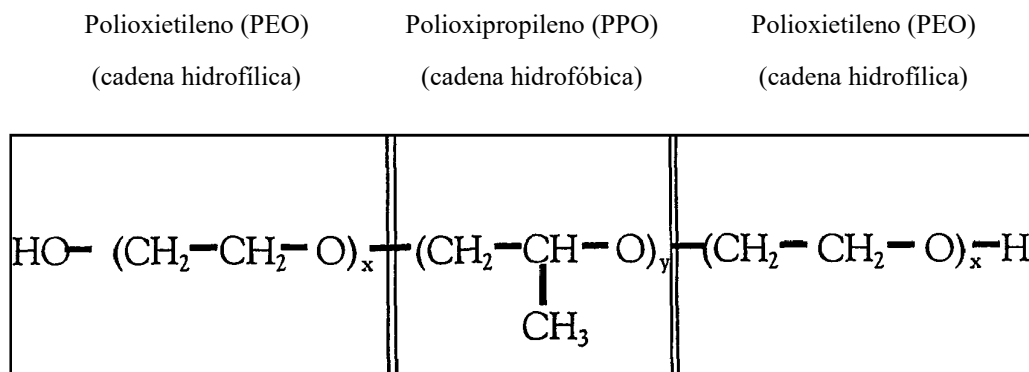


Figura 1.11: Estructura general del Pluronic.

La longitud variable de los bloques x e y dan lugar a diferentes polímeros identificados como 124, 188, 237, 338 y 407 que muestran una ligera diferencia en sus propiedades. Se encuentran disponibles en diferentes grados, pudiendo variar de líquidos a sólidos. Son

incorporados en sistemas de administración de fármacos vía oral, parenteral o tópica y se utilizan como solubilizadores, emulsionantes y estabilizantes. No son tóxicos ni irritantes y, por lo tanto, también son usados como agentes humectantes en ungüentos, bases de supositorios y geles [90, 91].

La representación común del poloxámero se indica como "P" seguido por tres dígitos donde los dos primeros dígitos se multiplican por 100 para obtener la masa molecular del óxido de propileno hidrofóbico y el último dígito debe ser multiplicado por diez para obtener el contenido de óxido de etileno hidrofílico en porcentaje. El nombre común utilizado es Pluronic y la representación del copolímero denota su aspecto físico (L-Liquid, P-Paste y F-Flake). La codificación del nombre comercial es dada como poli para Pluronic, seguido de una sola letra representando la forma física y luego por dos dígitos [91].

1.6.5.1. Pluronic F68

Es un surfactante no iónico con frecuencia utilizado en la industria farmacéutica debido a su compatibilidad con fármacos y excipientes. Se presenta en forma sólida, contiene entre 75-85 unidades de PEO y 25-40 unidades de PPO y su masa molecular promedio es de aproximadamente 7,680-9,510 g/mol.

1.7. Proteínas usadas en este trabajo

1.7.1. Lisozima

La Lisozima (LZ) es una enzima universal que posee la capacidad de lisar ciertas bacterias por hidrólisis de la unión β entre el ácido murámico y la N-acetilglucosamina de mucopolisacáridos en la pared celular bacteriana. También tiene la capacidad para inactivar ciertos virus ácidos mediante la formación de un complejo insoluble con los mismos.

La LZ está presente en la secreción mucosa, tales como saliva y lágrimas. Sin embargo, una de las principales fuentes de LZ para uso industrial, es la clara de huevo de gallina, donde el 3,5% del total de las proteínas presentes corresponde a dicha enzima.

Es una cadena polipeptídica única de 129 aminoácidos entrecruzada por cuatro puentes disulfuro. Es una proteína pequeña cuyo peso molecular es 14.307 Da y presenta un pI de 11,35. En la figura 1.12 se representa la estructura tridimensional de la LZ.



Figura 1.12: Estructura tridimensional de la LZ

Esta enzima tiene un enorme potencial en aplicaciones clínicas, para el tratamiento de úlceras, infecciones, heridas y como potenciador de algunos antibióticos. También se ha sugerido su uso para disminuir las temperaturas de esterilización requeridas en el envasado de alimentos y para la autoesterilización de enzimas inmovilizadas en columnas por co- inmovilización de la LZ. También se ha demostrado que puede tener efectos específicos sobre los polisacáridos de membranas de células de mamífero normales y transformadas, teniendo, en consecuencia, un papel importante tanto en la protección de las membranas, como siendo mediador clave de las funciones antitumorales de los macrófagos [92].

1.7.2. Quimotripsinógeno

El α -quimotripsinógeno A de páncreas bovino (QTg) es el precursor inactivo de una de las principales serin proteasas de los sistemas digestivos de los mamíferos y otros animales, la quimotripsina (QT). El peso molecular del QTg es 25,6 kDa (secuencia de aminoácidos) y su pI es de 8,97. El zimógeno conteniendo 5 puentes disulfuros se transforma por un proceso de proteólisis parcial, en la proteína activa QT. El QTg debe ser inactivo hasta llegar al tracto digestivo, para prevenir daños en el páncreas y otros órganos. La activación ocurre en dos pasos: en el primero de ellos la tripsina, otra serin proteasa presente en el páncreas, corta el enlace entre los AA 15 y 16. El péptido amino terminal permanece unido a la molécula mediante un enlace disulfuro entre los AA 1 y 122. El producto así generado se denomina π -QT. En el segundo paso de la activación la π -QT autocatalíticamente rompe el enlace entre los residuos 145 y 146 y elimina los residuos 14 y 15 para dar lugar a la proteína activa: α -QT, una proteína tripeptídica interconectada por 5 puentes disulfuro intra e intercatenarios [93] (Figura 1.13).

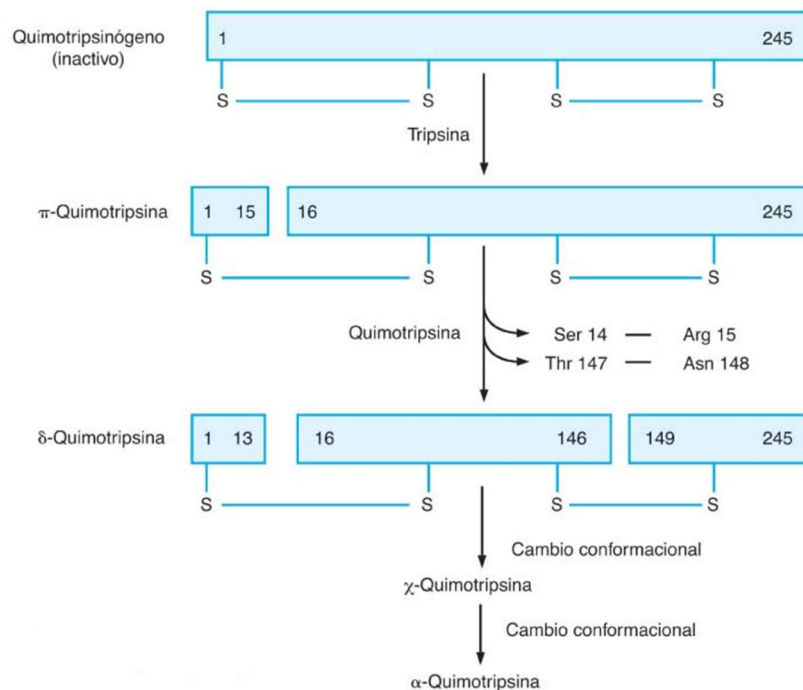


Figura 1.13: Activación de la QT a partir de la proteólisis del QTg.

En el sistema digestivo la QT facilita la hidrólisis de los enlaces peptídicos por reacciones hidrolíticas. Los principales sustratos de la enzima son los AA aromáticos y la metionina que son hidrolizados en el carboxilo terminal. Es importante destacar que la reacción catalizada por la QT es termodinámicamente favorable pero no ocurre en ausencia de un catalizador.

Sus principales usos son en la industria agroalimentaria, formulaciones infantiles y en el tratamiento de cueros. Además, es utilizada en investigación básica como enzima modelo y en la secuenciación de proteínas [94].

Objetivos

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de Tesis es obtener matrices biodegradables que puedan ser utilizadas en procesos de adsorción para la recuperación de moléculas de interés biotecnológico directamente desde la biomasa y que además presenten baja interacción con esta.

El mismo se logrará a partir de los siguientes objetivos parciales:

- *Obtener y caracterizar matrices insolubles empleando polímeros naturales y sintéticos:* Se estudiará la capacidad de los PE seleccionados para ser transformados en matrices no solubles que retengan intactos y activos sus grupos prototrópicos. Se evaluará qué metodología permite la mayor estabilidad mecánica, capacidad de adsorción, reutilización de la matriz y la menor capacidad de interaccionar con la biomasa.

- *Estudiar la Interacción Matriz-Enzima:* se caracterizará termodinámica y cinéticamente el proceso de adsorción/desorción de las proteínas propuestas sobre la matriz polimérica a través de la construcción de isothermas de adsorción y curvas de adsorción y elución de las enzimas sobre la matriz. Se estudiará el efecto que tienen sobre dicho proceso: composición relativa de polímeros en la matriz, composición de polímero de cadena flexible, pH, fuerza iónica, tiempos de incubación, presencia de cosolutos, etc.

Para analizar el funcionalismo de los lechos se estudiará la interacción de una serie de proteínas modelos, como la Lisozima y el Quimotripsinógeno, entre otras, todas elegidas por su importancia en Biotecnología.

- *Aplicar la información obtenida al desarrollo de una estrategia de purificación de las proteínas seleccionadas:* se plantea sistematizar y analizar la información proveniente de los resultados obtenidos a través de la concreción de los objetivos específicos anteriores, con el fin de lograr un diseño racional de las condiciones óptimas

para el aislamiento y la purificación de las enzimas seleccionadas desde la biomasa donde se encuentra.

Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1. Reactivos químicos

- **Proteínas:** Lisozima de clara de huevo (LZ), α -Quimotripsinógeno A de páncreas bovino (QTg), Catalasa de hígado bovino (CAT), Ovoalbumina (OVO) y Albumina sérica bovina (BSA). Adquiridas en Sigma-Aldrich.
- **Polímeros:** Alginato de sodio - Protanal CR 8133 (Alg), adquirido en FMC BioPolymer en forma de polvo y utilizado sin purificación previa. Goma Guar (GG), Pluronic® F-68 (Plur68), Polivinilpirrolidona (PVP) y Polivinilalcohol (PVA). Todos adquiridos en Sigma-Aldrich en forma de polvo y utilizados sin purificación previa.
- **Otros:** Epiclorohidrina (Epi), adquirida en Sigma-Aldrich.
- El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

3.2. Preparación de las soluciones de trabajo

3.2.1. Proteínas

- **LZ:** Se preparó por pesada directa de la droga sólida (10 mg) y posterior disolución en 1 ml de H₂O destilada. Fue almacenada a -20°C y previo a su utilización se verificó que no presentara turbidez ni partículas en suspensión.
- **QTg:** Se preparó por pesada directa de la droga sólida (10 mg) y posterior disolución en 1 ml de HCl 1mM. Fue almacenada a -20°C y previo a su utilización se verificó que no presentara turbidez ni partículas en suspensión.
- **CAT:** Se preparó por pesada directa de la droga sólida (30 mg) y posterior disolución en 1 ml de fosfato de potasio (KPi) 50 mM, pH 7. Fue almacenada a 6°C y previo a su utilización se verificó que no presentara turbidez ni partículas en suspensión.

- **BSA:** Se preparó por pesada directa de la droga sólida (30mg) y posterior disolución en 1 ml de H₂O destilada. Fue almacenada a -20°C y previo a su utilización se verificó que no presentara turbidez ni partículas en suspensión.
- **OVO:** Se preparó por pesada directa de la droga sólida (30mg) y posterior disolución en 1 ml de H₂O destilada. Fue almacenada a -20°C y previo a su utilización se verificó que no presentara turbidez ni partículas en suspensión.

3.2.2. Polímeros

Todos los polímeros utilizados durante este trabajo (Alg, GG, Plur68, PVP y PVA) son solubles en agua. Para la preparación de las soluciones de dichos polímeros, se pesó una cantidad adecuada de la droga sólida y se disolvió en H₂O destilada. Se prepararon soluciones madre de las siguientes concentraciones: Alg 2,0 %P/V, GG 0,5 %P/V, Plur68 1,0 %P/V, PVP 1,0 %P/V y PVA 1,0 %P/V. Para el trabajo experimental se utilizaron diluciones de dichas preparaciones.

3.2.3. Solución de Rojo Congo

Se preparó una solución madre (10 mg/ml) de rojo congo (RC; PM: 696,66 g/mol - Anedra) en dimetilsulfóxido (DMSO) y las soluciones experimentales de concentraciones de RC deseadas fueron obtenidas por diluciones sucesivas de dicha solución madre. La concentración de RC en la solución experimental se determinó a partir de una curva de calibración, que fue realizada midiendo la absorbancia de diferentes concentraciones de soluciones de RC en $\lambda_{\text{máx}}$ 497 nm utilizando un espectrofotómetro Paralwall 3100-UV-Visible.

3.2.4. Soluciones Reguladoras de pH

Durante el trabajo experimental se utilizaron distintos tipos de buffer según la zona de pH en la que se necesitaba la regulación. Las soluciones buffer fosfato (Pi) y citrato de sodio (Cit) fueron preparadas a partir de fosfato de sodio o fosfato de potasio,

según corresponda y citrato de sodio. El pH de las soluciones fue ajustado utilizando HCl o NaOH según correspondiera en cada caso.

3.3. Preparación de matrices insolubles Alg-GG

Para la obtención de las matrices utilizadas en este trabajo se preparó, en primer lugar, una solución 0,5% P/V de GG en agua destilada y una vez alcanzada la disolución se agregó Alg hasta alcanzar diferentes concentraciones finales: 0,6 % P/V o 1,0 % P/V. La mezcla se dejó 24 hs para alcanzar una homogenización total.

Posteriormente, se procedió al goteo de la solución de polímeros en una solución de CaCl₂ 0,1 M, con agitación constante a 120 rpm en agitador orbital. Para el goteo se utilizó una jeringa de 100 mL con una aguja de 0,8 mm de diámetro, obteniéndose esferas fácilmente visibles. Una vez finalizado el goteo, las matrices formadas se dejaron en agitación durante 24 hs, para luego ser entrecruzadas. Se separaron matrices sin entrecruzar, control, que se almacenaron en CaCl₂ 6,0 mM.

3.4. Entrecruzamiento de las matrices de Alg-GG

Para llevar a cabo el entrecruzamiento se realizó una adaptación del protocolo Roy et al. [82] 5,0 g de esferas de Alg-GG fueron transferidos a 25 ml de etanol absoluto conteniendo CaCl₂ 100 mM y se incubó por 30 min a 45 °C. Una vez finalizada la incubación se agregó Epi en un volumen adecuado (1,5 o 3,0 ml, según el lecho a entrecruzar) en alícuotas pequeñas y con agitación constante. Luego de 10 min se agregaron 3,2 y 6,4 mL de NaOH 5 N, para cada volumen de Epi (1,5 o 3,0 mL), y se dejó que transcurra la reacción incubando a 30°C con agitación constante durante 24 hs. Finalmente, se finalizó la reacción mediante el agregado de ácido acético hasta que el pH del sistema llegara a 7,0.

La matriz así obtenida fue lavada exhaustivamente con una mezcla 3:1 de etanol (70%)/H₂O destilada, seguido por 1 lavado con etanol (70%) y finalmente 3 lavados con

H₂O destilada. Este protocolo de lavado es importante ya que permite eliminar cualquier resto de reactivo o polímero sin reaccionar que haya quedado en el medio. Finalmente, la matriz obtenida fue re-suspendida en 50 ml de buffer de trabajo y mantenida a 6°C hasta su uso. Previo a su utilización se verificó la integridad de las esferas.

3.5. Preparación de matrices insolubles Alg-GG-PCF

Para la obtención de estas matrices se preparó, en primer lugar, una solución 0,5% P/V de GG en agua destilada y una vez alcanzada la disolución se agregó Alg 0,6 %P/V y PVP, PVA o Plur68 0,2 %P/V, 0,4 %P/V o 0,6 %P/V, según sea el caso. La mezcla se dejó 24 hs para alcanzar una homogenización total.

Posteriormente, se procedió al goteo de la solución de polímeros en una solución de CaCl₂ 0,1 M, con agitación constante a 120 rpm en agitador orbital. Para el goteo se utilizó una jeringa de 100 mL con una aguja de 0,8 mm de diámetro, obteniéndose esferas fácilmente visibles. Una vez finalizado el goteo, las matrices formadas se dejaron en agitación durante 24 hs, para luego ser entrecruzadas. Se separaron matrices sin entrecruzar, control, que se almacenaron en CaCl₂ 6,0 mM.

Por último, se procedió al entrecruzamiento de las matrices siguiendo el protocolo ya descrito en la sección 3.4 utilizando 1,5 ml de Epi para las matrices Alg-GG y 3,0 ml de Epi para las matrices de Alg-GG-PCF.

3.6. Preparación de micropartículas

Para la obtención de partículas poliméricas de menor tamaño, se utilizaron las siguientes técnicas:

- Nano Spray Drying, utilizando un Büchi Nano Spray Dryer B-90.
- Gelificación ionotrópica por goteo, haciendo uso de un Büchi *Encapsulator B-395 Pro*.

La técnica de Spray Drying fue utilizada para la obtención y posterior caracterización de partículas de Alg. La técnica de goteo se utilizó para la producción de las partículas de Alg con el agregado de PVA y PVP en diferentes relaciones. Se optó por la gelificación por una cuestión de practicidad y tiempo requerido. Los protocolos de cada técnica se detallan a continuación:

3.6.1. Secado por Pulverización (Spray Drying)

Para la obtención de micropartículas de Alg, una solución 0,1 %P/V de Alg (Propanal 8133) se hizo pasar por el Nano Spray Dryer B-90. Este aparato se basa en un nuevo concepto de secado por aspersión. Un diagrama completo del mismo se ilustra en la Figura 3.1.

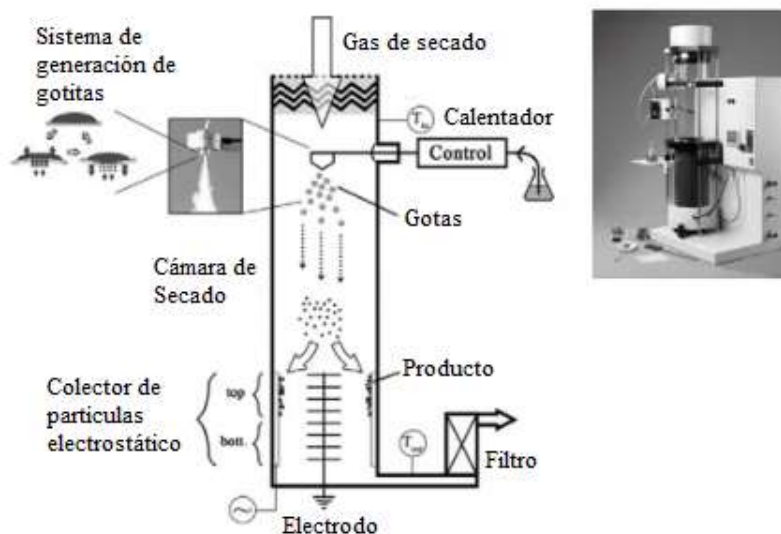


Figura 3.1. Esquema del Nano Spray Dryer B-90

El gas de secado ingresa al aparato desde la parte superior, calentándose hasta la temperatura de entrada, luego fluye a través de la cámara de secado, sale del secador por atomización en la salida inferior y se filtra completamente antes de abandonar el

instrumento. La temperatura de entrada, T_{in} y la temperatura exterior, T_{out} , se miden después del calentamiento y antes del filtrado fino, respectivamente. La muestra líquida se alimenta a la cabeza pulverizadora mediante una bomba. Como se ilustra en la figura, la producción de gotas se basa en un generador accionado eléctricamente, que hace vibrar una membrana delgada, perforada y de acero inoxidable en una pequeña tapa de pulverización. La tela de membrana (malla de pulverización) presenta una variedad de orificios precisos de tamaño micrométrico (4,0, 5,5 o 7,0 μm). El generador se acciona alrededor de los 60 kHz, lo que hace que la membrana vibre, expulsando millones de gotas de tamaño preciso por segundo con una distribución muy estrecha. Estas gotitas, extremadamente finas, se secan por acción del gas de secado y son recolectadas como partículas sólidas en un electrodo colector. Las condiciones de operación fueron las siguientes: malla de pulverización de 7,0 μm , flujo de aire comprimido de 100 L/min, temperatura de entrada de 30°C, presión de 31 mbar y spray al 30%. Finalmente, el polvo resultante se recoge utilizando una espátula de goma y se almacena en desecador hasta su utilización.

3.6.2. Gelificación Ionotrópica (Encapsulador)

La gelificación ionotrópica se basa en la capacidad de los polielectrolitos para formar hidrogeles a través de la formación de enlaces cruzados en presencia de contraiones. Para la obtención de microesferas de Alg, Alg-PVP y Alg-PVA, se prepararon soluciones de cada uno de los polímeros a las concentraciones finales correspondientes y se gotearon en CaCl_2 0,1 M a través del uso de un Encapsulador BUCHI B-395 Pro. Su funcionamiento se basa en el principio de ruptura de un torrente de líquido en gotitas mediante la aplicación de una vibración mecánica. La solución de polímero/s se hace/n pasar por una punta, imponiéndole una frecuencia vibratoria a una amplitud definida y haciendo que el líquido se rompa en pequeñas gotas uniformes de igual tamaño. Después

de la formación, las gotas caen en una solución que contiene el catión específico de manera que las gotas gelifiquen convirtiéndose en perlas o cápsulas. Para evitar la coalescencia de las gotas al entrar al baño de gelificación, una carga eléctrica es inducida sobre la superficie de las gotitas usando un sistema de voltaje electrostático. El tamaño de las gotas producidas y la tasa de producción dependen principalmente del tamaño de la punta, la velocidad de flujo, la viscosidad de la solución y la frecuencia de vibración aplicada. Todos estos parámetros pueden ser controlados. Para la producción de nuestras esferas se utilizó una punta de 120 μm de diámetro, un flujo de líquido de 1,8 mL/min y una frecuencia de 2000 Hz.

3.7. Entrecruzamiento de las micropartículas de Alg, Alg-PVP y Alg-PVA

El polvo obtenido en cada caso fue tratado con Epi para entrecruzar covalentemente las matrices y así, obtener esferas estables en el tiempo. Para dicho procedimiento se pesaron 30 mg de micropartículas y se les agregó 1,2 mL de CaCl_2 0,1 M en EtOH (99,5%). La muestra fue sonicada durante 30 minutos a 45°C, se le agregó 72 μL de Epi con agitación continua y, finalmente se llevó a pH básico agregando 153,6 μL de NaOH 5N [95].

Una vez obtenidas, las micropartículas fueron lavadas con una solución de H_2O /etanol (70%) (1:3), luego etanol (70%) y, por último, H_2O destilada. Para ello, en cada paso se decantaron las micropartículas centrifugando 5 min a 700 rpm. Finalmente, se reservaron en H_2O destilada a TA hasta su utilización.

3.8. Metodologías

3.8.1. Caracterización de las matrices insolubles de Alg-GG y Alg-GG-PCF

3.8.1.1. Insolubilidad de la matriz obtenida

Con el objetivo de verificar la reacción de entrecruzamiento se sometió a las matrices entrecruzadas covalentemente con Epi a la presencia de EDTA 0,1 M, el cual se

acompleja fuertemente con el Ca^{+2} . Si el entrecruzamiento no fue exitoso, la liberación del catión debido a la formación de un complejo con EDTA lleva a la disolución de la matriz, cosa que no ocurre si se formaron los enlaces covalentes entre los polímeros durante el tratamiento con Epi. Como control se utilizaron esferas que no fueron sometidas al proceso de entrecruzamiento covalente.

3.8.1.2. Masa de agua retenida por las matrices obtenidas

Para la determinación del porcentaje de agua presente en la matriz se pesó una masa exactamente conocida de la misma y se secó en desecador al vacío durante 24 hs. Transcurrido ese lapso se volvió a pesar y por diferencia se determinó la masa de agua retenida en la matriz. Además, con el objetivo de verificar si dicho porcentaje se mantiene constante en esferas preparadas en diferentes momentos, el protocolo se realizó con 3 preparaciones diferentes de matriz. Como control, en todos los casos, se utilizaron esferas sin tratar.

3.8.1.3. Determinación del pH_{zpc} de cada matriz

El pH en el punto de carga cero (pH_{zpc}) [96] de todos los adsorbentes fue estimado por diferencia entre las medidas de pH antes y después del contacto de la solución con cada matriz. En el ensayo, 0,5 g de adsorbente fueron colocados en 12,5 mL de solución de KCl 25 mM, y en diferentes tubos se fue variando el pH desde 2,0 hasta 8,0. Los distintos pHs ($\text{pH}_{\text{inicial}}$) de cada solución fueron ajustados con HCl (0,1 M) o NaOH (0,1 M). Las soluciones fueron agitadas por 24 hs en agitador orbital a 130 rpm y finalmente se procedió a la medida del pH_{final} en cada tubo. El gráfico de $(\text{pH}_{\text{final}} - \text{pH}_{\text{inicial}})$ vs $\text{pH}_{\text{inicial}}$ fue construido y el valor de pH_{zpc} fue estimado a partir de dicha gráfica.

3.8.1.4. Curva de titulación ácido – base

Se determinó la presencia de carga de las matrices insoluble Alg-GG y Alg-GG-PCF realizando una titulación ácido base de cada una. Para ello, se mezclaron 2 suspensiones de cada adsorbente, cada una de 200 mg de matriz y 20 mL de H₂O destilada. Cada suspensión fue titulada con soluciones acuosas de HCl y NaOH, respectivamente, para un amplio rango de concentraciones de ácido y de base. Los pHs en cada agregado fueron determinados. Se calcularon los valores de [H⁺] y [OH⁻] en cada caso. La carga total Q (mol/g) como función del pH fue calculada a partir de la ecuación (18):

$$Q = \frac{C_a - C_b [OH^-] - [H^+]}{m_{matriz}} \quad (18)$$

Donde Ca (mol/L) y Cb (mol/L) son las concentraciones de ácido y base agregadas, y m_{matriz} (g/L) es la concentración de matriz presente.

3.8.1.5. Determinación del área de superficie específica

El Área de Superficie Específica (SSA) de cada tipo de matriz generada se determinó usando el método de adsorción de RC [97, 98]. Los sistemas se prepararon en un volumen final de 3,0 mL a pH 6,0, agregando NaCl 0,5 M y cantidades variables de RC con un contenido final de matriz de 0,1 g. Los sistemas fueron incubados a 25°C en agitación por inversión durante 24 horas, y luego centrifugados a 10000 rpm durante 15 minutos. Se tomaron, al inicio y al final de la experiencia, muestras del sobrenadante y se les midió abs a 497 nm para determinar la concentración de RC. A partir de los datos obtenidos se graficaron las respectivas isotermas y se ajustaron al modelo de Langmuir para obtener los correspondientes valores de q_{máx} (capacidad máxima de adsorción).

Finalmente, se determinó la superficie específica utilizando la siguiente ecuación:

$$SSA = \frac{Q_{max} N SA}{PM 10^{21}} \quad (19)$$

donde N es la constante de Avogadro, SA es área de superficie de una sola molécula de colorante (1,73 nm²), y PM es el peso molecular de RC (696 g/mol) [99].

3.8.1.6. Espectroscopía FTIR

La región infrarroja del espectro se encuentra entre 13.000-10 cm⁻¹. La misma se divide en 3 regiones diferentes según la frecuencia que se analice: IR cercano (NIR) entre 13.000-4000 cm⁻¹, IR medio entre 4000-400 cm⁻¹ e IR lejano entre 400-10 cm⁻¹. En general, la mayoría de las aplicaciones analíticas se dan en la región del IR medio.

La espectroscopía infrarroja se basa en el hecho de que, en las moléculas, los movimientos de rotación y vibración moleculares tienen niveles de energía discretos. Las frecuencias resonantes o frecuencias vibracionales son determinadas por la forma de las superficies de energía potencial molecular, las masas de los átomos implicados y, eventualmente, por el acoplamiento vibrónico asociado. También, pueden estar, en una primera aproximación, relacionadas con la fuerza del enlace, así, la frecuencia de las vibraciones puede ser asociadas con un tipo particular de unión. Es importante destacar que para que un modo vibracional de una molécula sea activo al IR debe estar relacionado con cambios en el dipolo permanente [100].

Cuando una muestra se somete a la radiación infrarroja y la frecuencia de excitación de un enlace o grupo de enlaces coincide con alguna de las frecuencias incluidas en las ondas del haz incidente, se produce la absorción. Lo que se registra es la cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda, esto puede lograrse escaneando el espectro con un haz monocromático que cambia de longitud de onda a través del tiempo, o usando una transformada de Fourier (FT) para medir todas las longitudes de onda a la vez [101]. A partir de esto se obtiene un espectro de transmitancia o absorbancia

el cual muestra a que longitudes de onda la muestra absorbe el IR y permite, en algunos casos, determinar qué tipos de enlaces están presentes. En muchos casos, los espectros son complejos y presentan un gran número de bandas, por lo que resulta difícil asignar a cada una de las bandas un tipo específico de enlace. Sin embargo, aun cuando no puede determinarse exactamente a qué tipo de movimiento atómico se debe cada banda, los espectros de IR siguen dando información muy valiosa para análisis cuantitativos y cualitativos.

En este caso, se utilizaron los espectros de FT-IR para comparar las matrices de Alg-GG tratadas con Epi y las sin tratar. Las muestras fueron liofilizadas previamente y, para la preparación de las pastillas, se mezclaron aproximadamente 5.0 mg de matriz con 150 mg de KBr homogeneizando el sistema en mortero de ágata. Las pastillas se prepararon por presión del material utilizando una prensa hidráulica.

3.8.1.7. Microscopía electrónica de barrido

Los microscopios electrónicos de barrido son instrumentos de haz de electrones altamente versátiles que pueden proporcionar imágenes 100 veces más amplias que los microscopios ópticos comerciales.

En la actualidad, los SEM convencionales incluyen un cañón de electrones, lentes electromagnéticas, bobinas de exploración y aperturas. Las lentes electromagnéticas generalmente se dividen en dos categorías, las lentes de condensador que se colocan inmediatamente después del cañón de electrones y la lente del objetivo ubicada justo antes de la muestra. Los SEM típicos producen un haz de electrones de alta energía (1-30 keV) que se enfoca sucesivamente en una sonda submicrométrica y se explora la trama sobre la superficie de la muestra. Este haz de electrones se conoce normalmente como haz primario. Para la formación de la imagen topográfica más común usa electrones secundarios. Son electrones dispersos que tienen energías de solo unos pocos eV. Otro

modo popular de formación de imágenes en SEM es utilizar electrones más dispersos elásticamente conocidos como electrones retrodispersados. Estos últimos se definen para tener energías que van desde 50 eV hasta la energía del haz primario [102].

Se evaluó la morfología de la superficie de las esferas obtenidas por SEM en un microscopio Quanta 200 FGE. Las muestras fueron recubiertas con una 1–10nm de espesor de capa de carbono y luego se observa con un voltaje de aceleración de 3,0kV. Las macropartículas fueron previamente liofilizadas.

3.8.2. Caracterización de las micropartículas de Alg

3.8.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se analizaron la morfología y distribución de tamaños de las micropartículas obtenidas utilizando un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 650 FEG Environmental SEM, usando un voltaje de 5,0 kV para imágenes electrónicas secundarias. Las muestras fueron colocadas sobre cinta de cobre sin tratamiento previo. Las distribuciones de tamaño de partícula se revelaron a partir de las micrografías SEM utilizando el programa Imagen J de dominio público, disponible en Internet en <http://rsb.info.nih.gov/ij>, con el que solo se recogieron el número de partículas y su diámetro. Se aplicó una extrapolación normal con la siguiente función de densidad de probabilidad:

$$f(x; \mu, \sigma) = \exp^{-(\ln x - \mu)^2 / 2\sigma^2} / (x\sigma\sqrt{2\pi}) \quad (20)$$

donde μ y σ son la media y la desviación estándar, respectivamente, lo que permite una comparación cuantitativa de las imágenes SEM.

3.8.2.2. Microscopía óptica

El estudio morfológico, distribución de tamaño y número de micropartículas Alg-PCF obtenidas por gelificación ionotrópica en el Encapsulador, se realizaron analizando

las imágenes obtenidas en el software correspondiente al microscopio **Nikon ECLIPSE Ni-U**.

3.8.2.3. Espectroscopia RAMAN

La espectroscopía Raman es una técnica empleada para el análisis cuantitativo de prácticamente cualquier material, ya sea orgánico o inorgánico. Sus principales ventajas radican en que no es necesaria ninguna preparación de la muestra a estudiar y que se trata de un proceso no destructivo.

El fundamento físico de la técnica está basado en el efecto Raman que consiste en la dispersión inelástica de una fracción de la luz incidente en la muestra, la cual sufre un cambio de frecuencia debido al intercambio de energía con la materia en dicha colisión, según la ecuación de energía de los fotones:

$$\Delta E = h\Delta\nu \quad (21)$$

donde h es la constante de Planck y ν la frecuencia de la luz incidente.

Para la medición, un haz de luz monocromático, de frecuencia ν_0 , incide sobre la muestra, dispersándose de manera elástica (dispersión Rayleigh) en su mayor parte, pero existiendo una cantidad de luz que ha sido dispersada inelásticamente y, por tanto, presenta un cambio en su frecuencia. Estos cambios en la frecuencia son característicos de la naturaleza química y del estado físico de la muestra, y permiten identificar distintos compuestos y características moleculares. Microscópicamente, este efecto se puede describir como una excitación de la nube electrónica de la molécula debido a la interacción con el fotón incidente. Este provoca la excitación de la molécula a un estado excitado virtual que luego emite un fotón con el objetivo de regresar al estado fundamental. Sin embargo, si el choque ha sido inelástico y se ha perdido o ganado energía, la molécula no volverá exactamente al mismo estado, sino que se encontrará en

un estado rotacional o vibracional distinto del inicial [103]. La diferencia de energía entre estos estados es lo que modifica la frecuencia del fotón emitido (Ecuación 22).

Para obtener información molecular, se analizan los niveles de energía vibracionales, los cuales son característicos de los átomos del enlace, su conformación y su entorno. Estos niveles tienen frecuencias de resonancia características, las cuales son función de la masa de las moléculas y la fortaleza de sus enlaces. A diferencia de la espectroscopía infrarroja, en la que es necesario un cambio en el momento dipolar de la molécula, para la espectroscopía Raman es necesario un cambio en la polarizabilidad, lo cual permite obtener información espectral complementaria sobre moléculas homonucleares. En general, un espectro Raman es una representación de la intensidad de la luz dispersada frente al número de onda. Se observa una banda central, correspondiente a la dispersión Rayleigh, a la misma frecuencia que el fotón incidente y de gran intensidad y, a cada lado de ella, se sitúan de manera simétrica las bandas Raman-Stokes y Raman Anti-Stokes (Figura 3.2).

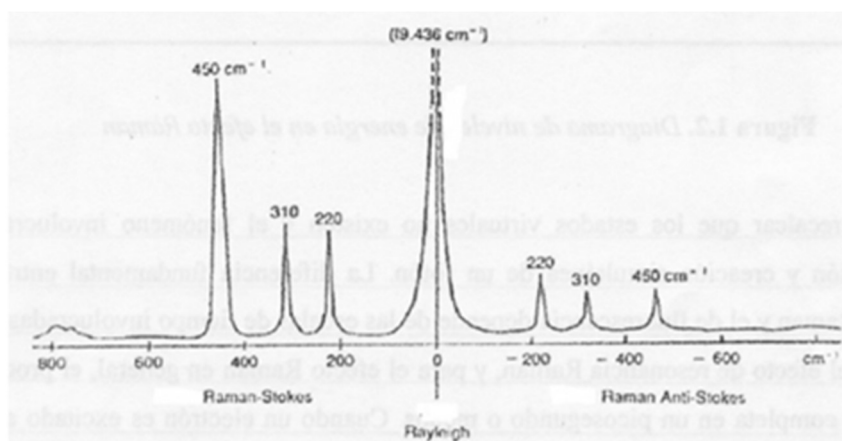


Figura 3.2. Representación energética de las diferentes posibilidades de dispersión al incidir un fotón sobre una muestra.

Las muestras se analizaron por microscopía Raman, haciendo incidir una luz láser en una zona determinada y refocalizando la señal Raman dispersada hacia una pequeña abertura confocal, la cual actúa como filtro espacial, permitiendo únicamente la entrada

de la señal proveniente de la zona que se quiere estudiar y eliminando la señal proveniente de otros puntos. La señal recogida es dispersada en un dispositivo de carga acoplada (CCD), el cual produce el espectro. La ventaja en esta técnica radica en la posibilidad de analizar a distintas profundidades de la muestra sin necesidad de realizar cortes transversales, y con una resolución espacial del orden del micrómetro.

Las muestras de las micropartículas se caracterizaron utilizando un Microscopio Confocal Raman Witec Alpha 300R. Los espectros de dispersión micro-Raman se registraron con la línea láser de 532 nm, una cámara CCD eléctricamente refrigerada y un filtro de muesca para eliminar la dispersión elástica. Los espectros se obtuvieron utilizando un objetivo de microscopio de 50 ×. La potencia del láser de salida en las muestras fue de aproximadamente 25 mW. Las condiciones de exploración espectral se eligieron de manera de evitar la degradación de la muestra.

3.8.2.4. Potencial Zeta

Esta medida da una idea del potencial que se requiere para penetrar la capa de iones que rodea a una partícula, la cual está directamente relacionada con la estabilidad de esta última. Por lo tanto, es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula [104]. Se determinó el potencial zeta de las micropartículas ya tratadas con Epi en un Horiba Nano Partica SZ-100 disolviendo las muestras en agua desionizada y analizando sus distribuciones de carga.

3.8.2.5. Análisis Térmico

La caracterización térmica de las micropartículas obtenidas se llevó a cabo mediante un análisis térmico simultáneo: Termogravimetría (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

La técnica de TGA consiste en determinar la variación de peso de la muestra con respecto a la temperatura bajo una rampa de calentamiento a velocidad constante, o con

respecto al tiempo para procesos isotérmicos. A su vez, el equipo permite determinar los parámetros cinéticos del proceso de pirólisis que sufre el material bajo estudio. El proceso de pirólisis se puede seguir midiendo la masa de la muestra vs. temperatura y se define como el grado de avance del proceso o conversión α (adimensional) según la siguiente ecuación:

$$\alpha = 1 - x = (m_0 - m_T)/(m_0 - m_f) \quad (22)$$

Donde m_0 , m_T y m_f son la masa de la muestra en la temperatura inicial (T_0), la temperatura T y la temperatura final (T_f), respectivamente y x es la masa residual a cada T .

A partir de la representación gráfica de α vs T (curva de pirólisis o TGA) se puede calcular la temperatura de transición (T_t), la cual es característica de un material y cuyo valor varia en caso de que cambie la estructura del mismo (Figura 3.3). El cálculo de la T_t se realiza en base a $(\partial\alpha/\partial T)$ vs. T , que permite determinar el número de transiciones que posee un material. Esto se debe a que, generalmente, a partir de la curva α vs. T es más difícil de determinar.

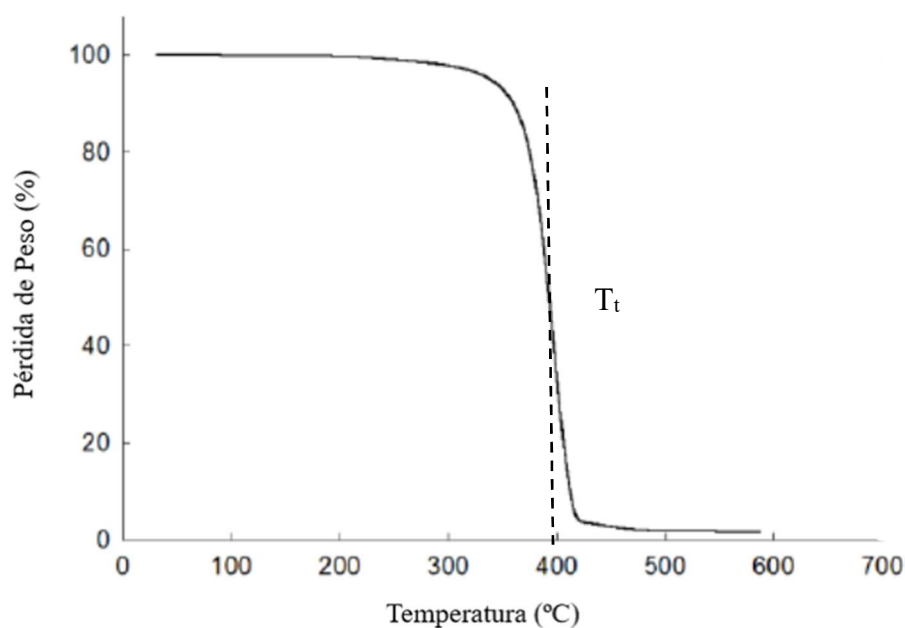


Figura 3.3. Representación gráfica de la curva TGA.

La TGA también permite calcular la energía de activación (E_a) del proceso de pirólisis a partir de diferentes modelos [105]. La selección del mismo depende de la complejidad del sistema. Por ejemplo, en el caso de biomasas vegetales, que contienen tres componentes principales: hemicelulosa, celulosa y lignina, los modelos son complejos, pero en el caso de la pirólisis de sustancias puras, tales como: polisacáridos, Alg, chitosan o mezclas de polisacáridos tal como los lechos de Alg-GG, estos se pueden considerar como una única sustancia y es posible aplicar el modelo iso-convencional también denominado modelo libre, que permite el cálculo de la energía de activación del proceso de pirólisis y, sobre todo, si el material ha sufrido modificaciones estructurales, permite obtener una idea de la modificación en las interacciones intramoleculares del mismo.

El material en estado sólido se calienta a una velocidad constante ($\beta = dT/dt$, K/s). La forma de conversión de la velocidad de reacción según la ley de Arrhenius se puede expresar como:

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{A}{\beta} \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) f(\alpha) \quad (23)$$

Donde E_a (J/mol) es la energía de activación aparente; A (1/s) es un factor pre-exponencial; T (K) es la temperatura absoluta; R (8,3145 J/mol.K) es la constante de gas ideal; $f(\alpha)$ es el modelo de mecanismo que depende de la conversión.

Para una sola reacción, se cree que los métodos de iso-conversión son precisos para la estimación de la energía de activación aparente (E_a). Los métodos de iso-conversión tratan la E_a como una función de α . Los valores de E_a a una dada α , E_a , pueden estimarse utilizando múltiples velocidades de calentamiento sin $f(\alpha)$ conocido. Uno de los métodos de iso-conversión más utilizados es el método de Friedman (Ec. (24)) que se reorganiza a partir de la Ec. (23):

$$\ln \left[\beta_k \left(\frac{d\alpha}{dT} \right)_\alpha \right] = \ln[A_\alpha f(\alpha)] - \frac{E_\alpha}{RT_{\alpha,k}} \quad (24)$$

donde el subíndice k representa la velocidad de calentamiento; $T_{\alpha,k}$ es la temperatura correspondiente a una dada α de velocidad de calentamiento; $(d\alpha/dT)_\alpha$, E_α , A_α son el diferencial de α vs T , la energía de activación aparente y el factor pre-exponencial de una dada α , respectivamente. En los ajustes lineales de $\ln[\beta_k(d\alpha/dT)_\alpha]$ vs. $-1/T_{\alpha,k}$, E_α se puede estimar a partir de la pendiente E_α/R ; y el A_α se puede calcular a partir de las intersecciones una vez que el $f(\alpha)$ más adecuado es conocido [106].

Las mediciones de DSC, por su parte, están basadas en la capacidad calorífica (C_p) de la muestra en función de la T . La función principal de esta metodología es detectar la variación diferencial de la potencia aplicada, lo cual permite calcular el flujo de calor entrante o saliente en un intervalo de tiempo determinado, o dentro de un rango de variación de T . De hecho, las mediciones no son absolutas, ya que el instrumento determina la diferencia en el flujo de calor entre la muestra y la referencia (vacía), que deben llevarse a cabo en la misma cápsula. Durante una reacción endotérmica, el DSC muestra una disminución en el flujo de calor, el cual es compensado por un aumento de potencia, ya que este último "compensa" cualquier cambio físico o químico al ingresar más energía para mantener una temperatura isotérmica. El flujo de calor disminuye para el endotérmico porque la muestra absorbe el calor durante el cambio de entalpía (ΔH , J/g). Este último depende de la estabilidad del peso y se calcula a través de la integración del área bajo la curva [51]:

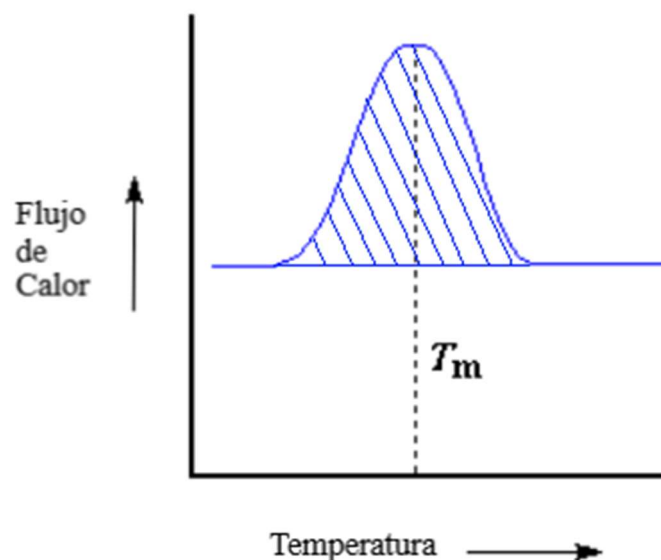


Figura 3.4. Representación gráfica de la curva DSC.

La temperatura en la parte superior del pico se denomina temperatura de fusión o cambio de fase de la muestra (T_m).

Las experiencias se realizaron en un Mettler Toledo TGA / DSC 1 Sistema Star® con Controlador de Gas GC 200 pesando 12-20 mg de muestra, aplicando una velocidad de calentamiento de 5 °C/min, de 0 a 500 °C y bajo una atmosfera de argón (30mL/min) para evitar una degradación termo-oxidativa. Se realizó un blanco sin muestra. Los resultados se expresaron como % de masa residual vs temperatura (TGA) y potencial (mW) vs temperatura (DSC). La primera derivada de TGA fue también determinada mediante el uso de Sigma Plot v12. La integral del área de los picos de DSC fue determinada mediante el uso de Origin 6.0.

3.8.3. Cuantificación de Lisozima y Quimotripsinógeno

3.8.3.1. Absorbancia a 280 nm

Ya que se trabajó con proteínas comerciales con alto grado de pureza, la presencia de las mismas se determinó mediante medidas de absorbancia a 280 nm (donde absorben los residuos Tirosina, Triptófano y, en menor medida, la Fenilalanina y los puentes

disulfuro presentes en la proteína) [107]. Este método fue seleccionado debido a su sencillez y a que brinda la posibilidad de recuperar la muestra luego de la medición.

Para las medidas se emplearon dos equipos diferentes según el sistema a analizar. Cuando se trabajó con las esferas macroscópicas se empleó un Espectrofotómetro UV-Vis Jasco V-550, mientras que para los sistemas preparados con microesferas se empleó un Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c de Thermo Scientific™.

En ambos casos, se realizaron las curvas de calibración utilizando diferentes diluciones de una solución stock de LZ 10 mg/ml y otra de QTg 10 mg/ml para conocer el rango de linealidad del método.

3.9. Estudio de la adsorción en batch de LZ y QTg sobre matrices poliméricas

3.9.1. Determinación de las condiciones de adsorción en batch de LZ sobre la matriz Alg-GG

Uno de los pasos más importantes en este trabajo, fue determinar las condiciones experimentales óptimas donde se obtuviera el mayor porcentaje de proteína adsorbida en tanque agitado sobre una masa fija de la matriz en estudio.

Se llevó a cabo la adsorción de LZ comercial en diferentes sistemas, en los cuales se variaron las siguientes condiciones: concentración inicial de LZ (0,05 mg/mL, 0,10 mg/mL, and 0,16 mg/mL), pH del medio (6,0, 7,0 y 8,0), fuerza iónica (0 mM, 150 mM y 300 mM NaCl), volumen de Epi agregado para inducir el entrecruzamiento (1,5 mL y 3,0 mL) y concentración total de Alg para la obtención de la matriz (0,6 % P/V y 1,0 % P/V). La elección se basa en que dichos parámetros son los más influyentes en un proceso de interacción electrostática como el que se espera que suceda en este caso [108].

Para el estudio se prepararon sistemas con una masa conocida e igual de matriz y se llevaron a un volumen final constante con los diferentes buffers ensayados para la adsorción. Los sistemas se dejaron en agitación por media hora de manera que la matriz

se lave bien con la solución de trabajo. Una vez equilibrada la matriz, se agregó proteína en igual concentración a cada uno de ellos. Los tubos fueron dejados por 1 h bajo agitación orbital de 30 rpm a 25 °C. Este tiempo es suficiente, según medidas de cinética, para que los sistemas lleguen al equilibrio.

Para los cálculos se utilizó el método de depleción, que consiste en medir la concentración de proteína inicial y final en el sobrenadante y, mediante diferencia de las mismas, se obtiene la cantidad de proteína adsorbida en las diferentes condiciones [108, 109]. Los datos fueron expresados como % de proteína adsorbida vs. Condición de trabajo.

Se realizaron en cada condición controles de matriz sin proteína y de proteína sin matriz. Todas las experiencias fueron realizadas por duplicado.

3.9.2. Determinación de las condiciones de adsorción de QTg sobre matrices Alg-GG-PCF a partir de diseño estadístico experimental

Para determinar las condiciones experimentales óptimas donde se obtuviera el mayor porcentaje de proteína adsorbida sobre una masa fija de la matriz en estudio, se realizaron varios experimentos independientes para obtener modelos optimizados para la adsorción de QTg. La influencia de las variables (pH y adición de polímeros sintéticos) en la capacidad de adsorción fue estudiada empleando un diseño factorial completo con dos factores (pH y adición de polímeros sintéticos) en cuatro y tres niveles, respectivamente. La significación estadística de la regresión no lineal se determinó mediante la prueba de Student, la ecuación del modelo de segundo orden fue evaluada por la prueba de Fischer y la proporción de varianza explicada por el modelo obtenido fue dada por el coeficiente de determinación, R^2 . Los diseños experimentales y el cálculo de los datos predictivos se realizaron con Minitab® 17.1.0 (© Minitab Inc., 2013).

3.9.2.1. Secuencia de Fibonacci

Los niveles óptimos del factor significativo en la adsorción de QTg se analizaron mediante la secuencia de Fibonacci [110]. En este estudio, se probó un factor (pH). La estrategia utilizada tuvo un error máximo de 0,1 con un rango de pH entre 4,0 y 6,0.

3.9.3. Determinación de las condiciones de adsorción de QTg sobre micropartículas de Alg-PVP/Alg-PVA a partir de diseño estadístico experimental

Para determinar si el agregado de PVA o PVP en la producción de micropartículas afecta la capacidad de adsorción de QTg sobre una masa fija de matriz se llevó a cabo un diseño experimental, a partir del cual se realizaron varios experimentos independientes para obtener modelos optimizados para la adsorción de la proteína. La influencia de las variables [PVP], [PVA] y Volumen de Epi en la capacidad de adsorción fue estudiada empleando un diseño factorial completo con tres factores ([PVP], [PVA] y Volumen de Epi) en dos niveles cada uno. En la Tabla 2.1 se detallan los niveles estudiados. Estos factores y niveles fueron determinados por pruebas preliminares y literatura [22, 95, 111]. Las condiciones experimentales utilizadas, como pH y temperatura, fueron las determinadas en experiencias previas, durante la producción de macroesferas (datos no mostrados). La significación estadística de la regresión no lineal se determinó mediante la prueba de Student, la ecuación del modelo de segundo orden fue evaluada por la prueba de Fischer y la proporción de varianza explicada por el modelo obtenido fue dada por el coeficiente de determinación, R^2 . Los diseños experimentales y el cálculo de los datos predictivos se realizaron con Minitab® 17.1.0 (©Minitab Inc., 2013).

Tabla 3.I. Variables y niveles aplicados al diseño factorial completo estudiado.

Diseño Factorial Completo	Variables	Niveles		
		-1	0	1
	Concentración de PVP % (P/V)	0	0,35	0,7
	Concentración de PVA % (P/V)	0	0,35	0,7
	Volumen de Epi (uL)	240	600	960

3.9.4. Caracterización de la cinéticas del proceso de adsorción

Para el estudio de la cinética del proceso de adsorción se incubó una cantidad constante de matriz con proteína y se midió la cantidad de proteína remanente en el sobrenadante a lo largo del tiempo. Los tubos fueron mantenidos en agitación y a temperatura constante durante el transcurso de la experiencia. La cinética se determinó a diferentes concentraciones iniciales de proteína, diferentes volúmenes de Epi y a dos temperaturas (6°C y 25°C).

Los datos fueron expresaron como mg de proteína adsorbida/ g de matriz hidratada en función del tiempo (q_t). Las cinéticas de adsorción obtenidas fueron analizadas con diferentes modelos cinéticos, a saber: pseudo-primer orden o modelo de Lagergen [112], pseudo-segundo orden o modelo de Ho y Mckay [113] y modelo intra-particular de Weber y Morris [114]. Las ecuaciones de ajuste y los parámetros correspondientes a cada modelo cinético estudiado se detallaron en la sección 1.2.1.

3.9.5. Isotermas de adsorción

El procedimiento para obtener isotermas de adsorción consiste en trabajar con muestras con una cantidad fija de adsorbente y concentraciones de adsorbato crecientes. Por lo tanto, se preparó una serie de tubos con una cantidad constante de matriz y a cada uno de ellos se le agregó una concentración diferente de una solución stock de proteína, según corresponda. Las muestras fueron colocadas en un agitador orbital a 30 rpm con temperatura constante y se dejaron equilibrar. Se determinó la concentración de proteína

inicial y en el equilibrio en cada tubo. Las isotermas se obtuvieron a 2 temperaturas: 6 °C y 25 °C.

Los datos obtenidos fueron ajustados a diferentes modelos de adsorción hasta encontrar el mejor ajuste, de manera de obtener los parámetros fisicoquímicos del proceso. Los modelos de isotermas utilizados fueron detallados en la sección 1.2.2.

Se obtuvieron diferentes isotermas según el sistema en estudio y, debido a que las características de los lechos obtenidos son diferentes, la metodología de trabajo presentó variaciones. Cuando se trabajó con macroesferas se utilizaron 0,100 g de lecho en un volumen final de 3 ml de sistema tanto para el caso de la LZ como para el QTg y el sistema se incubó durante 1 h para alcanzar el equilibrio. Al trabajar con micropartículas se empleó 1,0 mg de matriz en un volumen final de 1 ml dejando el sistema en agitación durante 30 min para alcanzar el equilibrio luego de lo cual los tubos fueron centrifugados por 10 min a 10000g para poder realizar el dosaje de proteína.

3.9.6. Determinación de las condiciones de desorción

Cuando un proceso de adsorción se optimiza con el objetivo de purificar una proteína, la desorción de la misma es casi tan importante como su adsorción. Por ello, se realizaron pruebas con el fin de encontrar las condiciones experimentales que rindieran la mejor desorción de las proteínas de interés.

Se prepararon sistemas con una cantidad fija de matriz, buffer de adsorción y cantidad fija de proteína. Los tubos se incubaron con agitación orbital a 25°C. Una vez alcanzado el equilibrio de adsorción, se separó la matriz del sobrenadante y se realizaron varios lavados con el buffer de adsorción (hasta alcanzar una concentración de proteína despreciable en el lavado). Finalmente, se colocó en cada tubo un volumen constante de los diferentes buffers de desorción y se dejó el sistema en agitación orbital por 1 h, con el

objetivo de estar seguros de haber alcanzado el equilibrio de desorción. Los datos obtenidos fueron expresados como % proteína desorbida vs. Condición de desorción.

Las condiciones ensayadas para la desorción se eligieron en base a resultados obtenidos en las experiencias anteriores y en base a la bibliografía consultada. Se utilizó buffer Pi 20 mM pH 7,0 para LZ y Cit 25 mM pH 5,0 para QTg, con variación de la fuerza iónica por la adición de NaCl al medio (0 mM, 150 mM, 300 mM y 450mM) en ambos casos.

3.9.7. Cinética de la desorción

Para obtener el tiempo requerido para alcanzar la máxima concentración de proteína desorbida, se realizaron las medidas de cinética para la desorción. Para ello se realizó el mismo protocolo que en la determinación de las condiciones de desorción, pero se midió la cantidad (%) de proteína desorbida en función del tiempo transcurrido. Estas medidas fueron realizadas únicamente para la condición que rindió el mayor porcentaje de desorción.

3.9.8. Ciclos de reutilización de la matriz

Para la determinación de la viabilidad de las matrices utilizadas se llevaron a cabo varios ciclos sucesivos de adsorción – lavado – desorción durante un período de 3 días consecutivos. Se realizaron los mismos protocolos para adsorción y desorción detalladas anteriormente. Las matrices fueron reservadas entre ciclo y ciclo en buffer de adsorción.

Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Se obtuvieron los valores de % proteína adsorbida y % de proteína desorbida en función del tiempo.

3.10. Adsorción en lecho empacado: estudio del proceso de captación de LZ sobre la matriz Alg-GG

La adsorción en columna de lecho empacado es un proceso en el que se produce una transferencia continua de masa entre dos fases (la fase móvil que contiene el soluto y

la fase sólida del lecho compactado). La adsorción en lecho empaquetado se realizó en una columna de 5 mm de diámetro x 100 mm de alto la cual se empacó con una cantidad conocida de matriz de Alg-GG para obtener la altura de lecho deseada. La solución de LZ de concentración conocida se bombeó a una velocidad fija a través de la columna. El procedimiento de elución se realizó utilizando un ÄKTA prime plus 100 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) equipado con una bomba peristáltica y una detección UV para las mediciones de la concentración de proteínas. Los datos obtenidos se expresaron como concentración de proteína eluida sobre la concentración de LZ total inicial en la solución de entrada frente al tiempo [32]. Dicha grafica se denomina curva de ruptura y fue estudiada variando la altura del lecho (Z), la velocidad del flujo (caudal) (Q_v) o la concentración inicial de LZ (C_0). De esta manera, se puede estudiar el comportamiento de la proteína en los sistemas de adsorción formados.

Los datos obtenidos fueron ajustados a diferentes modelos matemáticos hasta encontrar el mejor ajuste, de manera de obtener los parámetros para describir las curvas de rupturas obtenidas. Los modelos utilizados fueron detallados en la sección 1.3.

3.11. Aplicación de los resultados obtenidos

3.11.1. Fuente de obtención de LZ

Para la obtención de LZ a partir de una fuente natural se utilizó clara de huevo. Para ello se preparó una dilución de la clara de huevo en H_2O destilada a pH 7,0; en una relación 1:5. Posteriormente se procedió a colar la solución utilizando un colador de metal y finalmente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a $4^\circ C$. Dicho tratamiento fue realizado para disminuir la viscosidad natural de la clara, siempre tratando de evitar la formación de espuma.

3.11.2. Purificación de la enzima

Una vez obtenida la solución se procedió a la purificación de LZ a través del proceso de adsorción–lavado–desorción tanto en tanque agitado como en lecho empacado empleando las mejores condiciones obtenidas en las pruebas con la enzima pura. En el caso del proceso realizado en lecho empacado, las muestras se recolectaron a la salida de la columna en los intervalos de tiempo deseados.

Finalmente, se llevó a cabo una electroforesis de proteínas (S.D.S. – P.A.G.E.) a través de la cual se pueda verificar la presencia de la enzima tanto en la fase de desorción luego de un tratamiento de ultracentrifugación (30 min, 6000 rpm, 8°C), técnica capaz de concentrar la proteína obtenida. El análisis de imágenes de los geles se realizó en una PC utilizando el programa de imagen de dominio público desarrollado por Wayne Rasband, de los Institutos Nacionales de la Salud de EE. UU. y disponible en Internet en <http://rsb.info.nih.gov/ij> para mediciones de área, a través intensidad relativa integrada de cada banda obtenida.

3.11.3. Evaluación de la capacidad de las micropartículas de Alg para la recuperación de QTg y LZ en una mezcla de proteínas

Para estudiar la eficiencia de las micropartículas en la recuperación de LZ y QTg a partir de una mezcla artificial de proteínas, se llevó a cabo un ciclo de adsorción-lavado-desorción en las condiciones previamente estudiadas para cada proteína. Se agregaron al sistema las proteínas OVO, BSA y CAT a una concentración final 30 mg/mL. Se eligieron estas proteínas teniendo en cuenta su pI y PM. Finalmente, las alícuotas de cada paso del ciclo para cada proteína se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS) (PAGE), en Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels de Bio-Rad, de concentración 4-15% y 12 pocillos de 20 µL de siembra. El tiempo de funcionamiento fue de aproximadamente 1 hora con una intensidad constante de 40 mA. Las proteínas se tiñeron con azul brillante Coomassie.

3.12. Manejo de los datos experimentales

El ajuste de los datos experimentales, usando las ecuaciones adecuadas a cada experiencia fue realizado mediante el programa de PC de ajuste no lineal Sigma Plot para Windows, versión 12.0.

La mayoría de las mediciones fueron realizadas por duplicado y el error asociado fue calculado como la desviación estándar de las mismas.

En los casos en los que fue necesario ajustar los datos obtenidos experimentalmente a ecuaciones correspondientes a modelos teóricos para explicar los comportamientos del sistema, el mejor ajuste fue considerado como aquel que presente un coeficiente de determinación (R^2) más cercano a la unidad y la menor sumatoria de cuadrados del error (SS). Las ecuaciones correspondientes a dichos parámetros se presentan a continuación:

$$R^2 = \left(\frac{(q_{e,modelo} - q_{e,exp})^2}{\sum (q_{e,modelo} - \bar{q}_{e,exp})^2 + (q_{e,modelo} - q_{e,exp})^2} \right) \quad (25)$$

Donde: $q_{e,modelo}$ corresponde a los valores de q_e obtenidos por el modelo; $q_{e,exp}$ se refiere a los valores de q_e obtenidos experimentalmente y $\bar{q}_{e,exp}$ es la media de los valores de $q_{e,exp}$ obtenidos.

$$SS = \sum_i^p (Q_{e,modelo} - Q_{e,exp})^2 \quad (26)$$

Donde: $Q_{e,modelo}$ es la capacidad teórica de adsorción brindada por el modelo y $Q_{e,exp}$ es la capacidad de adsorción en el equilibrio obtenida experimentalmente.

Resultados y Discusión:

Capítulo 1

4. Resultados y discusión: Adsorción de Liozima en matriz de Alginato-Goma Guar

4.1. Caracterización de la matriz obtenida

La matriz elegida como adsorbente está formada por una mezcla de Alg y GG, la cual gelifica en contacto con CaCl_2 y, luego, ambos polisacáridos son entrecruzados con Epiclorohidrina (Epi), un epóxido altamente reactivo. Las matrices entrecruzadas con diferentes relaciones de Epi (1,5 mL y 3,0 mL) y sin entrecruzar se muestran en la figura 4.1. Puede observarse que las tres matrices obtenidas presentan forma esférica con un diámetro promedio de entre 1,5-2,0 mm. Su densidad, mayor que la del agua, permite que decanten fácilmente evitando pasos de centrifugación para su separación.



Figura 4.1: Fotografía de las esferas obtenidas. A la derecha se muestran matrices Alg-GG control, en el centro esferas tratadas químicamente con 1,5 mL de Epi y a la izquierda las tratadas con 3 mL de Epi.

Si bien las matrices utilizadas durante este trabajo fueron obtenidas a partir de un protocolo previamente publicado [82], antes de comenzar a estudiar su capacidad de adsorción, se realizó una caracterización de las matrices Alg-GG (0.6 %P/V-0.5 %P/V). Para ello se procedió al estudio de diversas propiedades, las cuales se detallan a continuación.

4.1.1. Insolubilidad

Se verificó la estabilidad de las matrices obtenidas frente a la presencia de EDTA 0,1M. Este paso es fundamental para su posterior uso ya que, si las matrices no se encuentran entrecruzadas covalentemente de forma correcta pueden solubilizarse al variar

las condiciones de trabajo y, por lo tanto, no cumplirán con los requisitos necesarios para ser utilizadas.

Se pudo observar que, durante la agitación por inversión de ambas matrices, entrecruzadas y sin entrecruzar (control), durante un período de 3 horas en una solución de EDTA 0,1M, la primera se conservó intacta mientras que la última se solubilizó completamente. Esto demuestra que el entrecruzamiento luego de la reacción con Epi fue exitoso, ya que, cuando la matriz es modificada químicamente, el agregado de EDTA (agente quelante de Ca^{2+}) no solubiliza el gel, independientemente de la presencia de Ca^{2+} .

Los resultados obtenidos son muy interesantes debido a que la insolubilidad de las esferas obtenidas permite su utilización en medios sin la presencia de cationes divalentes. Esto es ventajoso ya que la presencia de dichos cationes limita, en muchos casos, la utilización de ciertos buffers debido a la precipitación de sales insolubles. Este inconveniente lleva a tener que utilizar otros compuestos para la regulación del pH que, en la mayoría de los casos, encarecen el proceso. Un ejemplo claro de esto es la imposibilidad de utilizar buffer fosfato (P_i) en combinación con sales de calcio.

4.1.2. Masa de agua retenida por las matrices

A partir de las determinaciones de porcentaje de agua presente en las matrices, se encontró que la matriz tratada está compuesta en un $(93.5 \pm 0.1) \%$ de agua y, que dicho valor se mantiene constante en las diferentes preparaciones de la misma. El control presentó un porcentaje de agua similar $(98.2 \pm 0.1) \%$, lo que permite concluir que el tratamiento químico de las esferas no altera el grado de hidratación de las mismas. Este dato es similar a resultados obtenidos para las matrices de Alg- CaCl_2 en las que se estima un 98,3 % de agua [16] y para matrices formadas por otros polímeros naturales tales como el chitosan [115].

4.1.3. Espectroscopía FTIR

Para completar la caracterización de las matrices Alg-GG entrecruzadas y sin entrecruzar, se procedió a realizar el espectro de IR de las mismas. En la figura 4.2 se pueden observar los espectros IR superpuestos de la matriz sin entrecruzar y la matriz entrecruzada con 1,5 mL Epi. También se llevó a cabo el mismo procedimiento para el adsorbente entrecruzado con 3,0 mL de Epi, resultados que no son presentados, ya que se obtuvieron conclusiones similares.

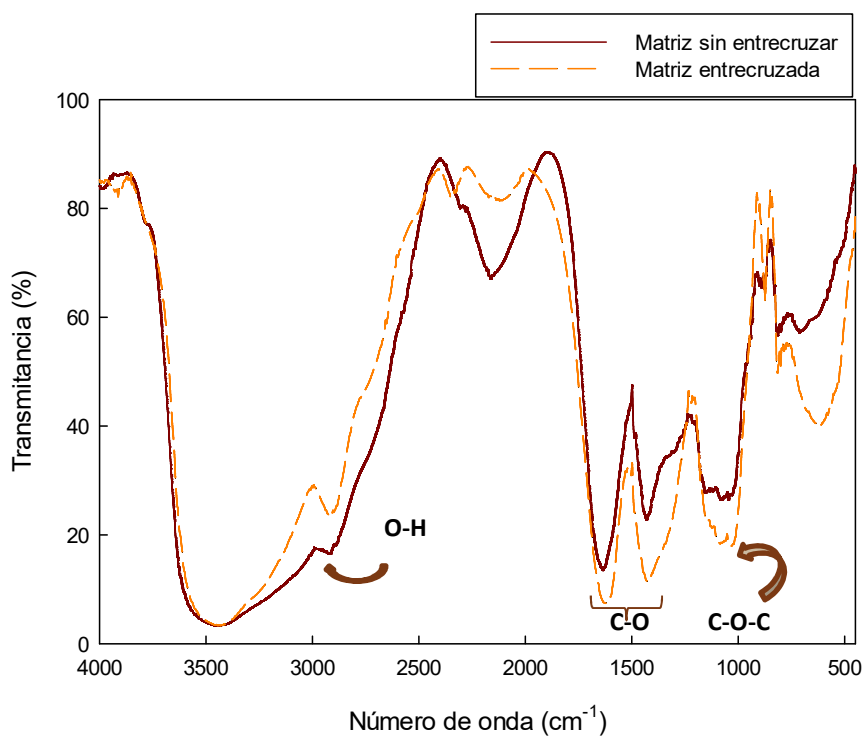


Figura 4.2: Espectros de FTIR de las esferas de Alg-GG.

El pico más importante se observa a los 1120 cm^{-1} . Dicho pico es característico de los grupos epóxido y está asociado a la deformación axial del C-O-C [116]. Puede verse que la intensidad de dicho pico se incrementa notablemente en las esferas entrecruzadas. Estos resultados, junto con las pruebas de solubilidad, nos permiten concluir que la reacción de entrecruzamiento fue exitosa.

Las bandas de alrededor de 1030 cm^{-1} (C-O-C stretching) se atribuyen a la estructura de los polisacáridos. Además, las bandas a 1617 y 1417 cm^{-1} se asignan a los

picos asimétricos y simétricos de estiramiento de los grupos carboxilo del Alg. Finalmente, el pico a 3000 cm^{-1} corresponde a los grupos hidroxilo de ambos polímeros [82, 116].

4.2. Estudio de la adsorción en batch de LZ sobre la matriz Alg-GG

4.2.1. Determinación de las condiciones de adsorción en batch

Para comenzar con el estudio de la adsorción en tanque agitado de LZ sobre la matriz de Alg-GG se prepararon sistemas en los cuales se estudió el efecto del pH del medio (6,0, 7,0 y 8,0), la concentración final de Alg en la formación de la matriz (0,6 % P/V y 1,0 % P/V) y el volumen de Epi necesario para el entrecruzamiento (1,5 mL y 3,0 mL) y, se determinó el % de LZ adsorbido sobre cada matriz. Los resultados obtenidos en los distintos sistemas son presentados en la figura 4.3.

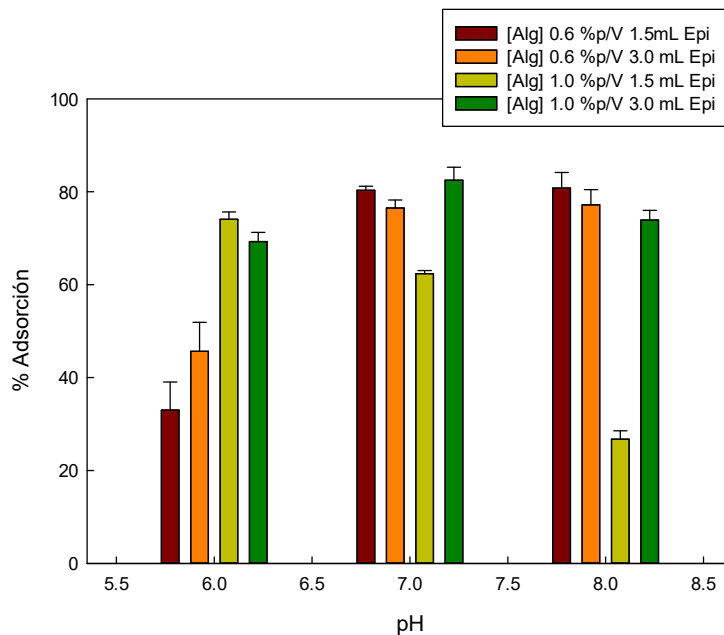


Figura 4.3: % Adsorción de LZ en los sistemas en estudio en función del pH del medio. Medio buffer Pi 20 mM. Concentración inicial de LZ 0,16 mg/mL. Temperatura 25°C.

Se observa que, en el medio a pH 7,0, los valores de % de adsorción de los sistemas estudiados son más altos. Dentro de estos sistemas, el mejor resultado fue (82 ± 3) % de LZ adsorbida en la matriz formada por 1,0 % P/V de Alg y 3,0 mL de Epi. Sin

embargo, la capacidad de adsorción de las matrices formadas por 0,6 % P/V de Alg y entrecruzadas con 1,5 mL y 3,0 mL de Epi son $(80 \pm 1) \%$ y $(77 \pm 2) \%$, respectivamente. Es por ello que, si se tienen en cuenta los valores obtenidos y sus respectivos errores, puede concluirse que la diferencia obtenida para los porcentajes de adsorción en esta condición con las 3 matrices es despreciable. Y, considerando la cantidad de reactivos empleada para la formación de las matrices, se procedió a continuar trabajando con las matrices formadas con una concentración inicial de Alg de 0,6 %P/V y entrecruzadas covalentemente con 1,5 mL y 3,0 mL de Epi.

Por último, a partir de dicha experiencia se determinó el pH que rinde la mayor adsorción para el sistema en estudio: buffer Pi 20 mM, pH 7,0.

4.2.2. Caracterización de la cinética del proceso de adsorción

Durante el estudio de cualquier proceso es importante determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en el sistema, es decir, realizar la cinética de adsorción. En la figura 4.4 se muestran los resultados obtenidos para la adsorción de LZ sobre la matriz de Alg-GG y sus respectivos ajustes.

a)

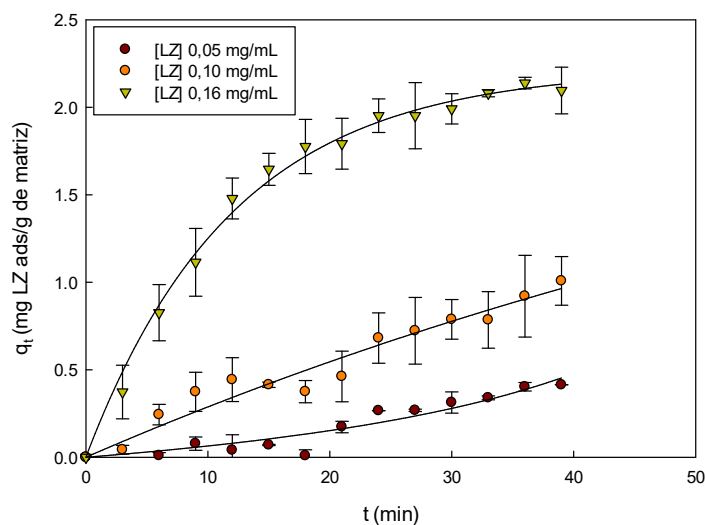


Figura 4.4: Cinéticas del proceso de adsorción de LZ sobre esferas de Alg-GG en diferentes condiciones: a) 1,5 mL Epi, Temperatura 25°C. b) 3,0 mL Epi, Temperatura 25°C. c) 1,5 mL Epi, Temperatura 6°C. d) 3,0 mL Epi, Temperatura 6°C. Medio buffer Pi 20 mM pH 7,0.

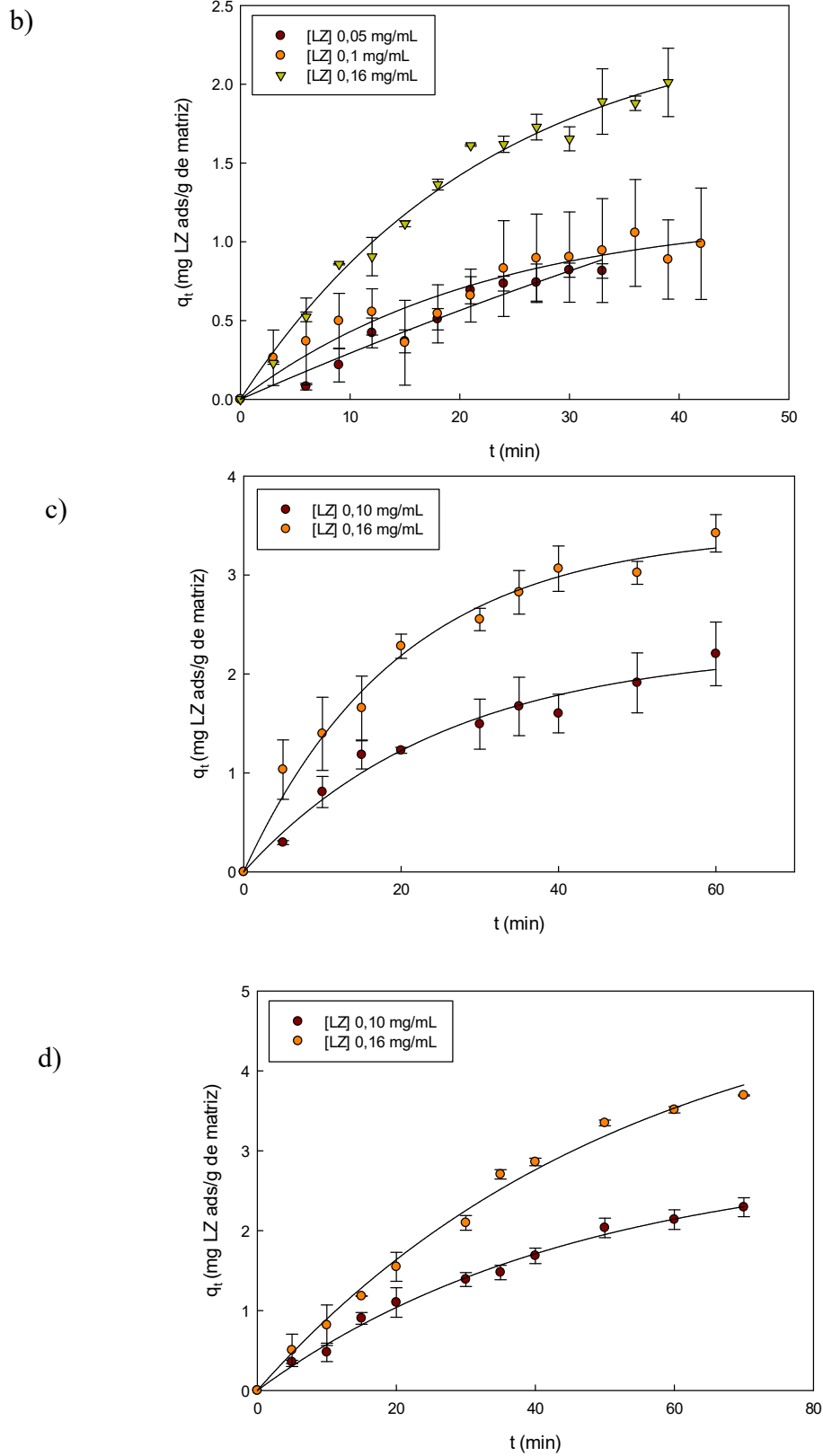


Figura 4.4 (continuación): Cinéticas del proceso de adsorción de LZ sobre esferas de Alg-GG en diferentes condiciones: a) 1,5 mL Epi, Temperatura 25°C. b) 3,0 mL Epi, Temperatura 25°C. c) 1,5 mL Epi, Temperatura 6°C. d) 3,0 mL Epi, Temperatura 6°C. Medio buffer Pi 20 mM pH 7,0.

Puede observarse que, en todos los casos, la adsorción de la proteína se incrementa con el tiempo de contacto hasta alcanzar un plateau. El punto en el que comienza el plateau es el tiempo de equilibrio necesario para lograr la adsorción máxima en estas condiciones. Se observa una elevada velocidad inicial que puede deberse a la gran disponibilidad de sitios de adsorción en la matriz porosa y a una buena accesibilidad a los mismos. La velocidad disminuye a medida que el sistema se acerca al equilibrio, lo que puede corresponderse con la disminución de los sitios disponibles en la matriz para la adsorción de más enzima o con un impedimento estérico para la unión de más enzima debido a las moléculas ya unidas en la matriz. Además, se observan diferencias en el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, tanto por efecto de la concentración inicial de enzima como la temperatura de trabajo.

Para analizar el mecanismo cinético de adsorción, los datos experimentales fueron ajustados a dos modelos: *pseudo* - primer orden y *pseudo* - segundo orden [117, 118], las ecuaciones correspondientes a cada modelo se detallaron en la sección 1.2.1.

A partir de los ajustes realizados, se pudo determinar que todos los casos siguen un comportamiento cinético de *pseudo* - primer orden. Cuando se trabajó a bajas temperaturas (6 °C), los valores de q_t resultaron: $(3,4 \pm 0,2)$ mg/g y $(3,7 \pm 0,5)$ mg/g para las matrices entrecruzadas con 1,5 mL y 3,0 mL de Epi, respectivamente. Estos valores resultaron ser superiores a los q_t obtenidos cuando se trabajó a temperatura ambiente (Tabla 4.I), corroborando lo observado experimentalmente. Sin embargo, se consideró que la proporción de mg de LZ adsorbida por g de matriz hidratada a temperaturas bajas no es lo suficientemente importante teniendo en cuenta la variable costo, ya que se necesitaría energía extra para disminuir la temperatura. Por lo tanto, se concluye que es más rentable trabajar a 25 °C y, en la tabla 4.I, se detallan los parámetros de los modelos

cinéticos y los coeficientes de correlación de regresión (R^2) a concentraciones iniciales de LZ de 0,16 mg/mL y dicha temperatura.

Tabla 4.I: Parámetros cinéticos para la adsorción de LZ sobre matriz de Alg-GG. Medio buffer Pi 20 mM pH 7,0. Concentración inicial de LZ 0,16 mg/mL. Temperatura 25°C.

Parámetros	Volumen de Epi (mL)			
	1,5		3,0	
	Modelo Cinético			
	Pseudo-primero orden	Pseudo-segundo orden	Pseudo-primero orden	Pseudo-segundo orden
q_t (mg/g)	2,20±0,04	1±23	2,4±0,2	1±6
k_1 (min^{-1}); k_2 (g/mg.min)	(8,3±0,5).10 ⁻²	0,2± 3,9.10 ⁻⁴	(4,4±0,5).10 ⁻²	(7,5±0,1).10 ⁻²
R^2	0,9934	0,9871	0,9877	0,9861
SS	0,0398	0,0779	0,0676	0,0759
[#] E_a (kcal/mol)	4,4	0,56	7,3	21,5
K_{id} (g/mg.min ^{0,5})	0,37±0,02		0,36±0,02	
C	0,01±0,11		-0,2±0,1	
R^2	0,9524		0,9674	
SS	0,2883		0,1786	

Se encontró que los valores de R^2 calculados para el modelo de *pseudo* primer orden se encuentran cercanos a 0,99, lo que demuestra la aplicabilidad de este modelo a la adsorción de LZ en matrices de Alg-GG. Los valores obtenidos para qt a partir de dicho ajuste son coincidentes con el valor experimental que se observa en las Figuras 4.6. a) y b).

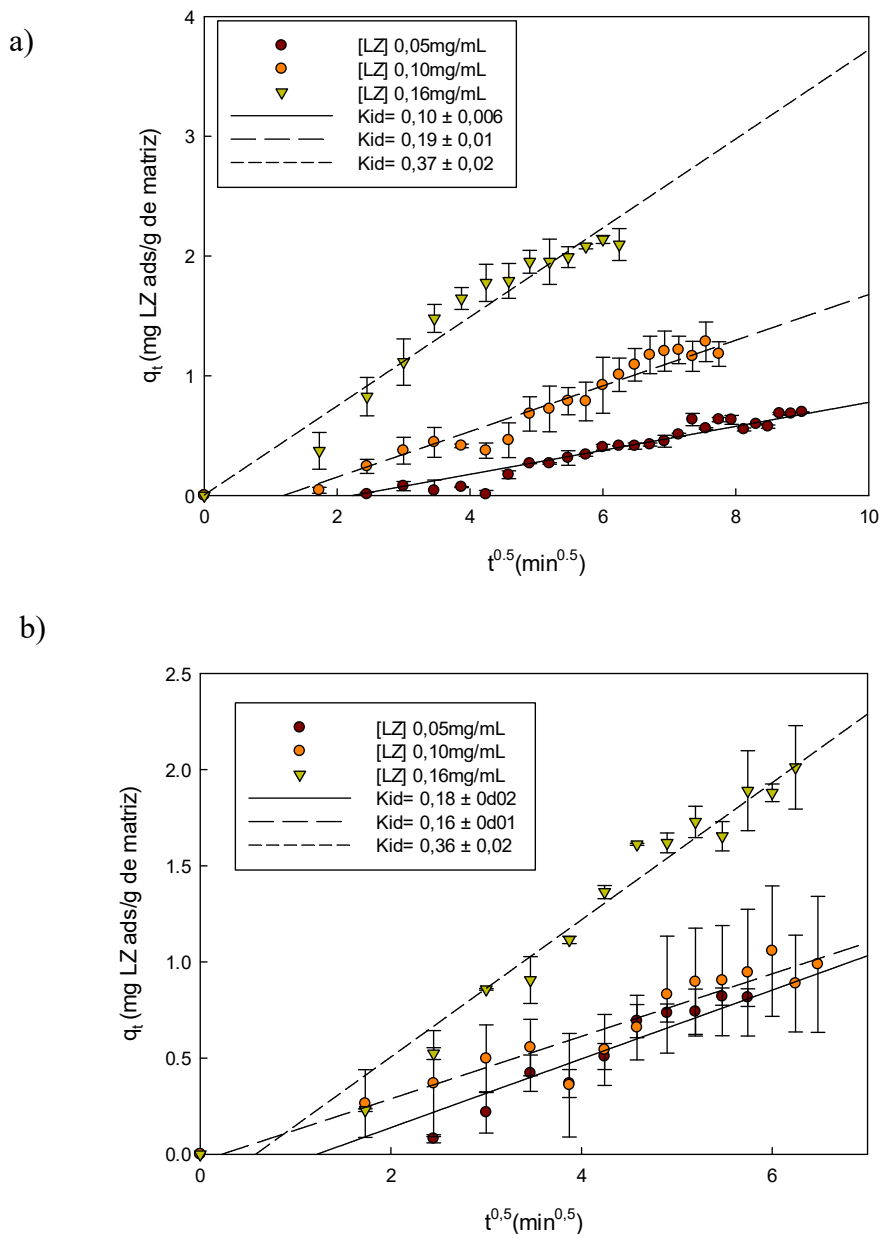
También, a partir de los datos obtenidos a dos temperaturas, se determinó la energía de activación (E_a) del proceso de adsorción, la cual se calculó utilizando la ecuación de Arrhenius:

$$\ln \frac{k_{279}}{k_{298}} = \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T^{298K}} - \frac{1}{T^{279K}} \right) \quad (27)$$

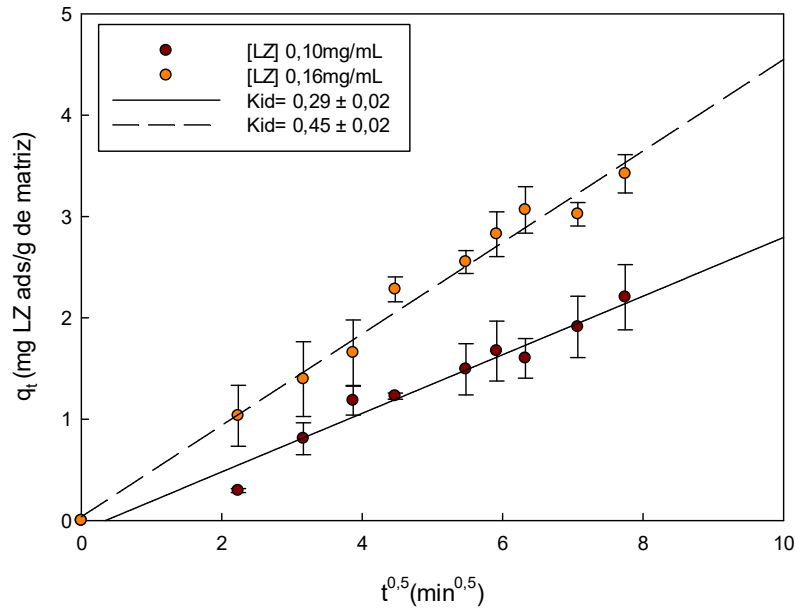
Dónde: R es la constante universal de los gases (2 cal/mol.K), T es la temperatura absoluta (K) y E_a es la energía de activación de adsorción (kcal/mol). La magnitud de E_a puede dar una idea acerca del tipo de adsorción. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 4.I. Los valores bajos de E_a obtenidos muestran una interacción física en la adsorción de LZ

sobre la matriz Alg-GG, lo cual se correlaciona con los valores de entalpía y entropía positivos obtenidos.

Posteriormente, se estudió la difusión intra-partícula, a partir de la cual se puede determinar el mecanismo molecular involucrado en el proceso de adsorción. Para lograr dicho objetivo se ajustaron los datos experimentales a una gráfica de difusión intra-partícula, según el modelo de Weber y Morris. La ecuación correspondiente a este modelo y sus derivaciones teóricas se encuentran en la sección 1.2.1. La gráfica q_t vs $t^{0.5}$ y los parámetros obtenidos se muestran en la figura 4.5 y en la tabla 4.I.



c)



d)

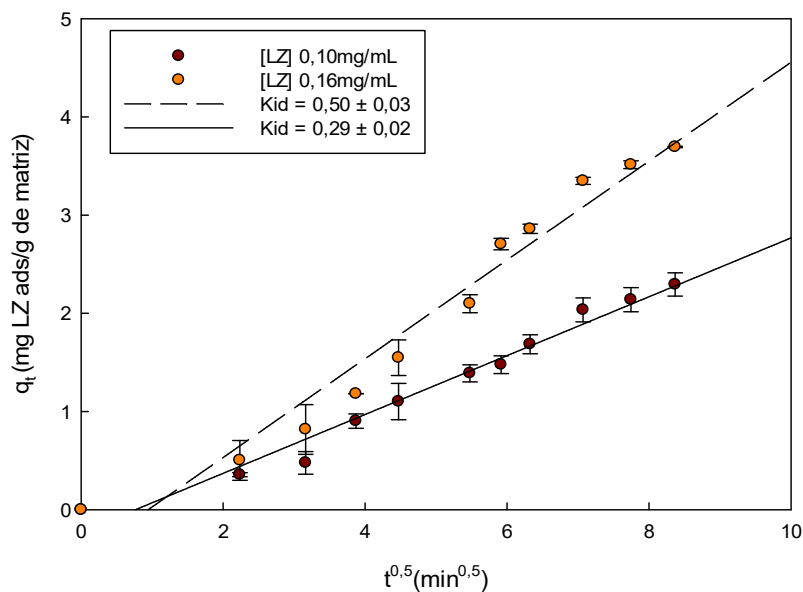


Figura 4.5: Ajuste al modelo de difusión intra-partícula de Weber-Morris en el proceso de adsorción de LZ sobre esferas de Alg-GG en diferentes condiciones: a) 1,5 mL Epi, Temperatura 25°C. b) 3,0 mL Epi, Temperatura 25°C. c) 1,5 mL Epi, Temperatura 6°C. d) 3,0 mL Epi, Temperatura 6°C. Medio buffer Pi 20 mM pH 7,0.

La linealidad en dichas gráficas afirma que el proceso cinético depende exclusivamente de la difusión de solutos a través de la matriz. También se observó que los valores obtenidos de C (cada una de las intercepciones de las gráficas lineales de la Figura 4.6 con el eje de las ordenadas; constante relacionada con el efecto de la capa

límite) fueron negativos, de lo que se deriva que la velocidad de adsorción de la LZ en estas matrices está controlada por más de un mecanismo. De acuerdo a investigaciones previas [119], en este caso, la velocidad del proceso estaría definida por el efecto combinado de la difusión a través de la capa límite y de la reacción en la superficie del adsorbente.

A partir del análisis de los valores de K_{id} obtenidos para cada sistema y presentados en la figura 4.5, se pudo concluir que el aumento en el volumen de Epi para el proceso de entrecruzamiento de la matriz no afecta la difusión de la partícula a través de la misma. Mientras que, al disminuir la temperatura del proceso de adsorción se observa un aumento en la K_{id} , lo cual representa un aumento en la velocidad de difusión de la proteína a través de la matriz.

Para finalizar con el estudio cinético, se procedió a realizar la adsorción de LZ en ambas matrices de Alg-GG, pero en este caso se agregó una concentración conocida y constante de los distintos cationes pertenecientes a la serie de Hofmeister (Li^+ , K^+ , Rb^+ y Cs^+). Para ello, primeramente, se realizaron las cinéticas en presencia de los diferentes cationes para luego ajustar los datos obtenidos a los modelos de interés. Los resultados se muestran en las figuras 4.6 y 4.7.

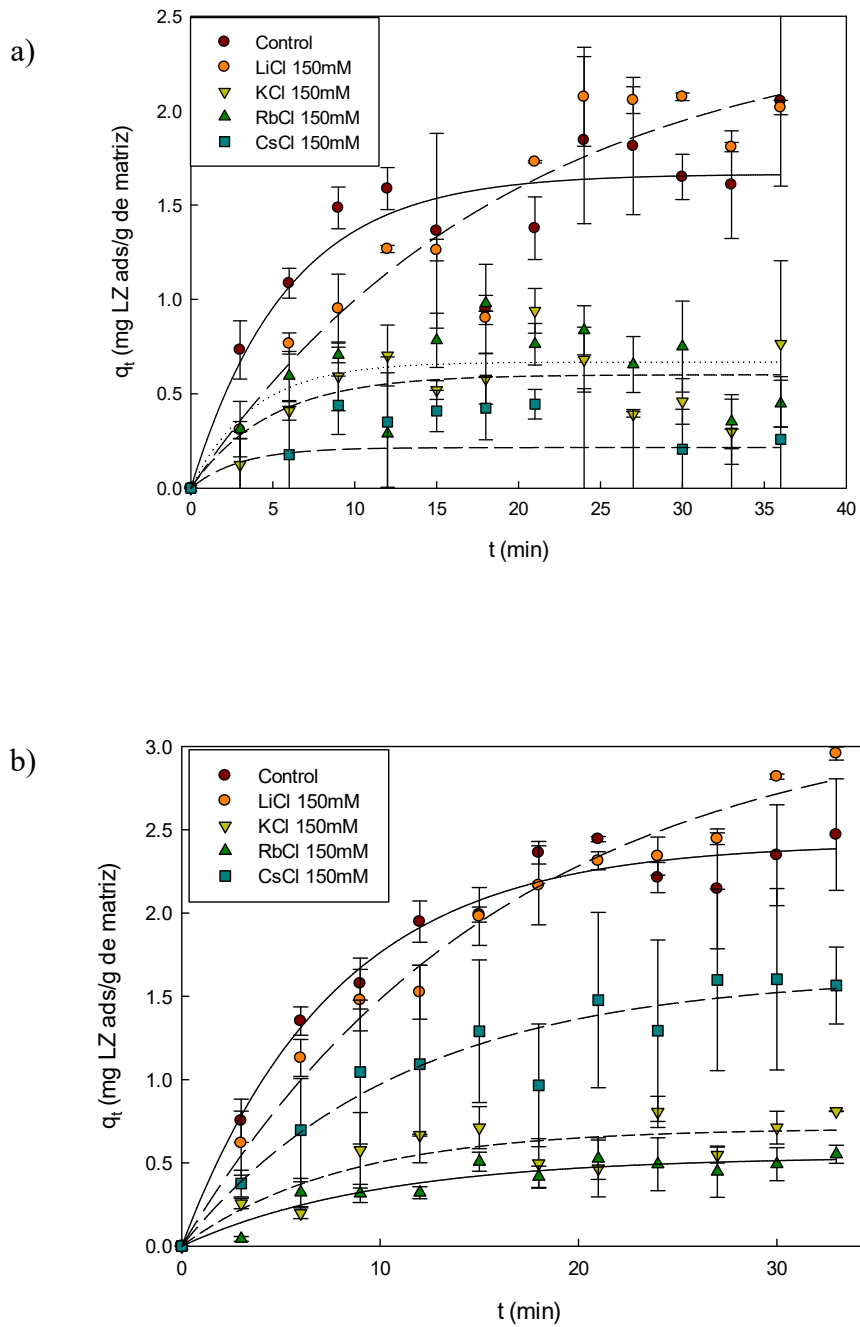


Figura 4.6: Cinéticas del proceso de adsorción de LZ sobre esferas de Alg-GG agregando cationes cloruros de la serie de Hofmeister (150 mM) en diferentes condiciones: a) 1.5 mL Epi. b) 3.0 mL Epi. Medio buffer Pi 20 mM pH 7.0. Temperatura 25°C.

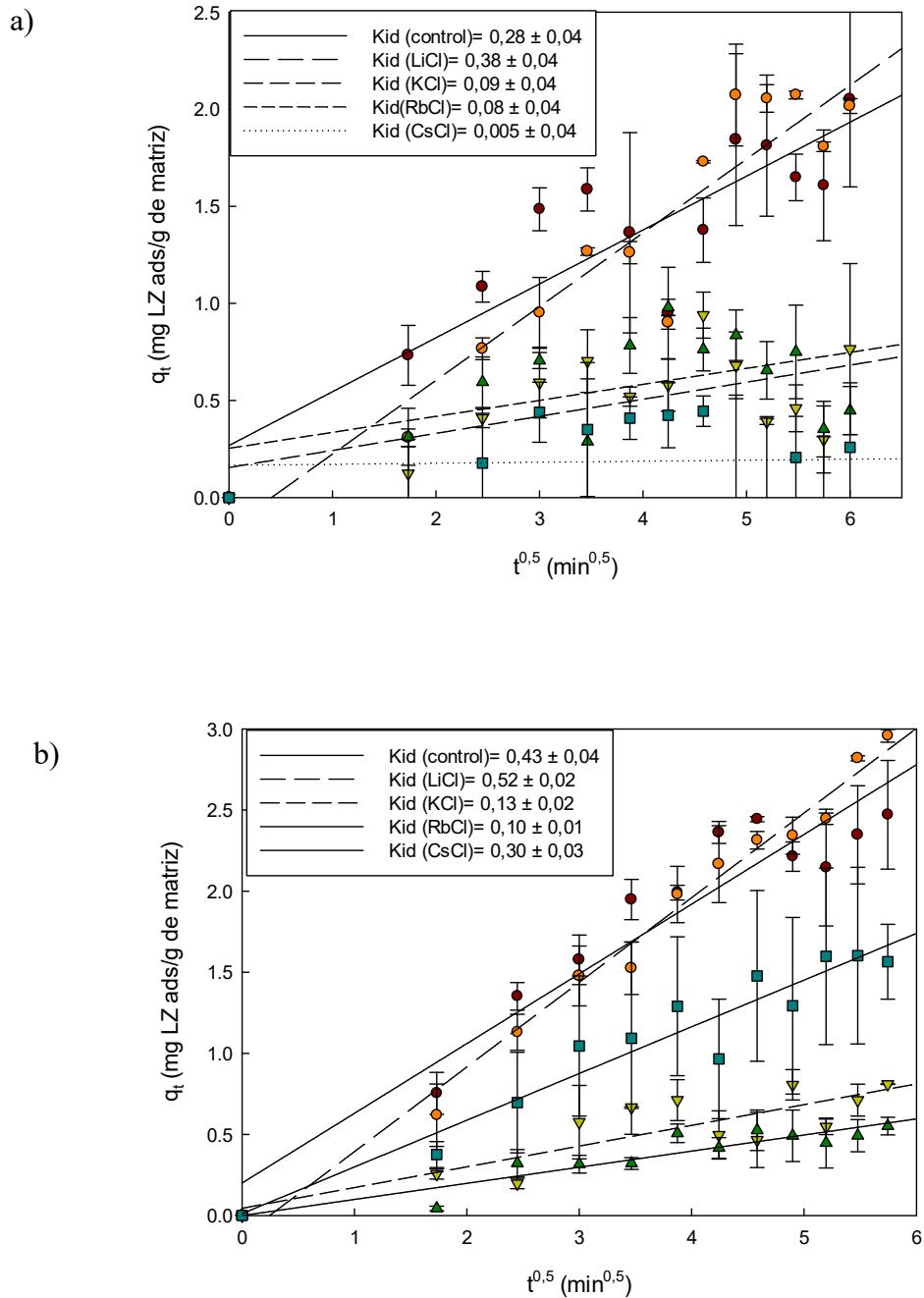


Figura 4.7: Ajuste al modelo de difusión intra-partícula de Weber-Morris en el proceso de adsorción de LZ sobre esferas de Alg-GG agregando cationes cloruros de la serie de Hofmeister (150 mM) en diferentes condiciones: a) 1.5 mL Epi. b) 3.0 mL Epi. Medio buffer Pi 20 mM pH 7.0. Concentración inicial de LZ 0.16 mg/mL. Temperatura 25°C.

A partir de los análisis efectuados sobre los datos experimentales obtenidos se puede observar que, en todos los casos, la adsorción presenta una cinética de pseudo primer orden y una notable disminución de la capacidad de adsorción de LZ sobre las

matrices con el agregado de los cationes Cs^+ , Rb^+ y K^+ , mientras que la presencia de Li^+ mantiene la capacidad de adsorción con respecto a la matriz control. También se puede concluir que los cationes de la serie de Hofmeister modifican el coeficiente de difusión en el siguiente orden: $\text{Cs}^+ < \text{Rb}^+ < \text{K}^+ < \text{Li}^+$. Esta tendencia en la movilidad, y en consecuencia en la adsorción de la proteína sobre la matriz, refleja la afinidad de los diferentes cationes a la superficie eléctrica cargada negativamente de la matriz Alg-GG. Por lo tanto, cuando un catión se encuentra poco hidratado como es el caso del Cs^+ , éste interacciona más fuertemente con la superficie eléctricamente cargada de Alg-GG y, por lo tanto, reduce la magnitud de la superficie cargada disminuyendo la difusión de la LZ a través de la superficie de la matriz. En cambio, un ion fuertemente hidratado como es el caso del Li^+ interactúa débilmente con la superficie Alg-GG y sus paredes porosas, por lo que, la difusión de la LZ a través de la pared de la matriz no se encuentra afectada.

4.2.3. Isotermas de adsorción

Como parte del estudio del proceso de adsorción se realizaron las respectivas isotermas de adsorción de LZ sobre las matrices de Alg-GG a dos temperaturas (25°C y 6°C) y también se estudiaron las isotermas a 25°C aumentando la fuerza iónica del medio, mediante el agregado de una concentración final de NaCl de 150 mM. Los resultados se muestran en las figuras 4.8 y 4.9.

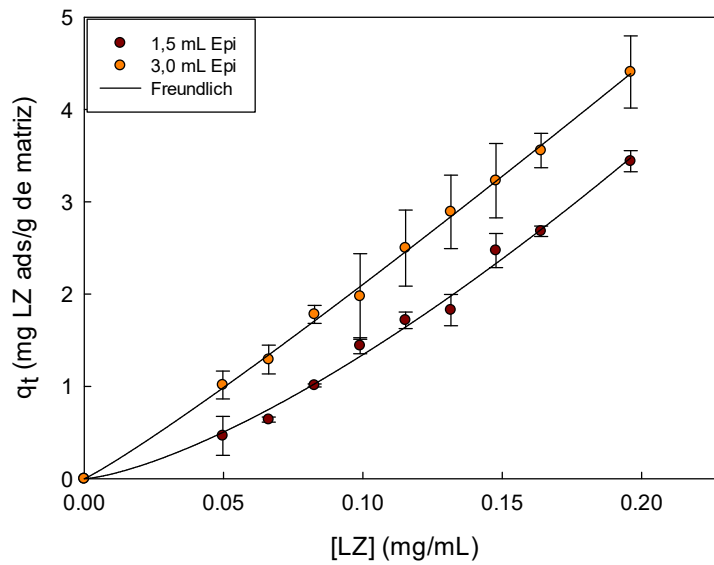


Figura 4.8: Isotermas de adsorción de LZ sobre ambas matrices de Alg-GG. Medio buffer Pi 20 mM, pH 7.0. Temperatura 6°C.

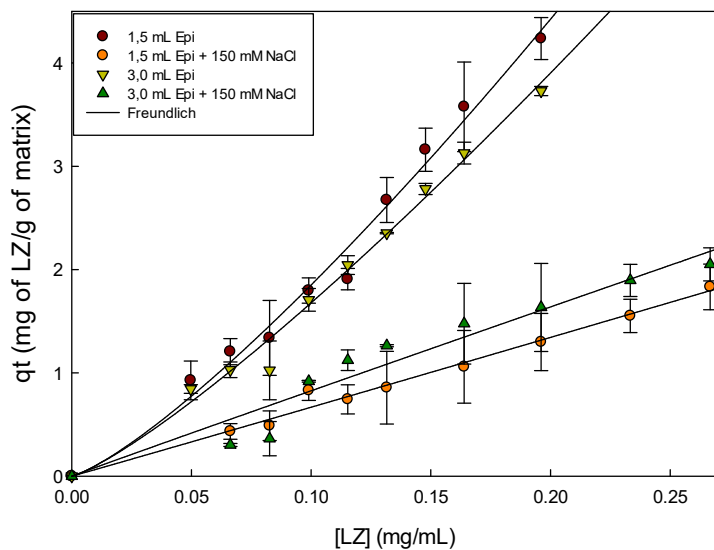


Figura 4.9: Isotermas de adsorción de LZ sobre ambas matrices de Alg-GG y variando fuerza iónica (150 mM NaCl). Medio buffer Pi 20 mM pH 7.0. Temperatura 25°C.

Puede observarse que a ambas temperaturas el proceso de adsorción sigue un modelo exponencial donde a medida que aumenta la concentración de proteína presente aumenta la capacidad de adsorción de las matrices. Se puede concluir también que a bajas temperaturas el aumento en el volumen de Epi durante la formación de las

matrices se correlaciona al aumento en la capacidad de adsorción, fenómeno que no se reproduce a 25°C.

En la figura 4.9 se verifica que un aumento de la fuerza iónica del medio, por el agregado de NaCl 150 mM, disminuye notablemente la capacidad de adsorción de las matrices a 25°C. Confirmando la existencia de un mecanismo electrostático para el proceso de adsorción en estudio.

Los datos experimentales fueron ajustados a tres modelos de adsorción: Freundlich, Langmuir y Hill, cuyas ecuaciones fueron detalladas en la sección 1.2.2.

Los parámetros determinados para cada modelo así también como las funciones termodinámicas son representados en la tabla 4.II.

Tabla 4.II: Parámetros del proceso de adsorción de LZ sobre la matriz Alg-GG a diferentes temperaturas. Medio buffer Pi 20 mM pH 7,0.

Parámetros	25°C		6°C	
	Volumen de Epi (mL)			
	1,5	3,0	1,5	3,0
Freundlich				
K_F (mg/mL)	34±5	28±4	35±4	26±1
$1/n$	1,3±0,1	1,2±0,1	1,4±0,1	1,09±0,02
R^2	0,9878	0,9891	0,9963	0,9991
SS	0,1895	0,1318	0,0774	0,0277
Langmuir				
K_L (mL/mg)	-1,5±0,3	-1,3±0,3	-2,0±0,3	-0,6±0,2
q_m (mg/g)	-10±3	-12±3	11±1	20±1
R^2	0,9875	0,9875	0,9937	0,9991
SS	0,1939	0,1521	0,1311	0,0290
Hill				
K_H (mL/mg)	N.A	0,5±1,0	0,4±0,3	N.A
q_m (mg/g)		22±42	14±13	
n		1,4±0,3	1,6±0,3	
R^2		0,9895	0,9967	
SS		0,1277	0,0686	

El análisis estadístico de la función de error (R^2) verifica que la ecuación que tiene el mejor ajuste de datos para ambos sistemas es el modelo de Freundlich a las dos temperaturas ensayadas. Este modelo concuerda con la E_a baja que se encuentra asociada

con el proceso de adsorción. El valor de K_F disminuyó con el aumento de la cadena de polisacárido reticulado por acción de la Epi, como se muestra en la tabla 4.II. Los ajustes a los modelos de Langmuir y Hill, a pesar de brindar coeficientes de regresión aceptables, mostraron parámetros anómalos, lo que demuestra que no son válidos para explicar el comportamiento del sistema en estudio.

Las funciones de estado termodinámicas (energía libre, entalpía y entropía) son indicadores importantes al estimar el mecanismo del proceso de adsorción. El coeficiente de distribución K_D refleja la capacidad de unión de una molécula a una superficie. K_D es definido a partir de la siguiente ecuación:

$$K_D = \frac{C_s}{C_{eq}} \quad (28)$$

Donde: C_s es la cantidad de soluto adsorbido en la matriz sólida (mg/g) y C_{eq} es la cantidad de adsorbato libre en solución en equilibrio con el soluto adsorbido (mg/ml). K_D puede obtenerse extrapolando C_{eq} a cero en las gráficas de $\ln(C_s/C_{eq})$ en función de C_{eq} , a ambas temperaturas [120]. La energía estándar de Gibbs (ΔG°) se estimó aplicando la siguiente ecuación:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_D \quad (29)$$

Donde: R es la constante universal de los gases (2,0 cal/molK), T es la temperatura absoluta (K) y K_D es el coeficiente de distribución de adsorbato entre la capa adsorbida y la solución. El cambio de entalpía (ΔH°) se calculó aplicando la ecuación de van't Hoff:

$$\ln \frac{K_{D,279}}{K_{D,298}} = - \frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{279} - \frac{1}{298} \right) \quad (30)$$

El cambio de entropía (ΔS°) se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (31)$$

Tanto el cambio de entalpía (ΔH , kcal/mol) como el cambio de entropía (ΔS , cal/molK) resultantes del proceso de adsorción en cada sistema se presentan en la tabla 4.III.

Tabla 4.III: Parámetros termodinámicos para el proceso de adsorción de LZ sobre matrices de Alg-GG entrecruzadas con diferente volumen de Epi agregado. Temperatura 6 °C (279 K) y 25 °C (298 K).

Vol. Epi (mL)	T(K)	K_D	ΔG° (kcal/mol)	ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (cal/mol.K)
1,5	279	1,6±0,5	-0,3	7,3	27,0
	298	3,7±0,4	-0,8		
3,0	279	4,0±0,1	-0,8	1,0	5,0
	298	4,5±0,6	-0,6		

Se puede observar que el ΔH fue positivo, indicando que el efecto conductor de la adsorción de LZ estaría dado principalmente por el denominado efecto hidrofóbico: desorden del agua estructurada en el interior de los poros del adsorbente, inducido por la difusión de la enzima a través de esos canales. A su vez, el ΔS positivo confirma el mecanismo antes descrito. Se puede observar que el aumento en el volumen de Epi durante la formación de la matriz induce una disminución en ambos parámetros termodinámicos, lo cual puede deberse a una estructura más cerrada de la matriz, donde el desorden del agua estructurada en el interior de los poros es menor.

4.2.4. Determinación de las condiciones de desorción

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante las experiencias realizadas para la determinación de las condiciones de adsorción, principalmente durante el estudio de las isothermas, donde se planteó el aumento de la fuerza iónica del medio y se observó una disminución de la capacidad de adsorción de LZ sobre las matrices de Alg-GG, se planteó utilizar esta condición para la desorción de la enzima de interés. En la tabla 4.IV se representan los % de desorción obtenidos al incrementar la fuerza iónica del sistema.

Tabla 4.IV: % Adsorción y % Desorción de LZ en los sistemas en estudio.
Medio buffer Pi 20 mM pH 7,0. Concentración inicial de LZ 0,16 mg/mL. Temperatura 25°C.

Volumen de Epi (mL)	150 mM NaCl		300 mM NaCl	
	%Adsorción	%Desorción	%Adsorción	%Desorción
1,5	47 ± 2	77 ± 13	55 ± 5	91 ± 5
3,0	87 ± 10	88 ± 10	90 ± 3	96 ± 2

Puede concluirse que, de las condiciones ensayadas, el mejor buffer de desorción es el Pi 20 mM pH 7,0 con el agregado de 300 mM de NaCl, con el cual se obtiene un 96 ± 2 % de LZ desorbida. Estos resultados avalan nuevamente la suposición de un mecanismo electrostático de interacción entre la enzima y la matriz.

Una vez determinada la mejor condición para la liberación de la enzima, se procedió a estudiar el tiempo requerido para alcanzar el máximo de desorción. La figura 4.10 muestra los resultados obtenidos:

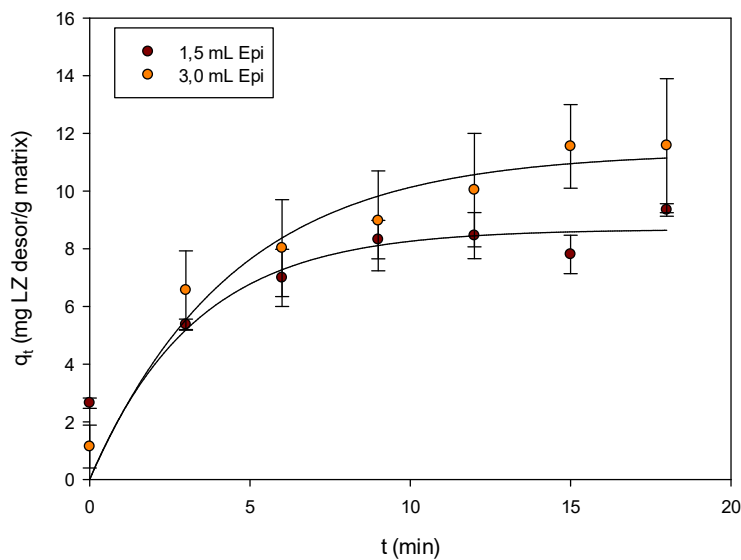


Figura 4.10: Cinéticas del proceso de desorción de LZ sobre ambas matrices de Alg-GG.
Buffer de desorción: Pi 20 mM pH 7.0 + NaCl 300 mM. Temperatura 25°C.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la cinética del proceso de desorción es rápida, alcanzando el equilibrio a los 10 minutos de incubación. Los

resultados están de acuerdo con los obtenidos para otros sistemas, donde el proceso de desorción es mucho más rápido que la adsorción [16].

4.2.5. Reutilización de la matriz

Finalmente, los resultados obtenidos fueron integrados para la realización de ciclos sucesivos de adsorción-lavado-desorción utilizando siempre la misma alícuota de matriz. Cabe destacar que el paso de lavado es muy importante para poder verificar la eliminación completa de enzima adsorbida inespecíficamente así también como impurezas. Se utilizó para los lavados el mismo buffer que se utiliza para la etapa de adsorción (Pi 20 mM pH 7,0). La tabla 4.V muestra los valores obtenidos luego de cada ciclo.

Tabla 4.V: Porcentajes de LZ adsorbidas en ciclos consecutivos de utilización de ambas matrices de Alg-GG. Medios: buffer Pi 20 mM pH 7,0 y buffer Pi 20 mM pH 7,0 + NaCl 300 mM. Temperatura 25°C.

Ciclos	% Adsorción	
	Volumen de Epi (mL)	
	1,5	3,0
1	46 ± 1	49 ± 1
2	43 ± 3	44 ± 2
3	45 ± 4	44 ± 1
4	39 ± 3	36 ± 3
5	40 ± 1	33 ± 3

A través de los resultados obtenidos se puede concluir que los valores de adsorción se mantienen prácticamente constantes durante los 5 ciclos, disminuyendo levemente en los últimos dos. Es importante aclarar que los valores de % de adsorción obtenidos en esta experiencia son inferiores a los obtenidos en la primera experiencia realizada en este trabajo. Esto puede ser justificado en que las matrices son realizadas en cantidades determinadas a medida que se realizan las experiencias y existen variables externas que pueden afectar su producción y resultar en una disminución de la capacidad de adsorción

de las mismas. Por este motivo, es importante tener mucho cuidado durante el paso de obtención de las matrices.

4.3. Aplicación de los resultados obtenidos

Se llevó a cabo un ciclo de adsorción-lavado-desorción de una solución de clara de huevo en buffer Pi 20 mM pH 7,0, utilizando las mejores condiciones obtenidas a lo largo de este trabajo. Posteriormente, se sembraron alícuotas iguales de cada uno de los pasos del ciclo en un gel de poliacrilamida. A partir de la realización de la electroforesis de proteínas indicada se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 4.11.

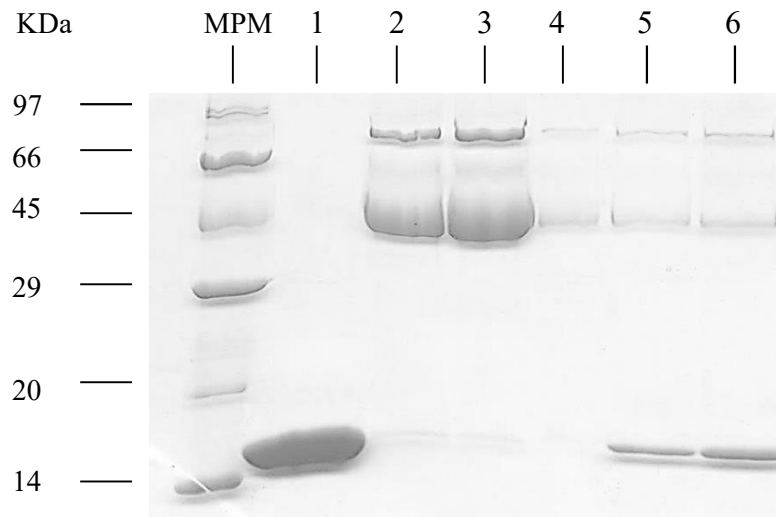


Figura 4.11: Gel de poliacrilamida obtenida luego de la adsorción-desorción de LZ a partir de clara de huevo. Buffer Pi 20 Mm pH 7,0. Temperatura 25°C. **Calle 1:** LZ pura 10 mg/mL, **Calle 2:** Clara Huevo dilución 1/5. **Calle 3:** SN adsorción batch dilución 1/10. **Calle 4:** SN adsorción batch dilución 1/100. **Calle 5:** Desorción matrices en batch. **Calle 6:** Desorción matrices en batch concentrado 3 veces por ultracentrifugación.

A partir de estos resultados se puede concluir una marcada purificación de LZ de clara de huevo. Se observa otra banda que según el PM puede deberse a la presencia de ovoalbúmina (PM 45,0 kDa), proteína mayoritaria en la clara de huevo.

4.4. Adsorción en lecho empacado: funcionalidad de la columna para el proceso de captación de LZ

Una vez determinadas las condiciones óptimas de la matriz y el sistema en batch para la adsorción de LZ en macroesferas de Alg-GG, se comenzó el análisis del comportamiento de la enzima que se pretende purificar por adsorción en lecho empacado. La matriz se empaquetó en una columna 5 mm de diámetro y 100 mm de alto con el mismo buffer usado en experimentos de adsorción en batch (Pi 20 mM, pH 7,0) y se analizaron la variación de la altura del lecho (Z), el flujo (Q_v) y la concentración inicial de LZ (C_0):

4.4.1. Efecto de la altura del lecho

Se estudió la variación de Z (3,0, 6,0 y 9,0 cm) en las curvas de ruptura a una Q_v constante de 0,4 ml/min y una C_0 de 10,0 mg/ml y los resultados se observan en la Fig. 4.12. Cuando la solución de LZ pasa a través del lecho, la zona de adsorción se mueve fuera de la columna y la concentración de LZ comienza a aumentar con el tiempo. Los resultados presentados en la Tabla 4.VI indican que t_b , $t_{0.5}$ y t_s aumentaron con el aumento de Z . Esto se debe a la disponibilidad de más sitios de unión para la adsorción a mayores alturas de lecho dando lugar a un aumento en la MTZ [32]. Podemos concluir que, a mayor Z , mayor adsorción de LZ, lo que se debe al aumento del número de sitios activos del adsorbato para unir proteína.

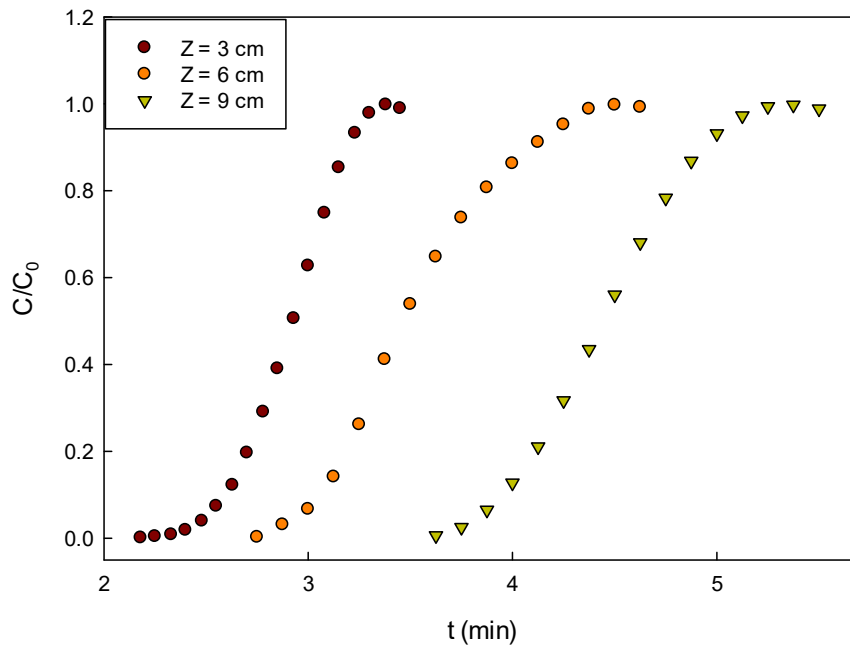


Figura 4.12: Curvas de ruptura experimentales para la altura del lecho (cm) a un caudal de 0,4 ml/min y una concentración inicial de LZ de 10 mg/ml. Medio buffer Pi 20 mM pH 7.0. Temperatura 25°C.

4.4.2. Efecto del caudal

Se estudió la variación de Q_v (0,2; 0,3 y 0,4 ml/min) a Z (9,0 cm) y C_0 (10,0 mg / ml) constantes. La curva de ruptura de C/C_0 en función del tiempo con Q_v variable se representa en la Fig. 4.13. Los resultados indican que al disminuir Q_v a Z constante aumenta el t_b . El $t_{0.5}$ se tomó de las curvas, porque todas las curvas mostraron ser simétricas, por lo que los datos encontrados se muestran en la Tabla 4.VI. El tiempo de residencia del soluto dentro de la columna es un parámetro importante en el diseño del procedimiento de adsorción en lecho empacado. La transferencia de masa externa controlará el proceso cuando el Q_v sea muy bajo; por el contrario, un Q_v más alto dificultará la difusión intra-partícula en el sistema. Es decir, cuando el Q_v es alto, no todos los solutos en la solución tendrán tiempo suficiente para penetrar y reaccionar con los grupos funcionales, lo que generalmente resulta en un t_b más corto [121].

El aumento de Q_v da como resultado una disminución de t_b , $t_{0.5}$ y t_s , así como de q_b , $q_{0.5}$ y q_s . El Q_v más bajo ofrece el tiempo adecuado para que las moléculas de LZ

penetren en los poros del lecho, lo que da como resultado curvas de ruptura progresivas, como se muestra en la Fig. 4.13. La disminución de q_b a mayor Q_v puede atribuirse a un tiempo de contacto insuficiente entre el adsorbato y el soluto.

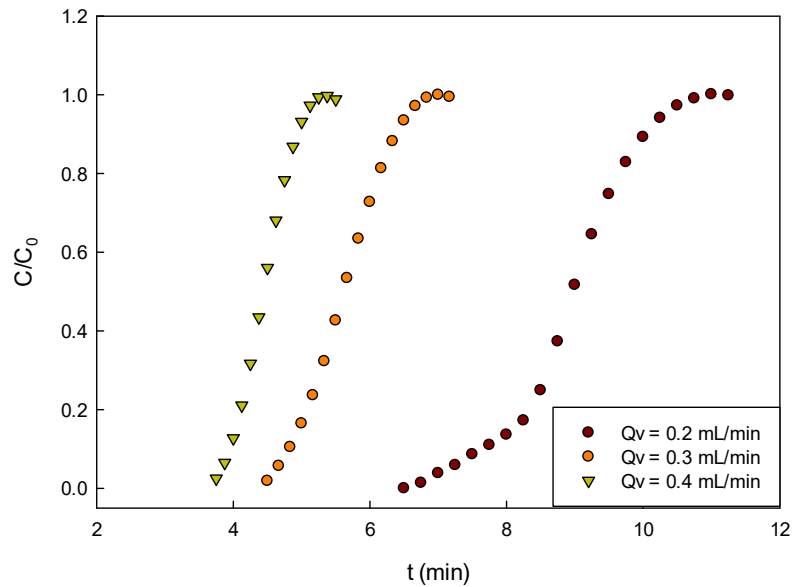


Figura 4.13: Curvas de avance experimentales: efecto de la velocidad de flujo para la adsorción de LZ, columna de longitud 9,0 cm, concentración inicial de LZ 10mg/ml. Medio buffer Pi 20 mM pH 7,0. Temperatura 25°C.

4.4.3. Efecto de la concentración inicial de LZ

El efecto de C_0 (3,0; 5,0 y 10,0 mg/mL) en las correspondientes curvas de ruptura a Z (9,0 cm) y a Q_v (0,4 ml/min) constantes, se observan en la Fig. 4.14. Como se observa en la Tabla 4.VI., los t_b , $t_{0.5}$ y t_s disminuyeron al aumentar el C_0 , ya que una alta concentración conduce a una rápida saturación del lecho. Esto, a su vez, conducirá a curvas de rupturas más pronunciadas, como se observa en la Fig. 4.14, obteniéndose la máxima adsorción de LZ con el C_0 más alto. En este caso, la fuerza impulsora para la adsorción es la diferencia de concentración entre la proteína en el adsorbente y en la solución. Esto significa que, un gradiente de concentración menor provoca un transporte más lento, disminuyendo el coeficiente de difusión [122]. En cambio, a una C_0 más alta,

el adsorbente se satura temprano ya que los sitios de unión se saturan rápidamente en la columna, conduciendo a menores t_b , $t_{0.5}$ y t_s .

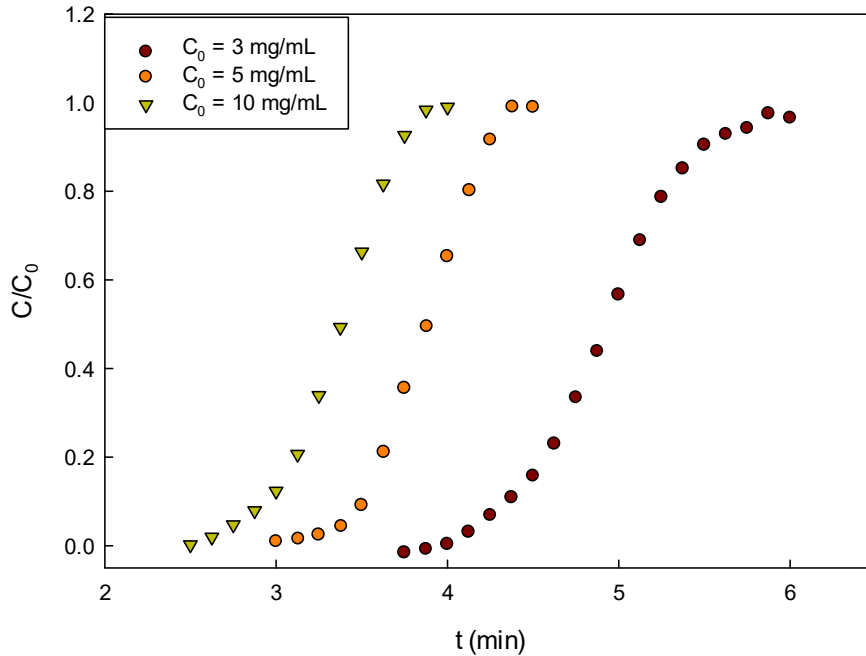


Figura 4.14: Curvas de avance experimentales para la concentración de LZ de entrada variable (mg/L) a la altura de lecho de 9,0 cm y caudal de 0,4 mL/min. Medio buffer Pi 20 mM pH 7,0. Temperatura 25°C.

Tabla 4.VI: Datos experimentales obtenidos con diferentes alturas de lecho, flujos y concentraciones iniciales de proteína.

C_0 (mg/ml)	Q_v (ml/min)	t_b (min)	$t_{0.5}$ (min)	t_s (min)	Matriz (g)	Z (cm)	q_b (mg/g)	$q_{0.5}$ (mg/g)	q_s (mg/g)
10,0	0,4	2,50	2,92	3,25	0,8380	3,0	11,93	13,93	15,51
10,0	0,4	2,94	3,50	4,25	1,1664	6,0	10,08	12,00	14,57
10,0	0,4	3,82	4,45	5,00	1,8405	9,0	8,30	9,67	10,87
5,0	0,4	3,35	3,90	4,33	1,8405	9,0	3,64	4,24	4,71
3,0	0,4	4,12	4,90	5,74	1,8405	9,0	2,69	3,19	3,74
10,0	0,3	4,61	5,60	6,55	1,8405	9,0	7,51	9,13	10,67
10,0	0,2	6,96	9,00	10,3	1,8405	9,0	7,56	9,78	11,19

4.5. Modelización matemática de las curvas de rupturas

Las curvas de rupturas obtenidas con diferentes Z, Q_v y C_0 se describieron utilizando diferentes modelos matemáticos que se detallan a continuación:

- *El modelo de Thomas:* es uno de los modelos de adsorción más general y ampliamente utilizado para describir datos de curva de ruptura. Este modelo asume la cinética de Langmuir de adsorción-desorción y la no dispersión axial, y se deriva de la

suposición de que la adsorción es la fuerza impulsora de la velocidad [39]. Las constantes del modelo de Thomas (q_s y k_{TH}), determinadas en diferentes condiciones, junto con los coeficientes de correlación, se presentan en la Tabla 4.VI. La constante de velocidad (k_{TH}), que caracteriza la velocidad del soluto transferido desde la fase líquida a la sólida, aumenta con la disminución de Z , aumentando Q_v y disminuyendo C_0 . Por el contrario, la concentración máxima del soluto fase sólida (q_s) mostró una tendencia inversa (Tabla 4.VII). Este resultado fue el esperado para sistemas de inmovilización, ya que altas constantes velocidad generalmente muestran una menor utilización del verdadero potencial de adsorción del lecho debido a la posible resistencia intra-partícula. Resultados similares se obtuvieron durante la adsorción de fenol por lodos activados inmovilizados [123]. También debe señalarse que el modelo de Thomas predijo razonablemente los valores de captación de LZ y se ajustó bien a los datos experimentales con altos coeficientes de correlación.

- *Modelo de Yoon-Nelson*: este modelo asume que la velocidad de disminución en la probabilidad de adsorción para cada molécula de adsorbato es proporcional a la probabilidad de adsorción del adsorbato y la probabilidad de avance del adsorbato en el adsorbente [39]. Como se muestra en la Tabla 4.VII, el $t_{0.5}$ aumentó y la constante de velocidad (k_{YN}) disminuyó al aumentar Z , disminuyendo Q_v y disminuyendo C_0 . La $t_{0.5}$ obtenida con el modelo de Yoon-Nelson coincidió muy bien con los datos experimentales. Además, el modelo predijo muy bien las curvas de ruptura con altos coeficientes de correlación.

- *Modelo de dosis-respuesta modificado* [39]: este modelo minimiza el error que resulta del uso del modelo de Thomas, especialmente con tiempos de curvas de rupturas más altos y más bajos. En la Tabla 4.VII se puede observar que la constante del modelo (a_{mdr}) aumenta al aumentar Z , disminuir Q_v y disminuir C_0 . Aunque la concentración

máxima de soluto en fase sólida (q_s) pronosticada por el modelo modificado de dosis-respuesta mostró la misma tendencia predicha por el modelo de Thomas, los valores predichos no coinciden exactamente con los valores de captación experimental. Por lo cual, podemos concluir que este no es el mejor modelo para la predicción de los datos experimentales.

Tabla 4.VII Parámetros de los modelos de Thomas, Yoon – Nelson y dosis-respuesta modificado con diferentes alturas de lecho, flujo y concentraciones iniciales de LZ.

Z (cm)	Q_V (mL/min)	C_0 (mg/mL)	Modelo de Thomas				Modelo de Yoon-Nelson				Modelo Dosis Respuesta Modificado			
			k_{TH}	q_s	R^2	Σ^2	k_{YN}	$t_{0.5}$	R^2	Σ^2	a_{ndr}	q_s	R^2	Σ^2
3	0.4	10	0.8007	13.98	0.9962	0.00063	16.2389	2.59	0.9932	292.87	20.994	13.94	0.9968	0.00053
6	0.4	10	0.4342	11.99	0.9949	0.00077	19.8664	3.05	0.9988	12.42	15.055	11.95	0.9971	0.00044
9	0.4	10	0.4406	9.65	0.9987	0.00019	7.1684	4.26	0.9959	0.46	19.641	9.63	0.9982	0.00027
9	0.4	5	1.297	4.21	0.9956	0.00075	4.2625	4.09	0.9963	4.18	22.461	4.20	0.9970	0.00052
9	0.4	3	1.3138	3.21	0.9989	0.00017	17.4783	4.33	0.9975	13.78	19.320	3.21	0.9992	0.00013
9	0.3	10	0.2787	9.15	0.9984	0.00023	5.9866	5.16	0.9916	1.77	15.685	9.13	0.9973	0.00039
9	0.2	10	0.2019	9.75	0.9978	0.00036	3.0849	8.1	0.9711	0.72	18.438	9.73	0.9964	0.00061

Las curvas de ruptura predichas con los tres modelos examinados se muestran en las Figuras 4.15, 4.16 y 4.17.

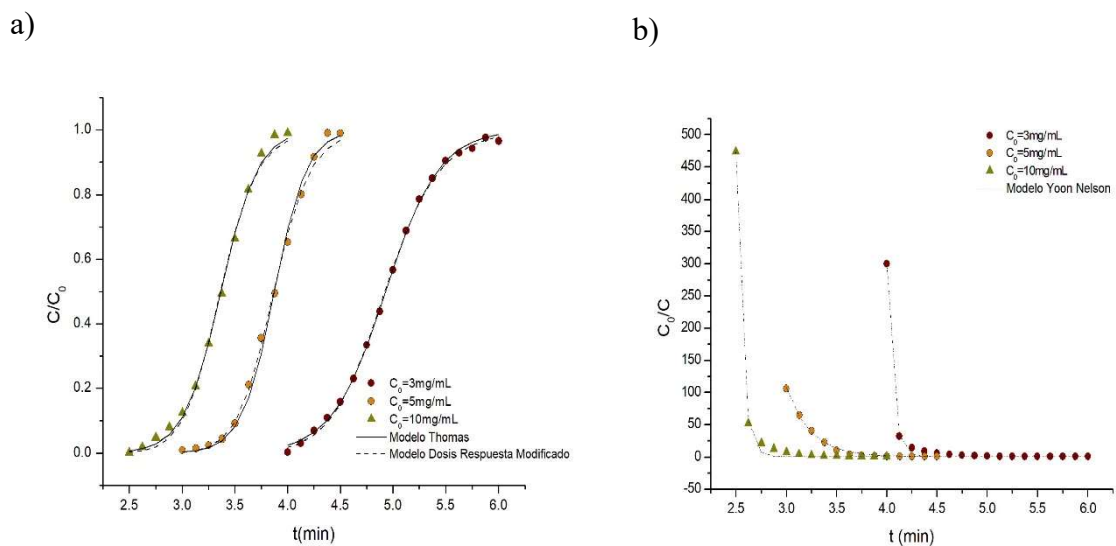


Figura 4.15: Curvas de ruptura experimentales y ajustadas para la altura del lecho (cm) a un caudal de 0,4 ml / min y 10 mg / ml de concentración inicial de LZ. a) Modelos de Thomas y Yoon-Nelson. b) Modelo de dosis-respuesta modificado. Temperatura 25 °C.

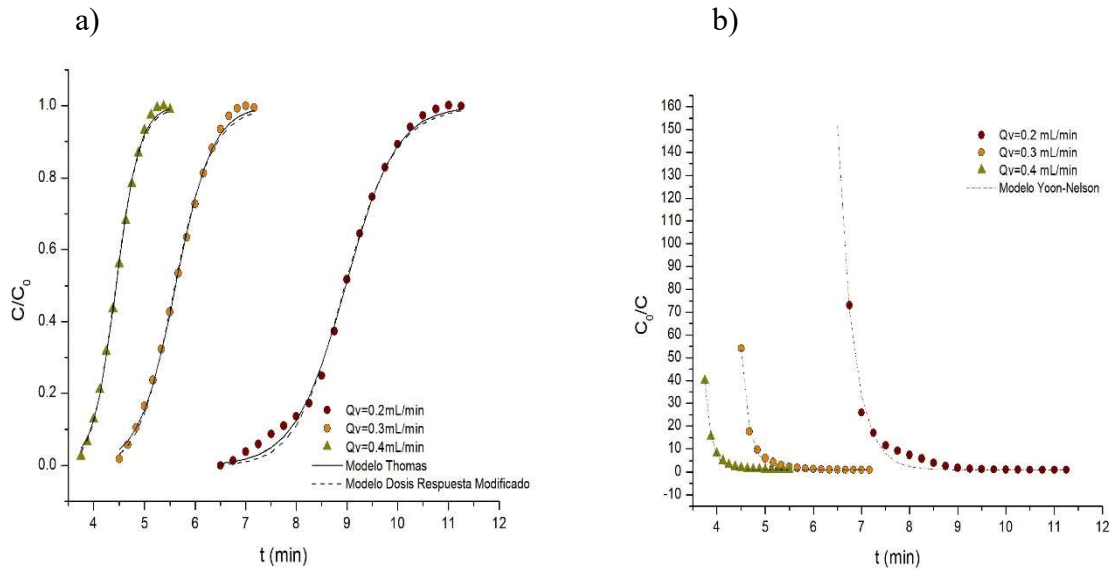


Figura 4.16: Curvas de ruptura experimentales y ajustadas: efecto del flujo para la adsorción de LZ, altura del lecho 9,0 cm, concentración inicial de LZ 10 mg/ml. a) Modelos de Thomas y Yoon-Nelson. b) Modelo de dosis-respuesta modificado. Temperatura 25 °C.

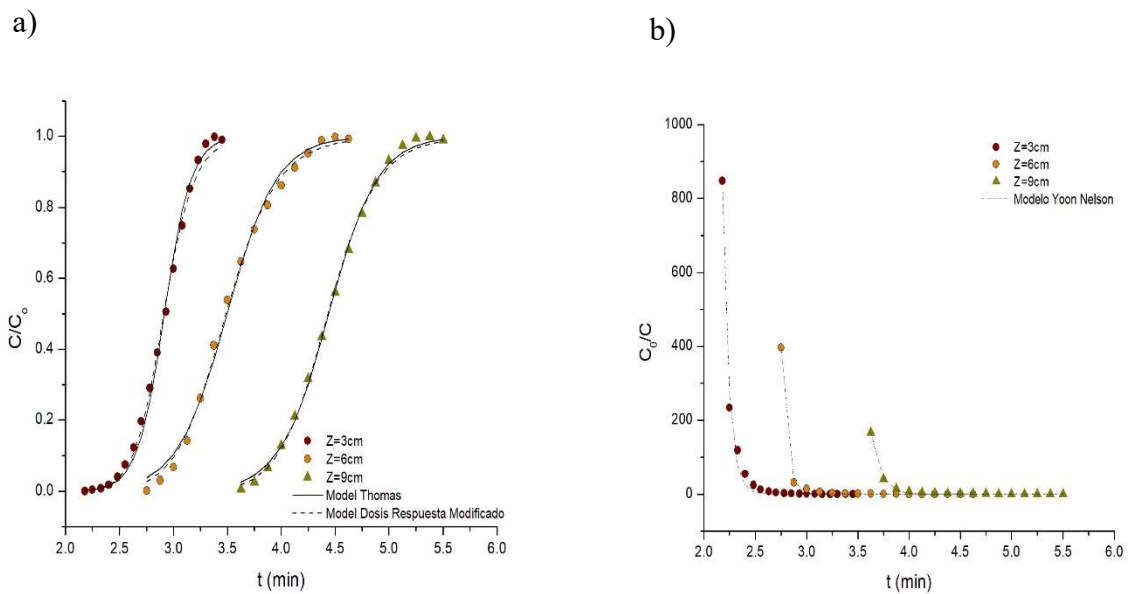


Figura 4.17: Curvas de ruptura experimentales y ajustadas para variar la concentración inicial de LZ (mg/mL) a la altura del lecho de 9,0 cm y un caudal de 0,4 mL/min. a) Modelos de Thomas y Yoon-Nelson. b) Modelo de dosis-respuesta modificado. Temperatura 25 °C.

- *Modelo de tiempo de servicio de la altura del lecho (BDST) [36, 122]:* este modelo se basa en la suposición de que la velocidad de adsorción está controlada por la

reacción superficial entre el adsorbato y la capacidad residual del adsorbente. Se utiliza para la descripción de la parte inicial de la curva de ruptura, que relaciona C/C_0 con el tiempo, t , para una columna adsorbente de flujo continuo. De la linealización de la ecuación de Bohart y Adams, detallada en la sección 1.3, se pudo obtener la Figura 4.18 que muestra la representación lineal del modelo BDST para la adsorción de LZ en un lecho de Alg-GG a diferentes relaciones de C/C_0 (0,10, 0,30, 0,50, 0,75 y 0,99), C_0 10 mg/ml, Q_v 0,4 ml/min a las diferentes Z estudiadas.

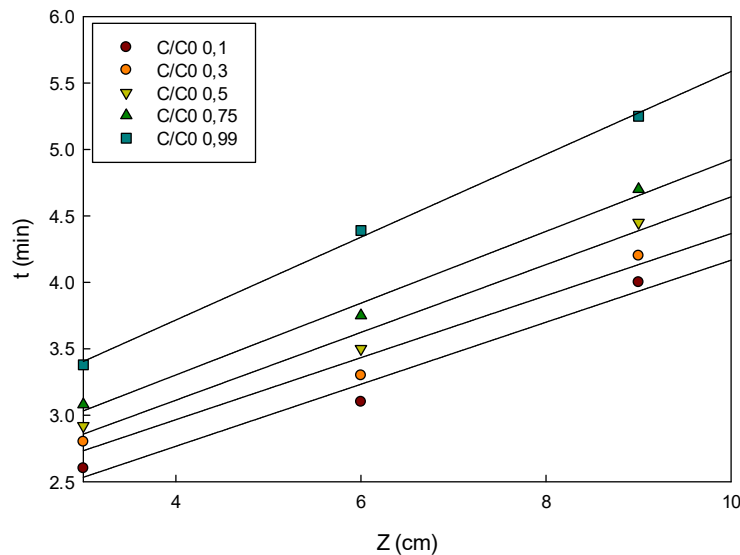


Figura 4.18: Representación lineal del modelo BDST. Velocidad de flujo de 0,4 ml/min, [LZ] inicial 10mg/ml. Medio buffer Pi 20 mM pH 7.0. Temperatura 25°C.

De los valores de la pendiente e intercepción de cada una de las líneas del ajuste se calcularon los parámetros del modelo; los resultados se muestran en la tabla 4.VIII. Se observa un ajuste satisfactorio de los datos experimentales ($R^2 > 0.9735$ y $SS < 0.0260$).

Tabla 4.VIII: Parámetros de Adams-Bohart obtenidos empleando análisis de regresión lineal. Los datos han sido tomados de la Fig. 4.19.

C/C_0	Z_0 (cm)	U (cm/min)	k_{BA} (mL/mg.min)	N_0 (mg/mL)	R^2	Σ^2
0,10	7,9565	2,04	0,1201	4,69	0,9735	0,0267
0,30	8,8261	2,04	0,1659	4,69	0,9735	0,0267
0,50	8,2078	2,04	0,1859	5,20	0,9808	0,0228
0,75	8,2333	2,04	0,1936	5,50	0,9901	0,0131
0,99	7,9677	2,04	0,1856	6,32	0,9978	0,0037

Como se muestra en la tabla 4.VIII, los valores de N_0 aumentan con el aumento de la relación C/C_0 como consecuencia de la mayor saturación de la matriz por unidad de masa. Los valores de k_{BA} aumentaron con los incrementos de la relación C/C_0 , lo que es una prueba de que no todos los sitios activos en el lecho tienen la misma afinidad por la LZ, por lo que los sitios con baja afinidad necesitan alta concentración de LZ para ser ocupados. Estos resultados muestran que la cinética del sistema global está dominada por la transferencia de masa externa en el 50% o más de la adsorción en la columna [124], lo que permite un excelente ajuste de las curvas de ruptura experimentales. Un comportamiento similar fue informado por García-Mateos et al. [125]. La altura del lecho (Z_0) se calculó a partir de la ecuación (18) de la sección 1.3 ajustando $t = 0$ mientras que C/C_0 varió entre 0,10 a 0,99. Dichos valores de Z_0 para las diferentes condiciones calculadas se muestran en la Tabla 4.VIII. Se puede observar que la altura del lecho teórico mínimo varía ligeramente dependiendo de la zona de la ruptura de cada relación C/C_0 . Esto es prueba de que el modelo BDTS mostró un ajuste adecuado de los datos experimentales en el rango de condiciones ensayadas.

4.6. Aplicación de los resultados obtenidos para la purificación de LZ sobre lecho empacado

Para la purificación de LZ a partir de clara de huevo, se llevó a cabo un ciclo de adsorción-lavado-desorción (Figura 4.19). Para dicho objetivo se utilizaron las

condiciones de trabajo óptimas determinadas en las etapas anteriores del trabajo: [Alg] 0.6% P/V para la producción de la matriz Alg-GG, 1,5mL de Epi para el entrecruzamiento químico, buffer Pi 20 mM pH 7,0 a 25 °C para la adsorción y buffer Pi 20 mM pH 7,0 + 300 mM NaCl a 25 °C para la desorción. Las partes alicuotadas de cada etapa se separaron y después se analizaron mediante SDS-PAGE. La Figura 4.20 muestra la purificación de LZ. El carril correspondiente a la etapa de desorción muestra la banda predominante correspondiente a LZ con una cantidad menor de proteínas contaminantes.

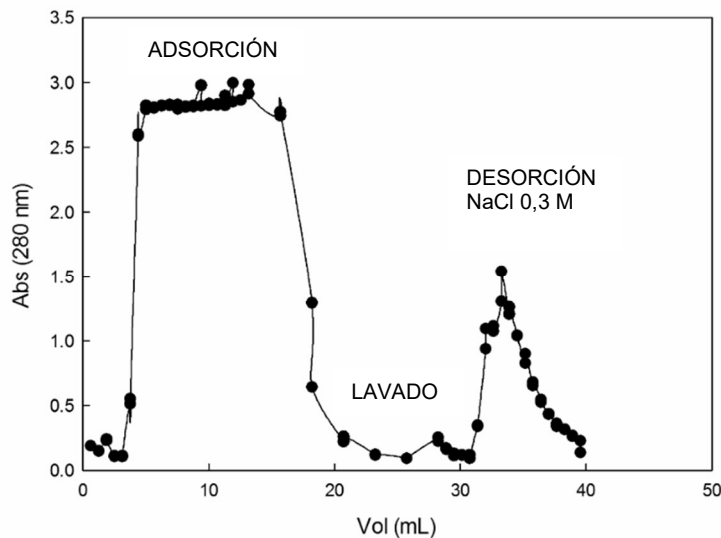


Figura 4.19: Ciclo de adsorción-lavado-desorción de la clara de huevo.

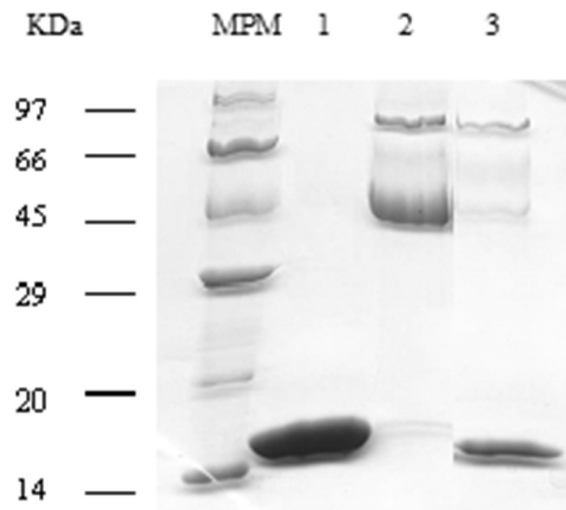


Figura 4.20: SDS-PAGE obtenido luego de la adsorción de LZ a partir de clara de huevo. Buffer Pi 20 Mm pH 7.0. Temperatura 25°C. **Calle 1:** LZ pura 10,0 mg/mL. **Calle 2:** Clara Huevo dilución 1/5. **Calle 3:** proteínas presentes en el pico de desorción concentrado 3 veces por ultracentrifugación.

Para reducir el costo del proceso y la dependencia del mismo con el suministro continuo del adsorbente, es importante regenerarlo. La columna se regeneró y se reutilizó diez veces durante dos semanas (10 ciclos consecutivos) para evaluar su capacidad de adsorción. El Q_v se mantuvo a 0,4 ml/min para evitar el contacto excesivo del eluyente con el adsorbente. La Figura 4.21 muestra las curvas de elución de tres de los ciclos, observándose un valor máximo de elución que disminuyó ligeramente con el reciclado.

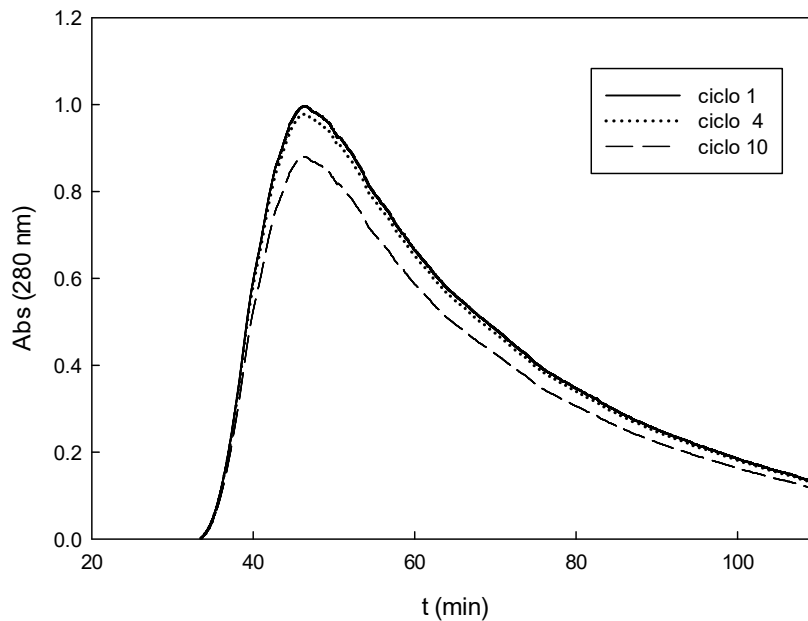


Figura 4.21: Curvas de elución de la columna durante diez ciclos de regeneración de adsorción de clara de huevo. Medio: buffer fosfato 20 mM pH 7,0, NaCl 0,3M, 25 °C. $Q_v = 0,4$ ml / min.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos para la purificación de LZ desde clara de huevo en batch y en lecho empacado, se comparó la eficiencia de purificación de ambos métodos. En ambos casos, se adsorbió la LZ desde la clara de huevo, se lavó el lecho y la proteína adsorbida se eluyó añadiendo NaCl 0,3 M al sistema. El contenido de LZ en la fracción eluida se determinó mediante electroforesis cuantitativa medida de acuerdo con el método descrito en la sección 3.11.2. La Tabla 4.IX muestra el factor de purificación y el recupero de LZ, calculada a partir de la intensidad de banda obtenida en cada electroforesis. Durante la adsorción en lecho empacado, se observó una eficiencia de elución máxima del 75% de recupero de LZ total presente en la clara de huevo, mientras que la adsorción de LZ de la clara de huevo usando el método de equilibrio en batch mostró un rendimiento y purificación menores de la proteína como se muestra en la Tabla 4.IX.

Tabla 4.IX: Valores de recuperoy y purificación de LZ a partir de clara de huevo en sistema batch y en columna de lecho empacado.

Sistema	Factor de Purificación	Rendimiento (%)
Batch	13,9	66,1
Lecho empacado	15,9	75,6

4.7. Discusión final y Conclusiones: Adsorción de Lisozima en matriz de Alginato-Goma Guar

Un proceso de adsorción puede llevarse a cabo mediante tres tipos de operaciones unitarias, todas ellas tienen en común el contacto de una molécula que se encuentra en una fase líquida y móvil, que es retenida sobre una fase sólida. Según el estado estático o dinámico de la fase sólida, se tienen tres tipos de operaciones unitarias:

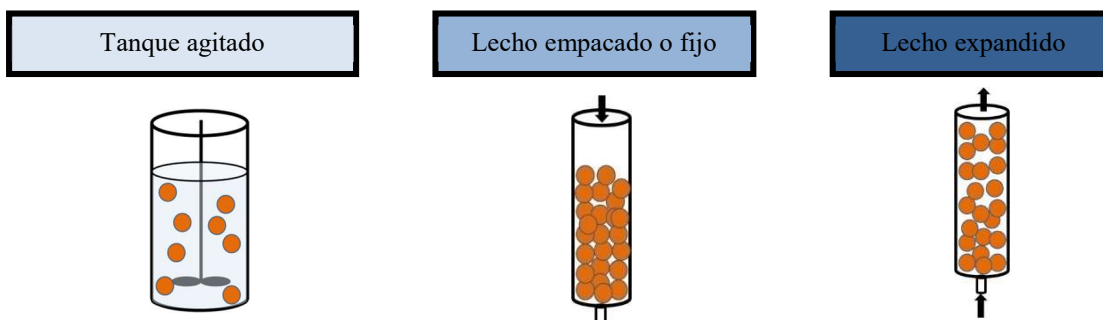


Figura 4.22: Clasificación de los sistemas de adsorción dependiendo el estado de la fase sólida.

Como se observa en la figura 4.22, cuando la adsorción es en tanque agitado, ambas fases son móviles, mientras que, en las adsorciones en lecho empacado y lecho expandido, la fase sólida es estática y la fase líquida móvil. La diferencia entre ambas es el sentido en el cual se mueve el líquido. Además, estas dos últimas operaciones unitarias se realizan en columna, mientras que, en el primer sistema ambas fases son agitadas en un recipiente. Asimismo, se pueden determinar diferentes parámetros, dependiendo el sistema utilizado. En el caso de la adsorción en tanque agitado, sus ecuaciones de estado relacionan las variables que la definen y regulan a través de las muy conocidas isothermas de adsorción, que determinan el equilibrio químico que ocurre entre el adsorbente y el adsorbato. Mientras que, las operaciones en columna se rigen por las ecuaciones de estado denominadas curvas de ruptura y curvas de elución.

Las operaciones unitarias de adsorción se han desarrollado en forma significativa en los últimos 20 años debido a su utilidad y eficiencia [126-128], sin embargo, la problemática principal que presentan es la matriz o lecho adsorbente, ya que,

desde el muy antiguo carbón activado empleado hace más de 100 años en los primeros procesos de adsorción, hasta los lechos comerciales más sofisticados que se ofrecen actualmente en el comercio, presentan un valor muy elevado y, generalmente, no son amigables con el medio ambiente. Por todo esto, el objetivo de este trabajo fue obtener lechos fáciles de preparar, sin producir residuos peligrosos y que sean muy económicos y, en consecuencia, puedan ser aplicados a nivel de macro escala para la bioseparación de una molécula desde una fuente compleja.

Existe una cantidad infinita de lechos estudiados de diferentes orígenes, tal como se muestra en la siguiente figura:



Figura 4.23: Diferentes lechos de adsorción utilizados en la actualidad.

Muchos de ellos requieren de un proceso de obtención que no los hace aplicables a nivel de escalado, y otros emplean materiales costosos. Por lo tanto, la idea de los investigadores, especialmente aquellos que llevan a cabo sus actividades en países en desarrollo, es obtener lechos empleando materiales naturales que no sean tóxicos. Una interesante opción son los polímeros de cadena flexible de la familia de los polisacáridos, ya que se obtienen de biomásas que, generalmente, son renovables: caso de Alg, chitosan [129], GG, pectina [126], etc., sumados a que se pueden descartar al medio ambiente sin riesgo alguno, dado que son totalmente degradables.

Se han publicado muchos trabajos sobre la capacidad de los geles de Alg para adsorber proteínas, en la mayoría se caracteriza la cinética y las isoterms [130, 131], pero no se analiza el mecanismo de interacción proteína-gel. Durante este trabajo, la

presencia de GG favoreció la penetración de la LZ sin hacer perder la resistencia mecánica del mismo y su posibilidad de reutilización. Por otro lado, la LZ al ser una proteína pequeña, y con carga eléctrica positiva en un amplio rango de pH, es un buen modelo donde solo deberían participar fuerzas Coulombicas en la adsorción. Sin embargo, se encontró una cinética de primer orden para el paso de adsorción con baja energía de activación, lo que sugiere la participación de un mecanismo físico de adsorción, como las fuerzas de van der Waals. Este hallazgo está de acuerdo con el modelo de Freundlich ajustado a los datos de equilibrio y con los ΔH° y ΔS° positivos asociados a la adsorción de LZ. Se emplearon ecuaciones cinéticas para analizar la cinética de adsorción a diferentes temperaturas y se encontró que los datos cinéticos se explicaron más adecuadamente mediante el modelo cinético de primer orden. Los resultados del modelo de Weber y Morris muestran que las intercepciones de las gráficas para tiempo cero son negativos, por lo que la velocidad de adsorción de la LZ en estas matrices está controlada por el efecto combinado de la difusión a través de la capa límite y de la reacción en la superficie del adsorbente [119]. Además, los valores de C pequeños en todos los sistemas indicaron una baja resistencia de la enzima a difundir a través de la capa límite de líquido.

El rendimiento de los lechos promedió los 2,40 mg de LZ adsorbida por g de matriz húmeda. En este punto muchos autores expresan la capacidad de adsorción por g de lecho seco [131], si se tiene en cuenta que la cantidad de agua está entre 95-98%, la capacidad de adsorción llega a alrededor a 250 mg de LZ adsorbida por g de matriz seca.

No hay muchas publicaciones que analicen el comportamiento de los lechos de Alg-GG en la operación unitaria de lecho empacado (columna). En este trabajo, cuando se ensayó, se observó una excelente resistencia mecánica del lecho, como así también, no se observaron dificultades durante el proceso como los encontrados con otros lechos,

dado el tamaño de las esferas de gel. Los modelos de Thomas y BDTS exhibieron un ajuste adecuado de los datos experimentales en el rango de las condiciones estudiadas, por lo tanto, proporcionan un enfoque integral para estimar la adsorción en columna. El lecho empacado al aplicarse a la fuente natural de LZ: clara de huevo, se mostró muy eficiente, a pesar de que la LZ solo representa el 3% del total de las proteínas de esta biomasa. Un recupero del 75% de la cantidad de LZ con un factor de purificación de 15, muestra una buena eficiencia del lecho, incluso si se los compara con lechos comerciales tradicionales, como es el caso de un 65% de recupero y un factor de purificación de 12,6 veces de la β -galactosidasa desde un lisado celular por adsorción en Streamline-DEAE por lecho expandido [132].

Por otro lado, la regeneración y el uso sucesivo del lecho mostraron que puede reutilizarse al menos diez veces sin afectar su capacidad de adsorción utilizando la operación de columna continua. De igual manera, las sucesivas preparaciones de diferentes lotes de matriz a través del tiempo mostraron la misma respuesta en cuanto a la cinética de captación de LZ e isothermas de adsorción, demostrando la simplicidad y potencialidad del sistema.

Resultados y Discusión:

Capítulo 2

5. Resultados y discusión: Adsorción de Lisozima y Quimotripsinógeno en matrices de Alginato-Goma Guar y Alginato-Goma Guar-Polímero de cadena flexible.

5.1. Obtención de matrices insolubles empleando polímeros naturales y PCF

En esta segunda parte la matriz obtenida y estudiada en el primer período de trabajo [95], la cual está compuesta por Alg-GG, se le agregaron dos polímeros de cadena flexible sintéticos no cargados eléctricamente (PCF: PVA y PVP) y un surfactante no iónico (Plur68), ya que se ha demostrado que la presencia en la matriz de cada uno de estos polímeros disminuye la interacción de la misma con la biomasa en el caso que la proteína a recuperar este incluida en esta [84, 129].

5.2. Caracterización de las matrices obtenidas

Las matrices seleccionadas para ser estudiadas como adsorbentes – Alg-GG-PVP, Alg-GG-PVA, Alg-GG-Plur68 – fueron tratadas similarmente a la matriz control Alg-GG: gelificación por contacto con CaCl_2 y posterior tratamiento con Epi. Para la obtención de dichas matrices se utilizaron las concentraciones de 0,6 %P/V y 0,5 %P/V para el Alg y GG, respectivamente, determinadas en la primera parte del trabajo. Las nuevas matrices fueron entrecruzadas con 3,0 mL de Epi. En la figura 5.1 se muestran las matrices de Alg-GG y Alg-GG-PCF con una concentración final de PCF de 0,2 %P/V. Mostramos sólo estas matrices ya que no se encontraron diferencias macroscópicas al comparar las matrices Alg-GG-PCF obtenidas a distintas concentraciones de PCF. Puede observarse que todas presentan una forma esférica con un diámetro promedio de 2 mm. Se observa que al adicionar cualquiera de los tres PCF, las matrices adquieren una forma más compacta, es decir, el tamaño de la esfera disminuye con respecto a la que contiene sólo Alg-GG. Esto puede deberse a la presencia de mayores interacciones entre las cadenas polisacáridas del Alg y GG favorecidas por la presencia de los PCF sintéticos.

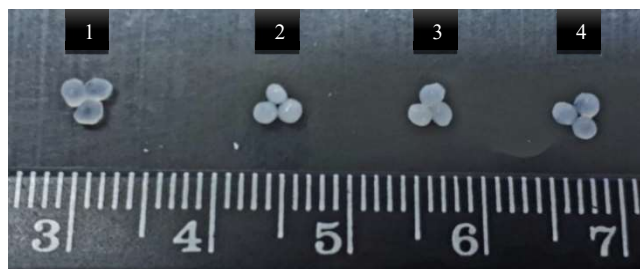


Figura 5.1: Fotografía de las esferas obtenidas. 1: Alg-GG; 2: Alg-GG-PVA; 3: Alg-GG-PVP; 4: Alg-GG-Plur68. Todas las matrices se encuentran entrecruzadas con Epi. Se muestran sólo las matrices Alg-GG-PCF con concentración 0,2% P/V de PCF.

Para continuar con la caracterización, se llevaron a cabo los siguientes estudios sobre cada una de las matrices: porcentaje de masa de agua retenida (%H₂O), determinación del pH_{zpc}, curvas de titulación, análisis de la superficie de las matrices a través de Microscopía electrónica de barrido (SEM) y determinación del área de superficie específica (SSA). Cada una de ellas se detallan a continuación:

5.2.1. Masa de agua retenida (%H₂O)

La cantidad de agua retenida por las diferentes matrices se muestra en la Tabla 5.I. Puede observarse una pequeña diferencia de retención de agua entre las matrices que contienen los PCF con respecto a la matriz control. Hay evidencia de que PVA, PVP y Plur68 tienden a interactuar con los grupos OH de los polisacáridos, formando puentes de hidrógeno [129, 133, 134]. Cuanto mayor sea esta interacción, más rígida es la estructura de la matriz, lo cual lleva a una mayor resistencia mecánica. Al mismo tiempo, una mayor interacción disminuye la cantidad de agua que retiene la matriz, lo cual podría aumentar la velocidad de captación de las proteínas en estudio, derivando en un aumento en la capacidad de adsorción. En nuestro caso, esta relación al agregar los PCF a la matriz control, se presenta en el siguiente sentido: PVP < P68 = PVA. Esto nos podría estar indicando que el agregado de los PCF seleccionados a la matriz Alg-GG, beneficiaría de manera positiva tanto en el aumento de resistencia mecánica como en un posible aumento en la capacidad de adsorber proteínas.

Tabla 5.I: Porcentajes de agua retenida, valores de pH_{zpc} , pKa y SSA de las matrices en estudio.

Matriz	% H ₂ O	pH_{zpc}	pKa	SSA (m ² /g)
Alg-GG	97,2 ± 0,1	5,781	5,53	13 ± 4
Alg-GG-PVP	94,8 ± 0,2	5,834	5,38	52 ± 4
Alg-GG-PVA	96,0 ± 0,1	5,963	5,44	26 ± 4
Alg-GG-Plur68	96,0 ± 0,1	6,478	5,33	13 ± 4

5.2.2. Determinación del pH_{zpc}

El pH en el punto de carga eléctrica cero (pH_{zpc}) de cada una de las matrices en estudio se determinaron a partir del gráfico en la figura 5.2 y se muestran en la tabla 5.I. Como se definió anteriormente, a pH inferiores de dicho valor, la matriz posee una carga neta superficial positiva, promoviendo la adsorción de aniones y, por encima de ese valor, la superficie de la matriz está cargada negativamente, favoreciendo la adsorción de cationes [96].

Comparando las gráficas de pH_{zpc} obtenidas, se observa que el agregado de PVA, PVP y Plur68 a la matriz Alg-GG, provocó un ligero desplazamiento de la curva control hacia pH más básicos. Esto podría estar sugiriendo que, al adicionar los PCF, se presenta una leve disminución de los grupos COO⁻ en la superficie de la matriz, lo cual resulta en una menor inducción del potencial eléctrico negativo neto en la pared de la superficie, generando una carga superficial relativamente más positiva, que produciría una menor interacción con cationes.

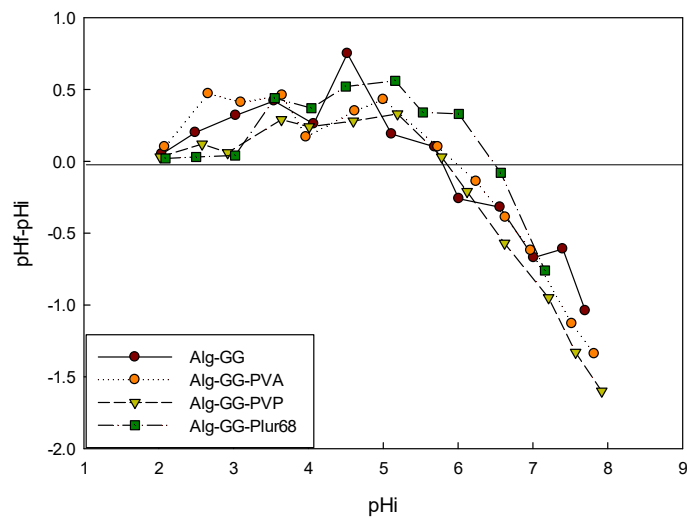


Figura 5.2: pH_{zpc} de las matrices estudiadas.

5.2.3. Determinación del número de grupos ácidos titulables presentes en la matriz

A partir de la construcción de la curva de titulación ácido-base de las matrices adsorbentes puede conocerse la carga eléctrica accesible al solvente de ellas en función del pH. Los resultados obtenidos al determinar la carga relativa de la matriz (Q) entrecruzada en función del pH se muestran en la figura 5.3.

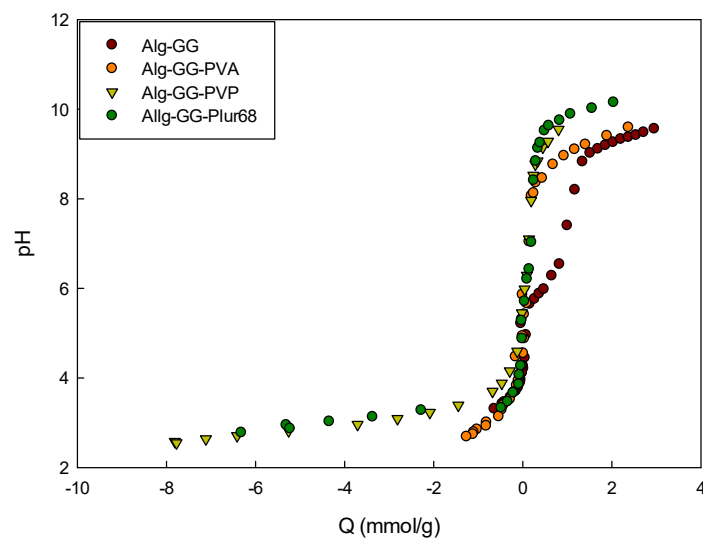


Figura 5.3: Curva de titulación ácido-base de las matrices estudiadas.

Los resultados obtenidos demuestran un corrimiento en las gráficas de las matrices en las cuales se agregaron los polímeros PVA, PVP y Plur68 comparando con la matriz control Alg-GG. En la tabla 5.I se presentan los valores de pKa calculados a partir de la figura 5.3 de cada una de las matrices. Los valores muestran una disminución en el valor de pKa en presencia de PCF en comparación con el Alg-GG solo, lo que sugiere que el agregado de los PCF modifica la constante micro dieléctrica del entorno de los grupos eléctricos cargados negativamente (COO^-), incrementando su acidez (tabla 5.I). Este efecto se puede correlacionar al carácter hidrofóbico-hidrofílico de las moléculas de PCF ensayadas.

5.2.4. Microscopía electrónica de barrido

Para el estudio morfológico de la superficie de las matrices, las mismas fueron liofilizadas y analizadas por SEM. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 5.4.

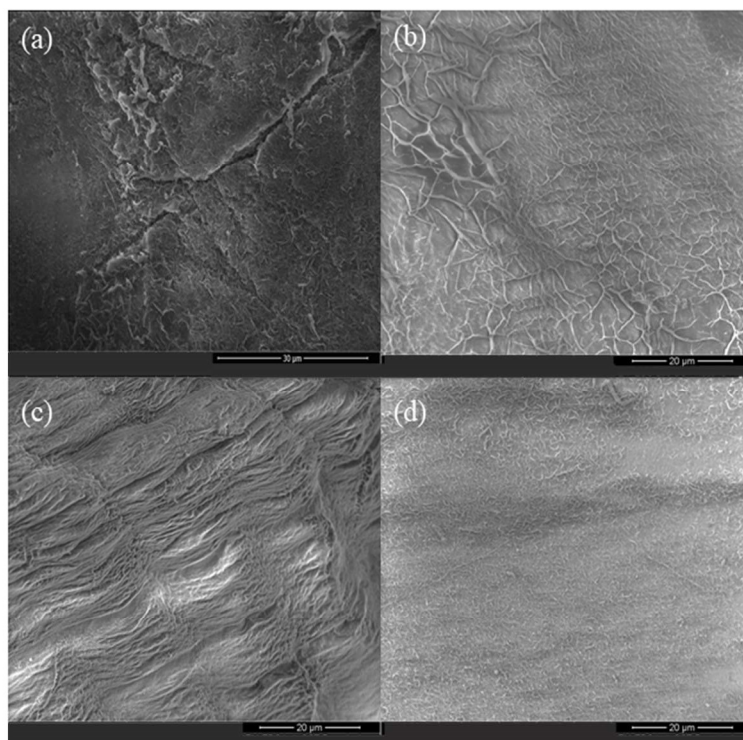


Figura 5.4: Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las matrices: a) Alg-GG; b) Alg-GG-PVA; c) Alg-GG-Plur68; d) Alg-GG-PVP.

El aspecto morfológico de la superficie de la matriz Alg-GG (Figura 5.4.a) inicialmente presenta una pequeña rugosidad que cambia sustancialmente con la adición de los PCF (Figura 5.4 b-d). En las imágenes 5.4.b y 5.4.d se puede observar que la adición de PVA y PVP, respectivamente, generó un aumento en la cantidad de poros presentes en la superficie de cada matriz. Este fenómeno también se ha visto para otros sistemas poliméricos semejantes [135].

Por otro lado, la adición de Plur68 (Figura 5.4.c) mostró una superficie más escamosa. Este cambio en la superficie con respecto a las otras matrices puede deberse a interacciones hidrofílicas del Plur68 con el Alg debido a su alto contenido de oxidrilos y la consecuente inducción a una conformación extendida de los polímeros en solución [129].

Teniendo en cuenta el carácter hidrofílico/hidrofóbico del Plur68, se puede suponer que dichas moléculas deben orientarse con sus cadenas polares interactuando con el agua o con los polisacáridos y con sus cadenas no polares interactuando con el aire atrapado dentro del poro. De esta manera, la presencia de las moléculas del surfactante permite mantener la integridad estructural de la matriz a medida que el agua se evapora [129].

En conclusión, los resultados sugieren que la adición de PCF no iónicos origina cambios estructurales en la superficie de las matrices que podrían afectar la capacidad de adsorción de las mismas como consecuencia de una posible variación en el grado de hidrofobicidad/hidrofiliidad de la misma.

5.2.5. Determinación del área de superficie específica

El área de superficie específica (SSA) de las cuatro matrices en estudio fue calculada por adsorción de RC. Los resultados se detallan en la tabla 5.I. Se puede observar que el agregado de Plur68 no modifica el SSA con respecto a la matriz Alg-GG.

En cambio, el agregado de PVA y PVP duplica y triplica este valor, respectivamente. Este comportamiento puede ser explicado por el aumento en la cantidad de poros por el agregado de ambos PCF, lo que probablemente facilita la difusión de las moléculas de RC. Dicho resultado se correlaciona con los resultados obtenidos en SEM.

5.3. Estudio de la adsorción de LZ sobre las matrices Alg-GG/PCF

5.3.1. Determinación de la capacidad de adsorción de LZ sobre cada matriz

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar de qué manera la presencia y la cantidad de PCF sintético influye sobre la adsorción de LZ. Las condiciones de trabajo utilizadas fueron las obtenidas anteriormente para las matrices Alg-GG.

Los resultados se expresaron como % de LZ adsorbida respecto de la concentración total de PCF sintético presente en el sistema, tal como se muestra en la Figura 5.5. Se observa que la adición de los distintos polímeros sintéticos a las matrices Alg-GG modifica la capacidad de adsorción de esta matriz control.

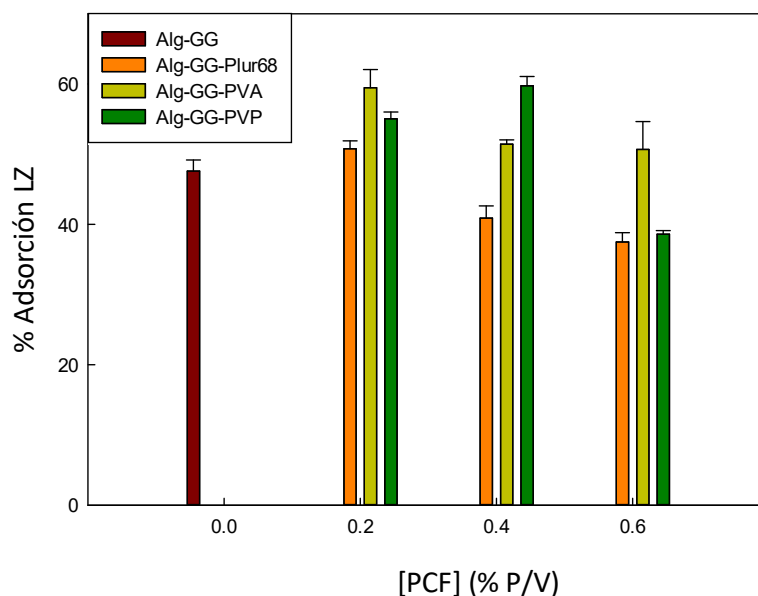


Figura 5.5: % de proteína adsorbida en función de las distintas concentraciones ensayadas de cada uno de los PCF. Medio buffer Pi 20 mM, pH 7,0. Concentración inicial de LZ: 0,10 mg/mL. Temperatura 25°C.

En el caso de las matrices que contienen Plur68 y PVA, a medida que se aumenta su concentración final en el sistema, disminuye la capacidad de adsorción de LZ. Por otro lado, la adición de PVP mostró un valor máximo en la adsorción de LZ a una concentración final de 0,4 %P/V. Sin embargo, para la elección de la concentración de PCF a utilizar en la construcción de las matrices, se priorizó el hecho de que la adición de los tres PCF a una concentración de 0,2 %P/V permitió obtener una mayor capacidad de adsorción de la enzima en comparación con la matriz Alg-GG (control), utilizando la menor concentración ensayada de PCF, lo que implica disminuir costos si se piensa en escalar el proceso. Por lo tanto, la concentración óptima de PCF determinada fue de 0,2% P/V, la cual se utilizó en todos los casos para los posteriores experimentos realizados.

5.3.2. Cinética de adsorción de LZ en matrices ALG-GG/PCF

Se llevó a cabo la adsorción de LZ pura sobre las diferentes matrices en función del tiempo. Los datos experimentales se ajustaron siguiendo los modelos de *pseudo*-primer y *pseudo*-segundo orden. Además, se identificó el mecanismo de adsorción mediante el modelo de difusión intra-partícula de Weber y Morris.

El ensayo se realizó sobre matrices generadas con la concentración de PCF determinada en el paso anterior (0,2% P/V) y se comparó con el control Alg-GG. Las medidas se realizaron a una temperatura de 25 °C.

En la Figura 5.6, se observa la cinética de adsorción de LZ, graficada como q_t (mg de LZ adsorbida por g de matriz) en función del tiempo (t), para cada uno de los sistemas ensayados.

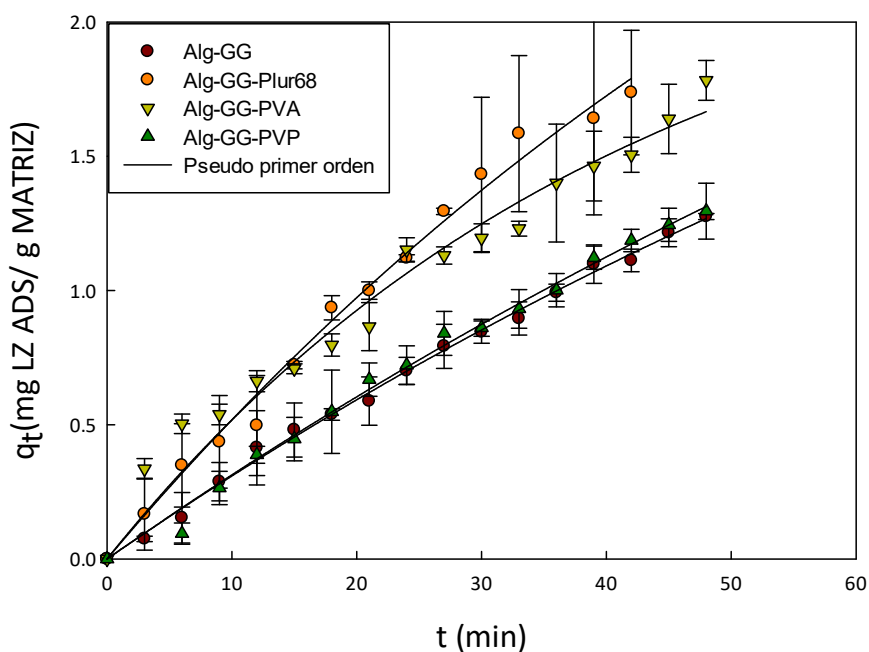


Figura 5.6: Cinéticas del proceso de adsorción de LZ sobre matrices Alg-GG/PCF. Concentración inicial de LZ: 0,10 mg/mL. Temperatura 25 °C. Medio buffer Pi 20 mM, pH 7,0.

Se observa que la presencia de PCF afectó de manera significativa al proceso de captación de la enzima, induciendo un aumento de la capacidad de adsorción por unidad de masa de lecho a medida que aumentaba el tiempo de contacto. Las matrices con PVA y Plur68 mostraron el mayor efecto, ya que los valores de q_t observados en sus gráficas son superiores en comparación a los obtenidos con las matrices Alg-GG-PVP y Alg-GG (control).

Las constantes de los modelos cinéticos, los coeficientes de determinación (R^2) y la sumatoria de cuadrados del error (SS) se muestran en la tabla 5. II.

Tabla 5.II: Parámetros cinéticos para la adsorción de LZ sobre matrices Alg-GG y Alg-GG-PCF. Medio buffer Pi 20 mM, pH 7.0. Concentración inicial de LZ: 0,10 mg/mL. Temperatura 25°C.

Matriz	Modelo	q_t (mg/g)	k_1 (min^{-1})	k_2 (g/mg.min)	R^2	SS
Alg-GG	Pseudo 1er orden	3,74±0,61	(8,6±1,7).10 ⁻³	-	0,9967	0,0086
	Pseudo 2do orden	7,0±1,0	-	(0,7±1,0).10 ⁻³	0,9967	0,0085
Alg-GG-Plur68	Pseudo 1er orden	4,27±0,95	(1,3±0,4).10 ⁻²	-	0,9907	0,0398
	Pseudo 2do orden	7,71±1,39	-	(0,9±1,7).10 ⁻³	0,9904	0,0408
Alg-GG-PVA	Pseudo 1er orden	2,45±0,34	(2,4±0,5).10 ⁻²	-	0,9700	0,1181
	Pseudo 2do orden	3,08±1,38	-	(4,3±2,8).10 ⁻³	0,9723	0,1093
Alg-GG-PVP	Pseudo 1er orden	4,41±1,17	(7,4±2,2).10 ⁻³	-	0,9937	0,0155
	Pseudo 2do orden	8,36±1,08	-	(0,5±1,2).10 ⁻³	0,9937	0,0157

A pesar de que los valores de R^2 y SS son similares para ambos modelos, en el modelo de ajuste de *pseudo*-segundo orden los valores experimentales de q_t no concuerdan con los valores calculados a partir del modelo. Además, las constantes para este ajuste mostraron valores incongruentes, lo que muestra que la adsorción de LZ en estas matrices no se ajusta a este modelo cinético. En cambio, en el modelo de *pseudo*-primer orden se observa una mayor correlación entre los valores de q_t experimentales y los calculados con el ajuste, lo que indica la posibilidad de aplicar este modelo para describir la cinética de adsorción de LZ en estos sistemas.

Para identificar el mecanismo molecular implicado en el proceso de adsorción, se ajustaron los datos al modelo de difusión intra-partícula de Weber-Morris. La ecuación correspondiente a este modelo y sus derivaciones teóricas se encuentran en la sección 1.2.1. La gráfica q_t vs $t^{0.5}$ y los parámetros obtenidos se muestran en la Figura 5.7 y en la tabla 5.III, respectivamente.

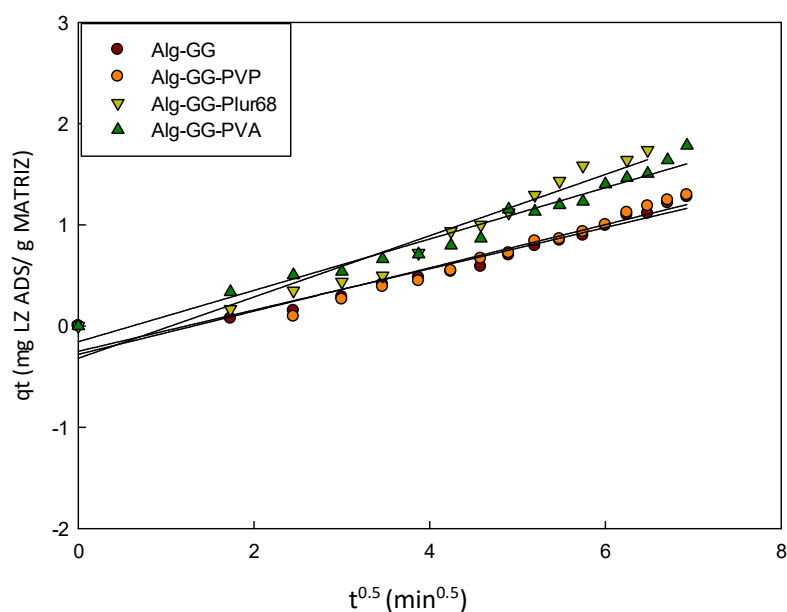


Figura 5.7: Ajuste modelo de Weber-Morris en el proceso de adsorción de LZ sobre las matrices Alg-GG/PCF. Concentración inicial de LZ: 0,10 mg/mL. Medio buffer Pi 20 mM, pH 7,0. Temperatura 25°C.

Tabla 5.III: Parámetros del ajuste modelo de Weber-Morris en el proceso de adsorción de LZ sobre las matrices de Alg-GG/PCF. Concentración inicial de LZ: 0,10 mg/mL. Medio buffer Pi 20 mM, pH 7,0. Temperatura 25°C.

Matriz	K_{id} (g/mg.min ^{0.5})	C	R ²	SS
Alg-GG	0,20±0,01	-0,2493	0,9489	0,1320
Alg-GG-Plur68	0,30±0,02	-0,3179	0,9387	0,2620
Alg-GG-PVA	0,25±0,01	-0,1548	0,9641	0,1415
Alg-GG-PVP	0,21±0,02	-0,2792	0,9337	0,1642

A partir de estos resultados se observó que los valores obtenidos de C (cada una de las intercepciones de las gráficas lineales de la Figura 5.7 con el eje de las ordenadas; constante relacionada con el efecto de la capa límite) fueron negativos, por lo que la velocidad de adsorción de la LZ en estas matrices está controlada por más de un mecanismo. De acuerdo a investigaciones previas [119], en este caso, la velocidad del

proceso estaría definida por el efecto combinado de la difusión a través de la capa límite y de la reacción en la superficie del adsorbente. Además, los valores de C pequeños en todos los sistemas indicaron una baja resistencia de la enzima a difundir a través de la capa límite de líquido.

Se observó también que el agregado de PCF aumentó el valor de K_{id} (constante de difusión; pendiente de la gráfica de q_t vs $t^{0.5}$) con respecto al presentado por matrices Alg-GG, lo cual se relaciona con el aumento de la velocidad de difusión de la LZ en el siguiente orden: ninguno <PVP<PVA<Plur68.

Por todo esto, se puede concluir que la presencia de PCF sintéticos induce un aumento en la cinética del proceso de adsorción, teniendo un mayor efecto en matrices con Plur68 y PVA. Esto puede deberse a una disminución del coeficiente de microfricción de la LZ en la superficie interior de los poros de la matriz, a causa de cambios en la estructura general del adsorbente por el agregado de los PCF [129].

5.3.3. Isotermas de adsorción de LZ en matrices de Alg-GG/PCF

Las isotermas de adsorción de LZ sobre las matrices de Alg-GG/PCF a dos temperaturas diferentes: 25 °C y 8 °C, se observan en las Figuras 5.8 y 5.9, respectivamente.

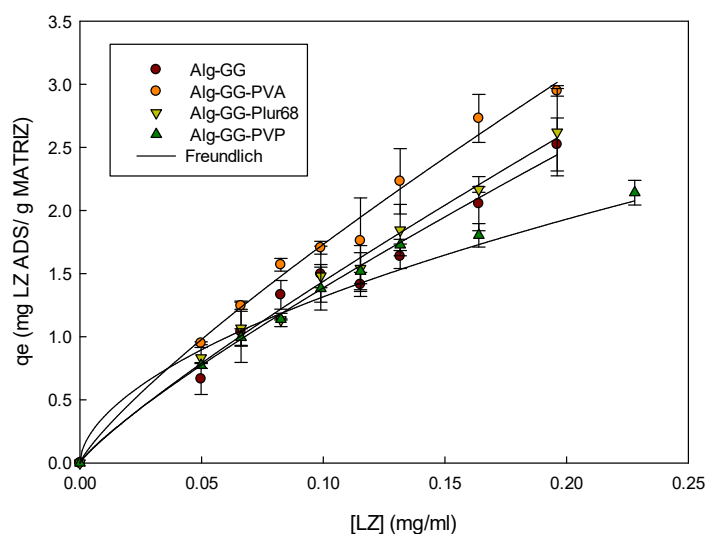


Figura 5.8: Isotermas de adsorción de LZ sobre matrices de Alg-GG/PCF. Medio buffer Pi 20 mM, pH 7,0. Temperatura 25 °C.

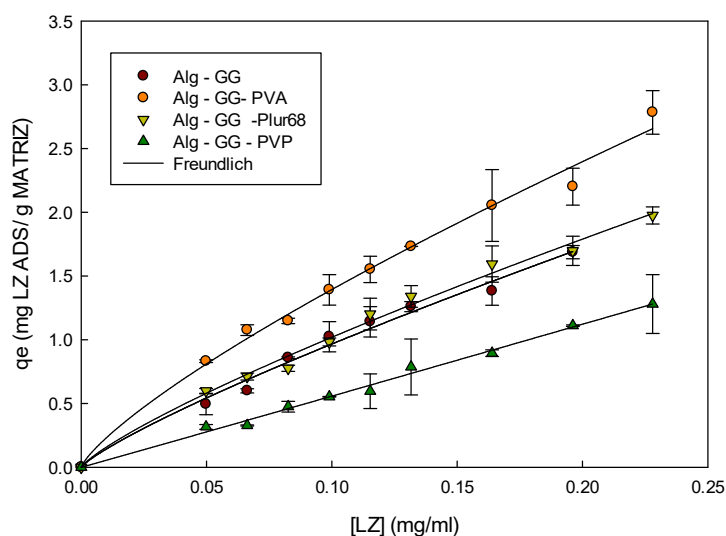


Figura 5.9: Isotermas de adsorción de LZ sobre matrices de Alg-GG/PCF. Medio buffer Pi 20 mM, pH 7,0. Temperatura 8 °C.

Puede observarse que, a ambas temperaturas el proceso de adsorción sigue un modelo levemente hiperbólico, con tendencia a la saturación a elevadas concentraciones de LZ. Los datos experimentales fueron ajustados mediante los modelos matemáticos de las isotermas de adsorción de Freundlich y Langmuir, cuyas ecuaciones fueron detalladas en la sección 1.2.2. Los valores de los parámetros característicos para cada modelo son representados en las tablas 5. IV y 5.V.

Tabla 5.IV: Parámetros del proceso de adsorción de LZ sobre matrices de Alg-GG/PCF. Temperatura 25°C.

Matriz	Modelo	K_F	K_L	1/n	$Q_{máx}$ (mg/g)	R^2	SS
Alg-GG	Freundlich	9,58±1,39	-	0,84±0,07	-	0,9783	0,0948
	Langmuir	-	1,52±0,87	-	10,59±1,93	0,9768	0,1014
Alg-GG-Plur68	Freundlich	10,51±0,79	-	0,86±0,04	-	0,9942	0,0276
	Langmuir	-	1,19±0,46	-	13,59±2,03	0,9927	0,0350
Alg-GG-PVA	Freundlich	11,53±1,14	-	0,82±0,05	-	0,9895	0,0688
	Langmuir	-	1,76±0,61	-	11,64±2,38	0,9893	0,0701
Alg-GG-PVP	Freundlich	5,55±0,51	-	0,62±0,05	-	0,9855	0,0475
	Langmuir	-	5,02±0,67	-	4,07±1,71	0,9937	0,0208

Tabla 5.V: Parámetros del proceso de adsorción de LZ sobre matrices de Alg-GG/PCF. Temperatura 8 °C.

Matriz	Modelo	K_F	K_L	1/n	$Q_{máx}$ (mg/g)	R^2	SS
Alg-GG	Freundlich	6,55±0,71	-	0,83±0,05	-	0,9878	0,0256
	Langmuir	-	1,81±0,60	-	6,38±1,33	0,9902	0,0206
Alg-GG-Plur68	Freundlich	6,61±0,50	-	0,81±0,04	-	0,9912	0,0279
	Langmuir	-	1,76±0,43	-	6,88±1,57	0,9923	0,0242
Alg-GG-PVA	Freundlich	8,44±0,62	-	0,78±0,04	-	0,9910	0,0496
	Langmuir	-	1,98±0,56	-	8,46±2,10	0,9877	0,0678
Alg-GG-PVP	Freundlich	5,68±0,42	-	1,01±0,04	-	0,9934	0,0090
	Langmuir	-	(-)0,07±0,28	-	(-)77,15±1,01	0,9934	0,0090

Todos los sistemas mostraron seguir un comportamiento Freundlich, modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales. Éste presentó, en todos los sistemas, un R^2 cercano a la unidad, un bajo valor de SS y parámetros lógicos que concuerdan con la teoría de la adsorción. K_F y n son constantes empíricas que indican el grado de adsorción y la efectividad o intensidad de la adsorción, respectivamente. En la isoterma de Freundlich, n depende del adsorbente y del tipo de adsorbato; como en este caso el

adsorbato es el mismo (LZ), la diferencia en los valores de n se deberá exclusivamente al adsorbente. La matriz que presentó un mayor valor de n fue Alg-GG-PVA, a ambas temperaturas; los sistemas restantes no mostraron variaciones significativas de este parámetro. Por otro lado, se observa que el valor de K_F aumentó con la adición de los PCF en el siguiente orden: PVP <ninguno<Plur68<PVA, lo que sugiere un aumento en la capacidad de adsorción de las matrices en correlación con el comportamiento observado en la cinética de adsorción de LZ.

El modelo de Langmuir presentó coeficientes de regresión aceptables en todos los sistemas, pero los parámetros anómalos obtenidos a partir del ajuste no tienen aplicabilidad a los fines de la adsorción. Entre ellos, se puede observar que los valores de $q_{máx}$ no coincidieron con los datos experimentales.

La termodinámica de adsorción de LZ por las matrices Alg-GG/PCF fue estudiada a ambas temperaturas (8 °C y 25 °C). Las funciones de estado termodinámicas (energía libre, entalpía y entropía) fueron obtenidas utilizando las ecuaciones planteadas en la sección 4.2.3 y se presentan en la tabla 5.VI.

Matriz	T(K)	K_D	ΔG° (kcal/mol)	ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (cal/mol.K)
Alg-GG	281	5,58	-0,96	7,14	28,81
	298	11,61	-1,45		
Alg-GG-Plur68	281	6,44	-1,04	6,71	27,56
	298	12,81	-1,51		
Alg-GG-PVA	281	12,54	-1,41	4,5	21,03
	298	19,90	-1,77		
Alg-GG-PVP	281	2,34	-0,47	16,38	59,97
	298	12,54	-1,49		

Tabla 5.VI: Parámetros termodinámicos para el proceso de adsorción de LZ sobre matrices de Alg-GG/PCF. Temperatura 8 °C (281 K) y 25 °C (298 K).

Los cambios de entalpía y entropía fueron positivos para todos los sistemas, indicando que el efecto conductor de la adsorción de LZ estaría dado principalmente por

el denominado efecto hidrofóbico: desorden del agua estructurada en el interior de los poros del adsorbente, inducido por la difusión de la enzima a través de esos canales. Sin embargo, deben también existir interacciones coulombicas, ya que la LZ al pH de trabajo (pH muy inferior al punto isoeléctrico de la enzima) se encuentra cargada positivamente en su superficie y, por lo tanto, estaría interactuando con los grupos COO^- del Alg, pero este tipo de interacción es desbordada por el efecto hidrofóbico, lo que causa que las funciones ΔH° y ΔS° determinadas experimentalmente muestren valores positivos.

Al adicionar un PCF con cierto grado de hidrofobicidad a la matriz Alg-GG, se genera una reorganización de las moléculas de agua cercanas a la superficie externa e interna (dentro de los poros) de la matriz. Cabe resaltar que el agua es el único solvente con la capacidad de formar una red molecular de coordinación que envuelve una partícula con cierta naturaleza apolar, optimizando la formación de sus puentes de hidrógeno. Esta red ordenada de hidratación disminuye la entropía del sistema. Cuando se agrega LZ al sistema, los procesos de difusión involucrados en la adsorción generan la liberación de moléculas de “agua ordenada” hacia fuera de la red de hidratación, aumentando la entropía del sistema. La Figura 5.9 y la tabla 5.VI permiten concluir que el PVA induce un incremento significativo en la capacidad de adsorción de la matriz. Esto es importante si se quiere obtener lechos con buen rendimiento de adsorción. Este resultado puede deberse al efecto que causa el agregado de PCF sobre la estructura de la matriz, es decir, cómo incide sobre el mecanismo molecular del proceso de adsorción. Además, se observa que el proceso de adsorción de LZ en la matriz que contiene PVP está asociado a un elevado valor de cambio de entalpía y entropía. Esto sugiere que el PVP, al insertarse en el interior de la matriz, aumenta la capacidad de estructurar agua, lo cual puede deberse a la presencia del anillo de pirrolidona en su estructura, que le otorga cierto carácter hidrofóbico. Por lo tanto, la penetración de la molécula de LZ en los poros del lecho

deriva en la magnificación del proceso de remoción de agua debido al exceso de agua estructurada que contiene la matriz, aumentando así la entropía del sistema.

5.3.4. Determinación de las condiciones de desorción

Se planteó el aumento de la fuerza iónica del medio como condición para la desorción de LZ en las matrices Alg-GG-PVA ya que dicha condición fue exitosa para lograr la elución de la proteína cuando se utilizó la matriz control. Se eligió la matriz adicionada con PVA para el estudio de la desorción ya que, en los estudios de adsorción, permitió obtener la mayor cantidad de LZ adsorbida por g de matriz. En la Figura 5.10 se representan los % de desorción de LZ en función de la concentración de NaCl agregada al sistema.

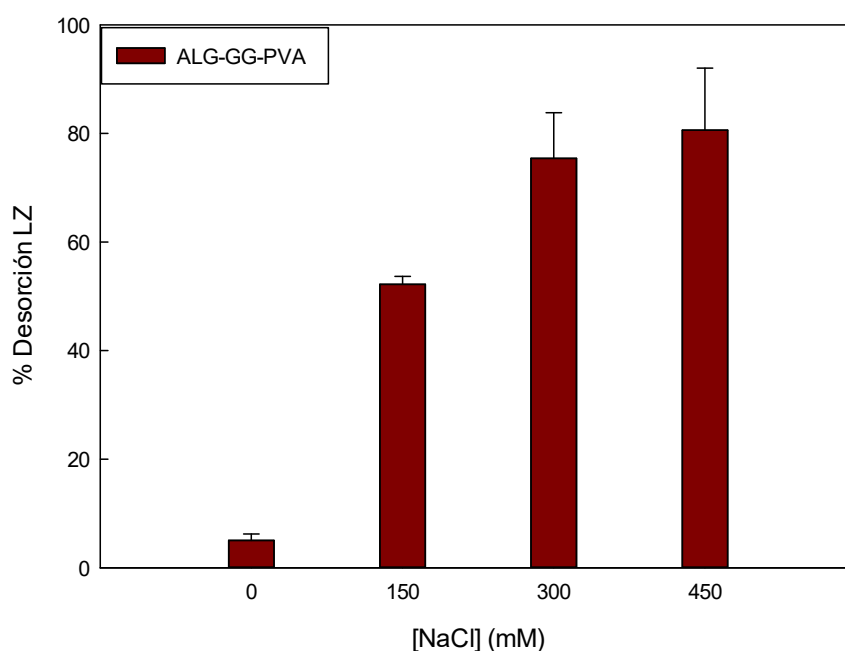


Figura 5.10: % Desorción de LZ en función de la fuerza iónica del medio en matrices Alg-GG/PVA. Medio buffer Pi 20 mM, pH 7,0. Concentración inicial de LZ: 0,10 mg/mL. Temperatura 25 °C.

La Figura 5.10 muestra que el sistema con PVA es altamente sensible a la presencia de NaCl, ya que se eluye un elevado porcentaje de la proteína adsorbida inicialmente. Esto resulta en una ventaja bioseparativa, al recuperarse una mayor

proporción de LZ adsorbida por parte de la matriz. A pesar de que se obtuvo el mayor % de LZ desorbida con el agregado de NaCl 450 mM al buffer Pi 20 mM pH 7,0, se decidió usar NaCl 300 mM porque con esta concentración se obtuvo igualmente un $(81 \pm 8) \%$ de LZ desorbida y resulta más conveniente en cuanto a costos si se pretende escalar el proceso. Este comportamiento es similar al observado con la matriz de Alg-GG (control) donde se logró una desorción del $(91 \pm 5) \%$ al agregar al sistema NaCl 300 mM.

Por otra parte, el desplazamiento de la proteína adsorbida mediante el incremento de la fuerza iónica del medio de trabajo avala la hipótesis de que existen interacciones electrostáticas en el proceso de adsorción de la enzima y la matriz.

5.3.5. Cinética de desorción

La Figura 5.11 muestra la liberación de las moléculas de LZ adsorbidas en la matriz al incubar el sistema en el buffer de desorción determinado en la sección anterior: buffer Pi 20 mM pH 7,0 + NaCl 300 mM. Los datos obtenidos se representaron como mg de LZ desorbidos por g de matriz en función del tiempo.

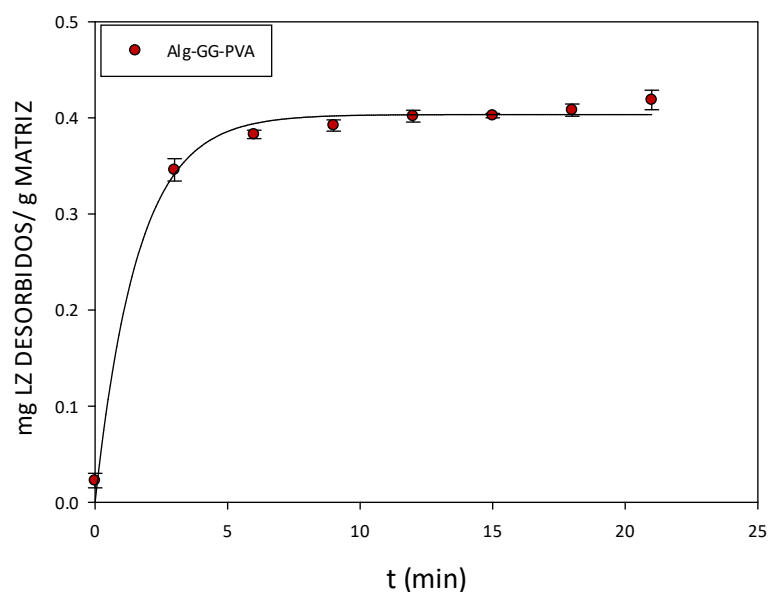


Figura 5.11: Cinéticas del proceso de desorción de LZ sobre matrices Alg-GG-PVA. Concentración inicial de LZ: 0,10 mg/mL. Buffer de desorción: Pi 20 mM pH 7,0 + NaCl 300 mM. Temperatura 25°C.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la cinética del proceso de desorción es rápida, alcanzando el equilibrio a los 8 minutos de incubación. Los resultados están de acuerdo con los obtenidos para otros sistemas, donde el proceso de desorción es mucho más rápido que el de adsorción [16]. Esta es otra ventaja bioseparativa de la matriz, en el sentido que permite la recuperación de la proteína en un tiempo muy corto, evitando procesos de desnaturalización.

5.4. Aplicación de los resultados obtenidos

5.4.1. Purificación de la enzima

Para obtener LZ a partir de su biomasa natural, la clara de huevo, se ensayó un ciclo de adsorción-lavado-desorción, en sistema batch, con las matrices Alg-GG y Alg-GG-PVA (con la que se obtuvo la mayor capacidad de adsorción de proteína pura), bajo las condiciones optimizadas a lo largo de este trabajo.

Finalmente, se separaron alícuotas iguales de cada una de las etapas para luego ser analizadas mediante SDS-PAGE. A partir de la realización de la electroforesis de proteínas indicada se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 5.12.

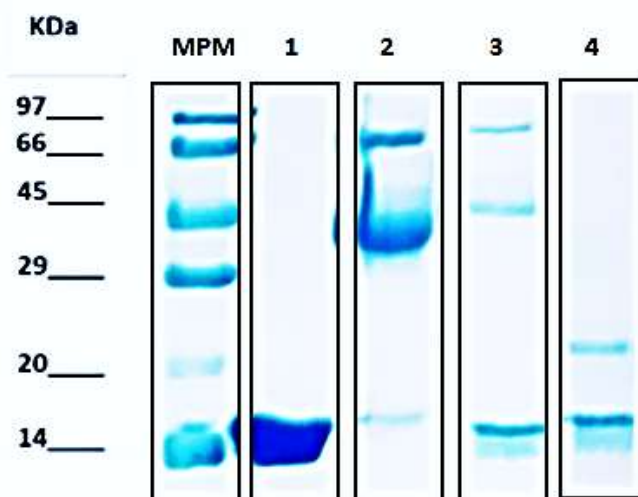


Figura 5.12: SDS – PAGE para el ciclo de adsorción-lavado-desorción de la solución de clara de huevo en batch. **Calle 1:** LZ pura 10 mg/ml. **Calle 2:** Clara de huevo en agua destilada, pH 7,0 (dilución 1/50). **Calle 3:** Paso Desorción con ultracentrifugación (concentrado 2 veces), matriz Alg-GG. **Calle 4:** Paso Desorción, concentrado 2 veces por ultracentrifugación, matriz Alg-GG-PVA 0.2% p/V. Temperatura 25°C. **Peso Molecular de LZ: 14.3 kDa.**

Se observa que ambas matrices en sistema batch permiten recuperar la LZ a partir de su fuente natural. En ambos casos se obtiene la banda perteneciente a la enzima de interés en una proporción alta. Para el caso de la matriz Alg-GG, en la calle 3, se presentan dos bandas más, las cuales podrían pertenecer a la Ovoalbumina (44.5 kDa) y a la Ovotransferrina (77.7 kDa). Al pH de adsorción (pH 7,0), la primera está cargada negativamente (pI 4,5), y es probable que su presencia se deba a que representa el 54% de las proteínas totales de la clara de huevo. Mientras que, la Ovotransferrina posee un pI de 6,0 y representa un porcentaje más bajo, menos del 12%. Se puede pensar que, debido a la proximidad entre el pI y el pH de adsorción es posible que posea un número importante de cargas eléctricas positivas o zonas cargadas positivamente con capacidad para interactuar con los COO^- del Alg [136]. En la calle 4, se observa el paso de desorción para la matriz Alg-GG-PVA, dónde, además de la banda perteneciente a la LZ, se ve otra banda de menor intensidad, la cual podría pertenecer a la Ovomucoide (28 kDa)

[136]. A partir de las intensidades de las bandas obtenidas en la electroforesis y, teniendo en cuenta las correcciones correspondientes a volúmenes sembrados y factor de concentración por ultracentrifugación, se determinó el factor de purificación (FP) y el recuperado (%R) de LZ sobre la matriz Alg-GG-PVA. La tabla 5.VII muestra los valores correspondientes al FP y %R de LZ a partir de clara de huevo sobre las matrices Alg-GG y Alg-GG-PVA.

Tabla 5.VII: Valores de recuperación y purificación de LZ a partir de clara de huevo usando Alg-GG o Alg-GG-PVA como matriz adsorbente en sistema batch.

Matriz	Factor de Purificación	Rendimiento (%)
Alg-GG	13,9	66,1
Alg-GG.PVA	17,7	79,4

A pesar de la presencia de estos pequeños contaminantes, se puede concluir que la matriz Alg-GG-PVA mejora la capacidad de recuperado de LZ desde su fuente natural con respecto a la matriz formada sólo por Alg-GG.

5.5. Estudio de la adsorción de QTg sobre las matrices Alg-GG-PCF

5.5.1. Optimización de la adsorción de QTg en matrices ALG-GG

Para el estudio de la adsorción de QTg sobre las diferentes matrices obtenidas hasta el momento se decidió emplear herramientas estadísticas. El diseño experimental y los resultados según el diseño factorial completo general se muestran en la Tabla 5.VIII. Los factores estudiados a 4 y 3 niveles fueron el pH y el polímero agregado a la matriz original, respectivamente, y la respuesta a optimizar fue la capacidad de adsorción de QTg del sistema.

Tabla 5.VIII: Diseño experimental y resultados según el diseño factorial completo general. Medio buffer Cit 25 mM. Temperatura 25°C.

Experimentos	pH	Polímero	Adsorción (%)
1	6,0	PVA	41,9
2	6,0	Plur68	34,8
3	7,0	PVP	16,2
4	4,0	Plur68	46,8
5	5,0	Plur68	60,9
6	4,0	PVA	46,3
7	4,0	PVP	35,7
8	7,0	PVA	17,6
9	6,0	PVP	37,3
10	5,0	PVA	48,7
11	5,0	PVP	60,7
12	7,0	Plur68	19,6
13	5,0	Plur68	71,8
14	5,0	PVP	63,2
15	5,0	PVA	56,2

El objetivo de emplear este tipo de herramientas en el estudio es obtener un modelo que seleccione el factor significativo, investigando las interacciones entre todos los niveles de los factores categóricos involucrados empleando el menor número de experimentos posibles.

A través del análisis de la varianza, se verificó la significación estadística de cada una de las variables y sus interacciones. En dicho análisis se pudo verificar que la interacción entre la concentración de polímeros y el pH no fue significativa (p-value 0,431), procediendo a su eliminación del análisis. La siguiente ecuación (33) mostró la influencia de las variables ensayadas sobre la capacidad de adsorción en el lecho:

$$\begin{aligned} \%Ads = & 38,88 + 4,06 \text{ pH4} + 17,89 \text{ pH5} - 0,88 \text{ pH6} - 21,07 \text{ pH7} + 1,65 \text{ Plur68} \\ & - 1,40 \text{ PVP} - 0,25 \text{ PVA} \quad (33) \end{aligned}$$

Se pudo concluir que el pH es el único factor significativo que influye en la capacidad de adsorción de la matriz (p-value <0,05). El R² (92,59%) indica que el ajuste

del modelo es aceptable para la correspondiente variable dependiente. Así, la superficie de respuesta basada en el modelo se utilizó para representar la capacidad de adsorción en función de las variables como se muestra en la Figura 5.13.

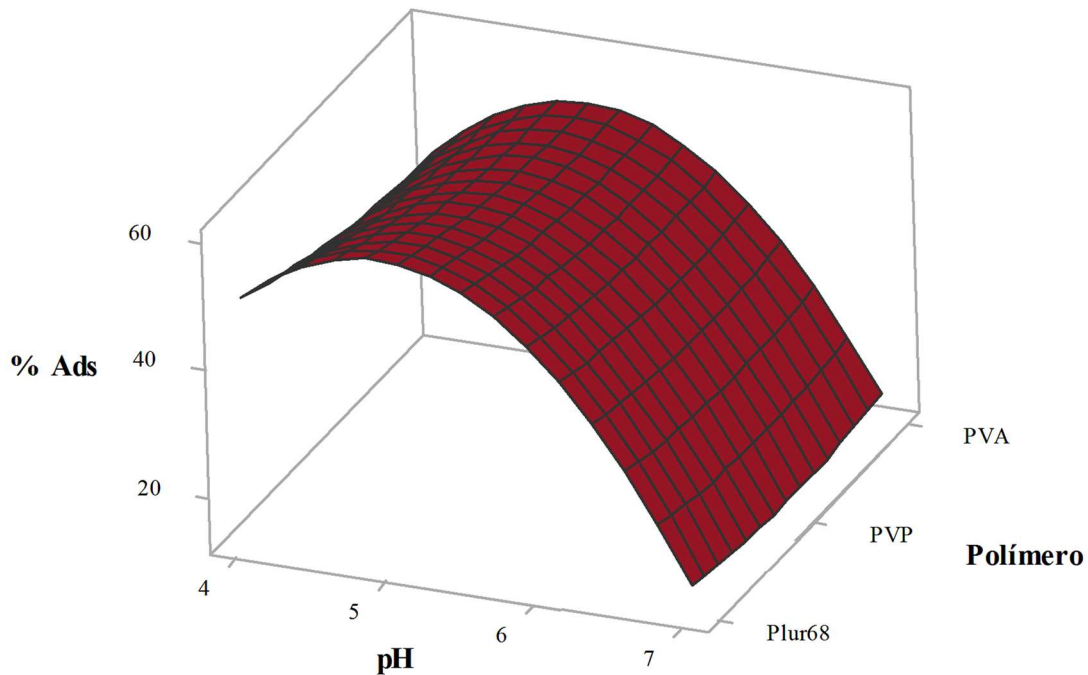


Figura 5.13: Superficie de respuesta de la capacidad de adsorción de QTg sobre las matrices Alg-GG-PCF. Medio buffer Cit 25 mM. Temperatura 25°C.

El efecto de la adición de los polímeros sintéticos ha sido claramente insignificante en la capacidad de adsorción. Sin embargo, el cambio de pH provocó un aumento en la capacidad de adsorción de QTg con un valor máximo a pHs cercanos a 5,0. A pHs superiores, se observa una disminución en la adsorción. La explicación de esto es que el Alg tiene grupos carboxilo que se disocian a pH 4,5, mientras que el QTg tiene un pH isoelectrico alrededor de 8,5. En consecuencia, a pH superior 5 la carga eléctrica positiva de la proteína disminuye, reduciendo la interacción electrostática entre las cargas eléctricas opuestas.

5.5.1.1. Sucesión de Fibonacci

Utilizando esta estrategia de optimización para 1 factor y 1 respuesta, problema univariado, y teniendo en cuenta los resultados anteriores, se estudió la capacidad de adsorción de QTg en las tres matrices (Alg-GG-PVA, Alg-GG-PVP y Alg-GG-Plur68) a pHs sucesivos con una diferencia simétrica entre ellos. La mejor capacidad de adsorción de QTg para cada polímero resultó ser a pH 4,92 para la matriz Alg-GG-PVA y a pH 5,08 para las matrices Alg-GG-PVP y Alg-GG-Plur68. Los siguientes experimentos se llevaron a cabo a estos pHs, respectivamente.

5.5.2. Cinética de adsorción del QTg en los lechos de ALG-GG

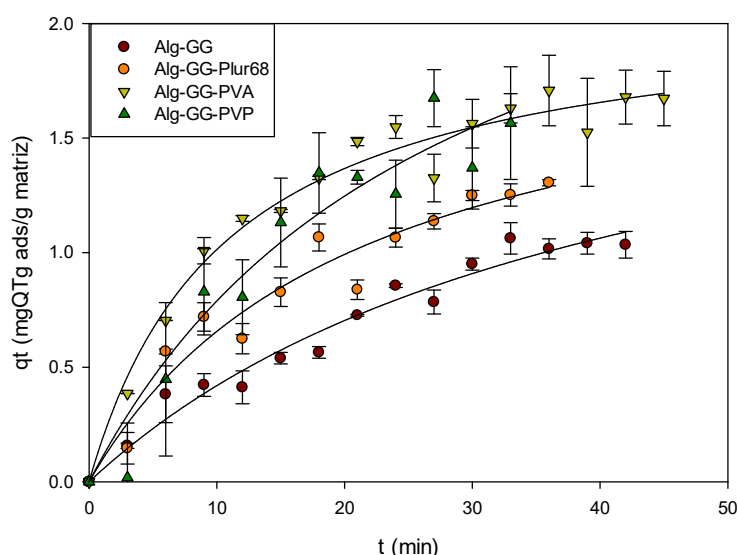


Figura 5.14: Curvas cinéticas en las condiciones óptimas para la adsorción de QTg (concentración inicial: 0,164 mg / ml), pH 5,00, 4,92 y 5,08 según sea apropiado a 25°C.

La figura 5.14 muestra las curvas cinéticas de adsorción para QTg sobre los diferentes lechos de Alg-GG. Se observa una situación de saturación alrededor de los 40 min que indica que la adsorción fue un proceso rápido. Además, puede verse que la adición de los PCF afecta de manera significativa al proceso de captación induciendo un aumento de la capacidad de adsorción por unidad de masa de lecho, mostrando PVP y PVA el efecto principal, lo cual puede deberse a una modificación en la estructura interna

de la matriz que beneficia la interacción de la proteína con los grupos cargados negativamente de la matriz.

Al mismo tiempo, para obtener información sobre la adsorción de QTg en los lechos de Alg-GG, se ajustaron los datos obtenidos a los modelos cinéticos de *pseudo*-primer orden y *pseudo*-segundo orden. Las constantes de los modelos cinéticos, los coeficientes de correlación de regresión y la suma de cuadrados se muestran en la tabla 5.IX.

Tabla 5.IX: Parámetros cinéticos para la adsorción de QTg sobre las matrices de Alg-GG. Medio buffer Cit 25 mM pH 5,0, 5,08 y 4,92, según corresponda. [QTg]_{inicial} 0,164 mg/mL. Temperatura 25°C.

Matriz	Modelo	Q _t (mg.g ⁻¹)	k ₁ (min ⁻¹)	k ₂ (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	R ²	SS
Alg-GG	Pseudo 1er orden	1,42±0,17	0,03±0,007		0,9676	0,0526
	Pseudo 2do orden	2,17±0,92		0,01±0,006	0,9678	0,0523
Alg-GG-Plur68	Pseudo 1er orden	1,44±0,14	0,06±0,01		0,9471	0,1092
	Pseudo 2do orden	2,03±1,09		0,02±0,01	0,9503	0,1027
Alg-GG-PVA	Pseudo 1er orden	1,67±0,04	0,09±0,008		0,9774	0,0843
	Pseudo 2do orden	2,10±1,50		0,04±0,008	0,976	0,0896
Alg-GG-PVP	Pseudo 1er orden	1,92±0,30	0,05±0,02		0,9387	0,2179
	Pseudo 2do orden	2,97±1,36		0,01±0,01	0,9346	0,2326

A pesar de que los R² y SS ajustan para ambos modelos, el modelo de ajuste de segundo orden da valores Q_t superiores a los calculados a partir de la inspección visual de la figura 5.15, lo que sugiere que la adsorción sigue el modelo de *pseudo*-primer orden. El valor de Q_t también muestra que la presencia de PVA y PVP aumenta la capacidad de adsorción del lecho en el orden del 17% y 35%, respectivamente.

Para identificar el mecanismo implicado en el proceso de adsorción, se ajustaron los datos experimentales al modelo difusión intra-partícula de Weber y Morris. Los resultados obtenidos para cada uno de los ajustes se muestran en la figura 5.15 y en la tabla 5.X.

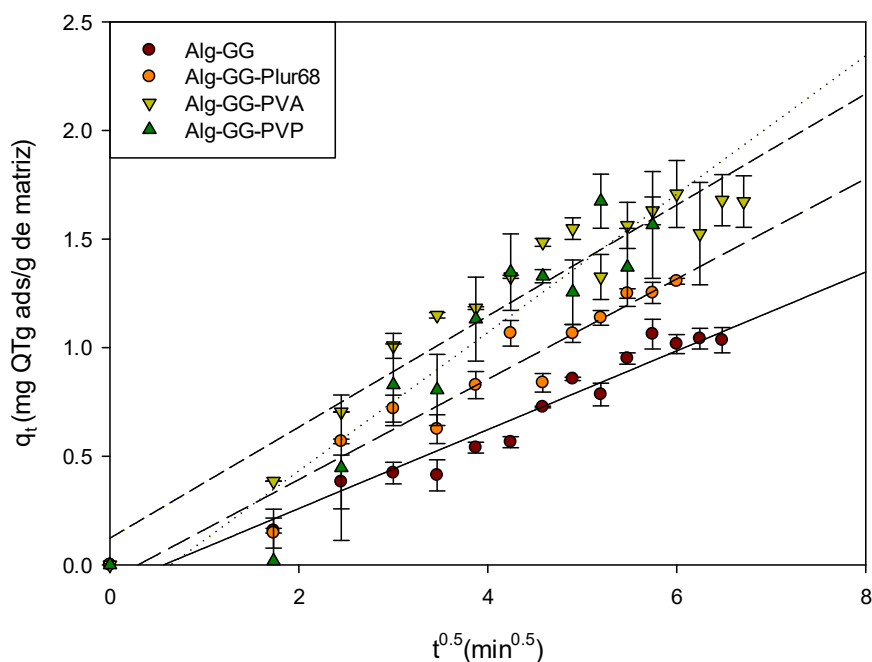


Figura 5.15: Difusión intra-partícula en el proceso de adsorción de QTg sobre los lechos de Alg-GG Medio buffer Citrato 25 mM a pH 5,0, 4,92 o 5,08, según corresponda. Temperatura 25°C.

Tabla 5.X: Parámetros del ajuste al modelo de Weber y Morris en el proceso de adsorción de QTg sobre esferas de Alg-GG/PCF. Medio buffer Citrato 25 mM, pH 5,0. Temperatura 25°C.

Matriz	K_{id} (mg/g.min ^{0.5})	C	R ²	SS
Alg-GG	0,1815±0,0108	-0,1034	0,9559	0,0716
Alg-GG-Plur68	0,2309±0,0169	-0,0689	0,9445	0,1145
Alg-GG-PVA	0,2557±0,0189	0,1228	0,9288	0,2654
Alg-GG-PVP	0,3185±0,0323	-0,2044	0,9070	0,3309

Se observa que la presencia de un PCF aumenta el valor de K_{id} , que se relaciona con el aumento de la velocidad de difusión del QTg en el siguiente orden: ninguno <Plur68 <PVA <PVP. Por lo tanto, la presencia de PCF induce un aumento en la cinética de este proceso debido a un aumento en la hidratación de las paredes de los poros,

disminuyendo la interacción con la macromolécula. Además, los valores de C pequeños, en todos los sistemas, indican una baja resistencia de la proteína a difundir a través de la capa límite de líquido.

Como ya se mencionó, dicho modelo representa la multilinearidad que caracteriza los dos o más pasos involucrados en un proceso de adsorción. Esto puede confirmarse con los R^2 bajos y SS altos, cuando se ajustan los datos experimentales a un modelo lineal único.

5.5.3. Isotermas de adsorción del QTg en los lechos de ALG-GG

Como parte del estudio del proceso de adsorción se realizaron las respectivas isotermas de adsorción de QTg sobre las matrices de Alg-GG a 25°C. Los resultados se muestran en la figura 5.16.

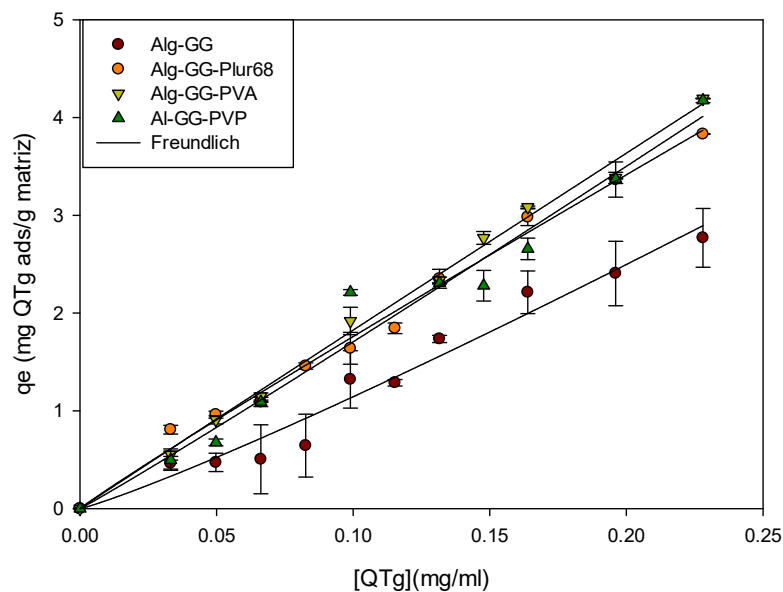


Figura 5.16: Isotermas de adsorción de QTg sobre todas las matrices de Alg-GG. Medio buffer Cit 25 mM a pH 5,0, 4,92 o 5,08, según corresponda. Temperatura 25°C.

Puede observarse que a ambas temperaturas el proceso de adsorción sigue un modelo exponencial donde a medida que aumenta la concentración de proteína presente aumenta la capacidad de adsorción de las matrices.

Los datos experimentales fueron ajustados a tres modelos de adsorción, Freundlich, Langmuir y Hill. A partir del ajuste de los datos se obtuvieron los parámetros característicos para cada modelo, determinando que los sistemas en estudio se ajustan al modelo de Freundlich. Los parámetros determinados para cada modelo son representados en la tabla 5.X. Las matrices a las cuales se les adicionaron los PCF no ajustaron al modelo de Hill, por lo tanto, dichos valores no fueron expresados.

Tabla 5.X: Parámetros del proceso de adsorción de QTg sobre matrices de Alg-GG. Medio buffer Cit 25 mM a pH 5,0, 4,92 o 5,08, según corresponda. Temperatura 25°C.

Matriz	Model	K_F	K_L	n_F	Q_0 (mg/g)	R^2	SS
Alg/GG	Freundlich	15,3 ± 2,7		0,89 ± 0,09		0,9673	0,2783
	Langmuir		(-)0,6±0,5		(-)17,9±1,3	0,9646	0,3013
Alg/GG/Plur	Freundlich	15,9±1,2		1,04±0,04		0,9912	0,1212
	Langmuir		0,28±0,34		65,2±1,0	0,9909	0,1256
Alg/GG/PVA	Freundlich	17,9±1,2		1,01±0,04		0,9954	0,0761
	Langmuir		0,09±0,29		208,8±0,9	0,9955	0,0754
Alg/GG/PVP	Freundlich	18,6±3,3		0,96±0,09		0,9723	0,4453
	Langmuir		(-)0,32±0,63		(-)51,4±2,0	0,9725	0,4415

El análisis estadístico de la función de error (R^2) verifica que la ecuación que tiene el mejor ajuste de datos para todos los sistemas es el modelo de Freundlich. El valor de K_F aumentó con la adición de los PCF en el siguiente orden Plur68 <PVA <PVP, como se muestra en la tabla. El modelo de Langmuir produjo parámetros anómalos que demuestran que el Freundlich es el modelo correcto para ajustar los datos experimentales.

5.5.4. Determinación de las condiciones de desorción

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante las experiencias realizadas para la determinación de las condiciones de desorción durante el estudio con la LZ, se planteó el aumento de la fuerza iónica del medio para la desorción de QTg en las matrices formadas por Alg-GG-PVA y Alg-GG-PVP. Se eligieron estas matrices para el estudio de la desorción ya que en el estudio de adsorción fueron las responsables de la obtención

de la mayor cantidad de Qtg por g de matriz. En la figura 5.17 se representan los % de desorción de QTg obtenidos en cada caso.

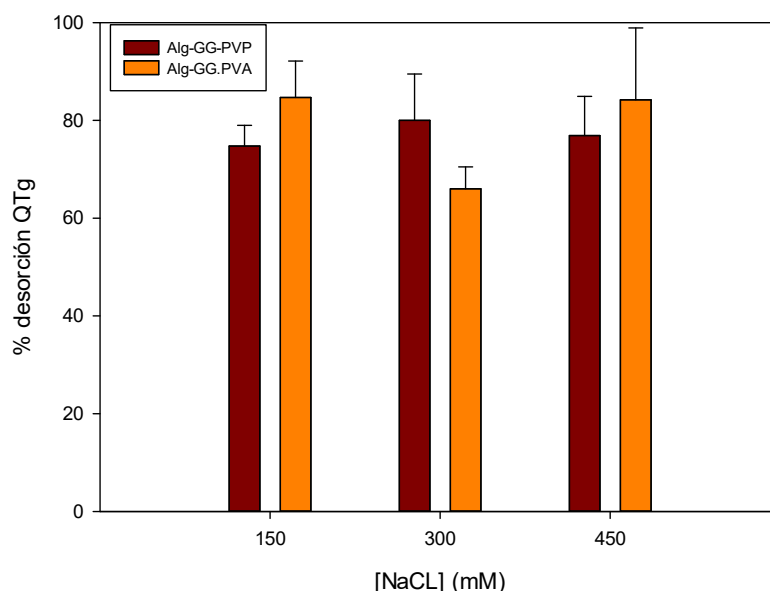


Figura 5.17: % desorción de QTg en los sistemas en estudio en función de la fuerza iónica del medio. Medio buffer Cit 25 mM. Concentración inicial de QTg 0,164 mg/mL. Temperatura 25°C.

Puede concluirse que el mejor buffer de desorción para la matriz Alg-GG-PVP es el Cit 25 mM pH 5,0 con el agregado de 300 mM de NaCl, con el cual se obtiene un $80,0 \pm 9,5$ % de QTg desorbida. En cambio, para la matriz Alg-GG-PVA es el Cit 25 mM pH 5,0 con el agregado de 150 mM de NaCl, con el cual se obtiene un $84,7 \pm 7,5$ % de QTg desorbida. Esta discrepancia puede deberse a la diferencia de estructura de cada uno de los polímeros. Se puede suponer que, la presencia de PVA en forma de ovillo entre la estructura de la matriz Alg-GG puede beneficiar la liberación de la proteína, ya que la misma no se encuentra interaccionando fuertemente con los grupos cargados de la matriz. Esto, a su vez, confirma nuevamente el comportamiento electrostático de la interacción entre la matriz y la proteína modelo.

5.5.5. Cinética de desorción

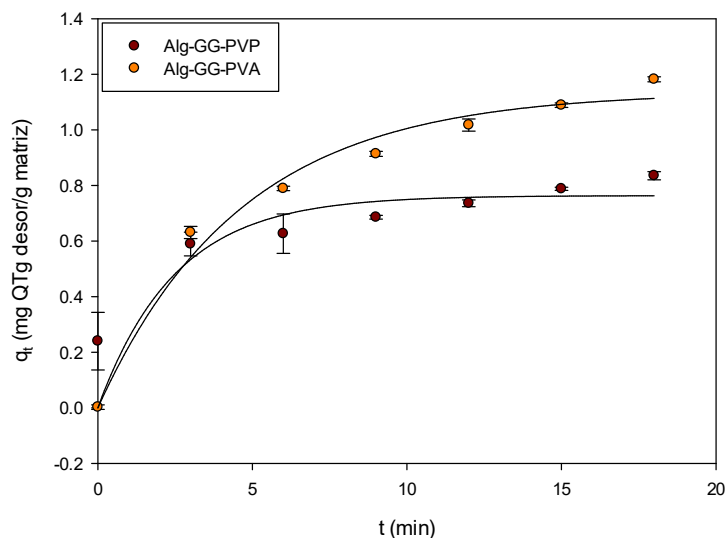


Figura 5.18: Cinéticas del proceso de desorción de QTg sobre ambas matrices. Buffer de desorción: Cit 25 mM pH 5,0 + NaCl 300 mM y 150 mM. Temperatura 25°C.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la cinética de proceso de desorción es rápida, alcanzando el equilibrio a los 6 minutos de incubación aproximadamente. Los resultados están de acuerdo con los obtenidos para otros sistemas, donde el proceso de desorción es mucho más rápido que la de adsorción [16].

5.5.6. Reutilización de la matriz

Finalmente, se aplicaron todos los resultados obtenidos para la realización de ciclos sucesivos de adsorción-lavado-desorción utilizando siempre la misma alícuota de las matrices de Alg-GG-PVP y Alg-GG-PVA. Cabe destacar que el paso de lavado es muy importante para poder verificar la eliminación completa de enzima adsorbida inespecíficamente así también como impurezas. Se utilizó en este caso el mismo buffer que para la adsorción (Cit 25 mM pH 5,0). La tabla 5.XI representa los valores obtenidos luego de cada ciclo.

Tabla 5.XI: Porcentajes de QTg adsorbidas y desorbidas en ciclos consecutivos de utilización de ambas matrices de Alg-GG. Medios: buffer Cit 25 mM pH 5,0, buffer Cit 25 mM pH 5,0 + NaCl 300 mM y buffer Cit 25 mM pH 5,0 + NaCl 150 mM Temperatura 25°C.

Ciclos	Polímero agregado a la matriz de Alg-GG			
	PVP		PVA	
	% Adsorción	% Desorción	% Adsorción	% Desorción
1	38,1 ± 3,1	81,0 ± 10,9	53,6 ± 0,21	79,9 ± 2,5
2	48,4 ± 2,8	63,9 ± 4,4	53,8 ± 0,35	83,3 ± 7,6
3	38,3 ± 0,6	80,0 ± 6,2	48,3 ± 5,2	104,4 ± 13,1
4	49,9 ± 1,3	71,0 ± 14,6	49,4 ± 0,5	89,3 ± 0,9
5	46,6 ± 2,7	67,5 ± 12,4	45,2 ± 2,5	71,0 ± 7,6
6	40,7 ± 5,7	94,2 ± 6,1	48,2 ± 1,4	74,2 ± 1,2
7	42,8 ± 2,3	68,9 ± 7,6	42,5 ± 0,3	90,1 ± 1,5
8	39,7 ± 1,5	52,4 ± 4,13	39,7 ± 11,3	130,3 ± 52,5

A través de los resultados obtenidos se puede concluir que los valores de adsorción se mantienen prácticamente constantes durante los 8 ciclos, disminuyendo levemente en los últimos dos. Es importante aclarar que los valores de % de adsorción obtenidos en esta experiencia son inferiores a los obtenidos en la primera experiencia realizada en este trabajo. Esto puede ser justificado en que las matrices son realizadas en cantidades determinadas a medida que se realizan las experiencias y existen variables externas que pueden afectar su producción y resultar en una disminución de la capacidad de adsorción de las mismas. Por este motivo, es importante tener mucho cuidado durante el paso de obtención de las matrices.

Los % de desorción en cada ciclo fueron variando en un rango entre 50% y 90%, lo que nos ayuda a concluir que el proceso de desorción en los ciclos estudiados fue

óptimo. En aquellos donde se observan valores superiores al 100% pueden ser considerados errores en la medición de las variables.

5.6. Discusión final y Conclusiones: Adsorción de Lisozima y Quimotripsinógeno en matrices de Alginato-Goma Guar y Alginato-Goma Guar-Polímero de cadena flexible

Las operaciones unitarias que incluyen adsorción de una molécula contenida en una fase líquida sobre una fase sólida, suelen presentar dificultades cuando la proteína de interés está contenida en un homogenado de una biomasa (vegetal, microbiana o animal) [137]. La excesiva presencia de restos celulares, células enteras y grandes cantidades de otras proteínas disminuyen o anulan la adsorción de la macromolécula de interés. Trabajos previos [138] han demostrado que la presencia de determinados PCF sintéticos formando parte de la matriz, disminuyen la interacción del lecho con la biomasa y favorecen la adsorción de la macromolécula de interés. No hay muchos trabajos que analicen el mecanismo de adsorción de proteínas en lechos que contienen PCF sin carga eléctrica: entre los más ensayados se pueden mencionar PVA, PVP, familia de los polióxidos de etileno-propileno (Pluronic®), etc.

Durante esta segunda parte del trabajo, se observó que el entrecruzamiento de las matrices de Alg-GG/PCF no redujo su capacidad de retener agua y mejoró la hidrofiliidad. También, se halló que la presencia de PCF sintéticos modifica las propiedades estructurales de las matrices, adquiriendo una estructura más compacta y con mejor resistencia mecánica. En este sentido, los resultados coinciden con publicaciones realizadas por otros autores [138], donde se describe que la presencia de PCF, cuando son adsorbidos en una matriz de Streamline (Sephacosa® con grupos SO^{-3} o COO^{-}), y luego se enfrenta la misma a una biomasa para recuperar una determinada enzima, disminuye la interacción con la biomasa incrementando la adsorción de la proteína de interés.

También se observó que el agregado de PVA y PVP aumenta el área superficial específica (SSA) de las matrices, mostrando un mayor efecto cuando se agrega PVP, esto

podría explicar el aumento de afinidad observado con las proteínas estudiadas, resultado también observado por otros autores con otras macromoléculas [132].

Cuando se estudió la adsorción de LZ en cada una de las matrices obtenidas, se determinó que la matriz formada por Alg-GG-PVA mostró la mayor capacidad de adsorción de la enzima. Por lo tanto, se seleccionó esta matriz para ensayar el proceso de recupero de LZ contenida en su biomasa natural (clara de huevo), siendo efectiva al emplearse en sistema batch, ya que se obtuvo hasta un 79% de recupero de la misma desde su fuente natural. La proteína pura adsorbida es recuperada en un 80% en presencia de NaCl 300 mM, siendo el tiempo de elución de 8 minutos. Esto presenta una ventaja bioseparativa con respecto a la matriz control de Alg-GG, con la cual se necesita mayor concentración de NaCl y más tiempo para eluir la misma cantidad de enzima.

Además, a partir del análisis termodinámico, se puede concluir que las interacciones coulómbicas serían similares en las 4 matrices generadas, por lo que las diferencias entre ellas en cuanto a la capacidad de adsorción de la enzima estarían dadas principalmente por el denominado efecto hidrofóbico generado, en mayor o menor medida por la adición de los distintos PCF.

El estudio de la adsorción de QTg sobre las matrices, muestra seguir un modelo cinético de *pseudo* primer orden para todas las matrices analizadas. A partir del ajuste al modelo de Weber y Morris, se puede concluir que la presencia de los PCF aumenta el valor de K_{id} , que se relaciona con el aumento de la velocidad de difusión del QTg en el siguiente orden: ninguno < Plur68 < PVA < PVP. La isoterma de Freundlich describe el sistema heterogéneo y la adsorción reversible. Este modelo predice que la concentración de proteína en el adsorbente aumenta con el aumento de su concentración inicial en solución. Además, el proceso de adsorción mostró ser reversible porque el QTg se eluyó de la matriz usando una baja concentración de NaCl, lo que es una prueba de la naturaleza

electrostática de la interacción. El pH óptimo de adsorción fue de alrededor de 5.0, lo que se correlaciona con el punto isoeléctrico del QTg alrededor de 8.5.

Las matrices de Alg-GG obtenidas con adición de PVA o PVP han demostrado ser eficientes en la adsorción de QTg. Este es un resultado importante, porque este sistema puede usarse como un primer paso en la recuperación de QTg del homogenado de páncreas fresco. Además, la técnica y los biomateriales utilizados garantizan el bajo costo y la no peligrosidad para el medio ambiente.

Se concluye que la incorporación de PCF sintéticos en los lechos de Alg-GG favorece su estabilidad mecánica, aumenta la capacidad de adsorción y la velocidad de elución de las proteínas ensayadas, con un buen recupero de ellas.

Resultados y Discusión:

Capítulo 3

6. Resultados y discusión: Adsorción de Lisozima y Quimotripsinógeno en micromatrices de Alginato y Alginato-Polímeros de cadena flexible.

6.1. Caracterización física de micropartículas

6.1.1. Morfología, tamaño y carga eléctrica superficial de micropartículas

Las micropartículas de Alg obtenidas a partir del método de secado por pulverización o nano spray drying, se analizaron morfológicamente antes y después del proceso de entrecruzamiento empleando SEM (figura 6.1). Se puede observar que, en general, las partículas tienen forma esférica, con un aspecto superficial principalmente liso presentando zonas con leves rugosidades. Antes del proceso de entrecruzamiento, se observa que la mayoría de las partículas se agregan, probablemente debido al proceso de secado por pulverización (figura 6.1a). Este fenómeno también se ha observado para otros sistemas poliméricos [139]. Como se ha informado previamente [133], el método de pulverización no muestra una uniformidad en el tamaño de las partículas, sin embargo, los diámetros medios son del orden de 500 a 600 nm.

Después del proceso de entrecruzamiento con Epi, las micropartículas se hidratan y, en consecuencia, parecen unirse entre sí y aumentan su tamaño en relación con las micropartículas sin proceso de entrecruzamiento, las cuales se encuentran deshidratadas (Fig. 6.1b). Cuando se aplicó la función de distribución para calcular el diámetro de ambas poblaciones, los resultados mostraron que las micropartículas tienen diámetros medios de 512,0 nm y 648,3 nm con una dispersión del 109% y 125% antes y después del proceso de entrecruzamiento, respectivamente. Dicha polidispersidad en ambas muestras podría ser consecuencia de la magnitud de las fuerzas electrostáticas activas en las micropartículas en el proceso de secado por pulverización, lo que resulta en variaciones en la distribución del tamaño de partícula [52].

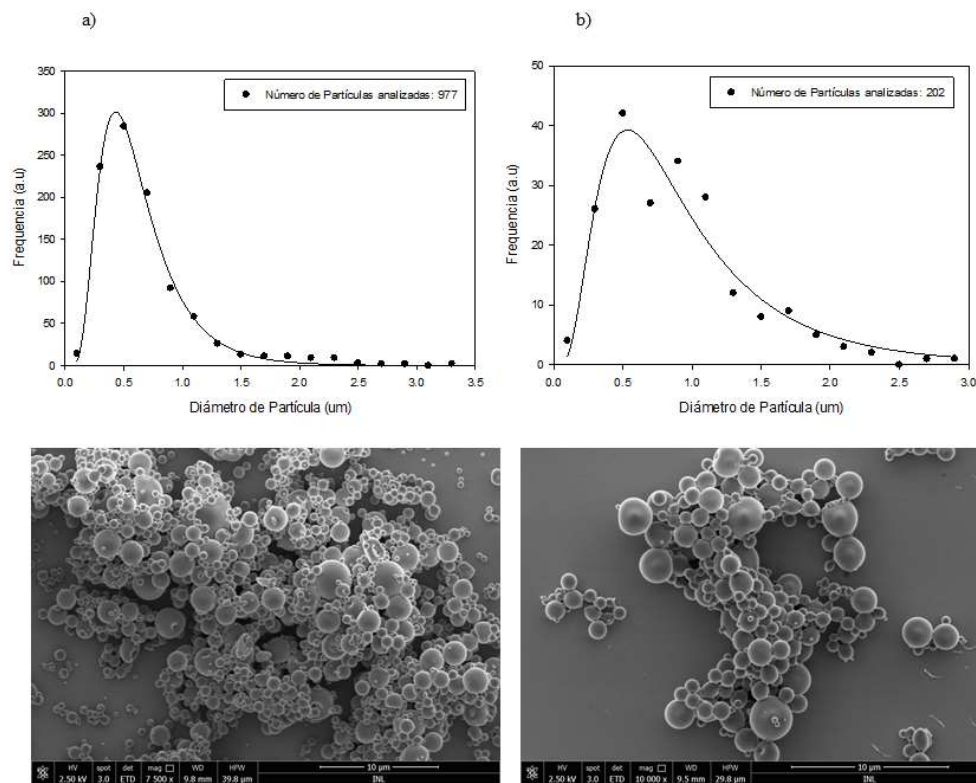


Figura 6.1. Micrografías SEM y distribución de tamaño de las micropartículas de Alg a) antes y b) después de ser entrecruzadas con Epi.

Las micropartículas entrecruzadas con Epi tienen un potencial zeta de $(-83,94 \pm 2,01)$ mV a pH 7,2 (Figura 6.2). El alto potencial negativo se debe a los grupos COO^- presentes en el Alg y es una prueba de que permanecen intactos durante la obtención de las micropartículas [140]. Esto es interesante porque la presencia de grupos aniónicos mejora la capacidad y la selectividad de la matriz para el proceso de adsorción [141].

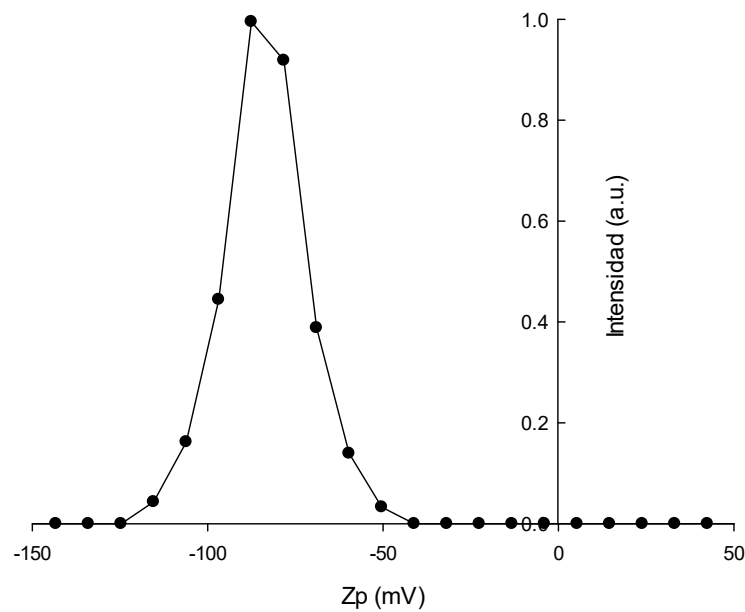


Figura 6.2. Distribución del potencial zeta de las micropartículas de Alg entrecruzadas. Las medidas se realizaron con las partículas hidratadas en un medio de agua destilada (pH 7,2) a 25°C.

6.1.2. Espectroscopia Raman

Las micropartículas de Alg sin entrecruzar y entrecruzadas se analizaron por espectroscopia Raman. Para ello, un rayo láser con una longitud de onda de 532 nm y una potencia de 25 mW se hizo incidir sobre la muestra. Los Espectros 1 y 2 en la figura 6.3 representan los espectros Raman de ambas micropartículas de Alg, cada uno de ellos registrado con un tiempo de recolección de 2 s.

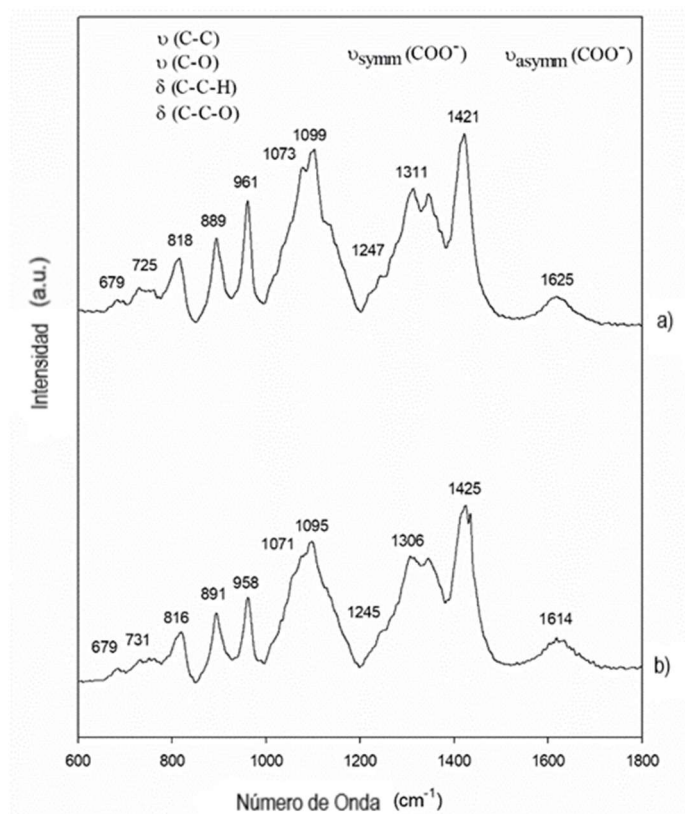


Figura 6.3. Espectros Raman de a) Micropartículas de Alg b) Micropartículas de Alg Entrecruzadas. Temperatura 25 °C.

Las bandas más prominentes obtenidas para ambas micropartículas de Alg se muestran en la Tabla 6.I. Los espectros Raman de Alg pueden dividirse en dos partes: vibraciones de la cadena principal del polímero en la zona de número de onda $< 1300 \text{ cm}^{-1}$ y vibraciones de estiramiento de los grupos funcionales carboxilato con cambios Raman a $\geq 1300 \text{ cm}^{-1}$ [142]. El espectro de las micropartículas de Alg entrecruzadas mostró corrimiento de picos, diferencias en las formas de los picos y la aparición de nuevas bandas en relación con las micropartículas de Alg sin entrecruzar. La deformación en el plano de los C-H se encuentra como un pico marcado alrededor de 1310 cm^{-1} . El predominio de este pico en el espectro de las micropartículas de Alg sin entrecruzar demuestra la mayor libertad de movimiento en esta región. La deformación C-C-H, a 960

cm^{-1} , es nuevamente más nítida y de mayor intensidad para las mismas. Al mismo tiempo, dos picos alrededor de 1070 y 1090 cm^{-1} relacionados con C-C, C-O y C-O-C son ligeramente más preponderantes. Los grupos C-C del esqueleto de Alg tienen su vibración de estiramiento (stretching) cercana a 810 cm^{-1} . De este análisis se puede observar que las vibraciones esqueléticas son más fuertes en las micropartículas de Alg sin entrecruzar, mientras que son más restringidas con el proceso de entrecruzamiento, lo cual era esperable debido a la formación de nuevos enlaces covalentes entre los átomos de Alg. Para las vibraciones de estiramiento del grupo carboxilato, el desplazamiento de banda más pronunciado fue la banda de estiramiento de COO^- asimétrica de 1625 cm^{-1} (Alg) a 1614 cm^{-1} (Alg entrecruzado), que demuestra el proceso de entrecruzamiento covalente en el Alg.

Tabla 6.I. Bandas de Raman más prominentes para los espectros de micropartículas de Alg.

	Micropartícula de Alg (cm^{-1})	Micropartícula de Alg entrecruzada (cm^{-1})
C-C-O modo bending/ deformación C-H	889	891
C-C-O modo bending/ deformación C-C-H	961	958
Anillo glicosídico modo breathing	1099	1095
Vibración de estiramiento del Carboxilato y de la Unión simple C-O	1311	1306
Vibración de estiramiento del Carboxilato Simétrico	1421	1425
Vibración de estiramiento del Carboxilato Asimétrico	1625	161

6.1.3. Análisis térmico

Las curvas del Análisis Termogravimétrico (TGA) para las micropartículas de Alg antes y después de ser entrecruzadas con Epi se presentan en la figura 6.4a. La gráfica de las micropartículas de Alg presenta dos transiciones térmicas, mientras que la de las micropartículas de Alg entrecruzadas muestra tres. También, se puede considerar que a 500 °C la pirólisis de Alg se termina, porque la masa restante es constante durante el calentamiento. Sin embargo, las micropartículas de Alg muestran una masa residual de alrededor del 40% del total inicial, mientras que la masa residual de las micropartículas de Alg entrecruzadas es de alrededor del 20%. Este hallazgo sugiere que la micropartícula de Alg entrecruzada tienen una menor proporción de cadena de polisacáridos con respecto a la misma masa de micropartícula de Alg sin entrecruzar. Debe tenerse en cuenta que las micropartículas entrecruzadas se incubaron en etanol, se lavaron con agua y se secaron solo en papel adsorbente, por lo que el contenido de agua debería ser significativo. Esta hipótesis concuerda con el primer valor derivado de la masa residual frente a la temperatura que se muestra en la figura 6.4b, donde se producen diferentes transiciones durante la pirólisis de Alg. En el caso de las micropartículas de Alg, se observa una pequeña transición a 53 °C. Esto se debe a que las micropartículas se prepararon en etanol y se secaron, por lo que esta temperatura de transición puede ser la pérdida de etanol residual en el interior de las micropartículas de Alg. Sin embargo, para las micropartículas de Alg entrecruzadas, se observa una transición importante alrededor de 107 °C. Este pico puede asociarse al agua perdida, que interactúa de manera más fuerte con las cadenas de polisacáridos mediante la formación de puente hidrógeno con el -OH del Alg, por lo que la temperatura de pérdida de esta agua es superior a 100 °C. A partir de este evento, se obtuvo el valor de recuperación de agua de la muestra entrecruzada: 0,63 g/g, lo que demuestra la alta capacidad hidrófila de la micropartícula tratada. Resultado similar se ha

observado para la pirólisis de Alg [139]. Las micropartículas de Alg mostraron una segunda transición a 231 °C, que se debe a la descomposición del polisacárido, como se informó anteriormente [143]. Por otro lado, la pirólisis para las micropartículas de Alg entrecruzadas es más compleja porque su proceso mostró dos transiciones: 196 °C y 250 °C, sugiriendo una estructura más rígida y con mayor estabilidad (20 °C más que las micropartículas de Alg). Esto puede relacionarse con la formación de nuevos enlaces entre las cadenas de polisacáridos que varían el comportamiento térmico de la matriz obtenida. Por otra parte, estos resultados junto a los obtenidos por espectroscopia Raman y a las imágenes de SEM permiten verificar que el entrecruzamiento de las micropartículas ha sido exitoso.

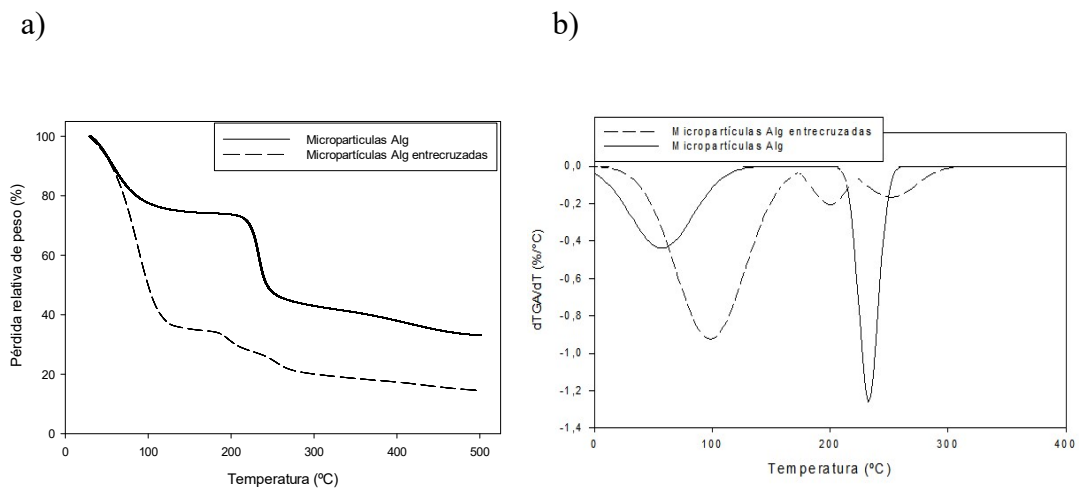


Figura 6.4. a) TGA (b) $\delta TGA/\delta T$ y c) DSC para micropartículas de Alg antes y después de ser entrecruzadas con Epi. Velocidad de calentamiento: 5 °C/min.

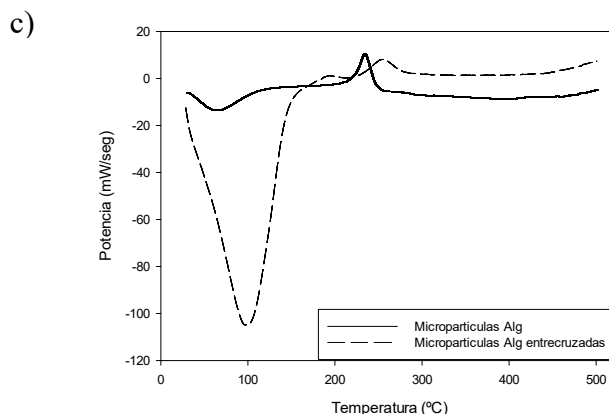


Figura 6.4 (continuación). a) TGA (b) $\partial TGA/\partial T$ y c) DSC para micropartículas de Alg antes y después de ser entrecruzadas con Epi. Velocidad de calentamiento: 5 °C/min.

Las curvas térmicas, las temperaturas de transición y las entalpías asociadas a ellas, obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para ambas muestras, se presentan en la Fig. 6.4c y en la Tabla 6.II. Los termogramas de las micropartículas de Alg sin entrecruzar y entrecruzadas con Epi muestran picos exotérmicos iniciales a 64 °C y 95 °C, respectivamente. Los picos exotérmicos se correlacionan con la pérdida de etanol residual que interactúa con grupos hidroxilo, a juzgar por el bajo calor asociado a la transición en micropartículas de Alg, mientras que el Alg entrecruzado mostró un pico significativo centrado a 95,3 °C que sugiere la pérdida de una gran cantidad de agua (juzgando por la transición de temperatura) incluida en la matriz, la cual se encuentra interaccionando fuertemente con los grupos hidroxilo del polímero a través de enlaces de hidrógeno. Estos hallazgos están de acuerdo con la literatura [51]. Tanto los picos endotérmicos como los exotérmicos se desplazaron a valores de temperatura más altos cuando las micropartículas de Alg se encuentran entrecruzadas con Epi (véase la tabla 6.II), por lo que se puede pensar que la estabilidad de la muestra es mayor y se requiere más energía para eliminar el agua residual adsorbida por la micropartículas (cambios de pico exotérmicos a mayor valor), y se libera menos energía al romper interacciones iónicas durante la descomposición térmica de micropartículas (cambio de pico

endotérmico a mayor valor). Finalmente, ambas micropartículas mostraron un pico endotérmico centrado a 234 °C y 255 °C asociado al proceso de pirólisis de Alg relacionado con las reacciones de despolimerización y la destrucción de las cadenas glucosídicas.

Tabla 6.II. Temperaturas máximas de $\partial TGA/\partial T$ y DSC y cambios de entalpía de los termogramas de DSC de las micropartículas de Alg y micropartículas de Alg entrecruzadas con Epi.

Muestra	Temperatura (°C)		ΔH (J/g)
	$\partial TGA/\partial T$	DSC	
Micropartículas Alg	53	63,8	-24,2
	231	233,6	45,6
Micropartículas Alg entrecruzadas	107	95,3	-205,6
	196	254,9	1,8
	250	-	-

6.2. Estudio de la capacidad de adsorción de las micropartículas

6.2.1. Isotermas de adsorción

Para el estudio del proceso de adsorción de las proteínas modelos sobre la matriz, se llevaron a cabo las isotermas de adsorción de LZ y QTg. Tanto las condiciones experimentales como el tiempo de incubación utilizados se determinaron anteriormente en este trabajo [95, 111]. La figura 6.5 muestra los resultados experimentales obtenidos.

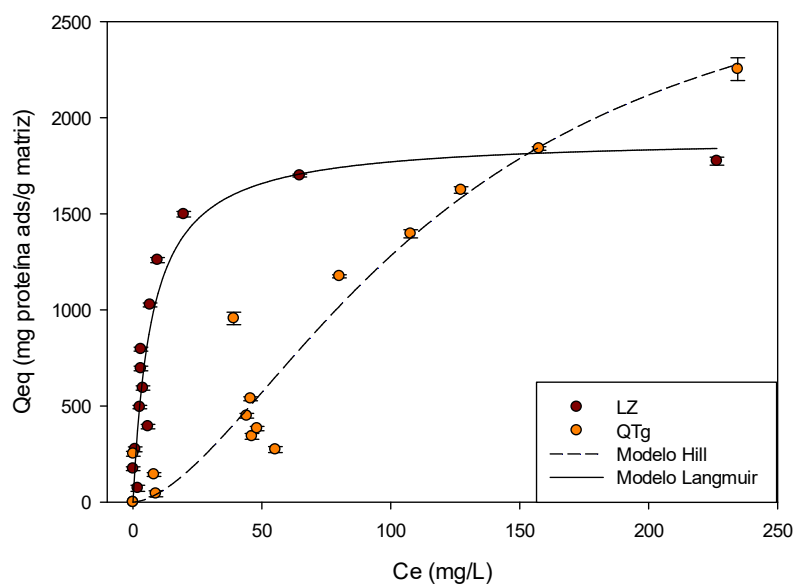


Figura 6.5. Isotermas de adsorción de LZ y QTg sobre micropartículas de Alg entrecruzadas con Epi. Medio: buffer Pi 20 mM, pH 7,0 y buffer Cit 25 mM, pH 5,0, respectivamente. Temperatura 25 °C.

Los datos experimentales fueron ajustados a tres modelos de adsorción, Freundlich, Langmuir y Hill [27, 111]. El análisis estadístico de la función de error muestra que las ecuaciones que mejor se ajustan a los datos son el modelo de Langmuir para la adsorción de LZ y el modelo de Hill para la adsorción de QTg. Los parámetros determinados para cada modelo son representados en la tabla 6.III.

Tabla 6.III. Parámetros del proceso de adsorción de LZ y QTg sobre la matriz formada por micropartículas de Alg entrecruzadas con Epi. Medio: buffer Pi 20 mM, pH 7,0 y buffer Cit 25 mM, pH 5,0, respectivamente. Temperatura 25 °C.

Modelo	Proteína	$Q_{\text{máx}}$ (mg/g matriz)	K_F	K_L	K_H	n_F or n_H	R^2	\sum^2
Freundlich	LZ	NA	534,4± 927	NA	NA	4,6 ± 0,03	0,7796	0,1253
	QTg	NA	20,4±10,7	NA	NA	1,14±0,11	0,8979	0,0733
Langmuir	LZ	1879,9 ± 44,3	NA	0,14 ± 0,03	NA	NA	0,9162	0,0476
	QTg	9133,3±1753,8	NA	0,0015±0,0013	NA	NA	0,9041	0,0688
Hill	LZ	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	QTg	3034,4±1063,9	NA	NA	3463,5±8.3	1,66±0,52	0,9159	0,0641

Los resultados muestran un comportamiento diferente entre ambas proteínas. Los datos experimentales de la isoterma de adsorción del QTg muestran una baja adsorción cuando la concentración de proteína es baja, pero a concentraciones más altas, la fracción de proteína unida aumenta significativamente de acuerdo con la presencia de un efecto cooperativo en el proceso de adsorción [111, 144]. Aunque en el pH de trabajo para ambas proteínas, las micropartículas de Alg entrecruzadas con Epi poseen carga eléctrica neta negativa, las isotermas muestran que ambas proteínas tienen un mecanismo de adsorción diferente. Por lo tanto, se deben considerar algunas diferencias entre ellas:

- El peso molecular de la LZ (14,3 kDa) es la mitad con respecto al QTg (25,6 kDa).
- El pH isoeléctrico (pI) es 11,35 y 8,97 para LZ y QTg, respectivamente.
- La carga neta superficial del QTg es menor con respecto a la carga neta superficial de la LZ. Sin embargo, su distribución es menos uniforme que en la LZ. Investigaciones previas sobre el QTg, han demostrado que cuando la carga neta superficial se encuentra

concentrada en una región de la molécula beneficia las fuerzas electrostáticas atractivas [145].

Debido a que la LZ tiene un tamaño menor que el QTg debería ser mayor su capacidad de penetración, sin embargo, se ha demostrado que el Alg interactúa con las proteínas hidrofílicas solo por la fuerza electrostática [146], este componente es determinante para impulsar la unión de la proteína. Ya que el QTg tiene una distribución de carga desigual, interactúa fuertemente con las micropartículas de Alg. Entonces, el efecto cooperativo del QTg puede ser producido por la modificación de la estructura interna de las micropartículas cuando las primeras moléculas de QTg están ligadas a él, favoreciendo la interacción de las siguientes moléculas de proteína. Se ha informado un resultado similar para la adsorción de LZ y QT sobre matriz formada por macroesferas de Alg y Goma Guar [95, 111].

6.2.2. Determinación de las condiciones de desorción

Teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos para las condiciones de desorción de LZ y QTg en macroesferas de Alg y GG [95], se planteó el aumento de la fuerza iónica del medio para la desorción de LZ y QTg en la matriz formada por micropartículas de Alg entrecruzadas con Epi. En la figura 6.6 se representan los % de desorción de LZ y QTg obtenidos en cada caso.

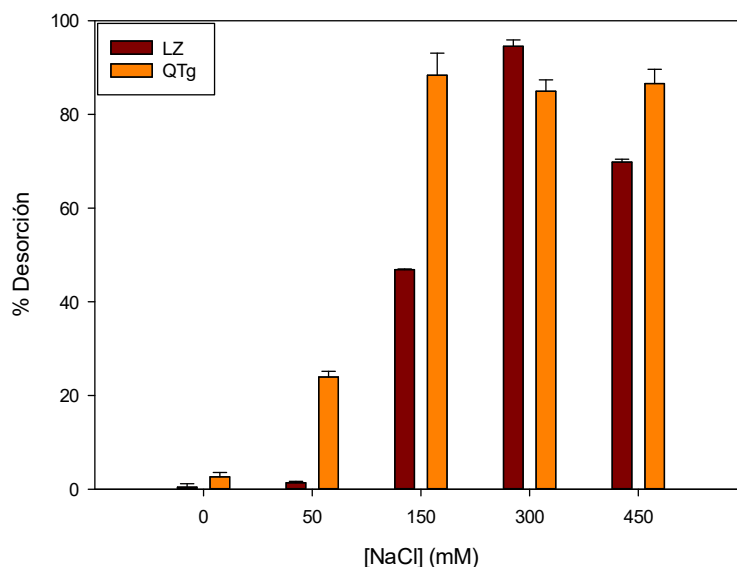


Figura 6.6. % desorción de LZ y QTg en los sistemas en estudio en función de la fuerza iónica del medio. Medio: buffer Pi 20 mM, pH 7,0 y buffer Cit 25 mM, pH 5,0, respectivamente. Concentración inicial de proteína 1,2 mg/mL. Temperatura 25°C.

Puede concluirse que el mejor buffer de desorción para LZ es Pi 20 mM pH 7,0 con el agregado de 300 mM de NaCl, con el cual se obtiene un $94,6 \pm 1,3$ % de proteína desorbida. En cambio, para QTg el mejor buffer de desorción resultó ser Cit 25 mM pH 5,0 con el agregado de 150 mM de NaCl, con el cual se obtiene un $88,4 \pm 4,7$ % de QTg desorbida.

Estos resultados avalan las conclusiones previas obtenidas sobre un mecanismo electrostático de interacción entre las proteínas y el adsorbente.

6.3. Estudio de la adsorción de QTg en matrices de micropartículas de Alg-PVA y Alg-PVP

A través de estudios previos [147], se demostró que el agregado de PVA o PVP a macroesferas de Alg y GG produce un incremento en la capacidad de estas de adsorber QTg cuando son utilizadas como lechos de adsorción en tanque agitado. Por lo tanto, se decidió estudiar si el agregado de estos polímeros de cadena flexible (PCF) afecta de manera similar la adsorción de QTg en las micropartículas de Alg. También, se estudió

cómo afecta a la capacidad de adsorción el volumen de Epi agregado para el entrecruzamiento de la micropartícula obtenida. Para ello, se desarrollaron microesferas de Alg, Alg-PVA, Alg-PVP y Alg-PVP-PVA a partir del goteo de cada una de soluciones en CaCl₂, utilizando el equipo denominado Encapsulador. Se optó por la gelificación ionotrópica por una cuestión de practicidad y tiempo requerido. Se planteó un diseño factorial completo (DOE) variando la [PVA], la [PVP] y el volumen de Epi para la producción de cada matriz. La matriz de diseño con las correspondientes respuestas (% de adsorción de QTg) se muestra en la Tabla 6.IV.

Tabla 6.IV. Diseño experimental (DOE) según el diseño factorial completo.
Buffer Cit 25 mM, pH 5,0, 25°C

PVA % (P/V)	PVP % (P/V)	Vol. Epi (uL)	Adsorción QTg (%)
0	0,7	960	35,9
0,7	0	240	92,2
0,7	0	960	47,6
0	0	960	41,8
0,7	0,7	960	45,7
0,7	0,7	240	73,0
0,35	0,35	600	81,1
0,35	0,35	600	85,5
0	0	240	93,2
0	0,70	240	91,5

De acuerdo con los resultados obtenidos y mediante el análisis de la varianza, se verificó la significación estadística de cada variable y sus interacciones. Sólo uno de los parámetros estudiados (Vol. de Epi) tuvo una influencia significativa en la adsorción (valores p-value <0.05) mientras que el agregado de PVP y PVA a la matriz no afectó el proceso (p-values 0.192 y 0.733). También se encontró que ninguna de las interacciones entre los parámetros en estudio resultó significativas (p-value > 0.05). Estos resultados nos permiten concluir que el agregado de PCF no afecta directamente a la capacidad de adsorción de las micropartículas de Alg. Una explicación posible para los resultados obtenidos es que el aumento en la capacidad de adsorción ya se incrementó a su máximo valor a causa del aumento en la superficie de contacto dado por la disminución del tamaño

de las partículas adsorbentes, por lo que el agregado de PCF no modifica los resultados obtenidos. También podemos concluir que el aumento en el volumen de Epi utilizado para entrecruzar dichas micropartículas afecta de manera negativa la capacidad de adsorción de QTg, lo que puede deberse a una estructura más compacta por el aumento en el entrecruzamiento de las moléculas de Alg.

6.4. Análisis del tamaño de las micropartículas de Alg, Alg-PVP y Alg-PVA entrecruzadas con dos volúmenes de Epi.

Se procedió al análisis microscópico de las micropartículas obtenidas en la sección anterior para verificar si el tamaño de estas está directamente relacionado con el aumento en el volumen de Epi para su entrecruzamiento. La figura 6.7 muestra cada matriz con su respectivo histograma.

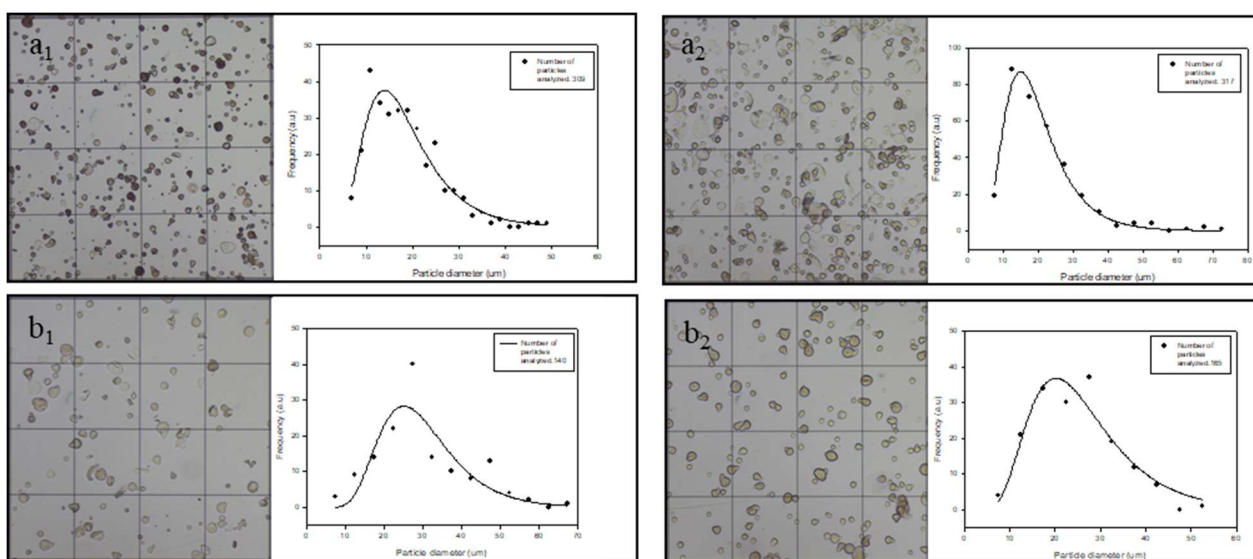


Figura 6.7. Micrografías ópticas de micropartículas entrecruzadas. (a) Alg, (b) Alg-PVP, (c) Alg-PVA y (d) Alg-PVP-PVA. Los subíndices 1 indican que las muestras se entrecruzaron con 240 uL de Epi, y los subíndices 2, con 960 uL. Las barras de escala son 100 µm.

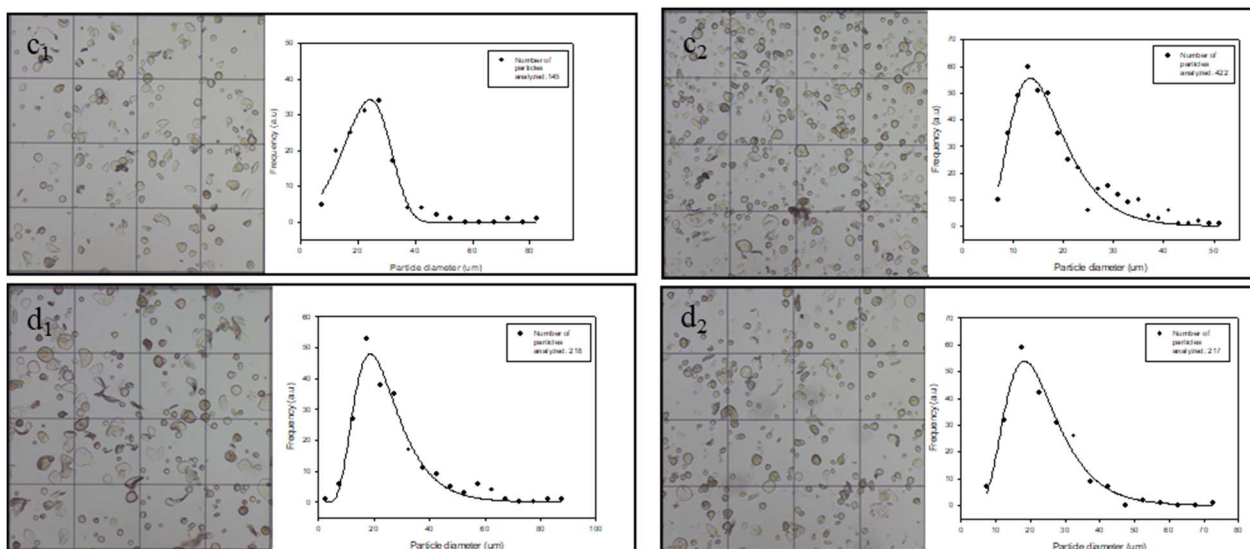


Figura 6.7 (continuación). Micrografías ópticas de micropartículas entrecruzadas. (a) Alg, (b) Alg-PVP, (c) Alg-PVA y (d) Alg-PVP-PVA. Los subíndices 1 indican que las muestras se entrecruzaron con 240 μ L de Epi, y los subíndices 2, con 960 μ L. Las barras de escala son 100 μ m.

A partir del análisis de las gráficas se puede concluir que a mayor volumen de Epi agregado para entrecruzar menor el tamaño de las micropartículas. También se puede observar que al agregar PVP para la producción de las matrices se observa un leve aumento en el tamaño. Todo esto nos permite concluir que, al aumentar el volumen de Epi para entrecruzar las micropartículas, el entrecruzamiento se vuelve más compacto y disminuye el tamaño de las partículas. Esto se ve reflejado en la disminución de la capacidad de adsorción de estas al permitirse menos el contacto de la proteína con la matriz.

6.5. Aplicación de los resultados obtenidos

6.5.1. Eficiencia de las micropartículas de Alg entrecruzadas con Epi en la recuperación de QTg y LZ en una mezcla de proteínas

La capacidad de selección y recuperación de las micropartículas de Alg entrecruzadas con Epi producidas por Spray Drying en la primera parte de este capítulo, se ensayó adsorbiendo LZ y QTg a partir de una mezcla artificial de proteínas formadas por CAT (pI 5.4, PM 250 kDa), OVO (pI 4.5, PM 44.3 kDa) y BSA (pI 5.3, PM 66.4 kDa) en una

proporción del 90% de esas proteínas que actúan como impurezas y 10% de LZ o QTg, respectivamente. La adsorción en lecho agitado o batch, el lavado y la desorción se llevaron a cabo en las condiciones previamente determinadas. Las proteínas en cada paso (adsorción, lavado o desorción) se identificaron mediante electroforesis en SDS, el patrón obtenido se muestra en la figura 6.8. La calle correspondiente al paso de desorción (cuarta calle) para LZ muestra la banda predominante correspondiente a la purificación de la proteína, donde no aparecen proteínas contaminantes, a diferencia de la segunda y tercera calle, que representan los pasos de adsorción y lavado, respectivamente, y donde si se observan impurezas. Por otro lado, en el caso del QTg, la calle número 8 representa el paso de desorción donde la purificación de la proteína objetivo no es total, porque aparecen las proteínas contaminantes. Esto podría explicarse ya que cuando el QTg se une a las micropartículas, produce un cambio estructural interno que beneficia la unión de las otras proteínas, así también como tener en cuenta que el pH en el cuál es óptima la adsorción de QTg en la matriz (pH =5,0), las proteínas impurezas probablemente se encuentran levemente cargadas positivamente, interaccionando también con las micropartículas de Alg entrecruzadas cargadas negativamente.

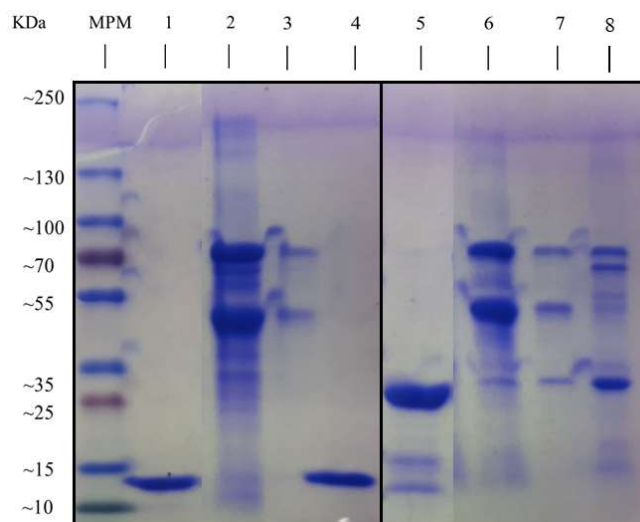


Figura 6.8. SDS-PAGE para el sistema de mezcla de proteínas: (MPM) marcador de peso molecular; (1) LZ pura 10 mg/ml, (2) Paso de adsorción del sistema selectivo para LZ, buffer Pi 20 mM pH 7,0, (3) Paso de lavado del sistema selectivo para LZ, buffer Pi 20 mM pH 7,0, (4) Paso de desorción del sistema selectivo para LZ, buffer Pi 20 mM pH 7,0 - NaCl 300 mM, (5) QTg puro 10 mg/ml (6) Paso de adsorción del sistema selectivo para QTg, buffer Cit 25 mM, pH 5,0; (7) Paso de lavado del sistema selectivo para QTg, buffer Cit 25 mM, pH 5,0; (8) Paso de desorción del sistema selectivo para QTg, buffer Cit 25 mM, pH 5,0 - NaCl 150 mM. Temperatura 25 °C.

6.5.2. Estudio de la recuperación de QTg en una mezcla de proteínas sobre matrices formadas por micropartículas de Alg, Alg-PVP, Alg-PVA y Alg-PVP-PVA

A partir de las micropartículas obtenidas por el proceso de gelificación ionotrópica utilizando el Encapsulador, se estudió la capacidad de recuperación y selectividad en cada una de ellas de QTg a partir de una mezcla de proteínas (BSA, OVO y CAT), las cuales fueron utilizadas en exceso para representar impurezas del sistema. Se llevó a cabo un proceso similar a la sección anterior, realizando un ciclo de adsorción-lavado-desorción en las condiciones óptimas para el proceso de la proteína en cuestión. Las proteínas presentes en la desorción de cada sistema se identificaron mediante electroforesis en SDS, el patrón obtenido se muestra en la figura 6.9. A partir del análisis de cada calle se puede observar la presencia de las impurezas en el paso de desorción de todos los sistemas, excepto en la calle 6, la cual pertenece al sistema formado por la matriz de micropartículas de Alg-PVP-PVA. Estos resultados se pueden justificar por el pH de trabajo (pH=5,0), en el cual las proteínas (impurezas) se encuentran levemente cargadas positivamente y

pueden interactuar electrostáticamente con la matriz cargada negativamente. Sin embargo, este comportamiento se ve reducido en la matriz que contiene una proporción alta de ambos PCF, disminuyendo esta atracción y mejorando la purificación de la proteína de interés con respecto al resto de las matrices en estudio. Esto podría deberse a que la presencia de dichos polímeros disminuye la carga eléctrica neta negativa de la matriz, aumentando su acidez y beneficiando sólo la unión de las proteínas cargadas más positivamente [147].

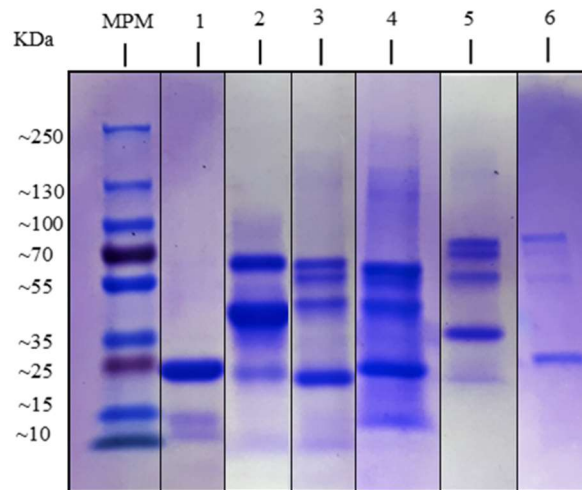


Figura 6.9. SDS-PAGE para sistema de mezcla de proteínas en diferentes matrices de adsorción. (MPM) marcador de peso molecular; (1) QTg puro 10 mg/ml; (2) Mezcla de proteínas en buffer Cit 25 mM pH 5,0; (3) Paso desorción en matriz de micropartículas de Alg entrecruzadas con Epi; (4) Paso desorción en matriz de micropartículas de Alg- PVP entrecruzadas con Epi; (5) Paso desorción en matriz de micropartículas de Alg- PVA entrecruzadas con Epi; (6) Paso desorción en matriz de micropartículas de Alg-PVA-PVA entrecruzadas con Epi. Buffer desorción: Cit 25 mM, pH 5,0 - NaCl 150 mM. Temperatura 25 °C.

6.6. Discusión final y Conclusiones: Adsorción de Quimotripsinógeno y Lisozima en micromatrices de Alg y Alg-Polímero de cadena flexible.

El objetivo de esta sección fue analizar el comportamiento de la operación unitaria de adsorción para un adsorbente que está a nivel de micropartículas (100 a 1000 nm). En este sentido, en los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas para la obtención de micro y nano partículas a partir de un material adsorbente tradicional como son los geles de polisacáridos, los cuales magnifican sus propiedades y, a veces, hasta adquieren nuevas propiedades respecto del mismo material cuando se trabaja a nivel de partículas macroscópicas (2-4 mm) [148]. Uno de los métodos más populares para obtener micropartículas de geles de polisacáridos es el método de spray drying o pulverización con posterior secado de la microgota cuando todavía está suspendida en el aire. Esta metodología está muy desarrollada en la industria de los alimentos, por ejemplo, la obtención de la leche en polvo se hace aplicando esta metodología. Su principal ventaja es que se puede aplicar en forma continua, lo que permite obtener una gran cantidad de material, ideal para luego escalar un proceso de obtención de micropartículas. A diferencia de la obtención de los geles de polisacáridos a partir del goteo de sus soluciones, caso del Alg, chitosan, carragenano, etc., donde las partículas muestran una dispersión pequeña de diámetro, el método de spray drying tiene la desventaja de que no permite la pulverización de soluciones viscosas, por lo tanto, trabaja con soluciones más diluidas en comparación a los valores empleados en el método de goteo, lo que lleva a la obtención de partículas de tamaños muy polidispersos.

Las nanopartículas de geles de polisacáridos y otros materiales compatibles con la vida son útiles para realizar *delivery* oral de un fármaco [149], pero no tienen aplicación cuando se emplean en la operación unitaria de bioseparación. De esta manera, el tamaño micro que se ha seleccionado para las partículas de Alg fue óptimo para lograr el objetivo

propuesto. Cabe destacar que, partículas de menor tamaño, pueden generar inconvenientes en la manipulación y consecuente separación de la fase acuosa donde se encuentran. A diferencia de las macropartículas estudiadas en los Capítulos 1 y 2, estas micropartículas solamente estaban formadas por Alg, no pudiéndose agregar el segundo polisacárido expansor de la estructura interna por la alta viscosidad de sus soluciones. Sin embargo, la disminución del tamaño demostró que no hace falta un segundo polisacárido para mejorar la capacidad de adsorción de las micropartículas obtenidas.

Como parte final del trabajo de Tesis, se desarrollaron micropartículas de Alg entrecruzadas con Epi aplicando la técnica de secado por pulverización (Spray Drying). Se logró caracterizarlas tanto morfológica como estructuralmente a partir de la utilización de diferentes técnicas microscópicas, espectroscópicas y térmicas, así también como, estudiar su capacidad de adsorber dos proteínas modelos, LZ y QTg. Las micropartículas de Alg entrecruzadas dieron como resultados tamaños de partícula medios de 700 nm, presentaron buena estabilidad térmica y mostraron una capacidad de adsorción máxima de 3034 mg de QTg por gramo de lecho y 1088 mg de LZ por gramo de lecho a 25 °C, cuando se ensayó el proceso en batch. Los resultados mejoran 100 veces la adsorción de QTg en comparación con otros lechos poliméricos [111, 147, 150] y 30 veces la adsorción de LZ [95, 151]. Esta diferencia es una respuesta directa a la disminución en el tamaño de las partículas que forman la matriz y que beneficia el aumento en la superficie de contacto. También, muestra la misma capacidad de selección de la proteína de interés cuando ésta está presente en proporción muy minoritaria en una mezcla con otras proteínas. Además, el proceso de entrecruzamiento con Epi del polímero ayuda a aumentar su estabilidad y resistencia mecánica, lo que le da una ventaja sobre los lechos macroscópicos, indicando un alto potencial para su aplicación industrial.

Por otra parte, se estudió el posible mejoramiento en la capacidad de adsorción de dichas matrices mediante el agregado de dos polímeros de cadena flexible, PVP y PVA, utilizando la técnica de gelificación ionotrópica. Se corroboró que, la presencia de ellos no mejora dicha capacidad. Además, a pesar de que es conocido que, las matrices cuando son utilizadas en lecho empacado poseen mayor capacidad de adsorción que la misma matriz cuando se trabaja en batch, no fue necesario ensayar las micropartículas en una columna de lecho empacado, debido a que el aumento de entre 30 a 100 veces de su capacidad de adsorción, produce un rendimiento de recuperación de la proteína de interés (LZ y/o QTg) muy superior a un lecho empacado. Sin embargo, no se puede descartar el empleo de estas matrices en columnas, ya que podrían resultar ventajosas a nivel de costos de producción y materiales si se pretende escalar el proceso.

Las metodologías desarrolladas a partir de la obtención de micropartículas de geles poliméricos se mostraron sencillas, escalables y muy económicas, lo cual permitiría aplicarlas a otras macromoléculas de interés biotecnológico.

Referencias Bibliográficas

7. Referencias Bibliográficas

1. Tejeda-Mansir, A., R. Montesinos-Cisneros, and R. Guzmán, *Bioseparaciones*. Editorial UNISON, México, 1995: p. 307-491.
2. Wheelwright, S.M., *The design of downstream processes for large-scale protein purification*. Journal of Biotechnology, 1989. **11**(2-3): p. 89-102.
3. Cisneros-Ruiz, R.-P., *Estrategias de Bioingeniería Para la Recuperación Primaria de Productos Biológicos*. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 2005: p. 131-139.
4. Scopes, R.K., *Protein purification: principles and practice*. 2013: Springer Science & Business Media.
5. Labrou, N., *Protein Purification: An Overview*, in *Protein Downstream Processing*, N.E. Labrou, Editor. 2014, Humana Press. p. 3-10.
6. Jean-François, P.H. and B.H. Jean, *Modeling and Applications of Downstream Processing*, in *Downstream Processing and Bioseparation*. 1990, American Chemical Society. p. 1-35.
7. Scopes, R.K., *Protein purification : principles and practice / Robert K. Scopes*. Springer advanced texts in chemistry. 1994, New York :: Springer-Verlag.
8. Castillo-Yáñez, F.J., et al., *Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (Sardinops sagax caeruleus)*. Food Chemistry, 2006. **99**(2): p. 252-259.
9. Carrea, G., P. Pasta, and E. Antonini, *Purification of chymotrypsin by subunit exchange chromatography on the denatured protein*. Biotechnology and bioengineering, 1983. **25**(5): p. 1331-1339.
10. Doran, P.M., *Chapter 11 - Unit Operations*, in *Bioprocess Engineering Principles (Second Edition)*. 2013, Academic Press: London. p. 445-595.
11. Huddleston, J. and A. Lyddiatt, *Aqueous two-phase systems in biochemical recovery*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1990. **26**(3): p. 249-279.
12. Boeris, V., et al., *Purification of chymotrypsin from bovine pancreas using precipitation with a strong anionic polyelectrolyte*. Process Biochemistry, 2009. **44**(5): p. 588-592.
13. Cappella, L.V., V. Boeris, and G. Picó, *A simple method of chymotrypsin concentration and purification from pancreas homogenate using Eudragit® L100 and Eudragit® S100*. Journal of Chromatography B, 2011. **879**(13-14): p. 1003-1007.
14. Anspach, F.B., et al., *Expanded-bed chromatography in primary protein purification*. Journal of Chromatography A, 1999. **865**(1-2): p. 129-144.
15. Gondim, D., et al., *Human IgG adsorption using dye-ligand epoxy chitosan/alginate as adsorbent: influence of buffer system*. Adsorption, 2014. **20**(8): p. 925-934.
16. Spelzini, D., B. Farruggia, and G. Picó, *Purification of chymotrypsin from pancreas homogenate by adsorption onto non-soluble alginate beads*. Process Biochemistry, 2011. **46**(3): p. 801-805.
17. Castellan, G.W. and M.E.C. Basín, *Fisicoquímica*. 1987: Pearson educación.
18. Ho, Y.S. and G. McKay, *Kinetic Models for the Sorption of Dye from Aqueous Solution by Wood*. Process Safety and Environmental Protection, 1998. **76**(2): p. 183-191.
19. Hameed, B.H., I.A.W. Tan, and A.L. Ahmad, *Adsorption isotherm, kinetic modeling and mechanism of 2,4,6-trichlorophenol on coconut husk-based activated carbon*. Chemical Engineering Journal, 2008. **144**(2): p. 235-244.
20. Chiou, M.-S. and H.-Y. Li, *Equilibrium and kinetic modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads*. Journal of Hazardous Materials, 2002. **93**(2): p. 233-248.
21. Ho, Y.S. and G. McKay, *Pseudo-second order model for sorption processes*. Process Biochemistry, 1999. **34**(5): p. 451-465.
22. Dotto, G., et al., *Optimization and kinetic analysis of food dyes biosorption by Spirulina platensis*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. **91**: p. 234-241.
23. Ho, Y.S. and G. McKay, *Sorption of dyes and copper ions onto biosorbents*. Process Biochemistry, 2003. **38**(7): p. 1047-1061.

24. Bilgili, M.S., *Adsorption of 4-chlorophenol from aqueous solutions by xad-4 resin: isotherm, kinetic, and thermodynamic analysis*. Journal of Hazardous Materials, 2006. **137**(1): p. 157-164.
25. Tan, K. and B. Hameed, *Insight into the adsorption kinetics models for the removal of contaminants from aqueous solutions*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2017. **74**: p. 25-48.
26. Sathishkumar, M., et al., *Two and three-parameter isothermal modeling for liquid-phase sorption of Procion Blue H-B by inactive mycelial biomass of *Panus fulvus**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2007. **82**(4): p. 389-398.
27. Foo, K.Y. and B.H. Hameed, *Insights into the modeling of adsorption isotherm systems*. Chemical Engineering Journal, 2010. **156**(1): p. 2-10.
28. Langmuir, I., *THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. PART I. SOLIDS*. Journal of the American Chemical Society, 1916. **38**(11): p. 2221-2295.
29. Koopal, L., et al., *Analytical isotherm equations for multicomponent adsorption to heterogeneous surfaces*. Journal of Colloid and Interface Science, 1994. **166**(1): p. 51-60.
30. Goutelle, S., et al., *The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling*. Fundamental & clinical pharmacology, 2008. **22**(6): p. 633-648.
31. Fahrner, R.L., G.S. Blank, and G.A. Zapata, *Expanded bed protein A affinity chromatography of a recombinant humanized monoclonal antibody: process development, operation, and comparison with a packed bed method*. Journal of biotechnology, 1999. **75**(2-3): p. 273-280.
32. Taty-Costodes, V.C., et al., *Removal of lead (II) ions from synthetic and real effluents using immobilized *Pinus sylvestris* sawdust: Adsorption on a fixed-bed column*. Journal of hazardous materials, 2005. **123**(1-3): p. 135-144.
33. Vieira, M., et al., *Adsorption of lead and copper ions from aqueous effluents on rice husk ash in a dynamic system*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2014. **31**(2): p. 519-529.
34. Han, R., et al., *Adsorption of methylene blue by phoenix tree leaf powder in a fixed-bed column: experiments and prediction of breakthrough curves*. Desalination, 2009. **245**(1-3): p. 284-297.
35. Karimi, M., et al., *Column study of Cr (VI) adsorption onto modified silica-polyacrylamide microspheres composite*. Chemical engineering journal, 2012. **210**: p. 280-288.
36. Aksu, Z. and F. Gönen, *Biosorption of phenol by immobilized activated sludge in a continuous packed bed: prediction of breakthrough curves*. Process biochemistry, 2004. **39**(5): p. 599-613.
37. Nwabanne, J. and P. Igbokwe, *Adsorption performance of packed bed column for the removal of lead (II) using oil palm fibre*. International Journal of Applied Science and Technology, 2012. **2**(5).
38. Blanes, P.S., et al., *Application of soy hull biomass in removal of Cr (VI) from contaminated waters. Kinetic, thermodynamic and continuous sorption studies*. Journal of environmental chemical engineering, 2016. **4**(1): p. 516-526.
39. Vijayaraghavan, K. and Y.-S. Yun, *Polysulfone-immobilized *Corynebacterium glutamicum*: a biosorbent for Reactive black 5 from aqueous solution in an up-flow packed column*. Chemical Engineering Journal, 2008. **145**(1): p. 44-49.
40. Zulfadhly, Z., M. Mashitah, and S. Bhatia, *Heavy metals removal in fixed-bed column by the macro fungus *Pycnoporus sanguineus**. Environmental Pollution, 2001. **112**(3): p. 463-470.
41. Long, Y., et al., *Packed bed column studies on lead (II) removal from industrial wastewater by modified *Agaricus bisporus**. Bioresource technology, 2014. **152**: p. 457-463.
42. Senthilkumar, R., et al., *Seaweeds for the remediation of wastewaters contaminated with zinc (II) ions*. Journal of Hazardous Materials, 2006. **136**(3): p. 791-799.

43. Yan, G., T. Viraraghavan, and M. Chen, *A new model for heavy metal removal in a biosorption column*. Adsorption Science & Technology, 2001. **19**(1): p. 25-43.
44. Bohart, G. and E. Adams, *Some aspects of the behavior of charcoal with respect to chlorine*. Journal of the American Chemical Society, 1920. **42**(3): p. 523-544.
45. Suh, W.H., et al., *Porous, hollow, and ball-in-ball metal oxide microspheres: preparation, endocytosis, and cytotoxicity*. Advanced Materials, 2006. **18**(14): p. 1832-1837.
46. Iskandar, F., et al., *Production of morphology-controllable porous hyaluronic acid particles using a spray-drying method*. Acta biomaterialia, 2009. **5**(4): p. 1027-1034.
47. Nandiyanto, A.B.D. and K. Okuyama, *Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges*. Advanced Powder Technology, 2011. **22**(1): p. 1-19.
48. Paques, J.P., et al., *Preparation methods of alginate nanoparticles*. Advances in colloid and interface science, 2014. **209**: p. 163-171.
49. Leong, J.-Y., et al., *Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems*. Particuology, 2016. **24**: p. 44-60.
50. Schoubben, A., et al., *Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation*. Chemical Engineering Journal, 2010. **160**(1): p. 363-369.
51. Sarmento, B., et al., *Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies*. Carbohydrate Polymers, 2006. **66**(1): p. 1-7.
52. Li, X., et al., *Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90*. Journal of Controlled Release, 2010. **147**(2): p. 304-310.
53. Amirav, L., A. Amirav, and E. Lifshitz, *A spray-based method for the production of semiconductor nanocrystals*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(20): p. 9857-9860.
54. Nandiyanto, A.B.D., et al., *Rapid synthesis of a BN/CNT composite particle via spray routes using ferrocene/ethanol as a catalyst/carbon source*. Materials Letters, 2009. **63**(21): p. 1847-1850.
55. Zhou, B., R. Balee, and R. Groenendaal, *Nanoparticle and nanostructure catalysts: technologies and markets*. Nanotech. L. & Bus., 2005. **2**: p. 222.
56. Seymour, R.B., *Introduction to polymer Chemistry*. 1971, New York: Mcgraw-Hill. 437.
57. José García de la, T., G.H.C. José, and M.C.L. Martínez, *Prediction of solution properties of flexible-chain polymers: a computer simulation undergraduate experiment*. European Journal of Physics, 2008. **29**(5): p. 945.
58. Kadajji, V.G. and G.V. Betageri, *Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications*. Polymers, 2011. **3**(4): p. 1972-2009.
59. Dobrynin, A.V. and M. Rubinstein, *Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces*. Progress in Polymer Science, 2005. **30**(11): p. 1049-1118.
60. Simsek-Ege, F.A., G.M. Bond, and J. Stringer, *Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH*. Journal of Applied Polymer Science, 2003. **88**(2): p. 346-351.
61. Cooper, C.L., et al., *Polyelectrolyte-protein complexes*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2005. **10**(1-2): p. 52-78.
62. Sankalia, M.G., et al., *Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007. **65**(2): p. 215-232.
63. Pawar, S.N. and K.J. Edgar, *Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications*. Biomaterials, 2012. **33**(11): p. 3279-3305.
64. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: Properties and biomedical applications*. Progress in Polymer Science, 2012. **37**(1): p. 106-126.
65. Steinbüchel, A. and S.K. Rhee, *Polysaccharides and polyamides in the food industry: properties, production, and patents*. 2005: Wiley-VCH Verlag GmbH & CO. KGaA.

66. Harnsilawat, T., R. Pongsawatmanit, and D.J. McClements, *Characterization of β -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study*. Food Hydrocolloids, 2006. **20**(5): p. 577-585.
67. Fabian, C.B., L.H. Huynh, and Y.H. Ju, *Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate*. LWT - Food Science and Technology, 2010. **43**(2): p. 375-379.
68. Teotia, S., S. Khare, and M. Gupta, *An efficient purification process for sweet potato beta-amylase by affinity precipitation with alginate*. Enzyme and microbial technology, 2001. **28**(9): p. 792-795.
69. Zhang, S., et al., *Silica modified calcium alginate–xanthan gum hybrid bead composites for the removal and recovery of Pb (II) from aqueous solution*. Chemical Engineering Journal, 2013. **234**: p. 33-42.
70. Damelin, L.H., M.A. Fernandes, and C.T. Tiemessen, *Alginate microbead-encapsulated silver complexes for selective delivery of broad-spectrum silver-based microbicides*. International journal of antimicrobial agents, 2015. **46**(4): p. 394-400.
71. Diós, P., et al., *Preformulation studies and optimization of sodium alginate based floating drug delivery system for eradication of Helicobacter pylori*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015. **96**: p. 196-206.
72. Sookkasem, A., et al., *Alginate beads for colon specific delivery of self-emulsifying curcumin*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2015. **29**: p. 159-166.
73. Harris, W.T., *Water temperature and accuracy of alginate impressions*. The Journal of prosthetic dentistry, 1969. **21**(6): p. 613-617.
74. Hondrum, S.O. and R. Fernandez, *Effects of long-term storage on properties of an alginate impression material*. The Journal of prosthetic dentistry, 1997. **77**(6): p. 601-606.
75. Kulkarni, A.R., et al., *Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application*. Journal of Controlled Release, 2000. **63**(1–2): p. 97-105.
76. Grant, G.T., et al., *Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model*. FEBS Letters, 1973. **32**(1): p. 195-198.
77. Gonçalves, V.L., et al., *Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium*. Polímeros, 2005. **15**(1): p. 6-12.
78. Yoon, S.-J., D.-C. Chu, and L. Raj Juneja, *Chemical and Physical Properties, Safety and Application of Partially Hydrolyzed Guar Gum as Dietary Fiber*. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2008. **42**(1): p. 1-7.
79. Chudzikowski, R., *Guar gum and its applications*. Journal of the Society of Cosmetic Chemists. **22**(1): p. 43-60.
80. Rana, V., et al., *Modified gums: Approaches and applications in drug delivery*. Carbohydrate polymers, 2011. **83**(3): p. 1031-1047.
81. Mudgil, D., S. Barak, and B. Khatkar, *Guar gum: processing, properties and food applications—A Review*. Journal of Food Science and Technology, 2014. **51**(3): p. 409-418.
82. Roy, I., M. Sardar, and M.N. Gupta, *Cross-linked alginate–guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin*. Biochemical Engineering Journal, 2005. **23**(3): p. 193-198.
83. Liu, Z.-M., et al., *Surface modification of polypropylene microfiltration membranes by the immobilization of poly (N-vinyl-2-pyrrolidone): a facile plasma approach*. Journal of membrane science, 2005. **249**(1): p. 21-31.
84. Chauhan, G.S., B. Singh, and S. Kumar, *Synthesis and characterization of N-vinyl pyrrolidone and cellulose based functional graft copolymers for use as metal ions and iodine sorbents*. Journal of applied polymer science, 2005. **98**(1): p. 373-382.
85. Nguyen, V., et al., *Kinetics of free-radical graft polymerization of 1-vinyl-2-pyrrolidone onto silica*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2002. **40**(1): p. 26-42.

86. Al Sagheer, F.A. and N.M. El-Sawy, *Investigation of radiation-grafted and radiation-modified N-vinyl-2-pyrrolidone onto polypropylene film*. Journal of applied polymer science, 2000. **76**(3): p. 282-289.
87. Gao, J., et al., *Preparation of gelatin-N-vinylpyrrolidone graft copolymer*. Journal of applied polymer science, 1998. **68**(9): p. 1485-1492.
88. ELKODSI, G. and J. Schurz, *CHEMICAL CHARACTERIZATION OF HIGH POLYMERS. I. NITRATION AND SUBSEQUENT REACTIONS*. PAPIER, 1973. **27**(7): p. 253-255.
89. Yeo, J.H., et al., *The Effects of PVA/Chitosan/Fibroin (PCF)-Blended Spongy Sheets on Wound Healing in Rats*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2000. **23**(10): p. 1220-1223.
90. Johnston, T.P. and W.K. Palmer, *Mechanism of poloxamer 407-induced hypertriglyceridemia in the rat*. Biochemical pharmacology, 1993. **46**(6): p. 1037-1042.
91. Devi, D.R., P. Sandhya, and B.V. Hari, *Poloxamer: a novel functional molecule for drug delivery and gene therapy*. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2013. **5**(8): p. 159.
92. LI-CHAN, E., et al., *Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography*. Journal of food science, 1986. **51**(4): p. 1032-1036.
93. Rezaei-Ghaleh, N., et al., *Thermal aggregation of α -chymotrypsin: role of hydrophobic and electrostatic interactions*. Biophysical chemistry, 2008. **132**(1): p. 23-32.
94. Lozano, P., T. De Diego, and J.L. Iborra, *Dynamic structure/function relationships in the α -chymotrypsin deactivation process by heat and pH*. European journal of biochemistry, 1997. **248**(1): p. 80-85.
95. Brassesco, M.E., N.W. Valetti, and G. Picó, *Molecular mechanism of lysozyme adsorption onto chemically modified alginate guar gum matrix*. International journal of biological macromolecules, 2017. **96**: p. 111-117.
96. Fiol, N. and I. Villaescusa, *Determination of sorbent point zero charge: usefulness in sorption studies*. Environmental Chemistry Letters, 2009. **7**(1): p. 79-84.
97. Goodrich, J.D. and W.T. Winter, *α -Chitin nanocrystals prepared from shrimp shells and their specific surface area measurement*. Biomacromolecules, 2007. **8**(1): p. 252-257.
98. Ougiya, H., et al., *Relationship between the physical properties and surface area of cellulose derived from adsorbates of various molecular sizes*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1998. **62**(10): p. 1880-1884.
99. Spence, K.L., et al., *The effect of chemical composition on microfibrillar cellulose films from wood pulps: water interactions and physical properties for packaging applications*. Cellulose, 2010. **17**(4): p. 835-848.
100. Pavia, D., et al., *Introduction to spectroscopy*. 2008: Cengage Learning.
101. Faix, O., *Fourier transform infrared spectroscopy*, in *Methods in lignin chemistry*. 1992, Springer. p. 83-109.
102. McMullan, D., *Scanning electron microscopy 1928–1965*. Scanning, 1995. **17**(3): p. 175-185.
103. Colthup, N., *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. 2012: Elsevier.
104. Sze, A., et al., *Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow*. Journal of colloid and interface science, 2003. **261**(2): p. 402-410.
105. Hu, M., et al., *Thermogravimetric kinetics of lignocellulosic biomass slow pyrolysis using distributed activation energy model, Fraser–Suzuki deconvolution, and iso-conversional method*. Energy Conversion and Management, 2016. **118**: p. 1-11.
106. Camiscia, P., et al., *Comparison of soybean hull pre-treatments to obtain cellulose and chemical derivatives: Physical chemistry characterization*. Carbohydrate polymers, 2018. **198**: p. 601-610.
107. Aitken, A. and M.P. Learmonth, *Protein determination by UV absorption*. The protein protocols handbook, 2002: p. 3-6.
108. Rabe, M., D. Verdes, and S. Seeger, *Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces*. Advances in Colloid and Interface Science, 2011. **162**(1–2): p. 87-106.

109. Nakanishi, K., T. Sakiyama, and K. Imamura, *On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001. **91**(3): p. 233-244.
110. Jain, R., *The art of computer systems performance analysis: techniques for experimental design, measurement, simulation, and modeling*. 1990: John Wiley & Sons.
111. Valetti, N.W. and G. Picó, *Adsorption isotherms, kinetics and thermodynamic studies towards understanding the interaction between cross-linked alginate-guar gum matrix and chymotrypsin*. Journal of Chromatography B, 2016. **1012**: p. 204-210.
112. Lagergren, S., *About the theory of so-called adsorption of soluble substances*. 1898.
113. Ho, Y.-S. and G. McKay, *Pseudo-second order model for sorption processes*. Process biochemistry, 1999. **34**(5): p. 451-465.
114. Burton, N.P. and C.R. Lowe, *Design of novel cationic ligands for the purification of trypsin-like proteases by affinity chromatography*. Journal of Molecular Recognition, 1993. **6**(1): p. 31-40.
115. Vieira, R.S. and M.M. Beppu, *Dynamic and static adsorption and desorption of Hg (II) ions on chitosan membranes and spheres*. Water research, 2006. **40**(8): p. 1726-1734.
116. Rodrigues, E., et al., *Adsorption of Cellulase Isolated from Aspergillus niger on Chitosan/Alginate Particles Functionalized with Epichlorohydrin*. Adsorption Science & Technology, 2013. **31**(1): p. 17-34.
117. Vadivelan, V. and K.V. Kumar, *Equilibrium, kinetics, mechanism, and process design for the sorption of methylene blue onto rice husk*. Journal of colloid and interface science, 2005. **286**(1): p. 90-100.
118. Zhou, C., et al., *Adsorption kinetic and equilibrium studies for methylene blue dye by partially hydrolyzed polyacrylamide/cellulose nanocrystal nanocomposite hydrogels*. Chemical Engineering Journal, 2014. **251**: p. 17-24.
119. Rudzinski, W. and W. Plazinski, *Kinetics of solute adsorption at solid/solution interfaces: on the special features of the initial adsorption kinetics*. Langmuir, 2008. **24**(13): p. 6738-6744.
120. Milonjić, S.K., *A consideration of the correct calculation of thermodynamic parameters of adsorption*. Journal of the Serbian chemical society, 2007. **72**(12): p. 1363-1367.
121. Lezehari, M., et al., *Fixed-bed column studies of pentachlorophenol removal by use of alginate-encapsulated pillared clay microbeads*. Journal of colloid and interface science, 2012. **379**(1): p. 101-106.
122. Jain, M., V. Garg, and K. Kadirvelu, *Cadmium (II) sorption and desorption in a fixed bed column using sunflower waste carbon calcium–alginate beads*. Bioresource technology, 2013. **129**: p. 242-248.
123. Srivastava, V., et al., *Prediction of breakthrough curves for sorptive removal of phenol by bagasse fly ash packed bed*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2008. **47**(5): p. 1603-1613.
124. Aziz, A.S.A., et al., *Column dynamic studies and breakthrough curve analysis for Cd (II) and Cu (II) ions adsorption onto palm oil boiler mill fly ash (POFA)*. Environmental Science and Pollution Research, 2014. **21**(13): p. 7996-8005.
125. García-Mateos, F., et al., *Removal of paracetamol on biomass-derived activated carbon: Modeling the fixed bed breakthrough curves using batch adsorption experiments*. Chemical engineering journal, 2015. **279**: p. 18-30.
126. Aguilar, K.C., et al., *Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation*. Journal of Food Engineering, 2015. **154**: p. 17-24.
127. Chiew, C.S.C., et al., *Stability and reusability of alginate-based adsorbents for repetitive lead (II) removal*. Polymer Degradation and Stability, 2016. **123**: p. 146-154.
128. Thakur, S., et al., *Recent progress in sodium alginate based sustainable hydrogels for environmental applications*. Journal of cleaner production, 2018. **198**: p. 143-159.
129. Bueno, C.Z., et al., *Control of the properties of porous chitosan–alginate membranes through the addition of different proportions of Pluronic F68*. Materials Science and Engineering: C, 2014. **44**: p. 117-125.

130. Grasselli, M., L. Diaz, and O. Cascone, *Beaded matrices from cross-linked alginate for affinity and ion exchange chromatography of proteins*. *Biotechnology techniques*, 1993. **7**(10): p. 707-712.
131. Zhang, W., et al., *Fabrication and characterization of macroporous epichlorohydrin cross-linked alginate beads as protein adsorbent*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2013. **43**(5): p. 431-444.
132. Boeris, V., et al., *Production, recovery and purification of a recombinant β -galactosidase by expanded bed anion exchange adsorption*. *Journal of Chromatography B*, 2012. **900**: p. 32-37.
133. Hua, S., et al., *pH-sensitive sodium alginate/poly (vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca^{2+} crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium*. *International journal of biological macromolecules*, 2010. **46**(5): p. 517-523.
134. Zain, N.A.M., M.S. Suhaimi, and A. Idris, *Development and modification of PVA–alginate as a suitable immobilization matrix*. *Process Biochemistry*, 2011. **46**(11): p. 2122-2129.
135. Kamoun, E.A., et al., *Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: characterization and bio-evaluation*. *Arabian Journal of Chemistry*, 2015. **8**(1): p. 38-47.
136. Mine, Y., *Recent advances in the understanding of egg white protein functionality*. *Trends in Food Science & Technology*, 1995. **6**(7): p. 225-232.
137. Vennapusa, R.R., et al., *Surface energetics to assess biomass attachment onto hydrophobic interaction adsorbents in expanded beds*. *Biochemical Engineering Journal*, 2009. **43**(1): p. 16-26.
138. Vennapusa, R.R. and M. Fernandez-Lahore, *Effect of chemical additives on biomass deposition onto beaded adsorbents*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2010. **110**(5): p. 564-571.
139. de Oliveira, E.F., H.C. Paula, and R.C. de Paula, *Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014. **113**: p. 146-151.
140. Harnsilawat, T., R. Pongsawatmanit, and D. McClements, *Characterization of β -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: a calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study*. *Food Hydrocolloids*, 2006. **20**(5): p. 577-585.
141. Helfferich, F., *Ion exchange; Courier Corporation, 1962*.
142. Schmid, T., et al., *Towards chemical analysis of nanostructures in biofilms II: tip-enhanced Raman spectroscopy of alginates*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2008. **391**(5): p. 1907-1916.
143. Ross, A., et al., *Influence of cation on the pyrolysis and oxidation of alginates*. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 2011. **91**(2): p. 344-351.
144. Luo, Q. and J.D. Andrade, *Cooperative adsorption of proteins onto hydroxyapatite*. *Journal of colloid and interface science*, 1998. **200**(1): p. 104-113.
145. Velev, O., E. Kaler, and A. Lenhoff, *Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering: comparison of lysozyme and chymotrypsinogen*. *Biophysical Journal*, 1998. **75**(6): p. 2682-2697.
146. Imeson, A.P., D.A. Ledward, and J.R. Mitchell, *On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1977. **28**(8): p. 661-668.
147. Brassesco, M.E., N.W. Valetti, and G.A. Picó, *Control of the adsorption properties of alginate-guar gum matrix functionalized with epichlorohydrin through the addition of different flexible chain polymers as toll for the chymotrypsinogen isolation*. *International journal of biological macromolecules*, 2018. **115**: p. 494-500.
148. Klein, J., J. Stock, and K.-D. Vorlop, *Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts*. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 1983. **18**(2): p. 86-91.

149. Mumper, R.J., et al., *Calcium-alginate beads for the oral delivery of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1): stabilization of TGF- β 1 by the addition of polyacrylic acid within acid-treated beads*. *Journal of Controlled Release*, 1994. **30**(3): p. 241-251.
150. Zougrana, T. and W. Norde, *Thermal stability and enzymatic activity of α -chymotrypsin adsorbed on polystyrene surfaces*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1997. **9**(3-4): p. 157-167.
151. Bayramođlu, G., et al., *Preparation of ion-exchange beads based on poly (methacrylic acid) brush grafted chitosan beads: isolation of lysozyme from egg white in batch system*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007. **310**(1-3): p. 68-77.