



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario

## TESIS DE DOCTORADO

**“Análisis de la formación de complejos insolubles entre  
polímeros de cadena flexible con carga eléctrica y tripsina. Sus  
potenciales aplicaciones biotecnológicas”**

Presentada por: Mauricio Javier Braia

Rosario, Argentina

2013

Mauricio Javier Braia

Licenciado en Biotecnología  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR

*Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad 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 Laboratorio de Fisicoquímica Aplicada a Bioseparación, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de junio de 2008 y el 1 de julio de 2013, bajo la dirección de la Dra. Diana Romanini.*

Directora: Dra. Diana Romanini.....

Jurado: .....

Jurado: .....

Jurado: .....

Defendida:.....

Parte de los resultados producidos en esta tesis doctoral fueron publicados en diversas revistas especializadas:

### **Publicaciones en revistas internacionales con referato**

- Braia, Mauricio; Tubío, Gisela; Nerli, Bibiana; Loh, Watson; Romanini, Diana. “Analysis of the interactions between Eudragit® L100 and porcine pancreatic trypsin by calorimetric techniques” – **International Journal of Biological Macromolecules**, **50 (2012) 180-186**
- Porfiri, María Cecilia; Braia, Mauricio; Farruggia, Beatriz; Picó, Guillermo; Romanini, Diana. “Precipitation with poly acrylic acid as a trypsin bioseparation strategy” – **Process Biochemistry**, **44 (2009) 1046-1049**
- Braia, Mauricio; Porfiri, María Cecilia; Farruggia, Beatriz; Picó, Guillermo; Romanini, Diana. “Complex formation between protein and poly vinyl sulfonate as a strategy of proteins isolation” – **Journal of Chromatography B**, **873 (2008) 139-143**
- Romanini, Diana; Braia, Mauricio; Rodrigo Guiatte Angarten; Loh, Watson; Picó, Guillermo. “Interaction of lysozyme with negatively charged flexible chain polymers” – **Journal of Chromatography B**, **857 (2007) 25-31**

### **En prensa**

- Mauricio Braia, Maximiliano Ferrero, María Victoria Rocha, Dana Loureiro, Gisela Tubio, Diana Romanini. “Bioseparation of papain from *Carica* papaya latex by precipitation of papain-poly (vinyl sulfonate)” – **Protein Expression and Purification**

### **Capítulo de Libro**

Diana Romanini, Mauricio Javier Braia and María Cecilia Porfiri. “Applications of Calorimetric Techniques in the Formation of Protein-Polyelectrolytes Complexes” – TítulodelLibro: **Applications of Calorimetry in a Wide Context- Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry**.Capítulo 5,pp 105-128(2012). Ed. In Tech, Open Science, Open Minds. Editor: A. A. Elkordy. **ISBN: 978-953-51-0947-1**

Además se han presentado en diversos eventos nacionales e internacionales:

## Publicaciones, presentaciones a Congresos, Becas, Pasantías, Premios

---

- Mauricio Braia, Gisela Tubio, Barbara Andrews, Oriana Salazar, María Elena Lienqueo and Diana Romanini. “Development of a method for purifying trypsin that combines precipitation of protein-polyelectrolyte complexes with hydrophobic interaction chromatography” – Resumen aceptado - **17<sup>th</sup> International Conference on BioPartitioning and Purification** – Newport, EE.UU., año 2013
- Mauricio Braia, Bibiana Nerli, Diana Romanini. “Estudio calorimétrico de la interacción entre tripsina y Eudragit<sup>®</sup> S100” – Poster - **XVIII Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica**. – Rosario, año 2013
- Braia MJ, Tubio G, Nerli BB, Loh W and Romanini D. “Calorimetric analysis of the interaction between trypsin and Eudragit<sup>®</sup> L100” – Poster – **International Conference on Chemical Thermodynamics 2012 and 67<sup>th</sup> Calorimetry Conference** - Buzios, Brasil, año 2012
- Braia, Mauricio J.; Zígolo, María A.; Tubío, Gisela y Romanini, Diana. “Estudio de la formación de complejos insolubles tripsina-poliectrolito como base para la purificación de tripsina.” – Poster – **II Congreso Latinoamericano de Farmacia y Bioquímica Industrial, XIII Congreso Argentino de Farmacia y Bioquímica Industrial** (Capital Federal, año 2011) y **II Simposio Argentino de los Procesos Biotecnológicos (SaProBio)** (La Plata, año 2012).
- Braia, Mauricio; Nerli, Bibiana; Loh Watson y Romanini, Diana. “Análisis termodinámico de la formación de complejos insolubles entre tripsina y Eudragit<sup>®</sup> L100 como base para diferentes aplicaciones biotecnológicas” – Poster - **XVII Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica** – Córdoba, año 2011
- Braia, Mauricio; Picó, Guillermo y Romanini, Diana. “Análisis de las variables experimentales de la formación de complejos insolubles polímero-proteína” – Poster – **XII Congreso-XXX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario** – Rosario, año 2010

Este proyecto de Tesis Doctoral ha recibido las siguientes becas por parte de entidades públicas y privadas:

- **Beca doctoral TIPO II** otorgada por CONICET, (2011-2013). Directora: Dra. Diana Romanini; Codirectora: Bibiana Nerli

## Publicaciones, presentaciones a Congresos, Becas, Pasantías, Premios

---

- **Beca de investigación** otorgada por el Programa de Cooperación Científico-Tecnológica entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (**MINCYT**) y la Coordinación de Perfeccionamiento del Personal de Nivel Superior (**CAPES**) de Brasil. **BR/09/10**. Año 2010
- **Beca doctoral** otorgada por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. **PICT 2006/00508**. FonCyT, (2008-2011). Directora: Dra. Diana Romanini

### Pasantías en el exterior

- Pasantías en el **Instituto de Química de la Universidad de Campinas (Brasil)** bajo la dirección del Prof. Watson Loh, con motivo del proyecto “Desarrollo de métodos bioseparativos de bajo impacto que emplean polímeros de cadena flexible: precipitación selectiva con polielectrolitos y extracción líquido-líquido con sistemas bifásicos acuosos”; en el marco del **Programa de Cooperación Científico-Tecnológica** entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (**MINCYT**) y la Coordinación de Perfeccionamiento del Personal de Nivel Superior (**CAPES**) de Brasil, (2010-2011). **BR/09/10**. Directora: Dra. Bibiana Nerli. Año 2010 y 2012

### Premio

- Premio a la labor destacada como joven investigador **William F. Giauque Memorial Award** otorgado por **CALCON**, patrocinado por la AVIV Family Foundation. - International Conference on Chemical Thermodynamics 2012 and 67<sup>th</sup> Calorimetry Conference. Año 2012

---

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y PALABRAS TOMADAS DEL EXTRANJERO	vi
RESUMEN	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. LAS ENZIMAS EN LA INDUSTRIA	1
1.1.1. <u>Reseña histórica.</u>	1
1.1.2. <u>Problemática del uso de enzimas</u>	3
1.2. LOS POLÍMEROS DE CADENA FLEXIBLE	5
1.3. LOS COMPLEJOS PROTEÍNA-PE	6
1.3.1. <u>Formación de los complejos proteína-PE.</u>	7
1.4. CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA	9
1.5. LA TRIPSINA	11
1.5.1. <u>Características.</u>	11
1.5.2. <u>Papel biológico.</u>	12
1.5.3. <u>La tripsina como enzima modelo.</u>	13
1.5.4. <u>Mecanismo de catálisis.</u>	14
1.5.5. <u>Aplicaciones.</u>	15
1.5.6. <u>Producción de tripsina.</u>	15
1.6. POLÍMEROS	17
1.6.1. <u>Eudragit® L-100 y S-100.</u>	17

1.6.1.1. <u>Aplicaciones.</u>	17
<b>1.6.2. <u>Alginato.</u></b>	18
1.6.2.1. <u>Aplicaciones.</u>	20
1.7. TÉCNICAS EMPLEADAS PARA ESTUDIAR LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-PE	20
<b>1.7.1. <u>Turbidimetría.</u></b>	20
<b>1.7.2. <u>Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-vis).</u></b>	21
1.7.2.1. <u>Aplicación de la espectroscopía UV-vis al estudio estructural de proteínas.</u>	22
<b>1.7.3. <u>Espectroscopía de dicroísmo circular (DC).</u></b>	22
1.7.3.1. <u>Análisis de los experimentos en DC.</u>	23
<b>1.7.4. <u>Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).</u></b>	25
1.7.4.1. <u>Equipamiento y experimentación.</u>	26
1.7.4.2. <u>Análisis del experimento en ITC.</u>	29
1.7.4.3. <u>Caracterización de la interacción.</u>	31
<b>1.6.5. <u>Calorimetría diferencial de barrido (DSC).</u></b>	32
1.7.5.1. <u>Equipamiento y experimentación.</u>	33
1.7.5.2. <u>Termograma.</u>	34
1.7.5.3. <u>Modelo de equilibrio de dos estados.</u>	36
1.7.5.4. <u>Modelo de equilibrio entre más de dos estados.</u>	37
<b>1.6.6. <u>Dispersión Dinámica de la Luz (DLS).</u></b>	38
1.6.6.1. <u>Fundamentos de la DLS.</u>	38
<b>2. OBJETIVOS</b>	40
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1. MATERIALES	41
<b>3.1.1. <u>Reactivos.</u></b>	41
<b>3.1.2. <u>Soluciones.</u></b>	42

<b>3.1.3. <u>Equipamiento.</u></b>	43
3.1. METODOLOGÍA	45
<b>3.2.1. <u>Estudio de la solubilidad de los PE.</u></b>	45
3.2.1.1. <u>Efecto del pH sobre la solubilidad de los PE.</u>	45
3.2.1.2. <u>Efecto de la fuerza iónica sobre los diagramas de fases de los PE.</u>	46
<b>3.2.2. <u>Estudio de la formación de los complejos insolubles PE-TRP por medidas de turbidez.</u></b>	46
3.2.2.1. <u>Efecto del pH sobre la formación de los complejos PE-TRP.</u>	46
3.2.2.2. <u>Efecto de la concentración de TRP sobre la formación de los complejos PE-TRP.</u>	47
3.2.2.3. <u>Efecto de la fuerza iónica sobre la formación de los complejos PE-TRP.</u>	48
3.2.2.4. <u>Cinética de formación de los complejos PE-TRP.</u>	48
<b>3.2.3. <u>Estudio de la formación de los complejos insolubles PE-TRP por ITC.</u></b>	49
<b>3.2.4. <u>Estudio de la formación de los complejos insolubles PE-TRP por medidas de dispersión de luz.</u></b>	50
<b>3.2.5. <u>Análisis conformacional de la TRP.</u></b>	51
3.2.5.1. <u>Espectros de absorción UV-visible de TRP en ausencia y presencia de PE.</u>	51
3.2.5.2. <u>Espectros de dicroísmo circular de TRP en ausencia y presencia de PE.</u>	52
3.2.5.3. <u>Estudio de la estabilidad estructural de la TRP por medidas de calorimetría.</u>	53
<b>3.2.6. <u>Análisis de la actividad catalítica de la TRP.</u></b>	53
3.2.6.1. <u>Método de medición de actividad.</u>	53
3.2.6.2. <u>Análisis de la actividad de TRP en presencia de cada PE.</u>	54
3.2.6.3. <u>Análisis de la estabilidad de TRP a través del tiempo por medidas de actividad.</u>	54
<b>3.2.7. <u>Precipitación de TRP con EL100, ES100 y ALG.</u></b>	56
<b>3.2.8. <u>Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.</u></b>	57
<b>3.2.9. <u>Aplicación de la precipitación al homogenado de páncreas bovino.</u></b>	59
3.2.9.1. <u>Preparación del homogenado.</u>	59

3.2.9.2. <u>Activación del homogenado.</u>	60
3.2.9.3. <u>Precipitación de TRP con EL100.</u>	60
3.2.9.4. <u>Precipitación de TRP con ALG.</u>	61
<b>3.2.10. <u>Manejo de los datos experimentales.</u></b>	62
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS PE-TRP	63
<b>4.1.1. <u>Estudio de la solubilidad de los PE.</u></b>	63
4.1.1.1. <u>Efecto del pH sobre la solubilidad de los PE.</u>	63
4.1.1.2. <u>Efecto de la fuerza iónica sobre los diagramas de fase de los PE.</u>	65
<b>4.1.2. <u>Estudio de la formación de los complejos insolubles PE-TRP por medidas de turbidez.</u></b>	66
4.1.2.1. <u>Efecto del pH sobre la formación de los complejos PE-TRP.</u>	66
4.1.2.2. <u>Efecto de la concentración de TRP sobre la formación de complejos PE-TRP.</u>	72
4.1.2.3. <u>Efecto de la fuerza iónica sobre la formación de los complejos PE-TRP.</u>	76
4.1.2.4. <u>Cinética de formación de los complejos PE-TRP.</u>	78
4.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PE-TRP	83
<b>4.2.1. <u>Estudio de la formación de los complejos insolubles PE-TRP por medidas de ITC.</u></b>	83
4.2.1.1. <u>Formación del complejo insoluble PE-TRP.</u>	83
4.2.1.2. <u>Efecto de la fuerza iónica sobre la formación del complejo insoluble.</u>	90
4.2.1.3. <u>Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00.</u>	96
<b>4.2.2. <u>Estudio de la formación de los complejos insolubles PE-TRP por medidas de dispersión de luz.</u></b>	102
4.3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE TRP	107
<b>4.3.1. <u>Análisis conformacional de la TRP.</u></b>	107

---

4.3.1.1. <u>Espectros de absorción UV-vis de TRP en ausencia y presencia de cada PE.</u>	107
4.3.1.2. <u>Espectros de dicroísmo circular de TRP en ausencia y presencia de PE.</u>	108
4.3.1.3. <u>Estudio de la estabilidad estructural de la TRP por medidas de calorimetría.</u>	110
<b>4.3.2. <u>Análisis de la actividad catalítica de TRP.</u></b>	116
4.3.2.1. <u>Análisis de la actividad de TRP en presencia de cada PE.</u>	116
4.3.2.2. <u>Análisis de la actividad de TRP a través del tiempo.</u>	118
4.4. ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE LOS COMPLEJOS PE-TRP	122
<b>4.4.1. <u>Precipitación de TRP con EL100, ES100 y ALG.</u></b>	122
<b>4.4.2. <u>Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.</u></b>	126
<b>4.4.3. <u>Aplicación de la precipitación al homogenado de páncreas porcino.</u></b>	128
4.4.3.1. <u>Precipitación de TRP con EL100.</u>	129
4.4.3.2. <u>Precipitación de TRP con ALG.</u>	130
<b>5. DISCUSIÓN FINAL</b>	131
<b>6. CONCLUSIONES</b>	141
6.1. APLICACIONES DE LOS COMPLEJOS INSOLUBLES EL100-TRP, ES100-TRP Y ALG-TRP.	144
<b>6.1.1. <u>Concentración y estabilización de TRP.</u></b>	144
<b>6.1.2. <u>Purificación de TRP.</u></b>	144
<b>6.1.3. <u>Inmovilización de TRP.</u></b>	145
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	146

## Abreviaturas, símbolos y palabras tomadas del extranjero

---

<b>a</b>	constante
<b>Abs.</b>	absorbancia
<b>act. enz.</b>	actividad enzimática
<b>A<sub>L</sub></b>	absorción de luz polarizada hacia la izquierda
<b>ALG</b>	alginato
<b>A<sub>R</sub></b>	absorción de luz polarizada hacia la derecha
<b>B</b>	término relacionado con la línea de base del equipo
<b>BAPNA</b>	N <sub>α</sub> -benzoil-DL-arginil p-nitroanilida
<b>CATH</b>	clase; arquitectura; topología; superfamilia de homología
<b>cit</b>	citrato de sodio trihidrato
<b>C<sub>p</sub></b>	capacidad calorífica parcial
<b>C<sub>p</sub><sup>D</sup></b>	capacidad calorífica del estado desnaturalizado
<b>C<sub>p</sub><sup>N</sup></b>	capacidad calorífica del estado nativo
<b>D</b>	estado desnaturalizado o desplegado
<b>DC</b>	dicroísmo circular
<b>D<sub>dif</sub></b>	coeficiente de difusión traslacional
<b>DLS</b>	dispersión de luz dinámica
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DSC</b>	calorimetría diferencial de barrido
<b>e</b>	estequiometría del complejo PE-TRP
<b>EL100</b>	Eudragit <sup>®</sup> L-100
<b>enz.</b>	enzima
<b>estab.</b>	estabilización
<b>ES100</b>	Eudragit <sup>®</sup> S-100
<b>g<sub>1</sub>(q,τ)</b>	función de correlación del campo magnético de la luz dispersada que describe la correlación con el movimiento de cada partícula
<b>g<sub>2</sub>(q,τ)</b>	función de correlación de la intensidad de la luz dispersada que describe los cambios en la intensidad de la luz dispersada
<b>HIC</b>	cromatografía de interacción hidrofóbica
<b>i</b>	índice de refracción
<b>I</b>	intensidad de la radiación emitida
<b>I<sub>0</sub></b>	intensidad de la radiación incidente
<b>inmov.</b>	inmovilización

## Abreviaturas, símbolos y palabras tomadas del extranjero

---

<b>ITC</b>	calorimetría de titulación isotérmica
<b>k</b>	constante de afinidad microscópica
<b>k<sub>b</sub></b>	constante de Boltzmann
<b>k<sub>f</sub></b>	vector de onda dispersada
<b>k<sub>i</sub></b>	vector de onda incidente
<b>K<sub>D</sub></b>	constante de equilibrio aparente
<b>l</b>	longitud del paso óptico de la cubeta
<b>[L]</b>	concentración de ligando libre con las demás especies presentes en el sistema
<b>[L]<sub>b</sub></b>	concentración de ligando unido en equilibrio con el ligando libre
<b>[L]<sub>0</sub></b>	concentración de ligando en el inyector
<b>[M]<sub>i</sub></b>	concentración actual de macromolécula en la i-ésima inyección
<b>[M]<sub>T</sub></b>	concentración total de macromolécula
<b>n</b>	número de sitios de unión de la macromolécula para el ligando
<b>N</b>	estado nativo
<b>n/n</b>	relación molar polímero/proteína
<b>PCF</b>	polímero de cadena flexible
<b>PE</b>	polielectrolito
<b>pH<sub>c</sub></b>	pH crítico de formación de los complejos solubles
<b>pH<math>\Phi</math></b>	pH crítico de formación de los complejos insolubles
<b>PP</b>	precipitado
<b>purif.</b>	purificación
<b>q</b>	vector diferencia entre los vectores de onda incidente y onda dispersada
<b>Q</b>	calor
<b>q<sub>i</sub></b>	calor de interacción macromolécula-ligando en la i-ésima inyección
<b>Q<sub>T</sub></b>	calor total acumulado después de N inyecciones
<b>r</b>	moles de ligando unido por mol (o gramo) de macromolécula
<b>R<sub>h</sub></b>	radio hidrodinámico
<b>s</b>	constante
<b>SN</b>	sobrenadante
<b>t</b>	parámetro que depende del tamaño y la cantidad de partículas
<b>T</b>	radiación transmitida
<b>T<sub>m</sub></b>	temperatura de desnaturalización
<b>TRIS</b>	Sigma 7-9 <sup>®</sup>

<b>TRP</b>	tripsina
<b>V<sub>C</sub></b>	volumen de la celda
<b>V<sub>i</sub></b>	volumen de buffer que pasa al inicio del gradiente
<b>V<sub>in</sub></b>	volumen de inyección
<b>V<sub>f</sub></b>	volumen de buffer que pasa al final del gradiente
<b>x<sub>D</sub></b>	fracción de proteínas en el estado desnaturalizado
<b>Z</b>	función de partición de unión
<b>β</b>	constante
<b>ε</b>	absortividad molar/coeficiente de extinción molar
<b>ΔC<sub>p</sub></b>	variación de la capacidad calorífica
<b>ΔH<sub>b</sub></b>	cambio de entalpía por mol de ligando unido
<b>ΔH<sub>cal</sub></b>	cambio de entalpía asociado a la transición nativo-desnaturalizado
<b>ΔH<sub>dil</sub></b>	cambio de entalpía asociado a la dilución de la macromolécula
<b>ΔH<sub>disol</sub></b>	cambio de entalpía asociado a la disolución del ligando
<b>ΔH<sub>int</sub></b>	cambio de entalpía asociado a la interacción macromolécula-ligando
<b>ΔH<sub>T</sub></b>	cambio de entalpía total
<b>ΔH<sub>VH</sub></b>	cambio de entalpía de van't Hoff
<b>η</b>	viscosidad del medio
<b>θ</b>	ángulo al cual se mide la intensidad de onda dispersada
<b>[θ]</b>	elipticidad molar
<b>κ</b>	constante de Debye-Hückel
<b>λ</b>	longitud de onda
<b>μ</b>	fuerza iónica
<b>v</b>	parámetro de unión
<b>ξ</b>	densidad de carga superficial del polielectrolito
<b>σ</b>	densidad de carga superficial de la proteína
<b>τ</b>	tiempo de decaimiento
<b>τ<sub>s</sub></b>	turbidez

**Palabras tomadas del extranjero**

**buffer**      solución reguladora de pH

En la actualidad, la industria se ha convertido en un gran consumidor de enzimas ya que éstas permiten acelerar reacciones, disminuir los costos de producción, mejorar el rendimiento de un proceso industrial y hacer que el mismo se vuelva más amigable con el medio ambiente; entre otras ventajas. Las enzimas se utilizan en una gran variedad de industrias como la alimenticia, textil, papelera, cosmética, farmacéutica; ya sea en alguna etapa de un proceso (panificación, ablandamiento de cuero, blanqueo de papel, síntesis de drogas) o como componente de variados productos (cremas, medicamentos, detergentes).

Así, surge la necesidad de disponer de grandes cantidades de enzimas y en algunos casos con altos grados de pureza. Esto ha estimulado la búsqueda de fuentes naturales de enzimas junto con el desarrollo de nuevas técnicas bioseparativas y el perfeccionamiento de la obtención de enzimas recombinantes.

Gran parte de los procedimientos tradicionales de purificación de proteínas incluyen varias etapas de precipitación. Para mezclas con baja cantidad de contaminantes y alta concentración de la proteína de interés puede ser un método efectivo de concentración, y en algunos casos, puede actuar como etapa única de purificación, dependiendo del grado de pureza final pretendido. Una de las técnicas empleadas para la precipitación de enzimas es la formación de complejos insolubles con polímeros de cadena flexible cargados (polielectrolitos, PE). Estos complejos pueden separarse de los contaminantes por decantación y pueden utilizarse para purificar, concentrar, estabilizar e inmovilizar a la enzima de interés. Es una técnica simple, rápida, económica, aplicable a gran escala y en condiciones óptimas permite recuperar a la enzima casi en su totalidad (rendimientos superiores al 95 %).

La precipitación por formación de complejos insolubles se basa en la interacción principalmente electrostática entre la enzima de interés y un PE. Esta interacción depende del pH, la fuerza iónica, la temperatura, el tiempo y la concentración de ambas especies. Por lo tanto, es necesario conocer las mejores condiciones para optimizar el mecanismo de formación del complejo insoluble. Además, resulta prioritario mantener la estabilidad estructural de la enzima y su actividad catalítica.

En esta tesis se estudió la formación de complejos insolubles entre tres PE aniónicos: Eudragit<sup>®</sup> L-100 (EL100), Eudragit<sup>®</sup> S-100 (ES100) y alginato (ALG) y la tripsina (TRP), una enzima muy requerida en la industria.

Los tres PE empleados se caracterizan principalmente por poseer subunidades con grupos carboxilos, ser biodegradables y tener la capacidad de inducir su insolubilización por cambios en el pH del medio.

La TRP es una serin-proteasa que cataliza la escisión del enlace peptídico en el extremo C-terminal de los aminoácidos lisina y arginina. Se produce en el páncreas de los vertebrados como zimógeno (tripsinógeno) y luego es activada por una enteroquinasa intestinal en el duodeno donde actúa degradando las proteínas incorporadas en los alimentos para dar péptidos de menor tamaño y aminoácidos para su posterior absorción.

Se emplea principalmente en la clarificación de zumos y cerveza, el ablandamiento de cuero y como componente de detergentes enzimáticos.

El estudio de la formación de complejos insolubles entre la TRP y cada uno de los PE es importante ya que sienta las bases para el desarrollo de una técnica bioseparativa aplicable al aislamiento de la enzima a partir de páncreas bovino o porcino que resulta ser un desecho de la industria frigorífica local.

En las primeras etapas de este trabajo se investigaron las condiciones óptimas para la interacción entre la TRP y cada PE: se obtuvieron los diagramas de fase de cada polielectrolito y complejo insoluble, las isotermas de titulación turbidimétrica y la cinética de formación de cada complejo insoluble. Los resultados se resumen en la tabla I.

Tabla I

<i>Complejo</i>	<i>pH de insolubilidad</i>	<i>pH<sub>ópt.</sub></i>	<i>Relación óptima TRP/PE*</i>	<i>T<sub>ópt.</sub></i>	<i>tiempo de formación</i>	<i>Efecto de la fuerza iónica</i>
<i>EL100-TRP</i>	Menor a 6	5	15	25 °C	Menor a 1 min.	Inhibición
<i>ES100-TRP</i>		5,5	13			
<i>ALG-TRP</i>		3,5	200			

\* las unidades de los complejos EL100-TRP y ES100-TRP son moles de TRP/mol PE; mientras que para el complejo ALG-TRP es  $\mu$ moles TRP/gr ALG.

A partir de estos datos experimentales se estudió la interacción TRP-PE por calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y dispersión de luz dinámica (DLS). Algunos experimentos no pudieron realizarse con el ALG por inconvenientes metodológicos que este polímero presenta.

Los experimentos de ITC mostraron que la TRP se une fuertemente con el EL100 y el ES100 en un proceso conducido entrópicamente. Esto indica que los PE interactúan hidrofólicamente con la TRP para formar el complejo insoluble. Teniendo en cuenta el

efecto inhibitorio de la fuerza iónica sobre la formación del complejo insoluble (también corroborado por ITC) se puede concluir que existe una interacción mixta entre los polímeros Eudragit<sup>®</sup> y la TRP. Además, los diagramas de fase de cada complejo evidenciaron que la formación de los mismos es dependiente del pH.

Por otro lado, los experimentos con ALG demostraron que este PE interactúa electrostáticamente con la enzima, confirmando los datos de turbidimetría.

Tanto para los complejos EL100-TRP y ES100-TRP, como para el complejo ALG-TRP, los datos experimentales se ajustaron a una función sigmoidea asociada a un modelo de  $n$  sitios independientes y equivalentes.

Cuando los experimentos de ITC se realizaron a pH 8 se observó que la interacción entre el ALG y la TRP se inhibía totalmente; mientras el EL100 y el ES100 sí interactuaron con la enzima. Sin embargo, los diagramas de fase de los respectivos complejos no presentaron turbidez a este pH. Esto indicaría que a pH 8 se forma un complejo soluble entre los polímeros Eudragit<sup>®</sup> y la TRP mediado principalmente por interacciones hidrofóbicas.

Los resultados obtenidos por DLS corroboraron todas las observaciones realizadas para los experimentos de ITC a partir de los radios hidrodinámicos calculados para las especies en cada sistema.

También se evaluó la estabilidad enzimática por calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopía UV-vis, diroísmo circular (DC) y medidas de actividad catalítica.

Los experimentos de espectroscopía UV-vis y DC mostraron que la interacción entre la TRP y cada PE modifican levemente la estructura secundaria y/o terciaria de la enzima. Esta información es muy importante para estudiar de manera simple, rápida y no destructiva la estabilidad de una proteína. Sin embargo, la técnica por excelencia para estudiar estabilidad es la DSC ya que no sólo se aplica en la determinación de parámetros relacionados directamente con la estabilidad térmica de las proteínas (como el  $T_m$ ) sino que además permite analizar cambios en el mecanismo de desnaturalización de la misma.

En ausencia de PE, la TRP presenta su máxima estabilidad a pH 3 mientras que resulta ser menos estable a pH 8. Esto se condice con los importantes cambios estructurales que sufre la enzima al pasar de un pH a otro ya que a pH 3 la enzima se encuentra en una forma inactiva mientras que a pH 8 se observa la máxima actividad catalítica.

La presencia del polímero EL100 alteró significativamente la estabilidad térmica de la TRP y su mecanismo de desnaturalización. Cuando el sistema se incubó a pH 5; la

estabilidad térmica de la enzima aumentó considerablemente, evidenciado por un aumento del  $T_m$  en 10 °C. A pH 8 la TRP también modificó su mecanismo de desnaturalización aunque su estabilidad térmica no se vio afectada por la presencia del PE.

Los estudios realizados para el sistema ES100-TRP mostraron que tanto a pH 5 como a pH 8, la presencia del PE estabilizó la estructura proteica contra la desnaturalización térmica; aumentando el  $T_m$  en 4 °C y 2 °C, respectivamente. El mecanismo de desnaturalización de la TRP a cada pH también se modifica en presencia de ES100.

Otros análisis importantes sobre la estabilidad estructural de la enzima se llevaron a cabo desde el punto de vista de su actividad catalítica; estudiando el efecto de la presencia del PE a distintas concentraciones de polímero y a través del tiempo. Se observó que la actividad enzimática no se modificó en presencia de distintas concentraciones de cada PE. Los experimentos realizados a través del tiempo mostraron que la interacción de la TRP con los Eudragit<sup>®</sup> aumentó la estabilidad de la enzima, obteniéndose a cada tiempo ensayado mayor actividad enzimática en presencia de los PE que en su ausencia. Por otro lado, el ALG no presentó un efecto estabilizador de la actividad debido a que al pH de formación del complejo insoluble (pH 3,50) la TRP se encuentra en una forma inactiva pero muy estable. Esta información es muy importante ya que resulta indispensable que la enzima no pierda su actividad catalítica al ser purificada si se la quiere utilizar en la industria.

Conociendo las condiciones óptimas de interacción TRP-PE y habiendo corroborado que la presencia de los PE no interfiere con la estructura y la actividad de la enzima; se ensayó el método de precipitación en una solución de TRP comercial para determinar el rendimiento de la técnica. Se observó que el ALG es el mejor precipitante de TRP, obteniéndose aproximadamente un 97 % de la enzima en el precipitado. El EL100 logró precipitar el 72 % de la enzima total mientras que el ES100 tan sólo el 41 %.

El precipitado ALG-TRP redisolto se pasó por una columna cromatográfica de interacción hidrofóbica (HIC) con el objetivo de ensayar la separación de la enzima y el PE. Efectivamente, el ALG no eluyó en la misma fracción que la TRP; recuperándose en consecuencia la enzima libre de polímero. Esto puede llegar a ser decisivo en la aplicación de la TRP en la industria alimenticia o farmacéutica, las cuales requieren elevados niveles de pureza en sus productos y/o procesos.

Finalmente, se procedió a precipitar TRP a partir de un homogenado de páncreas con EL100 y ALG, los dos PE que dieron los rendimientos más satisfactorios.

El EL100 permitió precipitar la enzima aplicando dos protocolos: formación de complejo soluble y posterior insolubilización del EL100; y formación del complejo insoluble EL100-TRP propiamente dicho. El primer protocolo permitió recuperar el 45 % de la enzima total en el homogenado mientras que el segundo permitió recuperar el 82 %.

El ALG permitió recuperar casi toda la TRP en el precipitado obteniéndose un rendimiento igual a 98 %.

En conclusión, se puede decir que los tres PE son óptimos para la formación de complejos insolubles con la TRP los cuales pueden emplearse en la concentración, estabilización, inmovilización y/o bioseparación de la enzima. Tanto el EL100 como el ES100 estabilizaron la estructura proteica frente a la desnaturalización térmica y a la degradación en el tiempo. Si bien algunos experimentos de estabilidad en presencia de ALG no pudieron realizarse, se observó que no afecta a la actividad catalítica de la enzima. Adicionalmente, el EL100 y el ALG presentaron elevadas capacidades precipitantes lo que los torna excelentes candidatos para purificar e inmovilizar la enzima por precipitación del complejo insoluble.

### 1.1. LAS ENZIMAS EN LA INDUSTRIA.

#### 1.1.1. Reseña histórica.

A lo largo de la historia, ya desde miles de años antes de Cristo, el Ser Humano ha utilizado enzimas para la fabricación de alimentos fermentados como el pan, el queso, la cerveza y el vino; para la producción de papel y productos textiles; y para el ablandamiento de cuero (con excremento de ave o perro). Por supuesto que hace miles de años atrás, no se tenía certeza alguna de la base química y/o biológica que regía cada uno de estos procesos. Fue hacia finales del siglo XIX y principios del siglo XX que se hechó luz sobre la naturaleza subyacente de estos procesos de la mano de científicos como Pasteur quien determinó la naturaleza biológica de la fermentación (1864), Buchner quien describió el proceso de fermentación alcohólica en ausencia de células vivas (1903), Kühne quien acuñó el concepto de enzima (1876) y Samner quien cristalizó por primera vez una enzima: la ureasa (1926); entre otros.

En las últimas décadas, el desarrollo de la Biotecnología y de las técnicas de ADN recombinante, Ingeniería Genética e ingeniería de proteínas ha favorecido el uso de enzimas a escala industrial. No sólo se ha incrementado considerablemente la producción de las mismas sino que además se han disminuido los costos de bienes y servicios, se ha mejorado la calidad de los productos y, en la mayoría de los casos, se ha reducido significativamente el impacto ambiental de procesos y productos industriales [1, 2].

La era de la enzimología industrial comenzó en 1907 cuando Otto Rohm obtuvo una patente para el uso de un extracto de enzimas pancreáticas para el procesamiento de cuero [3]. Desde entonces, las enzimas han ganado terreno en distintas áreas, procesos y productos de la industria [4, 5]:

- industria alimenticia: panificación, maceración, clarificación de zumos y bebidas, fermentación, modificación de propiedades organolépticas.
- industria textil: procesamiento de las materias primas: ablandamiento del cuero, degradación de fibras de celulosa, desgomado.
- industria papelera: blanqueo del papel (en reemplazo de compuestos clorados), degradación de las fibras de lignina.
- industria cosmética: tinturas para el cabello, cremas para el cuidado de la piel.
- industria farmacéutica: síntesis de drogas (lipasa, penicilin amidasa).

Por otro lado, las enzimas son muy utilizadas como catalizadores en la síntesis de distintos compuestos [6, 7] sobre todo en la industria alimenticia y farmacéutica. Las ventajas que ofrecen las enzimas por sobre los catalizadores químicos son:

1. la velocidad de reacción es mayor, incluso a temperatura ambiente y presión atmosférica.
2. la especificidad de la reacción es mayor evitando la formación de sub-productos que disminuyen el rendimiento y la pureza del producto final e incluso pueden ser tóxicos.
3. los procesos industriales que incluyen reacciones catalizadas por enzimas son más amigables con el medio ambiente.

Las enzimas pueden actuar en la acilación de compuestos polihidroxilados como los esteroides y los alcaloides, en la separación de enantiómeros y en la reducción, oxidación y oxigenación de enlaces [8].

Si bien se puede observar que las enzimas presentan una amplia variedad de aplicaciones, principalmente se utilizan como componentes de detergentes para el lavado de ropa, vajilla y limpieza en industrias y establecimientos [9, 10].

En 1913, Otto Rohm introdujo al mercado un detergente a base de enzimas denominado Burnus<sup>®</sup>, comercializado en forma de pastilla y que poseía como principal componente extracto de páncreas. En la actualidad, básicamente todas las enzimas presentes en estos productos son hidrolasas (proteasas, amilasas, lipasas, celulasas).

La tabla 1.I presenta algunas enzimas y sus aplicaciones industriales.

**TABLA 1.I**

<b>Enzima</b>	<b>Aplicación</b>
<i>Tripsina</i>	ablandamiento de cuero; clarificación de cerveza; detergentes
<i>Xilanasa</i>	blanqueamiento del papel; clarificación de vinos; panificación
<i>α-amilasa</i>	panificación; clarificación de cerveza; detergentes
<i>Lipasa</i>	producción de biodiesel; detergentes; síntesis química

### **1.1.2. Problemática del uso de enzimas.**

La amplia aplicación de enzimas en la industria ha impulsado en los últimos años el desarrollo de áreas de I+D que solucionen los problemas que implican el uso de enzimas a gran escala y en condiciones a veces desfavorable para la estructura proteica o la actividad catalítica [11].

Por un lado, la necesidad de disponer de grandes cantidades de enzimas (y en algunos casos con alto grado de pureza) ha estimulado avances en bioseparación de proteínas y diseño de procesos para la recuperación de productos de valor agregado. Un proceso ideal de bioseparación debe combinar alta productividad con alta selectividad de separación. Además, se requiere que este proceso sea sencillo, rápido y de bajo costo ya que representa aproximadamente un 70% del costo final del producto [12].

Gran parte de los procedimientos tradicionales de purificación de proteínas incluyen varias etapas de precipitación de con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Para mezclas con baja cantidad de contaminantes y alta concentración de la proteína de interés puede ser un método efectivo de concentración, y en algunos casos, puede actuar como etapa única de purificación, dependiendo del grado de pureza final pretendido [13].

Otro punto a tener en cuenta es la estabilidad de la enzima. El desarrollo de las nuevas tecnologías ha permitido modificar microorganismos y/o enzimas de manera tal de obtener estas biomoléculas “mejoradas” para su aplicación en la industria: más estables en las condiciones de trabajo y/o con mayor actividad catalítica [14]. Además, el constante descubrimiento de especies microbianas ofrece una amplia selección de microorganismos capaces de soportar condiciones extremas de pH, salinidad y/o temperatura convirtiéndolos en posibles fuentes de enzimas aptas para procesos industriales.

También es posible aumentar la estabilidad estructural de una enzima por glicosilación con polisacáridos iónicos y no-iónicos como el dextrano, el alginato y el quitosán [15].

Por último, es deseable en estos procesos industriales recuperar el catalizador enzimático y reutilizarlo en un nuevo ciclo tantas veces como sea posible. Esto puede lograrse inmovilizando la enzima en soportes o matrices poliméricas por retención física, donde existen interacciones débiles entre la enzima y el soporte o por unión química, donde interviene la formación de enlaces químicos.

Si bien el proceso de inmovilización puede generar cambios estructurales en la enzima que conlleven a la pérdida total o parcial de su actividad catalítica y puede en sí

mismo aumentar los costos de un proceso; también se consigue aumentar la estabilidad de la enzima [16] y reutilizar el catalizador (y si es posible el soporte) lo que implicaría una reducción en los costos [17].

Existen dos factores que favorecen la estabilidad de una enzima inmovilizada: el aumento de la rigidez estructural de la conformación nativa (debido a las uniones covalentes) que la volvería más resistente a la desnaturalización térmica o química (por ejemplo, pH o fuerza iónica) y la protección frente a la autólisis debido a que la enzima se encuentra confinada a una porción del espacio [18].

Algunas de estas cuestiones pueden solucionarse formando complejos entre la enzima y polímeros de cadena flexible con carga, tanto sintéticos como naturales. Estos complejos pueden volverse insolubles y ser utilizados para aislar enzimas de interés por precipitación a partir de una mezcla compleja y/o para inmovilizar enzimas por retención física [19]. En la mayoría de los casos se ha observado un aumento de la estabilidad estructural de la enzima a través del tiempo [20].

Además, la precipitación de enzimas por formación de complejos insolubles con polímeros cargados se puede combinar con otras técnicas bioseparativas como la cromatografía de interacción hidrofóbica de manera tal de mejorar la pureza de la muestra. En este sentido, la precipitación podría actuar como primer paso extractivo que permite limpiar y concentrar la muestra. Por otro lado, la cromatografía de interacción hidrofóbica posibilitaría la separación física de la enzima y el polímero para su reutilización.

Las ventajas de utilizar estos complejos insolubles son:

- facilidad de aplicación a gran escala.
- requerimiento de equipos relativamente simples.
- gran diversidad de precipitantes que pueden ser utilizados de bajo costo y requeridos en bajas concentraciones.
- alta afinidad que permite que un gran número de proteínas se unan a una única molécula de polímero.
- facilidad de disociación por cambios en la fuerza iónica o el pH del medio.
- rapidez del proceso que permite preservar la conformación de la enzima aún luego de la redisolución del complejo insoluble.

1.2. LOS POLÍMEROS DE CADENA FLEXIBLE.

Los polímeros de cadena flexible (*PCF*) constituyen un grupo numeroso de sustancias que poseen grupos funcionales muy diferentes entre sí. La característica general de la molécula de PCF es la presencia de enlaces simples entre los átomos de carbono que forman la cadena hidrocarbonada, de manera tal que los restos alquílicos puedan rotar libremente. Esto le confiere al polímero la cualidad de ser totalmente flexible y por ende, de poder adquirir cualquier conformación al azar. Aquellos PCF útiles para la biotecnología son, generalmente, aquellos solubles en medio acuoso. Los polímeros solubles en solventes orgánicos son importantes en la síntesis de productos plásticos y poseen baja aplicación biotecnológica.

Se clasifican principalmente en base a su origen y al grupo funcional presente en la molécula, como se muestra en la tabla 1.II.

TABLA 1.II

Origen	Características	Derivados de...	Ejemplos
<i>Natural</i>	A partir del reino animal o vegetal. Son biodegradables.	Celulosa	Metilcelulosa Hidroxipropilcelulosa
		Almidón	Hidroxipropilalmidón Dextrinas 1,4-maltodextrinas
<i>Industrial</i>	Sintetizados mediante procesos controlados por el hombre. Pueden ser o no biodegradables y tóxicos.	Etilenglicol	Polietilenglicol
		Acrilamida	Poliacrilamida
		Caprolactano	Policaprolactano
		Óxido de etileno	Polióxido de etileno
		Polivinilo	Polivinilsulfonato

Además, se pueden clasificar de acuerdo a su estado de carga, como se muestra en la figura 1.1.

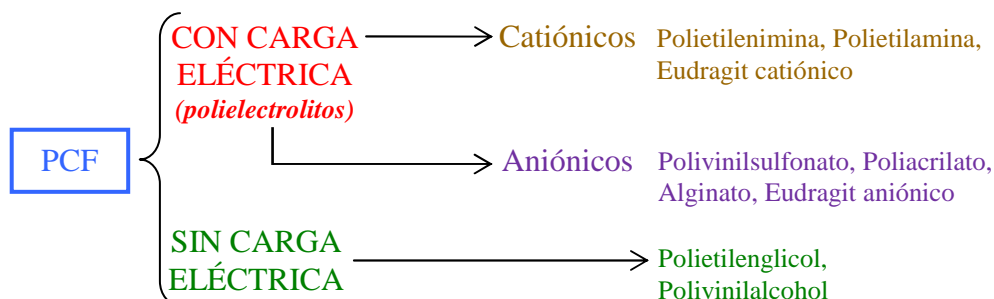


Figura 1.1: clasificación de los PCF según su carga.

Los polímeros de cadena flexible con carga eléctrica se denominan polielectrolitos (*PE*) y como se observa en la figura 1.1 pueden estar formados por unidades monoméricas cargadas positiva o negativamente.

### 1.3. LOS COMPLEJOS PROTEÍNA-PE.

Los complejos proteína-PE se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo ejemplos clásicos los complejos proteína-ADN y los complejos proteína-proteína en sí mismo; aunque estas macromoléculas no se ajustan a la definición de PE dada en el apartado anterior.

Normalmente, nos referimos a los complejos proteína-PE a aquellos formados por una proteína (generalmente una enzima) y un polímero de cadena flexible con carga opuesta (ver sección 1.2).

Estos sistemas se pueden clasificar en tres categorías: semisintéticos, naturales (no-cognatos) y cognatos [21].

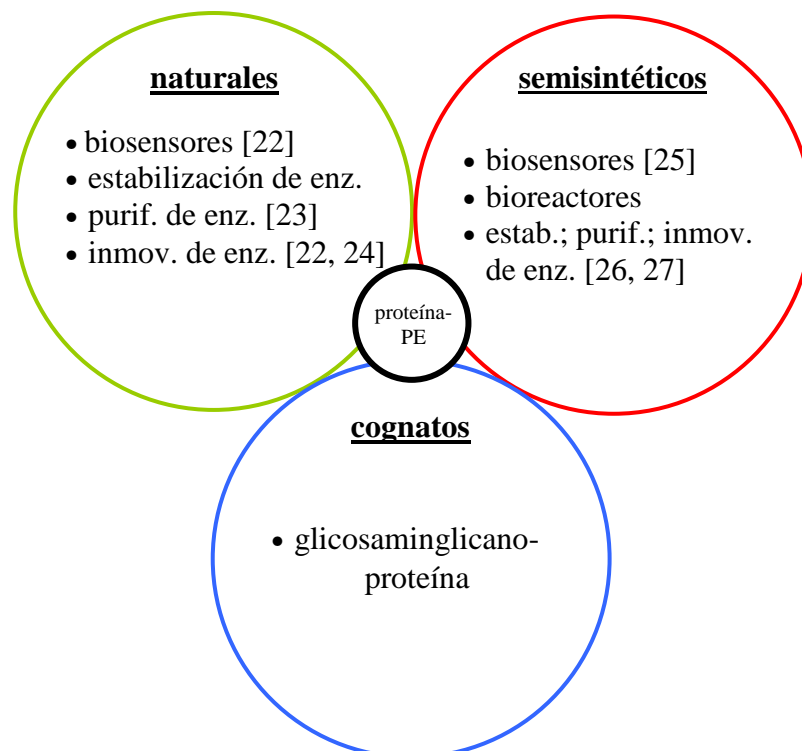


Figura 1.2: aplicaciones de los complejos proteína-polielectrolito según su naturaleza.

La palabra cognato se utiliza para describir aquellos sistemas formados entre dos moléculas coevolucionadas que interactúan *in vivo*, en condiciones fisiológicas, para

llevar a cabo funciones específicas [21]. En contraposición, un sistema no-cognato puede estar formado por dos moléculas naturales que no interactúan en la naturaleza.

En general, los sistemas semisintéticos se utilizan en investigación básica y producción de tecnología básica; los naturales se aplican en la industria cosmética y alimenticia; y los cognatos como ejemplos de la literatura especializada (figura 1.2).

La formación de los complejos proteína-PE depende de la concentración de proteína y PE, de la densidad de carga de cada especie y de las condiciones del medio como pH, temperatura y fuerza iónica [28, 29, 30]. Esto se refleja directamente en el tipo de interacciones que median la unión entre las moléculas:

- coulombicas (atractivas y repulsivas): entre residuos aminoácidos ionizables e hidrofílicos de la superficie proteica y sus pares en la estructura del PE.
- hidrofóbicas: entre residuos aminoácidos hidrofóbicos de la superficie proteica y el esqueleto hidrocarbonado del PE.

### 1.3.1. Formación de los complejos proteína-PE.

La mayoría de los modelos usados para explicar la formación de complejos proteína-PE se basan en la diferencia de carga eléctrica entre ambas moléculas. A raíz de ello, se postula que la formación de estos complejos depende altamente de la fuerza iónica del medio y/o su pH [31]:

$$\sigma = \frac{\partial \sigma}{\partial pH} (pH - pI) \quad 1.1$$

donde  $\sigma$  es la densidad de carga superficial de la proteína.

Dubin y col. [32] han postulado la siguiente ecuación de estado para la interacción entre una macromolécula y un PE:

$$\xi \sigma \cong a \kappa \quad 1.2$$

donde  $\xi$  es la densidad de carga superficial del PE,  $a$  es una constante que depende de cada sistema proteína-PE y  $\kappa$  es la constante de Debye-Hückel, la cual es proporcional a la fuerza iónica ( $\mu$ ):

$$\kappa = cte \mu^{1/2}$$

1.3

Las ecuaciones demuestran que modificando las condiciones del medio, tales como pH y fuerza iónica, se puede precipitar, redissolver o disociar el complejo [33, 34]. Sin embargo, a pesar de conocer ecuaciones de estado que describen la conducta de estos sistemas, no está completamente esclarecido un mecanismo molecular general que permita predecir la interacción de las proteínas con los PEs [35].

Dubin y colaboradores [36] han estudiado ampliamente la relación del pH en mezclas de proteínas globulares con PEs sintéticos altamente cargados. Ellos han identificado dos pHs críticos que dependen sensiblemente de la fuerza iónica (figura 1.3).

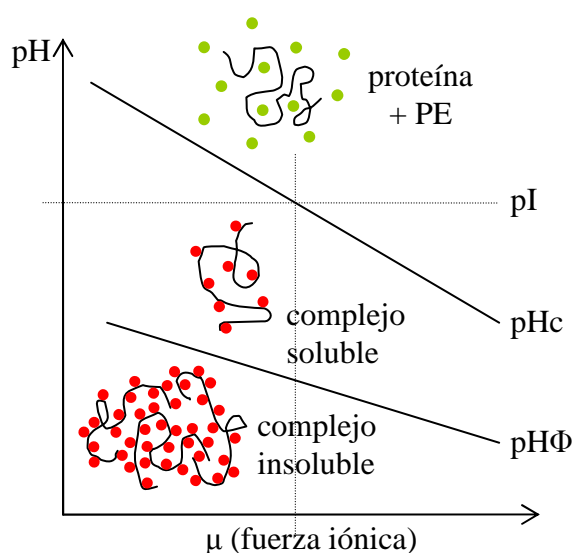


Figura 1.3: diagrama de fase: dependencia de la solubilidad del complejo polímero-proteína con el pH y la fuerza iónica. Proteína sin carga ( $\bullet$ ) y con carga ( $\bullet$ ) [37].

Como se puede observar, a una fuerza iónica dada, a medida que el pH disminuye se alcanza un pH crítico ( $pHc$ ) al cual los complejos solubles comienzan a formarse. Este valor caracteriza la incipiente unión de una proteína a una cadena de PE. La separación de fases macroscópicas ocurre a un segundo pH crítico ( $pH\Phi$ ), que depende de la relación molar PE/proteína. La figura 1.4 muestra un esquema de los diferentes estados de agregación en un sistema proteína-PE.

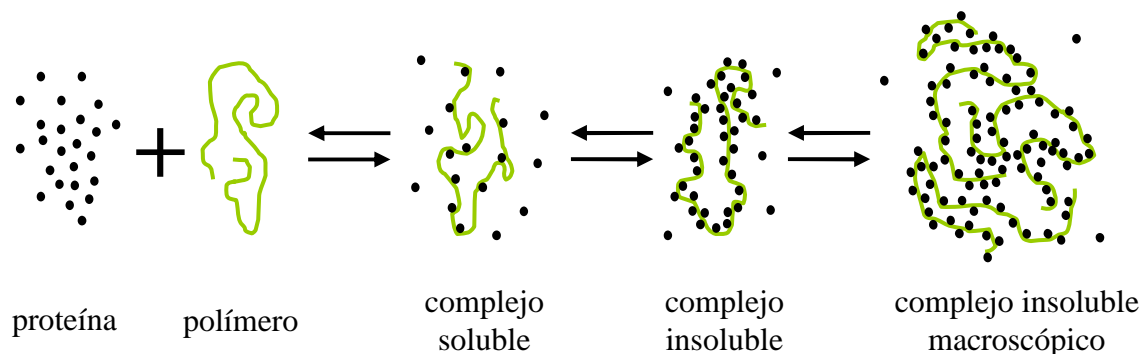


Figura 1.4: equilibrio de formación de complejos entre polímero y proteína.

#### 1.4. CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA.

La HIC (del inglés, *Hydrophobic Interaction Chromatography*) es una técnica muy empleada en la separación y purificación de proteínas basada en la diferencia de hidrofobicidad superficial de las mismas [38, 39]. Cada proteína interacciona reversiblemente con los ligandos hidrofóbicos ubicados en la superficie de la resina polimérica (fase estacionaria) en presencia de una elevada fuerza iónica (2-4 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). La elución se lleva cabo disminuyendo gradualmente la concentración de la sal en la fase móvil hasta una concentración de aproximadamente 0,1 M. Aquellas proteínas de alto carácter hidrofóbico que interaccionaran fuertemente con la resina serán eluidas en presencia de bajas concentraciones de sal.

Esta técnica también puede utilizarse como una etapa posterior a la precipitación de enzimas por formación de complejos insolubles con PE de manera tal de mejorar la pureza de la muestra y/o separar el polímero de la enzima de interés. Esto permitiría no sólo reutilizar el polímero sino que además emplear la enzima en áreas con elevados requerimientos de pureza como la farmacéutica [40].

Los principales parámetros a tener en cuenta para la selección de una resina de HIC y la optimización del proceso de separación de proteínas son [41, 42, 43]:

- las características del ligando hidrofóbico inmovilizado en la resina, como la naturaleza química y la longitud de la cadena hidrocarbonada.
- la naturaleza del polímero utilizado para fabricar la resina: preferentemente debe ser inerte (sin grupos funcionales) y poseer una resistencia mecánica tal que le permita a la columna soportar la presión de trabajo.

- el grado de sustitución de la resina: puede afectar la fuerza de la unión entre el ligando hidrofóbico y las proteínas, la capacidad de adsorción y desorción de la columna así como su selectividad.
- la naturaleza de la sal utilizada en la elución y su concentración: puede afectar la capacidad de adsorción y la selectividad de la columna. Además, se debe considerar si la disminución de la concentración de sal durante la elución de las proteínas se realiza como gradiente o en etapas.
- el pH y la temperatura: en general un aumento del pH de la fase móvil debilitaría las interacciones hidrofóbicas mientras que una disminución del pH tendría el efecto contrario. Por otro lado, un aumento de la temperatura favorecería la adsorción ya que este proceso es conducido entrópicamente. Por supuesto, debe tenerse siempre en cuenta el efecto de ambos parámetros sobre la estabilidad y solubilidad de las proteínas.
- otros aditivos que pueden agregarse a la fase móvil: detergentes, alcoholes miscibles con agua, agentes caotrópicos.

Existen una gran variedad de columnas cromatográficas disponibles en el mercado, fabricadas con diferentes ligandos y matrices poliméricas. Los polímeros más empleados en la producción de resinas son polisacáridos altamente hidrofílicos como la agarosa con distintos grados de entrecruzamiento (por ej., Sepharosa®) y sus derivados, celulosa, dextrano y copolímeros sintéticos [44].

Algunos de los ligandos más utilizados se resumen en la tabla 1.II [45].

**TABLA 1.II**

$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{---O-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH}_3 \end{array}$	grupo butil
$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{---O-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH}_3 \end{array}$	grupo octil
$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{---O-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C-(CH}_3\text{)}_3 \end{array}$	grupo alquil
$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{---O-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-O-} \langle \text{C}_6\text{H}_5 \rangle \end{array}$	grupo fenil

## 1.5. LA TRIPSINA.

1.5.1. Características.

La tripsina (*TRP*) es una endopeptidasa, que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis del enlace peptídico hacia el extremo C-terminal de un residuo de Lys o Arg, dando péptidos de menor tamaño. Sus características se resumen en la tabla 1.IV.

TABLA 1.IV

Características fisicoquímicas	
<i>Estructura</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• globular</li> <li>• monomérica</li> <li>• no glicosilada</li> </ul>
<i>n<sup>o</sup> de aminoácidos</i>	223
<i>PM (kDa)</i>	23,4
<i>pI</i>	10,9-11,4
<i>T<sub>max</sub> estabilidad (°C)</i>	37
<i>pH<sub>max</sub> actividad</i>	8,2
<i>pH almacenamiento</i>	3

Su estructura primaria (figura 1.5) presenta 6 puentes disulfuro localizados entre los residuos Cys 7-Cys 137, Cys 25-Cys 41, Cys 109-Cys 210, Cys 116-Cys 183, Cys 148-Cys 162 y Cys 173-Cys 197.

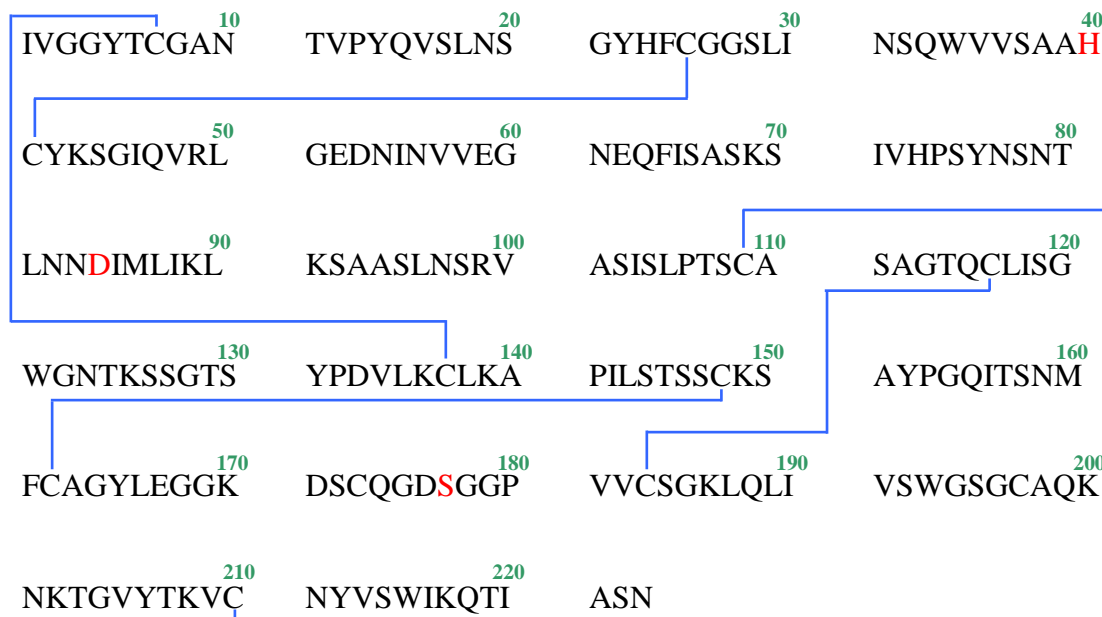


Figura 1.5: estructura primaria de la TRP. (—) puentes disulfuros; (*letras*) triada catalítica y (*números*) posición de los aminoácidos [46].

Aunque las estructuras primarias de isoformas de tripsina aisladas de distintas fuentes pueden ser muy diferentes entre sí, la estructura terciaria que adoptan son muy similares. Sin embargo, las tripsinas de origen porcino y bovino presentan una elevada homología.

De acuerdo a la clasificación CATH para estructura secundaria de proteínas [47], la TRP pertenece a la clase *principalmente  $\beta$* ; topología *barril  $\beta$* . La figura 1.6 muestra una representación tridimensional de la enzima donde pueden observarse dos dominios ricos en láminas  $\beta$  antiparalelas (flechas planas) que conforman un barril y escasas zonas de  $\alpha$ -hélices (flechas tridimensionales). El círculo gris representa al átomo de  $\text{Ca}^{2+}$  esencial para la actividad de la enzima.

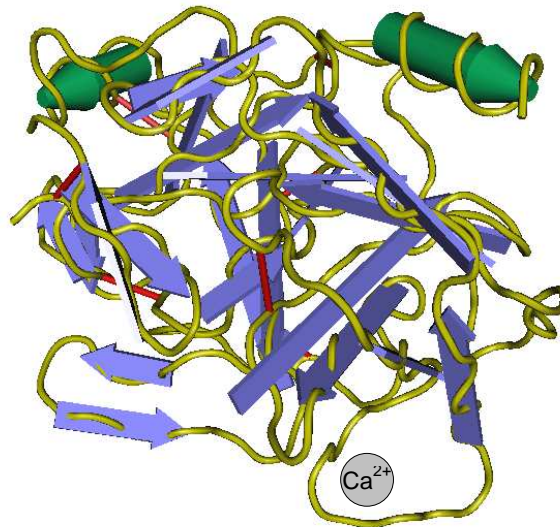


Figura 1.6: estructura tridimensional de la tripsina. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) [gi215649]

### 1.5.2. Papel biológico.

Esta enzima es producida por el páncreas en forma de zimógeno: tripsinógeno (enzima inactivo), y luego es activada en el duodeno por una enteroquinasa intestinal dando como resultado la enzima activa. Luego, la TRP activa a los demás zimógenos pancreáticos: quimotripsinógeno, proelastasa y procarboxipeptidasa, que son algunas de las enzimas proteolíticas de los jugos pancreáticos. Además, la TRP activa moléculas de tripsinógeno (autoactivación) al escindir la secuencia  $(\text{Asp})_4\text{-Lys}$  anterior a la secuencia N-terminal Ile-Val-Gly-Gly. El corte de este péptido trae aparejada la ruptura del puente de hidrógeno entre His40 y Asp149, lo cual conlleva a la rotación de este residuo y su interacción con Ile1. Así, se termina de formar el sitio activo de la enzima [48].

En el duodeno, la TRP hidroliza las proteínas incorporadas a través de los alimentos, en péptidos menores y aminoácidos para su posterior absorción. Esta proteína representa el 14% del contenido proteico del jugo pancreático.

La figura 1.7 esquematiza el proceso de secreción pancreática de tripsinógeno y la activación en la luz duodenal a TRP.

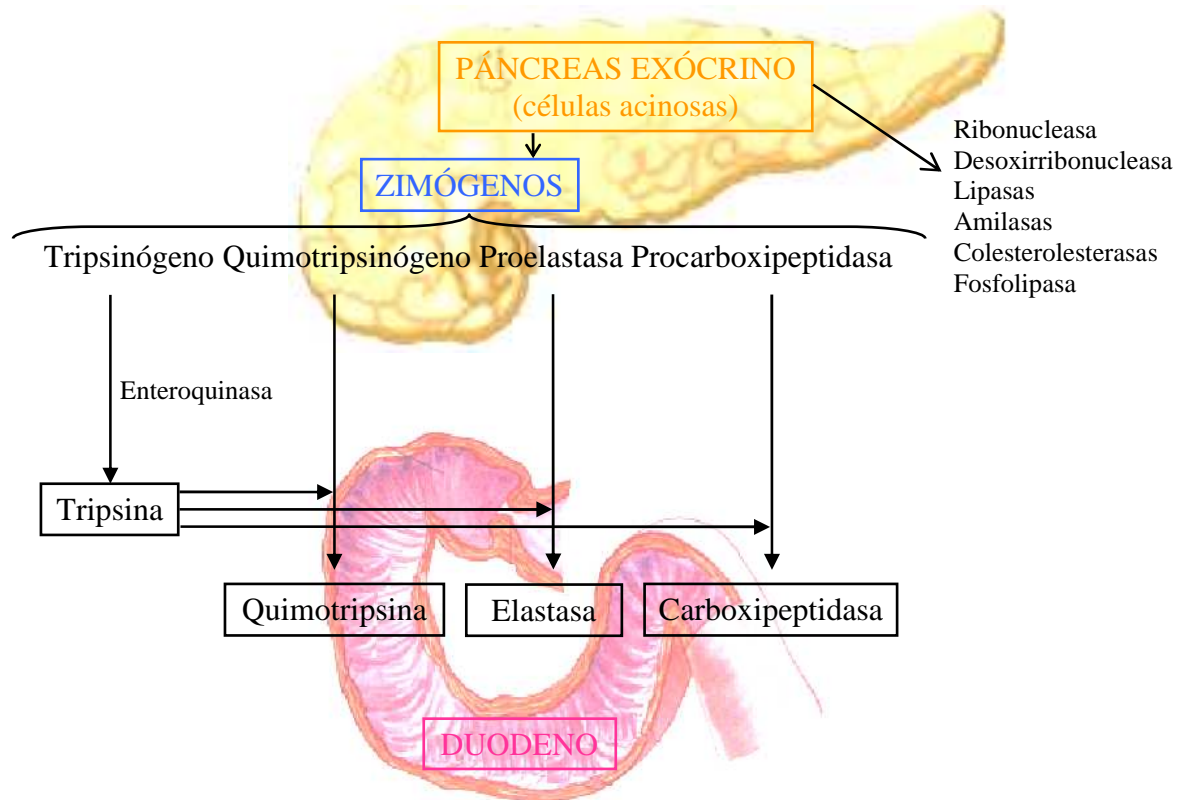


Figura 1.7: esquema de secreción y activación de TRP desde el páncreas hasta el duodeno.

### 1.5.3. La tripsina como enzima modelo.

La tripsina pertenece a la familia  $S_1$  de las serin-proteasas clan PA ya que posee un resto de Ser altamente nucleofílico en su sitio activo (Ser 177) formando una triada catalítica con un residuo de His 40 y Asp 84 (figura 1.8) [49].

Su estructura tridimensional se determinó en 1974 por dos grupos científicos que analizaron por cristalografía de rayos X cristales de tripsina de origen bovino [50, 51]. Las estructuras terciarias de las enzimas pertenecientes a esta familia son altamente conservadas, incluso entre eucariotas y procariotas [46].

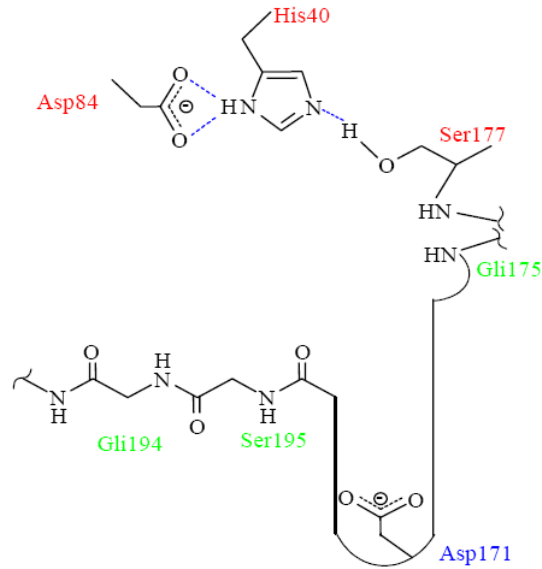


Figura 1.8: estructura del sitio activo de la TRP. [52].

### 1.5.4. Mecanismo de catálisis.

El mecanismo de catálisis de las serin-proteasas fue estudiado primeramente en las enzimas pancreáticas TRP, quimotripsina y elastasa y luego se extendió hacia todas las enzimas de la familia. La principal diferencia entre estos tres modelos es la especificidad por el sustrato, siendo la TRP la más específica.

La figura 1.9 muestra un esquema del mecanismo de hidrólisis de péptidos llevado a cabo por la TRP (general para todas las serin-proteasas) [53].

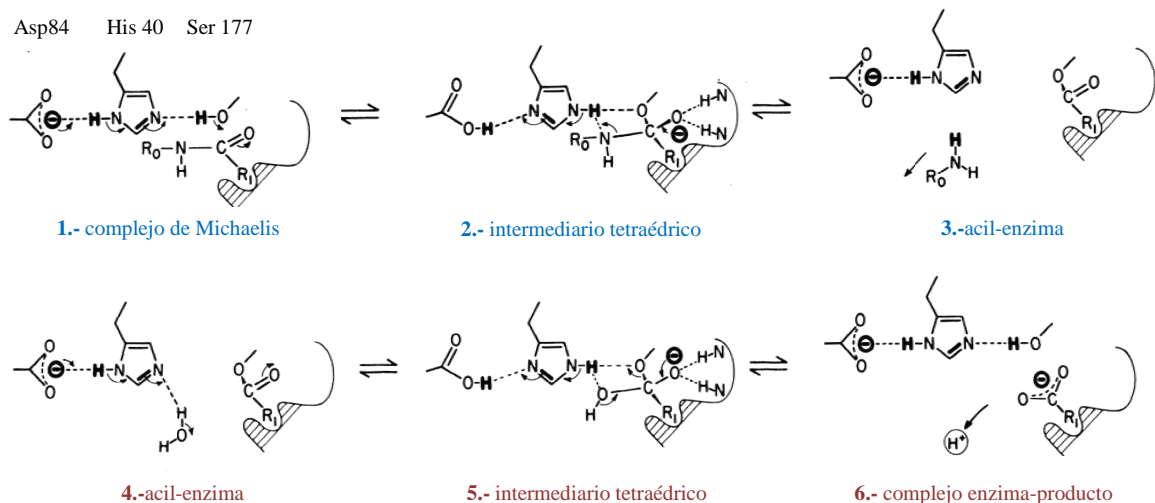


Figura 1.9: mecanismo de catálisis de la TRP: *etapa de acetilación*; *etapa de desacetilación* [51].

En las primeras etapas, se forma un complejo de Michaelis entre el péptido y la tripsina. La Ser177 realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del sustrato, catalizado por el grupo imidazol de la His40, el cual actúa como una base general aceptando y cediendo protones. Esto lleva a la formación del intermediario tetraédrico y el ion imidazolio [54]. Este complejo se estabiliza por la formación de dos puentes de hidrógeno entre la Gly194 y la Ser195 de la cavidad oxianiónica del sitio activo y el átomo de oxígeno cargado negativamente del grupo carbonilo aceptor de electrones [55, 56].

En las siguientes etapas, el intermediario tetraédrico se rompe para dar la acil-enzima, la base imidazol y uno de los productos de escisión. Durante este paso, el grupo imidazol transfiere el protón de la serina al grupo amino saliente. Seguidamente, la base imidazol toma un protón de una molécula de agua (hidrólisis) formándose así un nuevo intermediario tetraédrico estabilizado por la cavidad oxianiónica.

Finalmente, este intermediario se rompe liberando un protón al medio y el segundo producto de escisión: el grupo carboxilo saliente.

La etapa de desacetilación de la enzima (pasos 4, 5 y 6) es similar a la etapa de acetilación de la misma (pasos 1, 2 y 3) con la salvedad de que el grupo involucrado en el ataque nucleofílico es la molécula de agua en vez del grupo hidroxilo del residuo de Ser177.

### **1.5.5. Aplicaciones.**

La TRP se utiliza principalmente en la producción de detergentes enzimáticos y en el ablandamiento de cuero. También posee varias aplicaciones en la industria alimenticia: ablandamiento de carne para mejorar su solubilidad y digestibilidad, producción de alimentos para infantes para disminuir su potencial alergénico [57, 58], clarificación de zumos y cerveza y modificación de las propiedades organolépticas en general.

En investigación básica se la emplea en la disociación de células y la secuenciación de proteínas debido a su alta especificidad por los sitios de corte lo que le otorga una elevada reproducibilidad a los experimentos. En la industria farmacéutica se la introduce como componente de cremas para el tratamiento de edemas y heridas, y en suplementos para favorecer la digestión.

### **1.5.6. Producción de tripsina.**

La gran demanda de esta enzima ha motivado el perfeccionamiento de métodos de producción y purificación de la misma a partir de fuentes naturales como vísceras de

sardina (*Sardina pilchardus*) [59] y otros peces (*Lutjanusvitta*, *Balistescaprisus*) [60, 61]. Estos métodos pueden incluir precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  seguido de varios pasos cromatográficos: filtración en gel, intercambio iónico, cromatografía de afinidad. Sin embargo, aunque los factores de purificación pueden ser elevados, muchas veces los rendimientos resultan menores al 50 %.

También se ha aplicado la precipitación de afinidad para purificar TRP a partir de páncreas bovino utilizando benzamidina como ligando de afinidad acoplado a poliacrilamida y ácido benzoico como agente precipitante del complejo TRP-benzamidina-poliacrilamida [62]. El principal inconveniente de esta técnica es que los compuestos empleados son tóxicos y, en consecuencia, se requiere un uso y disposición correctos de los mismos lo cual conlleva a un incremento de los costos. Además, sólo puede aplicarse en reactores discontinuos.

Un método continuo propuesto es la ultrafiltración de afinidad para purificar TRP a partir de páncreas porcino utilizando un copolímero de N-acriloil-m-amino-benzamidina y acrilamida y benzamidina como agente de elución [63]. Este método consta de cuatro etapas de ultrafiltración de afinidad en las que inicialmente se gotea extracto crudo de páncreas sobre una solución del copolímero 0,75 %. Implica 10 horas de funcionamiento en discontinuo y 15 horas de funcionamiento en continuo a 4°C. El rendimiento es igual a 77 % con una pureza igual a 97 %. La ultrafiltración de afinidad requiere largos tiempos de trabajo y energía para mantener baja la temperatura; y utiliza soluciones de polímero concentradas lo cual conlleva a un aumento en el costo final.

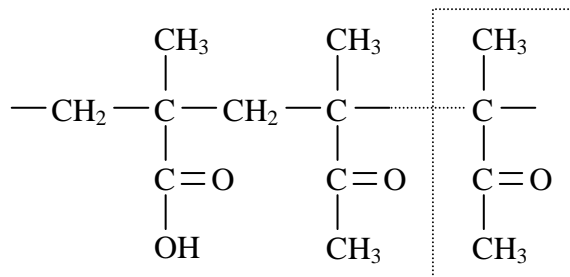
Por otro lado, se han desarrollado métodos de expresión de TRP, tanto en su forma activa como inactiva (tripsinógeno), en microorganismos como *Pichia pastoris* [64, 65] y *Escherichia coli* [66] y células de arroz (*Oryza sativa*) [67]. A pesar de la considerable cantidad de estudios, aún no se ha conseguido mejorar el rendimiento de la producción de TRP recombinante debido a inconvenientes en la transformación de las células, en la síntesis de la enzima por parte de las células huésped y/o en el plegamiento de la cadena polipeptídica (en el caso de que la TRP se encuentre formando cuerpos de inclusión). Además, en muchos casos, estas etapas suelen abarcar un 80-90% del costo del producto final. Por otro lado, las tripsinas recombinantes presentan problemas de agregación durante su expresión e inactivación por autólisis debido a fallas en la maquinaria de plegamiento de los microorganismos [68].

## 1.6. POLÍMEROS

### 1.6.1. Eudragit® L-100 y S-100.

El Eudragit® L-100 (*EL100*) y S-100 (*ES100*) son copolímeros sintéticos, aniónicos, formados por subunidades de ácido metacrílico y metilmetacrilato con una relación 1:1 y 1:2, respectivamente. Ambos poseen un peso molecular de 135.000 Da y una densidad aparente de 0,5 g/cm<sup>3</sup> a 20 °C.

Las unidades monoméricas se presentan en la figura 1.10.



*Figura 1.10: estructura química del EL100 y ES100. Recuadrado está el grupo metilmetacrilato adicional que posee la subunidad repetitiva del ES100.*

Ambos polímeros son prácticamente insolubles en agua (a excepción que se preparen soluciones alcalinas de los mismos) pero sí solubles en acetona y en alcoholes de bajo peso molecular.

Ninguno de estos polímeros presenta toxicidad aguda oral o dérmica. Tampoco presentan irritación cutánea aunque pueden causar un ligero efecto irritante en los ojos.

#### 1.6.1.1. Aplicaciones.

Tanto el EL100 como el ES100 se utilizan como excipientes cosméticos y farmacéuticos en productos de aplicación cutánea y oral [69]. Un ejemplo son las microesferas de ES100 con acetazolamida para el tratamiento de glaucomas [70] y la producción de sistemas controlados de liberación de drogas orales [71].

También se los usa como soportes sólidos para la inmovilización de enzimas como tripsina, xilanasas y lipasa [72, 73, 74] y como agentes precipitantes de biomoléculas por formación de complejos insolubles que pueden ser separados por decantación o centrifugación [75, 76].

### 1.6.2. Alginato.

El alginato (*ALG*) es un polisacárido lineal, natural y aniónico que se encuentra como un componente de la pared celular de las células del alga parda marina (organismo que habita en todas las regiones de aguas frías del mundo), formando un complejo insoluble con sales de calcio y magnesio.

Este PE está formado por subunidades de  $\beta$ -(1,4)-D-ácido manurónico y  $\beta$ -(1,4)-L-ácido gulurónico distribuidas aleatoriamente (figura 1.11).

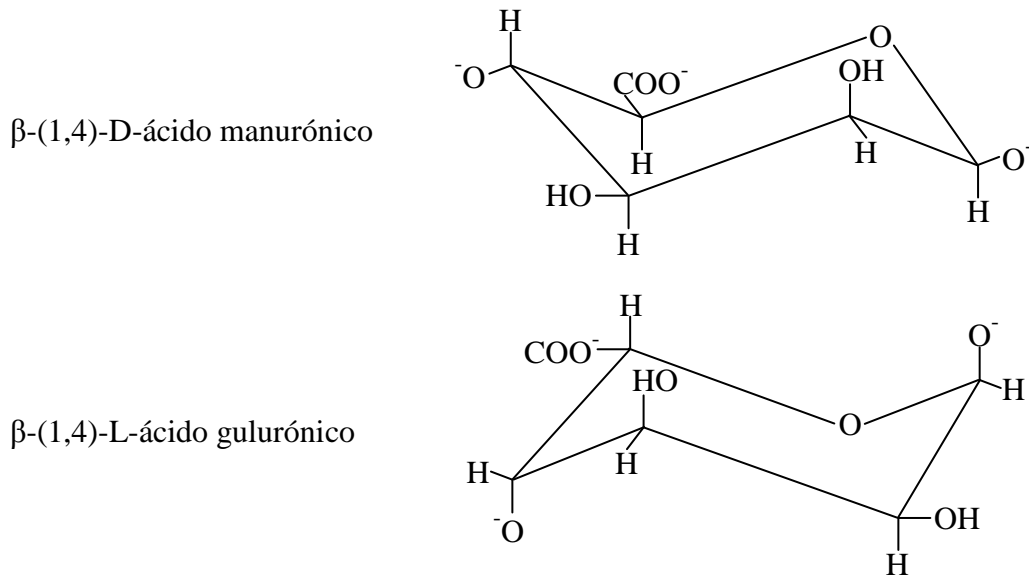
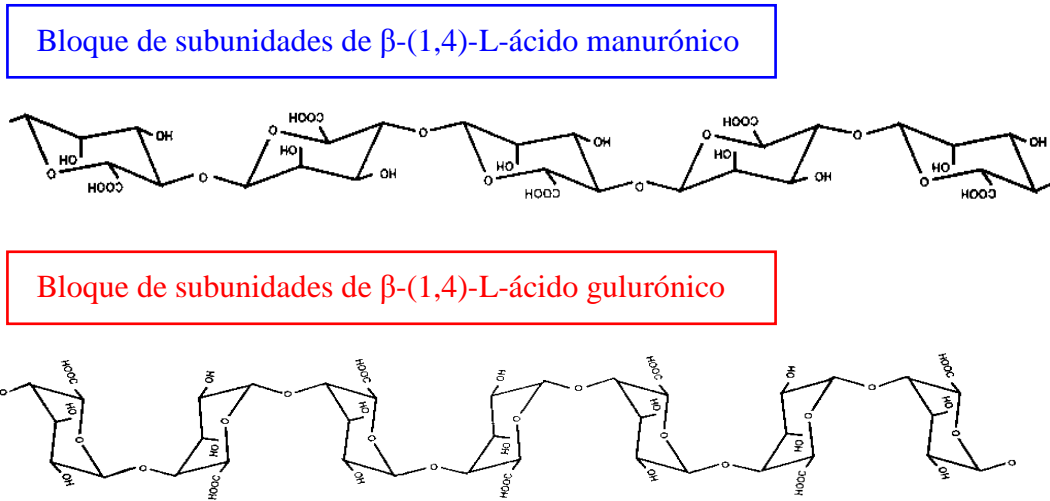


Figura 1.11: subunidades del ALG.

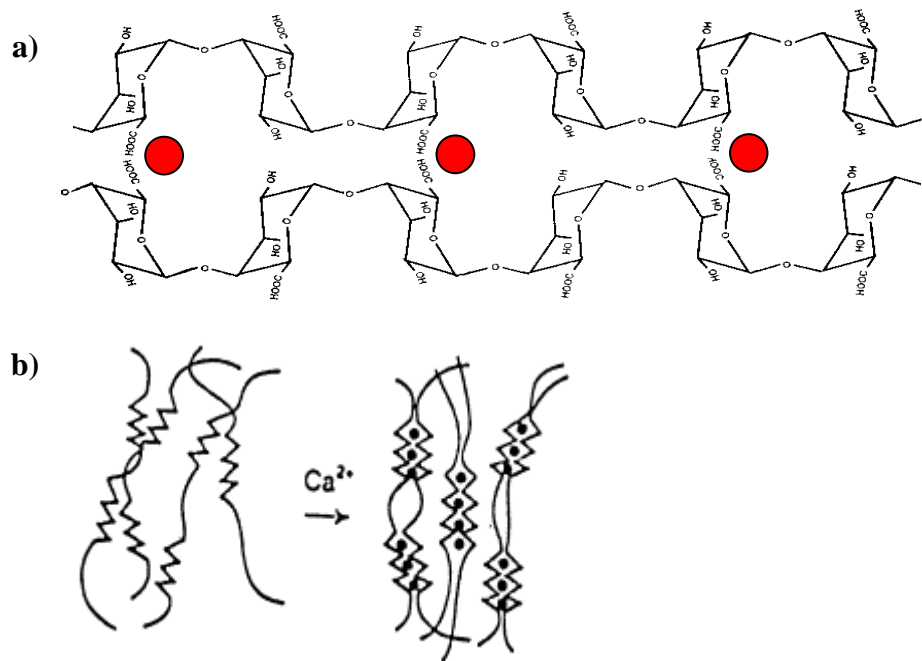
La disposición de estas subunidades da lugar a diferentes conformaciones de las cadenas de ALG, como se muestra en la figura 1.12.

La predominancia de uno u otro azúcar da como resultado un tipo de cadena diferente, lo que condiciona las propiedades de las soluciones de ALG. Las cadenas con un mayor contenido de  $\beta$ -(1,4)-D-ácido manurónico presentan una mayor proporción de zonas lisas; mientras que aquellas cadenas con un mayor contenido de  $\beta$ -(1,4)-L-ácido gulurónico presentarán una mayor cantidad de zonas en zig-zag. La proporción de zonas lisas/zig-zag es una característica importante a considerar en la solubilidad del ALG.



*Figura 1.12: conformaciones de la cadena de ALG de acuerdo a la naturaleza de sus subunidades: lisa y zig-zag.*

Generalmente, el ALG se insolubiliza en presencia de iones divalentes como el calcio y el magnesio [77, 78], formando geles a temperatura ambiente. Esta capacidad se debe en gran medida a la presencia de zonas en zig-zag a lo largo de la cadena de polímero que interactúan con los iones formando una estructura del tipo que se muestra en la figura 1.13.



*Figura 1.13: estructura del ALG en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ : (a) interacción entre los grupos  $\text{COO}^-$  y el  $\text{Ca}^{2+}$ ; (b) disposición de las cadenas de ALG [64].*

### 1.6.2.1. Aplicaciones.

Debido a que el ALG es un polímero natural, biodegradable y no tóxico es utilizado en varias áreas de la industria. En la alimenticia, se lo emplea frecuentemente como espesante y/o estabilizante de jugos de frutas, cerveza y salsas; y por sus propiedades gelificantes se lo aplica en la producción de gelatina y relleno de aceitunas.

En el área farmacéutica es usado para encapsular principios activos como rivo flavina y otros [79]. También es espesante en lociones y jarabes.

En el área de la biotecnología, los geles de ALG se pueden aplicar para la construcción de biorreactores, inmovilizando en ellos enzimas o microorganismos y para aislar por precipitación proteínas de fuentes complejas [80].

Además, se está investigando el uso de geles de ALG en la regeneración de tejido óseo, cartílago y otros [81]. En esta última, se lo utiliza como uno de los componentes de los materiales de impresión dental, para cubrir y proteger dentaduras de resina acrílica [79].

## 1.7. TÉCNICAS EMPLEADAS PARA ESTUDIAR LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-PE.

### 1.7.1. Turbidimetría.

La turbidimetría es una técnica analítica simple y no invasiva basada en la dispersión de radiación electromagnética que incide en una solución de partículas dispersantes. Permite obtener información preliminar de manera rápida y bastante certera sobre la formación de complejos entre proteínas y polímeros [82].

En los estudios turbidimétricos, se mide la radiación transmitida ( $T$ ) a través de una cubeta de longitud  $l$  que contiene una solución o dispersión no absorbente. Esta medida se relaciona con la turbidez ( $\tau_s$ ) por la ecuación 1.4:

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{(-\tau_s l)} \quad 1.4$$

donde  $I_0$  es la intensidad de la radiación incidente e  $I$  es la intensidad de radiación emitida.

La magnitud de la dispersión depende de la longitud de onda empleada, del tamaño y la concentración de las partículas dispersantes. Se demuestra experimentalmente que la turbidez se relaciona con la longitud de onda ( $\lambda$ ) por la ecuación 1.5 [83]:

$$\tau_s = s \lambda^{-t}$$

donde  $s$  es una constante que depende del sistema y  $t$  es un parámetro que depende del tamaño y de la cantidad de partículas.

La turbidimetría es muy útil en el estudio de complejos polímero-proteína ya que permite conocer las condiciones óptimas de formación (y redisolución) del complejo insoluble: pH, fuerza iónica, concentración de polímero y proteína, cinética o incluso detectar la formación de complejos solubles a través de pequeños incrementos en la densidad óptica de una solución [84].

### **1.7.2. Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-vis).**

La espectroscopía de absorción UV-vis es una técnica rápida, no invasiva que permite realizar una gran variedad de estudios; desde la identificación de sustancias hasta la cuantificación de compuestos orgánicos, inorgánicos y biomoléculas a través de la aplicación de la Ley de Beer [85]. Esta técnica se basa en la excitación de electrones desde el estado fundamental a un estado excitado por absorción de luz no polarizada en el rango ultravioleta o visible.

Las transiciones electrónicas en moléculas se presentan normalmente en forma de bandas anchas debido a la variación en el grado de solvatación que presentan las moléculas en el tiempo o la existencia de distintos niveles vibracionales dentro de cada estado electrónico y de distintos niveles rotacionales dentro de cada nivel vibracional [86, 87]. Esto hace que cuando un electrón absorbe energía, ocurra un gran número de transiciones energéticamente muy próximas entre sí debido a la gran cantidad de niveles vibracionales y rotacionales poblados (y por poblar) en cada nivel electrónico. En solución, a diferencia de lo que ocurre en gases, cada una de estas transiciones no pueden diferenciarse como un pico y por ende, los espectros UV-vis presentan bandas anchas características.

Las principales características de una banda de absorción son:

- la posición: dada por el máximo de absorción. Depende de la energía de la transición y se reporta como  $\lambda_{max}$  (longitud de onda de máxima absorción).
- la intensidad: que puede expresarse como absortividad molar en el máximo ( $\epsilon_{max}$ ) o intensidad integrada. Esta intensidad depende del cuadrado del momento dipolar de la transición (cambio en la distribución de cargas eléctricas durante la transición): absorciones intensas generan un gran cambio en la distribución de las cargas.

- el ancho: que depende del número e intensidad de los niveles vibracionales y rotacionales de la transición correspondiente.

Los cambios en una o más de estas características se denominan en conjunto *efecto solvato-crómico* y permite inferir cambios en el sistema en estudio.

### 1.7.2.1. Aplicación de la espectroscopía UV-vis al estudio estructural de proteínas.

Los residuos aromáticos de las proteínas absorben en la región UV del espectro originando una banda principal centrada alrededor de 280 nm. El triptófano es el que presenta la mayor absorptividad molar entre los tres aminoácidos aromáticos por lo tanto predomina en la banda a 280 nm. Cambios en la posición del máximo de absorción y/o en la intensidad del pico da indicios de perturbaciones en el entorno de los triptófanos debido a cambios en la estructura terciaria de la proteína. Un corrimiento del máximo de absorción hacia mayores o menores longitudes de onda se denomina *efecto batocrómico* o *hipsocrómico*, respectivamente. Un aumento o disminución de la absorbancia se denomina *efecto hipercrómico* o *hipocrómico*, respectivamente [88].

Así, se pueden detectar cambios cualitativos en la estructura proteica al modificar condiciones del medio como el pH y la fuerza iónica; o al agregar sustancias que puedan afectar la estabilidad interactuando con la proteína en sí o con el solvente.

### 1.7.3. Espectroscopía de dicroísmo circular (DC).

La DC es una técnica espectroscópica no destructiva utilizada para estudiar cambios en la estructura de biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos por absorción diferenciada de los componentes polarizados circularmente hacia la derecha e izquierda de luz UV polarizada en el plano.

En el estudio de proteínas se puede obtener distinto tipo de información sobre la estructura de las mismas: los espectros realizados en la región del UV cercano (250-290 nm) refleja las contribuciones de los residuos aromáticos, los puentes disulfuro y los grupos prostéticos y, como pueden encontrarse distribuidos por toda la superficie proteica, permiten analizar cambios en la estructura terciaria. Los espectros realizados en la región del UV lejano (180-250 nm) reflejan la contribución del enlace peptídico y permiten analizar la estructura secundaria de las proteínas [89].

Esta técnica es muy útil en el estudio de la formación de complejos insolubles proteínas-PE ya que la interacción entre ambas especies podría provocar cambios en la conformación proteica que conlleven a la pérdida total o parcial de las estructuras secundarias. Generalmente, se complementa con medidas de actividad y técnicas de espectroscopía UV-vis y calorimetría diferencial de barrido.

La técnica de DC se basa en la absorción diferencial de los haces de luz polarizada circularmente hacia la izquierda y derecha por los distintos cromóforos que presentan las proteínas. Particularmente en referencia a la experimentación en la región del UV lejano, estos cromóforos se generan en las proteínas gracias a la asimetría en el arreglo espacial del enlace amida producto de la ausencia o presencia de estructuras secundarias periódicas ( $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -plegada paralela y antiparalela, giros). De acuerdo al tipo de estructura secundaria, se obtienen distintos patrones de acoplamiento, distancias y orientaciones características de estos cromóforos que darán lugar a un espectro de DC característico.

Las proteínas pueden clasificarse en cinco clases de acuerdo a su estructura secundaria, incluyendo la conformación al azar [90]:

- $\alpha$ -proteínas: poseen únicamente  $\alpha$ -hélices, por ejemplo mioglobina y fosfolipasa C.
- $\beta$ -proteínas: poseen mayoritariamente  $\beta$ -láminas, por ejemplo inmunoglobulina y quimotripsina.
- $\alpha$ + $\beta$ -proteínas: poseen  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -láminas en dominios separados, por ejemplo insulina y lisozima.
- $\alpha$ / $\beta$ -proteínas: poseen segmentos alternados de  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -láminas, por ejemplo alcohol deshidrogenasa y fosforilasa.
- proteínas desordenadas: sin estructura secundaria (o con muy pocos elementos estructurados), por ejemplo caseínas e inhibidores de proteasas tipo Bowman-Birk.

La mayoría de las proteínas están lejos de estos modelos ideales, por lo cual asignar las estructuras secundarias presentes en proteínas suele ser una tarea complicada [91].

### 1.7.3.1. Análisis de los experimentos en DC.

Los datos experimentales se presentan en espectros obtenidos graficando elipticidad ( $\theta$ ) o elipticidad molar para independizar del paso óptico de la cubeta y de la concentración de proteína, en unidades de  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  vs. longitud de onda (figura 1.14).

El equipo de DC denominado *espectropolarímetro* monitorea la diferencia de absorción entre los componentes de luz polarizada hacia la derecha ( $A_R$ ) e izquierda ( $A_L$ ):

$$\Delta A = A_L - A_R \quad 1.6$$

De acuerdo a la Ley de Lambert-Beer esta diferencia es proporcional a la diferencia entre los coeficientes de extinción molar ( $\varepsilon$ ):

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \quad 1.7$$

Este valor se convierte en elipticidad molar ( $[\theta]$ ) a partir de la ecuación 1.8:

$$[\theta] = 3298 \Delta \varepsilon \quad 1.8$$

Los espectros obtenidos son característicos de cada proteína y resultan de la contribución de todos los cromóforos presentes en cada una.

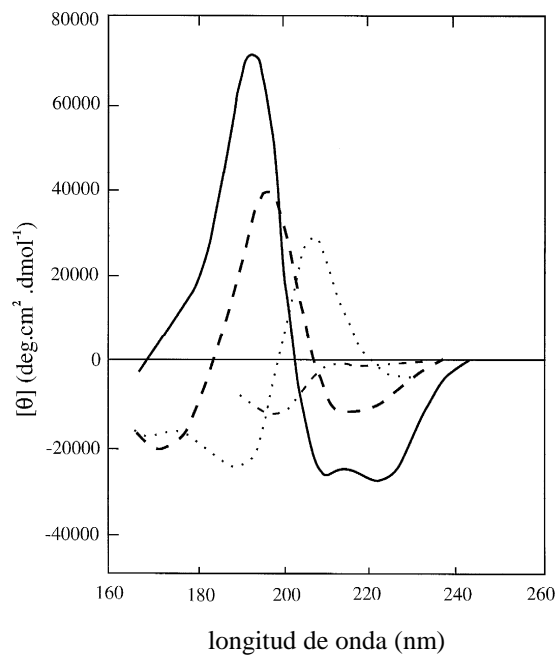


Figura 1.14: espectros de CD en el UV lejano asociados a distintos tipos de estructuras secundarias: (—)  $\alpha$ -hélice; (— —)  $\beta$ -lámina antiparalela; (···) giro  $\beta$  y (-·-·) estructura desorganizada [92].

Por ello, es necesario recurrir a distintos métodos estadísticos para estimar la estructura secundaria. Estos métodos se basan en algoritmos matemáticos y emplean proteínas de referencia con estructura conocida por cristalografía. Sin embargo, en muchas oportunidades estos métodos no logran resolver de manera correcta la estructura secundaria de proteínas y no son comparables entre sí debido a la existencia de distintas colecciones de proteínas de referencia que pueden emplearse. Además, los supuestos en los que se basan muchas veces no son correctos o pueden ser fuente de error [93, 94, 95].

### 1.7.4. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

La ITC (del inglés, *Isothermal Titration Calorimetry*) es una técnica analítica ampliamente usada en distintas áreas de investigación como la biofísica, la biotecnología y la farmacología que permite conocer varios parámetros de la interacción entre dos moléculas por medidas del calor producido o consumido, a presión constante, cuando se mezclan cantidades precisas de ambos reactivos. Las asociaciones proteína-ligando, proteína-proteína, proteína-ADN/ARN son ejemplos de indudable interés biológico [96].

Esta técnica mide directamente el calor liberado o absorbido en una reacción que pone en juego interacciones intermoleculares e intramoleculares. Si el efecto térmico neto de la interacción es suficientemente grande, la relación molar polímero/proteína ( $n/n$ ), la entalpía ( $\Delta H^\circ$ ) y la constante de afinidad ( $k$ ) de estos complejos puede determinarse sin ambigüedad. Consecuentemente, la energía de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) puede calcularse como:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln k \quad 1.9$$

y la entropía ( $\Delta S^\circ$ ) del proceso como:

$$\Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ}{T} \quad 1.10$$

El éxito de esta técnica se debe a varios hechos relevantes. En principio cualquier interacción libera o absorbe calor. En ITC este calor se mide a presión constante y por ende, se determina directamente la verdadera entalpía de la reacción en estudio. Esta peculiaridad contrasta con las medidas de una entalpía aparente, deducidas de la dependencia de la constante de asociación con la temperatura (ecuación de van't Hoff), obtenidas con técnicas tales como equilibrio de diálisis, ultrafiltración o cromatografía de

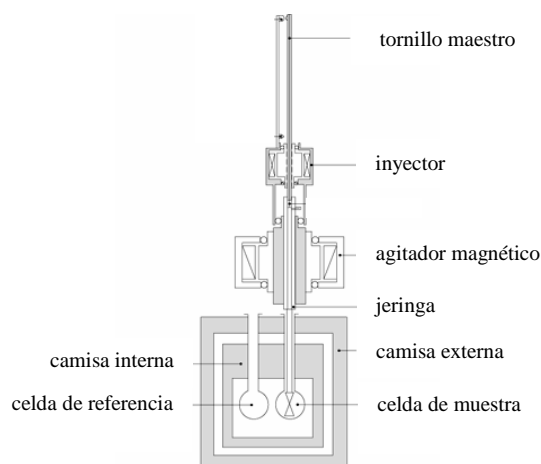
exclusión. Además, existe una base metodológica y teórica bien establecida para analizar los datos experimentales, incluso de sistemas relativamente complejos [97, 98]. Como consecuencia, es posible en muchos casos obtener una caracterización completa de una interacción intermolecular, siendo la única técnica que proporciona simultáneamente la relación molar y las funciones termodinámicas.

No obstante, debido a la inespecificidad intrínseca en la detección del efecto térmico se precisa de la ayuda de otras técnicas específicas para interpretar los valores de los parámetros termodinámicos en términos moleculares.

La importancia de la aplicación de ITC en el estudio de los complejos proteína-PE es que se puede caracterizar inequívocamente el sistema: determinar el número de moles de proteína por mol de PE, conocer la naturaleza de la interacción, no sólo a partir de las funciones termodinámicas sino que además llevando a cabo los experimentos en distintas condiciones experimentales (pH, fuerza iónica, temperatura). Puede complementarse con turbidimetría para conocer previamente dichas condiciones.

### 1.7.4.1. Equipamiento y experimentación.

El equipo utilizado para llevar a cabo un experimento de ITC se denomina *calorímetro de titulación*. Un esquema básico de sus componentes más importantes se muestra en la figura 1.15 [99].



*Figura 1.15: esquema básico de un calorímetro MicroCal VP-ITC.*

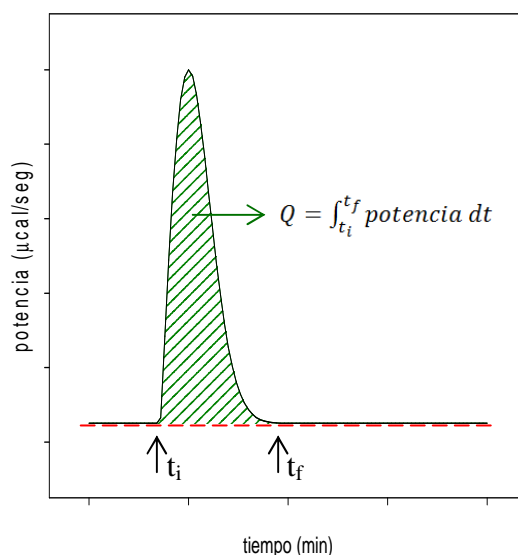
Un calorímetro típico consta de dos celdas con forma de moneda (celda de referencia y celda de muestra) rodeadas por una camisa adiabática y un inyector. La celda

de muestra es aquella en la cual se realiza el experimento y en ella se coloca la solución de uno de los reactivos; mientras que en la celda de referencia se coloca agua milli-Q o buffer.

El inyector se encarga de hacer agregados sucesivos de la solución del otro reactivo dentro de la celda de muestra. Al mismo tiempo, el extremo de la jeringa agita la solución durante todo el experimento. Cada alícuota que se agrega al sistema provoca la liberación o consumo de calor que es monitoreado en tiempo real por una termocupla.

De esta manera, un experimento convencional de ITC implica realizar agregados consecutivos de la solución de ligando a la solución de macromolécula contenida en la celda de muestra hasta observar la saturación de los sitios presentes en la macromolécula.

Inicialmente, el calorímetro mantiene ambas celdas a la temperatura de trabajo y la potencia necesaria para conservar dicha temperatura constante da origen a la línea de base del equipo. Cada alícuota que agrega el inyector genera una variación en la temperatura de la celda de muestra que es compensada por una consecuente variación de la potencia suministrada a la celda, procurando restablecer la temperatura de trabajo. Las reacciones exotérmicas provocan disminuciones en la potencia mientras que las endotérmicas provocan aumentos de la misma. Así, el software provisto con el calorímetro monitorea la variación de potencia a través del tiempo y muestra en tiempo real un gráfico de potencia ( $\mu\text{cal}/\text{seg}$ ) vs. tiempo (min) como el de la figura 1.16.



*Figura 1.16: pico característico de respuesta a una inyección de un reactivo sobre otro colocado en la celda de muestra. (— —) línea de base;  $t_i$ : tiempo inicial de la inyección y  $t_f$ : tiempo final de la compensación de potencia.*

El área del pico integrada entre el tiempo inicial y final es el calor intercambiado por el sistema durante cada inyección. Por cada alícuota que se agrega, el software muestra

picos cuyas áreas disminuyen a medida que el sistema se satura. La figura 1.17 (panel superior) muestra un ejemplo del gráfico final de un experimento de calorimetría de titulación isotérmica [100].

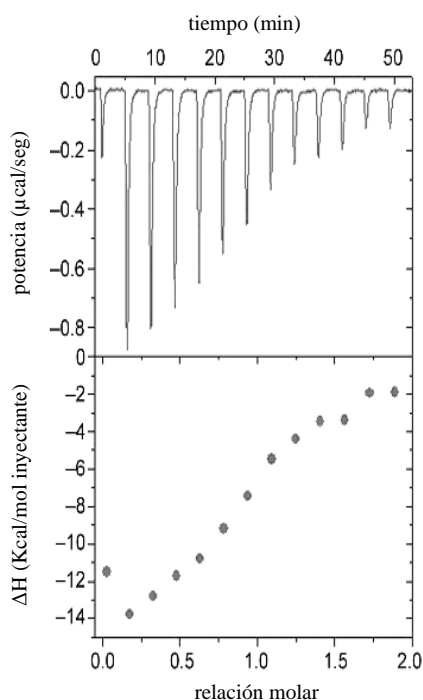


Figura 1.17: gráficos representativos de (**panel superior**) potencia vs. tiempo y (**panel inferior**)  $\Delta H$  vs. relación molar de un experimento de ITC.

Finalmente, el software informa el  $\Delta H$  asociado a cada inyección como el calor por mol de inyectante y lo representa en un gráfico de  $\Delta H$  (cal/mol de inyectante) vs. relación molar (figura 1.17 – panel inferior).

Sin embargo, se debe tener precaución en el análisis de los datos experimentales: el calor generado o absorbido puede ser resultado de numerosos procesos que ocurren simultáneamente con la reacción de interacción propiamente dicha, tales como la dilución de la macromolécula y la disolución del ligando. La inespecificidad intrínseca de esta técnica hace necesario efectuar ciertos controles que permitan sustraer de calor total aquellos que no correspondan a la interacción en sí misma. Así, además de realizar la titulación de la macromolécula con el ligando, se debe “titular” buffer con ligando y macromolécula con buffer de manera tal de obtener el calor asociado a la disolución del ligando ( $\Delta H_{disol}$ ) y el calor asociado a la dilución de la macromolécula ( $\Delta H_{dil}$ ). El calor propio de la interacción macromolécula-ligando ( $\Delta H_{int}$ ) se puede calcular entonces a partir del calor total medido ( $\Delta H_T$ ) como:

$$\Delta H_{int} = \Delta H_T - \Delta H_{dil} - \Delta H_{disol} \quad 1.11$$

#### 1.7.4.2. Análisis del experimento en ITC.

El diseño de un experimento de interacción macromolécula-ligando y el análisis posterior de los datos se realizan sobre la base de un modelo de interacción.

En aquellos casos de interacción que no muestren un efecto cooperativo (positivo o negativo) ni que presenten diferentes clases de sitios de unión para el ligando, el comportamiento del sistema “interaccionante” se puede describir adecuadamente a través del modelo de *interacción con sitios independientes y equivalentes* [101-106]. El término *equivalentes* implica la misma constante de afinidad microscópica para cualquiera de los  $n$  sitios presentes y el término *independientes* se refiere a que la unión a un sitio cualquiera no modifica la afinidad de los restantes.

El análisis termodinámico estadístico de un proceso de unión con estas características nos demuestra que la función de partición de unión ( $Z$ ), que describe las poblaciones de los diferentes estados moleculares accesibles del sistema es [107]:

$$Z = (1 + k [L])^n \quad 1.12$$

donde  $k$  es la constante microscópica aparente del equilibrio de unión,  $[L]$  la concentración de ligando libre en equilibrio con las demás especies presentes en el sistema interaccionante ( $M$ ,  $ML$ ,  $ML_2$ , ...,  $ML_n$ ) y  $n$  es el número de sitios de unión de la macromolécula para el ligando.

La relación de la concentración de ligando unido en equilibrio con el ligando libre ( $[L]_b$ ) y la concentración de macromolécula total ( $[M]_T$ ), conocida como *parámetro de unión*, está relacionada con la función de partición de unión por:

$$\bar{\nu} = \frac{[L]_b}{[M]_T} = \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln [L]} \quad 1.13$$

Por consiguiente el calor asociado a la variación de moles de ligando unido por mol de macromolécula para un sistema representado por el modelo de  $n$  sitios independientes y equivalentes será:

$$q_i = \Delta H_b \Delta(\text{moles } L_b) \quad 1.14$$

donde  $L_b$  representa el ligando unido y  $\Delta H_b$  es el cambio de entalpía por mol de ligando unido. Si  $V_c$  representa el volumen de la celda, la ecuación anterior puede expresarse más explícitamente como:

$$q_i = \Delta H_b V_c ([L]_{b,i} - [L]_{b,i-1}) = \Delta H_b V_c (\bar{v}_i [M]_i - \bar{v}_{i-1} [M]_{i-1}) \quad 1.15$$

Consideramos que el volumen efectivo que interviene en la reacción es aquel que llena la celda y por consiguiente las concentraciones de macromolécula y ligando actuales en la celda han de corregirse por las pequeñas cantidades de estos componentes contenidas en el volumen desplazado fuera de la misma. Así la concentración actual de macromolécula en la celda ( $[M]_i = [M] + [ML] + [ML_2] + \dots$ ) será:

$$[M]_i = [M]_{i-1} \frac{V_c - V_{in}}{V_c} \quad 1.16$$

y la concentración total del ligando en la celda:

$$[L]_{T,i} = \frac{(V_c - V_{in})[L]_{T,i-1} + V_{in}[L]_0}{V_c} \quad 1.17$$

donde  $V_{in}$  y  $[L]_0$  son el volumen de inyección y la concentración del ligando en el inyector, respectivamente.

El calor total acumulado después de  $N$  inyecciones puede determinarse a partir de la ecuación 1.18:

$$Q_T = \sum_{i=1}^N q_i = V_c [M]_N \Delta H_b \bar{v}_N = V_c [M]_N \Delta H_b \frac{n k [L]}{1+k [L]} \quad 1.18$$

En ITC, el valor de la variable  $[L]$  no se conoce por lo que operativamente conviene expresarla en función de las variables experimentales  $[L]_T$  y  $Q_T$ , como se muestra en la ecuación 1.18:

$$[L] = [L]_T - [L]_b = [L]_T - \frac{Q_T}{V_c \Delta H_b} \quad 1.19$$

Sustituyendo [L] en la ecuación 1.18 con la ecuación 1.19, se obtiene una ecuación de segundo grado en Q cuya solución es la ecuación 1.20:

$$Q_T = \frac{V_c \Delta H_b}{2k} \left[ 1 + k [L]_T + n k [M]_T - \sqrt{(1 + k [L]_T + n k [M]_T)^2 - 4 n k^2 [M]_T [L]_T} \right]$$

**1.20**

Esta ecuación relaciona el calor total acumulado después de N inyecciones con las variables experimentales  $V_c$ ,  $[L]_T$  y  $[M]_T$  y los parámetros  $n$ ,  $k$  y  $\Delta H_b$  [107, 108].

### 1.7.4.3. Caracterización de la interacción.

Existen varios procedimientos para determinar los parámetros característicos de una interacción ligando-macromolécula:

1. calcular el calor acumulado ( $Q_T$ ) luego de cada inyección (ecuación 1.20) y graficarlo vs. la concentración total de ligando en la celda luego de cada agregado ( $[L]_T$ ). A partir del ajuste matemático de estos datos con la ecuación 1.20 se puede calcular  $n$ ,  $k$  y  $\Delta H_b$  (y consecuentemente,  $\Delta G$  y  $\Delta S$ ).
2. ajustar los datos de la curva  $\Delta H$  vs. relación molar a una función sigmoidea y a partir de los parámetros de dicha ecuación obtener  $n/n$ ,  $k$ ,  $\Delta H_b$ ,  $\Delta G$  y  $\Delta S$ .
3. ajustar los datos de la curva  $\Delta H$  vs. relación molar a uno de los modelos de fijación: modelo de interacción con sitios independientes y equivalentes (uno o dos tipos de sitio); modelo de unión secuencial; etc.

Las opciones uno y dos implican suponer previamente que la fijación de ambas especies en estudio sigue un modelo de un único tipo de sitios independientes y equivalentes.

### 1.7.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La DSC (del inglés, *Differential Scanning Calorimetry*) es una técnica muy usada en varias áreas de las ciencias médicas y biológicas que permite estudiar la estabilidad de biomoléculas y conocer parámetros importantes de un proceso de transición de estados.

Esta técnica permite caracterizar termodinámicamente los cambios conformacionales inducidos por variación de la temperatura en proteínas [109, 110], ácidos nucleicos [111] y biomembranas. En la actualidad es considerada la técnica más adecuada para estudiar la energética de las transiciones de plegamiento-desplegamiento de proteínas

La información fundamental que proporciona un experimento de DSC es la capacidad calorífica de un sistema en función de la temperatura. El procesamiento subsiguiente de esta magnitud proporciona una caracterización termodinámica completa del proceso investigado. En general, los parámetros que se pueden obtener por DSC son:

1. La temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) que es la temperatura a la cual el 50 % de la población de proteína se encuentra en su forma nativa y el 50 % se encuentra en su forma desnaturalizada.
2. La capacidad calorífica parcial ( $C_p$ ) del compuesto de interés.
3. Los parámetros termodinámicos globales: los cambios de entalpía ( $\Delta H^\circ$ ), entropía ( $\Delta S^\circ$ ), energía de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) y variación de la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ) asociados a la transición inducida por temperatura.
4. La función de partición y concomitantemente la población de los estados relevantes del sistema y sus parámetros termodinámicos.

La DSC se utiliza en el estudio de la interacción proteína-PE ya que junto con otras técnicas como la espectroscopía UV-vis y DC, aporta información sobre la estabilidad de la estructura proteica. Esta técnica se destaca por sobre las recién nombradas ya que permite, a partir del valor de  $T_m$ , determinar si la interacción del PE con la proteína estabiliza o no la conformación nativa de la misma.

### 1.7.5.1. Equipamiento y experimentación.

El equipo con el cual se trabaja en DSC se denomina *calorímetro diferencial de barrido* y consta básicamente de dos celdas con forma de moneda (una de muestra y otra de referencia) rodeadas por una camisa adiabática (figura 1.18).

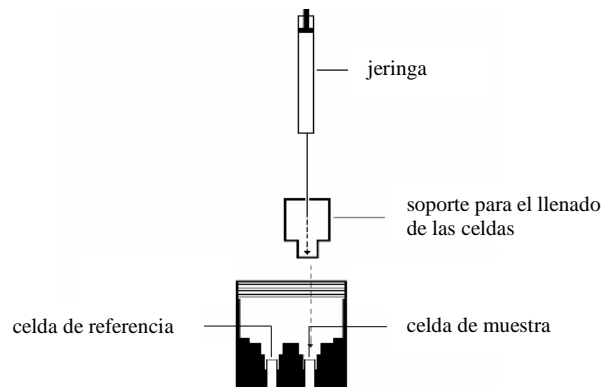


Figura 1.18: esquema básico de un calorímetro *MicroCal VP-DSC* [112].

En la celda de referencia se coloca agua milli-Q o buffer mientras que en la de muestra se coloca una solución de la macromolécula preparada en agua o buffer. En un experimento típico de DSC la temperatura del sistema aumenta en un rango y a una velocidad establecidos por el usuario mientras se registra de forma continua la capacidad calorífica aparente de la solución de proteína.

El funcionamiento del equipo es similar al del calorímetro para ITC: si bien en este caso la temperatura de trabajo varía a lo largo de todo el experimento; la misma se calibra con la potencia que se le otorga a la celda y se monitorea la variación de potencia durante todo el experimento.

Durante una transición endotérmica, la temperatura de la celda de muestra cae por debajo de la de referencia debido a que parte de la energía suministrada se utiliza para inducir la desnaturalización de la proteína en vez de para calentar la celda. Esto provoca el suministro adicional de potencia a la celda de muestra para igualar la temperatura de la celda de referencia. Este aporte de energía es proporcional a la energía necesaria para provocar la transición.

Los datos experimentales se presentan en un gráfico de capacidad calorífica vs. temperatura llamado *termograma* (figura 1.19), el cual generalmente está caracterizado por un pico de absorción de calor correspondiente a un proceso o transición térmicamente inducida.

### 1.7.5.2. Termograma.

Por lo general, el termograma de DSC de una proteína es una curva que contiene un pico endotérmico (figura 1.19) que se debe a la absorción de calor asociado a la transición en estudio (en el caso de algunas proteínas se obtienen varios picos asociados a la desnaturalización de distintos dominios intramoleculares).

Los valores de la señal en la zona de pre-transición y post-transición corresponden respectivamente a las capacidades caloríficas de los estados nativo y desnaturalizado de la proteína.

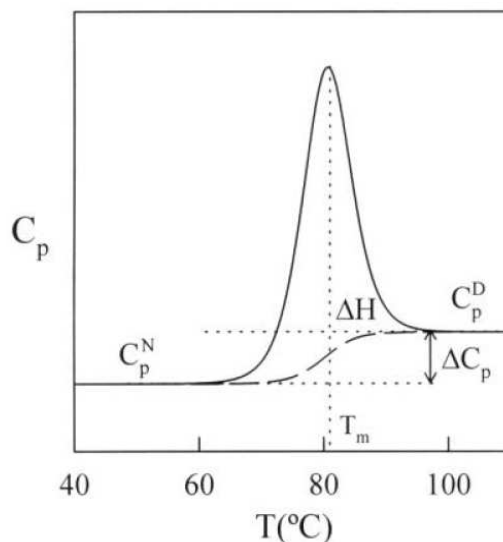


Figura 1.19: curva de capacidad calorífica en función de la temperatura para la desnaturalización térmica de una proteína hipotética [100].

A partir del termograma se pueden obtener ciertos parámetros termodinámicos significativos de la transición calorimétrica como la entalpía de transición ( $\Delta H_{cal}$ ) que es independiente de la naturaleza de la transición y se puede calcular a partir de la siguiente ecuación 1.21:

$$\Delta H_{cal} = \int C_p \Delta T \quad 1.21$$

Así, se observa que el  $\Delta H_{cal}$  se corresponde con el área encerrada debajo de la curva del termograma. Además, se pueden determinar la temperatura del máximo de la transición ( $T_m$ ) y la variación de la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ) entre el estado nativo ( $C_p^N$ ) y el desnaturalizado ( $C_p^D$ ).

Es importante destacar que para realizar un análisis basado en la termodinámica de equilibrios, se debe comprobar la reversibilidad de la transición efectuando barridos sucesivos y observando cómo se modifica el termograma: la ausencia de un pico a partir del segundo barrido indicaría que la transición observada no transcurre en equilibrio termodinámico. Por lo tanto, la información que se puede obtener de un experimento de DSC es diferente cuando el proceso está en equilibrio durante todo el barrido de temperatura o está controlado cinéticamente [109, 110, 113, 114].

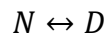
Existen dos modelos ampliamente utilizados para el análisis termodinámico de los datos: los modelos de *equilibrio de dos estados* y *de más de dos estados* y un modelo para el análisis cinético de los mismos (modelo de *Lumry y Eyring*). En este último, la desnaturalización de la proteína está gobernada por la velocidad de reacción y no por la termodinámica.

A continuación se explican los modelos de equilibrio para el análisis de los termogramas de DSC.

### 1.7.5.3. Modelo de equilibrio de dos estados.

Para algunas proteínas globulares pequeñas tales como la ribonucleasa A pancreática, la lisozima de clara de huevo de gallina, la nucleasa estafilocócica, la mioglobina y el citocromo C [115, 116] se ha observado que en el proceso de desplegamiento existen únicamente dos estados significativamente poblados: el estado nativo (*N*), con una estructura plegada y el estado desnaturalizado o desplegado (*D*).

Desde el punto de vista termodinámico-estadístico, estos estados *N* y *D* son en realidad dos macroestados formados cada uno de ellos por una multitud de microestados que difieren muy poco en sus entalpías. El desplegamiento de estas proteínas puede describirse cuantitativamente mediante el llamado modelo de equilibrio de dos estados, que se puede esquematizar de la siguiente forma:



Los dos estados *N* y *D* se encuentran en equilibrio en todo momento. La constante de equilibrio aparente ( $K_D$ ) viene dada por:

$$K_D = \frac{[D]}{[N]} \quad 1.22$$

y la fracción de proteína que se encuentra en el estado *D* ( $x_D$ ) será:

$$x_D = \frac{[D]}{[N]+[D]} = \frac{K_D}{1+K_D} \quad 1.23$$

Para este tipo de procesos, el calor absorbido a una temperatura determinada es proporcional al avance de la reacción. Por lo tanto, la constante de equilibrio a cada temperatura se puede obtener fácilmente a partir del termograma.

A partir de la ecuación de van't Hoff se puede calcular el cambio de entalpía ( $\Delta H_{VH}$ ) correspondiente al proceso como:

$$\left(\frac{d \ln K_D}{dT}\right)_P = \frac{\Delta H_{VH}}{RT^2} \quad 1.24$$

donde  $\Delta H_{VH}$  se denomina entalpía de van't Hoff.

Si el proceso es efectivamente un equilibrio entre dos estados, los valores de ambas entalpías ( $\Delta H_{cal}$  y  $\Delta H_{VH}$ ) deben ser idénticos. Si existe cooperatividad intermolecular entonces el  $\Delta H_{VH}$  es mayor al  $\Delta H_{cal}$  aunque el proceso siga siendo de equilibrio. Por otro lado, si el  $\Delta H_{VH}$  es menor al  $\Delta H_{cal}$ , el proceso de equilibrio no es de dos estados y por lo tanto existen uno o más intermediarios termodinámicamente estables significativamente poblados. Esta situación corresponde normalmente al caso en que ciertas regiones de la proteína (o dominios cooperativos) se desnaturalizan independientemente uno del otro.

Conociendo estos parámetros, se pueden calcular la variación de energía libre estándar ( $\Delta G^\circ$ ) y la variación de entropía estándar ( $\Delta S^\circ$ ) de la transición  $N \rightarrow D$  a partir de las ecuaciones termodinámicas 1.25 y 1.26:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_D \quad 1.25$$

$$\Delta S^\circ = -\left(\frac{\partial \Delta G^\circ}{\partial T}\right) \quad 1.26$$

#### 1.7.5.4. Modelo de equilibrio entre más de dos estados.

Se han encontrado una gran cantidad de proteínas, especialmente las más complejas, para las que el modelo de dos estados no es válido. Esto puede deberse a: **i)** una población apreciable de estados intermedios de plegamiento en equilibrio con los estados N y D [117], **ii)** cambios en el grado de asociación de la proteína concomitantes con su desplegamiento o **iii)** ambas situaciones simultáneamente [118, 119].

Se han propuesto varios modelos para explicar estos casos. El más antiguo y frecuentemente empleado es el modelo *secuencial*, que consiste en varios estados

consecutivos durante el proceso de desnaturalización. Los parámetros termodinámicos de cada estado se pueden calcular a partir del termograma por ajuste de mínimos cuadrados no lineales hasta obtener las constantes de equilibrio, fracción de moléculas en cada estado, cambios de entalpía y cualquiera otra función relacionada con ellos.

Otro modelo es el de *transiciones independientes* el cual supone que la desnaturalización de cada dominio es independiente uno del otro [100].

### 1.6.6. Dispersión dinámica de la luz (DLS).

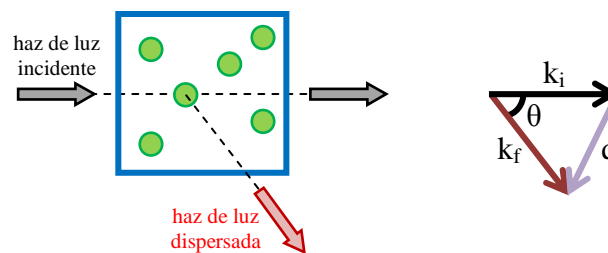
La DLS (del inglés, *Dynamic Light Scattering*) es una técnica no destructiva basada en la dispersión de luz provocada por las partículas en solución, que permite determinar el tamaño de las mismas a partir de su coeficiente de difusión traslacional ( $D_{dif}$ ) [120]. Este coeficiente puede relacionarse con el radio hidrodinámico ( $R_h$ ) de una partícula a través de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_{dif} = \frac{k_b T}{6 \pi \eta R_h} \quad 1.26$$

donde  $k_b$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura y  $\eta$  es la viscosidad del medio. El radio hidrodinámico se define como el radio de una esfera impenetrable.

#### 1.6.6.1. Fundamentos de la DLS.

Las partículas en solución desvían la dirección de un haz de luz incidente como se muestra en la figura 1.20.



*Figura 1.20: fenómeno de dispersión de la luz.  $k_i$  y  $k_f$  son los vectores de onda incidente y dispersada, respectivamente;  $\theta$  es el ángulo al cual se mide la intensidad de la luz dispersada.*

Se define el vector  $q$  que resulta de la diferencia entre los vectores  $k_i$  y  $k_f$  [121].

La magnitud del vector  $q$  se relaciona con la longitud de onda ( $\lambda$ ) y el ángulo de dispersión ( $\theta$ ) a partir de la ecuación 1.27:

$$q = \frac{4 \pi i \sin(\theta/2)}{\lambda} \quad 1.27$$

donde  $i$  es el índice de refracción del medio.

Como las partículas dispersantes se encuentran en constante movimiento browniano, este vector varía en el tiempo lo cual genera diferentes patrones de luz dispersada que pueden describirse a partir de dos funciones de correlación:

- $g_1(\mathbf{q}, \tau)$ : función de correlación del campo magnético de la luz dispersada que describe la correlación con el movimiento de cada partícula.
- $g_2(\mathbf{q}, \tau)$ : función de correlación de la intensidad de la luz dispersada que describe los cambios en la intensidad de la luz dispersada.

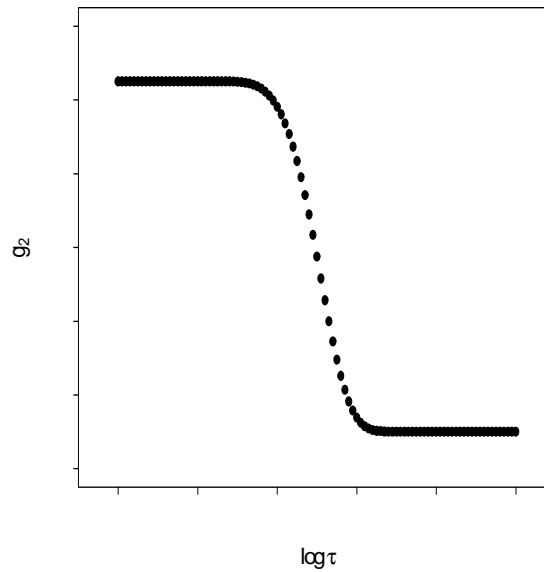
Ambas funciones se relacionan entre sí a través de la relación Siegert, para lograr corresponder la intensidad de la luz dispersada con el movimiento de las partículas [122]:

$$g_2(q, \tau) = B (1 + \beta |g_1(q, \tau)|^2) \quad 1.28$$

donde  $B$  es un término relacionado con la línea base del equipo,  $\beta$  es una constante del equipo y  $\tau$  se denomina tiempo de decaimiento.

La relación entre la función de correlación  $g_2$  y el tiempo de decaimiento se representa en una curva de  $g_2$  vs  $\log \tau$  como la que se muestra en la figura 1.21.

A medida que las partículas se mueven, la correlación que existe entre la intensidad de la luz dispersada y el movimiento de las mismas desaparece, con una consecuente disminución del valor de la función  $g_2$ . El tiempo necesario para que se pierda totalmente la correlación es el tiempo de decaimiento. Mientras mayor sea el tamaño de la partícula, más lentamente se moverá y por ende, mayor será el tiempo de decaimiento.

Figura 1.21: gráfico de  $g_2$  vs  $\log \tau$ .

La curva de la figura 1.21 es representativa de un experimento típico de DLS. El perfil de decaimiento observado resulta de la contribución de los decaimientos de las partículas individuales presentes en la muestra. El tratamiento estadístico y matemático de la función de correlación  $g_2$  permite relacionar  $\tau$  con  $D_{dif}$  a través de la ecuación 1.29:

$$D_{dif} = \frac{1}{q^2 \times \tau} \quad 1.29$$

Finalmente, la ecuación 1.29 permite determinar el radio hidrodinámico de las partículas utilizando el coeficiente de difusión correspondiente a cada una de ellas.

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

En este proyecto se analiza la capacidad de ciertos polielectrolitos de formar complejos con tripsina como punto de partida para aplicar este sistema al desarrollo de procesos de biotecnológicos de importancia industrial.

La hipótesis general de trabajo se basa en utilizar la capacidad de diferentes polielectrolitos de formar complejos insolubles con tripsina, los cuales son fácilmente separados del resto del sistema, y luego disociar la proteína del polielectrolito de manera de recuperarla conservando su actividad biológica intacta.

La enzima posee una vasta aplicación en diferentes procesos de fabricación de cerveza, medicamentos y alimentos.

Los polielectrolitos seleccionados son naturales y sintéticos de bajo impacto ambiental: Eudragit<sup>®</sup> aniónicos (L-100 y S-100) y alginato.

### 2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

El objetivo general del trabajo se logrará a partir de los siguientes objetivos parciales:

- Analizar el efecto de variables experimentales del medio (pH, fuerza iónica, sales, temperatura, peso molecular de los polielectrolitos, etc.) que condicionan la formación de complejos insolubles entre las proteínas de interés y diferentes polielectrolitos de manera de obtener información de las fuerzas intermoleculares que participan en la formación de estos complejos.
- Analizar estabilidad termodinámica de la enzima cuando forma parte del complejo con el polielectrolito y ensayar la influencia de estos polímeros como agentes estabilizantes en el almacenamiento de la enzima purificada en solución.
- Estudiar el proceso de disociación de la macromolécula de interés por parte del complejo polielectrolito-proteína.
- Determinar las mejores condiciones que permiten recuperar a la enzima del complejo insoluble polielectrolito-enzima.
- Evaluar las potenciales aplicaciones biotecnológicas de estos complejos: purificación, estabilización, inmovilización.

### 3.1.1. Reactivos.

#### a) Enzimas.

- *Tripsina de páncreas porcino (TRP)*: tipo IX-S, adquirida a Sigma Chem. Co. (USA). Droga sólida en forma de polvo liofilizado con actividad enzimática de 13.000-20.000 unidades de BAEE/mg proteína. Presenta una actividad de  $\alpha$ -quimotripsina inferior a 1,0 unidad de BTEE/mg de proteína.

#### b) Polímeros.

- *Eudragit<sup>®</sup> L100 (EL100)* y *Eudragit<sup>®</sup> S100 (ES100)*: Drogas sólidas en forma de polvo finamente particulado, provistas por EtilFarma S.A. Los estudios de pureza muestran un contenido de monómeros inferior a 500 ppm para ambos polímeros.
- *Alginato de sodio de alga marrón (ALG)*: adquirida a Sigma Chem. Co. (USA). Droga sólida en forma de polvo que en soluciones de 1% en agua destilada presenta una viscosidad de 200-400 cP a 25 °C (viscosidad media).

#### c) Sales.

- *Citrato de Sodio trihidrato (cit)*: adquirido a Reagents S.A. (línea Cicarelli). Droga sólida en forma cristalina, calidad pro-análisis, con una pureza superior a 99,0%.
- *Sigma 7-9<sup>®</sup> (TRIS)*: adquirido a Sigma Chem. Co. (USA). Droga sólida en forma cristalina con una pureza superior a 99,0%.
- *NaCl*: adquirido a Reagents S.A. (línea Cicarelli). Droga sólida en forma cristalina, calidad pro-análisis, con una pureza superior a 99,0%.
- *CaCl<sub>2</sub> dihidrato*: adquirido a Reagents S.A. (línea Cicarelli). Droga sólida en forma cristalina, calidad pro-análisis, con una pureza de 99,0-105,0%.

#### d) Sustrato de TRP.

- *N $\alpha$ -benzoil-DL-arginil p-nitroanilida (BAPNA)*: adquirido a Sigma Chem. Co. (USA). Droga sólida en forma de polvo, con una pureza superior a 98%.

#### e) Otros.

- *NaOH*: adquirido a Reagents S.A. (línea Cicarelli). Droga sólida en forma de perlas, calidad pro-análisis, con una pureza superior a 97,0%.
- *HCl*: adquirido a Sigma Chem. Co. (USA). Droga líquida, calidad ACS reagent, con una concentración 36,5-38,0% P/P y una densidad de 1,2 g/ml a 25 °C.

- *Dimetilsulfóxido (DMSO)*: adquirido a Sigma Chem. Co. (USA). Droga líquida con una concentración 50% P/P y una densidad de 1,069 g/ml a 25 °C
- *Páncreas porcino*: donado por frigorífico “Las Heras”, Capital Federal, Buenos Aires.

#### 3.1.2. Soluciones.

a) *TRP 1 mM*: preparada por pesada directa de la droga sólida y posterior dilución en HCl 1 mM. La solución se almacenó a -18 °C.

b) *EL100 0,18 mM; ES100 0,18 mM; ALG 0,30 %P/V y 3,00 %P/V*: cada solución se preparó por pesada directa de la droga sólida de EL100, ES100 y ALG, respectivamente y dilución en buffer cit/TRIS 50/50 mM. Posteriormente, trabajando con agitación constante, se hicieron agregados de NaOH en granallas hasta disolución total del polímero. Finalmente, las soluciones se llevaron a volumen final con buffer. Las soluciones se almacenaron a 8 °C. La concentración de ALG se expresa en %P/V debido a que las soluciones de este polímero son polidispersas.

c) *Soluciones buffer TRIS 100 mM; cit/TRIS 50/50 mM*: cada solución se preparó por pesada directa de la droga sólida de citrato y TRIS, respectivamente y dilución en agua destilada. Posteriormente, trabajando con agitación constante, se hicieron agregados de NaOH en granallas o HCl acuoso 37% hasta alcanzar el pH deseado. Finalmente, las soluciones se llevaron a volumen final con agua destilada y se almacenaron a 8 °C.

También se prepararon soluciones buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00 con NaCl 1,00 M y TRIS 100 mM pH 8,20 con CaCl<sub>2</sub> 200 mM por pesada directa de cada droga sólida; dilución con agua destilada y posterior agregado de HCl o NaOH para alcanzar el pH deseado. Soluciones buffer cit/TRIS 50/50 mM NaCl 0,25 M y 0,50 M se prepararon por dilución del buffer NaCl 1 M con buffer sin NaCl al mismo pH.

d) *BAPNA*: la solución madre se preparó por pesada directa de 100 mg de la droga sólida, dilución en 2,30 ml de DMSO y se almacenó a -18 °C. Las soluciones de trabajo se prepararon al momento de realizar las medidas de actividad enzimática diluyendo 100 veces la solución madre en buffer TRIS 100 mM CaCl<sub>2</sub> 200 mM pH 8,20.

### 3.1.3. Equipamiento.

a) Espectrofotómetro Jasco V-530: equipo de doble haz con lámparas de deuterio y de tungsteno que permiten trabajar en un rango de longitudes de onda de 190-1100 nm. El monocromador posee un ancho de banda de 2 nm y una exactitud de  $\pm 0,3$  nm. La velocidad de barrido abarca un rango de 40-8000  $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ . El rango fotométrico varía desde -2,000 a 3,000 Abs (0 a 200 %T).

b) Espectrofotómetro BOECO S-20: equipo de simple haz con una lámpara de tungsteno que permite trabajar en un rango de longitudes de onda de 320-1100 nm. El monocromador posee un ancho de banda de 8 nm y una exactitud de  $\pm 2$  nm. El rango fotométrico varía desde -0,300 a 1,999 Abs (0 a 199,9 %T).

c) Espectropolarímetro Jasco 810, equipo con lámpara de xenón que permite trabajar en un rango de longitudes de onda de 163-990 nm. El monocromador posee un ancho de banda de 2 nm y una velocidad de barrido de 10-100  $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ . Está provisto con un peltier que permite trabajar en un rango de temperatura de 4 - 110 °C.

d) pHmetro BOECO BT-600: rango de medición de pH desde -2,000 a 16,000 con una resolución de 0,001 y una apreciación de 0,005 unidades de pH.

e) Calorímetro MicroCal VP-ITC: equipo con dos celdas con forma de moneda: una de referencia de aproximadamente 1,5 ml donde se coloca agua milli-Q y otra para colocar la muestra (volumen de llenado: 1,8 ml; volumen de trabajo: 1,436 ml). El inyector puede cargar un volumen de 300  $\mu\text{l}$  y permite agitar la muestra a una velocidad de 0-800 rpm. El rango de temperaturas de trabajo es 2-80 °C. Además se pueden controlar las características de las inyecciones (número total, volumen, duración y espacio de tiempo entre inyecciones), la potencia de referencia (línea base), el tiempo inicial de estabilización de la potencia de referencia y la sensibilidad del aparato.

f) MicroCal VP-DSC: equipo con una celda de referencia y una de muestra con forma de moneda y un volumen de trabajo de 85  $\mu\text{l}$  (volumen de llenado: 500  $\mu\text{l}$ ). El rango de temperaturas de trabajo varía desde -10 a 130 °C y permite realizar rampas de temperatura ascendentes y descendentes. La velocidad de barrido es de 0-90 °C/h (rampas ascendentes)

y 0-60 °C/h (rampa descendente). La presión de trabajo puede seleccionarse desde 0 a 30 p.s.i. Al igual que en el VP-ITC, se puede controlar la potencia de referencia, el tiempo inicial de estabilización de la potencia de referencia y la sensibilidad del aparato.

g) Analizador de nanopartículas: consta de un goniómetro compacto modelo ALV/CGS-3 equipado con un láser He-Ne 22 mW que emite luz a una longitud de onda de 632,8 nm. El ángulo de detección de luz dispersada se puede variar entre 12° y 152° con una precisión de  $\pm 0,003^\circ$ . El correlacionador es modelo ALV 7004 multi-tau: cuenta con un número máximo de 312 canales, modo de correlación auto-cross y permite un tiempo de trabajo de 25 nanosegundos a 3435,9 segundos. El mínimo valor de radio hidrodinámico que se puede calcular es 5 nm. Se utilizó cis-decalina como líquido de emparejamiento del índice de refracción.

h) Sistema de cromatografía FPLC Pharmacia Biotech: consta de un controlador LCC-501 Plus, dos bombas PumpP-500; un mezclador de 24 V, 50-60 Hz y 5 MPa y una válvula de posicionamiento MV-7 IMV-7. Además posee monitores de conductividad y radiación UV a 280 nm y un recolector de fracciones automatizado FRAC-100. El equipo de FPLC es controlado con el software FPLC director<sup>TM</sup> de Pharmacia Biotech.

3.2.1. Estudio de la solubilidad de los PE.

3.2.1.1. Efecto del pH sobre la solubilidad de los PE.

Se prepararon soluciones de cada polímero en buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00 a tres concentraciones finales diferentes mostradas en la tabla 3.I.

**TABLA 3.I**

Concentración de PE		
EL100 ( $\mu\text{M}$ )	ES100 ( $\mu\text{M}$ )	ALG (% P/V)
3,70	3,70	0,14
6,67	6,67	0,22
12,59	12,59	0,32

El pH de estas soluciones se varió (trabajando con agitación permanente) desde 8,00 hasta 2,00 (desde 5,00 hasta 1,00 para la solución de ALG). Los cambios de pH fueron aproximadamente de 0,50 unidades por agregado de pequeñas alícuotas de HCl concentrado. Luego de cada agregado, se tomó 2,00 ml de la solución y se le midió la absorbancia a 420 nm (turbidez). La alícuota se devolvió al sistema antes del siguiente agregado. La figura 3.1 muestra el esquema de trabajo en esta experiencia.

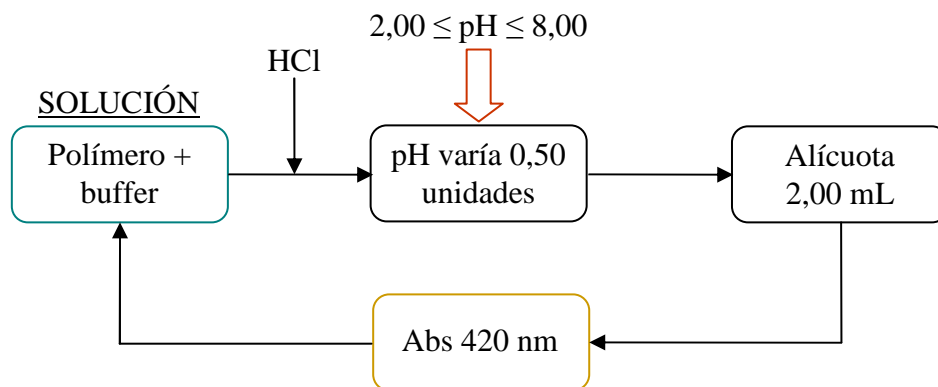


Figura 3.1: procedimiento para determinar la solubilidad de los polímeros.

Los datos recolectados permitieron obtener la curva de solubilidad de los polímeros (absorbancia a 420 nm vs. pH) y determinar los rangos de solubilidad e insolubilidad de cada polímero.

3.2.1.2. Efecto de la fuerza iónica sobre las curvas de solubilidad de los PE.

Se prepararon soluciones de EL100 1,12  $\mu\text{M}$ , ES100 1,12  $\mu\text{M}$  y ALG 0,22 g/L en buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00 en ausencia y en presencia de NaCl 0,25 M y 1,00 M (también 0,50 M para el ALG).

Se utilizó la misma metodología detallada en el apartado anterior para obtener las curvas de solubilidad de cada polímero a las distintas fuerzas iónicas del medio.

3.2.2. Estudio de la formación de los complejos insolubles PE-TRP por medidas de turbidez.

3.2.2.1. Efecto del pH sobre la formación de los complejos PE-TRP.

3.2.2.1.a) *pH inicial = 8,00*

Se prepararon soluciones de PE con distintas concentraciones de TRP en buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00 (tabla 3.II). A cada solución se le varió el pH y se le midió absorbancia a 420 nm como se explicó en el apartado 3.2.1.1. De esta manera se pudieron obtener las curvas de solubilidad de cada uno de los complejos PE-TRP y determinar los rangos de solubilidad e insolubilidad de los mismos. Paralelamente se realizó un control de la turbidez aportada por la TRP realizando un barrido de pH a una solución de TRP 45,5  $\mu\text{M}$ .

**TABLA 3.II**

<b>EL100 (3,70 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>ES100 (3,70 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>ALG (0,15% P/V)</b>
<i>relación TRP/EL100 (mol/mol)</i>	<i>relación TRP/ES100 (mol/mol)</i>	<i>relación TRP/ALG (<math>\mu\text{mol/g}</math>)</i>
sin TRP	sin TRP	sin TRP
2,40	2,40	19,71
4,81	4,81	25,21
12,00	12,00	31,51

3.2.2.1.b) *pH inicial = 3,50*

Se prepararon soluciones de PE con distintas concentraciones de TRP en buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 3,50. Las relaciones TRP/PE son las mostradas en la tabla 3.II.

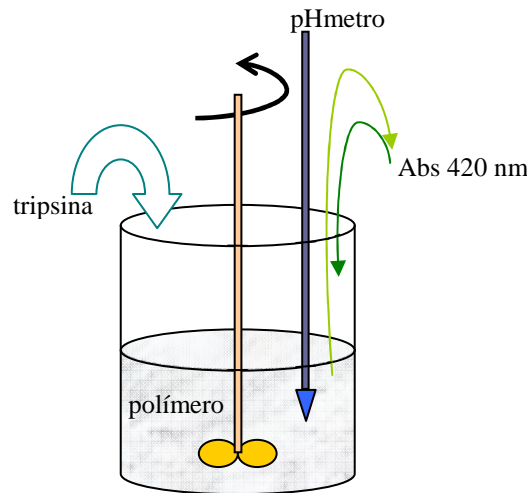
Cada solución se dividió en 2 sistemas: a uno de ellos se le varió el pH desde 3,50 a 2,00 por agregado de HCl concentrado; mientras que al otro se le varió el pH de

3,50 a 8,00 por agregado de una solución concentrada de NaOH. En ambos casos, la variación de pH fue de 0,50 unidades. Luego de cada agregado, se tomó 2,00 ml del sistema y se le midió la absorbancia a 420 nm. La alícuota se devolvió al sistema antes del siguiente agregado. Las curvas de solubilidad se obtuvieron graficando absorbancia a 420 nm vs. pH. También se realizó un control de TRP.

3.2.2.2. Efecto de la concentración de TRP sobre la formación de complejos PE-TRP.

Este estudio se llevó a cabo por titulación turbidimétrica de cada PE con TRP.

La figura 3.2 muestra el sistema utilizado el cual consiste en un vaso de precipitado conteniendo una solución de PE preparada en buffer cit/TRIS 50/50 mM a diferentes pHs (tabla 3.III). Trabajando con agitación permanente, se hicieron agregados de 10 µl de una solución de TRP 1,00 mM pH 3,00. Luego de cada agregado se tomó una alícuota y se midió la absorbancia a 420 nm. Finalmente, la alícuota se devolvió al sistema y se prosiguió con el siguiente agregado de TRP. La turbidez que aportarían los PE en algunos pH fue restada a cada valor de turbidez medido.



*Figura 3.2: esquema del sistema para la titulación turbidimétrica.*

**TABLA 3.III**

	<b>EL100 0,46 µM</b>	<b>ES100 0,46 µM</b>	<b>ALG 0,004 %P/V</b>
<b>pH</b>	4,00	5,00	3,00
	4,50	5,50	3,50
	5,00		

Se confeccionaron las isotermas de titulación correspondientes graficando absorbancia a 420 nm vs. relación TRP/PE. Las concentraciones de TRP y polímero en el sistema fueron recalculadas a partir de la dilución generada por el agregado de la alícuota de proteína.

La estequiometría del complejo (*e*) correspondiente a isotermas con forma sigmoidea o hiperbólica se calculó gráficamente, según se muestra en las figuras 3.3 (a) y (b). Para el caso de isotermas que presentan un máximo de turbidez, estequiometría del complejo se determinó como la relación TRP/PE a la que se observó dicho máximo.

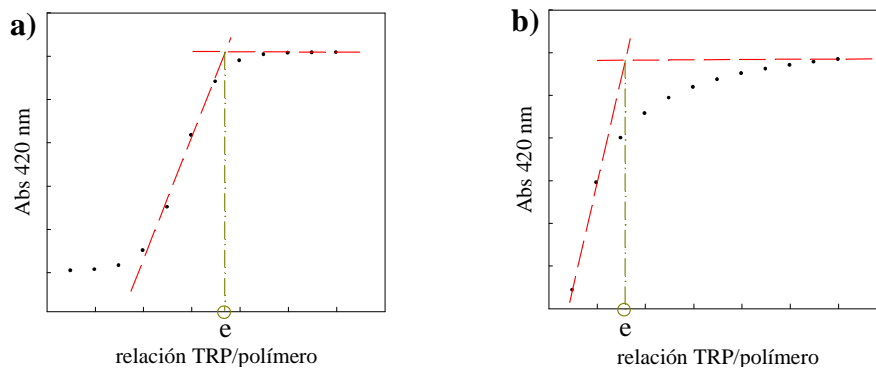


Figura 3.3: determinación de la relación TRP/polímero cuando se alcanza la saturación en un gráfico a) sigmoideo y b) hiperbólico.

#### 3.2.2.3. Efecto de la fuerza iónica sobre la formación de los complejos PE-TRP.

Se realizó una titulación turbidimétrica de cada polímero con TRP 1,00 mM, en ausencia de NaCl y en presencia de NaCl 0,25 M en el medio. Las soluciones se prepararon en buffer cit/TRIS 50/50 mM al pH en el cual se determinó la estequiometría del complejo en las gráficas obtenidas en el apartado 3.2.2.2. La metodología de trabajo es igual a la descrita en el mismo apartado.

#### 3.2.2.4. Cinética de formación de los complejos PE-TRP.

Se prepararon soluciones de polímero en buffer cit/TRIS 50/50 mM al pH en el cual se determinó la estequiometría del complejo en las isotermas de titulación turbidimétrica. En cada solución se agregó una alícuota de TRP 1,00 mM y se midió absorbancia a 420 nm a través del tiempo durante 5 minutos. Luego se graficó absorbancia a 420 nm vs. tiempo y se determinó el tiempo al cual el sistema comenzó a saturarse. Además, cada complejo PE-TRP se ensayó a diferentes relaciones

TRP/polímero (tabla 3.IV) para analizar el efecto de la concentración de TRP sobre la cinética de formación del complejo insoluble.

**TABLA 3.IV**

<b>TRP 0,11 mM</b>		<b>TRP 0,04 mM</b>
<i>relación TRP/EL100 (mol/mol)</i>	<i>relación TRP/ES100 (mol/mol)</i>	<i>relación TRP/ALG (<math>\mu</math>mol/g)</i>
3,23	3,23	170
5,39	5,39	220
8,09	8,09	330
16,18	16,18	660
32,35	32,35	4000

**3.2.3. Estudio de la formación de los complejos insolubles PE-TRP por ITC.**

En la celda de muestra se colocó una solución de TRP 0,30 mM (0,10 mM para el estudio del complejo ALG-TRP) preparada en buffer cit/TRIS 50/50 mM a distintos pHs: de estequiometría de complejo en ausencia y presencia de NaCl 1,00 M y pH 8,00.

En el inyector se colocó la solución de polímero preparada con el mismo buffer que la solución de proteína. Se trabajó con soluciones de EL100 0,13 mM; ES100 0,06 mM y 0,13 mM y ALG 0,50 % P/V.

El equipo se termostató a 25 °C durante toda la experiencia. Se realizaron 54 agregados de 5  $\mu$ L de la solución de polímero cada 5 minutos. Cada agregado duró 10 segundos y la velocidad de agitación fue 307 rpm. Luego de cada agregado, el calorímetro midió la potencia necesaria para compensar la variación de temperatura a causa de la liberación o consumo de calor por la interacción del polímero con la TRP.

Los blancos del experimento se realizaron colocando: 1.- *blanco de polímero*: celda: solución buffer; inyector: solución de polímero y 2.- *blanco de TRP*: celda: solución de TRP 0,30 mM; inyector: solución buffer. Ambos permitieron determinar el calor de disolución del polímero y de dilución de la TRP y restarlos del calor medido.

A partir de los datos de  $\Delta H$  (cal/mol de inyectante) vs. relación molar polímero/proteína se calcularon la relación polímero/TRP (n/n), la constante de afinidad intrínseca (k) (ecuación 1.20) y las funciones termodinámicas  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  y  $\Delta G^\circ$ .

**3.2.4. Estudio de la formación de los complejos insolubles PE-TRP por medidas de dispersión de luz.**

El tamaño de los complejos PE-TRP en diferentes condiciones del medio, como así el de los polímeros, se estudió por medidas de DLS.

Se prepararon soluciones de TRP, polímero y complejo PE-TRP en buffer cit/TRIS 50/50 mM al pH y las relaciones molares mostradas en la tabla 3.V.

**TABLA 3.V**

Sistema	pH del medio	[TRP] (μM)	[PE]	Relación TRP/PE
<i>EL100</i>	3,50	--	0,09 μM	--
	5,00		18,52 μM	
	8,00		37,03 μM	
<i>ES100</i>	3,50	--	0,09 μM	--
	5,50		18,52 μM	
	8,00		21,79 μM	
<i>ALG</i>	3,50	--	0,30% P/V	--
	8,00		0,08% P/V	
<i>TRP</i>	3,50	6,98	--	--
	8,00	9,09		
<i>EL100-TRP</i>	5,00	1	0,185 μM	5,40 moles TRP/mol EL100
	8,00	100	18,52 μM	
<i>ES100-TRP</i>	5,50	1	0,28 μM	3,60 moles TRP/mol ES100
	5,50 NaCl 1 M	100	27,78 μM	
	8,00	100	27,78 μM	
<i>ALG-TRP</i>	3,50	0,50	2,25 mg/L	222,22 μmoles TRP/g ALG
	3,50 NaCl 1 M	66,67	0,03% P/V	
	8,00	66,67	0,03% P/V	

La temperatura de trabajo fue de 298,05097 K y la viscosidad e índice de refracción de la solución se estandarizaron en 0,89222 cP y 1,33200, respectivamente para todos los sistemas. La longitud de onda del láser incidiendo sobre la muestra fue 632,80000 nm y el ángulo de medida de la luz dispersada fue 90°. Cada experimento duró 300 segundos y se realizó por cuatuplicado.

Se usó el software GENDIST (GenR 94 v. 4.0) para llevar a cabo la transformada de Laplace invertida no regularizada usando el algoritmo REPES (del inglés, *Regularized Positive Exponential Sum Program*).

Los datos de tiempo de decaimiento ( $\tau$  en ms) obtenidos permitieron calcular el coeficiente de difusión de las partículas en la muestra utilizando la ecuación 1.29 y, a partir de estos valores, el radio hidrodinámico de las partículas presentes en cada sistema aplicando la ecuación 1.26.

**3.2.5. Análisis conformacional de la TRP.**

3.2.5.1. Espectros de absorción UV-visible de TRP en ausencia y presencia de PE.

Se llevaron a cabo los espectros de absorción de la enzima entre 250-400 nm en medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH de máxima cantidad de complejo insoluble formado; en ausencia y presencia de distintas concentraciones de cada PE (tabla 3.VI).

**TABLA 3.VI**

<b>TRP 14 <math>\mu</math>M (EL100; ES100) – 11 <math>\mu</math>M (ALG)</b>		
<b>Relación TRP/PE</b>	<i>EL100</i> (mol/mol)	sin EL100 - 3,25 - 5,42 - 8,08 - 16,21 - 32,46
	<i>ES100</i> (mol/mol)	sin ES100 - 3,25 - 5,42 - 8,08 - 16,21 - 32,46
	<i>ALG</i> ( $\mu$ mol/g)	sin ALG - 235,30 - 333,33 - 689,66 - 3333,33

A cada espectro se le realizó la **corrección por turbidez** [123] como se explica a continuación. Primero se graficó logaritmo de la absorbancia vs. logaritmo de la longitud de onda ( $\lambda$ ) para la porción del espectro correspondiente a altas longitudes de onda donde no absorbe la muestra y los valores de absorbancia medidos se deben únicamente a la turbidez. Estos datos se ajustaron a una recta representada por la siguiente ecuación,

$$\log Abs = m \times \log \lambda + h \tag{3.1}$$

A partir de esta ecuación se recalcularon todos los valores de absorbancia del espectro y se los graficó vs. longitud de onda. Finalmente, al espectro original se le restó el espectro recalculado (figura 3.6).

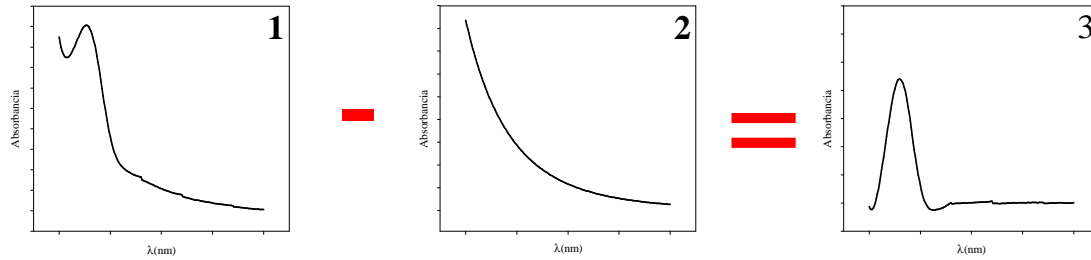


Figura 3.6: corrección por turbidez del espectro de absorción de proteínas. 1) Espectro original, 2) Espectro calculado a partir de la absorbancia corregida, 3) Espectro final.

### 3.2.5.2. Espectros de dicroísmo circular de TRP en ausencia y presencia de PE.

Se prepararon soluciones de TRP 5,00  $\mu\text{M}$  en buffer Pi 50 mM a pH 3,50 y pH de formación de los complejos EL100-TRP (5,00) y ES100-TRP (5,50). Esta experiencia no pudo realizarse con ALG debido a que la muestra era muy turbia y la señal de voltaje aumentaba por encima de 500 mV.

A cada solución se le agregó consecutivamente alícuotas de EL100 o ES100 37,03  $\mu\text{M}$ . Las relaciones molares TRP/PE de trabajo se muestran en la tabla 3.VII.

TABLA 3.VII

Vol. EL100/ES100 ( $\mu\text{l}$ )	Relación TRP/EL100 (mol/mol)	Relación TRP/ES100 (mol/mol)
0	--	--
5	68,50	68,50
15	33,33	33,33
25	13,51	13,51

Se midió la elipticidad de la TRP en ausencia y luego de cada agregado de polímero abarcando un rango de longitudes de onda de 260-200 nm y termostaticando a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Se realizaron seis acumulaciones por cada espectro.

Finalmente, se calculó la elipticidad molar ( $[\theta]$ ) y se obtuvieron los espectros de DC para cada sistema graficándola vs. longitud de onda a partir de los cuales se evaluaron cambios estructurales en la TRP.

3.2.5.3. Estudio de la estabilidad estructural de la TRP por medidas de calorimetría.

Se estudió la estabilidad térmica de la TRP en ausencia y presencia de EL100 y ES100 por DSC para determinar la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ), el  $\Delta H$  involucrado en la transición y el modelo de desnaturalización térmica de la enzima.

Para este estudio se prepararon soluciones de TRP en ausencia y presencia de cada uno de los polímeros en buffer cit/TRIS 50/50 mM. Las condiciones de trabajo se detallan en la tabla 3.VIII.

**TABLA 3.VIII**

	TRP 0,3 mM		
	sin PE	EL100	ES100
<b>pH de trabajo</b>	3,00		
	5,00	5,00	5,50
	8,00	8,00	8,00
<b>Relación molar TRP/PE</b>	--	10,86	
<b>Rango de T (°C)</b>	25 – 85		
<b>Velocidad de barrido (°C/h)</b>	60		
<b>Presión de trabajo (p.s.i.)</b>	28,00		

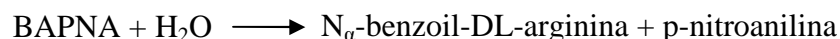
Los datos experimentales se procesaron con el programa MicroCal Origin 7.0. Se obtuvieron las curvas de  $C_p$  vs. temperatura y se determinaron los parámetros necesarios para caracterizar la desnaturalización térmica de la TRP.

**3.2.6. Análisis de la actividad catalítica de la TRP.**

3.2.6.1. Método de medición de actividad.

La actividad catalítica de la enzima fue determinada usando el *Método de Gildberg y Overbo* modificado [124].

Este método se basa en la capacidad que presenta la TRP de hidrolizar específicamente el sustrato cromogénico BAPNA de acuerdo a la siguiente reacción:



El seguimiento de la reacción se realizó espectrofotométricamente, midiendo absorbancia a 400 nm ( $\lambda_{\text{max}}$  absorción de la p-nitroanilina; coeficiente de extinción molar  $\epsilon = 18,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a través del tiempo. La reacción se llevó a cabo en medio

buffer TRIS 100 mM pH 8,20 CaCl<sub>2</sub> 200 mM y se trabajó en condiciones saturantes del sustrato durante el ensayo.

Finalmente, se graficó absorbancia a 400 nm vs. tiempo y se obtuvo una recta cuya pendiente es una medida directa de la actividad de la enzima.

**3.2.6.2. Análisis de la actividad de TRP en presencia de cada PE.**

Se prepararon soluciones de TRP en buffer cit/TRIS 50/50 mM a diferentes pH y concentraciones de cada polímero (tabla 3.IX). Los experimentos se realizaron a relación TRP-sustrato constante y variando la relación TRP/polímero.

Se extrajo una alícuota de 10 µL (EL100 y ES100) o 20 µL (ALG) de cada solución, se la agregó en 2,00 mL de BAPNA preparado con buffer TRIS 100 mM pH 8,20 CaCl<sub>2</sub> 200 mM y se le midió absorbancia a 400 nm durante 90 segundos. Finalmente, se graficó absorbancia a 400 nm vs. tiempo y se ajustaron los puntos experimentales a la ecuación de una recta. La pendiente de dicha recta es proporcional a la actividad catalítica del enzima.

**TABLA 3.IX**

<b>Condiciones de trabajo</b>			
	<i>[TRP] (mM)</i>	<i>pH del medio</i>	<i>Relaciones TRP/PE</i>
<i>EL100</i>	0,11	5,00	3,25; 5,42; 8,08; 16,21; 32,46 moles TRP/mol EL100
<i>ES100</i>		5,50	3,25; 5,42; 8,08; 16,21; 32,46 moles TRP/mol ES100
<i>ALG</i>	0,04	3,50	170; 220; 330; 660; 4000 µmoles TRP/g ALG

**3.2.6.3. Análisis de la estabilidad de TRP a través del tiempo por medidas de actividad.**

Se trabajó con soluciones de TRP en ausencia de PE, en presencia PE y con el complejo TRP-PE precipitado (sin redisolver). Las soluciones se prepararon en buffer cit/TRIS 50/50 mM a un pH y relación molar que asegurase la máxima cantidad de complejo formado (tabla 3.X).

**TABLA 3.X**

	Condiciones de trabajo		
	[TRP] (mM)	pH del medio	Relación TRP/PE
<i>EL100</i>	0,11	5,00	8,08 moles TRP/mol EL100
<i>ES100</i>		5,50	5,35 moles TRP/mol ES100
<i>ALG</i>	0,04	3,50	222,32 $\mu$ moles TRP/g ALG

La metodología de trabajo se esquematiza en la figura 3.7.

Cada sistema se incubó a una temperatura de 25 °C. A distintos tiempos se tomaron alícuotas y se les midió actividad de TRP (absorbancia a 400 nm durante 90 segundos) por el Método de Gildberg y Overbo modificado. Luego se graficó absorbancia a 400 nm vs. tiempo y se comparó la actividad enzimática a cada tiempo de incubación para estudiar la estabilidad de la TRP.

El complejo PE-TRP precipitado se obtuvo de la siguiente manera:

- 1.- se prepararon tres soluciones de TRP con cada polímero en buffer cit/TRIS 50/50 mM al pH y relaciones TRP/polímero descritas en la tabla 3.X.
- 2.- cada solución se dividió en 6 sistemas que se incubaron 10 minutos a 25 °C.
- 3.- se centrifugaron 10 minutos a 3500 rpm.
- 4.- se separaron precipitado y sobrenadante.

Los 6 precipitados obtenidos son los sistemas iniciales de este estudio. A distintos tiempos de incubación, cada precipitado se redisolvió en buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00 NaCl 1,00 M, se les tomó una alícuota y se le midió actividad como se explicó anteriormente.

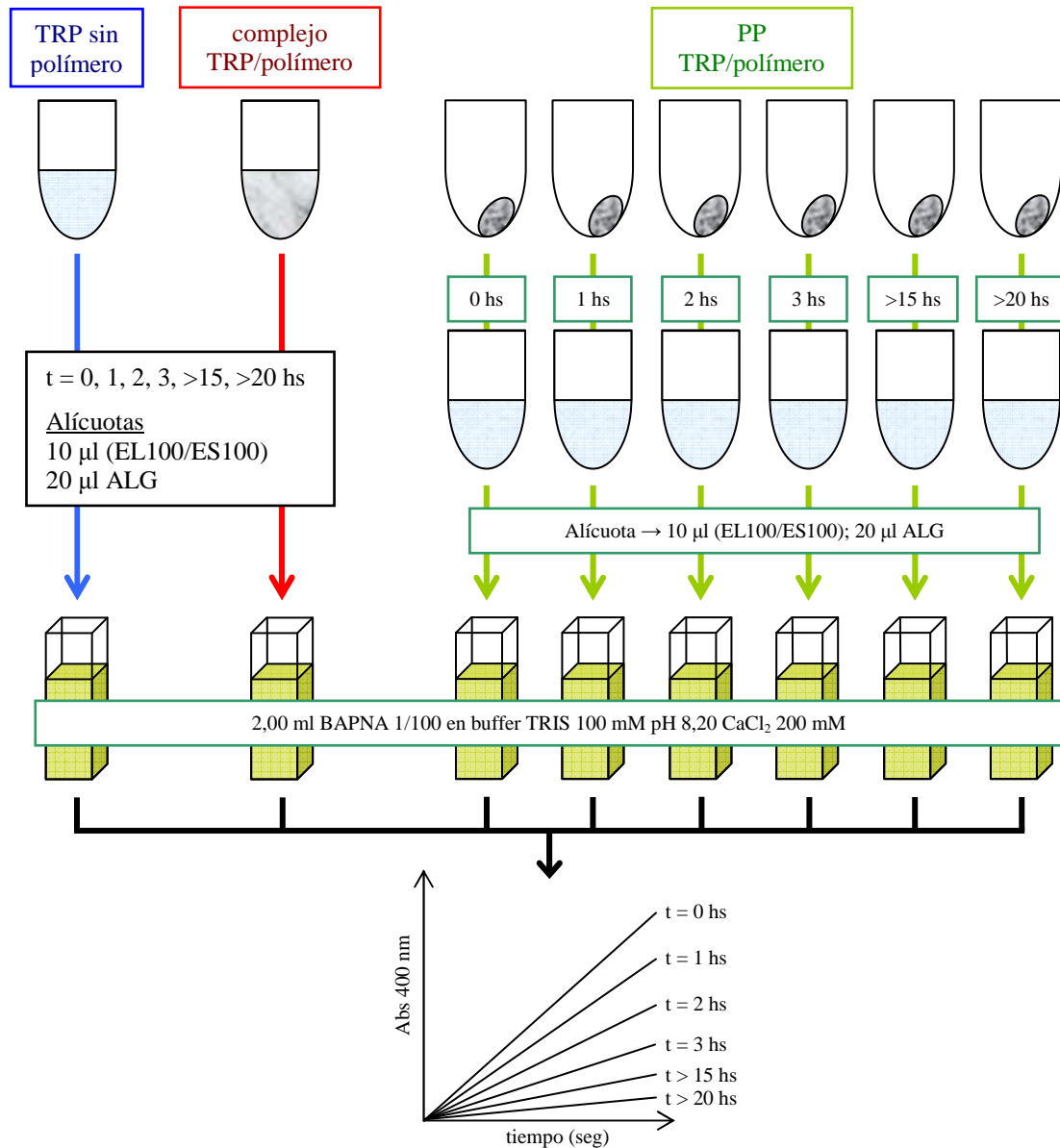


Figura 3.7: metodología para el estudio de la actividad a través del tiempo para soluciones de (•) TRP en ausencia de polímero; (•) complejo insoluble PE-TRP y (•) precipitado (PP) redissuelto en buffer.

### 3.2.7. Precipitación de TRP con EL100, ES100 y ALG.

Se prepararon soluciones de TRP con cada uno de los polímeros en buffer cit/TRIS 50/50 mM a pH y relaciones TRP/PE detalladas en la tabla 3.XI; asegurando que el volumen final sea el mismo en cada caso. Para la precipitación de TRP con EL100 y ES100 se probaron dos protocolos: uno que contemplaba trabajar con una relación molar TRP/PE igual o superior a la estequiometría de formación del complejo y

calculada por titulación turbidimétrica (protocolo 1) y otro en el cual se trabajó con las mismas relaciones molares de cinética (protocolo 2).

**TABLA 3.XI**

<b>Condiciones de trabajo</b>			
	<i>[TRP] (mM)</i>	<i>pH del medio</i>	<i>Relaciones TRP/PE</i>
<i>EL100/ES100 Protocolo 1</i>	0,1	EL100: 5,00 ES100: 5,50	98 moles TRP/mol EL100 162 moles TRP/mol ES100
<i>EL100/ES100 Protocolo 2</i>		EL100: 5,00 ES100: 5,50	3,25; 5,42; 8,08; 16,21; 32,46 moles TRP/mol PE
<i>ALG</i>	0,04	3,50	170; 220; 330; 660; 4000 μmoles TRP/g ALG

Los sistemas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se procedió a centrifugarlos a 3500 rpm durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante del precipitado y este último se redisolvió en buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00 NaCl 1 M. Finalmente, a cada fracción se le midió absorbancia a 280 nm.

Luego, a la solución cuya relación TRP/PE se observó la mayor cantidad de enzima precipitada, se le determinó la actividad catalítica antes de centrifugar, en el sobrenadante y en el precipitado redisoluelto de manera tal de calcular el porcentaje de actividad recuperado (rendimiento) en el precipitado y sobrenadante a partir de la siguiente ecuación:

$$\% TRP_{SN/PP} = 100 \times \frac{act. \text{ enz. } SN/PP}{act. \text{ enz. } INICIAL} \quad \mathbf{3.2}$$

### **3.2.8. Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.**

Se trabajó con soluciones de TRP en solución y TRP precipitada con ALG y redisoluelta de acuerdo al protocolo descrito en la sección 3.2.7 (el buffer de redisolución fue TRIS 50 mM pH 8,00 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,00 M). La relación TRP/ALG ensayada fue aquella a la que se observó la mayor cantidad de enzima precipitada.

Las condiciones operativas a las cuales se llevaron a cabo los experimentos de HIC se presentan en la tabla 3.XII.

**TABLA 3.XII**

<i>Columna</i>	Phenyl-Sepharosa
<i>Soporte</i>	Sepharosa
<i>Volumen de la columna</i>	1 mL
<i>Presión máxima</i>	0,3 MPa
<i>Flujo de operación</i>	0,75 mL/min
<i>Tipo de gradiente</i>	Lineal

Las condiciones de corrida cromatográfica se resumen en la tabla 3.XIII.

**TABLA 3.XIII**

<i>[TRP] en solución redisuelta</i>	2 mg/mL 0,9 mg/mL
<i>Volumen de muestra</i>	500 µL
<i>Volumen de elución</i>	10 mL
<i>Buffer salino B</i>	TRIS-HCl 50 mM pH 8,00 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,00 M

El gradiente de elución empleado se describe en la tabla 3.XIV, donde  $V_i$  y  $V_f$  se refieren al volumen de buffer que ha pasado por la columna cuando el gradiente se ha iniciado y finalizado, respectivamente.

**TABLA 3.XIV**

<i>Volumen (mL)</i>	<i>% Buffer salino</i>
0 ( $V_i$ )	100
5	100
15	0
25 ( $V_f$ )	0

La concentración de TRP en cada fracción se determinó por medidas de actividad aplicando el Método de Gildberg y Overbo explicado en la sección 3.2.6.1 y por medidas de absorbancia a 280 nm utilizando una curva de calibración preparada para tal fin.

Además, se determinó la concentración de ALG por el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico [125]; el cual se basa en la hidrólisis y deshidratación de polisacáridos como el ALG en presencia de ácido sulfúrico concentrado para dar reactivos intermedios. Estos reactivos forman productos coloreados con el fenol que poseen un máximo de absorción a 490 nm.

### **3.2.9. Aplicación de la precipitación al homogenado de páncreas porcino.**

#### **3.2.9.1. Preparación del homogenado.**

La técnica de precipitación con EL100 y ALG se aplicó a un homogenado de páncreas porcino para el aislamiento de TRP. El homogenado se preparó de la siguiente manera; trabajando a lo largo de todo el proceso a baja temperatura:

1. se removió el exceso de material biológico: venas, grasa, tejido conjuntivo, conductos específicos.
2. se cortó en trozos y trituró agregando aproximadamente 1,00 ml de buffer frío por gramo de material.
3. se filtró para eliminar los fragmentos de mayor tamaño.
4. se centrifugó 10 min a 3500 rpm.
5. se separó el precipitado y el sobrenadante.
6. se llevó el pH del sobrenadante a 3,00 con HCl con agitación constante. Esto no solo permite almacenar el homogenado sino que además, a este pH precipitan sustancias contaminantes que al ser centrifugadas forman un precipitado y, por ende, pueden ser separadas de la TRP que queda en el sobrenadante.
7. se centrifugó 10 min a 3500 rpm.
8. se separó el precipitado y el sobrenadante, y se controló el pH de esta última fracción.

**3.2.9.2. Activación del homogenado.**

La etapa de activación del homogenado es necesaria para purificar la enzima en su forma activa ya que la TRP se sintetiza como zimógeno. Además, este paso permite conocer aproximadamente la concentración de enzima en el homogenado y calcular factores de purificación y rendimientos.

Para poder activar la TRP, el medio de trabajo debe ser suplementado con  $\text{Ca}^{2+}$  y una pequeña cantidad de TRP pura (y activa) que desencadene el proceso. Se preparó una solución de activación conteniendo 3,20 mL de buffer TRIS 50 mM pH 8,20  $\text{CaCl}_2$  200 mM; 1,00 mL de homogenado y 5  $\mu\text{L}$  de TRP 1 mM pH 3,00. El tiempo de activación es de dos horas. Cada una hora se tomó una alícuota del sistema y se determinó la actividad mediante el Método de Gildberg y Overbo (ver sección 3.2.6.1), colocando 100  $\mu\text{L}$  del sistema en 2,00 mL de BAPNA.

Además, se preparó una solución de TRP pura 1,20  $\mu\text{M}$  en buffer TRIS 50 mM pH 8,20  $\text{CaCl}_2$  200 mM para controlar que su actividad catalítica no contribuya considerablemente a la actividad del homogenado.

**3.2.9.3. Precipitación de TRP con EL100.**

Se aplicaron tres protocolos para precipitar la enzima: dos protocolos implicaron primero activar el homogenado y luego precipitar. En el tercero, primero se precipitó la enzima y luego se activaron el homogenado y el precipitado (PP).

**3.2.9.3.a) *Protocolo 1:***

1. activar el homogenado de páncreas porcino.
2. tomar 1,50 mL del homogenado activado y llevar el pH a 5,00 con HCl.
3. agregar 50  $\mu\text{L}$  de EL100 0,18 mM. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. centrifugar 10 minutos a 3500 rpm.
5. Separar SN y PP. Redisolver este último en buffer TRIS 100 mM pH 8,00.
6. Medir actividad catalítica de cada fracción.
7. Determinar el rendimiento del método.

**3.2.9.3.b) *Protocolo 2:***

1. activar el homogenado de páncreas porcino.

2. tomar 1,50 mL del homogenado activado y llevar el pH a 5,00 con HCl.
3. agregar 50  $\mu$ L de EL100 0,18 mM. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. llevar el pH a 3,00 con HCl.
5. centrifugar 10 minutos a 3500 rpm.
6. Separar SN y PP. Redisolver este último en buffer TRIS 100 mM pH 8,00.
7. Medir actividad catalítica de cada fracción.
8. Determinar el rendimiento del método.

*3.2.9.3.c) Protocolo 3:*

1. preparar una solución de homogenado sin activar a pH 5,00 agregando 1,00 mL de homogenado en 3,20 mL de buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,00.
2. agregar 150  $\mu$ L de EL100 0,18 mM. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
3. centrifugar 1,50 mL del sistema, 10 minutos a 3500 rpm.
4. separar SN y PP. Redisolver este último en buffer TRIS 100 mM pH 8,00 CaCl<sub>2</sub> 200 mM.
5. agregar 2  $\mu$ L de TRP 1 mM pH 3,00 al PP y a la solución de homogenado preparada en el ítem 1.
6. medir la actividad catalítica de TRP a través del tiempo de la misma manera que se explicó en el punto 3.2.9.2.
7. Determinar el rendimiento del método.

3.2.9.4. Precipitación de TRP con ALG.

Se aplico un único protocolo para precipitar la enzima con dos variantes: activar antes de precipitar y precipitar antes de activar. El protocolo que requiere activar luego de precipitar consta de las siguientes etapas:

1. preparar una solución de homogenado a pH 3,50 agregando 1,00 mL de homogenado en 3,20 mL de buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 3,50
2. agregar 50  $\mu$ L de ALG 0,3 %P/V. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
3. centrifugar 1,50 mL 10 minutos a 3500 rpm.
4. separar SN y PP. Redisolver este último en buffer TRIS 100 mM pH 8,00 CaCl<sub>2</sub> 200 mM.

5. agregar 2  $\mu\text{L}$  de TRP 1 mM pH 3,00 y 35 mg de  $\text{CaCl}_2$  al PP y a la solución de homogenado preparada en el ítem 1.
6. medir la actividad catalítica de TRP a través del tiempo de la misma manera que se explicó en el punto 3.2.9.2.
7. Determinar el rendimiento del método.

En el protocolo que implica activar antes de precipitar, el buffer usado en el paso 1 debe ser suplementado con  $\text{CaCl}_2$  200 mM y se debe seguir el protocolo de activación del homogenado descrito en la sección 3.2.9.2; mientras que el buffer empleado para la redisolución del PP no es necesario que contenga  $\text{CaCl}_2$ . Además, las medidas de actividad realizadas en el paso 6 son puntuales (no a través del tiempo) ya que el homogenado se activó en el paso 1.

#### **3.2.10. Manejo de los datos experimentales.**

Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado o triplicado según el caso y el análisis de los datos experimentales se realizó utilizando el programa *Sigma Plot* versión 10.0 para Windows, que emplea el algoritmo Marquardt-Levenberg [126].

#### 4.1.1. Estudio de la solubilidad de los PE.

##### 4.1.1.1. Efecto del pH sobre la solubilidad de los PE.

Las curvas de solubilidad obtenidas para EL100 y ES100 a distintas concentraciones se muestran en la figuras 4.1a) y b), respectivamente. Se observó que ambos PE se encuentran en su forma soluble a pHs básicos lo cual se evidencia con la ausencia de turbidez en el sistema. Esto concuerda con lo esperado para PE aniónicos sensibles al pH.

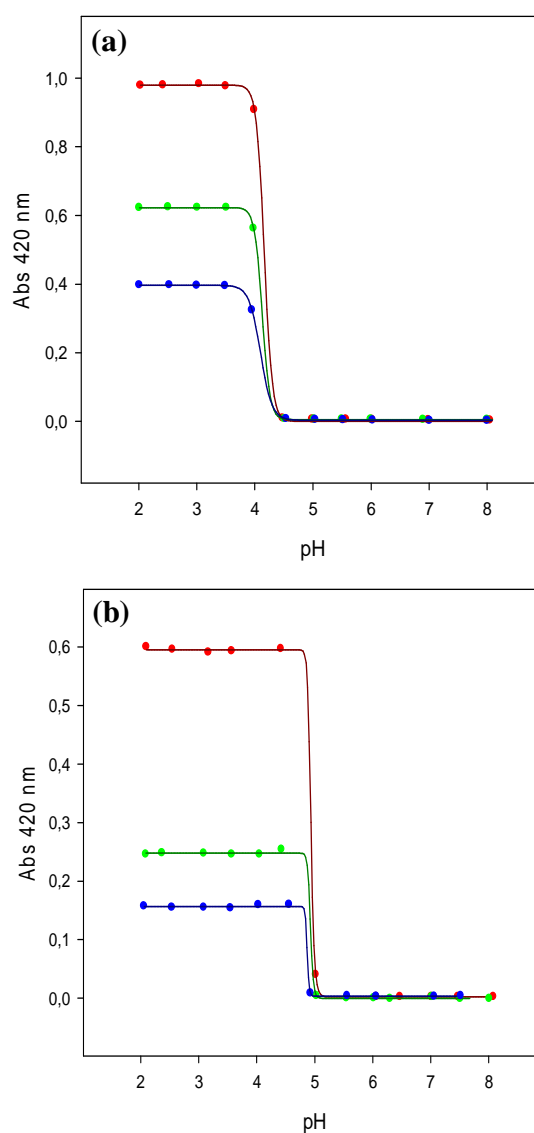


Figura 4.1: Curvas de solubilidad de los PE (a) EL100 y (b) ES100 a tres concentraciones ( $\mu\text{M}$ ): (•) 3,70; (•) 6,67 y (•) 12,59. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM. Temperatura 25 °C.

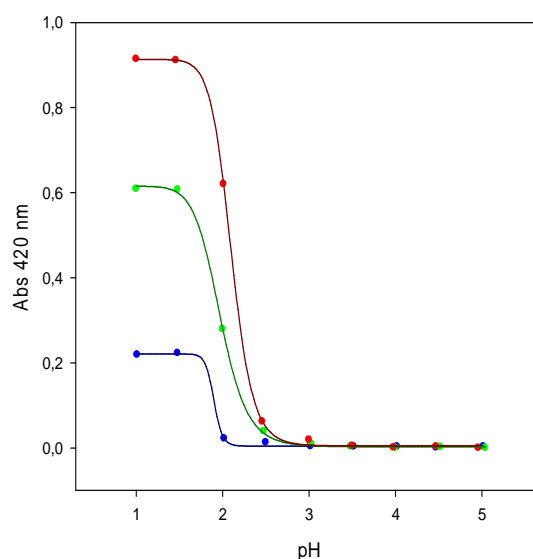
## 4. Resultados y Discusión

### *Sección 1: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP*

El rango de insolubilidad del EL100 comenzó a pH 4,00 mientras que el del ES100 a pH 4,50 y la turbidez se mantuvo constante hasta pH igual a 2,00.

La forma de las curvas de solubilidad, semejante a una sigmoidea, evidencia un mecanismo molecular en el cual es necesario que se alcance una concentración crítica de moléculas neutralizadas por los protones del medio, las cuales comienzan a unirse por medio de interacciones hidrofóbicas para dar agregados insolubles. La variación de la concentración de polímero no alteró la forma de las curvas de solubilidad.

La figura 4.2 muestra las curvas de solubilidad obtenidas para el ALG a distintas concentraciones. De la misma manera que ocurrió con el EL100 y ES100, el ALG presentó una curva semejante a una sigmoidea; con un rango de insolubilidad que abarcó pHs inferiores a 2,50. La variación de la concentración del PE en el sistema tampoco tuvo efecto sobre la forma de la curva de solubilidad.



*Figura 4.2: Curvas de solubilidad del polímero ALG a tres concentraciones (%P/V): (•) 0,14; (•) 0,22 y (•) 0,32. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM. Temperatura 25 °C.*

La diferencia observada en los pHs a los cuales cada PE comienza a insolubilizarse se debe a los diferentes pKa de los grupos aniónicos ionizables que presentan cada uno.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 1: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP

#### 4.1.1.2. Efecto de la fuerza iónica sobre las curvas de solubilidad de los PE.

La figura 4.3 muestra las curvas de solubilidad del EL100 y ES100 obtenidos a diferentes fuerzas iónicas y la figura 4.4 muestra las curvas correspondientes al ALG.

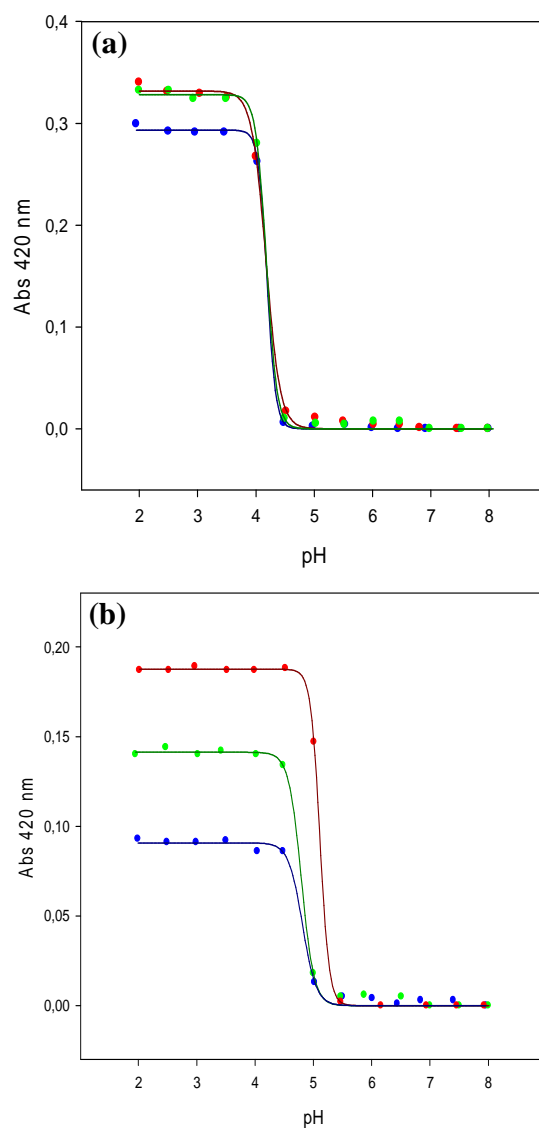


Figura 4.3 Curvas de solubilidad de los PE (a) EL100 1,12  $\mu\text{M}$  y (b) ES100 1,12  $\mu\text{M}$  a diferentes  $[\text{NaCl}]$ : ( $\bullet$ ) 0 M; ( $\bullet$ ) 0,25 M y ( $\bullet$ ) 1,00 M. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM. Temperatura 25  $^{\circ}\text{C}$ .

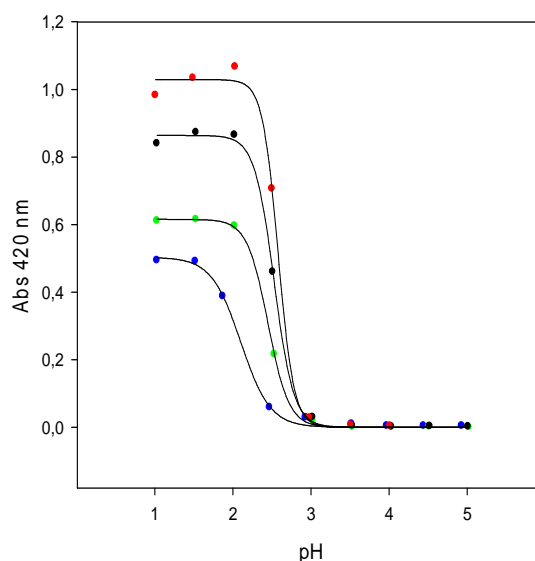


Figura 4.4: Curvas de solubilidad del polímero ALG 0,22 %P/V a diferentes  $[NaCl]$ : (•) 0 M; (•) 0,25 M; (•) 0,50 M y (•) 1,00 M. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM. Temperatura 25 °C.

La presencia de NaCl en cada sistema no alteró la forma y el rango de solubilidad/insolubilidad de las curvas de solubilidad aunque sí se observó un aumento de la turbidez al aumentar la fuerza iónica. La *Teoría de Timasheff* indica que el NaCl (principalmente el ion  $Na^+$ ) se excluiría preferencialmente de la superficie de los PE debido a las interacciones favorables entre los iones y las moléculas de agua. Esto induciría la hidratación preferencial de las moléculas de PE, favoreciendo la precipitación de las mismas (*salting out*) y el consecuente aumento de la turbidez.

#### 4.1.2. Estudio de la formación de los complejos insolubles PE-TRP por medidas de turbidez.

##### 4.1.2.1. Efecto del pH sobre la formación de los complejos PE-TRP.

###### 4.1.2.1.a) pH inicial = 8,00

Las curvas de solubilidad de los complejos EL100-TRP y ES100-TRP se muestran en la figuras 4.5a) y b), respectivamente. El control de TRP no presentó turbidez en todo el rango de pH. En ambos casos, el sistema presentó turbidez a pHs ácidos superior al control de PE, lo cual evidenciaría la formación del complejo insoluble PE-TRP. Al aumentar la concentración

## 4. Resultados y Discusión

### Sección I: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP

de TRP también aumentó la turbidez probablemente a causa del aumento en el número de partículas de complejo insoluble o la formación de partículas de mayor tamaño.

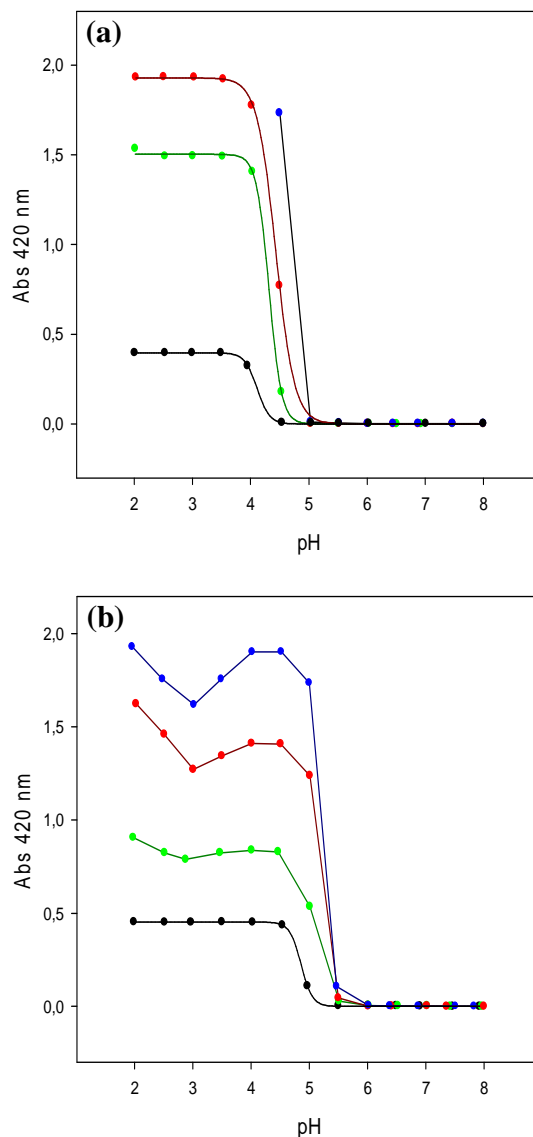


Figura 4.5: Curvas de solubilidad de los complejos (a) EL100-TRP y (b) ES100-TRP desde pH 8,00 a 2,00 a diferentes relaciones TRP/PE (mol/mol): (•) sin TRP; (•) 2,40; (•) 4,81 y (•) 12,00. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM. Temperatura 25 °C.

El complejo EL100-TRP siempre presentó valores de turbidez mayores que el complejo ES100-TRP, siendo iguales la concentración de PE y la turbidez de cada sistema en ausencia de enzima. Este puede ser un indicio de que en iguales condiciones se forman más moléculas de complejo EL100-TRP que de ES100-TRP o moléculas de mayor tamaño.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 1: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP

La curva de solubilidad del complejo EL100-TRP presentó la misma forma y un rango de insolubilidad semejante a la curva del PE. El complejo comenzó a precipitar a pH 4,50 y luego la turbidez se mantuvo constante en todo el rango de insolubilidad. Este es el pH crítico denominado  $pH\Phi$  de la figura 1.3 presentada en la Introducción – sección 1.3.1 y corresponde al pH al cual ocurre la separación de fases.

El sistema preparado con una relación TRP/EL100 igual a 12,00 desarrolló valores de turbidez superiores al límite de detección del equipo.

La curva de solubilidad del complejo ES100-TRP mostró un rango de insolubilidad desde pH 5,00 ( $pH\Phi$ ) hacia pHs ácidos; con un pico entre pH 3,00 y 5,00 que se acentuó al aumentar la concentración de TRP en el sistema.

Por otro lado, el ALG presentó curvas de solubilidad muy diferentes a los Eudragit<sup>®</sup>, los cuales se presentan en la figura 4.6.

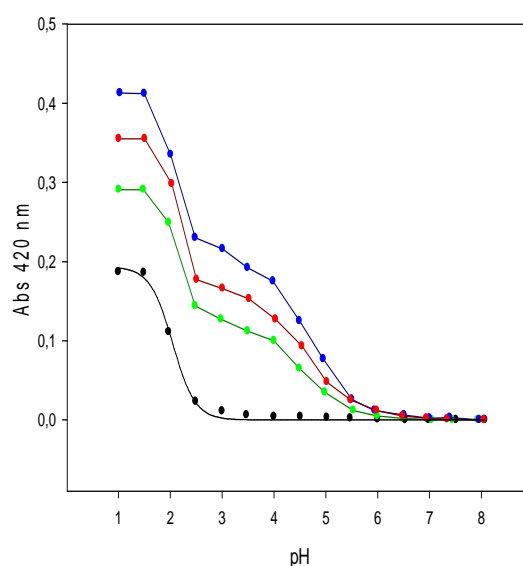


Figura 4.6: Curvas de solubilidad del complejo ALG-TRP desde pH 8,00 a 1,00 a diferentes relaciones TRP/polímero ( $\mu\text{mol/g}$ ): (•) sin TRP; (•) 19,71; (•) 25,21 y (•) 31,51. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM. Temperatura 25 °C.

Se puede observar que a medida que aumentó la concentración de TRP en el sistema también lo hizo la turbidez. Las curvas de solubilidad obtenidas para el complejo difieren de la curva del ALG y pueden distinguirse dos regiones de insolubilidad. En la primera región, que abarca desde pH 2,50 a 5,50 ( $pH\Phi$ ), la turbidez del sistema se debería únicamente a la precipitación del complejo ALG-TRP. Por debajo de pH 2,50 también comienza a precipitar el

polímero libre y la turbidez del sistema sería ahora una contribución de ambas especies. Esta segunda región es similar a la curva de solubilidad del ALG en ausencia de enzima.

El comportamiento de los tres sistemas puede explicarse teniendo en cuenta el estado de carga de cada molécula. A pH 8,00 la TRP presenta una baja densidad de cargas positivas mientras que los PE, una elevada cantidad de cargas negativas. La densidad de carga de la enzima no es lo suficientemente elevada como para consolidar la formación del complejo insoluble PE-TRP. A medida que el pH desciende desde 8,00; la densidad de carga positiva de la TRP aumenta mientras que la densidad de carga negativa de cada polímero disminuye. El primer efecto provocaría un aumento en el número y/o tamaño de las partículas de complejo insoluble y el segundo, una disminución de los mismos. Sin embargo, la ganancia en número de cargas de la enzima predomina por sobre la pérdida de cargas de los polímeros y por ende, el resultado final es un aumento de turbidez. Es evidente que la densidad de carga de la TRP es un factor importante para la formación de los complejos insolubles, ya que la enzima presenta una “baja” cantidad de cargas positivas en su superficie (16, mayoritariamente residuos de arginina) por molécula mientras que los PE pueden presentar más de 500 cargas negativas por molécula.

#### *4.1.2.1.b) pH inicial = 3,50*

Las figuras 4.7 y 4.8 muestran las curvas de solubilidad obtenidas para los tres complejos PE-TRP cuando el barrido de pH se realizó en dos direcciones: desde pH 3,50 hacia pHs ácidos y desde pH 3,50 hasta pH 8,00. El control de TRP no presentó turbidez en todo el rango de pH.

Se puede observar que la forma las curvas cambió considerablemente en relación a los presentados en la sección 4.1.2.1.a). Es importante destacar que los tres sistemas eran turbios a este pH.

En los tres casos se observó la presencia de un pico a todas las relaciones TRP/PE ensayadas.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección I: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP

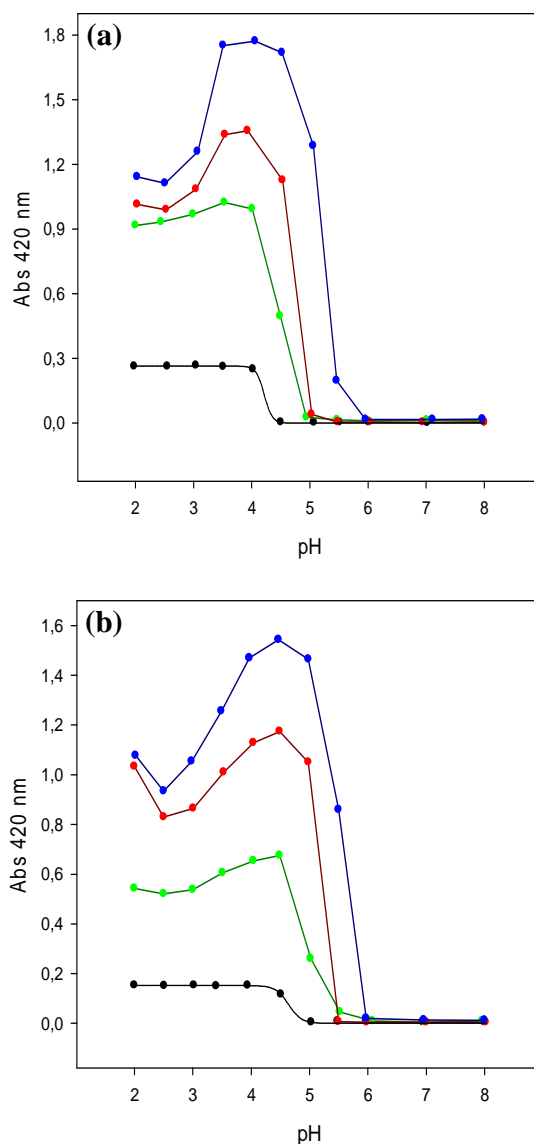


Figura 4.7: Curvas de solubilidad de los complejos (a) EL100-TRP y (b) ES100-TRP desde pH 3,50 a diferentes relaciones TRP/polímero (mol/mol): (●) sin TRP; (●) 2,40; (●) 4,81 y (●) 12,00. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM. Temperatura 25 °C.

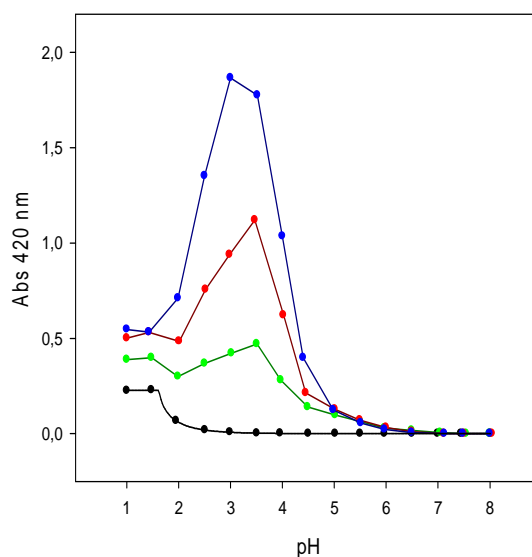
Cuando el medio se alcalinizó, la turbidez del sistema aumentó hasta alcanzar su máximo a pH 3,50-4,00 para el complejo EL100-TRP y 4,50 para el complejo ES100-TRP. A partir de pH 5,00-6,00 la turbidez de los sistemas disminuyó hasta valores iguales a cero, indicando que el complejo insoluble desapareció totalmente. Nuevamente se pone en manifiesto la importancia de la densidad de carga de la enzima por sobre la de cada PE.

## 4. Resultados y Discusión

### *Sección 1: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP*

Al acidificar el medio desde pH 3,50; se observó una disminución en la turbidez del sistema. Este efecto probablemente se deba a una reducción en el número de partículas de complejo insoluble: las moléculas de PE libre comienzan a perder sus cargas y precipitar; haciendo que la concentración de PE soluble disminuya. Esto generaría que el equilibrio de formación del complejo insoluble se desplace hacia la disociación del complejo, lo cual conllevaría a un descenso del número de partículas de complejo insoluble. Sin embargo, el valor de turbidez no iguala al correspondiente al polímero solo, indicando que aún existiría complejo insoluble formado.

El complejo ALG-TRP presenta el máximo de turbidez a pH 3,00-3,50 y, al igual que los complejos EL100-TRP y ES100-TRP, la turbidez desapareció al alcalinizar el medio desde pH 5,50 hasta 8,00.



*Figura 4.8: Curvas de solubilidad del complejo ALG-TRP desde pH 3,50 a diferentes relaciones TRP/polímero ( $\mu\text{mol/g}$ ): (•) sin TRP; (•) 19,71; (•) 25,21 y (•) 31,51. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM. Temperatura 25 °C.*

El efecto de la acidificación del medio para el caso del ALG es un poco más complicado de analizar ya que este PE aún no precipita a pH 3,50. Además, por debajo de pH 3,00 la estructura de la TRP comienza a abrirse exponiendo zonas que antes se encontraban ocultas. Esto claramente modifica la interacción entre la enzima y los tres PE.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección I: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP

#### 4.1.2.2. Efecto de la concentración de TRP sobre la formación de los complejos PE-TRP.

Las curvas de titulación del EL100 se muestran en las figuras 4.9; 4.10 y 4.11. Para realizar estos experimentos se seleccionaron los pHs de las curvas de solubilidad de cada complejo PE-TRP que presentaron la mayor turbidez.

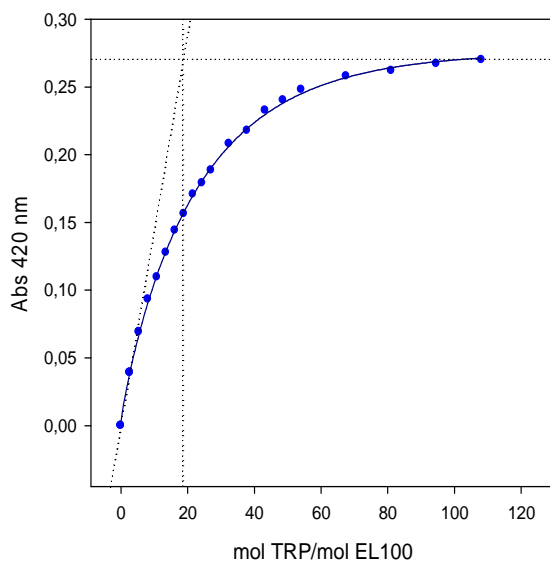


Figura 4.9: Curva de titulación de EL100 0,46  $\mu$ M con TRP 1,00 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 4,00. Temperatura 25 °C.

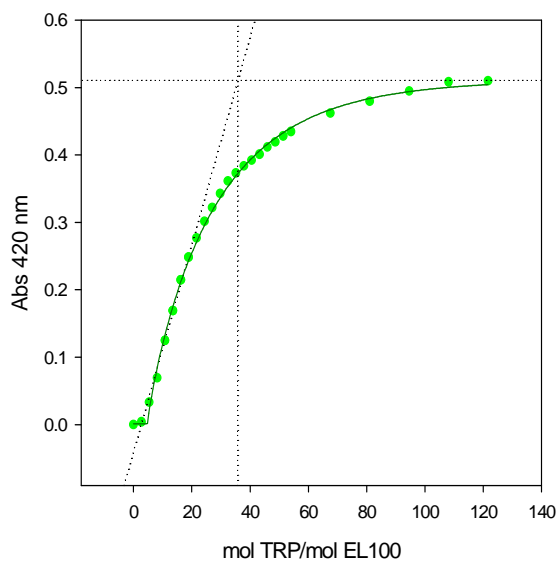


Figura 4.10: Curva de titulación de EL100 0,46  $\mu$ M con TRP 1,00 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 4,50. Temperatura 25 °C.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección I: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP

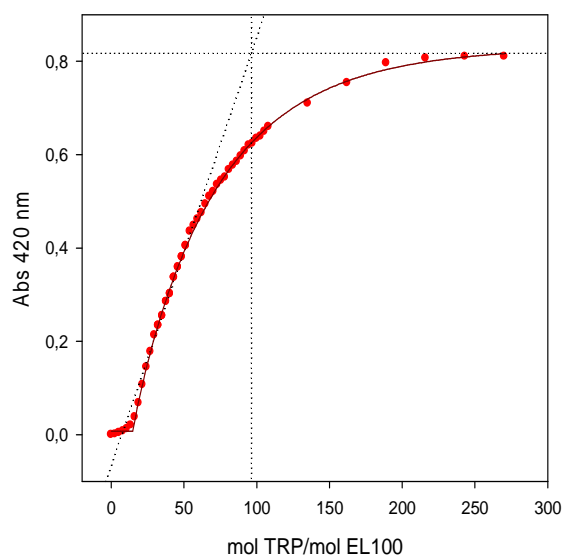


Figura 4.11: Curva de titulación de EL100  $0,46 \mu\text{M}$  con TRP  $1,00 \text{ mM}$ . Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,00. Temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Se puede observar que a los tres pHs ensayados, la turbidez del sistema aumentó al incrementarse la concentración de TRP. Todas las curvas reflejan un comportamiento hiperbólico y presentan una región de saturación a relaciones TRP/EL100 altas en la cual la turbidez se mantiene constante a pesar del agregado de enzima. Esto indicaría que el sistema se ha saturado y que por lo tanto no hay formación de nuevas partículas de complejo insoluble.

Además, se puede observar que al aumentar el pH, el mecanismo de formación de cada complejo se modificó. Esto se evidencia por la aparición, a bajas relaciones molares TRP/PE, de una región en la cual la turbidez se mantiene cercana a cero a pesar del agregado de TRP al sistema.

La máxima turbidez en la región de saturación se obtuvo a pH 5,00; al igual que la máxima estequiometría de complejo (ver tabla 4.I). Esto evidenciaría que la mayor cantidad de complejo insoluble o las partículas de mayor tamaño se forman a este pH y que cada partícula de este complejo contiene la mayor cantidad de moléculas de TRP. A este pH, la formación del complejo insoluble empezó a una relación molar TRP/EL100 igual a 10,81 moles TRP/mol EL100.

Las curvas de titulación de ES100 mostradas en la figura 4.12 presentaron una forma similar a las curvas de EL100, con una región de saturación que posee la máxima turbidez y la máxima estequiometría de complejo a pH 5,50 (ver tabla 4.I).

## 4. Resultados y Discusión

### Sección I: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP

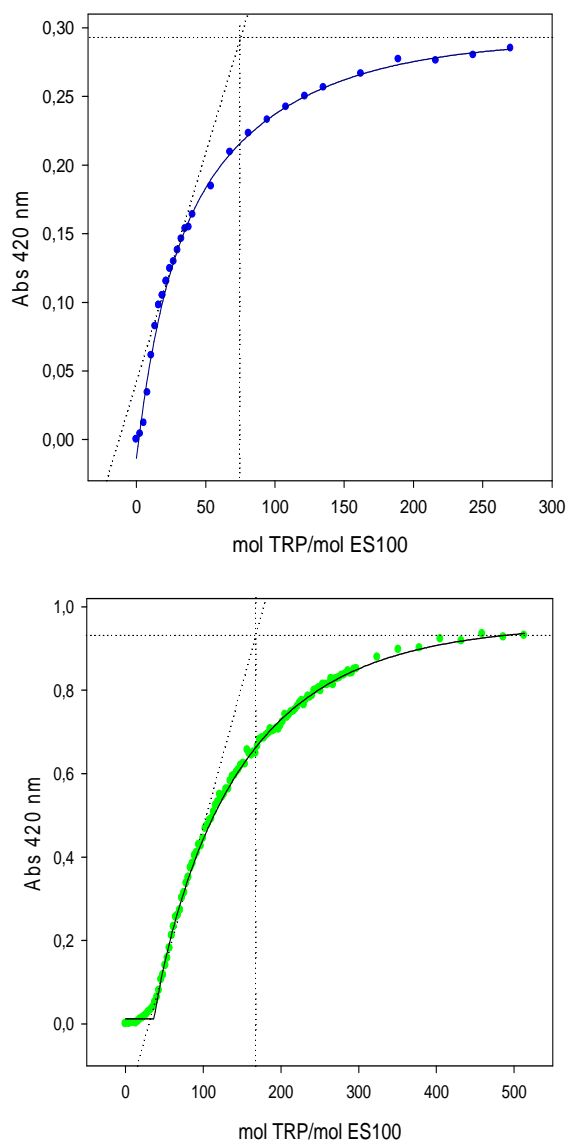


Figura 4.12: Curvas de titulación de ES100  $0,46 \mu\text{M}$  con TRP  $1,00 \text{ mM}$ . Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH (•) 5,00 y (•) 5,50. Temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

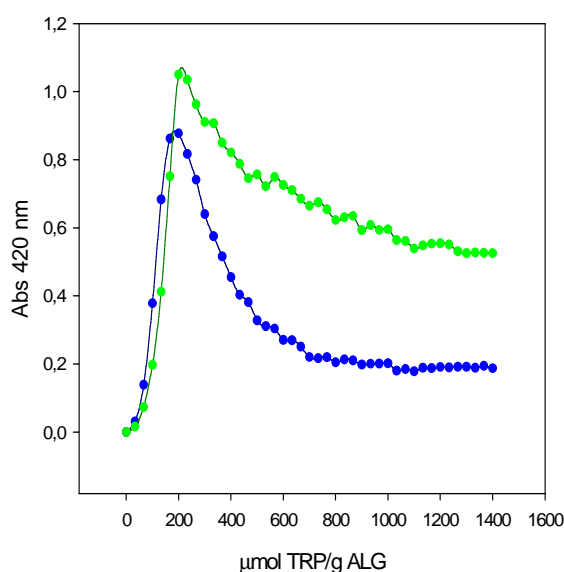
También se observó una región de turbidez cercana a cero a bajas relaciones molares. La formación del complejo insoluble comenzó a una relación molar TRP/ES100 igual a 16,22 moles TRP/mol ES100.

Las curvas de titulación del ALG se muestran en la figura 4.13. Estas curvas presentan un máximo de turbidez a bajas relaciones TRP/ALG y, a medida que la concentración de TRP en el sistema aumentó, la turbidez disminuyó hasta mantenerse constante. Este comportamiento se debería a un fenómeno denominado *Maduración de Ostwald* por el cual se

## 4. Resultados y Discusión

### *Sección I: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP*

forman partículas de mayor tamaño a expensas de las más pequeñas. Probablemente, las moléculas de TRP que se agregan en cada alícuota neutralicen las cargas negativas de las partículas de complejo insoluble lo que permitiría que se agreguen para dar partículas macroscópicas. El efecto de la disminución en la cantidad de entes dispersantes de la luz predomina por sobre el aumento del tamaño de los mismos. Este fenómeno de maduración podría no observarse en los complejos Eudragit<sup>®</sup>-TRP ya que todas las moléculas de estos PE poseen el mismo PM y las partículas formadas tendrían todas el mismo tamaño.



*Figura 4.13: Curvas de titulación de ALG 0,004 %P/V con TRP 1,00 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH (•) 3,00 y (•) 3,50. Temperatura 25 °C.*

La máxima turbidez se observó a pH 3,50 indicando que el mayor número de partículas de complejo insoluble o las partículas de mayor tamaño se forman a este pH. Sin embargo, la estequiometría del complejo no varió.

Los valores de estequiometría TRP/PE calculados para los complejos EL100-TRP, ES100-TRP y ALG-TRP se muestran en la tabla 4.I.

TABLA 4.I

pH	Estequiometría del complejo PE-TRP		
	<i>EL100</i> (mol/mol)	<i>ES100</i> (mol/mol)	<i>ALG</i> ( $\mu\text{mol/g}$ )
3,00	--	--	200
3,50	--	--	200
4,00	19	--	--
4,50	35	--	--
5,00	98	74	--
5,50	--	167	--

## 4.1.2.3. Efecto de la fuerza iónica sobre la formación de los complejos PE-TRP.

Las figuras 4.14, 4.15 y 4.16 presentan las curvas de titulación obtenidas para los tres PE, realizadas en ausencia de NaCl y en presencia de una concentración igual a 0,25 M.

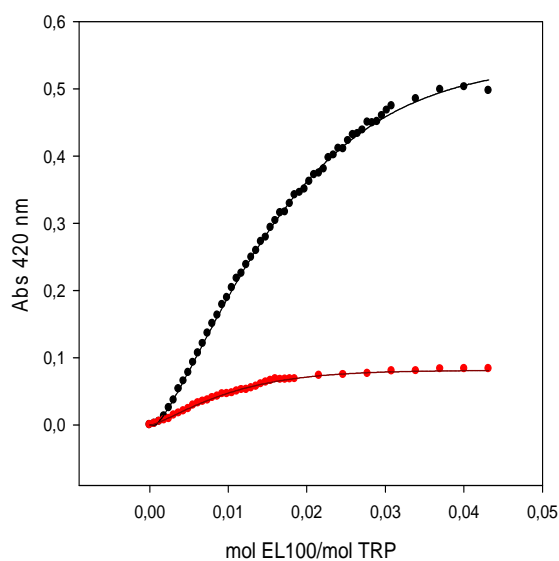


Figura 4.14: Curvas de titulación obtenidas para los complejos EL100-TRP a diferentes  $[\text{NaCl}]$ : (•) 0 M y (•) 0,25 M. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección I: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP

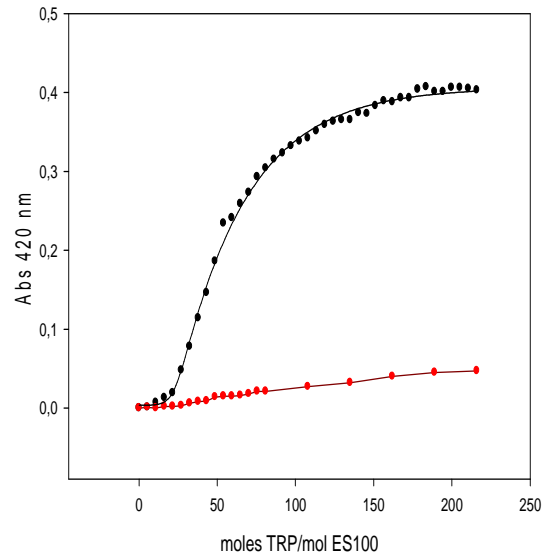


Figura 4.15: Curvas de titulación obtenidas para el complejo ES100-TRP a diferentes  $[NaCl]$ : (•) 0 M y (•) 0,25 M. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,50. Temperatura 25 °C.

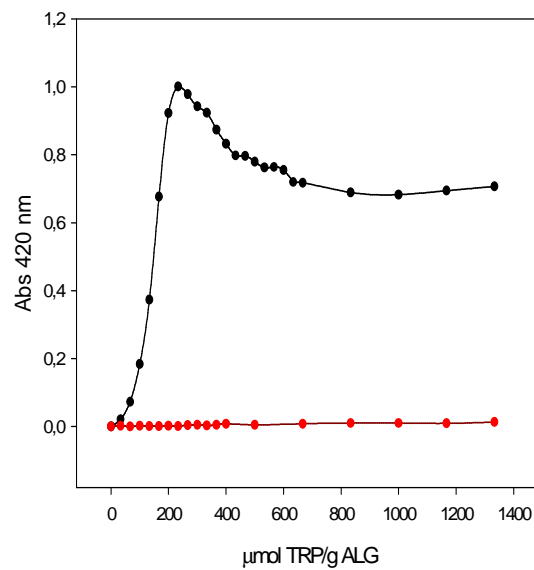


Figura 4.16: Curvas de titulación obtenida para el complejo ALG-TRP a diferentes  $[NaCl]$ : (•) 0 M y (•) 0,25 M. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 3,50. Temperatura 25 °C.

Se puede observar que en presencia de NaCl, la turbidez del sistema decrece drásticamente; alcanzando un valor igual a cero para el caso del ALG. Esto indicaría que las

interacciones que predominan en la formación del complejo insoluble son de naturaleza electrostática.

Para el caso del EL100 y ES100, la turbidez del sistema no desaparece totalmente lo que evidenciaría la presencia de interacciones hidrofóbicas además de las electrostáticas.

Estos resultados permiten, no sólo inferir la naturaleza de las interacciones que rigen la formación del complejo insoluble, sino además conocer condiciones que afectan la estabilidad y/o solubilidad del mismo. Esta información es muy importante en el caso que fuese necesario redissolver el complejo insoluble, separar la TRP del polímero y reciclar este último para un nuevo uso.

#### 4.1.2.4. Cinética de formación de los complejos PE-TRP.

Las cinéticas de formación de los complejos insolubles con EL100, ES100 y ALG se presentan en las figuras 4.17, 4.18 y 4.19, respectivamente. Además, en cada una se agregó un gráfico de barra que muestra la máxima turbidez alcanzada a cada relación TRP/PE.

Los tres complejos presentaron una cinética de formación rápida, con un tiempo de aproximadamente 50 segundos para obtener la máxima cantidad de complejo. Esta característica del mecanismo de formación de los complejos es muy importante ya que en cualquier proceso en el cual se manipule material biológico o cualquier proceso factible de ser usado a escala industrial, el tiempo es un factor crítico.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección I: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP

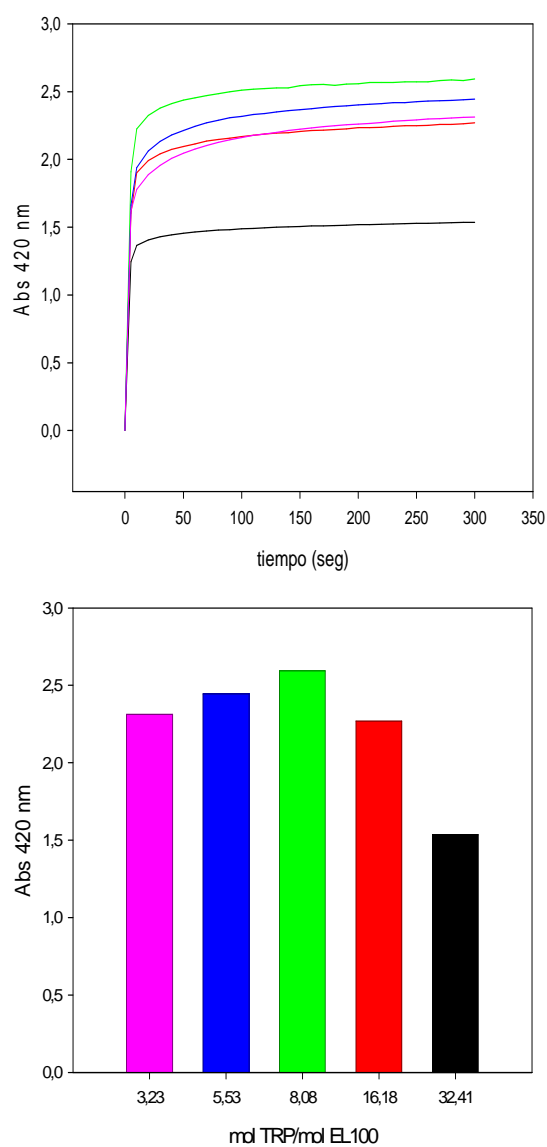


Figura 4.17: Cinética de formación del complejo EL100-TRP a diferentes relaciones TRP/EL100 (mol/mol): (•) 3,23; (•) 5,53; (•) 8,08; (•) 16,18 y (•) 32,41. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección I: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP

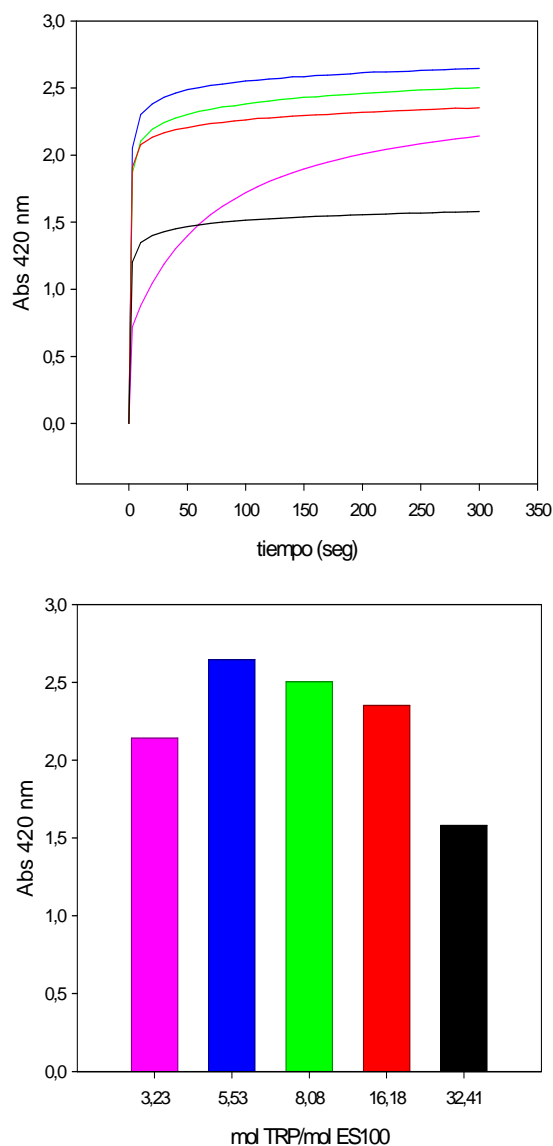


Figura 4.18: Cinética de formación del complejo ES100-TRP a diferentes relaciones TRP/ES100 (mol/mol): (•) 3,23; (•) 5,53; (•) 8,08; (•) 16,18 y (•) 32,41. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,50. Temperatura 25 °C.

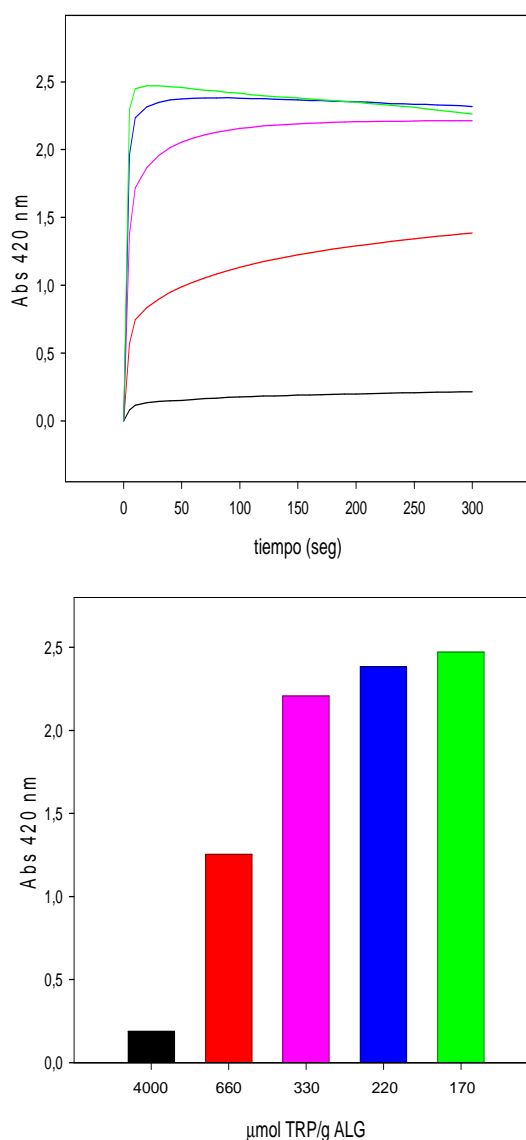
Los complejos EL100-TRP y ES100-TRP presentan la máxima turbidez a relaciones molares iguales a 8,08 y 5,53; respectivamente. A relaciones molares por debajo de la máxima, el sistema no se encuentra saturado debido a la baja concentración de TRP; mientras que en presencia de un exceso de TRP, el PE no adoptaría una configuración espacial óptima para la formación del complejo insoluble. En comparación con los experimentos de titulación, el agregado de TRP en alícuotas favorecería el acomodamiento de las cadenas del PE para

## 4. Resultados y Discusión

### *Sección I: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP*

optimizar las interacciones entre éste y la enzima. Por ello la estequiometría determinada para estos complejos por titulación turbidimétrica sería sustancialmente superior. La relación óptima se confirmaría con los experimentos de ITC, los cuales exponen inequívocamente el número de moléculas de TRP que se unen a una molécula de PE.

El complejo ALG-TRP mostró un mecanismo de formación distinto a aquel observado para los complejos Eudragit<sup>®</sup>-TRP: al aumentar la concentración de TRP en el medio también aumentó la turbidez; o sea la cantidad o el tamaño del complejo insoluble ALG-TRP.



*Figura 4.19: Cinética de formación del complejo ALG-TRP a diferentes relaciones TRP/ALG ( $\mu\text{mol/g}$ ): (•) 170; (•) 220; (•) 330; (•) 660 y (•) 4000. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 3,50. Temperatura 25 °C.*

## **4. Resultados y Discusión**

### *Sección 1: Estudio de la formación de los complejos PE-TRP*

---

La diferencia en los mecanismos de formación del complejo ALG-TRP y los complejos Eudragit<sup>®</sup>-TRP radica probablemente en la elevada densidad de cargas negativas que posee el ALG: al saturarse las moléculas de PE, la densidad de carga que presentan las partículas de complejo insoluble sería óptima para la interacción entre las mismas.

Además, es importante destacar que el mecanismo de formación de los complejos Eudragit<sup>®</sup>-TRP es diferente cuando la TRP se agregó al sistema en alícuotas consecutivas o en una única etapa: en el primer caso el sistema se saturó mientras que en el segundo, se observó un pico de turbidez.

Por otro lado, el mecanismo de formación del complejo insoluble ALG-TRP no se modificó con el proceso de mezclado de las soluciones.

**4.2.1. Estudio de la formación de los complejos insolubles PE-TRP por medidas de ITC.****4.2.1.1. Formación del complejo insoluble PE-TRP.**

Las figuras 4.20 y 4.21 muestran los datos de potencia vs. tiempo obtenidos para los sistemas EL100-TRP a pH 5,00 y ES100-TRP a pH 5,50; respectivamente. Estos pHs se seleccionaron de los experimentos de barrido de pH y titulación turbidimétrica y corresponden a la mayor cantidad de complejo insoluble formado (ver sección 4.1.2). El calor liberado por la dilución de la TRP es despreciable (datos no mostrados).

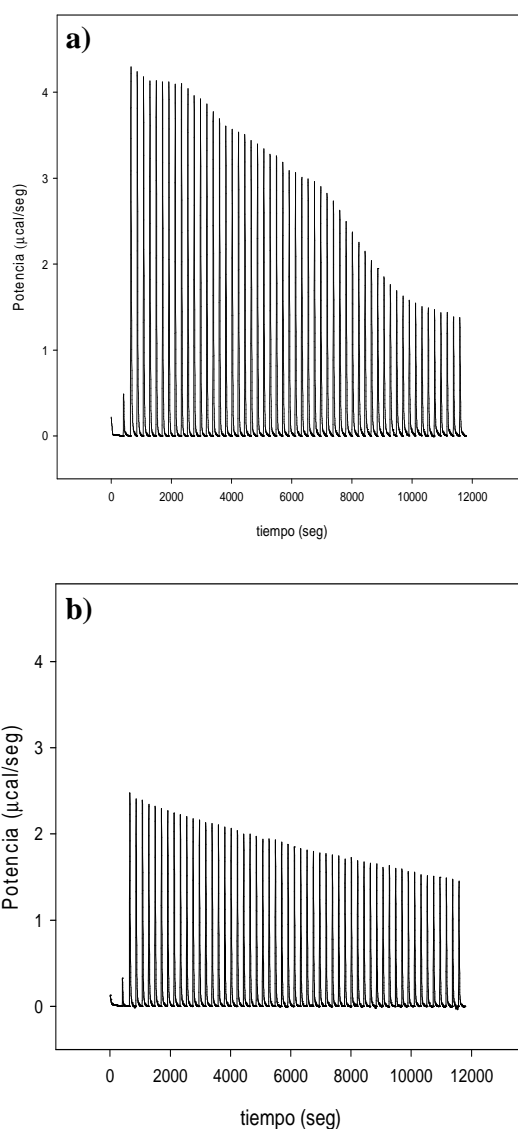


Figura 4.20: Gráficos de potencia vs. tiempo de **a)** titulación de TRP 0,3 mM con EL100 0,13 mM y **b)**  $Q_{disol}$  de EL100 0,13 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C.

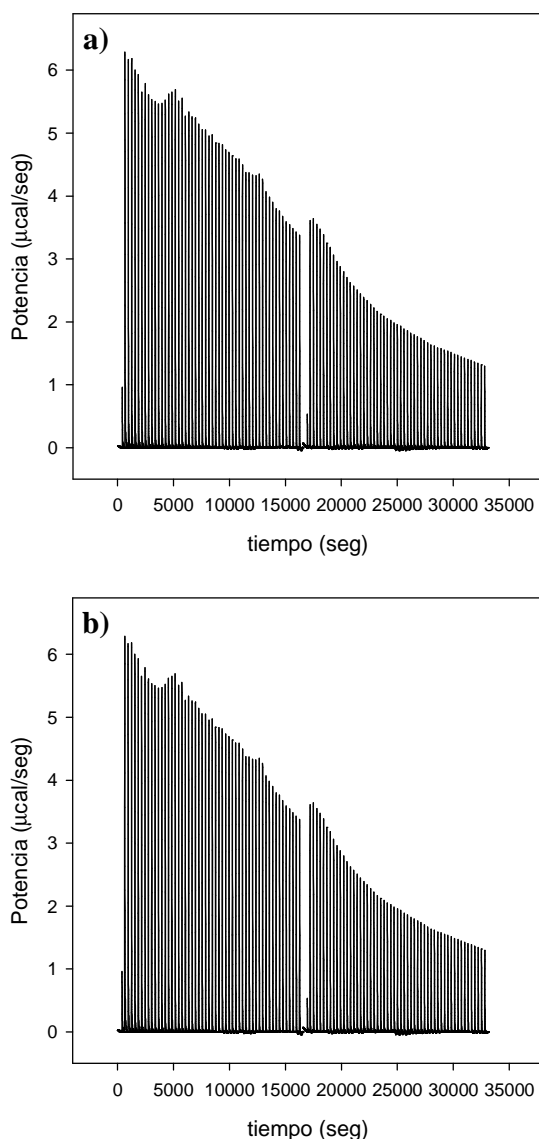


Figura 4.21: Gráficos de potencia vs. tiempo de **a)** titulación de TRP 0,3 mM con ES100 0,13 mM y 0,06 mM y **b)**  $Q_{disol.}$  de ES100 0,13 mM y 0,06 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,50. Temperatura 25 °C.

Las isotermas de titulación correspondientes se presentan en las figuras 4.22 y 4.23. Estos gráficos surgen de la integración del área de cada pico en la curva de potencia vs. tiempo para obtener el calor intercambiado en cada inyección y a partir de éste, el  $\Delta H$  por mol de inyectante (ver Introducción – sección 1.7.4.1).

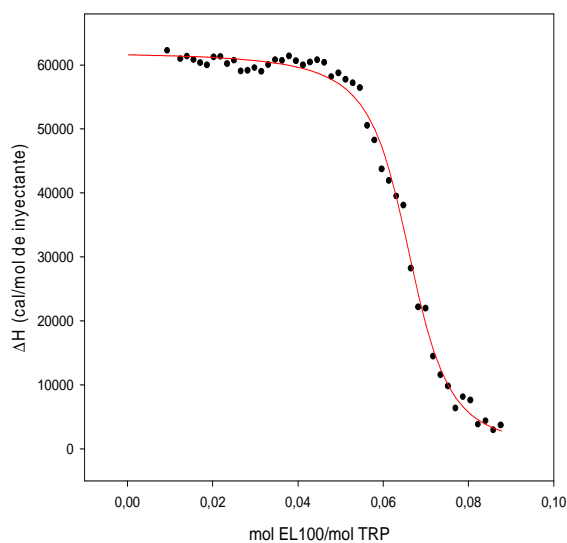


Figura 4.22: Titulación isotérmica de TRP 0,3 mM con EL100 0,13 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C

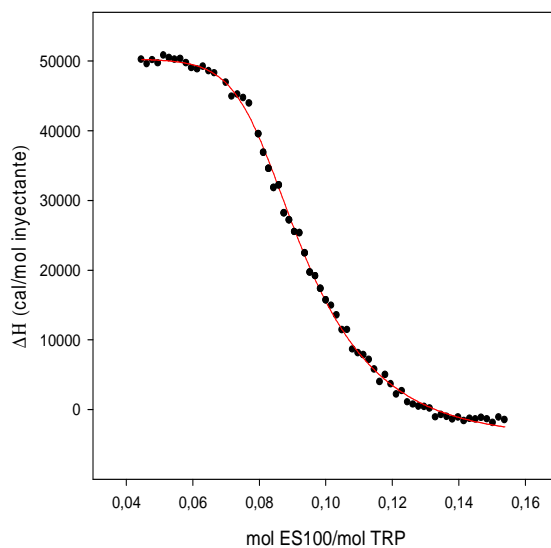


Figura 4.23: Titulación isotérmica de TRP 0,3 mM con ES100 0,13 mM y 0,06 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,50. Temperatura 25 °C.

Se puede observar que los datos experimentales de ambos sistemas ajustan a una sigmoidea indicando que la interacción entre la enzima y cada uno de los PE para formar el complejo insoluble seguiría un modelo de interacción de un único tipo de sitios independientes y equivalentes. Esto implica que las moléculas de TRP interaccionan con las de PE siempre con la misma afinidad (igual constante de afinidad microscópica) y que la unión de una

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 2: Estudio de la interacción PE-TRP

molécula TRP no afecta la afinidad de otra molécula de TRP por un sitio de unión vecino en el PE.

A bajas relaciones molares PE/TRP, las isotermas presentan valores de  $\Delta H^\circ$  de aproximadamente 50.000 y 60.000 cal por mol de PE y disminuyen hasta valores cercanos a cero a medida que se agrega polímero al sistema. Los  $\Delta H^\circ$  positivos indican que el sistema necesita absorber calor del medio para que el PE interaccione con la enzima.

Los valores de  $\Delta H^\circ$  cercanos a cero y constantes indicarían que el sistema se ha saturado, es decir que las moléculas de PE que se agregan al sistema en cada inyección no interaccionan con la TRP libre. Este mismo comportamiento fue observado en las curvas de titulación de la sección 4.1.2.2 en las cuales, luego de alcanzar la etapa de saturación, se observaron valores constantes de turbidez indicando que no se forman nuevas partículas de complejo insoluble.

Los parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales se muestran en las tablas 4.II y 4.III.

**TABLA 4.II**

<b>Parámetros de la interacción a pH 5,00 de TRP y EL100</b>	
$n/n$ (relación molar) [mol EL100/mol TRP]	$0,0657 \pm 2 \cdot 10^{-4}$
$k$ (constante de afinidad) [ $M^{-1}$ ]	$9,8 \cdot 10^6 \pm 7 \cdot 10^5$
$\Delta H^\circ$ (cal/mol)	$6,21 \cdot 10^4 \pm 3 \cdot 10^2$
$\Delta S^\circ$ (cal/mol/K)	240
$\Delta G^\circ$ (cal/mol)	- 9.598

**TABLA 4.III**

<b>Parámetros de la interacción a pH 5,50 de TRP y ES100</b>	
$n/n$ (relación molar) [mol ES100/mol TRP]	$0,0794 \pm 9 \cdot 10^{-4}$
$k$ (constante de afinidad) [ $M^{-1}$ ]	$1,14 \cdot 10^6 \pm 4 \cdot 10^4$
$\Delta H^\circ$ (cal/mol)	$5,42 \cdot 10^4 \pm 5 \cdot 10^2$
$\Delta S^\circ$ (cal/mol/K)	210
$\Delta G^\circ$ (cal/mol)	- 8.307

Para el caso del EL100, se puede observar que 15 moléculas de TRP interaccionan con alta afinidad con cada molécula de PE; mientras que para el ES100, 12 moléculas

interaccionan con alta afinidad. Es importante destacar que estos valores son sensiblemente inferiores a los obtenidos por turbidimetría (ver sección 4.1.2.2). Sin embargo, los valores de relación molar EL100/TRP y ES100/TRP obtenidos por ITC sí se condicen con los obtenidos en las medidas de cinética (ver sección 4.1.2.4): cuando la enzima y los PE se mezclan directamente en una única etapa, la relación molar a la cual se observa la máxima turbidez se relaciona directamente con la cantidad de moléculas de TRP unidas a cada molécula de polímero. Esto sugeriría que la turbidez desarrollada en los experimentos de titulación no se debe a la formación del complejo insoluble Eudragit<sup>®</sup>-TRP sino que los agregados de enzima al sistema alteran la solubilidad de cada PE.

La calorimetría da evidencia inequívoca de que existe interacción específica entre ambas especies y por ende se puede afirmar por esta técnica el número promedio de moléculas de enzima que se unen a una molécula de PE.

La interacción entre los PE Eudragit<sup>®</sup> y la TRP es conducida entrópicamente como se puede deducir de los valores de  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  (ambos positivos). Un valor de  $\Delta H^\circ$  positivo indica que la interacción es endotérmica. Un valor de  $\Delta S^\circ$  positivo indica un aumento del desorden del sistema, debido a la liberación de moléculas de agua estructurada alrededor de regiones hidrofóbicas, que supera al ordenamiento debido a la unión de la TRP con el PE. Estos resultados son congruentes con la presencia de una interacción hidrofóbica en la formación de estos complejos insolubles, aunque no se puede descartar la presencia de interacciones electrostáticas ya que este proceso es altamente dependiente del pH y la fuerza iónica (ver sección 4.1.2).

Los  $\Delta G^\circ$  negativos indican que la reacción se encuentra desplazada hacia la formación del complejo insoluble.

El sistema ALG-TRP a pH 3,50 presentó un comportamiento distinto al observado en los sistemas preparados con Eudragit<sup>®</sup>.

Los gráficos de potencia vs. tiempo obtenidos se muestran en la figura 4.24.

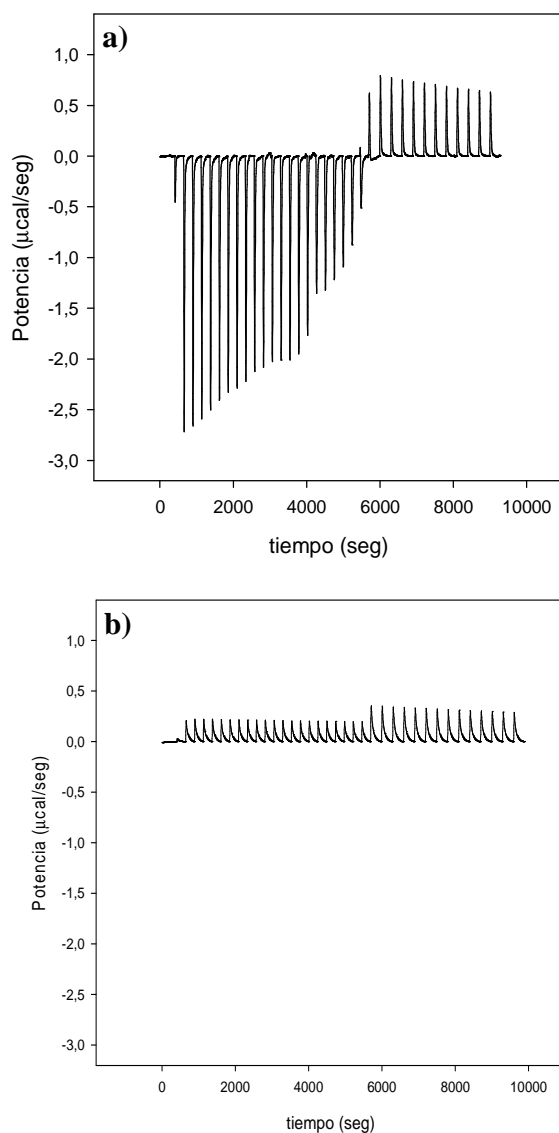


Figura 4.24: Gráficos de potencia vs. tiempo de **a)** titulación de TRP 0,3 mM con ALG 0,50 %P/V y **b)**  $Q_{disol.}$  de ALG 0,50 %P/V. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 3,50. Temperatura 25 °C.

La isoterma de titulación obtenida se presenta en la figura 4.25.

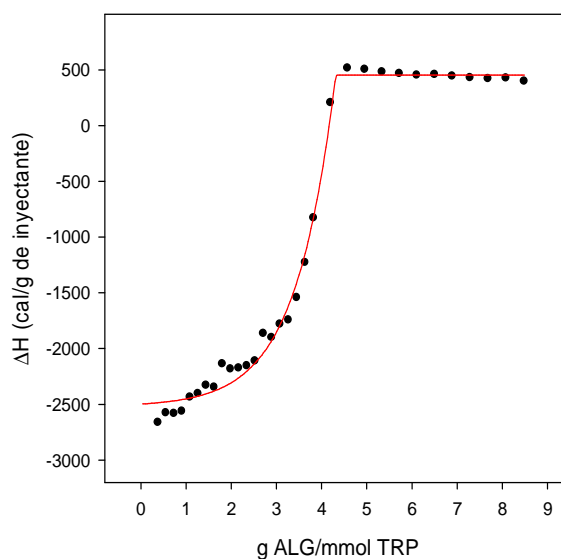


Figura 4.25: Titulación isotérmica de TRP 0,1 mM con ALG 0,50 %P/V. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 3,50. Temperatura 25 °C.

Se puede observar que el sistema con ALG presenta dos similitudes con los sistemas con EL100 y ES100: los datos experimentales ajustan a una sigmoidea y los valores (absolutos) de  $\Delta H^\circ$  disminuyen hasta alcanzar valores constantes, aunque en este caso distintos de cero. La primera característica indica que la interacción entre la enzima y el ALG seguiría un modelo de un tipo de sitios independientes y equivalentes. La segunda característica muestra que el sistema se satura a partir de una relación molar igual a 4,31 g ALG/mmol TRP (232  $\mu$ moles TRP/g ALG) y las moléculas de ALG que se inyectan al sistema no interaccionan con las moléculas de TRP.

Es importante destacar que este resultado es congruente con el observado en titulación turbidimétrica y cinética (ver secciones 4.1.2.2 y 4.1.2.4) que muestran un máximo de turbidez a 200  $\mu$ moles TRP/g ALG. A partir de este valor comenzaría el proceso de Maduración de Ostwald y el calor determinado en la región de saturación se correspondería con la formación de los agregados macroscópicos. Sin embargo, las cargas negativas de las partículas de complejo insoluble ALG-TRP no serían neutralizadas por la tripsina sino por los protones agregados junto con la misma.

De esta manera, se evidenció que el proceso de mezclado de las soluciones de TRP y ALG no afectó el mecanismo de formación del complejo insoluble.

La principal diferencia entre este sistema y aquellos con Eudragit<sup>®</sup> radica en que la interacción entre la enzima y el ALG presenta valores de  $\Delta H^\circ$  negativos, indicando que la formación del complejo ALG-TRP tiene asociada la liberación de calor al medio. Además, el valor de  $\Delta S^\circ$  también negativo muestra que el desorden del sistema disminuye debido a la unión del PE y la enzima para formar el complejo insoluble.

Los parámetros de la interacción se presentan en la tabla 4.IV.

**TABLA 4.IV**

<b>Parámetros de la interacción a pH 3,50 de TRP y ALG</b>	
<i>n/n (relación molar) [g ALG/mmol TRP]</i>	4,31 ± 0,05
<i>k (constante de afinidad) [M<sup>-1</sup>]</i>	2,8 10 <sup>3</sup> ± 4 10 <sup>4</sup>
<i>ΔH° (cal/g)</i>	- 2970 ± 50
<i>ΔS° (cal/g/K)</i>	- 26
<i>ΔG° (cal/g)</i>	- 4722

Los valores de  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  negativos indican que la interacción entre ALG y TRP es conducida entálpicamente y confirman la naturaleza netamente electrostática de la misma. Esto es congruente con los experimentos presentados en la sección 4.1.2 que reflejan la gran influencia que ejercen el pH y la fuerza iónica sobre la formación del complejo.

El  $\Delta G^\circ$  negativo indica que la reacción se encuentra desplazada hacia la formación del complejo insoluble.

#### 4.2.1.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la formación del complejo insoluble.

Los experimentos de ITC fueron realizados en presencia de NaCl 1,00 M para corroborar la naturaleza electrostática de la interacción PE-TRP observada en los diagramas de fase y en las isotermas de titulación turbidimétrica de la sección 4.1.2. Debido a la marcada dependencia que existe entre la formación del complejo insoluble PE/TRP y el pH y la fuerza iónica, resulta previsible se esperaría que la presencia de sal en elevadas concentraciones interfiera con la interacción entre ambas especies, inhibiendo la formación del complejo.

Las figuras 4.26 y 4.27 muestran los gráficos de potencia vs. tiempo obtenidos para los sistemas EL100-TRP a pH 5,00 y ES100-TRP a pH 5,50 en presencia de NaCl 1,00 M, respectivamente.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 2: Estudio de la interacción PE-TRP

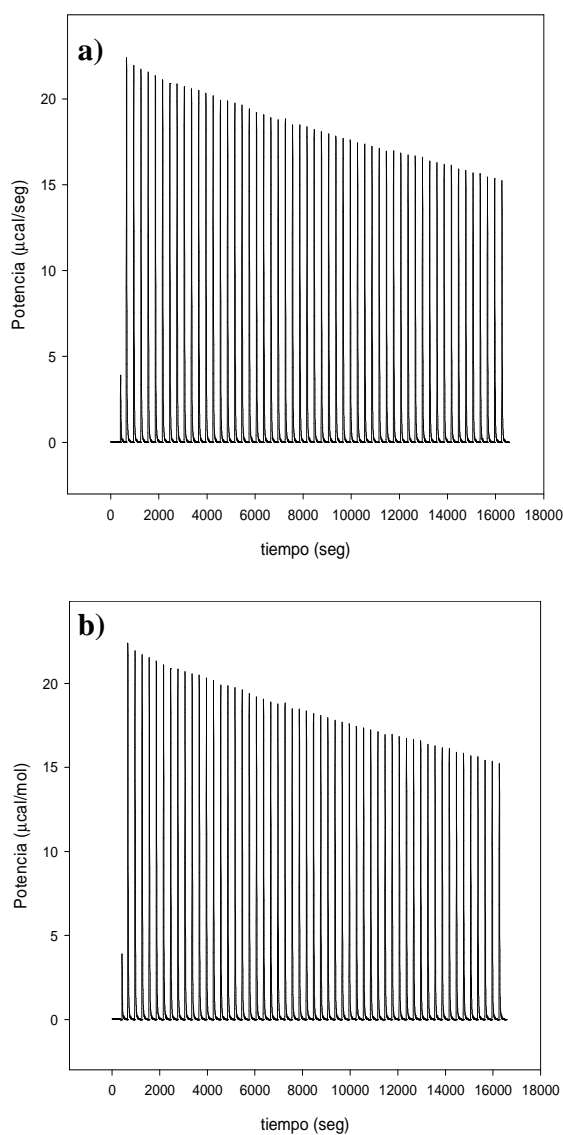


Figura 4.26: Gráficos de potencia vs. tiempo de **a)** titulación de TRP 0,3 mM con EL100 0,13 mM y **b)**  $Q_{disol.}$  de EL100 0,13 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,00 NaCl 1,00 M. Temperatura 25 °C.

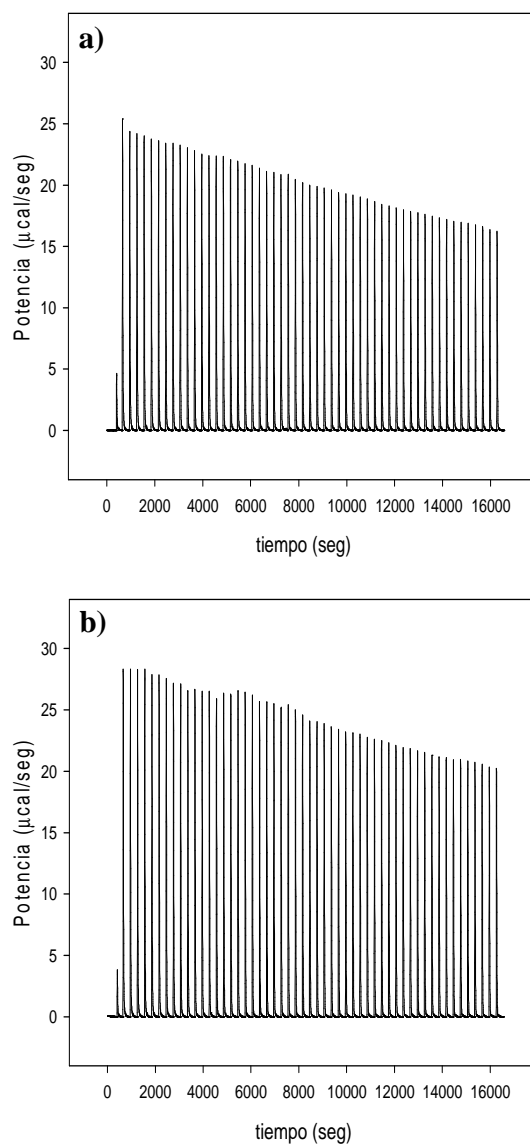


Figura 4.27: Gráficos de potencia vs. tiempo de **a)** titulación de TRP 0,3 mM con ES100 0,13 mM y **b)**  $Q_{disol.}$  de ES100 0,13 mM y 0,06 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,50 NaCl 1,00 M. Temperatura 25 °C.

Las isotermas de titulación obtenidas en presencia de NaCl 1,00 M para los sistemas EL100-TRP y ES100-TRP se presentan en las figuras 4.28 a) y b), respectivamente.

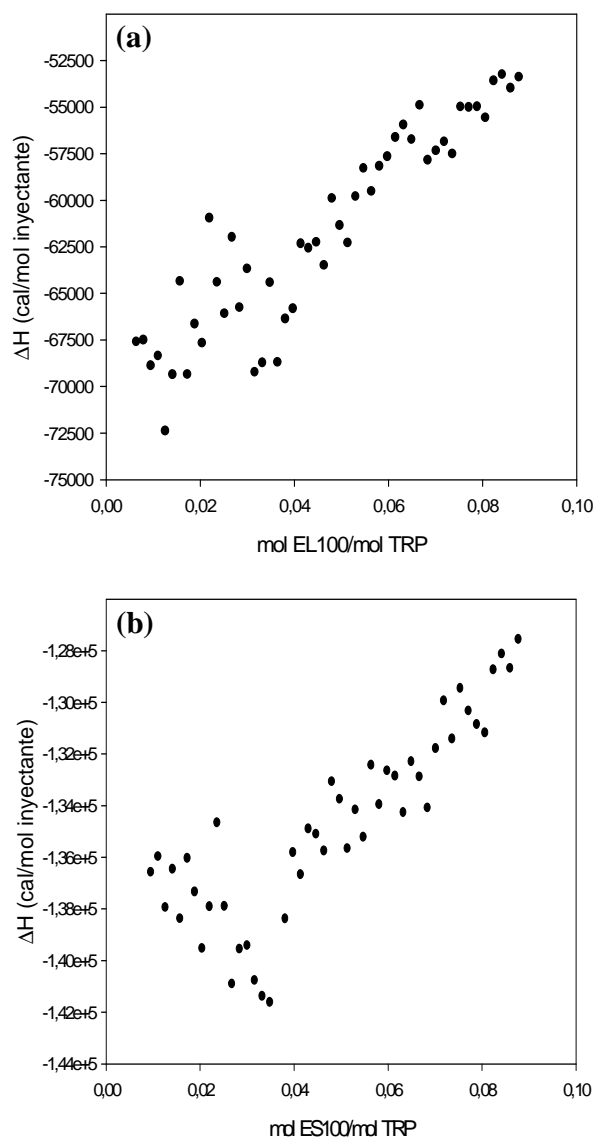


Figura 4.28: Titulación isotérmica de TRP 0,3 mM con (a) EL100 0,13 mM y (b) ES100 0,13 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH (a) 5,00 y (b) 5,50 NaCl 1,00 M. Temperatura 25 °C.

Puede apreciarse que ambos sistemas mostraron un aumento lineal de los valores de  $\Delta H$  con respecto a la relación molar PE/TRP. La ausencia de saturación y punto de inflexión indica que la enzima no interacciona con los PE cuando se encuentran en presencia de elevada fuerza iónica, en comparación con los mismos experimentos realizados en ausencia de NaCl.

Los resultados concuerdan con los observados en las titulaciones turbidimétricas de la sección 4.1.2.2 y confirman la presencia de interacciones electrostáticas entre la TRP y cada polímero.

Por otro lado, los valores de  $\Delta H$  calculados son negativos y disminuyen en valor absoluto a medida que la concentración de PE en el sistema aumenta. Esto indica que el agregado de PE al sistema conlleva la liberación de calor hacia el medio debido a su dilución en la celda. Esto sugiere que las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de polímero disminuyen y por ende un mayor número de moléculas de agua se estructuran alrededor de las zonas hidrofóbicas del PE. Esto aumenta las interacciones entre las moléculas de agua lo que deviene en la liberación de calor. A medida que la concentración de PE en la celda aumenta por los sucesivos agregados, las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de polímero aumentan, provocando el consumo de calor del medio. Esto genera una disminución en el valor absoluto del  $\Delta H$ .

Los  $\Delta H$  observados para el ES100 son mayores en valor absoluto que el EL100 debido a que la hidrofobicidad del esqueleto hidrocarbonado del primero es mayor y por lo tanto, un mayor número de moléculas de agua se estructuran alrededor de las moléculas de PE.

Para el caso del sistema ALG-TRP, contrariamente a lo que se observó en los sistemas EL100-TRP y ES100-TRP, los valores de  $\Delta H$  se mantienen constantes y cercanos a cero por cada agregado de PE al sistema (figura 4.30). La forma sigmoidea de la isoterma mostrada en la figura 4.25 (en ausencia de sal) desaparece cuando el sistema a pH 3,50 es suplementado con NaCl 1,00 M. Se puede concluir entonces que en presencia de una elevada fuerza iónica no existe interacción entre la TRP y el ALG y por ende, se inhibe la formación del complejo insoluble. Estos resultados son congruentes con los presentados en la sección 4.2.1.1 y confirman la naturaleza netamente electrostática de la interacción entre ambas especies.

Los gráficos de potencia vs. tiempo obtenidos se muestran en la figura 4.29

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 2: Estudio de la interacción PE-TRP

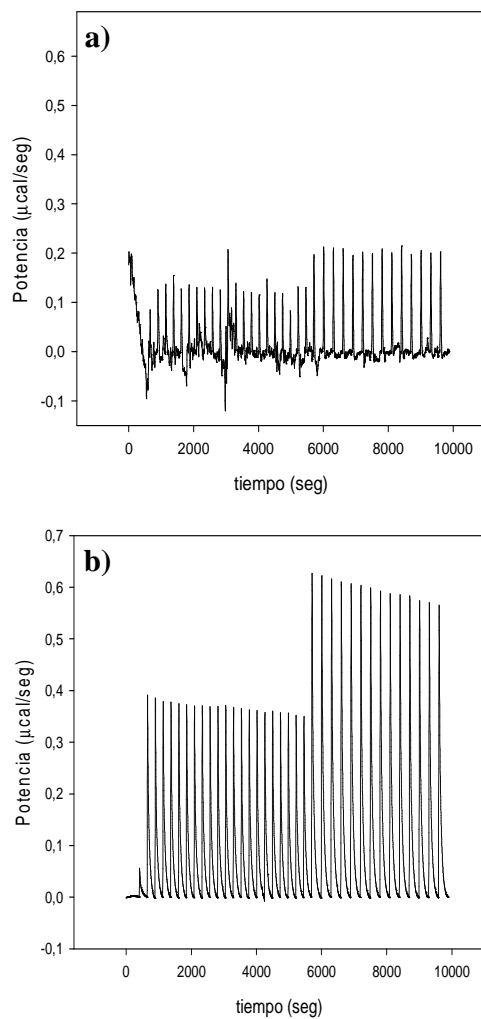


Figura 4.29: Gráficos de potencia vs. tiempo de la titulación de TRP 0,1 mM con ALG 0,50 %P/V y b)  $Q_{disol.}$  de ALG 0,50 %P/V. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 3,50. Temperatura 25 °C.

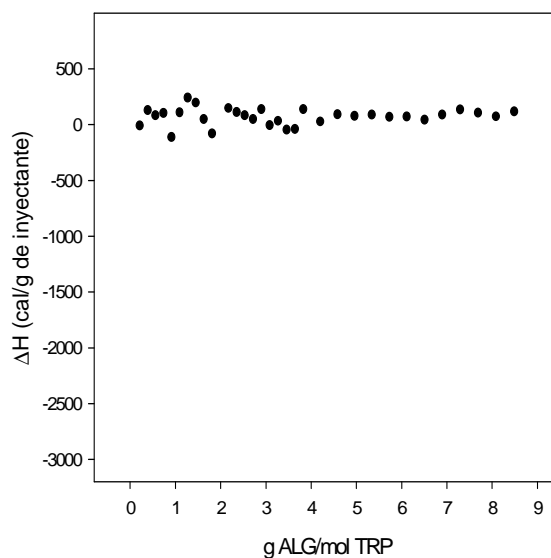


Figura 4.30: Titulación isotérmica de TRP 0,1 mM con ALG 0,50 %P/V. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 3,50 NaCl 1,00 M. Temperatura 25 °C.

#### 4.2.1.3. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00.

El estudio de la interacción entre los PE y la TRP a pH 8,00 tiene como objetivo analizar la formación del complejo entre ambas especies cuando la proteína presenta una baja densidad de carga positiva ya que el pH del medio se encuentra cercano a su pI. Esta nueva condición de trabajo permitiría comprobar la formación de un complejo soluble PE-TRP.

Los gráficos de potencia vs. tiempo obtenidos para los sistemas EL100-TRP y ES100-TRP a pH 8,00 se presentan en las figuras 4.31 y 4.32, respectivamente.

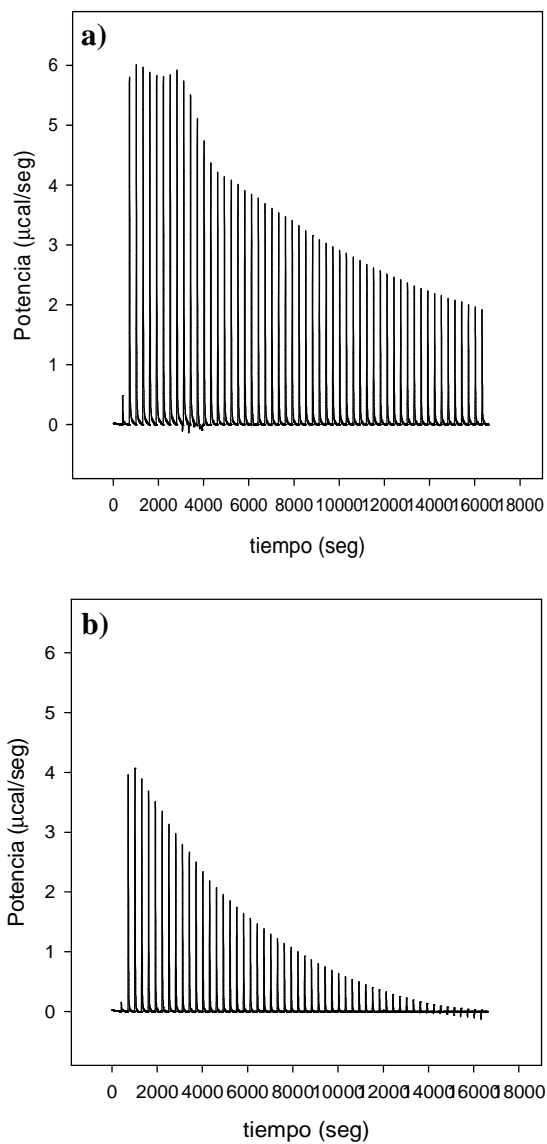


Figura 4.31: Gráficos de potencia vs. tiempo de **a)** titulación de TRP 0,3 mM con EL100 0,13 mM y **b)**  $Q_{disol.}$  de EL100 0,13 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00. Temperatura 25 °C.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 2: Estudio de la interacción PE-TRP

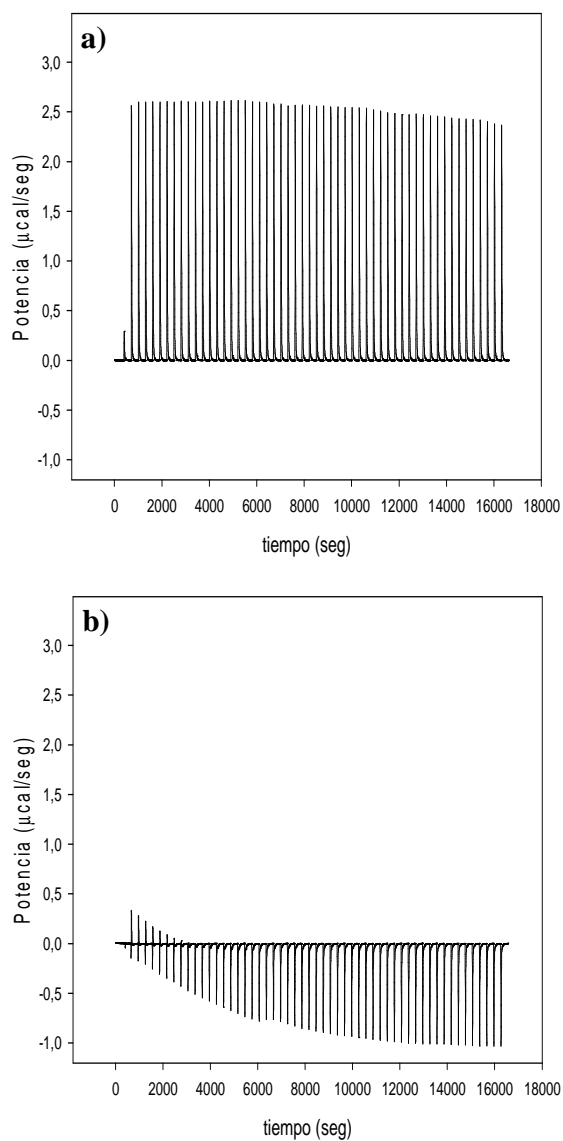


Figura 4.32: Gráficos de potencia vs. tiempo de **a)** titulación de TRP 0,3 mM con ES100 0,13 mM y **b)**  $Q_{disol.}$  de ES100 0,13 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00. Temperatura 25 °C.

Las isotermas de titulación obtenidas a pH 8,00 para los sistemas EL100-TRP y ES100-TRP se muestran en la figura 4.33.

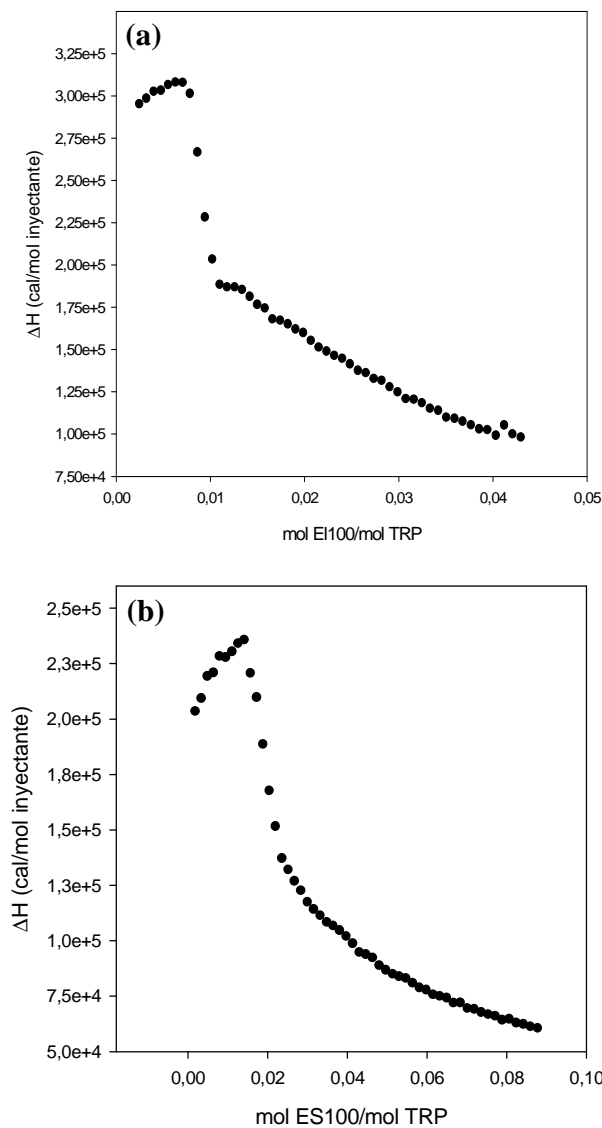


Figura 4.33: Titulación isotérmica de TRP 0,3 mM con (a) EL100 0,13 mM y (b) ES100 0,13 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00. Temperatura 25 °C.

Ambos sistemas presentan valores de  $\Delta H$  positivos que inicialmente aumentan y luego comienzan a disminuir a medida que la relación PE/TRP aumenta. Evidentemente, si no existiese interacción entre el polímero y la enzima, las isotermas de la figura 4.33 deberían ser similares a las de las figuras 4.28a) y b). Sin embargo, tampoco es sencillo aplicar un modelo

de interacción para explicar los datos experimentales obtenidos en estas condiciones de trabajo.

Aparentemente, ocurriría un proceso en dos etapas: en la primera, que corresponde a una baja concentración de polímero en el sistema, las moléculas de TRP se unirían a las de PE por medio de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas hasta alcanzar una relación molar PE/TRP igual a 0,007 para el sistema con EL100 y 0,014 para el sistema con ES100. La baja densidad de carga positiva presente en la superficie de la enzima disminuye las interacciones electrostáticas atractivas con cada PE y repulsivas con otras moléculas de TRP; favoreciendo indirectamente la presencia de las interacciones hidrofóbicas que resultan en los elevados valores de  $\Delta H$  medidos. En esta primera etapa se formarían complejos solubles saturados en moléculas de TRP. A partir de este punto, las moléculas de PE agregadas al sistema interactúan con las partículas de complejo soluble hidrofóbicamente y/o electrostáticamente. El resultado final son partículas de complejo con una menor relación TRP/PE.

El sistema ALG-TRP evidenció un comportamiento totalmente distinto a los sistemas preparados con Eudragit<sup>®</sup>. Los gráficos de potencia vs. tiempo y la isoterma de titulación se presentan en la figura 4.34 y 4.35, respectivamente.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 2: Estudio de la interacción PE-TRP

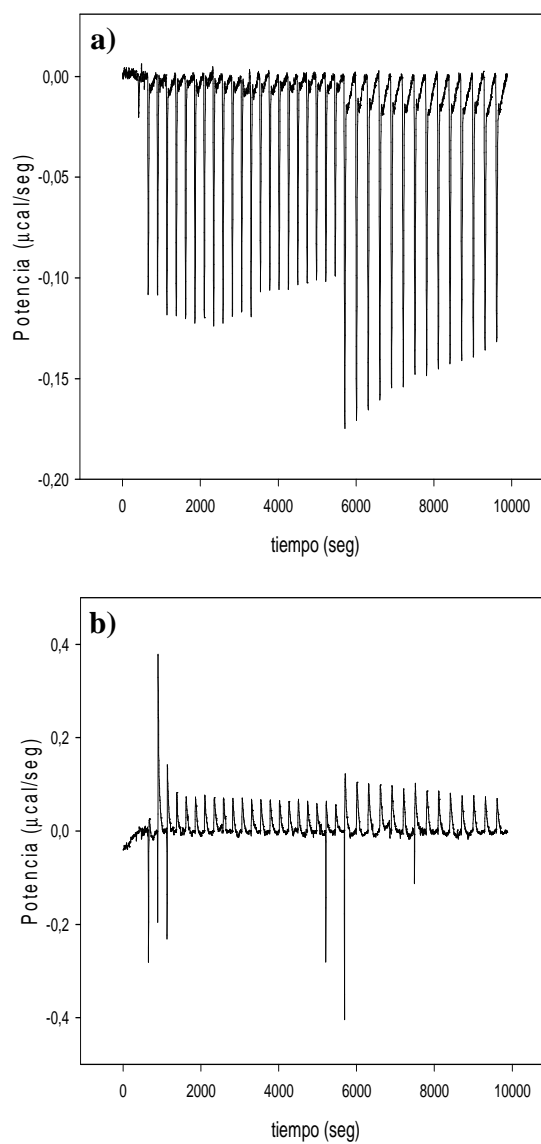


Figura 4.34: Gráficos de potencia vs. tiempo de la titulación de TRP 0,1 mM con ALG 0,50 %P/V y **b)**  $Q_{disol.}$  de ALG 0,50 %P/V. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00. Temperatura 25 °C.

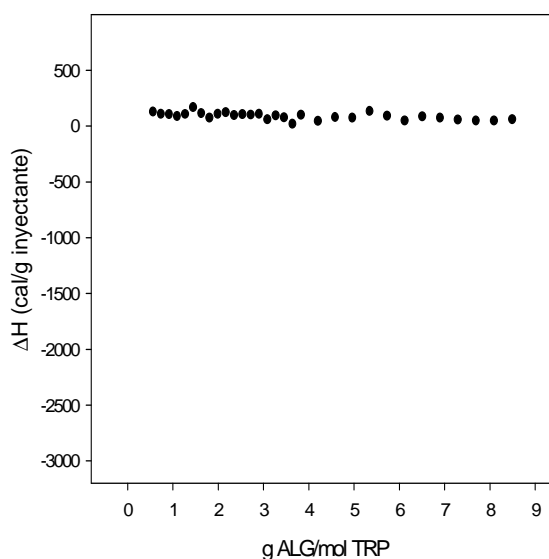


Figura 4.35: Titulación isotérmica de TRP 0,1 mM con ALG 0,50 %P/V. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00. Temperatura 25 °C.

Se puede observar que al trabajar a pH 8,00 el  $\Delta H$  se mantiene constante (y cercano a cero) por cada agregado de PE al sistema. Esto indica que la TRP y el ALG no interactúan a pH 8,00 debido a la disminución de la densidad de carga positiva de la TRP ( $pI \sim 11$ ). Además, se pone en manifiesto la naturaleza netamente electrostática de las interacciones que rigen la formación del complejo ALG-TRP ya que una variación en el pH del medio inhibe totalmente la interacción entre ambas especies.

La diferencia entre este sistema y aquellos preparados con los polímeros Eudragit® radica en que éstos están constituidos por subunidades que permiten la formación de interacciones hidrofóbicas con la TRP; mientras que el ALG, como se ha evidenciado en varios experimentos sólo es capaz de interactuar electrostáticamente con la enzima. Al disminuir la densidad de carga positiva en la superficie de la TRP se debilitan las interacciones electrostáticas con el ALG y por lo tanto no existe complejo soluble a pH 8,00.

#### 4.2.2. Estudio de la formación de los complejos insolubles PE-TRP por medidas de dispersión de luz.

Los estudios de DLS permiten analizar la formación de los complejos PE-TRP en base a cambios en los valores de radio hidrodinámico  $R_h$  determinados para las partículas en solución. Esta información, junto con la obtenida por calorimetría y turbidimetría, da pruebas

contendientes de la formación de complejos tanto insolubles como solubles. Es importante destacar que en los experimentos realizados a pH de precipitación (5,00 para EL100; 5,50 para ES100 y 3,50 para ALG) se trabajaron a concentraciones de PE y enzima muy diluidas en relación a los experimentos de titulación turbidimétrica y cinética (ver Materiales y Métodos – secciones 3.2.2.2, 3.2.2.4 y 3.2.4). Esto aseguró que la solución de trabajo no sea turbia lo cual resulta un inconveniente para esta técnica basada en la dispersión de luz.

La figura 4.36 muestra los valores de  $R_h$  obtenidos para los sistemas con EL100.

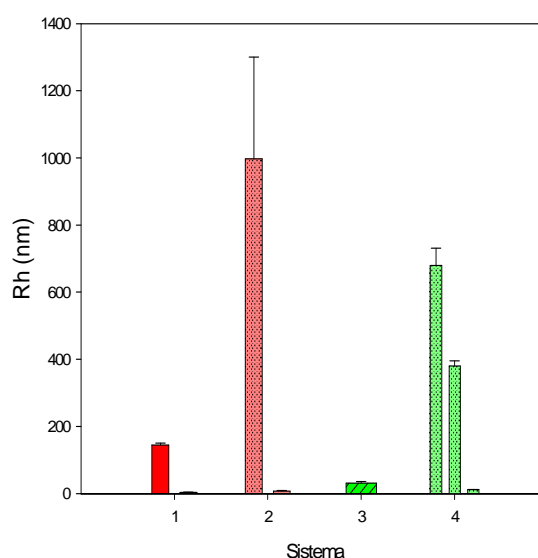


Figura 4.36:  $R_h$  medio de las partículas en sistemas con EL100: (1) EL100 pH 5,00; (2) EL100 pH 8,00; (3) EL100-TRP pH 5,00 y (4) EL100-TRP pH 8,00. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM. Temperatura 25 °C.

Se puede observar que en presencia de TRP los  $R_h$  determinados siempre disminuyeron, indicando que la interacción de la enzima con el EL100 genera una compactación de las partículas del sistema. Otro aspecto a tener en cuenta es la presencia de una población de partículas de tamaño 3,5-12 nm en los sistemas 1, 2 y 4 que podrían estar relacionadas con diferentes orientaciones del EL100 en solución el cual exhibe una configuración espacial similar a una barra. Estos radios no serán tenidos en cuenta para el análisis de los resultados.

El sistema 1 presentó un  $R_h$  igual a 145 nm que corresponde al tamaño de las partículas de EL100 en solución a pH 5,00. Cuando el PE y la TRP se incubaron a este pH (sistema 3), el  $R_h$  disminuyó a 30 nm. Este radio correspondería al complejo soluble EL100-TRP. A pH 8,00

también se evidenció una disminución del  $R_h$  desde 1000 nm (sistema 2) a 380 nm al incubar el EL100 con TRP (sistema 4). Este último además presentó una segunda población de partículas con  $R_h$  igual a 680 nm que podría corresponder al EL100, si se tiene en cuenta que el error del  $R_h$  del sistema 2 es considerable con respecto al promedio. De esta manera, el complejo soluble EL100-TRP a pH 8,00 tendría un  $R_h$  igual a 380 nm; un valor aproximadamente 12 veces mayor al del complejo a pH 5,00. Estos resultados corroborarían los observados por ITC en las secciones 4.2.1.1 y 4.2.1.3. Asumiendo que el complejo insoluble se forma únicamente por agregación del complejo soluble y que por ende, la estequiometría de uno es igual a la del otro; el complejo soluble a pH 8,00 contendría 9,5 veces más moléculas de TRP que el complejo soluble a pH 5,00. Evidentemente, el tamaño del complejo está relacionado con la cantidad de moléculas de TRP que lo conforman.

La figura 4.37 muestra los valores de  $R_h$  obtenidos para los sistemas con ES100.

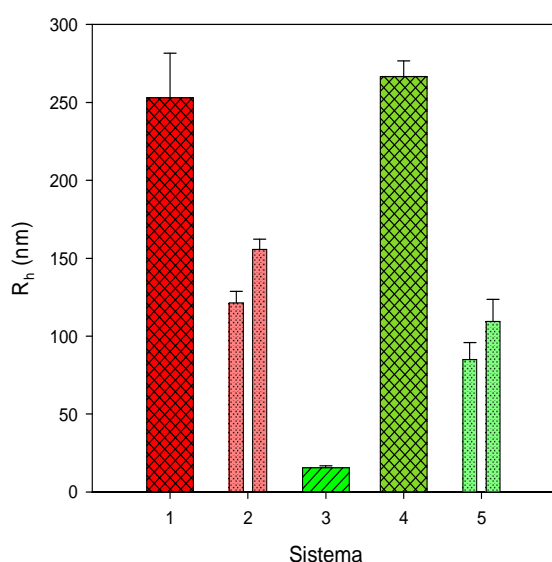


Figura 4.37:  $R_h$  medio de las partículas en sistemas con ES100: (1) ES100 pH 5,50; (2) ES100 pH 8,00; (3) ES100-TRP pH 5,50; (4) ES100-TRP pH 5,50 NaCl 1,00 M y (5) ES100-TRP pH 8,00. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM. Temperatura 25 °C.

Se puede observar que las partículas de ES100 en el sistema 1 y en el sistema 2 presentan  $R_h$  diferentes: a pH 5,50 se observa una única población con un  $R_h$  de 250 nm; mientras que a pH 8,00 aparecen dos poblaciones, con  $R_h$  iguales a 120 nm y 155 nm.

Cuando el PE y la enzima se incuban a pH 5,50 (sistema 3); el  $R_h$  observado disminuye a un valor igual a 15 nm, en comparación con el ES100 al mismo pH. Esto evidencia la

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 2: Estudio de la interacción PE-TRP

formación del complejo ES100-TRP y es congruente con los experimentos de titulación turbidimétrica (ver sección 4.1.2.2) e ITC (ver sección 4.2.1.1).

Al preparar el sistema 3 en presencia de NaCl 1,00 M (sistema 4) se observó que el  $R_h$  fue igual al obtenido para el sistema 1. Esto indicaría que el ES100 y la TRP no interaccionan en presencia de una elevada fuerza iónica, lo cual se condice con los resultados de las titulaciones turbidimétricas e ITC en presencia de NaCl.

El sistema preparado ES100-TRP a pH 8,00 (sistema 5) presentó dos poblaciones de  $R_h$  al igual que el sistema 2, aunque sólo uno de los  $R_h$  coincidió en ambos: el de 120 nm. El otro  $R_h$  igual a 85 nm puede atribuirse al complejo soluble ES100-TRP y confirmaría los datos observados en los experimentos de ITC a pH 8,00 (ver sección 4.2.1.3).

Estos resultados se condicen con los observados por ITC: el complejo ES100-TRP a pH 8,00 presentó un  $R_h$  y una cantidad de moléculas de TRP 5,5 veces mayor que el complejo soluble a pH 5,50 (asumiendo que posee la misma estequiometría que el complejo insoluble).

En comparación con el complejo EL100-TRP; el complejo ES100-TRP siempre presentó un tamaño menor. Esto podría deberse no sólo al número de moléculas de enzima que forman parte de cada complejo sino también al grado de agregación de cada uno.

Los resultados obtenidos para el complejo ALG-TRP se presentan en la figura 4.38.

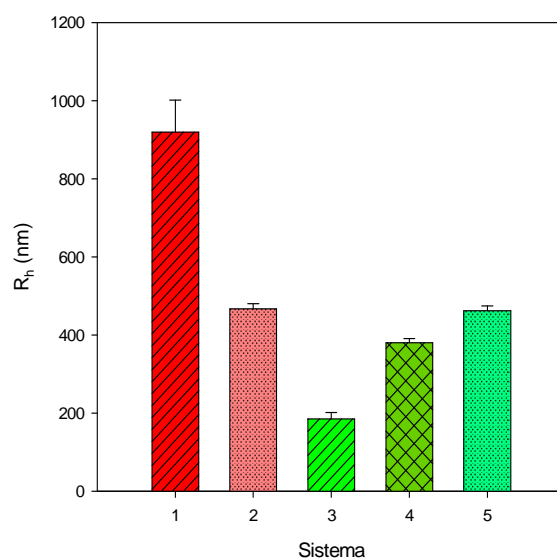


Figura 4.38:  $R_h$  medio de las partículas en sistemas con ALG: (1) ALG pH 3,50; (2) ALG pH 8,00; (3) ALG-TRP pH 3,50; (4) ALG-TRP pH 3,50 NaCl 1,00 M y (5) ALG-TRP pH 8,00. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM. Temperatura 25 °C.

En este caso también se puede observar que las partículas de ALG presentan dos poblaciones  $R_h$  diferentes a pH 3,50 (sistema 1) y 8,00 (sistema 2); centradas en 920 nm y 470 nm, respectivamente.

El sistema 3, preparado con ALG y TRP a pH 3,50, mostró una única población de partículas con un  $R_h$  de aproximadamente 185 nm. Este radio se le atribuye a las partículas de complejo formadas y al igual que ocurría en los sistemas preparados con ES100, presentan un mayor grado de compactación que las partículas de ALG al mismo pH en ausencia de enzima (sistema 1).

Al preparar el sistema 3 en presencia de NaCl 1,00 M se observó un aumento del  $R_h$  calculado aunque no igualó al determinado en el sistema 1 (contrariamente a lo ocurrido con el ES100). Esto podría deberse a que en presencia de elevada fuerza iónica la conformación del ALG no sea la misma que en su ausencia. Los iones  $\text{Na}^+$  podrían apantallar las cargas del PE confiriéndole al mismo una mayor flexibilidad y una forma similar a una esfera, lo que conllevaría a tiempos de decaimientos menores en relación a la forma de barra que podría adoptar el ALG a pH 3,50. Estos menores tiempos de decaimiento se reflejan luego en menores  $R_h$ . Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos en los experimentos de titulación turbidimétrica e ITC en presencia de NaCl indican que el complejo ALG-TRP no se forma en presencia de elevada fuerza iónica, el  $R_h$  determinado en el sistema 3 sería el del PE en esta condición.

El sistema preparado con ALG y TRP a pH 8,00 (sistema 5) presentó una única población de partículas con un  $R_h$  similar al observado en el sistema 2, correspondiente al PE en ausencia de enzima. Esto indica que el ALG y la TRP no interactúan a pH 8,00; contrariamente a lo observado para el ES100 que sí interactúa con la enzima para dar un complejo soluble. Estos datos se condicen con los observados por ITC (ver sección 4.2.1.3) y corroboran la presencia de interacciones hidrofóbicas entre el PE y la enzima para la formación del complejo soluble.

### 4.3.1. Análisis conformacional de la TRP.

#### 4.3.1.1. Espectros de absorción UV-vis de TRP en ausencia y presencia de cada PE.

Las figuras 4.39 y 4.40 muestran los espectros de absorción de la TRP en ausencia y presencia de EL100 y ES100, respectivamente.

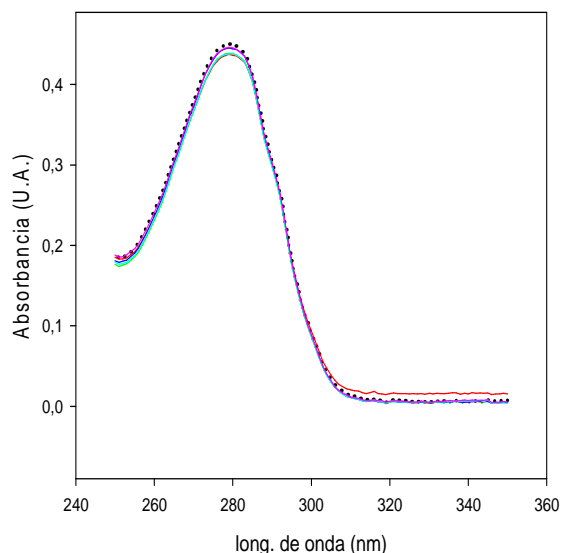


Figura 4.39: Espectros de absorción de TRP 14  $\mu\text{M}$  en (●●●) ausencia y presencia de EL100 a distintas relaciones molares: (—) 3,25; (—) 5,42; (—) 8,08; (—) 16,21 y (—) 32,46. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00. Temperatura 25 °C.

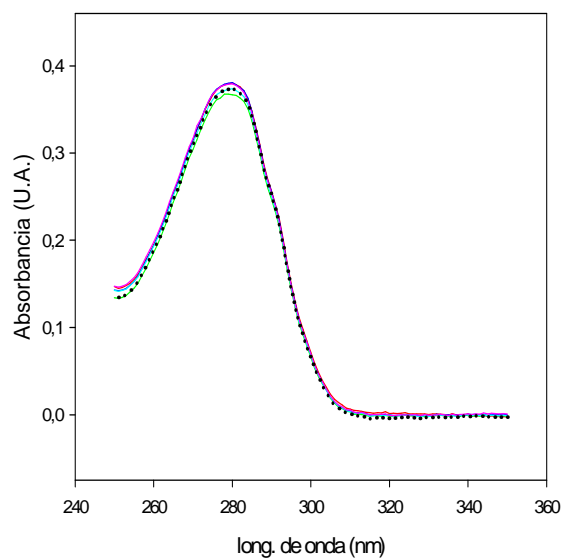
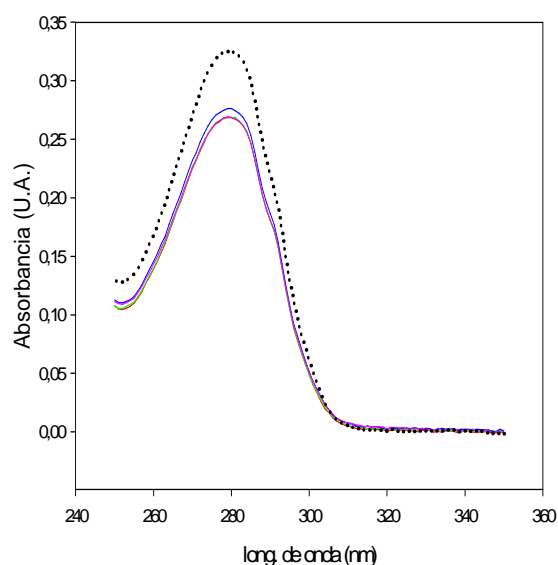


Figura 4.40: Espectros de absorción de TRP 14  $\mu\text{M}$  en (●●●) ausencia y presencia de ES100 a distintas relaciones molares: (—) 3,25; (—) 5,42; (—) 8,08; (—) 16,21 y (—) 32,46. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00. Temperatura 25 °C.

En ambos casos se observa que la presencia del PE no modificó la posición del pico de absorción (ubicado a 279 nm), correspondiente al máximo de absorción de los residuos aromáticos de la proteína. Esto indica que la presencia de estos polímeros no altera el entorno cercano a los triptófanos, siendo éste un indicio de estabilidad de la estructura terciaria de la enzima.

El espectro de absorción de TRP en presencia de ALG se muestra en la figura 4.41. Se puede observar que la posición del pico de absorción no se modificó en presencia de ALG.



*Figura 4.41: Espectros de absorción de TRP 11  $\mu$ M en (•••) ausencia y presencia de ALG a distintas relaciones TRP/ALG ( $\mu$ mol/g): (—) 235,30; (—) 333,33; (—) 689,66 y (—) 3333,33. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00. Temperatura 25 °C.*

#### 4.3.1.2. Espectros de dicroísmo circular de TRP en ausencia y presencia de PE.

La figura 4.42a) y b) muestra los espectros de dicroísmo circular de la TRP en ausencia y presencia de EL100 a pH 5,00 y ES100 a pH 5,50.

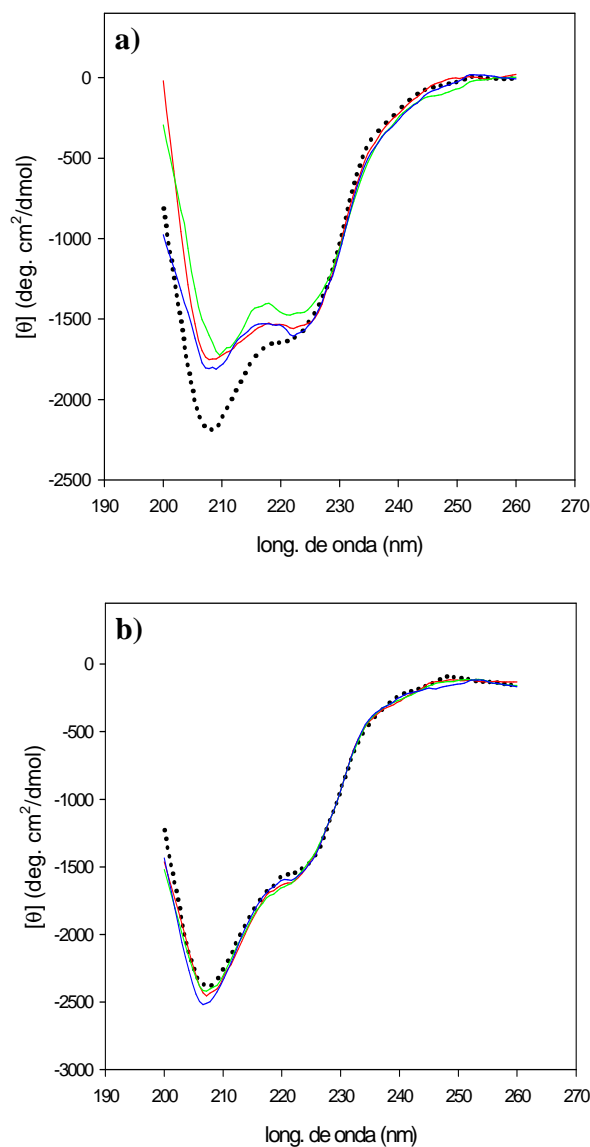


Figura 4.42: Espectros de DC en el UV lejano de TRP  $2,00 \mu\text{M}$  en (•••) ausencia y presencia de **a)** EL100 y **b)** ES100 a diferentes relaciones molares TRP/PE: (—) 68,50; (—) 33,33 y (—) 13,51. Medio buffer Pi 50 mM pH **a)** 5,00 y **b)** 5,50. Temperatura  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Todos los espectros presentan dos bandas de DC negativas a 208 nm y 220 nm correspondientes a las estructuras de  $\beta$ -lámina y  $\alpha$ -hélices.

Cuando la enzima interacciona con el EL100 se puede observar una disminución de la banda a 208 nm lo que evidenciaría una pérdida parcial de estructura secundaria  $\beta$ -plegada.

Por otro lado, la presencia del ES100 no modificó el espectro de la TRP indicando que la interacción de la enzima con el PE no altera su estructura secundaria.

## 4.3.1.3. Estudio de la estabilidad estructural de la TRP por medidas de calorimetría.

La DSC permite analizar la estabilidad térmica de la TRP en medios, en ausencia y presencia de cada PE. Para sistemas complejos (como los que se estudian en esta tesis) que presentan un gran número de interacciones entre una proteína y un PE; el parámetro de mayor interés es el  $T_m$  ya que está directamente relacionado con la estabilidad de la estructura proteica. Los demás parámetros como el  $\Delta H_{cal}$  carecen de validez y pueden llevar a conclusiones erróneas debido a que los estados iniciales del sistema, en ausencia y presencia de cada PE, difieren considerablemente entre sí.

Además, a medida que la enzima se desnatura, se establecen nuevas interacciones (y otras desaparecen) entre la TRP y cada PE dificultando el análisis de los datos experimentales.

La figura 4.43, 4.44 y 4.45 presenta las curvas de desnaturación de TRP obtenidas a diferentes pHs y los respectivos ajustes realizados por deconvolución de los picos.

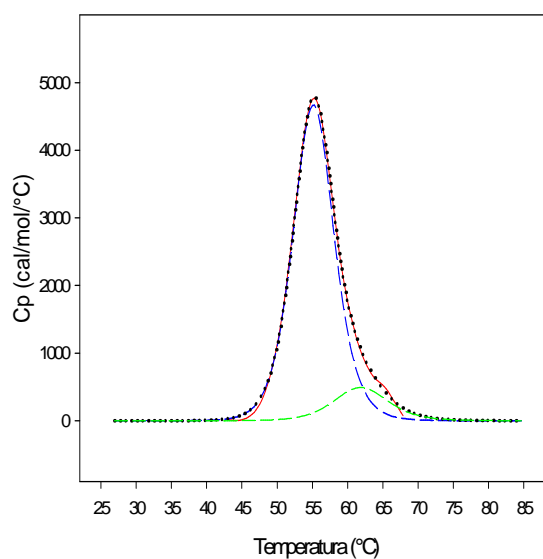


Figura 4.43: Curvas de desnaturación de TRP 0,30 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 3,00. (—) experimental; (···) ajuste; (--) T55 y (--) T62.

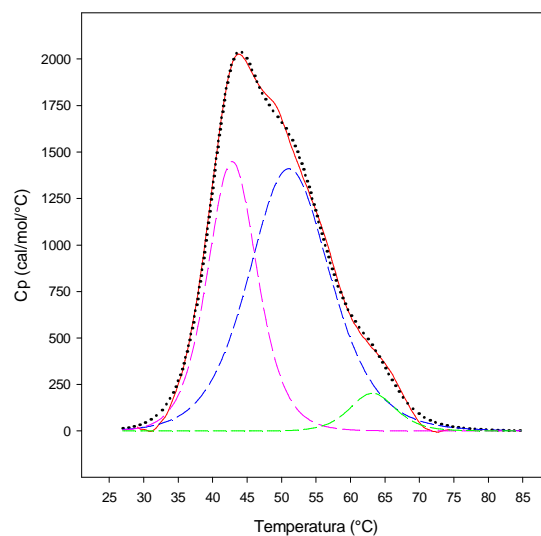


Figura 4.44: Curvas de desnaturalización de TRP 0,30 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,00. (—) experimental; (···) ajuste; (---) T43; (---) T52 y (---) T63.

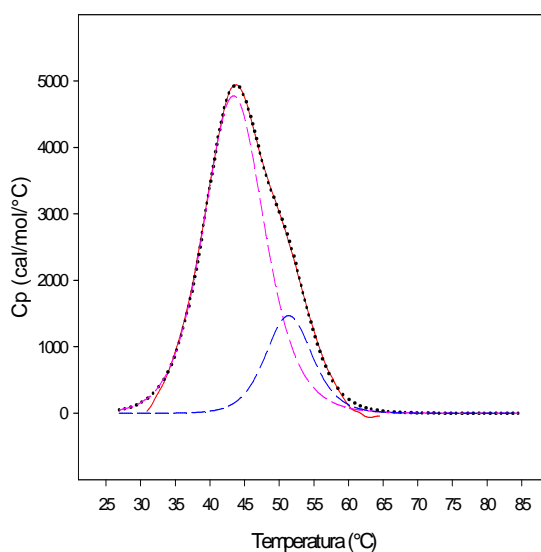


Figura 4.45: Curvas de desnaturalización de TRP 0,30 mM. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 8,00. (—) experimental; (···) ajuste; (---) T43 y (---) T52.

Se puede observar que tanto la forma de la curva como el área debajo de la misma ( $\Delta H_{\text{cal}}$ ) se modifican al cambiar el pH. Además, a cada pH aparecen y desaparecen

transiciones, lo cual indica claramente que el mecanismo de desnaturalización de la TRP es diferente en cada medio; consecuencia del cambio estructural que sufre la enzima.

Los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 4.V.

TABLA 4.V

Sistema	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{cal}$ (kcal/mol)
TRP pH 3,00	55,28	40,02
TRP pH 5,00	44,00	45,01
TRP pH 8,00	43,82	67,36

Los resultados muestran que la TRP presenta la mayor estabilidad térmica a pH 3,00. A pH 5,00 y 8,00 posee la misma  $T_m$  aunque el  $\Delta H_{cal}$  aumenta y por ende debe aportarse más energía al sistema para promover la desnaturalización de la TRP.

Los parámetros obtenidos por deconvolución de las curvas experimentales se muestran en la tabla 4.VI.

TABLA 4.VI

Sistema	Transición	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{cal}$ (kcal/mol)
TRP pH 3,00	T55	55,2 ± 0,1	35,9 ± 0,1
	T63	61,9 ± 0,5	5,0 ± 0,1
TRP pH 5,00	T43	43,0 ± 0,1	16,2 ± 1,7
	T52	51,5 ± 0,2	25,7 ± 2,5
	T63	62,7 ± 0,4	3,8 ± 0,9
TRP pH 8,00	T43	43,5 ± 0,1	55,5 ± 0,8
	T52	51,4 ± 0,1	13,2 ± 0,8

Se puede observar que la TRP presenta dos transiciones a pH 3,00 indicando que dos dominios se desnaturalizan independientemente uno del otro. Cuando la enzima se incubó a pH 5,00 la transición cuatro desaparece y aparecen dos nuevas transiciones a 43,06 °C y 51,56 °C. La transición T63 se mantiene pero presenta un  $\Delta H_{cal}$  levemente menor.

A pH 8,00 la TRP muestra las transiciones T43 y T52 observadas a pH 5,00 pero con  $\Delta H_{cal}$  diferentes; mientras que la transición a T63 desaparece totalmente. La ausencia de este dominio podría estar relacionada con la activación de la TRP a este pH.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 3: Estudio de la estabilidad de TRP

Por otro lado, la ausencia del dominio que se desnaturaliza a 55°C podría ser la causa de la desestabilización de la estructura proteica a pH 5,00 y 8,00 en comparación con pH 3,00 (ver tabla 4.V).

Al incubar la TRP en presencia de EL100, el mecanismo de desnaturalización de la enzima se modificó tanto a pH 5,00 como a pH 8,00. Las curvas de desnaturalización de TRP y los  $T_m$  y  $\Delta H_{cal}$  obtenidos se muestran en la figura 4.46 y en la tabla 4.VII, respectivamente.

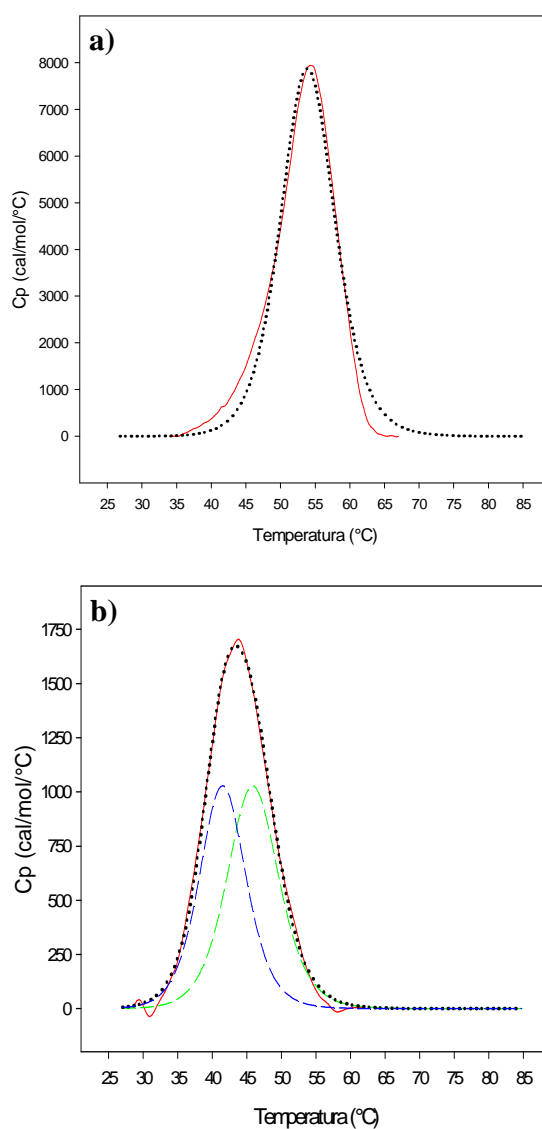


Figura 4.46: Curvas de desnaturalización de TRP 0,30 mM en presencia de EL100 ( $\text{mol TRP/mol EL100} = 10,86$ ). Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH (a) 5,00 y (b) 8,00. (—) experimental; (···) ajuste; (--) T41 y (--) T46.

TABLA 4.VII

Sistema EL100-TRP	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{cal}$ (kcal/mol)
<i>pH 5,00</i>	54,51	79,41
<i>pH 8,00</i>	43,88	19,02

Los resultados indican que la estabilidad térmica de la TRP aumenta al interactuar con el EL100 a pH 5,00; lo cual se evidencia por el aumento en 10 °C del  $T_m$  determinado en ausencia del PE. A pH 8,00 la estabilidad de la enzima no se modifica por la presencia del EL100. Además, los  $\Delta H_{cal}$  obtenidos en ausencia y presencia del PE son diferentes entre sí (ver tabla 4.V).

Los datos de la deconvolución de las curvas experimentales de la figura 4.46 se muestran en la tabla 4.VIII.

TABLA 4.VIII

Sistema EL100-TRP	Transición	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{cal}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{v\text{Hoff}}$ (kcal/mol)
<i>pH 5,00</i>	<i>T54</i>	$54,5 \pm 0,2$	$82,0 \pm 0,1$	$81,6 \pm 0,1$
<i>pH 8,00</i>	<i>T41</i>	$41,6 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$88,0 \pm 0,1$
	<i>T46</i>	$45,9 \pm 0,1$	$10,2 \pm 0,1$	$81,6 \pm 0,2$

Se puede observar que el mecanismo de desnaturalización de la TRP en presencia de EL100 es distinto a cada pH. Además, la presencia del polímero también modifica el mecanismo de desnaturalización de la TRP: a pH 5,00 en ausencia de EL100, la enzima exhibe tres transiciones mientras que en presencia del PE sólo muestra una transición con  $\Delta H_{vH}$  similar a  $\Delta H_{cal}$ . Esta conducta es compatible con un modelo de equilibrio de dos estados y evidencia que sólo existen dos macroestados significativamente poblados: el estado nativo (*N*), con una estructura plegada y el estado desnaturalizado o desplegado (*D*).

A pH 8,00 en presencia de EL100, la enzima presenta dos transiciones diferentes a las presentadas a en ausencia del PE; aunque esto no afecta estabilidad térmica global de la TRP.

Las curvas obtenidas para el sistema ES100-TRP se muestran en la figura 4.47. La tabla 4.IX presenta los parámetros obtenidos por ajuste de dichas curvas.

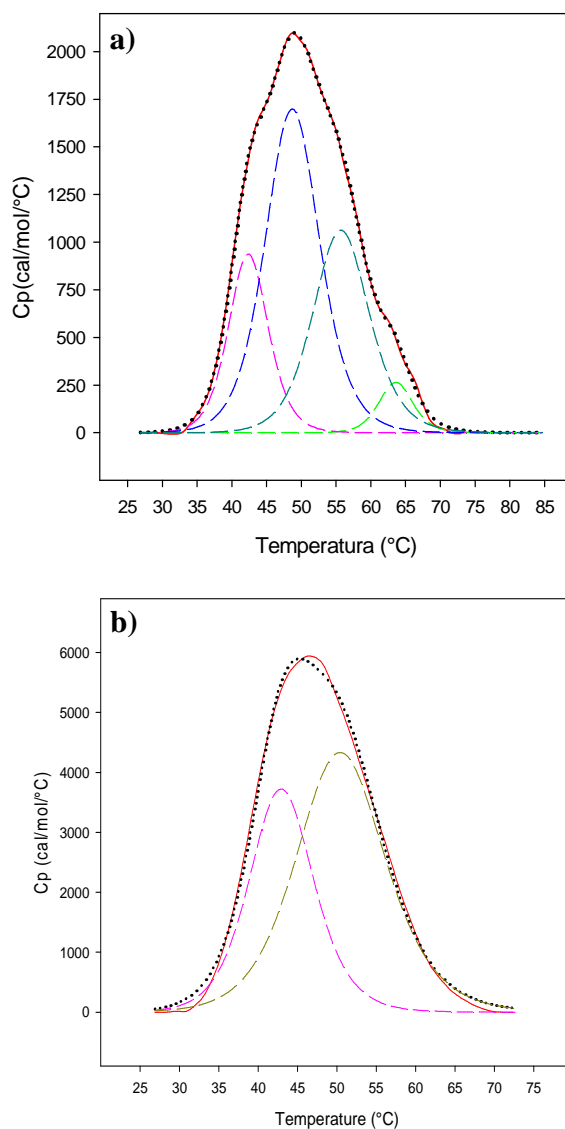


Figura 4.47: Curvas de desnaturalización de TRP 0,30 mM en presencia de ES100 (mol TRP/mol ES100 = 10,86). Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH (a) 5,50 y (b) 8,00. (—) experimental; (···) ajuste; (---) T42; (---) T49(50); (---) T49(52); (---) T56(52) y (---) T63.

TABLA 4.IX

Sistema ES100-TRP	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{cal}$ (kcal/mol)
pH 5,50	48,69	37,73
pH 8,00	46,58	103,61

Los resultados indican que a pH 5,50 y pH 8,00 el ES100 estabiliza la estructura de la enzima contra la desnaturalización térmica. El valor del  $\Delta H_{cal}$  obtenido en presencia del PE a pH 5,00 es menor que en su ausencia. A pH 8,00 el valor del  $\Delta H_{cal}$  obtenido en presencia de ES100 es mayor que en su ausencia.

Los parámetros obtenidos por deconvolución de las se muestran en la tabla 4.X.

**TABLA 4.X**

<b>Sistema ES100-TRP</b>	<b>Transición</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b><math>\Delta H_{cal}</math> (kcal/mol)</b>
<i>pH 5,50</i>	<i>T42</i>	42,4 ± 0,1	7,1 ± 0,8
	<i>T49(52)</i>	48,8 ± 0,1	17,6 ± 2,2
	<i>T56(52)</i>	55,8 ± 0,3	11,5 ± 1,8
	<i>T63</i>	63,6 ± 0,1	1,7 ± 0,3
<i>pH 8,00</i>	<i>T50</i>	50,6 ± 0,3	65,2 ± 3,6
	<i>T42</i>	43,0 ± 0,2	40,5 ± 3,5

A pH 5,00 en ausencia de los PE, la TRP presentó tres dominios que se desnaturalizan independientemente uno del otro (ver tabla 4.VI). En presencia de ES100, la transición *T52* se divide en dos transiciones, la *T49(52)* y la *T56(52)* con menores valores de  $\Delta H_{cal}$ , indicando que el ES100 interacciona con este dominio alterando su estabilidad y su mecanismo de desnaturalización. Es importante destacar que el  $T_m$  de las nuevas transiciones se encuentran a 3 °C del correspondiente a la transición *T52*. Además, la suma de los  $\Delta H_{cal}$  es similar al  $\Delta H_{cal}$  de la transición *T52*. Las transiciones *T42* y *T63* mostraron una disminución de los valores de  $\Delta H_{cal}$  pero sin cambio en el  $T_m$ . Esto sugiere que el ES100 no afecta la estabilidad térmica de estos dominios.

A pH 8,00 y en presencia de ES100, la curva de desnaturalización de TRP mostró transiciones con los mismos  $T_m$  que en ausencia del PE; aunque con diferentes  $\Delta H_{cal}$  lo que demostraría que el ES100 no altera la estabilidad térmica de estos dominios.

#### **4.3.2. Análisis de la actividad catalítica de TRP.**

##### **4.3.2.1. Análisis de la actividad de TRP en presencia de cada PE.**

Las figuras 4.48, 4.49 y 4.50 muestran la actividad catalítica de la enzima para distintas relaciones TRP/PE cuando forma parte de los complejos insolubles con cada EL100-TRP, ES100-TRP y ALG-TRP, respectivamente.

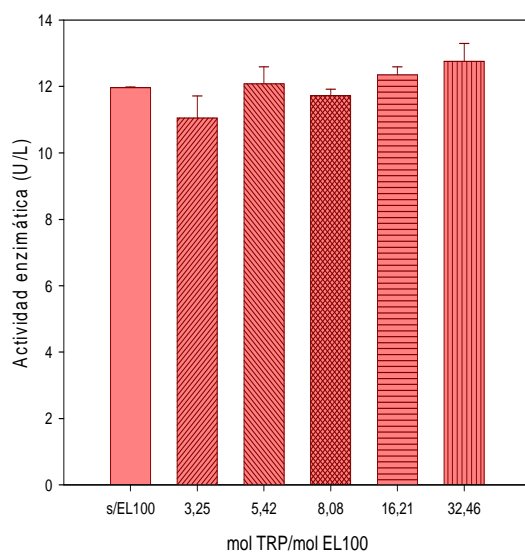


Figura 4.48: Actividad enzimática en presencia de EL100 a diferentes relaciones TRP/EL100. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C.

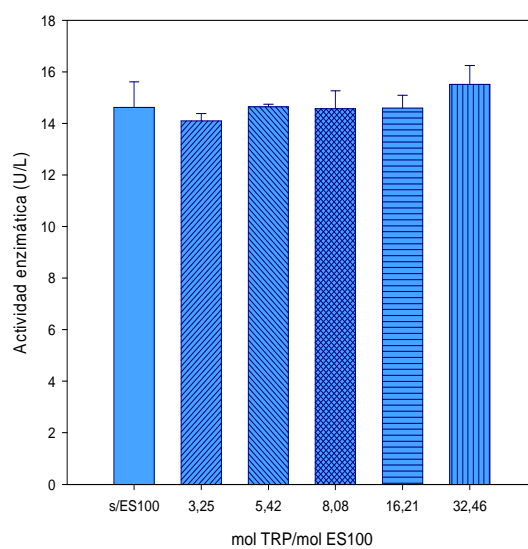


Figura 4.49: Actividad enzimática en presencia de ES100 a diferentes relaciones TRP/ES100. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,50. Temperatura 25 °C.

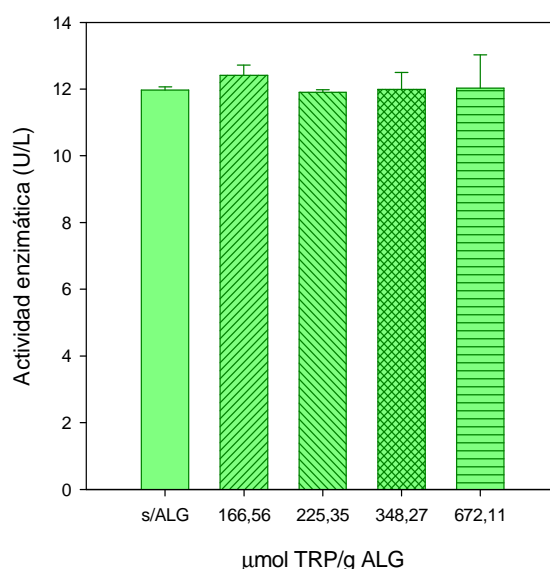


Figura 4.50: Actividad enzimática en presencia de ALG a diferentes relaciones TRP/ALG. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 3,50. Temperatura 25 °C.

Las gráficas muestran que la actividad catalítica no varía significativamente en presencia de distintas concentraciones de PE respecto de la enzima sola. Aunque la interacción con cada polímero afecta el mecanismo de desnaturalización de TRP y modifica los espectros de DC en el sistema TRP-EL100; estos experimentos indican que el sitio activo de la misma no se ve afectado; lo cual es muy importante ya que todas las aplicaciones que se hacen de la TRP (y de muchas otras enzimas) requieren que se mantenga inalterada su actividad catalítica.

#### 4.3.2.2. Análisis de la actividad de TRP a través del tiempo.

Los experimentos de estabilidad enzimática a través del tiempo para los sistemas preparados con EL100 y ES100 se muestran en la figura 4.51 y 4.52.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 3: Estudio de la estabilidad de TRP

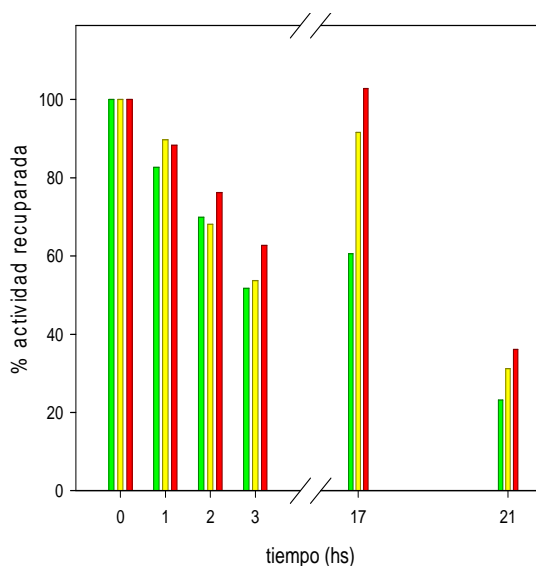


Figura 4.51: Porcentaje de actividad enzimática retenida a través del tiempo. (•) TRP 0,11 mM; (•) EL100-TRP en suspensión y (•) PP redissuelto. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C.

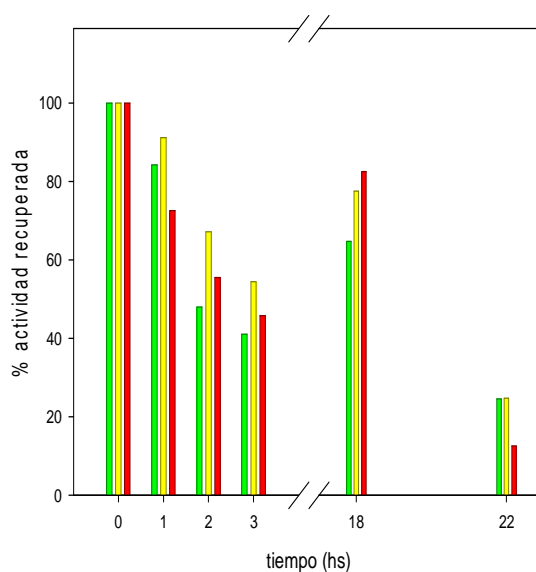


Figura 4.52: Porcentaje de actividad enzimática retenida a través del tiempo. (•) TRP 0,11 mM; (•) ES100-TRP en suspensión y (•) PP redissuelto. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,50. Temperatura 25 °C.

En ambos casos se puede observar que la actividad catalítica de la TRP disminuyó en las primeras horas de estudio, luego aumentó a partir de las 15 horas y finalmente volvió a

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 3: Estudio de la estabilidad de TRP

disminuir. Este comportamiento, que también se repite para el caso del ALG, es característico de todas las proteasas.

Para el caso del EL100, se observó que la actividad catalítica de TRP medida en presencia del PE es siempre mayor que en su ausencia. Es importante destacar que a las 17 horas, la actividad enzimática en presencia de EL100 es 1,5 veces mayor que aquella obtenida su ausencia. La máxima activación y estabilización de la enzima se obtuvo cuando la misma se incubó en el complejo insoluble precipitado; recuperándose a las 17 horas el 100% de la actividad inicial y a las 21 horas, el 36 %.

Para el caso del ES100, también se observó que la presencia del polímero protege a la estructura proteica de la autodegradación debido a que el porcentaje de actividad catalítica recuperada fue mayor que en ausencia de ES100. La máxima activación se observó cuando la TRP se incubó en el precipitado, recuperándose un 82 % de la actividad inicial. Sin embargo, la mayor estabilización a través del tiempo se obtuvo incubando la enzima en solución, en presencia del PE.

Los resultados obtenidos para el sistema ALG-TRP se presentan en la figura 4.53.

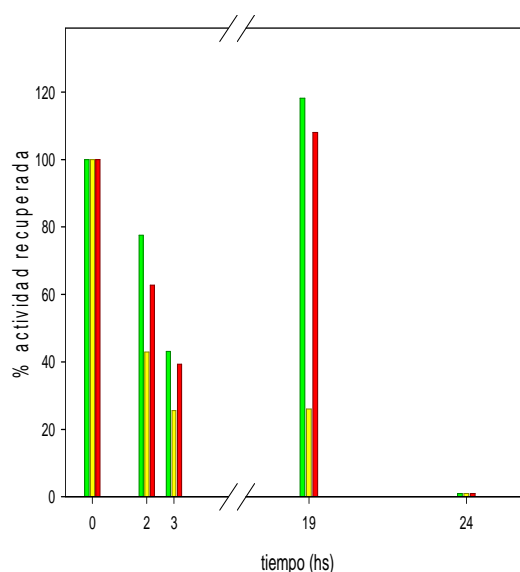


Figura 4.53: Porcentaje de actividad enzimática retenida a través del tiempo. (•) TRP 0,04 mM; (●) ALG-TRP en suspensión y (●) PP redissuelto. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 3,50. Temperatura 25 °C.

Se puede observar que la presencia del ALG no estabilizó la actividad catalítica a través del tiempo. Cuando las medidas se realizaron con el complejo insoluble sin precipitar,

## **4. Resultados y Discusión**

### ***Sección 3: Estudio de la estabilidad de TRP***

---

se observó que, a pesar de la agitación, las partículas decantaban y adherían al fondo del tubo de ensayo sin posibilidad de resuspenderlas, lo que explica la drástica caída de la actividad enzimática a través del tiempo. Sin embargo, la incubación de la enzima en el complejo insoluble precipitado tampoco aumentó la estabilidad de la misma.

Estos resultados pueden deberse a que el experimento se realiza a pH 3,50 al cual la TRP se encuentra inactiva (aunque con su estructura tridimensional muy estabilizada). A este pH se encuentra inhibido el proceso de autodigestión propio de las proteasas contra el cual protegerían los polímeros EL100 y ES100.

#### 4.4.1. Precipitación de TRP con EL100, ES100 y ALG.

La figura 4.54 muestra el porcentaje de TRP recuperada en el precipitado y en el sobrenadante cuando se la precipitó con EL100 y ES100 a una relación molar TRP/PE igual a 200 moles TRP/mol EL100 y 167 moles TRP/mol ES100.

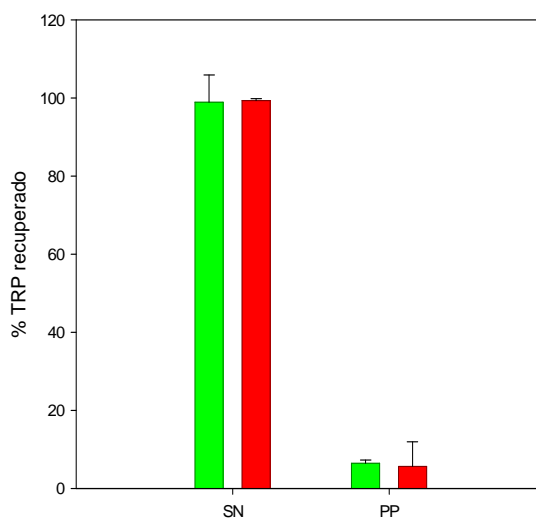


Figura 4.54: Recupero de TRP en PP y SN con (•) EL100 y (•) ES100. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH (•) 5,00 y (•) 5,50. Temperatura 25 °C.

Como se puede observar, el protocolo no es efectivo para precipitar TRP ya que casi la totalidad de la enzima se obtuvo en el sobrenadante. Esto demuestra que la turbidez desarrollada durante los experimentos de titulación no se debe a la formación del complejo insoluble Eudragit<sup>®</sup>-TRP.

Las figuras 4.55 y 4.56 muestran el porcentaje de TRP recuperada en el precipitado y en el sobrenadante cuando se la precipitó con EL100 y ES100 aplicando el protocolo 2, respectivamente. Los rendimientos se calcularon a partir de medidas de absorbancia a 280 nm.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 4: Estudio de la aplicación de los complejos PE-TRP

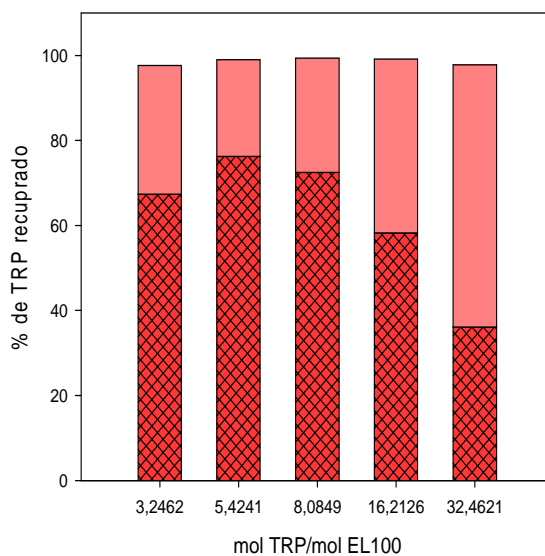


Figura 4.55: Recupero de TRP en PP y SN con EL100. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,00. Temperatura 25 °C.

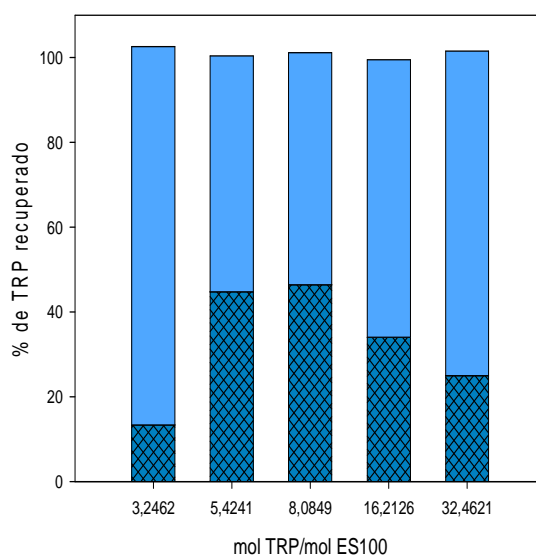


Figura 4.56: Recupero de TRP en PP y SN con ES100. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 5,50. Temperatura 25 °C.

Se puede observar que la mejor relación molar para precipitar TRP con EL100 es 5,42 moles TRP/mol EL100 mientras que para la precipitación con ES100, el mejor rendimiento se obtiene a 8,08 moles TRP/mol ES100. Estos resultados son congruentes con los obtenidos en los experimentos de cinética (ver sección 4.1.2.4), los cuales evidenciaron la máxima cantidad

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 4: Estudio de la aplicación de los complejos PE-TRP

de complejo insoluble formado a las mismas relaciones molares a las que se obtuvo la máxima cantidad de enzima precipitada. Es esperable que la cantidad de TRP precipitada sea proporcional a la cantidad de complejo insoluble formado.

Por otro lado, el porcentaje de TRP recuperada en el PP con EL100 (76,23 %) fue mayor que con ES100 (46,44 %). Esto indica que el primero es mejor precipitante ya que trabajando a las mismas concentraciones y relaciones molares, la precipitación con EL100 proporcionó mejores resultados. Esto se debería a que el EL100 posee una mayor densidad de carga negativa y por ende, una mayor cantidad de moléculas de TRP interaccionan con el PE.

Finalmente, como se esperaba, el porcentaje de TRP precipitada aplicando el protocolo 2 es superior que aplicando el protocolo 1. Además, a medida que la relación molar TRP/Eudragit® aumentaba, la cantidad de enzima que se precipita disminuía. Ambas observaciones confirman que durante la titulación turbidimétrica no se forma complejo insoluble y que la turbidez estaría relacionada con la insolubilización de los PEs.

Los resultados de la precipitación de TRP con ALG se muestran en la figura 4.57.

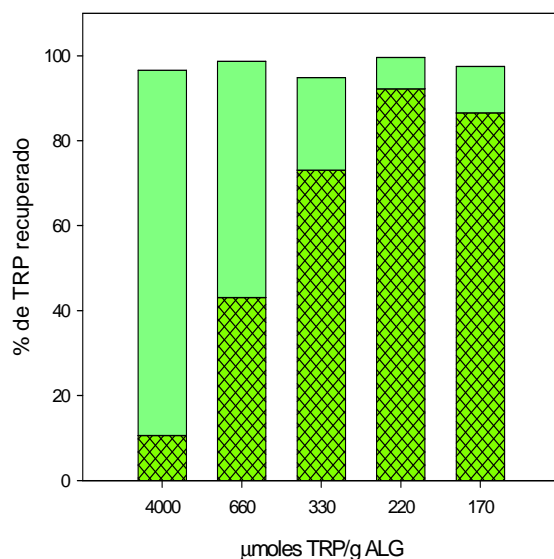


Figura 4.57: Recupero de TRP en PP y SN con ALG. Medio buffer cit/TRIS 50/50 mM pH 3,50. Temperatura 25 °C.

Se puede observar que el máximo recupero de la enzima en el PP se consiguió a una relación TRP/ALG igual a 220 µmoles TRP/g ALG (92,15 %). A mayores relaciones se

obtuvieron porcentajes de enzima precipitada menores. Esto se condice con lo observado en los experimentos de cinética de la sección 4.1.2.4

Los rendimientos obtenidos en cada experimento indican que el ALG es el mejor precipitante de TRP de los tres polímeros ensayados. Esto se debe a que el ALG es el que posee la mayor densidad de cargas negativas; seguido por el EL100 y el ES100.

Es importante destacar que las relaciones molares óptimas TRP/EL100 y TRP/ES100 ensayadas son muy inferiores a las calculadas por titulación turbidimétrica (ver sección 4.1.2.2); es decir que se trabaja con exceso de PE en relación a estas últimas. Sin embargo, resultan ser muy semejantes a aquellas obtenidas por ITC (ver sección 4.2.1.1). En estos sistemas se puede comprobar que: a la máxima relación molar PE/TRP (determinada por ITC) se obtiene la máxima turbidez (obtenida en cinética) lo que significa que se forma la máxima cantidad de complejo insoluble, lo que conlleva a la máxima cantidad de TRP precipitada.

Por otro lado, la relación óptima TRP/ALG de precipitación se asemeja a aquella calculada tanto por cinética como por titulación turbidimétrica e ITC. Se puede concluir que el efecto que genera la Maduración de Ostwald es contraproducente para el rendimiento de la precipitación.

El máximo rendimiento de la precipitación de TRP con cada PE calculado a partir de la actividad catalítica de la enzima se resume en la tabla 4.XI.

**TABLA 4.XI**

<b>Sistema</b>	<b>Rendimiento PP (%)</b>
<i>EL100-TRP</i>	72,42 ± 6,42
<i>ES100-TRP</i>	40,76 ± 2,71
<i>ALG-TRP</i>	97,18 ± 2,26

Se puede observar que los porcentajes obtenidos no difieren sustancialmente de aquellos determinados por absorbancia a 280 nm. Esto es importante para demostrar que el método de precipitación de esta enzima no afecta la actividad catalítica de la misma debido a que se trabaja a pHs en las cuales la TRP no es activa (ALG) o es poco activa (Eudragit®) y no se requieren largos tiempos de incubación. Todas estas condiciones en su conjunto, sumado al efecto protector de los PE, evitan la autodegradación propia de las proteasas.

Como se esperaba, el ALG volvió a mostrar la mejor capacidad precipitante de TRP entre los tres polímeros ensayados.

#### 4.4.2. Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.

La HIC puede actuar como una etapa posterior a la precipitación con PE para aumentar la pureza del producto final y si es posible separar el PE de la enzima.

Los estudios con HIC se realizaron con TRP comercial en ausencia y presencia de ALG con el objetivo de evidenciar cambios en el perfil de elución de la enzima y de separar la TRP de este PE.

La figura 4.58 muestra la curva de calibración de absorbancia a 490 nm vs. concentración de ALG.

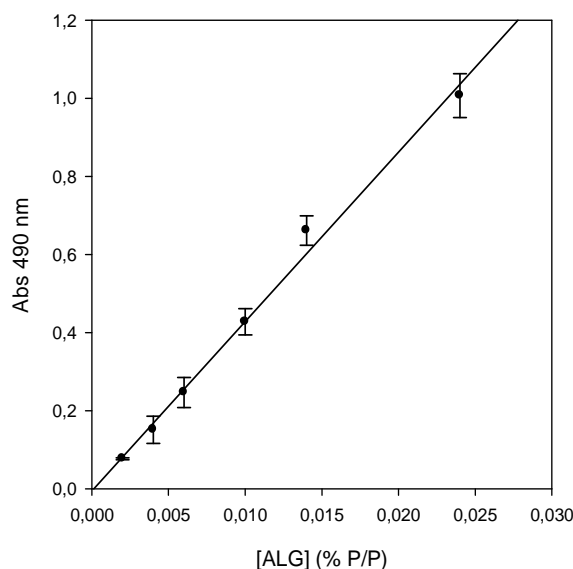


Figura 4.58: Curva de calibración de ALG realizada con el método del fenol- ácido sulfúrico.

Se observó que, en el rango de trabajo, ambas variables se relacionan linealmente de acuerdo a la ecuación  $Abs\ 490\ nm = 43,402\ (\% P/P)^{-1} * [ALG] - 5,636 * 10^{-3}$  la cual ajusta a los datos experimentales con un  $r^2 = 0,9924$ . Esta curva permitió determinar la concentración de ALG en diferentes fracciones luego de la corrida cromatográfica.

Los perfiles de elución obtenidos para la TRP pura y la TRP precipitada con ALG y redisuelta se muestran en la figura 4.59 y 4.60, respectivamente.

## 4. Resultados y Discusión

### Sección 4: Estudio de la aplicación de los complejos PE-TRP

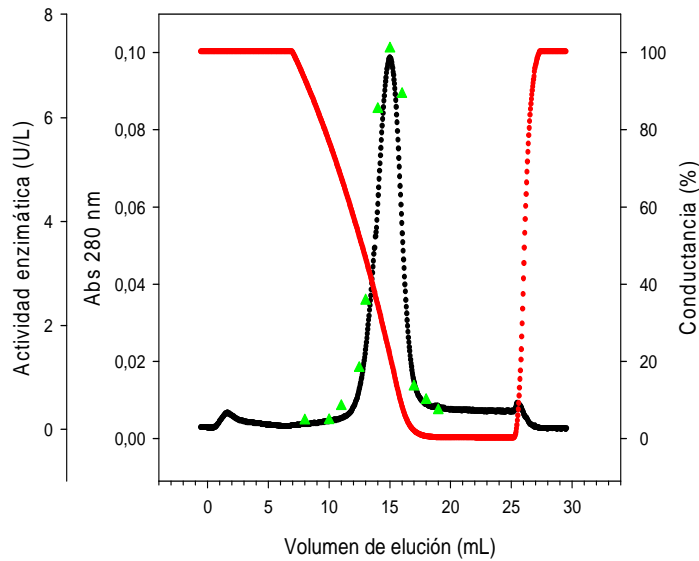


Figura 4.59: Perfil de elución de TRP 2 mg/mL: (•) absorbancia a 280 nm; (•) act. enz. y (•) gradiente de buffer B por medidas de conductancia.

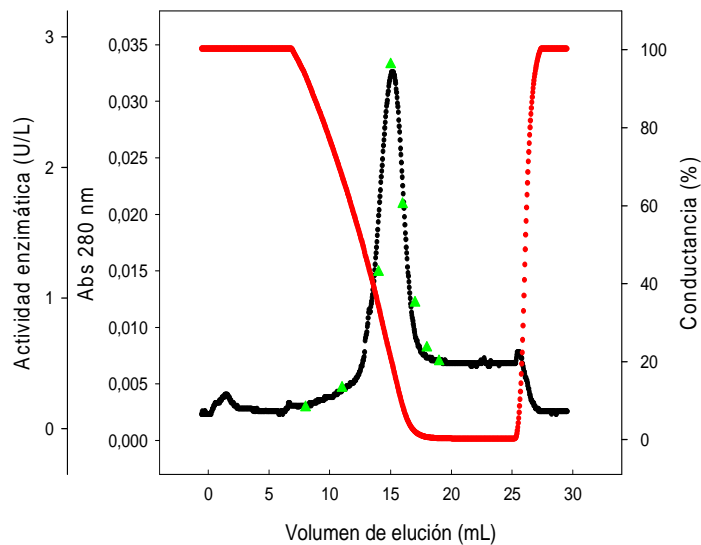


Figura 4.60: Perfil de elución de TRP 0,9 mg/mL precipitada y redissuelta: (•) absorbancia a 280 nm; (•) act. enz. y (•) gradiente de buffer B por medidas de conductancia.

Se puede observar que, tanto la TRP en solución como la TRP precipitada y redissuelta en buffer B, eluyeron en la fracción 15, que corresponde a 15 mL de volumen de elución; siendo el ancho de cada pico 6,17 mL y 5,63 mL; respectivamente. Esto indica que el perfil de elución de la TRP no se modifica por la presencia del ALG.

La tabla 4.XII presenta las concentraciones de ALG obtenidas para distintas fracciones.

**TABLA 4.XII**

Sistema	Abs 490 nm	[ALG] dosada (%P/P)
<i>ALG 0,017 % P/P</i>	0,653	0,015
<i>Precipitado redissuelto</i>	0,214	0,005
<i>Sobrenadante</i>	0,382	0,009
<i>Fracción recolectada (13, 14, 15 y 16)</i>	0,001-0,003	--

Se puede observar que al precipitar la enzima con ALG, el PE se encuentra mayoritariamente en el sobrenadante. Aunque lo que verdaderamente se debe destacar es que luego de pasar el precipitado redissuelto por la columna cromatográfica, la TRP eluye libre del polímero, lo que se evidencia con los valores de absorbancia a 490 nm obtenidos al aplicar el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico (ver Materiales y Métodos – sección 3.2.8) para las fracciones 13, 14, 15 y 16 (correspondientes a fracciones en las cuales eluye la enzima).

Así, se confirma que la HIC es una técnica útil para aplicar luego de una precipitación con ALG ya que permitiría mejorar la pureza de la muestra y separar la TRP del PE. La aplicación de la HIC depende del grado de pureza pretendido para el producto final de acuerdo a los requerimientos de la industria: el uso de TRP para el tratamiento de cuero o como componente de un detergente enzimático implica obtener un producto con un alto contenido de TRP e incluso de otras proteasas (como la quimotripsina) que complementarían a la actividad de TRP en el producto final. En estos casos la precipitación del complejo insoluble ALG-TRP podría ser el único paso extractivo necesario.

#### **4.4.3. Aplicación de la precipitación al homogenado de páncreas bovino.**

Para poder estudiar la precipitación de TRP a partir de un homogenado es necesario activar a la enzima ya que la misma se sintetiza *in vivo* como zimógeno. La figura 4.61 muestra el perfil de activación del homogenado pancreático preparado como se explica en Materiales y Métodos – sección 3.2.9.2.

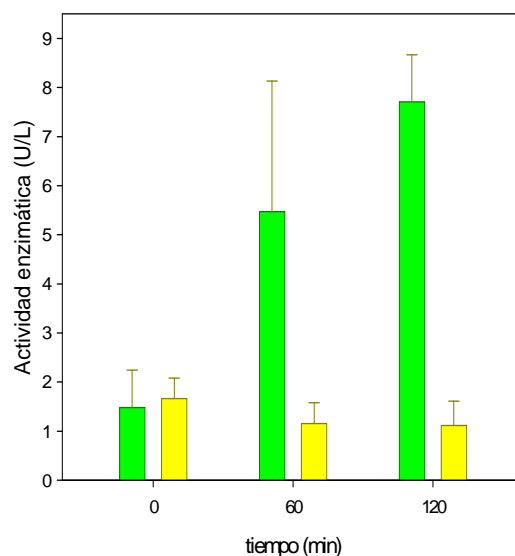


Figura 4.61: Actividad catalítica de TRP en (•) homogenado y (•) control. Medio buffer TRIS 100 mM pH 8,20 CaCl<sub>2</sub> 200 mM. Temperatura 25 °C.

#### 4.4.3.1. Precipitación de TRP con EL100.

Los tres protocolos aplicados al homogenado dieron rendimientos diferentes, como se puede observar en la tabla 4.XIII. El rendimiento del sobrenadante obtenido aplicando el protocolo 2 no se determinó debido a que la activación de esta fracción podría ser muy lenta a causa de la baja concentración de TRP presente.

Se debe recordar que para los protocolos 1 y 2 el homogenado se activó previo a la precipitación.

**TABLA 4.XIII**

Protocolo	Porcentaje de TRP en cada fracción	
	Precipitado	Sobrenadante
1	no se formó precipitado	
2	46 ± 1	56 ± 5
3	82 ± 10	n/d

Cuando se empleo el protocolo 1 no se observó la formación de un precipitado probablemente debido a la elevada fuerza iónica del medio de activación de TRP dada por la

presencia del  $\text{CaCl}_2$  200 mM. Esto inhibió la formación del complejo EL100-TRP al interferir con la interacción electrostática entre el PE y la enzima.

Entonces se varió el protocolo 1 agregando una etapa de acidificación del sistema hasta pH 3,00 antes de centrifugar (protocolo 2). El polímero EL100 precipita a este pH aún en presencia de elevada fuerza iónica y se esperaba que durante este proceso retenga a la enzima en el interior de las partículas. Efectivamente, el porcentaje de TRP recuperada en el precipitado fue de 45 % aunque resultó inferior al obtenido por mezcla directa de TRP pura y EL100 a pH 5,00 (ver sección 4.4.1).

Finalmente se empleó el protocolo 3, el cual es similar al protocolo 1 con la diferencia de que inicialmente se trabajó con homogenado sin activar (para evitar la presencia de  $\text{CaCl}_2$ ). En esta oportunidad sí se observó la formación de precipitado y se obtuvo un rendimiento del  $82 \pm 10$  %, comparable al obtenido trabajando con la enzima pura (72 %).

#### 4.4.3.2. Precipitación de TRP con ALG.

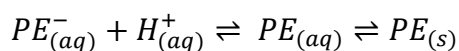
Al aplicar el método de precipitación de TRP a la solución de homogenado se observó que la presencia de ALG interfirió con la activación del PP redisueltos (paso 5) al secuestrar el  $\text{Ca}^{2+}$  del medio, el cual es necesario para la actividad enzimática. Entonces, se optó por precipitar y luego activar sólo el SN. El cálculo del rendimiento en el PP se realizó a partir del cálculo del rendimiento en el SN y el balance de masa de TRP en el sistema.

Al agregar ALG a la solución de homogenado sin activar se evidenció la aparición de un precipitado que se debería a la formación del complejo insoluble ALG-TRP.

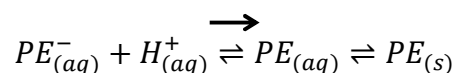
La activación del SN mostró que, durante las 3 horas que duró esta etapa, la actividad catalítica de la TRP se mantuvo constante alrededor de  $1,0 \pm 0,1$  U/L. Este valor corresponde principalmente a la actividad de la TRP agregada al SN para iniciar la activación del zimógeno pancreático e indicaría que la concentración de enzima en esta fracción es muy baja. El rendimiento del PP sería del  $99 \% \pm 3$  enzima total del homogenado. Sin embargo, sería indispensable medir la actividad enzimática del PP para corroborar el porcentaje de TRP en esta fracción. Utilizar una columna cromatográfica de HIC sería útil para separar la TRP y el ALG y evitar que este último interfiera con la activación de la enzima.

Los estudios de solubilidad de los PE mostraron que los mismos son insolubles a pH ácido y solubles a pH básico (equilibrio 1). El rango de solubilidad/insolubilidad depende del pKa de los grupos ionizables presentes en cada uno pero no de su concentración.

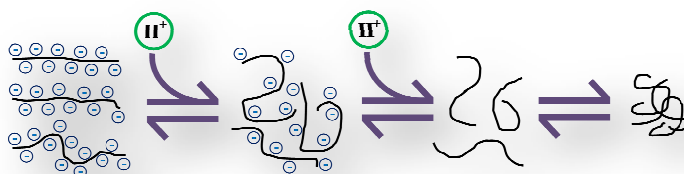
**equilibrio 1:**



El aumento de la fuerza iónica no modificó la curva de solubilidad de cada PE aunque se observó un aumento de la turbidez en la región de insolubilidad (efecto llamado salting out).



La figura 5.1 presenta un esquema a nivel molecular del equilibrio 1.



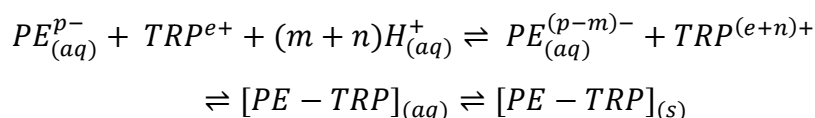
*Figura 5.1: esquema de la precipitación de los PE por acidificación del medio.  
(—) PE y (⊖) carga negativa de las subunidades de los PE.*

Asimismo, los estudios de solubilidad de los sistemas PE-TRP mostraron que la acidificación del medio provoca la formación del complejo insoluble entre ambas especies debido al aumento en la densidad de cargas positivas que presenta la enzima. Para el caso del sistema ALG-TRP, a pH ácidos se observó una turbidez que resulta de la adición de la turbidez debida a la formación del complejo insoluble y de la turbidez debida a la precipitación del PE. En los sistemas Eudragit<sup>®</sup>-TRP no se observó este efecto probablemente debido que el complejo insoluble es rico en PE y en consecuencia, la concentración de PE libre en solución es despreciable.

Cuando se trabajó con un sistema inicial turbio y realizando los barridos hacia pH ácido y básico, el mecanismo de formación del complejo insoluble cambió drásticamente, observándose un máximo de turbidez a pHs intermedios.

Por otro lado, los experimentos de ITC y DLS mostraron que existe un complejo soluble EL100-TRP y ES100-TRP a pH 8,00; aunque no se evidenció la presencia del complejo soluble ALG-TRP. Esto no descarta la existencia de un complejo soluble ALG-TRP sino que indica que la densidad de carga positiva de la enzima aún no es lo suficientemente elevada como para interactuar con el PE. En consecuencia, el mecanismo de formación del complejo insoluble por disminución del pH presentado en el equilibrio 2 es satisfactorio para los tres complejos PE-TRP.

**equilibrio 2:**



El esquema molecular de este equilibrio se muestra en la figura 5.2.

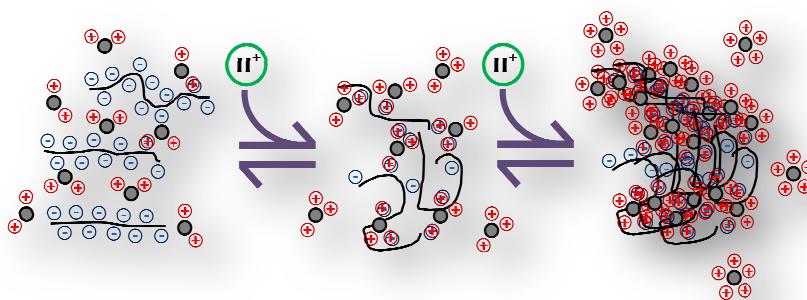
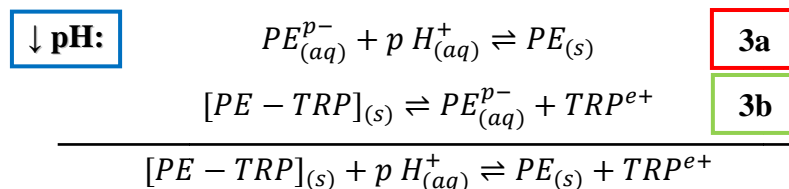


Figura 5.2: mecanismo de formación de los complejos PE-TRP por acidificación del medio. (—) PE; (⊖) carga negativa de las subunidades de los PE y (⊕) TRP cargada positivamente.

El efecto observado cuando el barrido de pH se realizó hacia pH ácido y básico se explica teniendo en cuenta varios equilibrios en el sistema:

**equilibrios 3a y b:**



Cuando el pH del sistema disminuye, el *equilibrio 3a* (o equilibrio 1) se desplaza hacia la precipitación del PE, lo que provoca la disminución de la concentración de PE soluble. Esto afecta al *equilibrio 3b*, desplazándolo hacia la disociación del complejo insoluble PE-TRP y la consecuente disminución de la turbidez. Para el caso del barrido de pH desde 8,00 a 2,00; el equilibrio 3a podría ser despreciado debido a que la concentración de PE libre en solución sería despreciable.

Cuando el pH del sistema aumenta se experimenta un desplazamiento de los equilibrios planteados en *equilibrio 2*: la disminución en la concentración de protones del medio provoca una disminución en la densidad de cargas positivas de la TRP y la disolución del complejo PE-TRP.

La figura 5.3 muestra el esquema molecular del equilibrio 3.

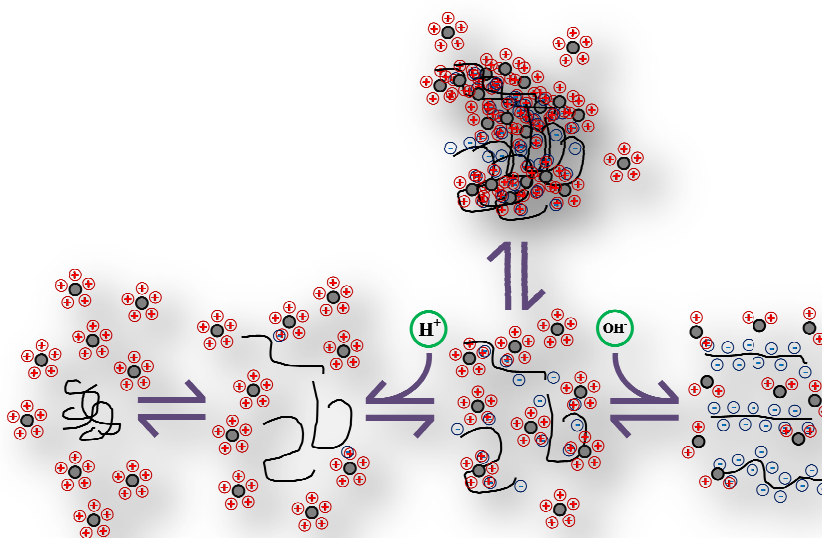


Figura 5.3: mecanismo de interacción de los PE con TRP presentado en el equilibrio 3. (—) PE; ( $\ominus$ ) carga negativa de las subunidades de los PE y ( $\oplus$ ) TRP cargada positivamente.

Estos experimentos evidenciaron la contribución electrostática en la formación del complejo insoluble PE-TRP. Además ponen en manifiesto la importancia del número de cargas positivas en la superficie de la proteína, las cuales actuarían como puentes para enlazar partículas de complejo soluble que darían lugar al complejo insoluble debido al incremento de su tamaño.

Los experimentos de titulación turbidimétrica mostraron que el pH óptimo de precipitación para los complejos EL100-TRP y ES100-TRP es 5,00 y 5,50 respectivamente; con valores de estequiometría de complejo iguales a 98 moléculas

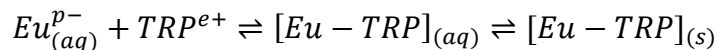
TRP/molécula EL100 y 167 moléculas TRP/molécula ES100. Estos valores son significativamente superiores a los valores de relación molar óptima determinados por cinética e ITC y sin embargo, los experimentos de precipitación mostraron que trabajando a relaciones molares iguales o superiores a la estequiometría del complejo, el precipitado no contenía TRP. Esto indicaría que la turbidez presente en el sistema no se debería a la formación del complejo insoluble TRP-Eudragit<sup>®</sup>. Este efecto puede explicarse teniendo en cuenta el equilibrio 3 y los resultados de ITC. Los experimentos de calorimetría mostraron que 15 moléculas de TRP se unen a una molécula de EL100 para formar el complejo insoluble EL100-TRP y que 13 moléculas de TRP se unen a una molécula de ES100 para formar el complejo ES100-TRP. A partir de este valor, el sistema se satura y no se forman nuevas partículas de complejo. Al mismo tiempo, las curvas de titulación de EL100 y ES100, presentaron una región de baja turbidez hasta una relación molar TRP/PE igual a 10,81 y 16,22; respectivamente. Estos valores se condicen con los de relación molar determinados por ITC; por ende, esta región corresponde a la formación del complejo insoluble (la turbidez es baja debido a que los PE y la enzima se encuentran en concentraciones muy diluidas). A partir de este valor, la TRP agregada al sistema no interacciona con los PE. Sin embargo, se debe considerar que la solución de TRP que se agrega se encuentra a pH 3,00 y que por ende también se están agregando protones al sistema. Estos protones interaccionarían con los grupos carboxilato de cada PE, neutralizando las cargas de los mismos y provocando su precipitación. El efecto total es la disociación del complejo Eudragit<sup>®</sup>-TRP y la aparición de turbidez asociada a la insolubilización del PE.

El sistema ALG-TRP presentó la máxima turbidez a pH 3,50; con una estequiometría del complejo igual a 200  $\mu$ moles TRP/g ALG. Este valor se corresponde con los experimentos de cinética e ITC: la elevada densidad de carga negativa que presenta este PE evitaría que la interacción entre los protones agregados y los grupos carboxilato del polímero afecte la formación del complejo. Más aún, a partir de 200  $\mu$ moles TRP/g ALG, el efecto de neutralización de las cargas negativas por agregado de protones al sistema provoca la agregación de las partículas de complejo insoluble.

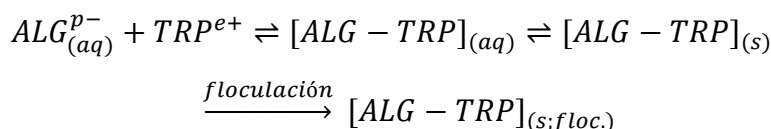
Por otro lado, los experimentos de DLS realizados para los sistemas ES100-TRP y ALG-TRP la existencia de complejos solubles al pH de precipitación, demostrándose nuevamente que la formación de este complejo es una etapa intermedia necesaria para la

formación del complejo insoluble. En estos casos, el estado de agregación del complejo depende de la concentración de TRP en solución.

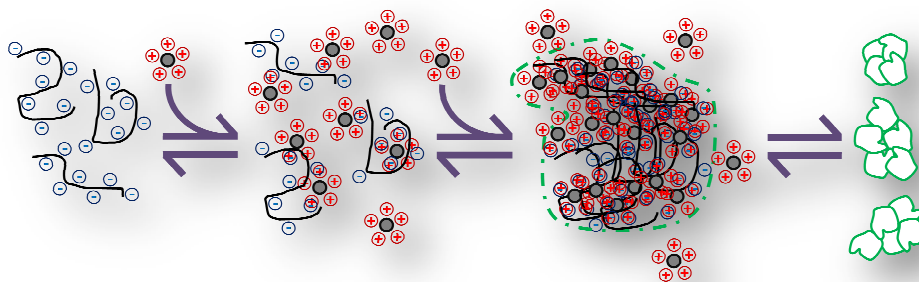
**equilibrio 4:**



**equilibrio 5:**



Los equilibrios 4 y 5 se esquematizan en la figura 5.4.



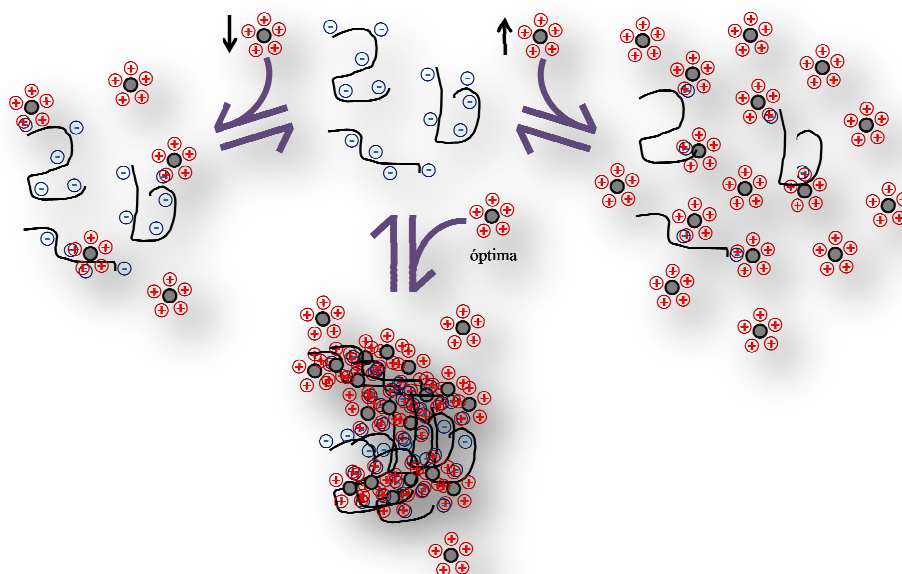
*Figura 5.4: mecanismo de formación de los complejos PE-TRP por agregado secuencial de TRP al sistema con PE. El último paso indica la etapa de floculación de las partículas de complejo ALG-TRP. (—) PE; (⊖) carga negativa de las subunidades de los PE y (⊕) TRP cargada positivamente.*

La última etapa de agregación observada en la titulación del ALG se debería a un fenómeno denominado Maduración de Ostwald el cual supone un crecimiento del tamaño de las partículas de complejo insoluble más grandes a expensas de las más pequeñas.

Los estudios cinéticos realizados a pH óptimo de formación del complejo insoluble (pH 5,00 para el complejo EL100-TRP; 5,50 para el ES100-TRP y 3,50 para el ALG-TRP) mostraron que la máxima cantidad de complejo insoluble se alcanza rápidamente, antes de los 50 segundos de incubación de cada sistema.

La relación TRP/PE a la cual se observó la máxima turbidez se condice con la relación determinada por ITC. Por debajo de este valor, la concentración de TRP está en defecto y el sistema no se encuentra saturado. Por encima de este valor, para los sistemas Eudragit-TRP, los protones agregados en la alícuota de la solución de TRP inhibe la formación del complejo insoluble. Este efecto no se observó para el sistema ALG-TRP.

La figura 5.5 muestra un esquema de los fenómenos que ocurren cuando las soluciones de TRP y Eudragit<sup>®</sup> se mezclan en una única etapa.



*Figura 5.5: mecanismo de formación de los complejos PE-TRP por mezcla directa de TRP y PE. El extremo derecho del diagrama corresponde a los sistemas Eudragit<sup>®</sup>-TRP. (—) PE; (⊖) carga negativa de las subunidades de los PE y (⊕) TRP cargada positivamente.*

Los experimentos de ITC mostraron que los polímeros EL100 y ES100 forman un complejo insoluble con la TRP a pH 5,00 y 5,50 por medio de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Las primeras son las responsables del acercamiento entre las moléculas mientras que las segundas actúan a corta distancia y pueden llegar a ser predominantes. La unión entre ambas especies presenta una elevada constante de afinidad y es conducida entrópicamente por la liberación de moléculas de agua estructurada al medio.

La figura 5.6 muestra un esquema de cómo actuarían las fuerzas atractivas electrostáticas e hidrofóbicas entre las moléculas de enzima y PE.

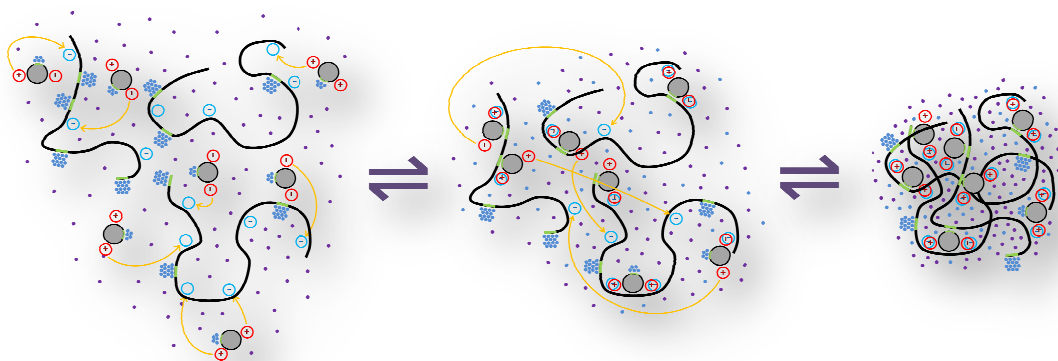


Figura 5.6: representación de los complejos insolubles PE-TRP. (—) PE; ( $\ominus$ ) carga negativa de las subunidades de los PE; ( $\oplus$ ) TRP cargada positivamente; ( $\bullet$ ) moléculas de  $H_2O$ ; ( $\bullet$ ) moléculas de  $H_2O$  estructurada y (—) zonas hidrofóbicas.

Por otro lado, el estudio de la interacción entre ALG y TRP a pH 3,50 evidenció que ambas especies interaccionan con una elevada constante de afinidad por medio de fuerzas netamente electrostáticas. La unión es conducida entálpicamente por la liberación de calor al medio. La figura 5.6 también es representativa del proceso de formación del complejo insoluble TRP-ALG teniendo en cuenta que las zonas hidrofóbicas no se encuentran en las cadenas de este PE.

La formación de los tres complejos se ajustó a un modelo de interacción de un único tipo de sitios independientes y equivalentes. El complejo EL100-TRP presenta 15 moléculas de TRP por mol de PE; el complejo ES100-TRP, 13 moléculas de TRP por molécula de PE y el complejo ALG-TRP, aproximadamente 230  $\mu$ moles de TRP por gramo de PE. Estos valores son similares a los que presentaron máxima turbidez en los estudios de cinética e indica que la máxima cantidad de complejo insoluble formado (o las partículas de mayor tamaño) se obtienen a la relación TRP/PE óptima determinada por ITC.

La presencia de elevada fuerza iónica inhibió la formación de los tres complejos insolubles PE-TRP al interferir con las interacciones electrostáticas entre la enzima y cada polímero. Al trabajar a pH 8,00 la TRP no interaccionó con el ALG. Sin embargo, se observó la formación del complejo soluble EL100-TRP y ES100-TRP a través de un mecanismo que abarcaría dos etapas: una de formación del complejo soluble con un elevado número de moléculas de TRP seguida de la adición de moléculas de PE para dar partículas de mayor tamaño con menor grado de saturación (figura 5.7).

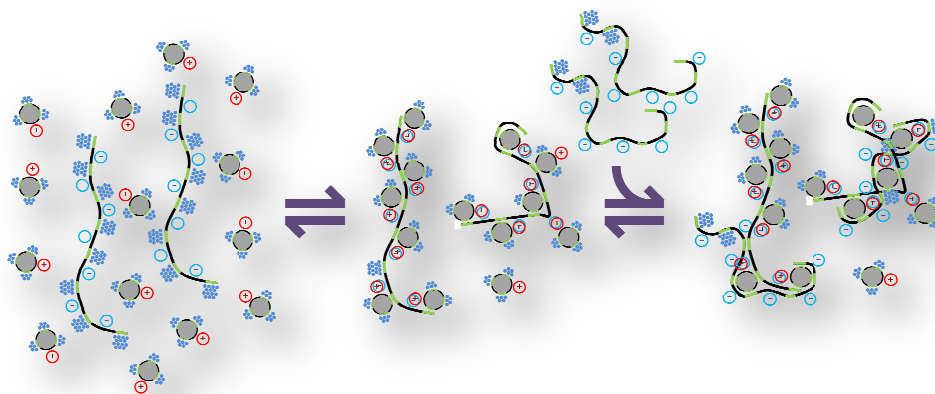


Figura 5.7: representación de los complejos solubles PE-TRP. (—) PE; ( $\ominus$ ) carga negativa de las subunidades de los PE ( $\oplus\oplus$ ) TRP cargada positivamente; ( $\bullet$ ) moléculas de  $H_2O$  estructurada y (—) zonas hidrofóbicas.

Estos resultados confirman la existencia de un complejo soluble que actuaría en una etapa previa a la formación del complejo insoluble. La presencia de zonas hidrofóbicas en la estructura de los PE sería de suma importancia para la formación del complejo soluble ya que la interacción hidrofóbica entre ambas especies sería la predominante al verse disminuida la densidad de carga positiva de la TRP a causa del pH.

La formación de los complejos PE-TRP también se estudió por DLS, determinándose el  $R_h$  de las partículas en solución a diferentes condiciones del medio. Estos experimentos corroboraron los resultados previamente observados en ITC.

Se evidenció la existencia del complejo soluble EL100-TRP a pH 5,00; ES100-TRP a pH 5,50 y ALG-TRP a pH 3,50. También se corroboró la formación del complejo soluble EL100-TRP y ES100-TRP a pH 8,00 los cuales resultaron ser de mayor tamaño a los observados a pH 5,00 y 5,50; respectivamente. El ALG no formó un complejo soluble con la TRP a pH 8,00. El aumento de la fuerza iónica dado por el NaCl inhibió la formación del complejo ES100-TRP a pH 5,50 y ALG-TRP a pH 3,50. EL EL100 probablemente hubiese presentado el mismo comportamiento.

EL complejo EL100-TRP presentó un  $R_h$  mayor al del complejo ES100-TRP, tanto a pH 5,00/5,50 como a pH 8,00. Esto estaría relacionado con la cantidad de moléculas de TRP que forman parte del complejo y con el grado de agregación del mismo.

Los estudios de estabilidad de la TRP mostraron que la estructura secundaria y/o terciaria de la enzima se altera al interactuar con cada PE. Al mismo tiempo, los experimentos de DSC indicaron que el EL100 mejora considerablemente la estabilidad térmica de la TRP a pH 5,00 mientras que el ES100 estabiliza levemente la estructura

proteica a ambos pH. Esta diferencia podría deberse a la resistencia estructural que adquiere la enzima cuando interacciona electrostáticamente con los PE. A pH 5,00 se favorecen estas interacciones entre la TRP y el EL100 observándose el máximo aumento en la estabilidad térmica de la TRP.

Sin embargo, a pesar de los cambios estructurales que sufre la TRP, su actividad catalítica no se perjudica en presencia de cada PE. Más aún, cuando los estudios de actividad se realizaron a través del tiempo, los polímeros Eudragit<sup>®</sup> aumentaron la estabilidad de la enzima, probablemente debido a la protección contra la autodegradación característica de todas las proteasas. Por otro lado, el ALG no presentó un efecto estabilizador de la actividad debido a que al pH de formación del complejo insoluble (pH 3,50) la TRP se encuentra en una forma inactiva pero muy estable.

Finalmente, los experimentos de precipitación mostraron que los tres sistemas PE-TRP presentaron la máxima cantidad de TRP precipitada a relaciones TRP/PE intermedias a las ensayadas; evidenciándose que un defecto o exceso de PE disminuye la cantidad de enzima en el precipitado. El EL100 permite precipitar un 72 % de la TRP presente en el sistema mientras que el ES100, un 41 %.

El ALG es el PE con mejor capacidad precipitante de TRP, obteniéndose aproximadamente un 97 % de la enzima en el precipitado. La HIC consiguió separar físicamente la enzima del ALG, observándose ausencia total del ALG en las fracciones en las cuales eluyó la TRP. Esto puede ser de vital importancia dependiendo de la industria que requiera el uso de la enzima. Además, la posibilidad de reutilizar el ALG resulta atractiva ya que disminuiría los costos de purificación y/o inmovilización de la TRP.

El conocimiento recopilado de cada experimento efectuado se utilizó para diagramar una metodología de precipitación de TRP con los polímeros EL100.

Los estudios realizados con el homogenado pancreático demostraron la importancia del mecanismo de formación del complejo PE-TRP cuando se desea precipitar TRP con EL100: los tres protocolos utilizados presentaron rendimientos muy distintos entre sí.

La presencia de CaCl<sub>2</sub> inhibió la formación del complejo insoluble EL100-TRP debido a la elevada fuerza iónica que proporcionó esta sal al medio. Sin embargo, al acidificar la mezcla homogenado-EL100 hasta pH 3,00 se formó un precipitado con un 45 % del total de la enzima presente en el homogenado. Es probable que la enzima se una débilmente al EL100 mediante interacciones hidrofóbicas, formando inicialmente un complejo soluble y quedando retenida luego en partículas de EL100 insoluble.

Por otro lado, en ausencia de  $\text{CaCl}_2$  sí se observó la formación de un precipitado que contenía aproximadamente el 82 % del total de la enzima. Este precipitado sería complejo insoluble EL100-TRP formado por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre ambas especies.

Al precipitar TRP a partir del homogenado de páncreas porcino con ALG se observó que la presencia del PE inhibe la activación del tripsinógeno al interactuar fuertemente con el  $\text{Ca}^{2+}$ . Se observó la aparición de un precipitado que se debería a la formación del complejo insoluble ALG-TRP. La activación del SN evidenció una baja concentración de TRP en esta fracción al no observarse un aumento de la actividad catalítica durante las 3 horas de activación. El rendimiento del PP, calculado a partir del balance de masa de TRP en el sistema, es igual a 99 %. La HIC sería una técnica apropiada para separar el ALG y la TRP y evitar que el PE interfiera con su actividad.

En la actualidad, las enzimas cumplen un rol muy importante en la industria ya sea como parte de un proceso industrial o como componente de un producto. Su uso se ha incrementado con el paso del tiempo debido a las ventajas que ofrecen con respecto a los compuestos químicos que reemplazan: mayor velocidad de reacción, mayor especificidad y menor impacto negativo sobre el medioambiente. En general, estas características dan como resultado procesos más eficientes y productos de mayor calidad, lo cual conlleva a una disminución de los costos. Sin embargo, el uso de enzimas también implica operar en condiciones que no afecten su estructura proteica o actividad catalítica.

Por otro lado, a medida que la demanda de enzimas por parte de la industria aumentaba, se desarrollaron y/o mejoraron métodos de producción y aislamiento que, idealmente, combinen alta productividad y selectividad, sencillez, rapidez y bajos costos.

Un método que reúne estas tres últimas características es la precipitación de complejos insolubles PE-proteína. En general, este método permite aislar una enzima de interés a partir de su fuente natural o un cultivo microbiano con un elevado rendimiento, además de concentrarla y estabilizarla. En algunos casos puede ser el único paso requerido para purificar una enzima. En otros, puede actuar como primer paso extractivo seguido de una o más técnicas cromatográficas. Esto dependerá de los estándares de pureza que se requieran para el producto final: en la industria farmacéutica es preferible un producto de elevada pureza aunque se deba sacrificar la cantidad obtenida; mientras que en el procesamiento de materias primas como el cuero o el papel puede ser más importante obtener una elevada cantidad de enzima con baja pureza. De cualquier manera, los “contaminantes” de una enzima podrían ser otras enzimas con actividad catalítica similar o complementaria lo cual podría ser beneficioso o inocuo para el proceso industrial en sí mismo.

Los complejos insolubles PE-proteína se forman principalmente por interacción electrostática entre un PE y una proteína y por ende, dependen del pH, la fuerza iónica, la temperatura y la concentración de ambas especies. La formación de un complejo insoluble puede transcurrir por diversos mecanismos en los cuales se postula la presencia de un complejo soluble PE-proteína como etapa intermedia. Normalmente, varias moléculas de proteína se unen con alta afinidad a una molécula de PE, de acuerdo a los residuos aminoacídicos que exponga y a la naturaleza de los grupos funcionales del PE. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios realizados en esta área, el mecanismo de formación de los complejos insolubles PE-proteína aún no ha sido esclarecido.

En el presente trabajo se estudió la formación de complejos insolubles entre la enzima tripsina y tres PE aniónicos: Eudragit<sup>®</sup> L-100, Eudragit<sup>®</sup> S-100 y alginato. Inicialmente se realizaron estudios de solubilidad y cinéticos de los PEs y de cada complejo PE-TRP para evaluar las condiciones de formación del complejo insoluble por medidas de turbidez. Esta información se utilizó luego para caracterizar la interacción PE-TRP y las partículas en el sistema por ITC y DLS. Además, se analizó la estructura de la enzima y su actividad catalítica para conocer el efecto de la presencia de los PE sobre la estabilidad de la TRP. Este estudio es muy importante para validar la formación de complejos insolubles PE-TRP como técnica de aislamiento, estabilización e inmovilización de esta enzima. Por otro lado, la aplicación de TRP en la industria implica que el proceso de formación del complejo no desestabilice la estructura proteica y/o afecte negativamente su actividad catalítica. Así, para validar el uso de los complejos insolubles PE-TRP en la industria se emplearon técnicas de espectroscopía UV-vis y DC, DSC y medidas de actividad enzimática en diferentes condiciones

A partir de los datos experimentales y del análisis minucioso de los mismos se han extraído las siguientes conclusiones:

1. la TRP interacciona de manera óptima con el EL100 a pH 5,00; el ES100 a pH 5,50 y el ALG a pH 3,50 formando complejos insolubles.
2. el complejo EL100-TRP contiene 15 moléculas de TRP por mol de EL100; el complejo ES100-TRP contiene 13 moléculas de TRP por mol de ES100 y el complejo ALG-TRP contiene 230  $\mu$ moles de TRP por gramo de ALG.
3. la formación de cada complejo transcurre a través de una etapa de formación de un complejo soluble que depende de la relación TRP/PE y de la concentración de las especies en solución.
4. la formación del complejo soluble también depende de la densidad de carga positiva de la TRP y de la posibilidad de que la enzima interaccione hidrofóbicamente con el PE. En este aspecto, el ALG no forma complejo soluble con la TRP a pH 8,00.
5. el EL100 y el ES100 forman un complejo soluble con la TRP a pH 8,00 que contiene 143 moléculas de TRP por mol de EL100 y 71 moléculas de TRP por mol de ES100.

6. la baja densidad de carga positiva permite un mayor acercamiento de las moléculas de TRP y por ende, acomodar un mayor número de moléculas de enzima sobre una cadena de PE.
7. los complejos solubles EL100-TRP y ES100-TRP a pH 8,00 son de mayor tamaño que a pH 5,00 y 5,50; respectivamente.
8. la solubilidad de cada complejo depende sensiblemente del pH, la fuerza iónica y la relación TRP/PE. Estos parámetros afectan la densidad de carga de los complejos solubles, favoreciendo su agregación o repulsión.
9. los complejos Eudragit<sup>®</sup>-TRP se forman mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. El complejo ALG-TRP se forma mediante interacciones netamente electrostáticas.
10. la cinética de formación de cada complejo es rápida, obteniéndose la mayor cantidad de complejo formado en menos de 50 segundos de incubación a temperatura ambiente.
11. la interacción de la TRP con los Eudragit<sup>®</sup> favorece su estabilidad estructural térmica y a través del tiempo. No se determinó efecto estabilizador del ALG.
12. la interacción de la TRP con cada PE no altera su actividad catalítica.
13. el ALG pudo separarse de la TRP por aumento de la fuerza iónica y posterior tratamiento con una columna de HIC.
14. el precipitado del complejo ALG-TRP contiene un 97 % de la enzima total en el sistema. El precipitado del complejo EL100-TRP contiene un 72 % y el precipitado del complejo ES100-TRP contiene un 41 %.
15. el EL100 permitió precipitar TRP a partir de un homogenado de páncreas porcino aplicando dos protocolos diferentes: el número 2 que implicaba la formación del complejo soluble y posterior precipitación del PE; y el número 3 que implicaba la precipitación del complejo insoluble.
16. la aplicación del protocolo 2 permitió precipitar el 46 % de la TRP en el homogenado de páncreas; mientras que la aplicación del protocolo 3 permitió precipitar el 82 %.
17. el ALG permitió precipitar el 99 % de la TRP total en el homogenado de páncreas.

### 6.1. APLICACIONES DE LOS COMPLEJOS INSOLUBLES EL100-TRP, ES100-TRP Y ALG-TRP.

#### 6.1.1. Concentración y estabilización de TRP.

Los tres PE forman complejos insolubles con la TRP que permitirían concentrarla y estabilizarla. En rigor, la concentración es una característica intrínseca a la precipitación por formación de complejos insolubles ya que el PP que contiene la enzima de interés idealmente podría redisolverse en cualquier volumen siempre y cuando se apliquen las condiciones óptimas de pH y/o fuerza iónica. En este aspecto, reducir el volumen de trabajo puede ser beneficioso si, por ejemplo, la precipitación de TRP se aplica como paso previo a una etapa cromatográfica durante la purificación de la misma.

Por otro lado, la estabilización de enzimas depende de la interacción de éstas con el PE y de las condiciones en las cuales se lleve a cabo la formación del complejo insoluble. Los complejos EL100-TRP; ES100-TRP y ALG-TRP se forman en condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica que no perjudican la estructura ni la actividad catalítica de esta enzima. Esto es muy importante ya que el objetivo final es aprovechar las capacidades proteolíticas de la TRP para distintos fines. Además, la posibilidad de mejorar la resistencia térmica de la enzima y su estabilidad a través del tiempo sin necesidad de aplicar técnicas de ingeniería genética y proteómica, le ofrece a estos complejos insolubles PE-TRP una gran ventaja debido a la rapidez y simpleza con la que se forman. En este aspecto, el EL100 incrementó sustancialmente la estabilidad térmica de la TRP.

Incluso, el PP (sin redisolverse) puede liofilizarse y/o mezclarse con compuestos estabilizantes de manera tal de optimizar el almacenamiento y la vida útil de la enzima.

#### 6.1.2. Purificación de TRP.

El ALG es el mejor precipitante de TRP permitiendo recuperar en el PP el 99 % de la enzima total en el homogenado de páncreas. Además, se comprobó que puede separarse de la TRP por HIC.

El EL100 también presentó una buena capacidad precipitante de TRP, permitiendo recuperar el 82 % de la enzima del homogenado de páncreas en el PP por precipitación del complejo insoluble a pH 5,00. En la aplicación de este PE se destaca la posibilidad de precipitar TRP a través de un protocolo que implica la formación del complejo soluble en presencia elevada fuerza iónica y posterior insolubilización del EL100. El rendimiento de TRP en el PP es igual a 46 %.

Así, se demuestra que el conocimiento del mecanismo y las condiciones de formación de los complejos PE-TRP es fundamental para controlar las características fisicoquímicas del PP.

### **6.1.3. Inmovilización de TRP.**

El complejo insoluble ALG-TRP puede adsorberse sobre una superficie sólida para inmovilizar la enzima o redisolverse para generar condiciones que permitan luego formar sistemas con TRP inmovilizada, como hidrogeles o esferas. Estos sistemas pueden funcionar como biocatalizadores industriales o como componente de cremas para el tratamiento de edemas y heridas.

El complejo insoluble EL100-TRP puede utilizarse para fabricar suplementos digestivos que favorezcan la degradación y absorción de los alimentos. También se puede usar para producir cremas para el tratamiento de edemas y heridas. En todos los casos, el complejo insoluble debería mezclarse con aditivos como plastificantes y por lo tanto sería importante llevar a cabo los respectivos estudios estabilidad estructural y actividad catalítica de la TRP en este nuevo medio.

Dos protocolos pueden aplicarse para precipitar TRP con EL100, los cuales presentan distintos mecanismos de formación del PP y porcentaje de TRP precipitada. Ambos PP poseen propiedades fisicoquímicas diferentes y por ende, permitirían obtener diferentes perfiles de liberación de la TRP: velocidad, porcentaje de TRP liberada, etc.

Además, si los PE son inmovilizados sobre un soporte sólido esférico o plano (por ejemplo, fabricado con poliestireno) previo a la formación del complejo insoluble (o soluble) se puede obtener una gran variedad de partículas recubiertas con TRP con diferentes características.

Es importante destacar que las interacciones a través de las cuales la TRP se une al ALG y al EL100 son reversibles y no se requiere el uso de reactivos tóxicos (como la carbodiimida) para promover la unión. Además, la estructura de la enzima no se ve afectada por el proceso de formación del complejo insoluble. Más aún, se observó que el EL100 mejora considerablemente la estabilidad térmica de la TRP y la protege del proceso de autodegradación.

Por supuesto que, para un estudio más preciso de la inmovilización de TRP, se debe caracterizar también la cinética de reacción de la enzima unida al soporte a través de los parámetros  $V_{\max}$  y  $K_m$ ; entre otras cosas.

- [1] Jegannathan, K. R.; Nielsen P. H. (2013) *Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review*. J Clean Prod **42** 228-240.
- [2] van Beilen, J. B.; Li, Z. (2002) *Enzyme technology: an overview*. Curr Opin Biotech **13** 338-344.
- [3] Rohm, O. (1907) *Preparation of hides for the manufacture of leather*. Patente US886411, The United States Patent and Trademark Office.
- [4] Kirk, O.; Borchert, T. B.; Fuglsang, C. C. (2002) *Industrial enzyme applications*. Curr Opin Biotech **13** 345-351.
- [5] Schäfer, T.; Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C.; Pedersen, S.; Salmon, S.; Olsen, H. S.; Deinhammer, R.; Lund, H. (2005) *Enzymes for Technical Applications*. En: Biopolymers Online (ed. Steinbüchel, A.), Wiley, Weinheim, 377-387.
- [6] Linko, Y. Y.; Lämsä, M.; Wu, X.; Uosukainen, E.; Seppälä, J.; Linko, P. *Biodegradable products by lipase biocatalysis*. J Biotechnol **66** 41-50.
- [7] Schmid, A.; Dordick, J.S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Industrial biocatalysis today and tomorrow*. Nature **409** 258-268.
- [8] Aelhe W. (2007) *Enzymes in Industry. Production and Applications*, 3er Ed., Wiley, Weinheim.
- [9] Eriksen N. (1996) *Detergents*. En: Industrial Enzymology (eds. Godrfrey, T.; West, S.), Stockton, New York, 187-200.
- [10] Olsen, H. S.; Flahot P. (1998) *The role of enzymes in modern detergency*. J Surfactants Deterg **1(4)** 555-567.
- [11] Zhao, H.; Chockalingam, K.; Chen, Z. (2002) *Directed evolution of enzymes and pathways for industrial catalysis*. Curr Opin Biotech **13** 104-110.
- [12] Lima, N.; Mota, M. (2003) *Biotecnología: fundamentos e aplicações*, Lidel, Lisboa.
- [13] Pessoa Jr., A., Vahan Kilikian, B. (2005) *Purificação de productos biotecnológicos*, Ed. Manole Ltda. Sao Paulo.
- [14] Eijsink, V. G. H.; Gaseidnes, S.; Borchert, T. V.; van der Burg, V. (2005) *Directed evolution of enzyme stability*. Biomol Eng **22** 21-30.
- [15] Fernandez, M.; Fragoso, A.; Cao, R.; Villalonga R. (2003) *Improved functional properties of trypsin modified by monosubstituted amino- $\beta$ -cyclodextrins*. J Mol Catal B-Enzym **21** 133-141.

- [16] Mateo, C.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. (2000) *Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment*. *Enzyme Microb Tech* **26** 509-515.
- [17] Zhilu, A.; Zhenjuiang, J.; Lite, L.; Wei, D.; Isao, K.; Huishang, L. (2005) *Immobilization of Streptomyces olivaceovirides E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production*. *Process Biochem* **40** 2707-2714.
- [18] Arroyo, M. (1998) *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*. *Ars Pharmaceutica* **39(2)** 23-39.
- [19] Alemzadeh, I.; Nejati, S. (2009) *Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase*. *J Hazard Mater* **166** 1082-1086.
- [20] Siva Sai Kumar, R.; Vishwanath, K. S.; Singh, S.A.; Appu Rao, A. G. (2006) *Entrapment of  $\alpha$ -amylase of alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization*. *Process Biochem* **41** 2282-2288.
- [21] Cooper, C. L.; Dubin, P. L.; Kayitmazer, A. B.; Turksen, S. (2005) *Polyelectrolyte-protein complexes*. *Curr Opin Colloid In* **10** 52-78.
- [22] Krajewska, B. (2004) *Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review*. *Enzyme Microb Tech* **35** 126-139
- [23] Teotia, S.; Khare, S. K.; Gupta, M. N. (2001) *An efficient purification process for sweet potato beta-amylase by affinity precipitation with alginate*. *Enzyme Microb Tech* **28** 792-795.
- [24] Silva, C. J. S. M.; Zhang, Q.; Shen, J.; Cavaco-Paulo, A. (2006) *Immobilization of proteases with water soluble-insoluble reversible polymer for treatment wool*. *Enzyme Microb Tech* **39** 634-640.
- [25] Gibson, T.D.; Pierce, B. L. J.; Hulbert, J. N.; Gillespie, S. (1996) *Improvements in the stability characteristics of biosensors using protein-polyelectrolyte complexes*. *Sensor Actuator* **33** 13-18.
- [26] Mahapatra, P.; Kumari, A.; Garlapati, V.; Banerjee, R.; Nag, A. (2009) *Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from Rhizopus oligosporus optimized with response surface methodology*. *J Mol Catal B-Enzym* **60** 57-63.
- [27] Gawande, P. V.; Kamat, M. Y. (1998) *Preparation, characterization and application of Aspergillus sp. xylanase immobilized on Eudragit S-100*. *J Biotechnol* **66** 165-175.
- [28] Porfiri, M. C.; Braia, M.; Farruggia, B.; Picó, G.; Romanini, D. (2009) *Precipitation with poly acrylic acid as a trypsin separation strategy*. *Process Biochem* **44** 1046-1049.

- [29] Braia, M.; Porfiri M. C.; Farruggia, B.; Picó, G.; Romanini, D. (2008) *Complex formation between protein and poly vinyl sulfonate as a strategy of proteins isolation*. J Chromatogr B **873** 139-143.
- [30] Fabian, C. B.; Huynh, L. H.; Ju, Y. H. (2010) *Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate*. Food Sci Technol-LEB **43** 375-379.
- [31] Weinbreck, F.; de Vries, R.; Schorooyen, P.; de Kruif, C. G. (2003) *Complex coacervation of whey proteins and gum Arabia*. Biomacromolecules **4** 293-303.
- [32] Mattison, K. W.; Dubin, P. L.; Brittain, I. J. (1998) *Complex formation between bovine serum albumin and strong polyelectrolytes: effect of polymer charge density*. J Phys Chem B **102** 3830-3836.
- [33] Patrickios, C. S.; Sharma, L. R.; Armes, S. P.; Billingham, N. C. (1999) *Precipitation of a water-soluble ABC triblock methacrylic polyampholite: effects of time, pH, polymer concentration, salt type and concentration, and presence of a protein*. Langmuir **15** 1613-1620.
- [34] Romanini, D.; Braia, M.; Giatte Angarten, R.; Loh, W.; Picó, G. (2007) *Interaction of lysozyme with negatively charged flexible chain polymers*. J Chromatogr B **857** 25-31.
- [35] Izumrudov, V. A.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. (1999) *Polycomplexes-potential for bioseparation*. Bioseparation **7** 207-220.
- [36] Kaibara, K.; Okazaki, T.; Bohidar, H. B.; Dubin, P. L. (2000) *pH-induced coacervation in complexes of bovine serum albumine and cationic polyelectrolytes*, Biomacromolecules **1** 100-107.
- [37] de Vries, R. (2004) *Monte Carlo simulation of flexible polyanions complexing Ruth whey proteins at their isoelectric point*. J Chem Phys **120** 3475-3481.
- [38] Guo, W.; Zhu, W.; Cai, J.; Huang, L.; Cen, P.; Xu, Z. (2012) *Refolding and two-step purification by hydrophobic interaction chromatography of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from Escherichia coli*. Process Biochem **47** 960-967.
- [39] Kepka, C.; Collet, E.; Roos, F.; Tjerneld, F.; Veide, A. (2005) *Two-step recovery process for tryptophan tagged cutinase: interfacing aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography*. J Chromatogr A **1075** 33-41.
- [40] Mahn, A. (2012) *Hydrophobic Interaction Chromatography: Fundamentals and Applications in Biomedical Engineering*. En: Biomedical Science, Engineering and Technology (ed. Ghista, D. N.), Intech, Rijeka, 603-628.

- [41] Eriksson, K.; Belew, M. (2011) *Hydrophobic Interaction Chromatography*. En: Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications (ed. Janson, J.), 3er Ed., Wiley, Weinheim, 165-182
- [42] O'Farrell, P. A. (2010) *Hydrophobic Interaction Chromatography*. En: Methods in Molecular Biology, vol. 244: Protein Purification Protocols (ed. Cutler, P.), 2da Ed., Humana Press Inc, Totowa, 133-138.
- [43] Lienqueo, M.E; Mahn, A.; Salgado, J. C.; Asenjo, J. A. (2007) *Current insights on protein behaviour in hydrophobic interaction chromatography*. J Chromatogr B **849** 53-68.
- [44] *Hydrophobic Interaction Chromatography: Principles and Methods*. Amersham pharmacia biotech.
- [45] Queiroz, J. A.; Tomaz, C. T.; Cabral, J. M. S. (2001) *Hydrophobic interaction chromatography of proteins*. J Biotechnol **87** 143-159.
- [46] Bode, W.; Walter, J.; Wenzel, H.R.; Tsechesche, H. (1984). *The refined 2.2 °A x-ray crystal structure of the ternary complex formed by bovine trypsinogen, valine-valine and the Arg 15 analogue of bovine pancreatic trypsin inhibitor*. Eur J Biochem **144** 185-190.
- [47] Orengo, C. A.; Michie, A. D.; Jones, S.; Jones, D. T.; Swindells, M. B.; Thornton, J. M. (1997) *CATH-a hierarchic classification of protein domain structures*. Structure **5(8)** 1093-1109.
- [48] Felhammer, H.; Bode, W.; Huber, R. (1977). *Crystal structure of bovine trypsinogen at 1.8 °A resolution*. J Mol Biol **111** 415-438.
- [49] Beynon, R.; Bond, J. S. (2001) *Proteolytic enzymes*, 2da Ed., Oxford University Press, Oxford.
- [50] Huber, R.; Kukla, D.; Bode, W.; Schwager, P.; Bartels, K.; Deisenhofer, J.; Steigemann, W. (1974). *Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor II. Crystallographic refinement at 1.9 °A resolution*. J Mol Biol **89** 73-101.
- [51] Stroud, R. M.; Kay, L. M.; Dickerson, R. E. (1974) *The structure of bovine trypsin: electron density maps of the inhibited enzyme at 5 °A and at 2.7 °A resolution*. J Mol Biol **83** 185-208.
- [52] Hedstrom, L. (2002). *Serine proteases mechanism and specificity*. Chem Rev **102** 4501-4523.
- [53] Stroud, R. M.; Krieger, M.; Koeppe II, R. E.; Kossiakoff, A. A.; Chambers, J. L. (1975) *Structure-Functions relationships in the serine proteases*. En: Proteases and

Biological Controls (eds. Reich, E.; Rifkin, D.B.; Shaw, E.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 13-32.

[54] Polgár, L. (2005) *The catalytic triad of serine proteases*. Cell Mol Life Sci **62** 2161-2172.

[55] Di Cera, E. (2009) *Serine proteases*. IUBMB Life **61(5)** 510-515.

[56] Perona, J. J.; Craik, C. S. (1995) *Structural basis of substrate specificity in the serine proteases*. Protein Sci **4** 337-360.

[57] Margot, A.; Flaschel, E.; Renken, A. (1998) *Development of a continuously operated reactor for the hydrolysis of whey protein by trypsin*. Process Biochem **33(2)** 125-131.

[58] Rocha, C.; Gonçalves, M.P.; Teixeira, J.A. (2011) *Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis*. Process Biochem **46** 505-511.

[59] Bougatef, A.; Souissi, N.; Fakhfakh, N.; Ellouz-Triki, Y.; Nasri, M. (2007) *Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (Sardina pilchardus)*. Food Chem **102** 343-350.

[60] Khantaphant, S.; Benjakul, S. (2010) *Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (Lutjanus vitta)*. Food Chem **120** 658-664.

[61] Jellouli, K.; Bougatef, A.; Daassi, D.; Balti, R.; Barkia, A.; Nasri, M. (2009) *New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (Balistes capriscus) with high activity at low temperature: Purification and characterization*. Food Chem **116** 644-650.

[62] Schneider, M.; Guillot, C.; Lamy B. (1981) *The affinity precipitation technique. Application to the isolation and purification of trypsin from bovine pancreas*. Annals of NY Acad of Sci 257-263.

[63] Luong, J. H.; Male, K. B.; Nguyen, A. (1990) *Affinity process for trypsin purification and stabilization*. Patente 4973554, The United States Patent and Trademark Office.

[64] Macouzet, M.; Simpson, B. K.; Lee, B. H. (2005) *Expression of a cold adapted fish trypsin in Pichia pastoris*. FEMS Yeast Res **5** 851-857.

[65] Muller, R.; Glaser, S.; Geipel, F.; Thalhofer, J.; Rexer, B.; Schneider, C.; Ratka, M.; Ronning, S.; Eckstein, H.; Giessel, C. (2007) *Method for producing recombinant trypsin*. US7276605B2, The United States Patent and Trademark Office.

[66] Mattanovich, D.; Katinger, H.; Hohenblum, H.; Naschberger, S.; Weik, R. (2008) *Method for the manufacture of recombinant trypsin*. US7351549B2, The United States Patent and Trademark Office.

- [67] Nan-sun, K.; Hwa-Young, Y.; Nguyen-Duc, C.; Yun-Ji, S.; Tae-Ho, K.; Moon-Sik, Y. (2011) *Production of functional recombinant bovine trypsin in transgenic rice cell suspension culture*. *Protein Expres Purif* **76** 121-126.
- [68] Pálsdóttir, H. M.; Gudmundsdóttir, A. (2007) *Expression and purification of a cold-adapted group III trypsin in Escherichia Coli*. *Prot Expres Purif* **51** 243-252.
- [69] Moustafine, R. I.; Kabanova, T. V.; Kemenova, V. A.; Van den Mooter, G. (2005) *Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E-100 with Eudragit L-100*. *J Control Release* **103** 191-198.
- [70] Haznedar, S.; Dortunç, B. (2004) *Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamida*. *Int J Pharm* **269** 131-140.
- [71] Elgindy, N.; Samy, W. (2009) *Evaluation of the mechanical properties and drug release of cross-linked Eudragit films containing metronidazole*. *Int J Pharm* **376** 1-6.
- [72] Kumar, A.; Gupta, M. N. (1998) *Immobilization of trypsin on an enteric polymer Eudragit S-100 for the biocatalysis of macromolecular substrate*. *J Mol Catal B-Enzym* **5** 289-294.
- [73] Sardar, M.; Roy, I.; Gupta, M. (2010) *Simultaneous purification and immobilization of Aspergillus niger xylanase on the reversibly soluble polymer Eudragit<sup>TM</sup> L-100*. *Enzyme Microb Tech* **27** 672-679.
- [74] Rodrigues, A. R.; Cabral, J. M. S.; Tapia, M. A. (2002) *Immobilization of Chromobacterium viscosum lipase on Eudragit S-100: coupling, characterization, and kinetic application in organic and biphasic media*. *Enzyme Microb Tech* **31** 133-141.
- [75] Gawande, P. V.; Kamat, M. Y. (1999) *Purification of Aspergillus sp. xylanase by precipitation with an anionic polymer Eudragit S-100*. *Process Biochem* **34** 577-580.
- [76] Breccia, D.; Matiasson, B.; Siñeriz, F. (1998) *Separation of bacterial xylanase by precipitation using eudragit S100*. *J Biotechnol* **61** 219-223.
- [77] Meera, G.; Abraham, T. E. (2006) *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan – a review*. *J Control Release* **114** 1-14.
- [78] Dashevski, A. (1998) *Protein loss by the microencapsulation of an enzyme (lactase) in alginate beads*. *Int J Pharm* **161** 1-5.
- [79] Chen, L.; Subirade, M. (2006) *Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds*. *Biomaterials* **27** 4646-4654.
- [80] Mondal, K.; Mehta, P.; Gupta, M. N. (2004) *Affinity precipitation of Aspergillus niger pectinase by microwave-treated alginate*. *Protein Expres Purif* **33** 104-109.

- [81] Lee, K. Y.; Mooney, D. J. (2012) *Alginate: properties and Biomedical applications*. Prog Polym Sci **37** 106-126.
- [82] Yoshida, K.; Dubin, P. L. (1999) *Complex formation between polyacrylic acid and cationic/nonionic mixed micelles: effect of pH on electrostatic interaction and hydrogen bonding*. Colloids Surface A **147** 161-167.
- [83] Morais, I. P. A.; Tóth, I. V.; Rangel, A. O. S. S. *Turbidimetric and nephelometric flow analysis: concepts and applications*. Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto.
- [84] Tsetska, R. (2001) *Physical chemistry of polyelectrolytes*. Surf Sci Series **99** 687-741.
- [85] Castellan, G. W. (1987) *Espectroscopía Atómica*. En: Fisicoquímica, 2da Ed., Addison-Wesley Iberoamericana S.A., Wilmington, Delaware, 613-658.
- [86] Suppan, P.; Ghoneim, N. (1997) *Introduction*. En: Solvatochromism, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1-20.
- [87] Laidler, K. J. (1978) *Molecular Spectroscopy*. En: Physical chemistry with biological applications, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc, California.
- [88] Campbell, I. D.; Dwek, R. A. (1984) *Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy*. En: Biological Spectroscopy, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc, California, 61-90.
- [89] Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. (2005) *How to study proteins by circular dichroism*. Biochimica et Biophysica Acta **1751** 119-139.
- [90] Schwenke, K. D. (1998) *Proteins: some principles of classification and structure*. En: Proteins at Liquid Interfaces (ed. Möbius, D.; Miller, R.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1-50.
- [91] Fasman, G. D. (1996) *Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules*, Plenum Press, New York and London.
- [92] Kelly, S. M.; Price, N. C. (1997) *The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding*. Biochim Biophys Acta **1338** 161-185.
- [93] Sreerama, N.; Woody R. (2000) *Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set*. Anal Biochem **287** 252-260.
- [94] Sreerama, N; Venyaminov, S. Y.; Woody, R. W. (2000) *Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis*. Anal Biochem **287** 243-251.

- [95] Khrapunov, S. (2009) *CD spectroscopy has intrinsic limitations for protein secondary structure analysis*. Anal Biochem **389**(2) 174-176.
- [96] Ladbury, J. E.; Chowdhry, B. Z. (1996) *Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions*. Chem Biol **3**(10) 791-801.
- [97] Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L. N. (1989) *Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter*. Anal Biochem **179** 131-137.
- [98] Freire, E.; van Osdol, W. W.; Mayorga, O. L.; Sanchez-Ruiz, J. M. (1990) *Calorimetrically determined dynamics of complex unfolding transitions in proteins*. Annu Rev Biophys Bio **19** 159-188.
- [99] Manual de Usuario del microcalorímetro Microcal VP-ITC.
- [100] Ladbury, J. E.; Doyle, M. L. (2004) *Biocalorimetry 2: Applications of calorimetry in the biological sciences*, Wiley, Chichester.
- [101] Pellegrini Malpiedi, L.; Picó, G. A.; Loh, W.; Nerli, B. B. (2010) *Role of polymer-protein interaction on partitioning pattern of bovine pancreatic trypsinogen and alpha-chymotrypsinogen in polyethyleneglycol/sodium tartrate aqueous two-phase systems*. J Chromatogr B **878** 1831-1836.
- [102] Zhou, Y. L.; Liao, J. M.; Du, F.; Liang, Y. (2004) *Thermodynamics of the interaction of xanthine oxidase with superoxide dismutase studied by isothermal titration calorimetry and fluorescence spectroscopy*. Thermochim Acta **426** 173-178.
- [103] Velázquez-Campoy, A. (2006) *Ligand binding to one-dimensional lattice-like macromolecules: Analysis of the McGhee-von Hippel theory implemented in isothermal titration calorimetry*. Anal Biochem **348** 94-104.
- [104] Jha, N. S.; Kishore, N. K. (2009) *Binding of streptomycin with bovine serum albumin: energetics and conformational aspects*. Thermochim Acta **482** 21-29.
- [105] Zakariassen, H.; Sørli, M. (2007) *Heat capacity changes in heme protein–ligand interactions*. Thermochim Acta **464** 24-28.
- [106] El Harrou, M.; Parody-Morreale, A. (1999) *Measurement of biochemical affinities with a gill titration calorimetry*. Anal Biochem **254** 96-108.
- [107] Gill, S. J.; Murphy, K. P.; Robert, C. H. (1990) *Partition function formalism for analyzing calorimetric experiments*. J Chem Educ **67** 928-931.

- [108] Kim, W.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. (2006) *Development of a fitting model suitable for the isothermal titration calorimetric curve of DNA with cationic ligands*. J Phys Chem B **110** 10919-10925.
- [109] Privalov, P. L.; Khechinashvili, N. N. (1974) *A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study*. J Mol Biol **86**(3) 665-684.
- [110] Privalov, P. L.; Potekhin, S. A. (1986) *Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins*. Method Enzymol **131** 4-51.
- [111] Privalov, P. L. (1979) *Microcalorimetric studies of macromolecules*, NETSU **6**(2) 56-65.
- [112] Manual de Usuario del microcalorímetro Microcal VP-DSC.
- [113] Privalov, P.L.; Filimonov, V.V. (1978) *Thermodynamic analysis of transfer RNA unfolding*. J Mol Biol **122** 447-464.
- [114] Bach, D.; Chapman, D. (1980) *Calorimetric studies of biomembranes and their molecular components*. En: Biological Microcalorimetry (ed. Beezer, A. E.), Academic Press, London, 275-309.
- [115] Privalov, P. L.; Tiktopulo, E. I.; Venyaminov, S. Y.; Griko, Y. V.; Makhatadze, G. I.; Khechinashvili, N. N. (1989) *Heat capacity and conformation of proteins in the denatured state*. J Mol Biol **205** 737-750.
- [116] Leharne, S.A.; Chowdhry, B. Z. (1998) *Thermodynamic Background to Differential Scanning Calorimetry*. En: Biocalorimetry: application of calorimetry in the biological sciences (eds. Ladbury, J. E.; Chowdhry, B. Z.), Wiley, New York, 155-183.
- [117] Montgomery, D.; Jordan, R.; McMacken, R.; Freire, E. (1993) *Thermodynamic and structural analysis of the folding/unfolding transitions of the Escherichia coli molecular chaperone DnaK*. J Mol Biol **232** 680-692.
- [118] Azuaga, A. I.; Conejero-Lara, F.; Rivas, G.; De Filippis, V.; Fontana, A.; Mateo, P. L. (1995) *The thermodynamics of association and unfolding of the C-terminal fragment of thermolysin*. Biochim Biophys Acta **1252** 95-102.
- [119] Filimonov, V. V.; Rogov, V. V. (1996) *Reversible association of the equilibrium unfolding intermediate of  $\lambda$  Cro repressor*. J Mol Biol **255** 767-777.
- [120] Some, D.; Kenrick, S. (2012) *Characterization of protein-protein interactions via static and dynamic light scattering*. En: Protein Interactions (eds. Cai, J.; Wang, R. E.), InTech, Rijeka, 401-426.

- [121] Berne, B. J.; Pecora, R. (2000) *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics*, Dover Publications Inc, Mineola.
- [122] Nicolai, T.; Brown, W. (1996) *Scattering from concentrated polymer solutions*. En: *Light Scattering: Principles and Development* (ed. Brown, W.), Oxford University Press, Oxford, 166-200.
- [123] Camerini-Otero, R.; Day, L. A. (1978) *The wavelength dependence of the turbidity of solutions of macromolecules*. *Biopolimers* **17** 2241-2249.
- [124] Johnson, K. D.; Clark, A.; Marshall, S. (2002) *A functional comparison of ovine and porcine trypsins*. *Comp Biochem and Physiol B* **131** 423-431.
- [125] Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. (1956) *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. *Anal Chem* **28(3)** 350-356
- [126] Marquardt, D.W. (1963) *An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters*. *J Soc Ind Appl Math* **11(2)** 431-441.