

VNiVERSiDAD DE SALAMANCA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL

DESARROLLO DE NUEVOS SISTEMAS PARA EL CAMBIO DE ESCALA EN CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD

MILENA AMPARO VEGA MORENO
SALAMANCA, 2013

VNiVERSiDAD DE SALAMANCA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL

DESARROLLO DE NUEVOS SISTEMAS PARA EL CAMBIO DE ESCALA EN CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

MEMORIA QUE PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN
INGENIERÍA QUÍMICA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
PRESENTA:

DÑA. MILENA AMPARO VEGA MORENO.



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

El Dr. D. Miguel Ángel Galán Serrano, Catedrático de Ingeniería Química de la Universidad de Salamanca y la Dra. Dña. Eva María Martín del Valle, Profesora Titular de Ingeniería Química de la Universidad de Salamanca,

Informan:

Que la memoria titulada: “Desarrollo de nuevos sistemas para el cambio de escala en cromatografía de afinidad” que para optar al Grado de Doctor en Ingeniería Química, Programa de Doctorado “Ingeniería Química y Medio Ambiente (2006/2008)”, presenta Dña. Milena Amparo Vega Moreno, ha sido realizado bajo la dirección de los mismos en el Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca y que considerando que constituye un trabajo de tesis autorizan:

Su presentación ante tercer ciclo de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firman el presente informe, en Salamanca a 4 de Septiembre de 2013.

D. Miguel Ángel Galán Serrano

Dña. Eva María Martín del Valle

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer de manera muy especial a los directores de este trabajo, el Dr. Miguel Ángel Galán Serrano y la Dra. Eva Martín del Valle, por confiar en mí, dándome la oportunidad de hacer esta tesis doctoral, y brindarme toda la ayuda necesaria para poder sacarla adelante.

También quiero agradecer al Dr. Ramón Cerro, por sus valiosas y acertadas aportaciones a este trabajo, además de todo el tiempo invertido.

De igual forma, dar las gracias a la Dra. María del Carmen Márquez, por iniciarme en el campo de la investigación.

A Manolo, María, Belén y Julián que ya no está, gracias por quitarme trabajo y ser tan colaboradores y diligentes.

A mis queridos amigos Sol y Juan Manuel, con los cuales empecé esta aventura, y conocen todo desde el principio, solo puedo decirles muchas gracias, los quiero.

A mis compañeros de laboratorio, los que están y los que han partido ya: Cris, Muliye, Pepe, Antonio, Monty, Jose, Barbara, Celeste, Edgar, Mariano, Cristina M., Elena, gracias por compartir conmigo estos años de trabajo, que han dejado sobre todo muchos buenos momentos y anécdotas irrepetibles.

Paco Bravo, te debo un agradecimiento pasado por ayudarme con las fotos de enzimas de mi tesina, este es el momento... gracias.

Al profesor Luis Simon, por ayudarme con sus conocimientos en química.

A los profesores del Dpto. de ingeniería química de la universidad de Salamanca, gracias por su ayuda.

Oma, cuñis siempre dispuesta a escucharme, eres la mejor.

Albina, gracias por apoyarme estos años y recordarme lo importante que es esto para mí.

Rafa, sin tu apoyo creo que no hubiera sido capaz de decidirme, gracias por estar siempre que te he necesitado.

A mi familia, que siempre me han apoyado en los buenos y malos momentos.

Gracias a todas las persona que de una u otra forma han participado en el desarrollo de este trabajo.

Gracias a todos

A mis padres, Heriberto y Martha,
mi hermano Mauri y Carlos.

ÍNDICE

INDICE

1.	Introducción y justificación.	3
2.	Objetivos.	13
3.	Fundamento teórico.	17
3.1.	Procesos en Cromatografía.	17
3.2.	Fundamentos de la cromatografía de afinidad con Metales Inmovilizados (IMAC).	20
3.2.1.	Antecedentes de la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados IMAC.	22
3.2.2.	Componentes de un medio de afinidad en cromatografía IMAC.	24
3.2.2.1.	Soporte sólido (matriz).	24
3.2.2.1.1.	Matrices de polímeros naturales.	27
3.2.2.1.2.	Matrices Sintéticas.	34
3.2.2.1.3.	Monolitos.	39
3.2.2.2.	Activación de la matriz.	44
3.2.2.3.	Brazo espaciador.	46
3.2.2.3.1.	Grupo quelante.	48
3.2.2.3.2.	Iones metálicos.	50
3.3.	Técnicas de la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC).	54
3.3.1	Solución tampón y preparación de la muestra.	55
3.3.2.	Proceso de elución.	56
3.3.3.	Regeneración.	59
3.3.4.	Fase Móvil: pH, tampones y fuerza Iónica.	60
3.4.	Preparación de la matriz IMAC.	61
3.5.	Descripción de las propiedades características de la proteína BSA y la enzima CAT.	62
3.5.1.	Albumina de suero bovino (BSA).	62
3.5.1.1.	Estructura primaria, secundaria y terciaria.	63
3.5.1.2.	Propiedades físico-químicas.	65
3.5.1.3.	Viscosidad.	65
3.5.1.4.	Efecto del pH.	66
3.5.1.5.	Afinidad con ligandos	68

3.5.2.	Catalasa (CAT).	69
3.5.2.1.	Características estructurales.	70
3.5.2.2.	Función enzimática.	71
3.5.2.3.	Estructura de la catalasa.	72
3.5.2.3.1.	Estructura primaria.	72
3.5.2.3.2.	Estructura secundaria.	73
3.5.2.3.3.	Estructura terciaria.	73
3.5.2.3.4.	Estructura cuaternaria.	74
3.6.	Termodinámica de enlace.	75
3.6.1.	Técnica de nano-calorimetría isotérmica (Isothermal Titration Calorimetry – ITC).	77
3.6.1.1.	Algunas aplicaciones del ITC en biotecnología.	81
3.6.1.1.1.	Aplicaciones en bioseparación.	81
3.6.1.1.2.	Aplicaciones en el desarrollo de fármacos.	81
3.6.1.1.3.	Aplicaciones en el metabolismo celular.	82
4.	Materiales y métodos.	85
4.1.	Productos químicos.	85
4.2.	Material y equipos utilizados.	86
4.3.	Preparación de la matriz cromatográfica.	87
4.3.1.	Preparación de los monolitos cerámicos.	87
4.3.2.	Preparación del recubrimiento de agarosa D5.	88
4.3.3.	Activación de la matriz de epoxi-agarosa.	89
4.3.3.1.	Procedimiento.	90
4.3.4.	Unión del compuesto quelante a la matriz activada.	91
4.3.4.1.	Procedimiento.	92
4.3.5.	Unión del metal a la matriz de IDA-agarosa y determinación del contenido en Cu^{2+} .	93
4.3.5.1.	Procedimiento.	93
4.3.5.2.	Determinación de la cantidad de cobre enlazado.	94
4.3.6.	Preparación de la columna de afinidad.	95
4.4.	Determinación de la concentración de biomoléculas.	97
4.4.1.	Curva de Calibrado para la proteína BSA.	97
4.4.2.	Curva de Calibrado para la enzima CAT.	99
4.4.3.	Método Bradford.	100

4.4.3.1.	Procedimiento.	103
4.4.4.	Medición de la actividad de la enzima CAT.	102
4.4.4.1.	Procedimiento	103
4.5.	Experimentos nano-calorimetría isotérmicos (ITC).	105
4.5.1.	Experimentos ITC con el Cu^{2+} en estado libre para el enlace de la proteína BSA.	105
4.5.2.	Experimentos ITC con el Cu^{2+} inmovilizado para el enlace de la proteína BSA.	107
4.5.2.1.	Preparación de la matriz cromatografica para los experimentos de enlace de la proteína BSA y el Cu^{2+} inmovilizado.	107
4.5.2.1.1.	Preparación de los soportes de epoxi-agarosa.	108
4.5.2.1.2.	Preparación de los soportes de ácido iminodiacético.	108
4.5.2.1.3.	Unión del metal al soporte de IDA-agarosa.	109
4.5.2.1.4.	Determinación del contenido de Cu^{2+} en la matriz de IDA-agarosa.	109
4.5.2.1.5.	Curva de calibrado.	110
4.5.2.2.	Procedimiento para llevar a cabo los experimentos en el ITC.	111
4.5.3.	Experimentos ITC con Cu^{2+} en estado libre para el enlace de la enzima CAT.	113
4.5.4.	Experimentos ITC con el Cu^{2+} inmovilizado para el enlace de la enzima CAT.	114
5.	Resultados Experimentales.	119
5.1.	Estudio adsorción/elución de la proteína BSA en el sistema formado por un monolito cerámico recubierto de agarosa D5 y activado con 1,4 butanodiol diglicidil éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético IDA, como agente quelante y Cu^{2+} como ligando, BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+} .	119
5.1.1.	Curvas de equilibrio de adsorción.	131
5.1.1.1.	Efecto del caudal.	131
5.1.1.2.	Efecto del pH.	138
5.1.2.	Curvas de elución.	139
5.1.3.	Modelo de eficiencia de adsorción.	145

5.1.3.1.	Validación del modelo de eficiencia.	160
5.1.4.	Rendimiento del proceso de separación al reutilizar la columna cromatográfica.	165
5.1.5.	Transferencia de materia dentro de los canales del monolito cerámico.	173
5.1.5.1.	Desarrollo del Modelo.	173
5.1.5.1.1.	Balace de Materia.	174
5.1.5.1.2.	Transferencia de materia en la superficie del adsorbente.	176
5.1.5.1.3.	Interacciones proteína-adsorbente.	177
5.1.6.	Determinación de la constante cinética de adsorción y el coeficiente de dispersión.	185
5.1.6.1.	Constante cinética de adsorción k_{ads} .	185
5.1.6.1.1.	Efecto del caudal en la constante cinética de adsorción.	187
5.1.6.1.2.	Efecto del pH en la constante cinética de adsorción.	188
5.1.6.2.	Coeficiente de dispersión k_{disp} .	188
5.1.6.2.1.	Efecto del caudal en el coeficiente de dispersión.	193
5.1.6.2.2.	Efecto del pH en el coeficiente de dispersión.	193
5.2.	Estudio adsorción/elución de la enzima Catalasa en el sistema formado por un monolito cerámico recubierto de agarosa D5 y activado con 1,4 butanodiol diglicidil éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético IDA, como agente quelante y Cu^{2+} como ligando, CAT-agarosa-IDA- Cu^{2+} .	195
5.2.1.	Curvas de equilibrio de adsorción de la enzima CAT.	200
5.2.2.	Curvas de elución de la enzima CAT.	204
5.2.3.	Eficiencia de adsorción de la enzima CAT.	208
5.2.3.1.	Validación del modelo de eficiencia para la enzima CAT.	211
5.2.4.	Rendimiento del proceso de separación de la enzima CAT al reutilizar la columna cromatográfica.	213

5.2.5.	Transferencia de materia dentro de los canales del monolito cerámico.	216
5.2.6.	Determinación de la constante cinética de adsorción y el coeficiente de dispersión.	217
5.2.6.1.	Constante cinética de adsorción k_{ads} para la enzima CAT.	217
5.2.6.2.	Coeficiente de dispersión k_{disp} para la enzima CAT.	218
5.3.	Estudios de separación de las biomoléculas Suero de albumina Bovina (BSA) y Catalasa (CAT) en el sistema formado por un monolito cerámico recubierto de agarosa D5 y activado con 1,4 butanodiol diglicidil éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético IDA, como agente quelante y Cu^{2+} como ligando, (BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+}) y (CAT-agarosa-IDA- Cu^{2+}).	221
5.3.1.	Curvas de equilibrio de adsorción.	225
5.3.2.	Curvas de elución.	226
5.3.3.	Eficiencia de adsorción de las biomoléculas (BSA+CAT).	232
5.3.3.1.	Validación del modelo de eficiencia para las biomoléculas (BSA+CAT).	235
5.3.4.	Rendimiento del proceso de separación de las biomoléculas (BSA + CAT).	237
5.3.5.	Transferencia de materia dentro de los canales del monolito cerámico.	242
5.3.6.	Determinación de la constante cinética de adsorción y el coeficiente de dispersión para la mezcla binaria de biomoléculas BSA+CAT.	243
5.3.6.1.	Constante cinética de adsorción k_{ads} para la mezcla binaria de biomoléculas BSA+CAT.	243
5.3.6.2.	Coeficiente de dispersión k_{disp} para la mezcla binaria de biomoléculas BSA+CAT.	245
5.4.	Caracterización del enlace molecular para los sistemas conformados por la enzima CAT y la proteína BSA.	248
5.4.1.	Estudios de nano-calorimetría Isotérmica para	248

	las biomoléculas con el ligando (Cu^{2+}) en estado libre.	
5.4.1.1.	Estudio calorimétrico BSA- Cu^{2+} y CAT- Cu^{2+} .	249
5.4.2.	Estudios de nano-calorimetría Isotérmica para las biomoléculas con el ligando (Cu^{2+}) inmovilizado.	263
5.4.2.1.	Estudio calorimétrico BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+} y CAT-agarosa-IDA- Cu^{2+} .	263
6.	Conclusiones.	279
7.	Bibliografía.	287
Anexo A	Datos de equilibrio de los experimentos de adsorción.	315
Anexo B	Cálculo de la fuerza iónica de los tampones empleados.	327
Anexo C	Curvas de elución correspondientes a la proteína BSA.	331
Anexo D	Valores de la concentración en equilibrio local teórica predicha por el modelo de transferencia de materia.	341
Anexo E	Diagrama de flujo del modelo de transferencia de materia simulado mediante la plataforma MATLAB.	347
Anexo F	Modelo matemático empleado en la técnica ITC.	353

ÍNDICE DE TABLAS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1.	Algunas proteínas purificadas con IMAC.	6
Tabla 3-1.	Propiedades de una matriz convencional.	25
Tabla 3-2.	Algunos tipos de Soportes utilizados en cromatografía de afinidad.	26
Tabla 3-3.	Algunas matrices para aplicación IMAC disponibles en el mercado.	37
Tabla 3-4.	Brazos espaciadores disponibles comercialmente.	47
Tabla 3-5.	Predicción de la afinidad metal-proteína basada en la accesibilidad de los residuos de histidina y triptófano en la superficie de las proteínas.	52
Tabla 3-6.	Contribución individual de los aminoácidos involucrados en la retención de proteínas.	52
Tabla 3-7.	Composición de aminoácidos del suero albumino.	64
Tabla 3-8.	Propiedades fisicoquímicas de las albuminas humana y bovina.	67
Tabla 4-1.	Valores de Calibrado CuCl_2 vs Absorbancia.	95
Tabla 4-2.	Valores del calibrado de la proteína BSA vs absorbancia.	98
Tabla 4-3.	Valores de calibrado de la enzima CAT frente a la absorbancia.	99
Tabla 4-4.	Datos para la curva de calibrado utilizados en el método Bradford.	101
Tabla 4-5.	Valores del calibrado utilizados para llevar a cabo el cálculo de la actividad de la enzima CAT.	104
Tabla 4-6.	Parámetros ITC, para los experimentos de enlace de la proteína BSA con Cu^{2+} en estado libre.	105
Tabla 4-7.	Valores del calibrado CuCl_2 vs absorbancia.	110
Tabla 4-8.	Parámetros ITC, para los experimentos con Cu^{2+} inmovilizado.	111

Tabla 5-1.	Propiedades físicas de los monolitos empleados en los experimentos de adsorción/elución, llevados a cabo en solución fosfato 50 mM pH 4,5.	123
Tabla 5-2.	Propiedades físicas de los monolitos empleados en los experimentos de adsorción/elución, llevados a cabo en tampón fosfato 50 mM pH 7,0 a un caudal de 14,0 cm ³ /min.	123
Tabla 5-3.	Datos de absorbancia a 280 nm de la eliminación de imidazol de la columna cromatográfica después de un proceso de elución, Q=1,50 cm ³ /min.	129
Tabla 5-4.	Valores de $\rho_{BE,n}$ para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, para los cinco caudales estudiados.	150
Tabla 5-5.	Valores de $\rho_{BE,n}$ para el sistema formado por la proteína BSA-tampón fosfato pH 7,0 Q=14 cm ³ /min.	150
Tabla 5-6.	Coeficientes de adsorción/elución para el estudio de la proteína BSA, en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales estudiados.	159
Tabla 5-7.	Coeficientes de adsorción/elución para el estudio de la proteína BSA, en tampón fosfato pH 7,0.	159
Tabla 5-8.	Comparación de la concentración en equilibrio C_E experimental vs obtenida por el modelo para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales estudiados.	160
Tabla 5-9.	Porcentaje de error de la concentración en equilibrio C_E experimental vs obtenida por el modelo para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales estudiados.	161
Tabla 5-10.	Comparación de la concentración en	161

	equilibrio C_E experimental vs obtenida por el modelo para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0 para el caudal de 14 cm^3/min , C_E Experimental (Exp) y Teórico (Teo) (mol/cm^3) $\times 10^9$.	
Tabla 5-11.	Determinación de la constante cinética de adsorción k_{ads} a partir de las pseudo-constante de velocidad k'_{ads} , para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0, $Q= 14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$.	186
Tabla 5-12.	Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.	186
Tabla 5-13.	Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.	189
Tabla 5-14.	Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=5,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.	189
Tabla 5-15.	Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=10,60 \text{ cm}^3/\text{min}$.	190
Tabla 5-16.	Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=10,60 \text{ cm}^3/\text{min}$.	190
Tabla 5-17.	Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$.	190
Tabla 5-18.	Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0, $Q=14,00$	194

	cm ³ /min.	
Tabla 5-19.	Propiedades físicas de los monolitos utilizados en los experimentos de adsorción/elución de la enzima catalasa, llevados a cabo en tampón PBS pH 7,4 y concentraciones de 0,7 mg/cm ³ .	197
Tabla 5-20.	Comparativo de los coeficientes de adsorción/elución para el estudio de la enzima CAT y la proteína BSA a un caudal de 1,50 cm ³ /min.	208
Tabla 5-21.	Comparación de la concentración en equilibrio C _E experimental vs obtenida por el modelo para la enzima CAT, en tampón PBS pH 7,4 para el caudal de 1,5 cm ³ /min y para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 a un caudal de 1,50 cm ³ /min. C _E Exp y C _E Teo (mol/cm ³) x 10 ⁹ .	211
Tabla 5-22.	Determinación de la pseudo-constante y la constante cinética de adsorción k'_{ads} y k_{ads} (cm ² /mol s), para la enzima CAT y la proteína BSA Q= 1,50 cm ³ /min.	218
Tabla 5-23.	Valores de los pseudo-coeficientes y coeficiente de dispersión (cm ² /mol s), para la enzima CAT y la proteína BSA a un caudal de 1,50 cm ³ /min.	219
Tabla 5-24.	Cantidades totales de biomolécula obtenidas en el proceso de adsorción, así como las cantidades de forma independiente para la proteína BSA y la enzima CAT para cinco ciclos de adsorción/elución.	222
Tabla 5-25.	Cantidades totales de biomolécula obtenidas en el proceso de adsorción, así como las cantidades de forma independiente para la proteína BSA y la enzima CAT para cinco ciclos de adsorción/elución.	227
Tabla 5-26.	Coeficientes de adsorción/elución para el estudio de separación de la mezcla de biomoléculas BSA y CAT en la misma	232

	matriz cromatográfica.	
Tabla 5-27.	Concentración en equilibrio C_E experimental vs obtenida por el modelo de eficiencia para la enzima CAT y la proteína BSA (proveniente de la separación de las dos biomoléculas). C_E Exp y C_E Teo (mol/cm^3) x 10^9 .	235
Tabla 5-28.	Comparación de la pseudo-constante y la constante cinética de adsorción k'_{ads} y k_{ads} ($\text{cm}^2/\text{mol s}$), para la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ estudiada de forma individual y proveniente de la separación de BSA+CAT.	244
Tabla 5-29.	Comparación de la pseudo-constante y la constante cinética de adsorción k'_{ads} y k_{ads} ($\text{cm}^2/\text{mol s}$), para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ estudiada de forma individual y proveniente de la separación de BSA+CAT.	244
Tabla 5-30.	Determinación del pseudo-coeficiente y coeficiente de dispersión k'_{disp} y k_{disp} (cm/s), para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, estudiada de forma individual y proveniente de la separación de BSA+CAT.	245
Tabla 5-31.	Determinación del pseudo-coeficiente y coeficiente de dispersión k'_{disp} y k_{disp} (cm/s), para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, estudiada de forma individual y proveniente de la separación de BSA+CAT.	246
Tabla 5-32.	Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas para el enlace de la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 y el Cu^{2+} en estado libre, para las 5 temperaturas estudiadas.	255
Tabla 5-33.	Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas para el	255

	enlace de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y el Cu^{2+} en estado libre, para las 5 temperaturas estudiadas.	
Tabla 5-34.	Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas para el enlace de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y el Cu^{2+} en estado libre, para las 5 temperaturas estudiadas.	256
Tabla 5-35	Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas para el enlace de la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 y el Cu^{2+} inmovilizado, para las 5 temperaturas estudiadas.	269
Tabla 5-36	Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas para el enlace de la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 y el Cu^{2+} inmovilizado, para las 5 temperaturas estudiadas.	269
Tabla 5-37	Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas para el enlace de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y el Cu^{2+} inmovilizado, para las 5 temperaturas estudiadas.	270
Tabla A-1	Datos de equilibrio de BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+} , solución fosfato 50 mM, pH 4,5 <u>$Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$</u> . Concentración mol/cm ³ .	315
Tabla A-2.	Datos de equilibrio de BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+} , solución fosfato 50 mM, pH 4,5 <u>$Q=5,50 \text{ cm}^3/\text{min}$</u> . Concentración mol/cm ³ .	316
Tabla A-3.	Datos de equilibrio de BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+} , solución fosfato 50 mM, pH 4,5 <u>$Q=8,40 \text{ cm}^3/\text{min}$</u> . Concentración mol/cm ³ .	317
Tabla A-4.	Datos de equilibrio de BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+} , solución fosfato 50 mM, pH 4,5 <u>$Q=10,60 \text{ cm}^3/\text{min}$</u> . Concentración mol/cm ³ .	318
Tabla A-5.	Datos de equilibrio de BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+} , solución fosfato 50 mM, pH 4,5	319

	<u>Q=14,00 cm³/min.</u> Concentración mol/cm ³ .	
Tabla A-6.	Datos de equilibrio de BSA-agarosa-IDA-Cu ²⁺ , <u>tampón fosfato 50 mM, pH 7,0</u> , Q=14,00 cm ³ /min. Concentración en mol/cm ³ .	320
Tabla A-7.	Datos de equilibrio de CAT-agarosa-IDA-Cu ²⁺ ; tampón PBS, pH 7.4, Q=1,50 cm ³ /min. Concentración en mol/cm ³ .	321
Tabla A-8	Datos de equilibrio para <u>BSA</u> -agarosa-IDA-Cu ²⁺ , tampón PBS, pH 7.4, Q=1,50 cm ³ /min. Proveniente de la separación de dos proteínas (<u>BSA</u> +CAT) Concentración en mol/cm ³ .	322
Tabla A-9	Datos de equilibrio para la <u>CAT</u> -agarosa-IDA-Cu ²⁺ , tampón PBS, pH 7.4, Q=1,50 cm ³ /min. Proveniente de la separación de dos proteínas (BSA+ <u>CAT</u>) Concentración en mol/cm ³ .	323
Tabla B-1	Determinación de la fuerza iónica para los tampones usados en los estudios de adsorción/elución de las biomoléculas BSA y CAT.	327
Tabla D-1.	Valores obtenidos de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, Q=1,50 cm ³ /min.	341
Tabla D-2	Valores obtenidos de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, Q=5,50 cm ³ /min.	341
Tabla D-3	Valores obtenidos de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, Q=8,40 cm ³ /min.	341
Tabla D-4	Valores obtenidos de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB para la proteína BSA en	342

Tabla D-5	solución fosfato pH 4,5, $Q=10,60 \text{ cm}^3/\text{min}$. Valores obtenidos de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$.	342
Tabla D-6	Valores normalizados de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB para la proteína BSA en solución fosfato.	342
Tabla D-7	Valores obtenidos de la concentración en equilibrio experimental vs obtenida por el modelo MATLAB, para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0, $Q=14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$.	343
Tabla D-8	Valores obtenidos de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB, para la proteína CAT en tampón PBS pH 7,4, $Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ y concentración $0,7 \text{ mg}/\text{cm}^3$.	343
Tabla D-9	Valores obtenidos de la concentración en equilibrio experimental vs obtenida por el modelo MATLAB, para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, $Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, proveniente de la separación de dos biomoléculas.	343
Tabla D-10	Valores obtenidos de la concentración en equilibrio experimental vs obtenida por el modelo MATLAB, para la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, $Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, proveniente de la separación de dos biomoléculas.	344

ÍNDICE DE FIGURAS

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Principio de la cromatografía de afinidad.	4
Figura 1-2.	Modelo de una columna cromatográfica empaquetada con partículas porosas.	8
Figura 1-3.	Columna monolítica cerámica.	10
Figura 3-1.	Esquema general de la preparación de un adsorbente en cromatografía IMAC.	21
Figura 3-2.	Clasificación de los soportes cromatográficos de acuerdo a la forma de la matriz.	25
Figura 3-3.	Foto del alga roja (Rhodophyceae), de la cual se extrae el polisacárido para la obtención de la agarosa.	27
Figura 3-4.	Estructura química de la agarosa.	28
Figura 3-5.	Gelificación del gel de agarosa.	28
Figura 3-6.	Superficie micro porosa del gel de agarosa tipo D-5 mediante microscopía electrónica (SEN).	30
Figura 3-7	Estructura química de la celulosa. a) A la izquierda, β -glucosa; a la derecha, varias β -glucosa unidas (Hermanson <i>et al</i> ; 1992) y b) fibras de celulosa.	30
Figura 3-8.	Estructura del dextrano utilizado como soporte de afinidad.	32
Figura 3-9.	Relación estructural entre la quitina, el quitosano y el quitano.	33
Figura 3-10.	Estructura de la poliacrilamida utilizada como soporte de afinidad.	34
Figura 3-11.	Estructura química del soporte Trisacryl.	35
Figura 3-12.	Formación de un polímero de GMA con EDMA. Esta figura solamente muestra una porción de la estructura polimérica final.	41
Figura 3-13.	Reacción típica usada para obtener monolitos de criogel basados en la	43

	copolimerización de la acrilamida, alil glicidil éter y N,N´ metileno-bis (acrilamida).	
Figura 3-14.	Utilización de los brazos espaciadores: a) ligando unido directamente a la matriz y b) ligando unido a la matriz a través de un brazo espaciador (Magdelin and Moser, 2012).	46
Figura 3-15.	Estructura representativa de los complejos quelantes con iones metálicos utilizados en cromatografía IMAC. IDA-Me ²⁺ , NTA-Me ²⁺ , TED-Me ²⁺ , para los iones metálicos Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ o Co ²⁺ (Adaptado Hochuli <i>et al</i> ; 1987).	49
Figura 3-16.	Estructura tridimensional de la a) histidina, b) cisteína, c) triptófano, d) fenilalanina, e) tirosina, f) arginina, g) lisina, h) asparragina, i) glutamina y j) metionina.	51
Figura 3-17.	Diagrama esquemático de las etapas de la cromatografía IMAC basado en el esquema propuesto por Wizerling (1992).	55
Figura 3-18.	Algunos métodos de elución en cromatografía de afinidad, adaptado de Mallik and Hage, 2006.	57
Figura 3-19.	Modelo de la molécula de albumina bovina con residuos básicos de color azul, residuos ácidos de color rojo y los neutros en color amarillo; a) vista frontal, b) vista anterior, c) lado izquierdo, y d) lado derecho. Propuesto por Carter and Ho (1994).	65
Figura 3-20.	a) Relación de las formas isoméricas del suero de albumina bovino, reproducidas por Peters, 1985, b) Configuraciones propuestas de las formas isoméricas de la albumina humana E, F, y N,	66

	reproducidas por Carter and Ho, 1994.	
Figura 3-21.	Estructura de las cuatro sub-unidades de la enzima CAT (Goodsell & RCSB Protein Data Bank, 2013).	69
Figura 3-22.	Estructura del grupo hemo de la catalasa.	70
Figura 3-23.	Secuencia de la cadena polipeptida de aminoácidos de la catalasa proveniente de hígado de bovino.	72
Figura 3-24.	a) Visión estéreo de la catalasa proveniente de eritrocitos humanos, b) Vista de la estructura de catalasa cerca del grupo hemo.	74
Figura 3-25.	Representación esquemática de equipo de ITC, propuesto por Holdgate, 2001.	79
Figura 3-26.	Variación de la constante de equilibrio de enlace K_b .	80
Figura 4-1.	Estructura del monolito cerámico.	88
Figura 4-2.	Estructura del 1,4 butanodiol diglicidil éter.	89
Figura 4-3.	Estructura de la agarosa epoxi-activada.	90
Figura 4-4.	Instalación empleada para la preparación de las matrices: 1) Termostato, 2) Agitador orbital, 3) Reactor encamisado.	91
Figura 4-5.	Estructura química del ácido iminodiacético monohidratado (IDA).	91
Figura 4-6.	Estructura de la matriz de IDA-agarosa.	92
Figura 4-7.	Columna cromatográfica empaquetada con el monolito cerámico recubierto de agarosa, activado y cargado con Cu^{2+} .	93
Figura 4-8.	Estructura de la matriz de agarosa -IDA- Cu^{2+} .	94
Figura 4-9.	Recta de calibrado para la medición de la concentración de CuCl_2 .	95
Figura 4-10.	Recta de calibrado para medición de la concentración de la proteína BSA.	98
Figura 4-11.	Recta de calibrado para la medición de	99

	la concentración de la enzima CAT.	
Figura 4-12.	Recta de calibrado para medición de la concentración de la proteína total adsorbida en la matriz IMAC.	102
Figura 4-13.	Recta de calibrado para la medición de la actividad de la enzima CAT a 240 nm.	104
Figura 4-14.	Esquema de los experimentos llevados a cabo mediante la técnica ITC, para el enlace de la proteína BSA-Cu ²⁺ .	106
Figura 4-15.	Recta de calibrado para la medición de la concentración de CuCl ₂ .	110
Figura 4-16.	Esquema de los experimentos llevados a cabo mediante la técnica ITC para el enlace BSA-agarosa-IDA-Cu ²⁺ .	111
Figura 4-17.	Esquema de los experimentos llevados a cabo mediante la técnica ITC, para el enlace de la enzima CAT- Cu ²⁺ .	113
Figura 4-18.	Esquema de los experimentos llevados a cabo mediante la técnica ITC para el enlace CAT-agarosa-IDA-Cu ²⁺ .	115
Figura 5-1.	Estructura del sistema BSA-agarosa-IDA-Cu ²⁺ .	121
Figura 5-2.	Esquema representativo de los sistemas estudiados para la adsorción de la proteína BSA.	122
Figura 5-3.	Experimentos realizados para estudiar la eficiencia de la matriz cromatografica.	124
Figura 5-4.	Esquema del proceso de adsorción.	125
Figura 5-5.	Efecto de la concentración de imidazol en la elución de la proteína BSA adsorbida en solución fosfato pH 4,5 y 298K.	127
Figura 5-6.	Curvas de elución de la proteína BSA adsorbida en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para distintos caudales de elución.	128
Figura 5-7.	Figura representativa de los sitios de	130

	Cu ²⁺ ocupados por el imidazol.	
Figura 5-8.	Perfiles de equilibrio de adsorción de la proteína BSA, en solución fosfato 50 mM, pH 4,5, 298 K, para los diferentes caudales estudiados.	131
Figura 5-9.	Disposición del complejo IDA-Cu ²⁺ sobre una matriz microporosa de agarosa a un caudal de 1,50 cm ³ /min.	135
Figura 5-10.	Disposición del complejo IDA-Cu ²⁺ sobre una matriz microporosa de agarosa a un caudal de 14,0 cm ³ /min.	136
Figura 5-11.	Perfiles promediados del equilibrio de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales estudiados con sus correspondientes reutilizaciones.	137
Figura 5-12.	Perfiles de equilibrios de adsorción de la proteína BSA, a) en tampón fosfato pH 7,0 y b) solución fosfato pH 4,5 298 K, para el caudal de 14 cm ³ /min.	138
Figura 5-13.	Curvas de elución de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para el caudal de adsorción de 1,50 cm ³ /min y n ₁ , n ₂ , n ₃ , n ₄ y n ₅ .	140
Figura 5-14.	Curvas de elución de la proteína BSA adsorbida tampón fosfato pH 7,0 y 298K, para un caudal de adsorción de 14,00 cm ³ /min y n ₁ , n ₂ , n ₃ , n ₄ y n ₅ .	143
Figura 5-15.	Esquema que muestra como de forma aleatoria las proteínas de BSA cubren la superficie de adsorción.	145
Figura 5-16.	Esquema del volumen de control del sistema de adsorción propuesto.	146
Figura 5-17.	Logaritmo de la concentración de proteína experimental por unidad de superficie vs número de reutilizaciones (n-1) para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales	153

	estudiados.	
Figura 5-18.	Logaritmo de la concentración de proteína experimental por unidad de superficie vs número de reutilizaciones (n-1), para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0 para el caudal de 14 cm ³ /min.	155
Figura 5-19.	Número de proteínas enlazadas a los ligandos por unidad de superficie de adsorción vs el número de ciclos para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, para los cinco caudales estudiados.	156
Figura 5-20.	Número de proteínas enlazadas a los ligandos por unidad de superficie de adsorción vs el número de ciclos para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0 para el caudal de 14 cm ³ /min.	158
Figura 5-21.	Concentración en el equilibrio C _E experimental y teórica vs Número de ciclos n, para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, para los cinco caudales estudiados.	162
Figura 5-22.	Concentración de proteína en el equilibrio C _E experimental y teórica vs Número de ciclos n, para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0 para el caudal de 14 cm ³ /min.	164
Figura 5-23.	Cantidad de proteína separada por unidad de área de la columna por unidad de tiempo, como una función de la cantidad de ciclos de adsorción/elución teniendo en cuenta el tiempo de regeneración, para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, para los cinco caudales estudiados.	167
Figura 5-24.	Cantidad de proteína separada por unidad de área de la columna por unidad de tiempo, como una función de	168

	la cantidad de ciclos de adsorción/elución teniendo en cuenta el tiempo de regeneración, para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0, para un caudal de 14,0 cm ³ /min.	
Figura 5-25.	Rendimiento de la columna monolítica para el proceso de separación anual, para un tiempo de inactividad de 5 horas, para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, para los cinco caudales estudiados.	169
Figura 5-26.	Rendimiento de la columna monolítica para el proceso de separación anual, para un tiempo de inactividad de 5 horas, para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0, caudal 14 cm ³ /min.	171
Figura 5-27.	Esquema del proceso de adsorción es una columna monolítica multicanal recubierta por agarosa microporosa D5.	177
Figura 5-28.	Perfiles teóricos y experimentales de concentración en el sobrenadante vs tiempo, correspondientes a la adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para los cinco caudales estudiados.	181
Figura 5-29.	Perfiles teóricos y experimentales de concentración en el sobrenadante vs tiempo, correspondientes a la adsorción de la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0 y 298 K, para el caudal de 14 cm ³ /min.	183
Figura 5-30.	Perfiles promediados teóricos y experimentales de concentración en el sobrenadante respecto al tiempo, para el proceso de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 para los cinco ciclos de adsorción.	184
Figura 5-31.	Variación de la constante de cinética de	187

	adsorción k_{ads} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, con respecto al número de Reynolds.	
Figura 5-32.	Variación del pseudo-coeficiente de dispersión k'_{disp} del proceso de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, con los diferentes ciclos de reutilización y caudal.	191
Figura 5-33.	Variación del promedio del coeficiente de dispersión k_{disp} del proceso de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 con respecto al número de Reynolds.	192
Figura 5-34.	Comparativo de la variación del pseudo-coeficiente de dispersión k_{disp}' del proceso de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y tampón fosfato pH 7,0 a un caudal de 14,00 cm ³ /min, con respecto al número de ciclos (n).	194
Figura 5-35.	Esquema representativo de los sistemas estudiados para la adsorción de la enzima CAT.	196
Figura 5-36.	Esquema representativo del sistema estudiado para la adsorción de la enzima CAT.	197
Figura 5-37.	Esquema de los ensayos realizados para llevar a cabo el proceso de elución de la enzima CAT.	199
Figura 5-38.	Figura 5-38. Comparación de los perfiles de equilibrio de adsorción para a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 y b) proteína BSA en solución fosfato pH 4,5; 298 K y Q= 1,50 cm ³ /min.	201
Figura 5-39.	Grafico representativo de la medición de tamaño de a) enzima CAT y b) la proteína BSA utilizando el equipo zeta sizer nano ZS-90.	202

Figura 5-40.	Posibles esquemas que muestran como de forma aleatoria a) las enzimas de CAT cubren la superficie de adsorción y b) las proteínas de BSA cubren la superficie de adsorción.	203
Figura 5-41.	Curvas de elución de la enzima CAT adsorbida en tampón PBS pH 7,4 y 298K, para un caudal de adsorción de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, concentración $0,7 \text{ mg}/\text{cm}^3$ y n_1, n_2, n_3, n_4 y n_5 .	205
Figura 5-42.	Comparativo del logaritmo de la concentración de enzima experimental por unidad de superficie vs número de reutilizaciones $n-1$ para a) la enzima CAT y b) la proteína BSA para el caudal de $14 \text{ cm}^3/\text{min}$.	209
Figura 5-43.	Número de enzimas enlazadas a los ligandos por unidad de superficie de adsorción vs el número de ciclos para a) la enzima CAT y b) proteína BSA para el caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.	210
Figura 5-44.	Concentración de enzima en el equilibrio C_E experimental y teórica vs Número de ciclos n , para a) la enzima CAT y b) la proteína BSA, para el caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.	212
Figura 5-45.	Cantidad de biomolecula separada por unidad de área de la columna por unidad de tiempo, como una función de la cantidad de ciclos de adsorción/elución teniendo en cuenta el tiempo de regeneración, para a) enzima CAT y b) proteína BSA para un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.	214
Figura 5-46.	Rendimiento de la columna monolítica para el proceso de separación anual de biomolecula, para un tiempo de inactividad de 5 horas, para a) enzima	215

	CAT y b) la proteína BSA para un caudal de $1,5 \text{ cm}^3/\text{min}$.	
Figura 5-47.	Comparativo de los perfiles teóricos y experimentales de concentración en el sobrenadante vs tiempo, correspondientes a la adsorción de a) la enzima CAT y b) proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.	217
Figura 5-48.	Comparación de la variación del coeficiente de dispersión k_{disp} de la enzima CAT con respecto a la proteína BSA para los cinco ciclos de reutilización.	219
Figura 5-49.	Esquema representativo del proceso de adsorción para la separación de dos macromoléculas adsorbidas en un monolito cerámico recubierto con agarosa tipo D5 activada con 1,4 butanodiol diglicidil éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante y Cu^{2+} .	222
Figura 5-50.	Esquema representativo del proceso de elución de las biomoléculas BSA y CAT adsorbidas en una misma columna monolítica.	224
Figura 5-51.	Perfiles de equilibrios de adsorción de la proteína BSA, en tampón PBS pH 7,4 proveniente de la separación de BSA+CAT y solución fosfato pH 4,5 a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.	225
Figura 5-52.	Curvas de elución de la proteína BSA y la enzima CAT, así como el balance general para $n=1$, proveniente de la separación de las dos biomoléculas.	228
Figura 5-53.	Curvas de elución de la proteína BSA y la enzima CAT, así como el balance general para $n=2$, proveniente de la separación de las dos biomoléculas.	228

Figura 5-54.	Curvas de elución de la proteína BSA y la enzima CAT, así como el balance general para $n=3$, proveniente de la separación de las dos biomoléculas.	229
Figura 5-55.	Curvas de elución de la proteína BSA y la enzima CAT, así como el balance general para $n=4$, proveniente de la separación de las dos biomoléculas.	230
Figura 5-56.	Curvas de elución de la proteína BSA y la enzima CAT, así como el balance general para $n=5$, proveniente de la separación de las dos biomoléculas.	230
Figura 5-57.	Comparativo del logaritmo de la concentración de BSA y CAT experimental por unidad de superficie vs número de reutilizaciones $n-1$ para a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.	233
Figura 5-58.	Comparativo Número de BSA y CAT enlazados a los ligandos por unidad de superficie de adsorción vs el número de ciclos proveniente de la separación de las dos biomoléculas.	234
Figura 5-59.	Comparativo de C_E experimental y teórica vs Número de ciclos n , para la enzima CAT y la proteína BSA (proveniente de la separación de las dos biomoléculas) a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.	236
Figura 5-60.	Cantidad de biomolecula separada por unidad de área de la columna por unidad de tiempo, como una función de la cantidad de ciclos de adsorción/elución teniendo en cuenta el tiempo de regeneración para a) enzima CAT y b) proteína BSA (proveniente de la separación de las dos biomoléculas) a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.	238
Figura 5-61.	Rendimiento de la columna monolítica	239

	para el proceso de separación anual, para un tiempo de inactividad de 5 horas, para a) enzima CAT y b) proteína BSA (proveniente de la separación de las dos biomoléculas) a un caudal de 1,50 cm ³ /min.	
Figura 5-62.	Rendimiento de la columna monolítica para el proceso de separación anual, para un tiempo de inactividad de 5 horas, para la proteína BSA, a 5 y 2,5 horas de tiempo de equilibrio.	241
Figura 5-63.	Comparativo de los perfiles teóricos y experimentales de concentración en el sobrenadante vs tiempo, correspondientes a la adsorción de a) la enzima CAT y b) proteína BSA a un caudal de 1,50 cm ³ /min (proveniente de la separación de las dos proteínas).	242
Figura 5-64.	Comparación de la variación del coeficiente de dispersión k_{disp} a) de la enzima CAT y b) proteína BSA para los cinco ciclos de reutilización proveniente de la separación de las dos biomoléculas y estudiada de forma independiente, en tampón PBS pH 7,4 y un caudal de 1,50 cm ³ /min.	247
Figura 5-65.	Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM, pH 4,5 y la con Cu ²⁺ en estado libre, a una temperatura de 296 K.	250
Figura 5-66.	Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM, pH 4,5 y la con Cu ²⁺ en	251

	estado libre, a una temperatura de 298 K.	
Figura 5-67	Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM, pH 4,5 y la con Cu^{2+} en estado libre, a una temperatura de 300 K.	252
Figura 5-68	Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM, pH 4,5 y la con Cu^{2+} en estado libre, a una temperatura de 302 K.	253
Figura 5-69	Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM, pH 4,5 y la con Cu^{2+} en estado libre, a una temperatura de 304 K.	254
Figura 5-70	Comparación de la constante de enlace K_b para los sistemas CAT- Cu^{2+} y BSA- Cu^{2+} para las cinco temperaturas estudiadas.	257
Figura 5-71	Comparación de la energía libre de Gibbs ΔG para los sistemas CAT- Cu^{2+} y BSA- Cu^{2+} para las cinco temperaturas estudiadas.	258
Figura 5-72	Compensación de entalpia-entropía del enlace de a) la enzima CAT- Cu^{2+} en tampón PBS pH 7,4, b) proteína BSA- Cu^{2+} en tampón PBS pH 7,4 y c) la proteína BSA- Cu^{2+} en solución fosfato pH 4,5, para las 5 temperaturas estudiadas.	260

Figura 5-73	Dependencia de la temperatura en el enlace de a) la enzima CAT-Cu ²⁺ en tampón PBS pH 7,4 b) la proteína BSA-Cu ²⁺ en tampón PBS pH 7,4 y c) la proteína BSA-Cu ²⁺ en solución fosfato pH 4,5 con respecto a la entalpía ΔH para las cinco temperaturas estudiadas.	261
Figura 5-74	Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4. b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM pH 4,5 y el Cu ²⁺ inmovilizado, a una temperatura de 296 K.	263
Figura 5-75	Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4. b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM pH 4,5 y el Cu ²⁺ inmovilizado, a una temperatura de 298 K.	264
Figura 5-76	Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4. b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM pH 4,5 y el Cu ²⁺ inmovilizado, a una temperatura de 300 K.	266
Figura 5-77	Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4. b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM pH 4,5 y el Cu ²⁺ inmovilizado, a una temperatura de 302 K.	267
Figura 5-78	Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4. b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM pH 4,5 y el Cu ²⁺ inmovilizado, a una temperatura de 304 K.	268
Figura 5-79	Comparación de la constante de enlace	270

	K_b para los sistemas agarosa-IDA-Cu ²⁺ -CAT y agarosa-IDA-Cu ²⁺ -BSA para las cinco temperaturas estudiadas.	
Figura 5-80	Comparación de la energía libre de Gibbs (ΔG) para los sistemas agarosa-IDA-Cu ²⁺ -CAT, y agarosa-IDA-Cu ²⁺ -BSA, para las cinco temperaturas estudiadas.	272
Figura 5-81	Compensación de la entalpía-entropía del enlace de a) agarosa-IDA-Cu ²⁺ -CAT en tampón PBS pH 7,4, b) agarosa-IDA-Cu ²⁺ -BSA en tampón PBS pH 7,4 y c) agarosa-IDA-Cu ²⁺ -BSA en solución fosfato pH 4,5, para las cinco temperaturas estudiadas.	273
Figura 5-82	Dependencia de la temperatura en el enlace de a) agarosa-IDA-Cu ²⁺ -CAT en tampón PBS pH 7,4, b) agarosa-IDA-Cu ²⁺ -BSA en tampón PBS pH 7,4 y c) agarosa-IDA-Cu ²⁺ -BSA en solución fosfato pH 4,5 con respecto a la entalpía ΔH , para las cinco temperaturas estudiadas.	275
Figura C-1	Curvas de elución de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para el caudal de adsorción de 5,50 cm ³ /min y n ₁ , n ₂ , n ₃ , n ₄ y n ₅ .	331
Figura C-2	Curvas de elución de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para el caudal de adsorción de 8,40 cm ³ /min y n ₁ , n ₂ , n ₃ , n ₄ y n ₅ .	332
Figura C-3	Curvas de elución de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para el caudal de adsorción de 10,60 cm ³ /min y n ₁ , n ₂ , n ₃ , n ₄ y n ₅ .	334
Figura C-4	Curvas de elución de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para el caudal de adsorción de 14,0 cm ³ /min y	336

Figura E-1	n_1, n_2, n_3, n_4 y n_5 . Diagrama de flujo del proceso de cálculo.	347
-------------------	--	-----

NOMENCLATURA

NOMENCLATURA

A_{mon}	Área total de la superficie del monolito	cm^2
A	Área total de monolito por unidad de volumen de adsorbente	cm^{-1}
a_M	Área específica interna de la celda del monolito cerámico	cm^2/cm^3
B	Variable definida en la ecuación 5-40	$\frac{\text{mol}}{\text{cm}} - \frac{\text{mol}}{\text{cm}^3} + \frac{\text{mol}}{\text{cm}}$
C	Variable definida en la ecuación 5-36	mol^2/cm^4
C_E	Concentración de biomolécula en equilibrio en el sobrenadante global (media).	mol/cm^3
\bar{C}_E	Concentración de biomolécula en equilibrio en el sobrenadante local.	mol/cm^3
$C_{E,ads}$	Concentración de biomolécula adsorbida en la superficie del monolito	mol/cm^3
$C_{E,ret}$	Concentración de biomolécula retenida en la superficie del monolito	mol/cm^3
C_o	Concentración inicial de biomolécula	mol/cm^3
$\bar{C}_{E,int}$	Concentración de biomolécula en la interfase	mol/cm^3
C_{salida}	Concentración de biomolécula eluida a la salida de la columna	mg/cm^3
C_y	Concentración de los iones en las soluciones tampón	M
D_{hid}	Diámetro hidráulico del canal del monolito cerámico	cm
D	Diámetro de la biomolécula	nm
E	Variable definida en la ecuación 5-38	cm^2/s

E_M	Porosidad aparente del monolito cerámico	cm^3/cm^3
I	Fuerza iónica	M
k_{ads}	Constante cinética de adsorción	$\text{cm}^2/\text{mol s}$
k'_{ads}	Pseudo-constante cinética de adsorción	$\text{cm}^2/\text{mol s}$
k_{des}	Constante cinética de desorción	s^{-1}
k_{disp}	Coefficiente de dispersión	cm/s
k'_{disp}	Pseudo-coeficiente de dispersión	cm/s
K_b	Constante de enlace	M^{-1}
K_D	Constante de equilibrio de desorción	mol/cm^2
L	Longitud de monolito cerámico	cm
L^*	Ligando	
M	Relación de volumen de solución de proteína en la sección de interfase de la columna	cm
M	Variable definida en la ecuación 5-37	mol/s
M^*	Macromolecula	
n	Número de ciclos	adimensional
n_b	Estequiometria de la reacción	adimensional
P	Presión	Pa
PM	Peso molecular	g/mol
Q	Caudal	cm^3/min
Q^*	Caudal en un canal del monolito cerámico	cm^3/min
Q'	Calor	μJ
R	Radio de un canal del monolito cerámico	cm
R^*	Constante de los gases ideales	$\text{kJ}/\text{K mol}$
Re_c	Número de reynolds de canal	adimensional
T	Tiempo	min
		s
t_{ads}	Tiempo del proceso de adsorción.	H
t_{ciclo}	Tiempo de Ciclo	H
t_{inact}	Tiempo de inactividad de la	H

	columna	
t_{reg}	Tiempo de regeneración de la columna	H
T	Temperatura	K
U	Energía total del sistema	kJ
V	Volumen total	
V_c	Volumen celda reacción ITC	cm ³
V_o	Volumen inicial de la solución de proteína	cm ³
V_{sol}	Volumen de la solución de proteína	cm ³
x_1	Variable definida en la ecuación 5-41	mol/cm
x_2	Variable definida en la ecuación 5-42	mol/cm
ΔC_p	Capacidad calorífica	kJ/mol K
ΔH	Entalpía de enlace	kJ/mol
ΔS	Entropía	kJ/mol K
ΔG	Energía libre de Gibbs	kJ/mol

LETRAS GRIEGAS

α	Constante definida en la ecuación 5-21	mol/cm ²
δ	Constante definida en la ecuación 5-21	adimensional
δ_E	Proyección de una molécula de proteína.	Nm
η_A	Eficiencia de adsorción	adimensional
η_D	Eficiencia de desorción	adimensional
ρ	Densidad	g/cm ³
$\rho_{BE,n}$	Número de moles de biomolécula limitado a los ligandos por unidad de superficie de adsorción de la matriz global (media).	mol/cm ²
$\bar{\rho}_{BE,n}$	Número de moles de biomolécula limitado a los ligandos por unidad de superficie de adsorción de la	mol/cm ²

	matriz local	
ρ_{AS}^R	Cantidad real de biomolécula que puede ser depositada sobre la superficie de adsorción.	mol/cm ²
ρ_{AS}^T	Cantidad teórica de biomolécula que puede ser depositada sobre la superficie de adsorción.	mol/cm ²
$\rho_{AS,n}^o$	Concentración superficial disponible de los sitios de adsorción durante los n th ciclos	mol/cm ²
$\rho_{AS,n}^{eq}$	Concentración en la superficie restante de los sitios de adsorción en equilibrio.	mol/cm ²
$\rho_{DS,n}$	Numero de moles de biomolécula liberadas en la elución para por unidad de superficie de adsorbente	mol/cm ²
$\rho_{Prod} _n$	Producción de biomolécula por unidad de área de columna monolítica y por unidad de tiempo.	mol/cm ² H
ρ_M	Densidad del monolito cerámico	g/cm ³
ϕ	Fracción de biomolécula adsorbida	adimensional

RESUMEN

RESUMEN

Dentro de los procesos downstream de separación de proteínas, la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados es una técnica muy utilizada porque el coste es relativamente más bajo que la cromatografía de afinidad convencional y por la posibilidad de llevar a cabo el proceso a escala industrial.

Tradicionalmente, estos procesos de separación de biomoléculas, se llevan a cabo en columnas empaquetadas con material en forma de partículas porosas. Sin embargo este tipo de matrices presentan inconvenientes al llevar los procesos de separación a nivel industrial, debido a que presentan una alta pérdida de carga, obligando a diseñar columnas de gran diámetro y altura reducida.

Es por esta razón, que el objetivo de este trabajo es desarrollar una nueva forma de separación de proteínas basada en la técnica IMAC, utilizando como matriz cromatográfica un monolito cerámico multicanal, que permita el paso de la fase líquida que contiene la biomolécula a separar a través de los canales del mismo facilitando el movimiento dentro del soporte y disminuyendo considerablemente la pérdida de carga.

Como sistema inicial de estudio, se propuso un monolito cerámico recubierto con agarosa tipo D-5, activado con 1,4 butanodiol-diglicidil-éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante y Cu^{2+} como ligando.

Asimismo, la proteína tipo empleada para establecer las condiciones del proceso fue el suero de albúmina bovina (BSA). Posteriormente se estudió el proceso de adsorción de la enzima catalasa (CAT), para finalmente llevar a cabo la separación de una mezcla binaria (BSA+CA).

Los objetivos de este trabajo se centraron en primer lugar en la determinación de la eficiencia de la matriz cromatográfica, es decir, el monolito cerámico recubierto de agarosa D5 y activado, debido a que es un factor clave para la economía del proceso de adsorción.

Para este fin, la eficiencia de los ciclos de adsorción fueron determinados mediante el desarrollo de un modelo dinámico, que estudia la reutilización óptima del soporte cerámico. En primer lugar se estudió el proceso de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, a cinco caudales (1,50, 5,50, 8,40, 10,60 y 14,00 cm³/min), llevando a cabo cinco ciclos de adsorción/elución, utilizando una misma matriz monolítica. De este estudio se pudo comprobar que, utilizando un mismo caudal en el proceso de adsorción, el tiempo necesario para que el sistema alcanzara el equilibrio, era prácticamente el mismo en todos los ciclos. También se observó, que a medida que aumentaba el caudal en el proceso de adsorción, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio era menor y que a medida que aumentaba el caudal, la capacidad de adsorción de la columna monolítica también aumentaba.

Los experimentos de elución, se llevaron a cabo por medio de un agente competitivo, el imidazol donde se obtuvo un porcentaje de recuperación de proteína enlazada específicamente, en torno al 95%. Y después del proceso de elución, la columna monolítica es acondicionada para el siguiente ciclo de adsorción por medio de un lavado con tampón tris-HCl pH 8,0.

Una vez estudiado el proceso de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, y determinado que el caudal de 14,00 cm³/min, era el que mejor resultado presentaba en cuanto a tiempo de equilibrio y cantidad de proteína adsorbida para las condiciones de trabajo propuestas, se procedió a estudiar el efecto del pH, llevando a cabo el proceso de adsorción de la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0. Así, de forma general se pudo establecer que independientemente del pH utilizado, a un caudal de 14 cm³/min, el tiempo necesario para que el proceso de adsorción alcance el equilibrio es prácticamente el mismo, y que la capacidad de adsorción de la matriz es ligeramente mayor con respecto a los experimentos en solución fosfato pH 4,5 a un caudal de 14,00 cm³/min respectivamente.

Obtenidas las curvas de equilibrio, y establecido cual era el comportamiento del sistema a diferentes caudales y pH, se procedió al estudio de la eficiencia de adsorción, desarrollando un modelo matemático para predecir el comportamiento del monolito tras varios ciclos de reuso y que estimará la reutilización óptima de la columna monolítica; partiendo de la premisa de que la porosidad del recubrimiento de agarosa es despreciable y por tanto, todo el

proceso de adsorción es llevado a cabo en la superficie externa del recubrimiento. De esta forma el área de adsorción será el área de los canales del monolito.

Del modelo de eficiencia se pudo obtener, la cantidad real de proteína que se podía adsorber en la superficie de la columna monolítica ρ_{AS}^R , así como la eficiencia del proceso de adsorción η_A y desorción η_D y finalmente la predicción de la concentración de proteína en equilibrio C_E , la cual fue comparada con los valores obtenidos experimentalmente. Así mismo se pudo extrapolar C_E para varios ciclos de adsorción donde se observó que a partir de aproximadamente el décimo reuso, la curva se vuelve asintótica, lo que significa que la columna monolítica no sería capaz de adsorber más proteína.

La obtención de los anteriores parámetros sirvieron para poder determinar el uso óptimo de la columna, teniendo en cuenta las siguientes variables operativas: i) la cantidad de tiempo permitido para el proceso de adsorción, ii) el número de ciclos de utilización de la columna antes de la regeneración, y iii) el tiempo de inactividad necesario para regenerar o cambiar la columna.

Una vez establecida la eficiencia del proceso de adsorción, se procedió a llevar a cabo el estudio de transferencia de materia en la superficie de las paredes del monolito cerámico, para ello se desarrolló un modelo matemático utilizando a plataforma MATLAB el cual ajustó el coeficiente de dispersión y la constante cinética de adsorción por un método de búsqueda de mínimos en funciones multiparamétricas.

Del modelo matemático se obtuvieron las constantes de equilibrio de desorción en función del área del monolito cerámico, así como las velocidades cinéticas de adsorción y los coeficientes de dispersión.

De los resultados obtenidos para la proteína BSA se pudo establecer una tendencia de tipo exponencial para la constante cinética de adsorción, donde a medida que aumentaba el número de Reynolds dicha constante también aumentaba, lo cual corrobora el hecho de que a mayor caudal, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es menor. Asimismo se pudo comprobar que el pH no afecta la constante de adsorción, puesto que tanto para la solución fosfato pH 7,5 como para el tampón fosfato pH 7,0 a un caudal de 14,00 cm³/min, son prácticamente iguales. Adicionalmente se pudo observar que el coeficiente de

dispersión, disminuye con el número de reutilizaciones, pero aumenta con el caudal

Una vez culminados los estudios correspondientes a la proteína BSA, se procedió a evaluar el comportamiento de la enzima CAT en el mismo adsorbente. Para ello se procedió de la misma forma que con la proteína BSA. Los experimentos de adsorción se llevaron a cabo en tampón PBS pH 7,4 y un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, debido a la formación de micelas.

De las curvas de equilibrio se pudo comprobar por un lado que el tiempo necesario para que el proceso de adsorción alcanzara el equilibrio era de aproximadamente 2 horas, tiempo inferior al requerido por la proteína BSA (5,6 horas). También se observó que del mismo modo que para la proteína BSA, a medida que se reutiliza el adsorbente, la capacidad de adsorción disminuye ligeramente.

El proceso de elución de la enzima CAT se realizó con un agente inhibidor, el tiocianato de sodio, recuperándose un porcentaje de enzima enlazada específicamente en torno al 95%

Una vez establecidas las condiciones de proceso, se procedió a llevar a cabo el estudio de eficiencia de adsorción, con el fin de determinar el uso óptimo de la columna monolítica. Y posteriormente se procedió a llevar a cabo el estudio de transferencia de materia en los canales del monolito cerámico. Este estudio mostró que para un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, la constante cinética de adsorción es mayor que la obtenida para la proteína BSA, lo cual es consecuente teniendo en cuenta que el tiempo necesario para que el sistema alcanzara la saturación (equilibrio) con la enzima CAT fue menor con respecto a la proteína BSA. Adicionalmente el coeficiente de dispersión disminuye ligeramente con el número de ciclos, comportamiento similar al obtenido para la proteína BSA.

Una vez estudiadas las dos biomoléculas (BSA y CAT) de forma independiente, se procedió a llevar a cabo la separación de una mezcla binaria (BSA+CAT). El estudio demostró que las biomoléculas no interfieren entre sí en el proceso de adsorción, ya que mantuvieron el mismo comportamiento que cuando se analizaron de forma independiente.

Asimismo se estableció que si se reduce el tiempo de adsorción para la proteína BSA a 2 horas, esta presenta una mejora en el rendimiento de la columna debido a que el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso de adsorción es menor, adicionalmente debido a que al cabo de 2,2 horas se ha alcanzado un porcentaje

de adsorción en torno a un 80% de la proteína total adsorbida, es más ventajoso interrumpir el proceso debido a que en los siguientes 3,4 horas, solo adsorbería el 20% de proteína. Por tanto acortar el tiempo de adsorción para la proteína BSA, cuando se lleva a cabo la separación de las dos biomoléculas, no supone un empeoramiento en el rendimiento de la columna monolítica.

Por otro lado, con el fin de obtener una mejor comprensión de los procesos de enlace involucrados en el proceso de adsorción de la proteína BSA y la enzima CAT con el ligando seleccionado en este trabajo (Cu^{2+}), se realizó un estudio de los parámetros termodinámicos (entalpía (ΔH), entropía (ΔS), energía libre de Gibbs (ΔG), capacidad calorífica (C_p), constante de equilibrio de enlace (K_b) y la estequiometría de enlace (n_b)) involucrados en el proceso de enlace, por medio de la técnica de nano-calorimetría isotérmica (Isothermal Titration Calorimetry ITC).

Los estudios se cabo llevaron para las dos biomoléculas, con el Cu^{2+} en estado libre e inmovilizado en un adsorbente en forma de partículas poroso, activado para obtener un soporte de epoxi-agarosa, similar al utilizado para recubrir el monolito cerámico. De estos estudios en general se pudo concluir que, la enzima CAT presenta una afinidad mayor por el ión Cu^{2+} , con respecto a la proteína BSA, tanto para el ligando libre como inmovilizado, generando enlaces de coordinación más estables, aunque igualmente de tipo débil, como los de la proteína BSA. Garantizando de esta forma, que la reacción pueda ser reversible.

De esta forma a partir de los estudios realizados, se ha obtenido un mayor conocimiento, acerca del proceso de separación de biomoléculas utilizando monolitos cerámicos como soporte cromatográfico. Además, los modelos planteados podrán ser aplicados para cualquier sistema de separación de biomoléculas por medio de la cromatografía IMAC que emplee soportes de geometría similar al expuesto en este trabajo. Todo ello contribuirá a que se pueda realizar un cambio de escala seguro y eficaz.

ABSTRACT

ABSTRACT

Within the downstream processes of protein separation, immobilized metal affinity chromatography is a technique frequently used, on one hand, because the cost is relatively lower than conventional affinity chromatography, and for the possibility to carry out the process to an industrial scale.

Traditionally, these biomolecule separation processes, are carried out in packed columns with porous particulate material. However this type of matrices present disadvantages to the separation processes at industrial level, because that show a high loss of load, forcing to design columns of large diameter and low height.

It is for this reason that the objective of this work is to develop a new way of protein separation based on IMAC technic, using as chromatographic matrix a multichannel ceramic monolith, allowing the passage of the liquid phase containing the biomolecule to be separated, through the same channels, facilitating movement within the bracket and considerably decreasing the loss of load.

As initial system study, it was proposed a ceramic monolith coated agarose type D-5, activated with 1,4 butanodiol diglycidyl ether as a spacer arm, iminodiacetic acid (IDA) as a chelating agent and Cu^{2+} as ligand.

Furthermore, the protein type used to establish the conditions of the process, was bovine albumin (BSA). Later we studied the process of adsorption of the catalase enzyme (CAT), to finally carry out the separation of a binary mixture (BSA+CAT).

The objectives of this work were focused first, on the determination of the efficiency of the chromatographic matrix, i.e. the ceramic monolith coated with agarose D5 and activated, since it is a key factor for the economy of the adsorption process.

For this purpose, the efficiency of the adsorption cycles was determined through the development of a dynamic model, which studies the optimal re-use of the ceramic base. First, we studied the process of BSA protein adsorption in phosphate solution pH 4,5 with five flow rate (1,50, 5,50, 8,40, 10,60 and 14,00

cm³/min), carrying out five cycles of adsorption/elution, using the same monolithic matrix.

With this study it became clear that using the same flow rate in the adsorption process, the time required for the system to reach equilibrium, was virtually the same in all cycles.

It was also observed, that when the flow in the process of adsorption was increased, the time required to achieve the balance was lower and when the flow rate was increased, the adsorption capacity of the monolithic column also was increased.

Elution experiments, were carried out by means of a competitive agent, imidazole where a percentage of recovery of protein bound specifically, around 95% was obtained. And after the elution process, the monolithic column is prepared for the next cycle of adsorption through a wash buffer tris-HCl pH 8,0.

Once studied adsorption process for BSA protein in phosphate solution (pH =4,5) and determined best volumetric flow to be 14,00 cm³/min related to equilibrium time and amount of adsorbed protein under experimental conditions proposed, pH effect was studied for BSA protein at pH 7,0 using phosphate solution. In general it could be said that at volumetric flow of 14,00 cm³/min, adsorption time for equilibrium process is independent on pH. Additionally adsorption capacity of matrix is lightly higher compared to experiments at pH=4,5 at the same flow rate (14,00 cm³/min).

Obtained equilibrium curves, and established which was the behavior of the system at different flow rates and pH, we proceeded to carry out the study of adsorption efficiency, developing a mathematical model to predict the behavior of the monolith after several cycles of reuse and that will estimate the optimal re-use of the monolithic column; starting from the premise that the porosity of the agarose coating is negligible and therefore, all the adsorption process is carried out on the outer surface of the coating. Thus the adsorption area is the area of the monolith channels.

Of the efficiency model we could obtain, the actual amount of protein that could adsorb on the surface of the monolithic column ρ_{AS}^R , as well as the efficiency

of the adsorption process η_A and desorption process η_D and finally the prediction of the concentration of protein in equilibrium C_E , which was compared with the values obtained experimentally.

Also, C_E could be extrapolated for several cycles of adsorption were it was observed that starting from approximately the tenth reuse, the curve becomes asymptotic, which means that the monolithic column would not be able to adsorb more protein.

The obtaining of the previous parameters served to determine the optimal use of the column, taking into account the following operational variables: i) the amount of time allowed for the adsorption process, ii) the number of cycles of use of the column before regeneration, and iii) the downtime required to rebuild or change the column.

Once established the efficiency of the adsorption process, we proceeded to carry out the study of mass transfer on the ceramic monolith walls surface, for that we developed a mathematical model using MATLAB platform which adjusted the dispersion coefficient and the kinetic adsorption constant by a method of search of minimums in multiparametric functions.

Using the mathematical model we obtained the desorption equilibrium constants depending on the area of the ceramic monolith, as well as the kinetic rates of adsorption and the dispersion coefficients.

From the results obtained for BSA protein it was able to establish an exponential trend for the kinetic adsorption, where increasing Reynolds number the kinetic constant also increases, corroborating the fact that for greater flow rate, the time required to achieve the equilibrium is lower. It was also found that pH does not affect the adsorption constant, since both the solution phosphate pH 4,5 and the phosphate buffer pH 7,0 to 14,00 cm^3/min flow rate, they are practically equal. Additionally it was observed that the dispersion coefficient decreases with the number of reuses, but increases with the flow rate.

Once culminated studies for BSA protein, we proceeded to evaluate the behavior of the CAT enzyme in the adsorbent. We therefore proceeded in the same way as with BSA protein. Adsorption experiments were carried out in PBS buffer pH 7,4 and a flow rate of 1,50 cm^3/min , due to the micelles formation.

From the equilibrium curves which it was found that the time required for the adsorption process to achieve the equilibrium was of approximately 2 hours, less than that required by the BSA protein (5,6 hours). It was also noted that in the same way that for BSA protein, as it is reused the adsorbent, the adsorption capacity decreases slightly.

The elution process of the CAT enzyme was carried out with an inhibiting agent, the sodium thiocyanate, recovering a percentage of enzyme bound specifically around 95 %.

Once established the process conditions, we proceeded to carry out the study of adsorption efficiency, in order to determine the optimal use of the monolithic column. And then we proceeded to carry out the study of mass transfer in the ceramic monolith channels. This study showed that for 1,50 cm³/min flow rate, adsorption kinetics constant is greater than that obtained for the BSA protein, which is consequent taking into account that the time required for the system to reach saturation (equilibrium) with the CAT enzyme was lower with respect to BSA protein. Furthermore the dispersion coefficient decreases slightly with the number of cycles, behavior similar to that obtained for the BSA protein.

Once studied two biomolecules (BSA and CAT) independently, we proceeded to carry out the separation of a binary mixture (BSA+CAT).

The study showed that the biomolecules do not interfere each other in the process of adsorption, since they kept the same behavior when analyzed individually.

Also it was established that if it is reduced the time of adsorption for BSA protein to 2 hours, this shows an improvement in the performance of the column since the time needed to carry out the process of adsorption is reduced, additionally because after to 2,2 hours it has been reached a percentage of adsorption around 80% of the total protein adsorbed. It is more advantageous to interrupt the process, since in the next 3,4 hours, it could only adsorb 20% of protein. Therefore shorten the time of adsorption for protein BSA, when the separation of the two biomolecules, takes place does not mean a worsening of the performance of the monolithic column.

On the other hand, in order to obtain a better understanding of the link processes involved in the adsorption process of BSA protein and CAT enzyme with the selected ligand in this work (Cu²⁺), we proceeded to carry out a study of

the thermodynamic parameters (enthalpy (ΔH), entropy (ΔS), Gibbs free energy (ΔG), heat capacity (C_p) a equilibrium binding constant (K_b) and the binding stoichiometry (n_b)) involved in the binding process, by means of the nano-isothermal calorimetry (Isothermal Titration Calorimetry ITC) technique.

The studies were carried out for two biomolecules, with the Cu^{2+} free and immobilized in an adsorbent in form of particles, activated to obtain an epoxy-agarose support, similar to that used for coating the ceramic monolith. Of these studies in general we were able to conclude that, CAT enzyme has one affinity for Cu^{2+} ion, than the BSA protein, for free and immobilized ligand, generating more stable coordination bonds, although equally weak such as the BSA protein. Ensuring that the reaction may be reversible.

Thus from the studies, we have obtained a greater knowledge about the separation process of biomolecules using ceramic monoliths as chromatographic support. In addition, the proposed models can be applied to any system of separation of biomolecules by IMAC chromatography employing supports of similar geometry to the exposed in this work. All this will contribute to make a change of scale safe and effective.

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

Dado que los productos farmacéuticos, alimenticios y de química fina están sometidos a cuidadosos estándares de calidad y restricciones legales severas, por ello se hace necesario desarrollar métodos eficientes de separación de estos compuestos tan sensibles a cualquier tipo de modificación del medio en el que se encuentren (Pavlou and Reichert, 2010).

Dentro de estos métodos, las proteínas están consideradas en la Industria Bioquímica como un mercado prometedor. Es por ello que la búsqueda de métodos de separación más rápidos y eficientes de dichas proteínas presenta cada vez más relevancia dentro de los procesos downstream.

Entre los procesos de separación de proteínas, la cromatografía de afinidad representa uno de los métodos más eficaces para la separación y purificación de las mismas.

El principio de separación se basa en la interacción reversible entre una proteína (o grupo de proteínas) y un ligando específico enlazado a una matriz cromatográfica (soporte sólido, insoluble e inerte). Este tipo de cromatografía se fundamenta en las interacciones altamente específicas entre la molécula o compuesto a separar y una segunda molécula unida covalentemente (inmovilizada) en la fase estacionaria (ligando).

Las interacciones entre las moléculas del ligando (inmovilizado) y la proteína están sujetas a la especificidad o afinidad procedente de una complementariedad a escala molecular en la que son participes enlaces de coordinación, fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas e hidrofóbica, etc. (Gray, 1980; Allaker-Chase, 1984; Liapis, 1989, Zou *et al*; 2001).

El principio de la cromatografía de afinidad se muestra en la figura 1-1:

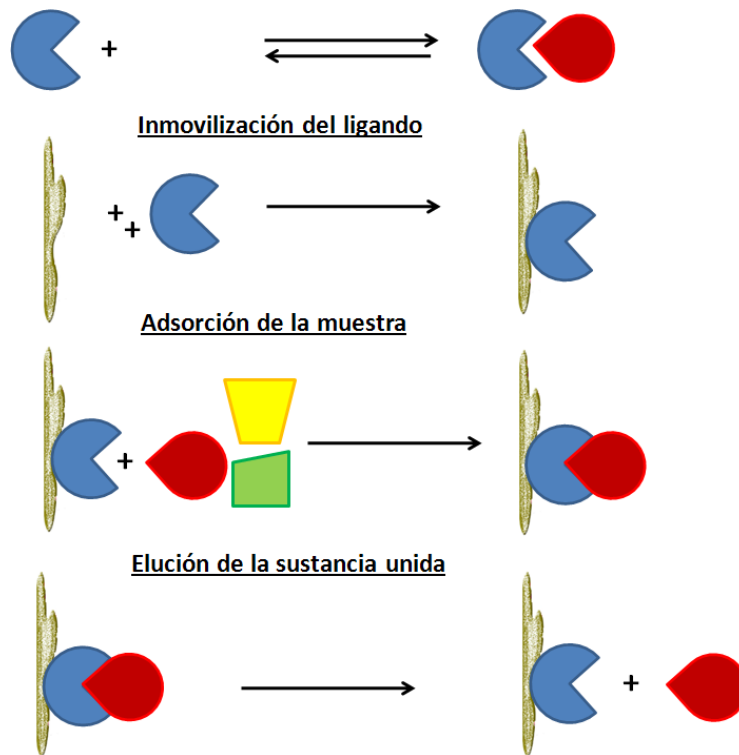


Figura 1-1. Principio de la cromatografía de afinidad.

Una de las principales ventajas de la cromatografía de afinidad con respecto a otros métodos de separación, es que aprovecha las propiedades bioquímicas únicas de la proteína deseada en lugar de las pequeñas diferencias en las propiedades físico-químicas entre proteínas utilizados en otros métodos cromatográficos (Voet, 2006).

Dentro de las interacciones específicas usadas en cromatografía de afinidad, a continuación se recogen las más importantes: (Dean, 1983):

- Enzima - sustrato análogo, inhibidor, cofactor
- Anticuerpo - antígeno, virus, células
- Hormona, vitamina - receptor
- Lecitina - polisacárido, glicoproteína, receptor de superficie celular, células
- Ac. Nucleico - Secuencia base complementaria, histonas, polimerasa de ácidos nucleicos, proteína de unión al ADN
- Iones metálicos - Proteínas nativas con histidina, residuos de cisteína y/o triptófano en su superficie
- Antígeno - anticuerpo

Por tanto, de la elevada especificidad de estas interacciones, se obtiene la capacidad de reconocimiento y enlace que muestran los anteriores sistemas biológicos, los cuales a su vez terminarán uniéndose aun cuando se encuentren en mezclas muy complejas (Voet, 2006).

Una de las principales ventajas de esta técnica es que permite purificar sustancias presentes en muy baja concentración o a partir de mezclas muy complejas conteniendo solutos de características similares a la que se pretende separar.

Por otra parte, la cromatografía de afinidad también puede ser utilizada para la retención de moléculas no deseadas (Gray, 1980).

Dentro de la cromatografía de afinidad, la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados, llamada de ahora en adelante IMAC, representa una modificación de dicha técnica, en la cual el ligando es sustituido por un ion metálico, el cual es apropiado para la separación y purificación de proteínas, que preferiblemente presenten residuos naturales de histidina expuestos en su superficie (Porath *et al*; 1975).

Esta técnica, también conocida como cromatografía de afinidad con metales quelados (MCAC) fue propuesta por primera vez por Porath *et al*; en 1975. Es una técnica alternativa que utiliza la asociación entre un ion metálico inmovilizado y un analito capaz de compartir electrones (Yip and Hutchensa, 1994).

Este sistema no se basa en el concepto de funcionalidad biológica como la cromatografías de afinidad clásica, si no que utiliza las propiedades quelantes de las cadenas laterales de Histidina, Cysteina y Triptofano de muchas proteínas, que son capaces de formar compuestos de coordinación con metales de transición, por ejemplo Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} entre otros (Porath, 1975; Arnold, 1991; Fanou-Ayi and Vijayalakshmi, 1983; Vijayalakshmi and Krishnan, 1987, Nakawa *et al*; 1988). El método consiste en inmovilizar alguno de estos cationes en fases estacionarias provistas de agrupamientos quelantes muy fuertes como el ácido iminodiacético o el ácido nitrilotriacético (Porath, 1992).

En la tabla 1-1 se recogen algunas de las proteínas que han sido purificadas mediante la técnica IMAC.

Tabla 1-1. Algunas proteínas purificadas con IMAC.

Substancia	Quelato	Iones metálicos	Referencia
α_2 - Macroglobulina	IDA, TED	Cd^{2+} , Zn^{2+}	(Kurecki <i>et al</i> ; 1979)
Calmodulina	IDA, TED	Cu^{2+} , Eu^{3+} , La^{3+} , Nd^{3+}	(Hemdan <i>et al</i> ; 1989)
Factores de coagulación	IDA	Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}	(Feldman <i>et al</i> ; 1996)
Colagenasas	IDA	Cu^{2+}	(Roy <i>et al</i> ; 1996)
Citocromos C	IDA	Cu^{2+} , Ni^{2+}	(Hemdan <i>et al</i> ; 1989)
Fibrinógeno	IDA	Zn^{2+}	(Scully and Kakkar, 1982)
Fibronectina	IDA	Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}	(Gmeiner <i>et al</i> ; 1995)
Hormonas gonadotróficas	IDA	Zn^{2+} , Ni^{2+}	(Smith <i>et al</i> ; 1988)
Factores de crecimiento	IDA, NTA	Cu^{2+} , Ni^{2+}	(Rowe <i>et al</i> ; 1986) (Heldin and Westermarck, 1989)
Interferón	IDA	Ni^{2+} , Zn^{2+}	(Edy <i>et al</i> ; 1977)
Lactoferrina	IDA	Cu^{2+}	(Lönnerdal <i>et al</i> ; 1977)
Lectina	IDA	Ca^{2+}	(Borrebaeck <i>et al</i> ; 1982)
Lisozimas	IDA	Cu^{2+}	(Torres <i>et al</i> ; 1979)
Proteínas de membrana	IDA, NTA, TED	Cu^{2+} , La^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}	(Machida and Saito, 1993; Micahelis <i>et al</i> ; 1992)
Metal-proteínas	IDA	Cu^{2+} , Zn^{2+}	(Barisani and Wessling-Resnick. 1996)
Metalotioneína	IDA	Cd^{2+}	(Khazaeli and Mitra 1981)
Mioglobinas	IDA	Co^{2+} , Zn^{2+}	
Fosfatasas	IDA, TED	Zn^{2+}	(Hörlein <i>et al</i> ; 1982)
Fosfoproteínas	IDA	Fe^{3+}	(Holmes <i>et al</i> ; 1997) (Scanff <i>et al</i> ; 1991)

Activador del plasminógeno	IDA	Zn ²⁺	(Rijken <i>et al</i> ; 1979)
Transcriptasa inversa	NTA	Ni ²⁺	(Le Grice and Grüninger-Leitch, 1990)
Ribonucleasas	IDA, NTA	Ni ²⁺ , Cu ²⁺	(Campbell and Ray, 1993)
Suero proteico	IDA, TED	Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺	(Lee and Pierce, 1995)
Superóxido dismutasa	IDA	Cu ²⁺	(Lönnerdal and Keen, 1982)

Fuente: Kastner, 1999

*IDA (Ácido iminodiacético).

*NTA (Ácido nitrilotriacético).

*TED (Tris(Carboximetil)Etilendiamina).

Como se puede ver en la tabla 1-1, la cromatografía IMAC, ha sido utilizada ampliamente para purificar un gran número de proteínas, con buenos resultados. En general y en comparación con otros métodos cromatográficos basados en interacciones de afinidad, IMAC es superior en términos de la estabilidad del ligando, la capacidad de recuperación de la proteína activa y el coste (Kastner, 1999).

La forma convencional de trabajar en cromatografía de afinidad es mediante el uso de columnas empaquetadas o de lecho fijo, las cuales habitualmente están rellenas de partículas porosas que permiten aumentar la superficie disponible para la adsorción.

En este tipo de columnas, la separación es llevada a cabo mediante el bombeo de la solución proteica a través de un lecho empaquetado en la cual el ligando es inmovilizado en el interior del poro de la partícula.

De esta forma la adsorción de las moléculas generalmente sigue los siguientes fenómenos (modelo general de velocidad):

1. Transferencia de materia externa desde la masa global del fluido hasta la superficie porosa de la partícula por convección, a través de una película delgada (capa límite) que rodea la superficie externa de la partícula.
2. Transferencia de materia interna del soluto por difusión en el poro desde la superficie externa de la partícula porosa hacia el interior del poro.

3. Adsorción del soluto en el interior del poro.

Los diferentes modelos descritos en bibliografía (Hahn *et al*; 2005; Kaczmariski and Bellot, 2003; Kang and Sun, 2007; Sun and Yang, 2008) que describen los procesos de adsorción en partículas porosas coinciden, en que cada partícula porosa se encuentra rodeada de una película (capa limite) donde la transferencia de materia tiene lugar solo por difusión molecular. De esta forma, dicha película está expuesta al flujo de la fase móvil y es enteramente accesible, mientras que del otro lado de la capa limite se encuentra la pared de la partícula que solo será accesible por los poros, siendo allí donde encuentra el ligando y se llevará a cabo el proceso de adsorción.

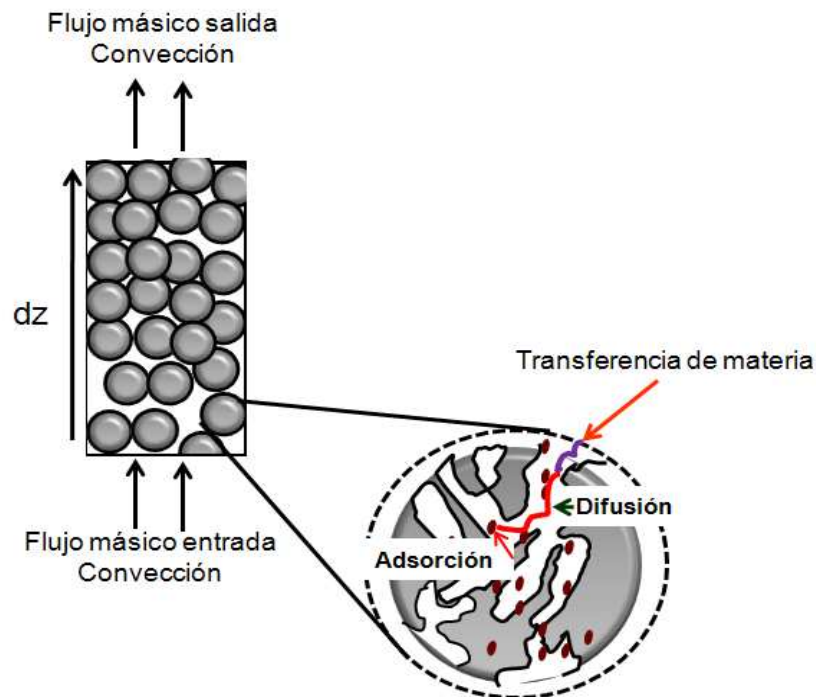


Figura 1-2. Modelo de una columna cromatografica empacuetada con partículas porosas.

En general, un problema que presenta este tipo de adsorbentes al incrementar su capacidad de proceso (escala industrial) son las altas pérdidas de carga debido a la propia condición del lecho (partículas pequeñas porosas) ocasionando también un aumento en la resistencia al transporte de materia.

Esta condición obliga a diseñar columnas de gran diámetro y altura reducida, generando una disminución en la velocidad de adsorción; adicionalmente involucra el ocupar bombas muy potentes y en consecuencia un alto consumo energético, lo que en muchas ocasiones hace poco viable el proceso (Guiochon, 2007).

Debido a los problemas descritos anteriormente de pérdida de carga y transferencia de materia, la propuesta de utilizar monolitos como fase estacionaria en cromatografía de afinidad resulta de gran interés para la separación y purificación de proteínas. Dada la geometría de los monolitos, esta técnica ofrece una notable reducción en la resistencia al transporte de materia, desde el seno de la fase líquida hasta la superficie del adsorbente, disminuyendo significativamente la pérdida de carga en la columna y permitiendo disminuir de forma significativa los tiempos de adsorción.

La estructura de los monolitos puede describirse como un bloque continuo, entrelazado por canales ramificados que tienen salidas por donde fluyen las proteínas; así longitud de los canales del monolito funciona como una adecuada fase estacionaria (figura 1-3). De esta forma, la proteína es bombeada a través de los canales de la columna, fluyendo con menor resistencia que en el caso de columnas empaquetadas, debido a la geometría en si del canal. Así, el movimiento del fluido generado por la bomba, es por convección, y el proceso de adsorción se lleva a cabo por difusión, desde la masa global del fluido hasta la superficie del adsorbente, donde se generaran las interacción proteína-ligando (Jungbauer and Hahn, 2002).

Los monolitos se pueden clasificar principalmente en dos clases; en primer lugar están los monolitos que directamente se utilizan como fase estacionaria como por ejemplo de poliacrilamida ó poli-polimetacritalo, donde actúa directamente como ligando (Pflegerl *et al*; 2002) y en segundo lugar están los monolitos elaborados con materiales inertes como la cerámica donde es necesario recubrirlos de un polímero (como agarosa) para llevar a cabo el proceso de activación y posterior adsorción de la proteína de interés.

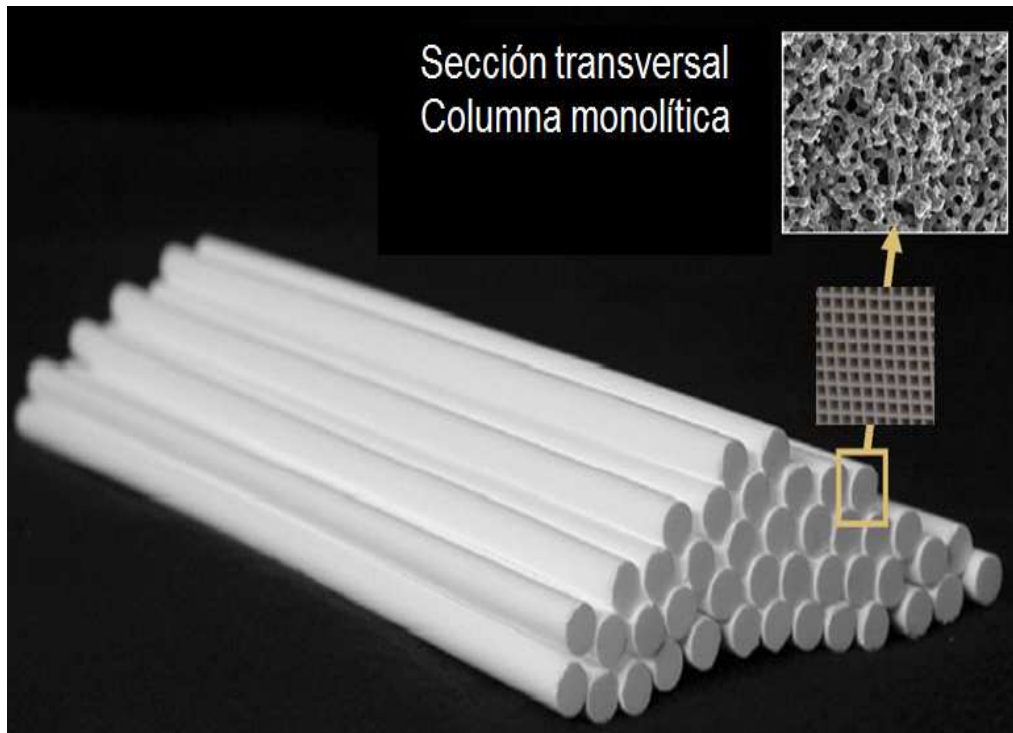


Figura 1-3. Columna monolítica cerámica.

En el presente estudio se han utilizado monolitos cerámicos ya que son soportes compactos que presentan una baja expansión térmica y una buena resistencia mecánica; están formados por capilares en forma de cuadrados o triángulos, en forma de panal, por donde atraviesa el fluido. La designación del monolito cerámico se hace mediante el número de capilares por pulgadas cuadrada de área frontal y sobre el espesor de las paredes (Martin del Valle *et al*; 2003).

El hecho de poder recubrir los monolitos cerámicos con un polímero como la agarosa, permite activar la matriz con un elevado número de ligandos, permitiendo separar una gran variedad de proteínas, ya que la molécula de interés no dependerá del tipo de soporte utilizado y la columna seguirá presentando las ventajas descritas anteriormente.

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, esta tesis doctoral pretende profundizar en el conocimiento de los diferentes fenómenos tales como, coeficientes cinéticos, coeficientes de dispersión, eficiencia del proceso de adsorción entre otros, que se manifiestan al emplear monolitos cerámicos como fase estacionaria en cromatografía de afinidad IMAC. De esta forma con los resultados obtenidos y mediante el oportuno modelamiento se tratará de hacer una propuesta para realizar un cambio de escala de la técnica seguro y eficaz.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Como se mencionó en la introducción, la forma convencional de trabajar en cromatografía de afinidad es mediante el empleo de columnas empaquetadas o de lecho fijo, presentando problemas de pérdida de carga y resistencia al transporte de materia, obligando a usar columnas de gran diámetro y altura reducida.

Con el fin de solventar estos problemas, una alternativa son los monolitos cerámicos, soportes robustos que presentan una baja pérdida de carga, siendo otra alternativa en procesos de separación aplicando la técnica IMAC.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, el objetivo principal de este trabajo es desarrollar una nueva forma de separar proteínas, basada en cromatografía IMAC usando monolitos cerámicos como soporte cromatográfico.

Como sistema inicial de estudio, se utilizará un monolito cerámico recubierto de agarosa tipo D-5, activado con 1,4-butanodiol-diglicidil-éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante, y Cu^{2+} como ligando, la proteína tipo será el suero de albumina bovina (BSA) que se utilizará para establecer las condiciones del proceso, posteriormente se estudiará la adsorción de la enzima Catalasa (CAT), para finalmente poder llevar a cabo la separación de una mezcla binaria (BSA+CAT).

Se ha elegido el suero de albumina bovino (BSA) como proteína tipo ya que es una macromolécula que ha sido estudiada ampliamente, de la cual se conocen sus propiedades además de ser muy abundante y económica, en segundo lugar se utilizará la agarosa tipo D-5 ya que posee mayor fuerza de gel lo cual hace que tenga más resistencia que agarosas tradicionales, siendo esto beneficioso para llevar a cabo recubrimientos en superficies sólidas.

La determinación de la eficiencia del adsorbente en los ciclos de adsorción/elución es un factor clave para la economía del proceso de separación; por lo tanto la eficacia de los ciclos de adsorción/elución serán determinados mediante el desarrollo de un modelo dinámico para estimar la reutilización óptima del soporte cerámico. Para ello se estudiará el efecto que tiene en la separación, múltiples ciclos de adsorción/elución sin regenerar el monolito cerámico

De igual forma, la cinética de adsorción, transferencia de materia y modelización del proceso son factores fundamentales para la implementación a

mayor escala de la técnica IMAC, ya que en muchos casos es necesario conocer la velocidad y la resistencia del transporte de materia, a fin de diseñar un equipo industrial adecuado, por lo tanto se estudiará la cinética de adsorción, junto con la adsorción específica y también no específica en el sistema IMAC empleando monolitos cerámicos como soporte cromatográfico.

Se realizará asimismo el estudio de transferencia de materia del proceso de adsorción y se llevara a cabo la correspondiente modelización matemática, para lo cual se propondrá y empleará un modelo matemático, utilizando la plataforma MATLAB.

Por último y con el fin de obtener una mejor comprensión de los procesos involucrados en los enlaces producidos entre la proteína BSA y Catalasa y el ligando a utilizar en este trabajo, se empleará la técnica de calorimetría isotérmica (ITC) para llevar a cabo un estudio de los parámetros termodinámicos del enlace de la proteína BSA y el ligando (Cu^{2+}) en estado libre a diferentes temperaturas y la proteína BSA y el ligando (Cu^{2+}) en estado inmovilizado en el soporte a diferentes temperaturas.

Dado que todos los procesos de adsorción por medio de la técnica IMAC conllevan procesos de enlace débiles los cuales se acompañan de la liberación o la adsorción de calor, es decir, un cambio en la entalpia de enlace, la caracterización completa de la reacción, provee información fundamental sobre los procesos que conducen las interacciones moleculares, los cuales son importantes a fin de realizar un cambio de escala en procesos de separación.

Por tanto, se estudiarán los parámetros termodinámicos de la enzima CAT y el ligando (Cu^{2+}) en estado libre a diferentes temperaturas y la enzima CAT y el ligando (Cu^{2+}) en estado inmovilizado en solución fosfato pH 4,5 y tampón PBS pH 7,4, en un intervalo de temperatura de 296 a 304 K.

Con todo lo anterior, se espera obtener un mayor conocimiento del sistema de adsorción planteado en este trabajo, además se espera que la información obtenida sirva para poder extrapolarse a otros sistemas de separación que utilicen monolitos cerámicos como soporte cromatográfico, esto con el fin de poder hacer un cambio de escala óptimo.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1. Procesos en cromatografía

Las separaciones cromatográficas representan un importante papel en la purificación de proteínas, son de gran versatilidad y selectividad ya que se pueden usar en la transformación secundaria de procesos biológicos.

De los procesos disponibles para llevar a cabo bioseparaciones, la cromatografía es la que mejores resultados provee; ni procesos como la filtración (micro, ultra y osmosis inversa), centrifugación, floculación, flotación, precipitación etc. pueden llegar a la pureza que los productos biofarmacéuticos requieren (Kalyanpur, 2000).

La cromatografía abarca una gran diversidad de métodos que permiten separar componentes de distintos tipos de mezclas; la forma de operación de dichas separaciones, se basan en el proceso de transportar la solución que contiene la biomolécula objetivo a través de una columna rellena con un material adsorbente. El adsorbente de manera efectiva, debe retener el bioproducto, permitiendo que las moléculas que no son de interés, pasen a través de él sin ningún tipo de interacción. Después de concluido el proceso de separación de la biomolécula objetivo, esta se eluye de la matriz, encontrándose disponible para su posterior uso.

En este tipo de procesos, cuando se emplean adsorbentes porosos, el flujo por convección es responsable del transporte de las biomoléculas hacia el adsorbente poroso, mientras que la difusión (influenciado por el tamaño relativo de los solutos y los poros, así como el tamaño de partícula) regula el transporte de las biomoléculas dentro de la estructura porosa del adsorbente. La caída de presión y el flujo a través de la columna depende del tamaño de partícula y longitud de la columna (Lyddiatt, 2002).

Las técnicas cromatográficas utilizan algunas características físicas, químicas o biológicas de la molécula de interés con el fin de lograr la separación.

A continuación se describen algunas de las técnicas más representativas (Kalyanpur, 2000, Jungbauer, 2005).

- **Exclusión de tamaño:** Esta técnica permite la separación de proteínas en función de su tamaño. Se realiza en una columna que está rellena con un gel poroso insoluble, en forma de esferas. Las moléculas proteicas de menor tamaño penetran por los poros, por lo que el recorrido que han de hacer a través de la disolución es mayor que el de las moléculas de gran tamaño, que no penetran en los poros por impedimento estérico; esto hace que las moléculas de gran tamaño eluyan antes que las de tamaño más pequeño. Por lo tanto, una mezcla de proteínas se separara en función del tamaño, primero las más grandes y en último lugar las de menor tamaño (Garrido and Teijon, 2006).
- **Intercambio iónico:** La cromatografía de intercambio iónico, permite la separación de proteínas en función de su carga; implica el intercambio reversible de especies cargadas eléctricamente entre una disolución en movimiento y un sólido. La fase estacionaria es una resina de intercambio iónico que contiene grupos cargados, presentando la propiedad de separar especies ionizadas (cationes o aniones), la fase móvil es generalmente una solución tampón. Las proteínas separadas por este método, lo hacen a través de las diferencias en signo y magnitud de la carga eléctrica neta de las mismas, a un valor de pH determinado. La afinidad de cada proteína a los grupos cargados de la columna, está influenciado por el pH y la concentración de iones en solución (concentración salina) que compite con la proteína en la interacción con la matriz. La elución de la proteína de la matriz cargada, puede obtenerse gradualmente cambiando el pH y/o la concentración salina de la fase móvil, de tal forma que se genere un gradiente de concentración (Voet *et al*; 2006).
- **Fase normal:** En esta técnica la fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un adsorbente solido como por ejemplo sílice o aluminio, ó bien un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (amino, ciano, etc.) (Gennaro, 2003).

- **Fase inversa:** La cromatografía en fase inversa se caracteriza porque la fase estacionaria es no polar o débilmente polar y el disolvente es más polar. En esta técnica, existe una interacción entre las moléculas hidrofóbicas de la fase estacionaria y las moléculas hidrofóbicas de la fase móvil. La matriz consiste usualmente en fibras de silicato con cadenas de hidrocarburos; estas atraerán a las moléculas hidrofóbicas de la muestra, mientras que las moléculas hidrofílicas saldrán con el tampón. Las moléculas son eluidas de la columna, lavando con soluciones de distinta concentración de alcohol o cualquier otro solvente no polar (Gennaro, 2003).
- **Interacción hidrofóbica:** La cromatografía por interacción hidrofóbica, separa las proteínas en base a su hidrofobicidad superficial y se caracteriza por la adsorción de las biomoléculas a la superficie débilmente hidrofóbica de la matriz (normalmente una resina) en una solución fuertemente salina y su posterior elución mediante una fuerza iónica más baja. A pesar de que el mecanismo de separación es similar al de la fase inversa, su selectividad es distinta, por lo que ambas técnicas pueden ser complementarias. Una de las principales ventajas de esta técnica cromatográfica, frente a la técnica de fase inversa se basa en las condiciones de trabajo, ya que al contrario de la fase inversa, no requiere de ningún tipo de modificador orgánico para la elución de las diferentes proteínas.
- **Cromatografía de afinidad:** Como se mencionó anteriormente, la cromatografía de afinidad, separa las proteínas basándose en una interacción reversible entre las proteínas y un ligando específico enlazado a una matriz cromatográfica. Esta técnica es ideal para llevar a cabo separaciones y procesos de purificación, además puede ser utilizada siempre que se disponga de un ligando adecuado para la proteína objetivo, permitiendo la purificación de dicha proteína con una elevada pureza y concentración.

Debido a la selectividad de la técnica, la cromatografía de afinidad ofrece un gran ahorro de tiempo y energía frente a los procedimientos en varios pasos, que además, son menos selectivos; el aumento en la concentración de los productos permite procesar mayores volúmenes de muestra y las proteínas pueden ser separadas a partir de mezclas biológicas muy complejas.

Dentro de la cromatografía de afinidad, la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) representa una variación de dicha técnica, en la cual, el ligando es sustituido por un complejo metálico, el cual es apropiado para la separación y purificación de proteínas con residuos de determinados aminoácidos expuestos en su superficie.

La cromatografía IMAC, es una técnica de separación que utiliza compuestos quelantes unidos covalentemente a una matriz cromatografica sólida para inmovilizar iones metálicos, los cuales sirven como ligandos de afinidad para diferentes tipos de proteínas, haciendo uso de enlaces de coordinación que proporcionan algunos residuos de aminoácidos que se encuentran en la superficie de dichas proteínas.

3.2. Fundamentos de la cromatografía de afinidad con Metales Inmovilizados (IMAC).

Como se mencionó en los objetivos, la técnica de separación utilizada en este trabajo es la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados IMAC; esta técnica se basa en el principio de separación que utiliza la afinidad de algunas cadenas externas de aminoácidos presentes en la superficie de las proteínas con iones metálicos inmovilizados para realizar la separación.

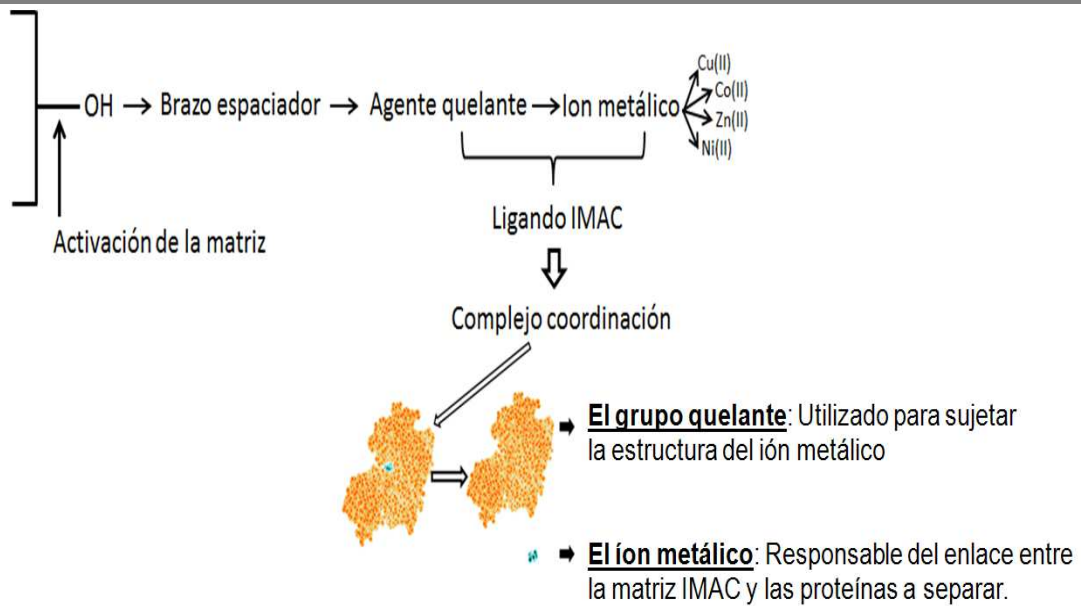


Figura 3-1. Esquema general de la preparación de un adsorbente en cromatografía IMAC.

Estas diferencias en la afinidad están motivadas por los enlaces de coordinación que se producen entre los iones metálicos y dichas cadenas de aminoácido. Los iones más comúnmente utilizados en esta técnica son: Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , ya que pueden aceptar pares de electrones y por tanto pueden ser considerados como ácidos de Lewis (Porath, 1975, 1992).

De esta forma el ión metálico actúa como aceptor de electrones, sin embargo el centro de adsorción no implica solo el metal sino que se forma un complejo

Los átomos donadores de electrones presentes en los compuestos quelantes que se unen al soporte cromatográfico, son capaces de coordinar iones metálicos y formar quelatos metálicos que pueden ser bidentados, tridentados etc., dependiendo del número de sitios de coordinación ocupados. Los otros sitios metálicos de coordinación, normalmente son ocupados por moléculas de agua y pueden ser cambiados con los grupos adecuados de donantes de electrones de la proteína (Hemdan and Potath, 1985).

Aunque muchos residuos de aminoácidos como el ácido glutámico, ácido aspártico, triptófano, cisteína, histidina, arginina, lisina y metionina, pueden participar en la unión al ion metálico, la retención real de proteínas usando el método IMAC está basado principalmente en la disponibilidad de los residuos de histidina y cisteína libres. (Gaberc-Porekar and Menart, 2001).

3.2.1. Antecedentes de la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados IMAC

Porath y colaboradores describieron por primera vez la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) en 1975 en la revista *Nature*. Desde entonces la técnica IMAC se ha utilizado para aislar proteínas, péptidos y ácidos nucleicos entre otros y para la separación de células. En dicha técnica, el ion metálico es inmovilizado en una matriz o soporte a través de la vinculación coordinada con agentes quelantes. Del mismo modo, la retención de un soluto en la columna depende de la formación de vínculos coordinados entre un donador de electrones del soluto en la fase móvil y el ion metálico inmovilizado. La separación de las macromoléculas generalmente dependerá de la fuerza de unión entre los iones metálicos y ellas, por lo tanto, el elegir el tipo de ion adecuado es crucial para el éxito de la separación.

La afinidad de iones metálicos ha sido utilizada para fraccionar proteínas durante más de un siglo. Inicialmente las sales de plomo fueron usadas para eliminar las proteínas a partir de extractos biológicos. Durante y después de la segunda guerra mundial, Tullis en 1953 introdujo una serie de procedimientos selectivos con esta técnica. En 1961 el concepto de “cromatografía de intercambio de ligandos” fue presentado por Helfferich (Helfferich, 1961) y fue desarrollado posteriormente por Davankov and Semechkin (1977). En 1970, se describieron estudios sobre las funciones de iones metálicos en metaloproteínas y la cromatografía de intercambio de ligandos. Sin embargo, este tipo de práctica fue casi inexistente hasta 1975. Es por esta razón por la que esta técnica aunque tiene sus orígenes en los trabajos de Tullis y Davankow, debería de ser considerada como una consecuencia de la cromatografía de bioafinidad.

En 1983, Fanou-Ayi and Vijayalakshmi, hablaron de la cromatografía de afinidad IMAC como una herramienta para las separaciones de macromoléculas. En 1985, Sulkowski *et al*; iniciaron un estudio sistemático para definir las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos responsables de la adsorción de los iones metálicos. Un aporte adicional por Hemdan y Porath, fue el esclarecimiento de la contribución de varios aminoácidos y sus cadenas a la unión con los iones metálicos (Hemdan and Porath, 1985).

Adicionalmente Sulkowski, dio una definición clara de los requisitos mínimos obligatorios para inmovilizar los iones metálicos. Estableció el mecanismo de

unión de un ión inmovilizado de Cu^{2+} en las cadenas de histidina de una proteína. Adicionalmente sugirió que el ligando Co^{2+} requiere al menos la presencia de dos histidinas adyacentes expuestas en la superficie de la proteína (Sulkowski, 1985).

En 1986 el conocimiento de la afinidad de las proteínas con los iones metálicos avanzó mucho más, como por ejemplo demostrando que las cadenas fosforiladas secundarias pueden desempeñar un papel importante en la unión de iones metálicos. Muszynska *et al*; 1986 y 1992, ayudaron a comprender el papel de los aminoácidos carboxílicos y la tirosina en la adsorción de proteínas y péptidos en iones metálicos inmovilizados. Fue también demostrada la importancia de la selectividad de los iones metálicos por las cadenas laterales fosforiladas de las macromoléculas como una característica importante de esta técnica (Muszynska *et al*; 1986 y 1992).

Los conocimientos adquiridos a lo largo de los años han contribuido a la demostración entre 1987 y 1988 por Hochuli *et al*; del trabajo en la utilización de hexa-histidina y adsorbentes IMAC para la purificación de proteínas recombinantes. Este método es el más utilizado en la actualidad, de hecho el 50% de las proteínas recombinadas expresado en células huésped procariontas son purificadas por la técnica IMAC.

Además de su uso como una herramienta de preparación, la técnica IMAC se ha utilizado con éxito como sonda en la superficie expuesta a los aminoácidos. Este enfoque es útil para predecir la disponibilidad de cadenas laterales de histidina en la superficie de las proteínas (como dar información adicional sobre el medio ambiente de los aminoácidos vecinos). Por ejemplo Berna *et al*; (1997) reportaron el empleo de la técnica IMAC para investigar la accesibilidad de los sitios activos de histidinas en quimiotripsinas.

Hasta la fecha los iones metálicos inmovilizados en una matriz han servido para fraccionar péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y para la separación de células en medios biológicos (Hochuli *et al*; 1987; Ohkubo *et al*; 1980; Montovaara *et al*; 1991; Hubert and Porath, 1986; Goubra-Botros *et al*; 1992; Min and Verdine, 1996; Price *et al*; 1995...).

3.2.2. Componentes de un medio de afinidad en cromatografía IMAC

Los elementos característicos de la técnica IMAC, sin tener en cuenta la hidrodinámica del proceso son (ver figura 3-1):

- **La matriz:** Soporte sólido inerte (física y químicamente) empleado para la unión del ligando
- **El brazo espaciador:** Utilizado para mejorar el enlace entre el ligando y la molécula a separar mediante la reducción de los efectos estéricos.
- **El ligando:** Molécula que se enlaza reversiblemente con la molécula o grupo de moléculas a separar. En cromatografía IMAC el ligando está compuesto por un compuesto quelante unido con un ion metálico.

3.2.2.1. Soporte sólido (matriz)

La matriz es el soporte insoluble del sistema cromatográfico que una vez activado permitirá unir el brazo espaciador y el ligando. Para que un soporte sea empleado como fase estacionaria en cromatografía IMAC, debe tener una serie de características.

En primer lugar, la adsorción no específica debe ser extremadamente baja, esto es esencial ya que el éxito de esta técnica se basa en interacciones específicas (Lowe and Dean, 1974).

En segundo lugar, el soporte debe ser insoluble, formando una red flexible y porosa que permita la entrada y salida uniforme de las proteínas a través de toda la matriz. Una característica crítica para los sistemas proteína- ligando es el alto grado de porosidad, ya que las estructuras con poros abiertos garantiza una alta interacción, incluso para grandes macromoléculas. De tal manera, que a menor tamaño de partícula y mayor tamaño de poro la superficie específica donde se llevaran a cabo las interacciones será mayor. (Hermanson, 1992).

En general el soporte sólido debe ser física y químicamente estable para las condiciones seleccionadas de adsorción y elución. La rigidez dimensional y la porosidad de la matriz deben permanecer estables en las condiciones de operación.

En la tabla 3-1 se recogen las propiedades que debe tener una matriz convencional en cromatografía IMAC.

Tabla 3-1. Propiedades de una matriz convencional.

1. La matriz debe formar una red porosa amplia que permita fácilmente el movimiento de grandes moléculas.
2. Las partículas deben ser preferiblemente uniformes, esféricas y rígidas con buenas propiedades de flujo.
3. La matriz no debe interactuar con las proteínas, de manera que no exista adsorción no específica.
4. El soporte inerte debe estar constituido por grupos funcionales que sean reactivos y susceptibles de ser activados y a los cuales puedan unirse el ligando y brazo espaciador.
5. La matriz debe ser mecánica y químicamente estables para las condiciones de adsorción-elución.

Fuente: Lowe and Dean, 1974

Los soportes se pueden clasificar, en primer lugar de acuerdo a la forma de la matriz y en segundo lugar al material del que están constituidos. En la figura 3-2 se muestra una clasificación de los soportes cromatográficos propuesta por Jungbauer de acuerdo a su forma (2005).

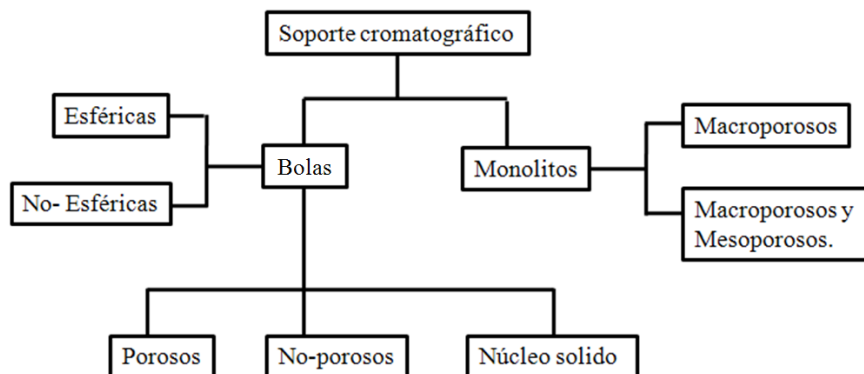


Figura 3-2. Clasificación de los soportes cromatográficos de acuerdo a la forma de la matriz.

Como se mencionó anteriormente las matrices también pueden ser clasificadas por el material del cual están constituidas, así, los materiales que convencionalmente se utilizan en cromatografía IMAC son polímeros naturales como la agarosa, celulosa, dextrano, quitosano, polímeros sintéticos como poliacrilamida, trisacryl, hidroxialquimetacrilato u oxiranos acrílicos entre otros, ó materiales inorgánicos como la sílice, óxido de zirconio, vidrio etc. Estas matrices pueden ser modificadas con el fin de aumentar su área específica (sílice) que se utiliza para injertar una capa adicional en la superficie (agarosa) (Jungbauer, 2005).

En la tabla 3-2 se recogen algunos soportes utilizados en cromatografía de afinidad:

Tabla 3-2. Algunos tipos de Soportes utilizados en cromatografía de afinidad.

Tipo	Material básico
Polímeros naturales	Agarosa
	Dextrosa
	Celulosa
	Chitosan
Copolímeros Sintéticos	Poliacrilamidas
	Poliestireno
Materiales inorgánicos	Vidrio poroso
Materiales inorgánicos / Copolímeros inorgánicos	Sílice / Copolímeros hidrofílicos

Fuente: Lowe and Dean, 1974

De los materiales anteriormente mencionados, los de mayor aplicación en procesos de separación y purificación de macromoléculas son los constituidos por polisacáridos y entre ellos la agarosa, debido a su carácter hidrofílico y a sus propiedades físicas y químicas inertes.

A continuación, de forma general se describirán algunos de los soportes con base en **material particulado** comúnmente utilizados en cromatografía IMAC.

3.2.2.1.1. Matrices de polímeros naturales

A continuación se describirán las matrices de polímeros naturales comúnmente usadas en cromatografía de afinidad.

a. Agarosa

La agarosa es un polisacárido natural extraído de las paredes celulares de ciertas algas rojas (*Rhodophyceae*) también conocidas como agarofitas. Su estructura química confiere a la agarosa la capacidad de formar geles con alto cross-linking incluso a bajas concentraciones. Estos geles de agarosa poseen una estructura macrorreticular con una malla muy abierta que se puede modificar al variar la concentración de agarosa (Hermanson *et al*; 1992).



Figura 3-3. Foto del alga roja (*Rhodophyceae*), de la cual se extrae el polisacárido para la obtención de la agarosa.

Estructuralmente, la agarosa es un galactano (polímero de galactosa) con enlaces 1-4, 1-3, 1-4, 1-3 (figura 3-4). Esta disposición permite la unión de dos cadenas adoptando una conformación de doble hélice LH, dicha configuración le permite retener moléculas de agua en su interior.

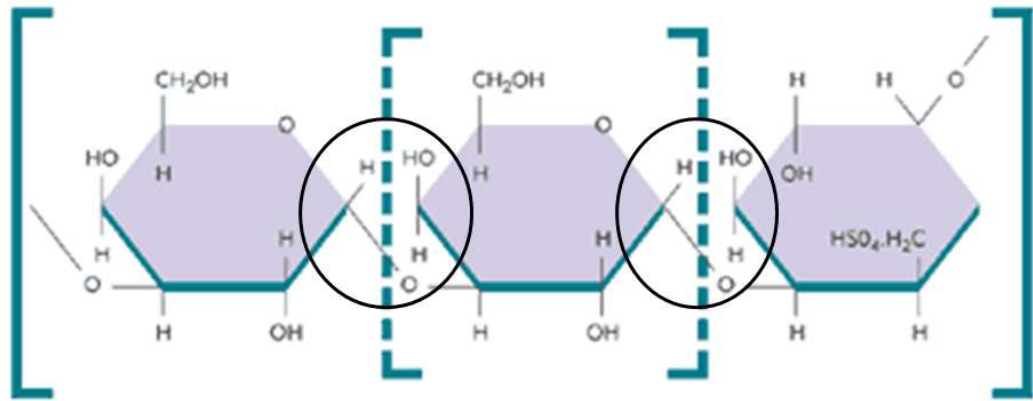


Figura 3-4. Estructura química de la agarosa.

La estructura macroreticular de los geles de agarosa, se forma por uniones de puentes de hidrogeno que hacen que el gel sea termo-reversible y por lo tanto que se funda cuando es sometida a calentamiento. La histéresis estructural (diferencia de estructuras entre temperaturas de fusión y gelificación) es mayor que en otros hidrocoloides, lo cual es una gran ventaja en muchas aplicaciones tales como cromatografía de afinidad y electroforesis entre otras, empleadas en el campo de la Bioquímica y la Biología Molecular. La ausencia de grupos iónicos hace que el gel tenga una estructura neutra e inerte, evitándose así la interacción de las moléculas con la estructura (Hermenson *et al*; 1992).

En concreto, gelifica a temperaturas comprendidas entre 32 y 45 °C y funde a temperaturas entre 80-95°C, aunque estas temperaturas, sin embargo estos intervalos de temperatura pueden ser alterados, si se desea obtener otro tipo de estructuras para usos específicos.

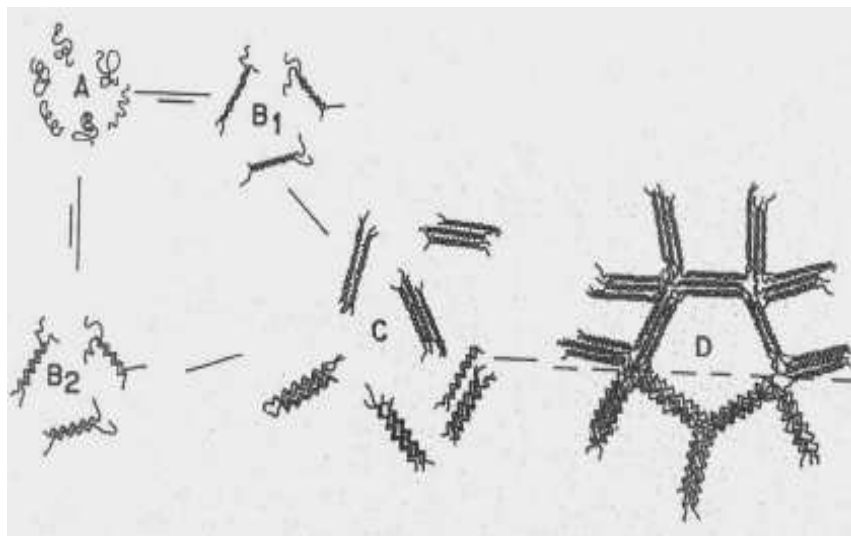


Figura 3-5. Gelificación del gel de agarosa

Estudios de rayos X (Arnott and Scott, 1972) demostraron que las cadenas de polisacáridos que constituyen la agarosa cambia de forma a doble hélice, con lo cual al adicionar puentes de hidrogeno y con la interacción hidrofóbica dentro de las fibras de la estructura del gel, dicho gel es mantenido por “zonas de anclaje” incluyendo acoplamiento no covalentes. Esta fase de la red puede contener hasta 100 partes de agua por fracción de polisacárido, lo cual hace que las macromoléculas se puedan difundir fácilmente en un espacio relativamente amplio. El límite de exclusión puede variar dentro de un amplio intervalo debido a que el tamaño del poro es inversamente proporcional a la concentración de agarosa.

Las matrices de agarosa son muy hidrofóbicas, estables mecánicamente, fácilmente modificables químicamente, poseen grupos OH y normalmente no poseen propiedades no específicas. Sin embargo bajo ciertas condiciones, las interacciones no específicas débiles llegan a ser distintamente evidentes; esto es atribuido a un contenido residual de sulfatos (<0,7%) en la forma de éster en la posición 6 ($\text{CH}_2\text{-OSO}_3$) o el grupo carboxilo y también por la interacción hidrofóbica probablemente atribuida al puente de éter en la anhidrogalactosa (Hermenson *et al*; 1992).

b. Agarosa tipo D5

La agarosa D5 es un polímero lineal de alto peso molecular, con una fuerza de gel (fuerza que hay que aplicar al gel para romperlo) superior al de otro tipo de agarosas comerciales ($\geq 3200 \text{ g/cm}^2$ 1,5% w/v). Adicionalmente, presenta una mayor estabilidad térmica como se indicó anteriormente, debido a su elevada histéresis (diferencia estructural entre las temperatura de gelificación y de fusión). Debido a estas propiedades no solo es posible prepararla en forma de bolas, sino que puede adquirir la forma de cualquier superficie, permitiendo hacer recubrimientos de matrices sólidas empleadas como fases estacionarias en cromatografía de afinidad (Laboratorios Conda, Especificaciones agarosa D5). En la figura 3-6 se puede observar la superficie micro porosa de este tipo de agarosa en forma de gel con un porcentaje 1,5% w/v.

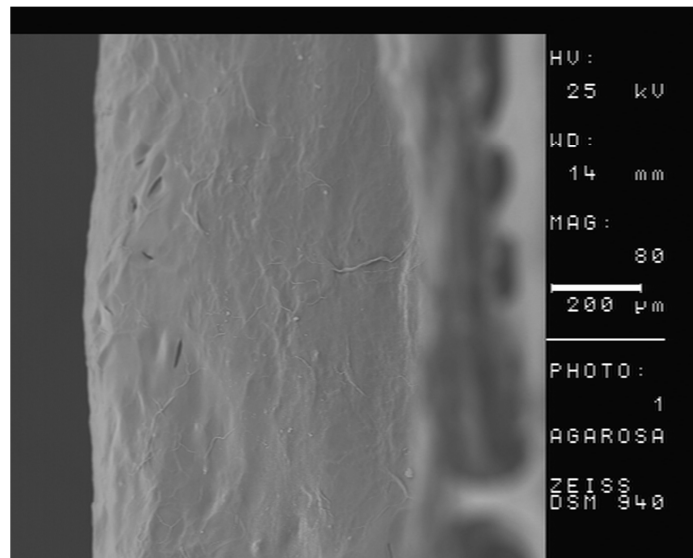


Figura 3-6. Superficie micro porosa del gel de agarosa tipo D-5 mediante microscopia electrónica (SEN).

c. Celulosa

Es un polímero lineal, siendo su estructura química 1,4 β D-glucosa con uniones ocasionales en la posición 1,6. Las fibras de celulosa comprenden una agregación de cadenas glucosídicas unidas unas a otras por varios puentes de hidrogeno.

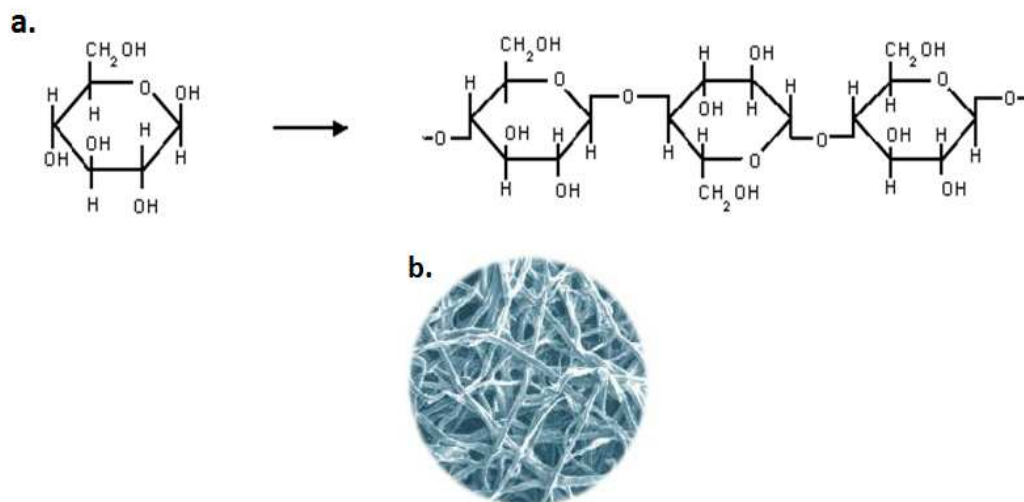


Figura 3-7. Estructura química de la celulosa. **a)** A la izquierda, β -glucosa; a la derecha, varias β -glucosa unidas (Hermanson *et al*; 1992) y **b)** fibras de celulosa.

Es una matriz que debido a su naturaleza fibrosa y poco uniforme no permite las formaciones de grandes poros, dando lugar a zonas cristalinas de alto grado de agregamiento y a zonas amorfas “desordenadas” que impiden el paso de grandes macromoléculas; sin embargo esta condición no ha impedido utilizarlas en diversos protocolos de purificación (Gemeiner, 1998).

La celulosa comercial está preparada en forma de micro fibras o microcristales esferoides que presentan buenas velocidades de flujo. En la actualidad también se puede conseguir celulosa en forma de esferas altamente porosas que se componen de celulosa pura (15%) y agua, de tal forma que cuando estas partículas se hinchan se produce una estructura microreticular (Hermanson *et al*; 1992).

d. Dextrano

El dextrano es un polisacárido de alto peso molecular, compuesto de unidades de D-Glucosa unidos mediante enlaces glucosídicos α -(1-6) (figura 3-8), son estructuralmente diversos y se caracterizan de acuerdo al porcentaje, naturaleza y distribución de sus enlaces. El dextrano se produce generalmente en cultivos de bacterias lácticas como *Streptococcus*, *Acetobacter* o *Leuconostoc*, en medios que contienen sacarosa, las células en crecimiento secretan una enzima llamada dextransucrasa que convierte el exceso de sacarosa al hidrolizarla en dextrano y liberando fructosa al medio (Turcová, 1978).

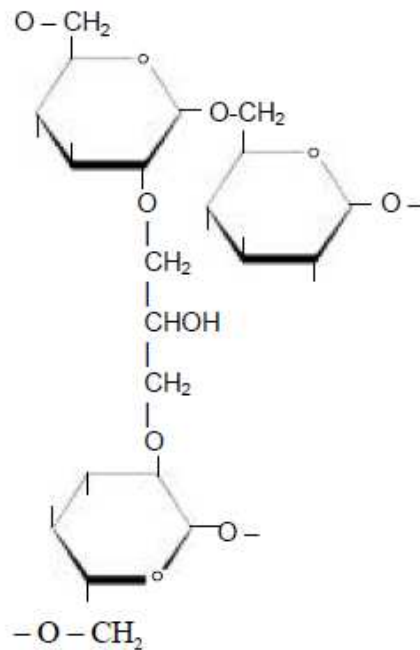


Figura 3-8. Estructura del dextrano utilizado como soporte de afinidad (Turcová, 1978).

La producción del dextrano se realiza por fermentación bacteriana o enzimática. El microorganismo empleado es *Leuconostoc mesenteroides* de las cepas NRRL B-512F, 512 y B1299; solo con la cepa B-512F se produce dextrano a escala industrial, a partir de sacarosa comercial. El sustrato empleado comúnmente es la sacarosa en concentraciones aproximadas de 5% y en fermentación enzimática puede ser hasta más o menos 20%, obteniéndose una concentración de dextrano de 20g/l (Khalikova *et al*; 2005).

e. Quitina y Quitosano

La quitina es un polisacárido natural y el quitosano se obtiene por la desacetilación parcial de la quitina. El quitosano ha generado una considerable atención en áreas como la biotecnología y la biomedicina, por considerársele como una excelente matriz en cromatografía de afinidad, debido a que sus grupos amino e hidroxilo proporcionan sitios activos reactivos para la introducción de varios tipos de ligandos (Singla and Chaula, 2001; Kurita, 2006).

Las propiedades de la quitina y el quitosano dependen principalmente de la fuente de obtención y el método de preparación ya que estos polímeros difieren entre sí por su distribución de los diferentes monómeros, masa molecular y grado de acetilación (Veiga-Ochoa and Ruiz-Caro, 2004).

Químicamente, la quitina y el quitosano son poliglucosaminas que son distinguidas únicamente por el grado de acetilación de los grupos amino. Las quitinas típicas presentan generalmente un grado de acetilación entre 70 y 95% que corresponde a un contenido de acetilo de un 15-20.7%, mientras que el quitosano tiene comúnmente un grado de acetilación entre 15 - 25% que corresponde 3.2 - 5.3% del contenido de acetilo (Gacén and Gacén, 1996).

El grado de acetilación es probablemente el parámetro más importante de estos polisacáridos y determina en gran medida las características funcionales y fisiológicas de los mismos. Los factores que afectan el grado de desacetilación incluyen concentración de álcali, tamaño de partícula y la densidad de la quitina. En la práctica, el nivel máximo de desacetilación que se puede alcanzar en un solo tratamiento alcalino es cerca del 75%. Este parámetro es muy importante para obtener un producto soluble, aunque también influye la distribución de los grupos acetilo (Gacén and Gacén, 1996).

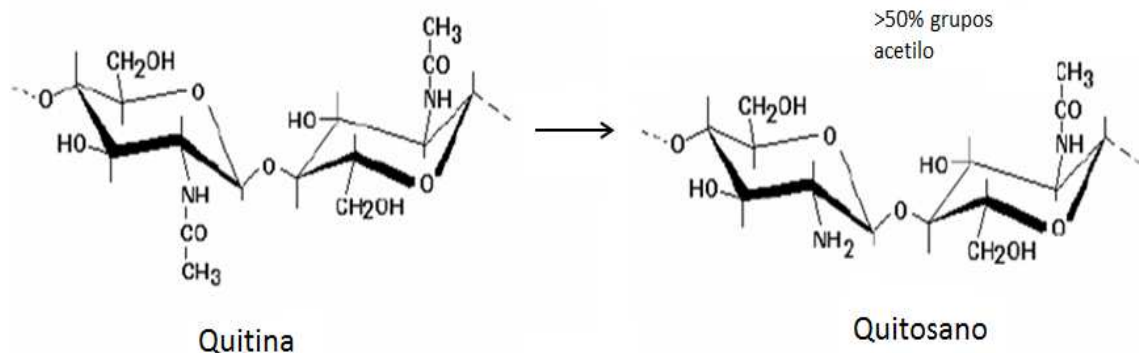


Figura 3-9. Relación estructural entre la quitina, el quitosano y el quitano (Lárez Velásquez, 2006).

Al igual que otros polisacáridos, para su utilización en cromatografía de afinidad, el gel de quitosano presenta baja resistencia mecánica y una gran pérdida de presión en operaciones cromatográficas. Sin embargo a pesar de estos inconvenientes, ha sido ampliamente usado en cromatografía IMAC, debido a la capacidad de adsorción de los iones metálicos en este tipo de matrices porosas, aumentando su capacidad de adsorción al aumentar los grupos amino inmovilizados en la matriz (Kaminski and Modrzejewska, 1997; Kawamura *et al*; 1993).

3.2.2.1.2. Matrices Sintéticas

A continuación se describirán algunas matrices sintéticas usadas comúnmente en cromatografía de afinidad.

a. Poliacrilamida

La acrilamida es un polímero sintético compuesto de un esqueleto hidrocarbonado al que se unen grupos de carboxilamida de la siguiente forma: $CH_2 = CH - CO - NH_2$ (Hermanson *et al*; 1992).

Para producir poliacrilamida, se mezcla acrilamida en diferentes proporciones, con el agente entrecruzante N,N'-metileno bis acrilamida, produciendo la siguiente estructura química: $CH_2 = CH - CO - NH - CH_2 - NH - CO - CH - CH_2$, utilizando la correspondiente polimerización, para dar lugar a una estructura del tipo que se muestra en la figura 3-10 (Hermanson *et al*; 1992).

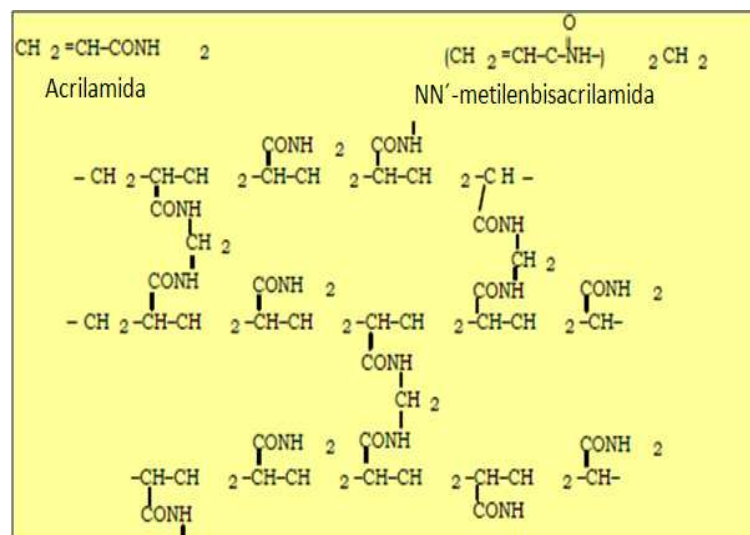


Figura 3-10. Estructura de la poliacrilamida utilizada como soporte de afinidad.

Al variar la concentración de acrilamida y la proporción de bis acrilamida, se obtienen geles de acrilamida de diversas porosidades, que proporcionan diferentes propiedades a las matrices para cromatografía de afinidad (Hermanson *et al*; 1992).

Los geles comerciales más comunes utilizados en separación de macromoléculas, son los fabricados por Bio-Rad cuyo nombre comercial es Bio-Gel P. Se pueden encontrar matrices diversos tamaños de poro, con límites de exclusión que varían entre 100-1800 μm (Bio-Gel P2) hasta 60000-400000 μm (Bio-Gel P300). Una ventaja de las matrices de poliacrilamida es el gran número de grupos potencialmente activables, lo que permite que se una covalentemente a diferentes tipos de ligando. Al aumentar el número de sitios en los que el ligando puede unirse, aumentan las probabilidades de obtener mayor cantidad del compuesto deseado (Turková, 1978).

b. Trisacryl

El trisacryl representa un nuevo soporte sintético generado sobre la base de un derivado de monómero de la acrilamida. Su fórmula química es N-acriloil-2-hidroxi-2-(2-hidroxi-1,3-propanodiol)acetamida; esta matriz se compone de 3 grupos hidroximetil enlazados a la carboxamida de la acrilamida. Su estructura macroporosa permite una buena difusión y mejora cinética de los procesos de separación para macromoléculas tales como albumina, interferón y algunos factores de coagulación entre otras (Hermanson *et al*; 1992).

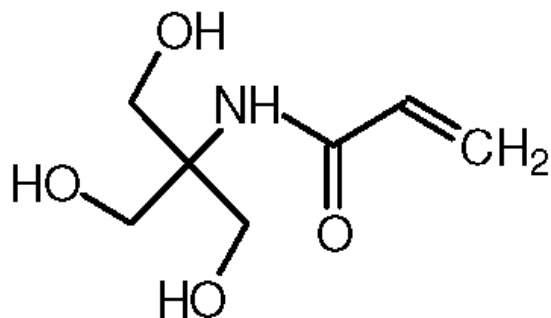


Figura 3-11. Estructura química del soporte Trisacryl.

c. Hidroxialquilmacrilato

Los geles de hidroxialquilmacrilato son preparados por polimerización de una suspensión de esteres de hidroxialquilmacrilato de ácido de macrilato y dimacrilato de alquenos, mediante la variación en la relación de las concentraciones de monómero y componentes de interés. El número de grupos reactivos, la porosidad y el área de superficie específica del gel puede ser modificado dentro de amplios límites, formando bolas de tamaño regular que presenta excelentes propiedades químicas (Turková, 1978). Sin embargo una desventaja que presenta este tipo de soportes, es que durante la unión de proteínas al ligando, puede existir una liberación de grupos carboxilo, adquiriendo la matriz un carácter polianiónico que puede afectar el proceso de separación y posterior purificación de la proteína de interés (Turková, 1978).

d. Oxiranos acrílicos

Este tipo de soportes se obtienen de la co-polimerización de la macrilamida, metilen-bis-macrilamida-glicidil-macrilato y/o alil-glicidil-eter. Se conocen bajo el nombre comercial de Eupergit C, son hidrofílicas, químicamente estables en un intervalo de pH de 0 a 12, por varias horas a temperatura ambiente en suspensión acuosa, en polvo son estables durante meses a -30°C. Dada la naturaleza química de la unión matriz-ligando, los ligandos se inmovilizan irreversiblemente a la matriz en un intervalo de pH de 1 a 10.

Aunque anteriormente se han descrito alguno los soportes más comunes utilizados en cromatografía IMAC, en la tabla 3-3 se recoge una selección de matrices comerciales disponibles en el mercado para la aplicación de esta técnica.

Tabla 3-3. Algunas matrices para aplicación IMAC disponibles en el mercado.

Nombre gel (Marca)	Grupo quelante	Matriz	Tamaño de partícula (µm)	Tamaño de poro (Å) o límite exclusión (Da)	Rata de flujo máximo (cm/H)	Estabilidad de pH	Capacidad/ml gel
Chelating Sepharose 6B	IDA	Cross-linked 6% agarose	45-165	4.5 x 10 ⁶ Da	75	4-12	22-30 µmol Zn ²⁺ >20 mg protein
Chelating Sepharose Fast Flow	IDA	Cross-linked 6% agarose	45-165	4.5 x 10 ⁶ Da	370	3-13	22-30 µmol Zn ²⁺ , >20 mg protein
Chelating Superose ^{c,d}	IDA	Highly crosslinked 12% Agarose	13	4 x 10 ⁵ Da	150	2-13	26-32 µmol Zn ²⁺ 30-38 µmol Cu ²⁺ >20 mg protein
HiTrap Chelating (Chelatin Sepharose High performance)	IDA	Highly crosslinked 6% agarose	34	4.5 x 10 ⁶ Da	190	3-13	23 µmol Cu ²⁺ , >20 mg protein
Matrex Cellufine Chelate	IDA	Cross-linked cellulose	125-210	< 4 x 10 ⁶ Da			35-45 µmol Cu ²⁺ , 22-30 µmol Zn ²⁺
PROSEP-Chelating I	IDA	High-silica glass	75-125	70-3000 Å selectable	> 3000	1-9	>50 µmol Cu ²⁺ , >40 µmol Ni ²⁺ , 25 mg lysozyme
HyperD	IDA	Composite (ceramic and acrylic)	25-60	5 X 10 ⁶ Da	600	1-14	70 µmol Cu ²⁺ , 65 mg IgG
Zinc Chelate Aflhity Adsorban Poly-His Protein Purification resine TALON	IDA	Agarose	45-165	> 5 x 10 ⁷	25	4-9	0.2-0.35 µmol protein
Fractogel EMD	IDA	Cross-linked 6% agarose Polimero	20-40	600-800 Å	360	1-13	>250 µmol Co ²⁺ , 5 mg protein 100-150 µmol Cu ²⁺ ,

Chelat 650(S)							60 mg lysozyme
Fractogel EMD Chelat 650(M) ^e	IDA	Polimero	60-90	600-800 Å	360	1-13	100-150 µmol Cu ²⁺ , 60 mg lysozyme
Sepabeads FP-CL	IDA	Vinyl polymer					
His.Bind	IDA	Cross- linked 6% agarose	45-165	4 x 10 ⁶ Da	30	3-14	>22 µmol Ni ²⁺ , 8-12 mg protein
POROS MC	IDA	Poly(styren e-divinyl- benzene)	20	Through: 6000- 8000 Å diffusive: 800-1500 Å	5000	2-13	15 mg protein
IDA- Agarose ^f	IDA	Cross- linked 4% agarose					25 mg IgG
IDA- Trisacryl	IDA	Trisacryl TSK HW 65F					>1,5 mg Cu ²⁺
Ni-NTA Agarose ^f	NTA	Cross- linked 6% agarose	45-165	>4 x 10 ⁷ Da	75	2-14	5-10 mg protein
Ni-NTA NTA supelflow	NTA	Highly crosslinked 6% agarose	60-160	4 x 10 ⁶ Da	3000	2-14	5-10 mg protein
Ni-NTA Silica	NTA	Spherical, macroporo us silica	16-24		3000	2-8.5	5-10 mg protein
IDA- Agarose	IDA	Cross- linked 4% agarose					30-40 µmol Cu ²⁺ , 28 mg BSA,
IDA- SigmaChro m ^d	IDA	Poly(hydro xy- methacryla te)					28 mg BSA,
TED- Agarose	TED	4% agarose					4-8 µmol Fe ³⁺
TSKgel Chelate- 5PW ^d	IDA	Polymer	10	1000Å	165	2-12	20 µmol Cu ²⁺ o Zn ²⁺

Fuente: Kastner, 1999

IDA: Acido iminodiacético.

NTA: Ácido nitrilotriacético.

TED: Tris(carboximetil) etilendiamina.

A continuación, de forma general se describirán algunos de los soportes en **forma de monolito** comúnmente utilizados en cromatografía IMAC.

3.2.2.1.3. Monolitos

Los monolitos son soportes que constan de una sola pieza continua de material poroso.

Los primeros intentos de fabricación de un monolito sólido poroso que se pudiera utilizar como fase estacionaria fue un polímero en forma de gel hinchado (Kubin *et al*; 1967) y de poliuretano poroso (Ross and Jefferson, 1970), los cuales no tuvieron demasiado éxito. El interés por este tipo de nuevas fases estacionarias se retomó en la década de los 80's, después de que se desarrollaran nuevos enfoques para la creación de nuevas formas de monolitos porosos basados en la fabricación de nuevos polímeros.

A mediados de la década de los 90's Belinkii *et al*; estudiaron la cromatografía de afinidad para la separación de proteínas usando monolitos porosos en forma de discos con estructura y configuraciones químicas diferentes y sugirió utilizar el método de elución por gradientes para recuperar la proteína (Belinkii *et al*; 1993).

Se demostró que estos soportes de bajo espesor, daban buenos resultados de adsorción y recuperación de proteína por medio de la cromatografía de afinidad, llegando a la conclusión de que eran adecuados para este tipo de técnica (Belinkii *et al*; 1993)

Otra categoría de monolitos que apareció en la década de 1990s, fue creada por la polimerización de monómeros en presencia de ciertos disolventes, los cuales ayudaban a obtener poros de tamaño determinado en el polímero final. Este tipo de disolventes actualmente son conocidos como porógenos, de tal forma que la estructura final del monolito es altamente dependiente de los porógenos utilizados en su formación. Así, cuando estos disolventes son eliminados, lo que queda es una serie de poros interconectados que proporcionan rutas para el flujo de la fase móvil a través del monolito (Belenkii, 2005).

Junto al uso de disolventes porógenos y polímeros orgánicos, también se han llevado a cabo la creación de monolitos para aplicaciones en HPLC, basados en materiales inorgánicos porosos, lo que ha conducido al desarrollo de columnas de sílice (Mallik and Hage, 2006).

Por lo tanto, existen varias razones que explican la creciente popularidad de los soportes monolíticos para aplicaciones de cromatografía de afinidad y HPLC. En primer lugar, los monolitos se pueden fabricar de diferentes formas y combinaciones dentro de las columnas, capilares o dispositivos de microfluidos (Juanbauer and Hahn, 2002; Jiang *et al*; 2005).

En segundo lugar, la baja caída de presión y la posibilidad de usar altas velocidades de flujo ayudan a llevar a cabo separaciones rápidas con tiempos cortos de análisis. En tercer lugar, presentan rápida transferencia de materia, proporcionando separaciones eficientes (Josic, 2001; Mallik *et al*; 2004).

Por último, existen diversos sistemas de reacción que pueden ser utilizados para la modificación de monolitos, esta es una valiosa característica, ya que esto permite que se adapten a diferentes aplicaciones, siendo compatibles con una amplia gama de ligandos de afinidad (Schulte and Dingenen, 2001; Juanbauer and Hahn, 2004).

Una variedad de materiales han sido utilizados para la fabricación de monolitos; siendo los más representativos: metacrilato de glicidilo (GMA), copolímeros de EDMA (Dimetacrilato de etileno), agarosa, sílice y criogel, los cuales se describen a continuación (Mallik and Hage, 2006).

a. Monolitos GMA/EDMA

Los copolímeros de GMA (glicidil metacrilato)/EDMA (dimetacrilato etileno) han sido los más utilizados en cromatografía de afinidad. Incluyendo diversos tipos de soporte. Un esquema general de la preparación de un monolito GMA/EDMA se muestra en la figura 3-12 (Mallik and Hage, 2006).

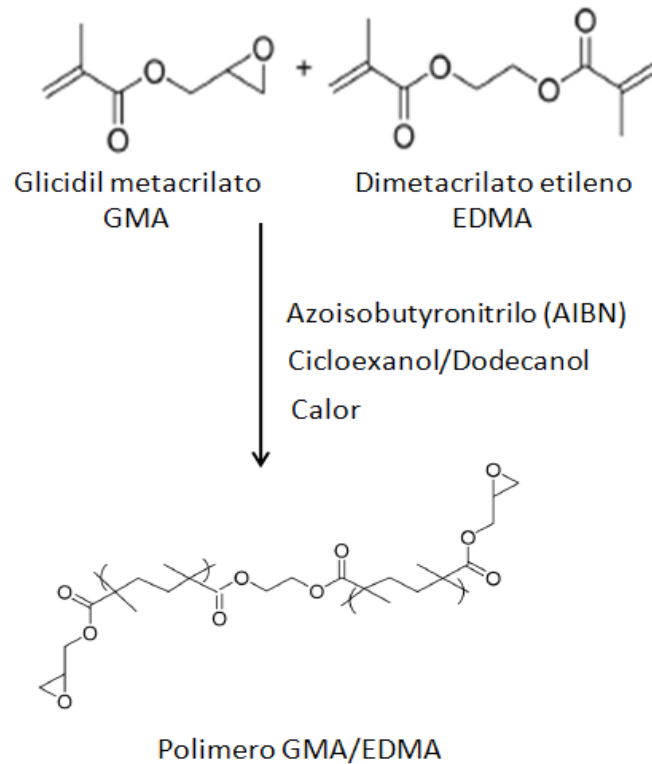


Figura 3-12. Formación de un polímero de GMA con EDMA. Esta figura solamente muestra una porción de la estructura polimérica final.

El monolito resultante contiene grupos epoxi que pueden ser utilizados directamente para la inmovilización del ligando, ó también se pueden convertir en una forma de diol en condiciones ácidas. Esta última forma provee una superficie hidrofílica, similar a la utilizada en los soportes más tradicionales como por ejemplo agarosa o enlaces de diol-sílice (Mallik *et al*; 2004).

Una desventaja de los monolitos de GMA/EDMA es que tienden a tener áreas superficiales bajas cuando se compara con soportes tales como el sílice, lo que limita la cantidad total de ligando que puede ser inmovilizado sobre este material, siendo esto un problema en operaciones de separación de proteínas (Mallik and Hage 2006).

b. Monolitos de agarosa

Los monolitos de agarosa también han sido utilizados en aplicaciones en cromatografía de afinidad. Esto es normal, debido a que la agarosa en forma de

partículas ha sido una fase estacionaria bastante popular para llevar cabo separaciones de afinidad durante varias décadas.

Este tipo de monolitos presenta un tamaño de poro 20-200 μm de diámetro. Estos monolitos se obtienen preparando una emulsión, formada por el calentamiento de una suspensión de agarosa en agua entre 95-100°C a la cual, usualmente se le añade una mezcla de ciclohexano y Tween 80 con agitación. La emulsión se vierte luego en columnas de vidrio que se ajustan con un tapón en la parte inferior y se mantiene en baño María a 60°C, la temperatura de este baño se reduce hasta 20°C, lo cual hace que el gel de agarosa adopte la forma deseada. La agarosa puede tomar una gran variedad de formas como varillas, discos, membranas o fibras entre otros (Mallik and Hage 2006).

Los materiales resultantes, presentan muchas de las mismas ventajas que los soportes de agarosa tradicionales. Esto incluye su capacidad para ser utilizado por diferentes tipos de ligando, su baja unión específica y su estabilidad en un amplio intervalo de pH (Mallik and Hage 2006).

c. Monolitos de Sílice

Otro tipo de monolitos son los basados en sílice. Una de las razones para que estos monolitos generen interés, es debida a la gran popularidad que tienen las partículas de sílice en sistemas HPLC. Existen monolitos de sílice disponibles comercialmente como bare-silica (ej. Chromolith-Si de Merck) y una forma de aminopropil (ej. Chromolith-NH₂) (Xie *et al*; 2005). Aunque los monolitos de bare-silica no tienen grupos reactivos que se puedan utilizar directamente para la inmovilización covalente de ligandos, estos se pueden convertir en una forma diol, utilizando métodos de activación convencionales para partículas de sílice.

Las ventajas de los monolitos de sílice incluyen su buena resistencia mecánica así como una elevada área superficial, siendo esto conveniente en métodos de separaciones por afinidad que requieran soportes con altas densidades de ligando (Tanaka *et al*; 2002).

La principal desventaja de los monolitos de sílice es que son difíciles de preparar directamente en laboratorio, debido a su considerable contracción después de su formación (Tanaka *et al*; 2002; Núñez *et al*; 2008). Además tienen las mismas limitaciones que las partículas de sílice tradicional en términos de de intervalo de pH (típicamente entre 2 y 8) (Schiel *et al*; 2006).

d. Criogeles

El criogel es un material extremadamente poroso, que se prepara por la polimerización por debajo de -10°C de monómeros disueltos en fase acuosa.

Una mezcla de acrilamida, alil glicidil éter y N,N' metileno-bis (acrilamida) se utiliza típicamente para hacer estos monolitos. Dado que este material debe fabricarse a baja temperatura, normalmente se forman cristales de hielo, de tal forma que cuando se inicia el proceso de polimerización, estos cristales forman una plantilla porosa de la cual se forma el polímero. Después de la polimerización, estos cristales de hielo se descongelan y el agua resultante es separada formando el monolito. Este proceso deja una serie de macroporos que típicamente tienen un diámetro de entre $10\text{-}100\ \mu\text{m}$. La reacción global que se típicamente se utiliza durante la formación de criogeles se muestra en la figura 3-13 (Mallik and Hage, 2006).

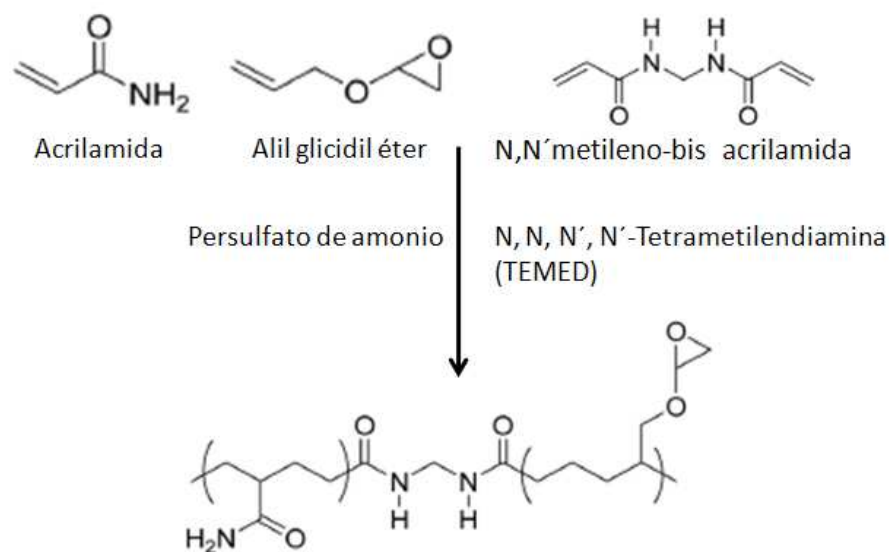


Figura 3-13. Reacción típica usada para obtener monolitos de criogel basados en la copolimerización de la acrilamida, alil glicidil éter y N,N' metileno-bis (acrilamida).

Una ventaja de los criogeles es que tienen grandes poros interconectados los cuales son de carácter hidrofílico (Syverud *et al*; 2011); esto hace que sustancias de diversos tamaños puedan acceder a los poros, incluyendo proteínas, material formado por microbios o células de animales, etc. (Arvidsson *et al*; 2003).

3.2.2.2. Activación de la matriz

De forma general, los pasos para preparar un adsorbente en cromatografía IMAC que permita llevar a cabo la separación y purificación de proteínas, se muestra en la figura 3-1, mostrada previamente.

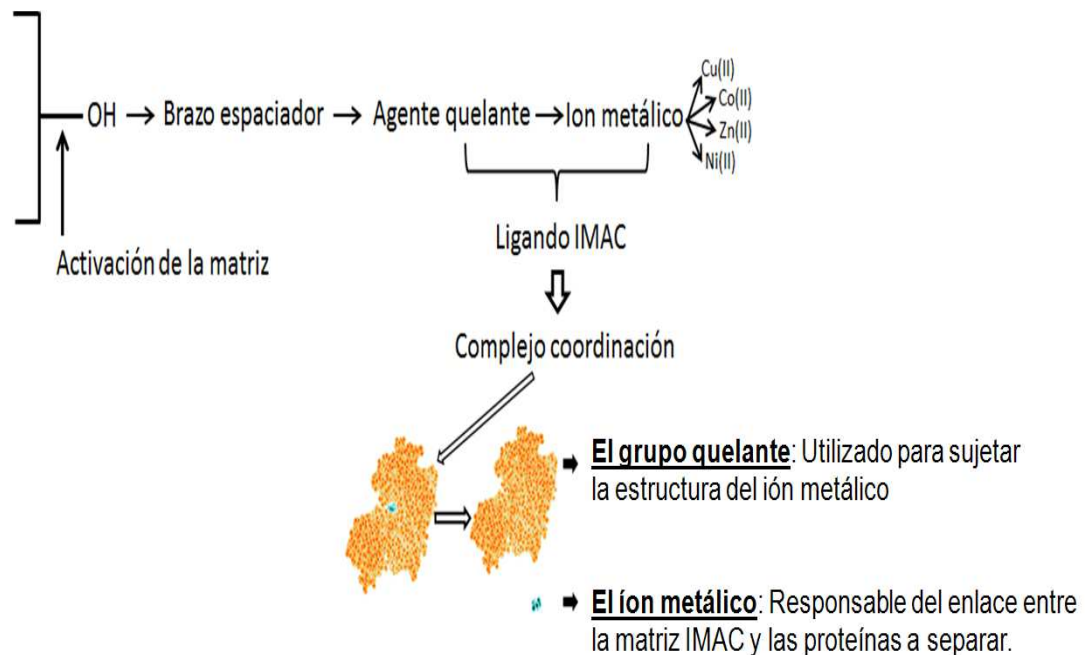


Figura 3-1. Esquema general de la preparación de un adsorbente en cromatografía IMAC.

De acuerdo a la figura 3-1, para llevar a cabo la unión del ligando a la matriz es necesario realizar previamente un tratamiento químico en su superficie (activación) para generar grupos químicos donde se puedan unir al brazo espaciador y/o ligandos.

Los compuestos usados comúnmente para activar las matrices son:

Grupo a:

- **Bromuro de cianógeno:** Este compuesto libera una amplia variedad de compuestos, entre los cuales los más importantes son posiblemente los ésteres de cianato.
- **Glutaraldehído:** Este compuesto presenta grupos aldehído libres que forman bases de Schiff (compuesto formado a partir de la reacción de condensación entre una amina aromática y un aldehído o cetona) con los grupos amino, para posteriormente ser reducidos con borohidruro de sodio o cianoborohidruro, formando enlaces N-álquilo estables.
- **Carbonilimidazol:** Este compuesto libera un N-carboximidazol éster.
- **Cloruro de tosilo:** Este compuesto libera un éster de tosilo que puede ser desplazado por una amina, dejando a ésta directamente enlazada con el anillo de polisacárido de la matriz y que es más estable que otros tipos de enlace.

Los compuestos usados comúnmente para activar la matriz cuando la misma posee grupos reactivos como grupos OH, son los que se describen a continuación:

Grupo b:

- **Diglicidil ésteres ó bis-oxiranos:** Estos compuestos presentan cadenas con un anillo epoxi en cada extremo, uno de los cuales reacciona con la matriz y el otro con el ligando.
- **Divinilsulfona:** Estos compuestos reaccionan con polímeros hidroxilados para dar lugar a grupos reactivos divinil sulfona.

El ligando, generalmente se une a la matriz mediante un brazo espaciador (moléculas que alejan al ligando de la matriz permitiendo que la proteína encuentre al ligando con mayor facilidad), para asegurar que el ligando es completamente accesible para la proteína a separar.

Por lo tanto el brazo espaciador se puede introducir en el sistema de diversas formas, se puede unir directamente con el ligando para posteriormente hacerlo reaccionar con la matriz (previamente activada), o se puede unir previamente a la matriz para posteriormente hacerlo reaccionar con el ligando. Así, compuestos como los diglicidil ésteres y la divinilsulfonas, proporcionan por si mismos un brazo espaciador debido a su longitud a la vez que activan la matriz

3.2.2.3. Brazo Espaciador

Como se mencionó en el apartado anterior, los brazos espaciadores son moléculas (generalmente cadenas lineales orgánicas) que alejan al ligando de la matriz permitiendo que la proteína encuentre al ligando con mayor facilidad y evitando problemas estéricos de anclaje. Son particularmente importantes en los siguientes casos: i) cuando el ligando es pequeño, ii) cuando la afinidad del ligando por la proteína es baja y iii) en casos en los que el ligando involucra proteínas de pesos moleculares muy altos. (Hermanson *et al*; 1992).

La zona enlazante de una proteína a menudo se encuentra en el interior de la molécula y la utilización de una matriz en la que el ligando sea de pequeño tamaño y se encuentre directamente unido a ella, puede reducir la capacidad de enlace debido a interferencias estéricas, es decir, el ligando no puede acceder al sitio activo de la proteína (Magdelin and Moser, 2012).

Adicionalmente los brazos espaciadores favorecen la unión de proteínas de gran tamaño con el ligando, cuando este último está situado demasiado cerca de la matriz. En la figura 3-14 se puede observar el enlace de una macromolécula con un ligando a) sin brazo espaciador y b) con brazo espaciador.

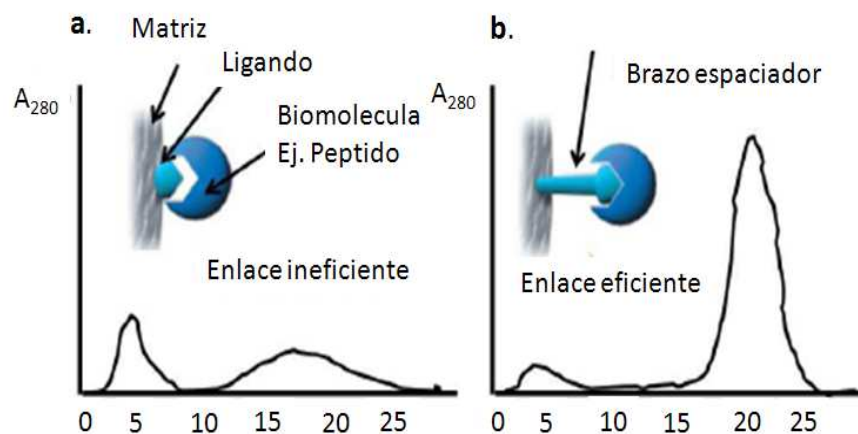


Figura 3-14. Utilización de los brazos espaciadores: a) ligando unido directamente a la matriz y b) ligando unido a la matriz a través de un brazo espaciador (Magdelin and Moser, 2012).

En las circunstancias descritas anteriormente, se precisa de la utilización de un brazo espaciador entre la matriz y el ligando para facilitar una unión efectiva. Estos

deben diseñarse de tal manera que maximicen el enlace, por lo tanto deben ser hidrofílicos y no se deben enlazar con proteínas de un modo no específico, tanto por su hidrofobicidad como por su carga (Hermanson *et al*; 1992).

La longitud del brazo espaciador es crítica, puesto que si es muy corto resulta poco efectivo y puede enlazarse con otras sustancias de la mezcla de proteínas a separar y si es muy largo, las proteínas se podrían unir no específicamente reduciendo la selectividad.

Estudios han demostrado que un brazo espaciador de cadena hidrocarbonada de 6 a 7 grupos de $-CH_2$ presenta una óptima interacción de la macromolécula con el ligando inmovilizado, debido a que se interpone mediante enlaces covalentes entre el ligando específico y la matriz cromatográfica (Hermanson *et al*; 1992).

En la tabla 3-4 se recogen algunos de los principales brazos espaciadores disponibles comercialmente.

Tabla 3-4. Brazos espaciadores disponibles comercialmente.

Nombre brazo espaciador	Estructura química
Diaminodipropilamina	
3,3'-Iminobispropilamina	
Acido 6-aminocaproico	
1,6-Diaminohexano	
Ácido succínico (usado como anhídrido)	
1,3-Diamino-2-propanol	
Etilendiamina (EDA)	
Hexametildiamina	$H_2NCH_2(CH_2)_4CH_2NH_2$
Bisoxirano	
Hidroxiaquil	

Fuente: Hermanson, 1992; Phillips, 1992

3.2.2.3.1. Grupo Quelante

Los grupos quelantes son compuestos con diferentes grupos de coordinación utilizados para anclar la estructura del ion metálico, siendo este último el encargado de llevar a cabo el enlace entre la matriz IMAC y las proteínas a separar. Por tanto, el complejo es el resultado de la interacción de un átomo central, un ion metálico con orbitales de valencia vacíos que pueden actuar como ácido de Lewis y una o varias bases de Lewis con pares de electrones libres (agente quelante o complejante). Esta interacción conduce a la formación de un enlace de coordinación, por esta razón, estos complejos reciben el nombre de compuestos de coordinación (Hermanson *et al*; 1992).

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, el átomo central del complejo de coordinación debe disponer de orbitales vacíos capaces de aceptar pares de electrones, siendo los metales de transición los que presentan una mayor tendencia a formar estos complejos (Hermanson *et al*; 1992).

Para utilizar esta técnica, los tres grupos quelantes más estudiados para diferentes aplicaciones son el ácido iminodiacético (IDA), tris (carboximetil) etilendiamina (TED), y tris (carboximetil) etilendiamina (NTA). IDA, TED y NTA. Son compuestos tridentados, cuatridentados y pentadentados respectivamente, siendo el orden relativo de la fuerza de unión a las proteínas IDA>NTA>TED, debido a la estructura del complejo y a la situación de los eventos de coordinación (figura 3-15) (Hochuli *et al*; 1988).

El compuesto quelante utilizado para llevar a cabo prácticamente todos los desarrollos relacionados con la cromatografía IMAC es el ácido iminodiacético (IDA) (Porath, 1992). Aunque compuestos quelantes tetradentados como NTA y TALON (nombre comercial para el ácido aspártico carboximetilado: CM-Asp), tiene una mayor afinidad para los iones metálicos que compuesto quelante tridentado IDA, estos presentan una baja unión con las proteínas debido a la pérdida de un centro de coordinación. Esto es aún más evidente en el compuesto quelante pentadentado TED, donde debido a una configuración octaédrica en torno a un ión metálico divalente, sólo deja un centro de coordinación para la unión a las proteínas. (Chaga, 2001; Garberc-Porekar and Menart, 2001).

Las estructuras de los complejos de iones metálicos con los quelantes más usados en la técnica IMAC se muestran en la figura 3-15:

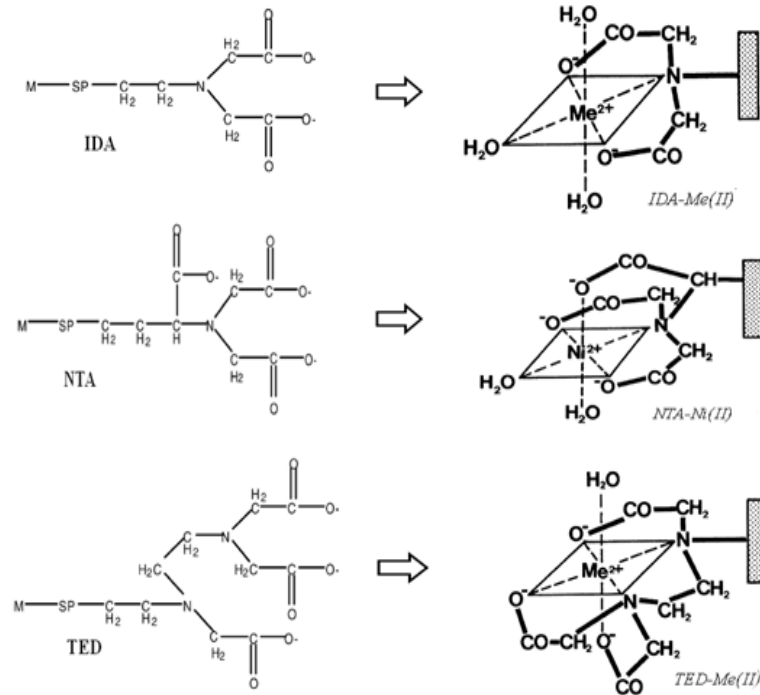


Figura 3-15. Estructura representativa de los complejos quelantes con iones metálicos utilizados en cromatografía IMAC. IDA-Me^{2+} , NTA-Me^{2+} , TED-Me^{2+} , para los iones metálicos Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} o Co^{2+} (Adaptado Hochuli *et al*; 1987).

Otro tipo de agente quelante son las aminas alifáticas, que por carboximetilación pueden aumentar su capacidad para formar complejos estables con iones metálicos, siendo muy útiles para la separación eficiente de iones metálicos en soluciones acuosas. Las aminas alifáticas lineales, pueden ser introducidas en el polímero por cualquiera de los átomos de nitrógeno que poseen, un ejemplo de este tipo de ligando es el Tris (2-aminoetil) amina (TREN) (Porath, 1992).

De acuerdo con lo descrito, el número de enlaces entre el ion metálico y el grupo quelante es determinante en la afinidad existente entre el complejo ion metálico-grupo quelante y las proteínas o péptidos a separar (Porath, 1988), así que el grupo quelante debe presentar una gran afinidad hacia el ion metálico seleccionado para llevar a cabo el proceso de separación.

3.2.2.3.2. Iones Metálicos

Como se mencionó en el apartado 3.2, la cromatografía IMAC se basa fundamentalmente en la interacción entre determinados residuos de aminoácidos en la superficie de las proteínas tales como, cisteína, histidina triptófano etc. y cationes de iones metálicos que actuaran como aceptores de electrones los cuales se encuentran quelados, con el fin de dar lugar al ligando que se unirá de forma reversible a dichos residuos de aminoácidos, para llevar a cabo los procesos de separación y purificación de proteínas.

En principio cualquier ion metálico podría ser utilizado en cromatografía IMAC, si es capaz de aceptar electrones. Los metales más utilizados a menudo son Cu^{2+} y Ni^{2+} , seguido de Zn^{2+} y Co^{2+} . Sin embargo, otros tipos de iones metálicos también han sido estudiados, como por ejemplo el Cd^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , los elementos del grupo III A, y las tierras raras, así como Mn^{2+} , y Hg^{2+} para la separación de proteínas (Belew *et al*; 1987; Margolis *et al*; 1989; Kastner and Neubert, 1991; Roos, 1991; Chaga *et al*; 1996).

El sistema de clasificación de iones metálicos usado comúnmente en la técnica IMAC, es el propuesto por Pearson (1973), el cual postula que los iones metálicos pueden clasificarse en tres categorías (fuertes, intermedios, suaves), en función de su reactividad preferencial hacia determinados átomos. Los iones metálicos pertenecientes al grupo de “fuertes” son: Fe^{3+} , Ca^{2+} , y Al^{3+} , que muestran preferencia por el oxígeno. Los iones metálicos “suaves” son: Hg^{2+} , Ag^{2+} , etc., los cuales muestran preferencia hacia el azufre y finalmente los iones metálicos intermedios como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , coordinan preferentemente con nitrógeno, oxígeno y azufre, siendo estos últimos los más destacados para llevar a cabo procesos de separación y purificación de proteínas. Con este tipo de iones, los agentes quelantes comúnmente usados para llevar a cabo el complejo son IDA, TED y NTA, los cuales poseen átomos de oxígeno y nitrógeno que actúan como donantes de electrones (Porath and Olin, 1983).

En la figura 3-16 se recogen las estructuras químicas de los principales aminoácidos involucrados en el proceso de enlace con los iones metálicos mediante la técnica IMAC en orden de mayor a menor afinidad.

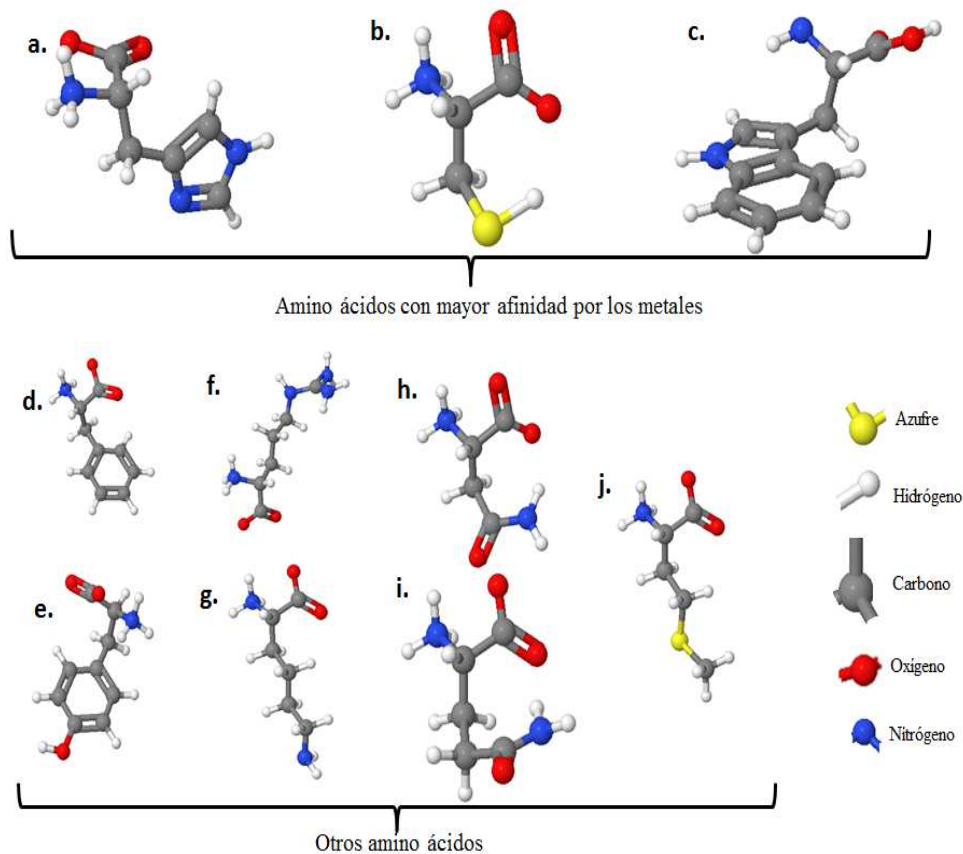


Figura 3-16. Estructura tridimensional de la a) histidina, b) cisteína, c) triptófano, d) fenilalanina, e) tirosina, f) arginina, g) lisina, h) asparragina, i) glutamina y j) metionina.

Existen diversos estudios que indican que la histidina es el aminoácido que mayor afinidad presenta por los iones metálicos (Hemdan *et al*; 1989; Yip *et al*; 1989 y Arnold, 1991), además, se acepta de un modo generalizado que tanto la histidina como los residuos de cisteína son fundamentales en el enlace de las proteínas mediante la técnica IMAC debido a la fuerza de las interacciones con los iones metálicos (Porath *et al*; 1975). Sawadogo and Van Dyke (1995) demostraron que el comportamiento de las proteínas en el proceso de retención se ve gobernado por la presencia de residuos de histidina en la superficie de las proteínas.

Esta afinidad se puede atribuir en gran proporción a sus grupos funcionales, en especial al grupo imidazol y tiol en el caso de la histidina, también hay otros grupos funcionales como los carboxilos o las α -amino, que también juegan un

papel importante en el proceso del enlace de las proteínas con el ion metálico (Hansen and Lideberg, 1995 y Hansen *et al*; 1996).

Existen otros aminoácidos que también tienen una cierta afinidad hacia los iones metálicos, entre los que está el triptófano, la fenilalanina y la tirosina, los cuales actúan directamente a través de sus radicales aromáticos. También la arginina, lisina, asparagina, glutamina y metionina actúan indirectamente de modo individual o mediante efectos combinados con la histidina (Zachariou and Hearn, 1995).

Cuando la composición del amino ácido en una proteína o péptido es conocida, las reglas generales recogidas en la tabla 3-5 y 3-6 se pueden utilizar para predecir qué tipo de iones metálicos son los mejores para llevar a cabo la separación mediante cromatografía IMAC (Ueda *et al*; 2003).

Tabla 3-5. Predicción de la afinidad metal-proteína basada en la accesibilidad de los residuos de histidina y triptófano en la superficie de las proteínas.

Residuos de Histidina o Triptófano en la superficie de la molécula	Iones metálicos que proporcionan retención
Sin His/Trp	---
1 His	Cu ²⁺
>1 His	Cu ²⁺ , Ni ²⁺
Cluster de His	Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ .
Varios Trp, ningún His	Cu ²⁺

Fuente: Kastner, 1999

Tabla 3-6. Contribución individual de los aminoácidos involucrados en la retención de proteínas.

Grupo funcional	Fuerza de retención
Histidina	++++
Cisteína	++++
Triptófano	+
Ácido aspártico, ácido glutámico	-
Lisina, arginina	+
Tirosina, fenilalanina	+
N-terminal	++

Fuente: Kastner, 1999

De acuerdo con lo anterior y debido al limitado número de residuos de cisteína en la superficie de las proteínas, los residuos de histidina se convierten en el objetivo principal de los iones metálicos (Porath, 1992); varios estudios utilizando IDA como agente quelante y diferentes tipos de iones como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , y Co^{2+} , mostraron que estos últimos son muy selectivos a los residuos de histidina que se encuentran en la superficie de las proteínas, pero podrían también vincularse a residuos de triptófano. Aunque la afinidad del triptófano con estos iones inmovilizados es más débil que con la histidina, la presencia de este tipo de aminoácido podría influir en la afinidad global de la proteína con dichos iones, debido a la formación de enlaces coordinados con el ión metálico (Winzerling, 1992).

También los aminoácidos carboxílicos, pueden actuar como objetivos para los iones de tipo “fuerte” así como tirosinas fosforiladas o cadenas laterales de serina, treonina o tirosina. Esto pone de manifiesto que la selectividad de los iones metálicos “fuertes” e “intermedios” es muy diferente.

En el pH óptimo para llevar a cabo los enlaces proteína-ligando (pH ácido, o pH neutro respectivamente) los iones metálicos “fuertes” e “intermedios” interactúan con distintas cadenas laterales en la superficie de las proteínas, además a pH altos, los iones pueden convertirse en hidróxido, precipitando. Así, la distinción entre ambos tipos ha sido aprovechada para lograr separaciones e incluso purificaciones de proteínas en mezclas biológicas complejas en un solo paso (Sulkowski, 1985).

3.3. Técnica de la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC)

En la técnica IMAC, las variables básicas a considerar son por lo tanto los grupos quelantes, los iones metálicos, pH, sistema tampón usado, fuerza iónica sal y el modo de elución.

Los soportes más comúnmente usados contienen ácido iminodiacético (IDA), (carboximetil) etilendiamina (TED), ácido nitrilotriacético (NTA) y como se mencionó anteriormente, varían en la retención de iones metálicos y la unión de las proteínas (Wizerling, 1992).

En muchos casos, un soporte disponible comercialmente que contenga IDA será suficiente, por lo que el siguiente paso es probar diferentes tipos de iones metálicos.

El principio de esta técnica es el siguiente: Inmovilización de los iones metálicos a través de un agente quelante en un soporte sólido y posteriormente la unión de la proteína a través de determinados aminoácidos contenidos en su superficie de las mismas.

Dado que los vínculos entre los grupos quelantes y los iones metálicos son generalmente mucho más fuertes que los lazos entre los iones metálicos y las proteínas, por lo general es posible eluir proteínas sin ningún tipo de acompañamiento de los iones metálicos (Wizerling, 1992).

La técnica IMAC también puede ser utilizada simplemente para la inmovilización reversible de enzimas. Este tipo de inmovilizaciones no da lugar a la formación de enlaces covalentes, así que la recuperación de la enzima y la actividad enzimática son generalmente muy altas. Al mismo tiempo (si la enzima tiene que ser recuperada o no) la matriz también puede ser conservada y ser utilizada para otros estudios (Wizerling, 1992).

Un diagrama esquemático general de las etapas de preparación de cromatografía IMAC se muestra en la figura 3-17:

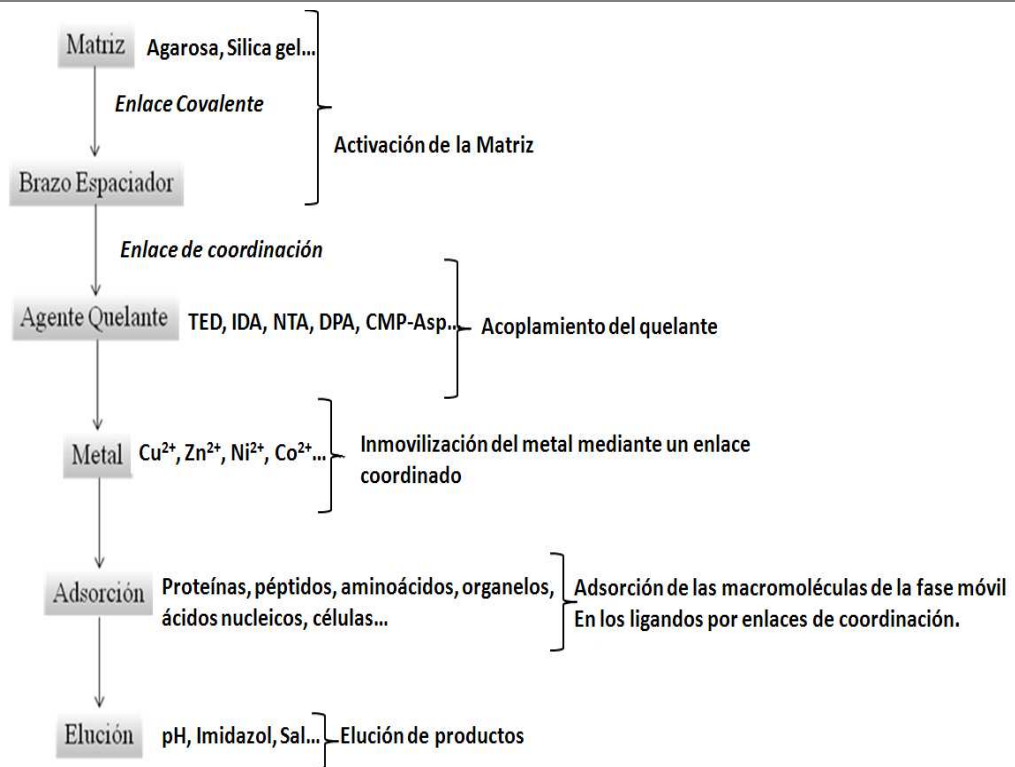


Figura 3-17. Diagrama esquemático de las etapas de la cromatografía IMAC basado en el esquema propuesto por Wizerling (1992).

3.3.1. Solución tampón y preparación de la muestra

El objetivo principal de la solución tampón de partida es proporcionar condiciones óptimas para la adsorción de la proteína. En ocasiones, esto puede ser una cuestión de ensayo y error. En cromatografía IMAC el factor más importante que afecta a la adsorción de las proteínas es el pH; valores de pH típicos de enlace están entre 6 – 8,5. La afinidad de las proteínas en medios alcalinos puede llegar a ser más eficaz pero menos específica, Porath *et al*; 1975; Kato *et al*; 1986; y Kastner and Neubert, 1991 reportaron que las proteínas eran fuertemente retenidas a un pH más bajo, recuperándolas casi en su totalidad. Sin embargo de acuerdo con Hansen and Lindeberg, (1992) valores de pH por debajo de 7,7 hacen que la unión de la proteína sea más débil debido al aumento de los grupos amino como consecuencia de la protonación y a pH superiores a 8,5 puede volver a disminuir la afinidad debido a la transferencia de iones metálicos del complejo quelante a una sola proteína.

La adsorción de una proteína en cromatografía IMAC se realiza a un pH, en el que los grupos donadores de electrones de la superficie de la proteína se encuentren parcialmente desprotonados.

Por ello, es habitual inducir la adsorción de las proteínas en el soporte trabajando a un pH ligeramente alcalino y con una fuerza iónica elevada; así, generalmente los tampones usados en IMAC son de fosfato de sodio con una concentración que oscila entre 10 -100 mM a pH neutro o ligeramente alcalino; otras soluciones tampón como Tris-HCl también son usadas con mas restricción debido a que su funcionalidad no es muy conveniente con determinados iones metálicos como el Fe^{3+} (Borrebaeck *et al*; 1981).

El comportamiento del tampón en los procesos de adsorción y elución es complicado, pues afecta a distintas propiedades, como el comportamiento nucleofílico de los componentes del tampón, así como las propiedades de aceptor-dador de electrones de los solutos y la estabilidad del metal Wizerling (1992).

3.3.2. Proceso de elución

Teniendo en cuenta el ligando de afinidad y al tipo de biomolécula a separar, se selecciona el método de elución de tal forma que lo que se busca es recuperar el mayor porcentaje de biomolécula posible. Así, en la figura 3-18 se representan los métodos de elución más comúnmente usados en cromatografía de afinidad, los cuales se describen a continuación:

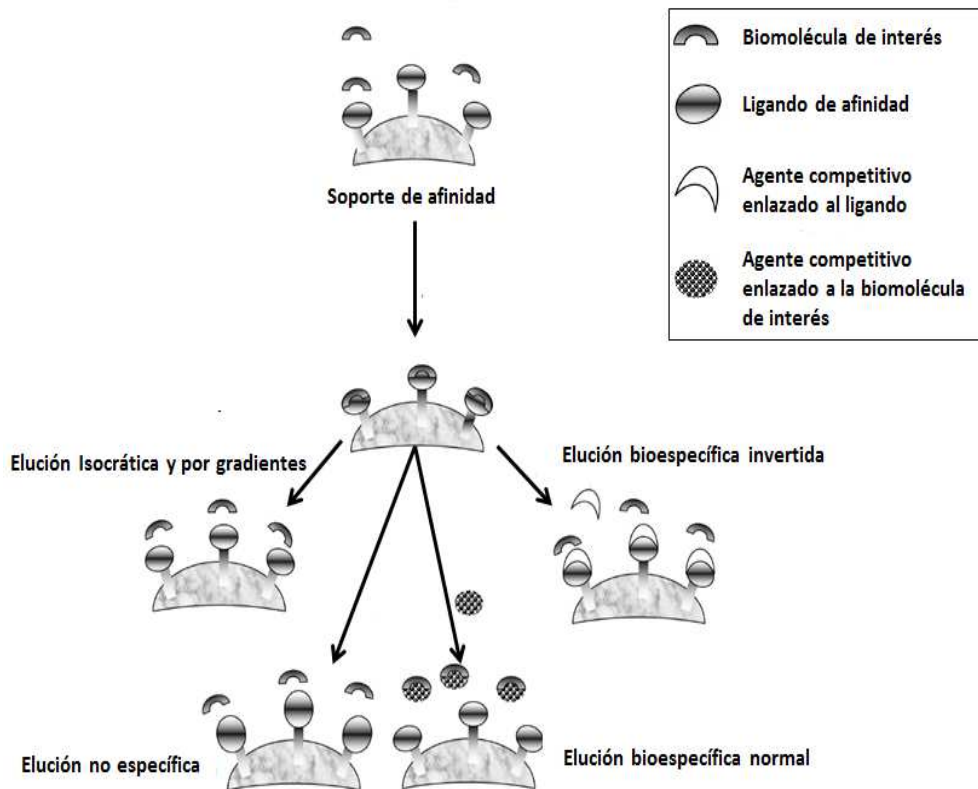


Figura 3-18. Algunos métodos de elución en cromatografía de afinidad, adaptado de Mallik and Hage, 2006.

- **Elución isocrática:** Se logra mediante el uso constante de un medio solvente durante el desarrollo del proceso cromatográfico (es decir, las mismas condiciones para ambos, adsorción y elución de los componentes retardados). En este caso el pH o la concentración de sal en la solución tampón debe permitir la interacción incompleta entre la proteína y los iones metálicos inmovilizados.

La elución isocrática es especialmente eficaz en el aislamiento de proteínas de bajo peso molecular ($MW < 30000$), péptidos y aminoácidos. Las ventajas de esta técnica incluyen una mejora en la resolución y rápida regeneración de la columna. Con proteínas de alto peso molecular, los picos se extienden, lo que limita la aplicación de este método a este tipo de proteínas (Winzerling *et al*; 1992).

- **Elución por gradientes:** Es probablemente el método más usado para la elución de proteínas. Los gradientes aplicados en la técnica IMAC dependerá de la naturaleza de los iones metálicos inmovilizados. Se puede usar para esta técnica gradientes de concentración iónica, pH,

concentración de ligando competitivo, o una combinación de ellos (Winzerling *et al*; 1992).

Existen algunos modelos que describen la elución isocrática de componentes de bajo peso molecular, pero sistemas que requieren separar proteínas de alto peso molecular donde la retención de los componentes depende en gran parte de la composición de la fase móvil, es imperativo utilizar elución por gradiente.

En este caso la composición de la fase móvil en cualquier punto de la columna varía con el tiempo, con lo cual se logra que el componente más retardado se mueva más rápido a través de la columna, reduciéndose considerablemente los tiempos de elución (Winzerling *et al*; 1992).

Dado que la técnica de elución por gradiente es compleja y se aplica a moléculas de alto peso molecular, los enfoques para el desarrollo de modelos que la describan, están basados en simplificaciones de las teorías usadas para elución isocrática, suponiendo un factor de retención constante, dado por la concentración del modulador de la fase móvil (eluyente) cuando sale de la columna (Winzerling *et al*; 1992).

- **Elución Bioespecífica normal:** Este método se basa en la interacción de un inhibidor con la biomolécula a separar, de tal forma que la biomolécula que está retenida por el ligando de afinidad de bajo peso molecular es eluida con un inhibidor que a su vez es también de bajo peso molecular y que tiene preferencia por el sitio activo de la biomolécula, de tal forma que la biomolécula es liberada junto con el inhibidor, dejando libre el ligando.
- **Elución Bioespecífica Invertida:** La elución de biomoléculas adsorbidas puede ser bioespecífica invertida cuando un contraligando presente en la fase móvil compite con el ligando inmovilizado en la matriz (Winzerling, 1992).

Para ello se utilizan compuestos que contengan moléculas donantes de electrones como por ejemplo imidazol, cloruro de amonio, histamina, etc. (Porath *et al*; 1983). Por otra parte, ciertos grupos donantes de electrones también pueden causar la elución por competencia como por ejemplo el fosfato si no se usa en la etapa de adsorción, ya que se puede usar como eluyente y purificador de diversas proteínas (Andersson and Porath, 1986;

Muszynska *et al*; 1986). De tal forma que el agente competitivo ocupa el sitio (ligando) de la biomolécula liberada.

- **Elución no específica:** Este tipo de elución se lleva a cabo generando un cambio en la fase móvil o en las condiciones de la columna de afinidad, por ejemplo mediante el uso de un tampón en el que el pH la fuerza iónica o la polaridad sean alterados drásticamente, con respecto al tampón utilizado para llevar a cabo el proceso de adsorción (Mallik and Hage, 2006).

Existen otros métodos de elución que involucran la utilización de agentes quelantes como como el EDTA o EGTA, los cuales son menos usados debido a que conllevan la eliminación del ligando si este es un ion metálico; usualmente este método es utilizado como último recurso en caso de que sea muy difícil recuperar la biomolécula por otros métodos de elución (Kastner, 1999).

3.3.3. Regeneración

Por lo general las medidas rutinarias de regeneración requieren de un lavado con suficiente solución tampón de partida para restaurar el equilibrio.

Para eliminar la proteína residual que todavía está ligada a la matriz de forma no específica, las columnas a menudo pueden ser limpiadas por lavados alternativos con un 40% de ácido acético o 0,1M HCl, 1M NaCl o KCl y 1M de NaOH; el NaOH no es posible usarlo si la matriz es de sílice. También se pueden solubilizar las proteínas con detergentes no iónicos como el Tritón X-100 en agua.

Además, los lípidos y los materiales muy hidrofóbicos pueden ser desorbidos por lavado con etanol al 70% o 30% de isopropanol.

A veces, un tratamiento periódico con unas cuantas inyecciones de acetonitrilo/ácido fórmico (1:1) o DMSO ayudan al proceso de desorción. Lípidos muy difíciles de limpiar pueden requerir compuestos orgánicos no polares como el cloroformo, éter dietílico o hexano (Kastner, 1999).

3.3.4. Fase Móvil: pH, tampones y fuerza Iónica

La selectividad de la cromatografía IMAC hacia una proteína también depende de la fase móvil. Un aumento de la fuerza iónica de los tampones puede llevar a eliminar totalmente las interacciones secundarias electrostáticas no deseadas, aumentando además, en número de enlaces proteína-ligando (Arnold, 1991).

El efecto de los electrolitos sobre la retención de proteínas esta relacionado con la afinidad del ion metálico hacia las moléculas de agua de solvatación; cuando estas fuerzas entre los iones metálicos y las moléculas de agua de solvatación se hacen más débiles, aumenta la fuerza iónica de los tampones, favoreciendo los procesos de adsorción de las proteínas (Kastner, 1999).

La adsorción de una proteína en cromatografía IMAC se lleva a cabo a un determinado pH, en el cual los grupos dadores de electrones de la superficie de la proteína se encuentran parcialmente desprotonados. Es una práctica habitual en cromatografía IMAC la de inducir la adsorción de las proteínas en el soporte trabajando a un pH ligeramente alcalino y con una fuerza iónica elevada. Los tampones de fosfato y acetato son habitualmente los más usados (Kastner, 1999).

El comportamiento del tampón en los procesos de adsorción y elución es complicado, ya que afecta a un gran número de propiedades, incluyendo entre ellas el comportamiento nucleofílico de los componentes del tampón, las propiedades de aceptor-dador de electrones de soluto y la estabilidad del metal. Un intervalo de pH entre 6-8 favorece la retención de los residuos de histidina y cisteína, a pHs más alcalinos se favorece la coordinación con grupos funcionales amino, por lo que se reduce la selectividad (Ueda *et al*; 2003).

3.4. Preparación de la matriz IMAC

Como se mencionó anteriormente en el diseño de una matriz de afinidad, hay tres pasos fundamentales que son:

- Elección de la matriz
- Elección del ligando y del brazo espaciador
- Elección del método de enlace

Así, en el trabajo presentado en esta tesis se empleara:

- ✓ **Matriz:** Se utilizará un monolito cerámico como soporte sólido recubierto de agarosa tipo D5 (descrita en el apartado 32.2.1.1.b), un gel microporoso que garantizará que los procesos de adsorción se lleven a cabo en la superficie del adsorbente.
- ✓ **Ligando y brazo espaciador:** Se utilizara ácido iminodiacético (IDA) como grupo quelante y Cu^{2+} como ion metálico, ya que la conjunción de estos dos compuestos proporciona un complejo tridentado con tres centros de coordinación libres para el enlace con la proteína. Adicionalmente, el IDA es el agente quelante que es utilizado comúnmente para complejar el ion cuando este es Cu^{2+} .

Se utilizara 1,4 butanodiol-diglicidil-éter como brazo espaciador, ya que los compuestos como los diglicidil ésteres (bis-oxiranos) que son cadenas con un anillo epoxi en cada extremo, uno de los cuales reacciona con la matriz y el otro con el ligando, de tal forma que por sí mismos proporcionan un brazo espaciador, por lo tanto no es preciso activar la matriz previamente, ya que este compuesto sirve para activarla e introducir el brazo espaciador simultáneamente, obteniéndose un soporte epoxi-agarosa (Hermanson *et al*; 1992).

Asimismo, las biomoléculas seleccionadas para llevar a cabo los procesos de separación basados en la técnica IMAC propuesta en este trabajo, son la proteína suero de albumina bovina (BSA) utilizada para establecer las condiciones del sistema y la enzima catalasa (CAT) por ser una metalo-enzima que presenta gran afinidad por los iones metálicos. Por tanto, a continuación se describirán las propiedades características de estas dos biomoléculas respectivamente.

3.5. Descripción de las propiedades características de la proteína BSA y la enzima CAT

A continuación se describirán las principales propiedades de las dos biomoléculas estudiadas en el presente trabajo.

La proteína suero de albumina bovino, perteneciente al grupo de las albuminas y sintetizada en el hígado, es una proteína que ha sido estudiada ampliamente y de la cual se conocen prácticamente todas sus propiedades y la enzima Catalasa, muy importante a nivel celular ya que es la encargada de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (un residuo tóxico del metabolismo celular de muchos organismos vivos) en agua y oxígeno.

3.5.1. Suero de Albumina bovino (BSA)

La albumina es una de las proteínas que ha sido más estudiada, y siendo la proteína más abundante en el plasma sanguíneo con una concentración típica de 5g/100ml. La albumina de suero bovino es una proteína extraída del suero bovino y es ampliamente utilizada en muchos procedimientos bioquímicos.

3.5.1.1. Estructura primaria, secundaria y terciaria

La molécula de BSA (figura 3-19) se compone de tres dominios homólogos (I, II, III), que se dividen en 9 bucles (L1-L9) por 17 puentes de disulfuro. Cada dominio a su vez es el producto de dos subdominios (IA, IB, etc). La estructura primaria de la albumina es inusual entre las proteínas extracelulares en la posición de un solo grupo sulfhidrilo (Cys-34), siendo esta estructura predominantemente alfa-helicoidal (67%). De esta forma, cada uno de los dominios se puede dividir en 10 segmentos helicoidales, 1-6 para el subdominio A y 7-10 para el subdominio B (King and Spencer, 1970).

Los dominios I y II, y II y III están conectados a través de extensiones helicoidales de la siguiente forma: 10 (I) - 1 (II) y 10 (II) - 1 (III), generando la creación de las dos hélices más largas de la albumina. La albumina bovina contiene cuatro residuos de metionina, en la posición 87, 184, 445 y 547, todos los residuos menos el Met-184 se producen en posiciones similares que la albumina humana y solo esta metionina se encuentra fuera de los lazos de disulfuro (King and Spencer, 1970).

Varios investigadores han descrito secuencias parciales de la cadena de albumina bovina: el C-terminal Ala con hidracina o reducción con borohidruro de litio (Schmid, 1959), péptidos del 1-24 (Shearer *et al*; 1967); fragmentos de 3 bromuro de cianógeno 1-87, 548-583 y 88-184 (King and Spencer, 1972), la orden de los residuos de aminoácidos 469-470 (Weijers, 1977), residuos 401-404 incluyendo una inserción en el residuo 401, y la asignación del grupo amida en los residuos 389, 390, 392 y 393 (Reed *et al*; 1980) y la inserción de Tyr-155 (Ueno *et al*; 1985).

En la tabla 3-7 se recogen la composición de los aminoácidos que conforman el suero albumino dependiendo de su procedencia.

Tabla 3-7. Composición de aminoácidos del suero albumino.

Aminoácido/parámetros	Humano ^a	Bovino ^b	Rata ^c	Proteína Avg ^d
Acido aspártico	36	40	32	32
Asparagina	17	14	20	24
Treonina	28	34	33	36
Serina	24	28	24	43
Ácido glutámico	62	59	57	32
Glutamina	20	20	25	23
Prolina	24	28	30	32
Glicina	12	16	17	52
Alanina	62	46	61	49
Valina	41	36	35	38
Cisteína/2	35	35	35	38
Metionina	6	4	6	9
Isoleucina	8	14	13	23
Leucina	61	61	56	44
Tirosina	18	20	21	19
Fenilalanina	31	27	26	22
Lisina	59	59	53	42
Histidina	16	17	15	15
Triptófano	1	2	1	6
Arginina	24	23	24	25
Total	585	583	584	585
Calc. Mol. Masa (Da)	66438,41	66411,17	65850,51	
Calc. % N	16,5707	16,4648	16,6923	
Avg. Residuo masa (Da)	113,5704	113,9128	112,7924	
Calc. Carga neta (pH 7)	215	217	212	

Fuente: Peters, 1995

- De acuerdo con secuencia de aminoácidos de la HSA descrita por Minghetti *et al*; 1986.
- De acuerdo con secuencia de aminoácidos de la BSA descrita por Holowacuk, 1991.
- Sargent *et al*; 1981.
- Doolittle, 1987.

3.5.1.2. Propiedades físico-químicas

La albumina bovina no presenta una carga uniforme en la estructura primaria, a pH neutro se calcula una carga neta de -10, -8, y 0 para los dominios I, II y III respectivamente. La distribución de la carga en la superficie se muestra en la figura 3-19.

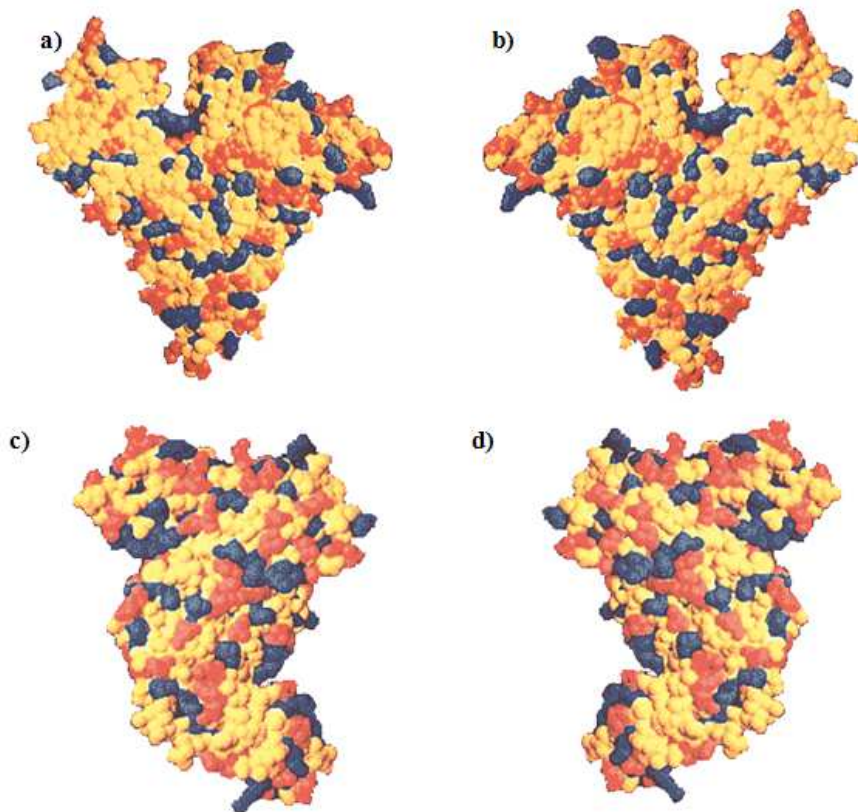


Figura 3-19. Modelo de la molécula de albumina bovina con residuos básicos de color azul, residuos ácidos de color rojo y los neutros en color amarillo; a) vista frontal, b) vista anterior, c) lado izquierdo, y d) lado derecho. Propuesto por Carter and Ho (1994).

3.5.1.3. Viscosidad

La viscosidad de una disolución de proteína depende de las características intrínsecas tales como masa molecular, tamaño, volumen, forma, superficie de carga y facilidad de deformación. Kolthoff *et al*; encontró que la viscosidad de una

solución de proteínas aumentaba cuando se generaba división de enlaces de disulfuro (Kolthoff *et al*; 1958). Wetzel *et al*; observaron un aumento lineal de la viscosidad aumentando la concentración hasta 65mg/ml y de manera exponencial en concentraciones más altas (Wetzel *et al*; 1980).

3.5.1.4. Efecto del pH

La albumina bovina presenta conformación de isomerización reversible con cambios en el pH. En la figura 3-20 se representa la relación de las formas isoméricas del suero de albumina bovino propuesto por Foster en 1977.

a)

	$E < \text{----} > F < \text{----} > N < \text{----} > B < \text{----} > A$
pH transición:	2,7 4,3 8 10
Nombre :	Expanded Fast Normal Basic Aged

b)

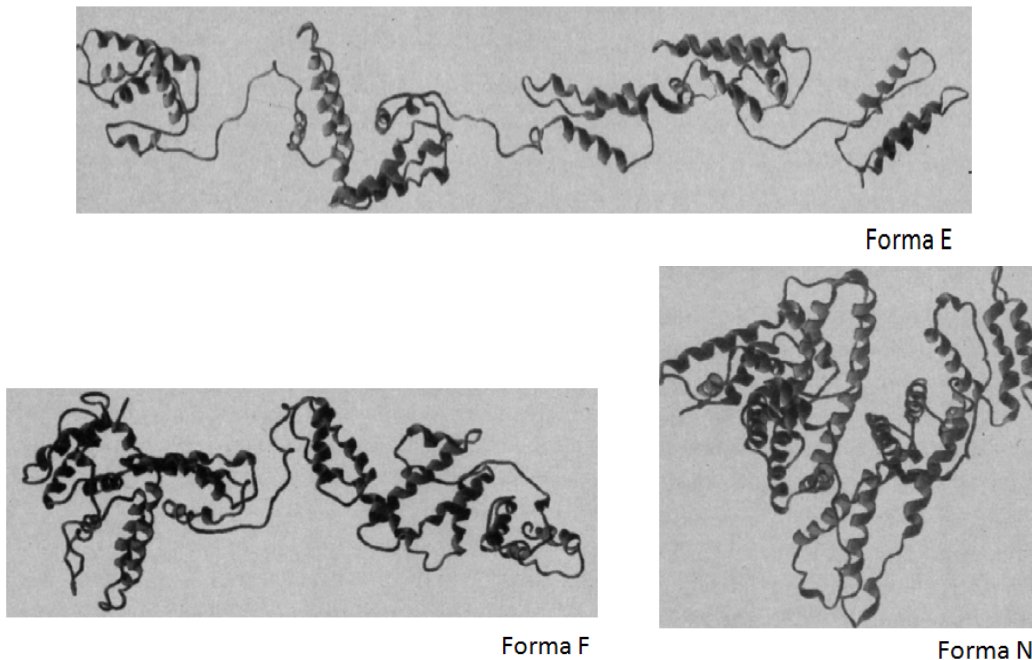


Figura 3-20. a) Relación de las formas isoméricas del suero de albumina bovino, reproducidas por Peters, 1995, b) Configuraciones propuestas de las formas isoméricas de la albumina humana E, F, y N, reproducidas por Carter and Ho, 1994.

La transición NF implica el desarrollo del dominio II (Geison and Baven, 1977 y Khan, 1986). La forma F se caracteriza por un aumento en la viscosidad, la solubilidad es mucho más baja y se genera una pérdida significativa en el contenido helicoidal (Foster, 1977). A valores de pH inferiores a 4, la albumina sufre una expansión con pérdida de hélices en el intra-dominio 10 del dominio en el que está conectado a la hélice 1 del dominio II, y que la hélice 10 del dominio II conecta a la hélice 1 del dominio III. Esto se conoce como la forma E que tiene una viscosidad intrínseca mayor y un aumento en la relación axial hidrodinámica de la hélice 4 a la 9. A pH 9 la proteína genera cambios conformacionales conocidos como forma básica B. Si la solución de albumina se mantiene a pH 9 y a una fuerza iónica baja a 3°C por aproximadamente 3 a 4 días, se produce otro tipo de isomerización conocido como la forma A.

La tabla 3-8 recoge las principales propiedades fisicoquímica de la albumina humana y bovina.

Tabla 3-8. Propiedades fisicoquímicas de las albuminas humana y bovina.

Propiedad	Humano	Bovino	Referencia
Masa molecular (Da)	66468	66411	
Constante de sedimentación $s_{20,w} \times 10^{13}$			
Monómero	4,6	4,5	(Oncley <i>et al</i> ; 1946)
Dímero	6,7	6,7	(Squire <i>et al</i> ; 1968)
Constante de difusión $D_{20,w} \times 10^7$, dcm ² /s	6,1	5,9	(Wagner and Scheraga, 1956)
Constante de difusión traslacional D_T ($\times 10^{-13}$ m ² s ⁻¹)	628	---	
Volumen específico parcial V_{20}	0,7336	0,733	(Hunter, 1966)
Viscosidad intrínseca, η	0,042	0,041	(Hunter, 1966) (McMillan, 1974)
Dimensiones, A			
Fisicoquímicas	38 x 150	41,6 x	(Hughes, 1954)
Estructura cristalina	30 x 80 x 80	140,9	(Wright and Thompson, 1975) (He and Carter, 1992)
Radio axial	3,9:1	3,4:1	(Oncley <i>et al</i> ; 1946) (Wright and Thompson, 1975)
Radio hidrodinámico de rotación A	26,4	---	(Clarwood, 1961)
Radio hidrodinámico de translación A	33,1	---	
Volumen molecular, A ³ , anhídrido			
Calculado a partir de V_{20}	80,000	81,000	(Anderegg <i>et al</i> ; 1955)
Calculado a partir de la estructura cristalina	88,249	---	(Riddiford and Jennings, 1966) (Carter and Ho,

Área molecular A^2 , calculado a partir de la estructura cristalina	28,202	---	1994 (Carter and Ho, 1994)
Coefficiente de fricción, f/f^0	1,28 ⁴	1,30	(Oncley <i>et al</i> ; 1946) (Creeth, 1952)
Punto isoiónico	5,16 ⁸	5,15	(Hughes, 1954) (Foster, 1977)
Punto isoeléctrico	4,7	4,7	
Movilidad electroforética, pH 8,6	-5,9		(Alberty, 1953)
Carga neta por molécula, pH 7,4	-19		(Tanford, 1950)
Incremento índice de refracción (578 nm), $\times 10^{-3}$	1,89	1,90	(Armstrong, 1947) (Wright and Thompson, 1975)
Absorbancia óptica, 279 nm, $1g\ l^{-1}$	0,531	0,667	(Janatova, 1968)
Media de rotación de los residuos $[m]_{233}$	8590	8443	(Wallevik, 1973) (Moore and Foster, 1968)
Media elipticidad de los residuos (theta)			
θ 290 nm	17	21,1	(Sjödín and Ljungsted, 1973)
θ 222 nm	16	20,1	(Noel and Hunter, 1972)
% estimación α hélice	67	68	(Carter y Ho, 1994) (Reed <i>et al</i> ; 1975)
% Forma β	10	17	

Fuente: Peters, 1995

3.5.1.5. Afinidad con ligandos

Una de las características más importantes de la albumina es su capacidad para unirse de forma reversible con una gran variedad de ligandos.

La proteína BSA es la principal portadora de los ácidos grasos que de otro modo serían insolubles en el plasma. También genera procesos de inactivación de diversos metabolitos tóxicos lipofílicos como la bilirrubina.

La albumina tiene una alta afinidad por los ácidos grasos, hematina, bilirrubina, así como para los pequeños compuestos aromáticos cargados negativamente. Forma enlaces con diversos iones metálicos como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{2+} , y Au^{2+} entre otros (Peters, 1995).

3.5.2. Catalasa (CAT)

La catalasa (figura 3-21) (peróxido de hidrogeno: peróxido de hidrogeno oxidoreductasa EC 1.11.1.6) es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra distribuida ampliamente en el cuerpo humano, su actividad varía dependiendo del tejido, siendo más alta en el hígado y en los riñones y más baja en el tejido conectivo y los epitelios y prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los perioxomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra el citosol (Gaetani *et al*; 1996).

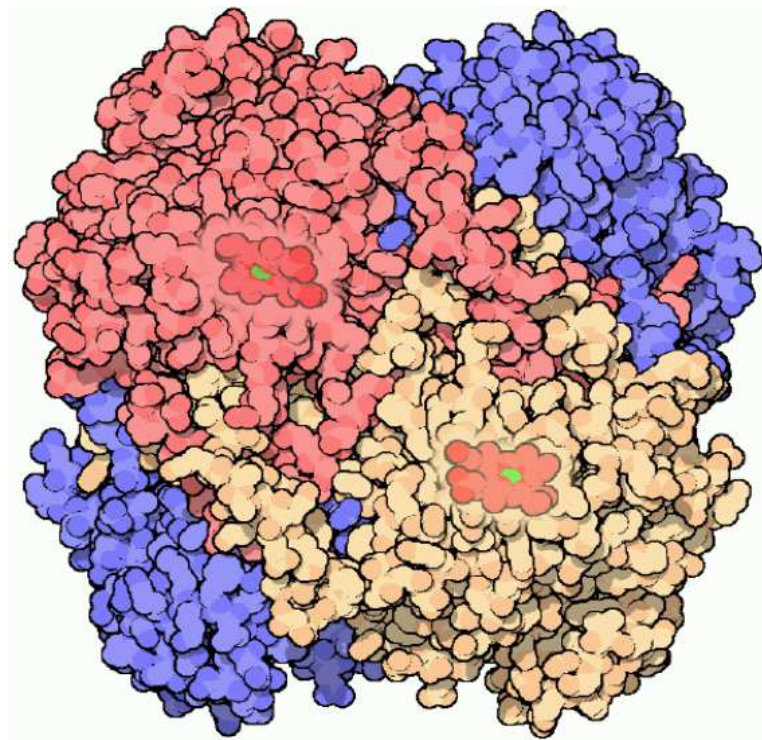


Figura 3-21. Estructura de las cuatro sub-unidades de la enzima CAT (Goodsell & RCSB Protein Data Bank, 2013).

Es una hemoproteína enzimáticamente activa, la cual contiene un protohemo como grupo prostético parecido a de la hemoglobina. Pertenece al grupo de metaloporfirinoenzimas, las cuales presentan grupos prostéticos del tipo de las cobalaminas (transmetilasa del hígado, metilmalonil CoA mutasa), o del tipo de las protoheminas (citocromo c oxidasa, citocromo c, peroxidasa, catalasa).

Esta enzima previene la acumulación de peróxidos tóxicos que pueden formarse durante la respiración celular. La reacción general de esta enzima se muestra en la ecuación 3-1:



Donde el donador de electrones es la segunda molécula de peróxido de hidrogeno (Switala and Loewen, 2002).

3.5.2.1. Características estructurales

Es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el intervalo de 210-280 kD. Consta de 4 subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes y cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX; adicionalmente el contenido protohémico y el del hierro representan un 1,1% y 0,09% respecto del peso molecular total de la enzima (Hadju *et al*; 1977).

En la figura 3-22 se muestra un esquema de la estructura del grupo hemo de la catalasa:

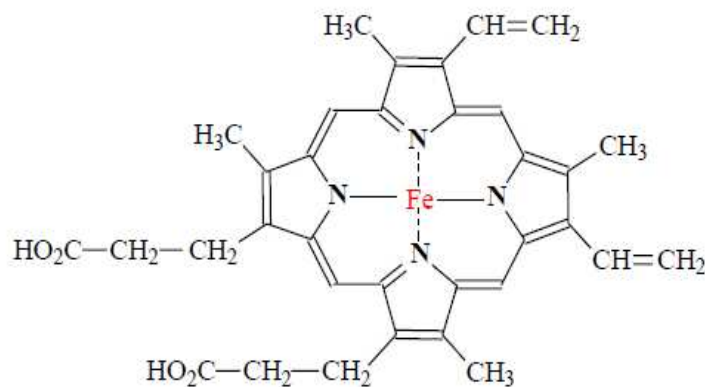


Figura 3-22. Estructura del grupo hemo de la catalasa.

En algunas especies, la catalasa contiene moléculas de nicotinamín adenín dinucleótido fosfatado en su forma reducida (NADPH) ligadas estrechamente a la enzima, demostrándose que la catalasa humana y de bovino está ligada a 4 moléculas de NADPH, una molécula en cada subunidad no existiendo interacción directa entre el grupo hemo y la molécula de NADPH (Fita and Rossman, 1985).

La molécula de NADPH unida a la enzima no está involucrada en su actividad catalítica o peroxidativa. Esta molécula puede intervenir en la prevención y reversión parcial de la inactivación de la catalasa por su propio sustrato tóxico y estabiliza a la enzima por tener un efecto alostérico sobre su conformación. Además, la catalasa constituye un reservorio de NADPH, lo cual juega un importante papel durante el estrés oxidativo (Chelikani *et al*; 2004).

3.5.2.2. Función enzimática

La catalasa como parte del sistema antioxidante está involucrada en la destrucción del H_2O_2 generado durante el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero poca afinidad con el sustrato. Presenta dos funciones: una catalítica y otra peroxidativa, ambas funciones se pueden representar por la ecuación 3-1 descrita anteriormente.

La reacción general entraña la reducción del sustrato tomando los átomos de hidrógeno aportados por el donador y los productos finales serían el sustrato reducido y el donador oxidado. En la función catalítica, el donador es otra molécula de H_2O_2 , siendo esta función realizada únicamente por la enzima en su forma tetramérica de acuerdo a la ecuación 3-1.

En la reacción peroxidativa la enzima puede utilizar como donadores de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehído (Havir and McHale, 1989), la cual se puede llevar a cabo con monómeros, dímeros y tetrameros (Srivastava and Ansari, 1980).

3.5.2.3. Estructura de la catalasa

A continuación se describirá de forma general las cuatro estructuras de las cuales está formada la enzima catalasa.

3.5.2.3.1. Estructura primaria

La estructura primaria de la catalasa se compone de una cadena polipeptídica de 526 aminoácidos, como se muestra en la figura 3-23.

10	20	30	40	50	60
MADNRDPASD	QMKHWKEQRA	AQKPDVLTIG	GGNPVGDKLN	SLTVGPRGPL	LVQDVVFTDE
70	80	90	100	110	120
MAHFDREERIP	ERVVHAKGAG	AFGYFEVTHD	ITRYSKAKVF	EHIGKRTPIA	VRFSTVAGES
130	140	150	160	170	180
GSADTVRDPK	GFAVKFYTED	GNWDLVGNNI	PIFFIRDALI	FPSFIHSQKR	NPQTHLKDPD
190	200	210	220	230	240
MVWDFWVSLRP	ESLHQVSLFL	SDRGIPDGRH	HMNGYGSHTF	KLVNANGEAV	YCKFHYKTDQ
250	260	270	280	290	300
GIKNLSVEDA	ARLAHEDPDY	GLRDLFNAI	TGNYPSTWLY	IQVMTFSEAE	IFPFNPFDLI
310	320	330	340	350	360
KVWPHGDYPL	IPVGKLVLRN	NPVNYFAEVE	QLAFDPSNMP	PGIEPSPDKM	LQGRLFAYPD
370	380	390	400	410	420
THRRLGPNY	LQIPVNCPYR	ARVANYQRDG	PMCMDNQGG	APNYYPNSFS	APEHQPSALE
430	440	450	460	470	480
HRTHFSGDVQ	RFNSANDDNV	TQVRTFYLVK	LNEEQRKRLC	ENIAGHLKDA	QLFIQKKAVK
490	500	510	520		
NFSDVHPEYG	SRIQALLDKY	NEEKPKNAVH	TYVQHSHLS	AREKANL	

Figura 3-23. Secuencia de la cadena polipeptídica de aminoácidos de la catalasa proveniente de hígado de bovino.

3.5.2.3.2. Estructura secundaria

El 60% de la estructura de la catalasa se compone de estructuras regulares, correspondientes a las hélices (alfa) y 12% a la estructura (beta), la estructura irregular incluye el predominio de las cadenas y los buques distendidos que desempeñan un papel importante en el mantenimiento del tetrámetro.

3.5.2.3.3. Estructura terciaria

Cada monómero posee cuatro dominios:

1^{er} Dominio:

1. Constituido por 75 residuos amino-terminal.
2. La formación de un brazo con dos elices (alfa).

2^{do} Dominio:

1. Es el más grande, contiene el grupo hemo y los residuos 76-230.
2. Se puede clasificar como un dominio alfa+beta.

3^{er} Dominio:

1. Compuesto por los residuos 321-436 y designado como envolvente.
2. Carente de estructura secundaria apreciable con solo dos elices alfa.

4^{to} Dominio:

1. Porción carboxi-terminal constituida por los residuos 457-506.
2. Involucrado en un dominio con 4 hélices, 3 de ellas alfa (dominio que contiene el grupo hemo) formado en la superficie de la enzima.

3.5.2.3.4. Estructura cuaternaria

La catalasa funcional es un tetrámero de cuatro subunidades idénticas, cada monómero contiene un grupo hemo y un grupo NADP. Mientras los grupos NADPs se encuentran en la superficie, los grupos hemo se encuentran en el centro de cada monómero aproximadamente 20\AA debajo de la superficie molecular y aproximadamente a 26\AA del centro del tetrámero.

En la figura 3-24 a) se puede observar la figura estereo de la catalasa proveniente de eritrocitos humanos y b) La estructura de la enzima catalasa cerca del grupo hemo.

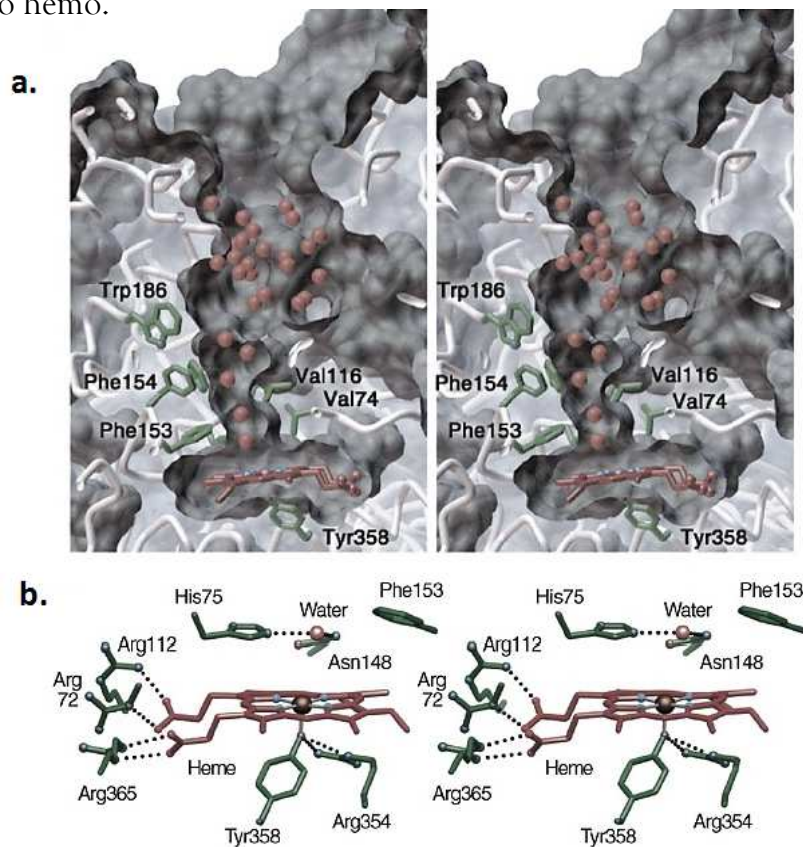


Figura 3-24. a) Visión estereo de la catalasa proveniente de eritrocitos humanos, b) Vista de la estructura de catalasa cerca del grupo hemo.

La caracterización de los enlaces provenientes de las reacciones bioquímicas, es clave para el entendimiento de los procesos que se llevan a cabo a nivel molecular, por lo tanto la investigación bioquímica y biomédica requiere de técnicas para el análisis preciso de estas reacciones. Es por esta razón que en la presente

investigación se utilizará la técnica de nano-calorimetría isotérmica (ITC) para caracterizar los enlaces moleculares realizados entre el adsorbente IMAC y las dos proteínas descritas previamente.

Por tanto, a continuación se describirán los fundamentos en los cuales está basada la técnica de nano-calorimetría isotérmica (ITC), así como la técnica propiamente.

3.6. Termodinámica de enlace

La termodinámica química es la rama de la termodinámica que se encarga del estudio, análisis y evaluación de las energías de los procesos en una reacción química y dentro de esta se encuentra la termodinámica de enlace, que estudia el comportamiento de los enlaces moleculares.

Cada uno de los parámetros termodinámicos es explicado a través de la energía libre de Gibbs (ΔG), que describe la tendencia de asociación de un sistema molecular y da información sobre la viabilidad de las reacciones; reflejando dos efectos opuestos fundamentales a nivel molecular: la tendencia a un valor de energía negativo (formación enlaces, ΔH negativo), compensado por la tendencia igualmente natural a que el movimiento perturbe las estructuras (rotura de enlace, ΔS positivo); de esta forma, usualmente un valor negativo de ΔG (denominado exergónico) corresponde a una reacción favorable donde no hay trabajo requerido para que la reacción se produzca, por otro lado ΔG positivo (denominado endergónico) significara que el trabajo se debe hacer desde el entorno para que la reacción se lleve cabo correspondiendo a una reacción química no favorable (Wiseman *et al*; 1989).

Así, la energía libre de Gibbs depende tanto de la entalpía (ΔH), entropía (ΔS) y la constante de equilibrio como se muestra en las ecuaciones 3-2 y 3-3 respectivamente, donde ΔG es la energía libre de Gibbs, ΔH es la entalpía de enlace, T es la temperatura absoluta (temperatura constante) y ΔS la entropía de enlace y K_b la constante de equilibrio de enlace (Wiseman, 1989).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3-2)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_p \quad (3-3)$$

La entalpía (ΔH), es una medida de la cantidad total de calor implicado en una reacción a presión y temperatura constante. Para cualquier sistema, la entalpía está definida explícitamente por la ecuación matemática 3-4 que se muestra a continuación.

$$H = U + PV \quad (3-4)$$

Donde U es la energía total del sistema, P es la presión absoluta y V el volumen total. Así, el producto de PV tiene unidades de energía, al igual que U , por lo tanto H también presenta unidades de energía.

Puesto que U , P , y V son funciones de estado, H tal y como está definida en la ecuación 3-4, también debería ser una función de estado. Por lo tanto, la forma diferencial de la ecuación 3-4 puede escribirse de acuerdo a la ecuación 3-5 que se muestra a continuación:

$$dH = dU + d(PV) \quad (3-5)$$

Así, esta ecuación es aplicada cada vez que ocurre un cambio diferencial en el sistema. Por tanto la integración de la ecuación 3-5, proporciona la ecuación 3-6 que se muestra a continuación:

$$\Delta H = \Delta U + \Delta(PV) \quad (3-6)$$

La ecuación 3-6 es una expresión que puede aplicarse cada vez que ocurre un cambio finito en el sistema de enlace.

De tal forma que si una reacción es exotérmica, mostrara un valor negativo de entalpía y un valor positivo indica que la reacción es endotérmica, así la entalpía contribuirá a la espontaneidad de la reacción si se trata de una reacción exotérmica, dependiendo del tipo de interacciones que se produzcan en el enlace, tales como puentes de hidrogeno, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas e interacciones π/π entre otras (Smith and Van Ness, 1975).

Otra función de estado es la entropía (ΔS), la cual representa una medida de la dispersión de la energía para una determinada temperatura y es una función del desorden de las moléculas, de tal forma que el aumento del desorden de un sistema se ve reflejado al incrementar (ΔS).

De tal forma que para un proceso reversible cuasiestático entre dos estados de equilibrio, si dQ' es el calor adsorbido o liberado por el sistema durante algún

intervalo, el cambio de la entropía, dS , entre dos estados de equilibrio esta dado por el calor transferido, dQ' dividido entre la temperatura absoluta del sistema en ese intervalo, de acuerdo a la ecuación 3-7 que se muestra a continuación:

$$dS = \frac{dQ'}{T} \quad (3-7)$$

De tal forma que cuando el sistema absorbe calor, dQ' es positivo y la entropía aumenta y cuando el sistema libera calor, dQ' es negativo y la entropía disminuye, de tal forma que la ecuación 3-7 no define la entropía sino el cambio de la misma.

Asimismo, la constante de equilibrio de enlace (K_b) es un índice de la fuerza de la unión del ligando a la proteína (Jelesarov and Bosshard, 1999).

Aunque existen muchas técnicas para estudiar las reacciones de enlace, todas con excepción de la calorimetría isotérmica ITC (Isothermal titration calorimetry) requieren el cálculo de la entalpía a partir de medidas experimentales, lo cual introduce un grado de inexactitud en el valor de ΔH .

En este sentido la nano-calorimetría es única ya que a temperatura y presión constantes el equipo ITC mide directamente la entalpía de reacción de enlace. Entonces, un valor mayor de K_b correspondería a un ΔG más negativo que indicaría un enlace más dissociado. Por otra parte variaciones en sentido opuesto, hace que variaciones grandes en la entalpía y la entropía conduzca a pequeños cambios en el valor de la energía libre de Gibbs (Jelesarov and Bosshard, 1999; Velazquez-Campoy and Freire, 2005).

3.6.1. Técnica de nano-calorimetría isotérmica (Isothermal Titration Calorimetry – ITC)

Como se ha mencionado, las contribuciones entálpicas y entrópicas a la energía libre de Gibbs, puede proporcionar información sobre el mecanismo de unión. De esta forma, los grandes oscilaciones en ΔH y ΔS pueden indicar cambios en la forma de unión que no son evidentes a partir de los pequeños cambios resultantes de ΔG .

Conociendo si una variación de la entalpía o la entropía es favorable, se puede conocer información sobre la naturaleza de las interacciones no covalentes asociadas al sistema, así mismo, la dependencia de la temperatura en la entalpía de enlace también ofrece valiosa información sobre estas interacciones (Wiseman, 1989).

El cambio en la entalpía que acompaña a un proceso químico se puede determinar ya sea directa o indirectamente, los métodos indirectos involucran inevitablemente el cálculo de las magnitudes relacionados de alguna forma con la entalpía a partir de relaciones teóricas, como el análisis de van 't Hoff, donde los cambios de la entalpía tras la unión son calculados a partir de la dependencia de la temperatura con la constante de equilibrio de enlace.

Se ha demostrado que las mediciones directas e indirectas de la entalpía muestran resultados aceptables, sin embargo se deben hacer medida en un amplio intervalo de temperatura, lo que a menudo no es factible experimentalmente y conducen a errores en los parámetros resultantes del análisis de Van 't Hoff (Wiseman, 1989).

La nano-calorimetría isotérmica (ITC), es una técnica experimental calorimétrica que ofrece una medida directa de la entalpía y la constante de enlace a partir de la estequiometría, mediante la medición del calor liberado o absorbido a presión y temperatura constante durante una reacción diseñada específicamente para un proceso determinado.

Esta técnica es el único método que permite la caracterización directa del calor involucrado en cualquier proceso (Todd and Gómez, 2001) y es ideal para adquirir una descripción termodinámica completa de un proceso de enlace (Jelesorov and Bosshard, 1999).

La ventaja del ITC con respecto a los métodos indirectos, tales como las técnicas cinéticas es que es eficaz y no es invasivo (Harding and Chowdhry, 2001), (Holdgate, 2001), (Leavitt and Freire, 2001) y (Ladbury, 2004) de tal forma que si se diseña cuidadosamente los experimentos, estos a su vez proporcionarían la constante de enlace y la entalpía de enlace, pudiéndose calcular fácilmente la energía libre de Gibbs y la entropía.

Por medio del ITC se puede medir directamente la energía asociada a los procesos que ocurren a presión y temperatura constante.

Cuando se estudian los procesos de unión, el objetivo es generar una isoterma de enlace, es decir, una curva que represente el grado de saturación de la proteína en términos de la concentración de ligando.

Para esto, las alícuotas de ligando se introducen mediante una jeringa con agitación contralada por medio de un ordenador a la solución de proteína que se encuentra en la celda de reacción (figura 3-25). Después de cada inyección de ligando, el calor liberado o adsorbido se mide con respecto a una celda de referencia que contiene agua ultrapura o tampón en su interior. El cambio de calor es supervisado por la energía eléctrica necesaria para mantener una pequeña diferencia de temperatura entre ambas celdas (reacción y referencia), las cuales están dentro de una camisa adiabática (Holdgate, 2001.)

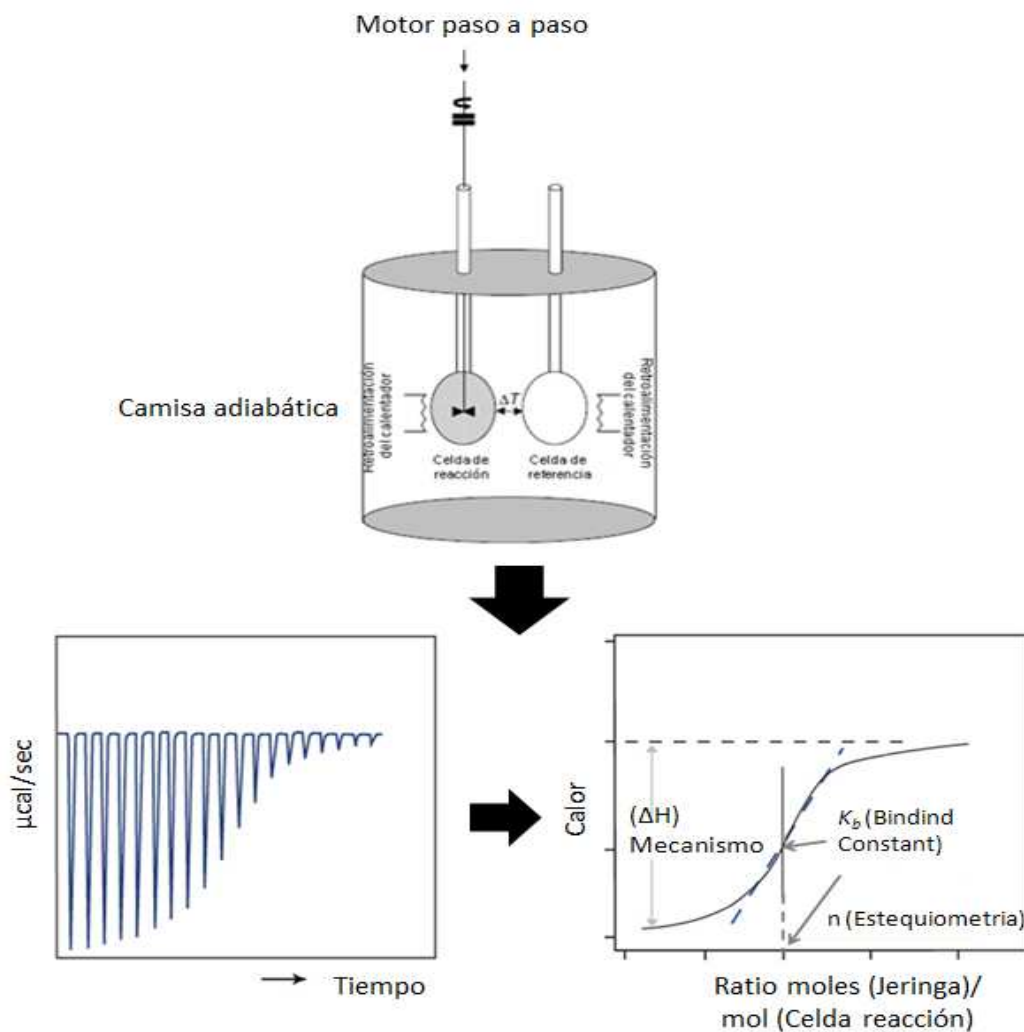


Figura 3-25. Representación esquemática de equipo de ITC, propuesto por Holdgate, 2001.

Así, La cantidad de proteína disponible que no se ha enlazado al ligando disminuye progresivamente después de cada inyección, por lo tanto, la magnitud de los picos se vuelven progresivamente más pequeña hasta que el complejo macromolecula-ligando alcanza la saturación. De esta forma, el calor por inyección dQ^* para la unión del ligando L^* a una macromolécula M^* para formar el complejo no covalente ML se representa en la ecuación 3-8:

$$dQ' = d[M^*L^*]\Delta H \cdot V_c \quad (3-8)$$

Donde V_c es el volumen de la celda de reacción del equipo ITC. Así, este cambio de calor puede ser diferenciado con respecto a la concentración total de ligando en la celda de reacción después de cada inyección (la variable bajo control experimental) para producir una isoterma de enlace.

Por otra parte, la constante de equilibrio de enlace para una reacción dada se puede estimar simultáneamente con el cambio de la entalpía, si las magnitudes de K_b y ΔH para la reacción que tiene lugar en el calorímetro está dentro de los límites. Así, la figura 3-26 muestra una familia de curvas de ruptura que representan la curvatura asociada al valor de K_b .

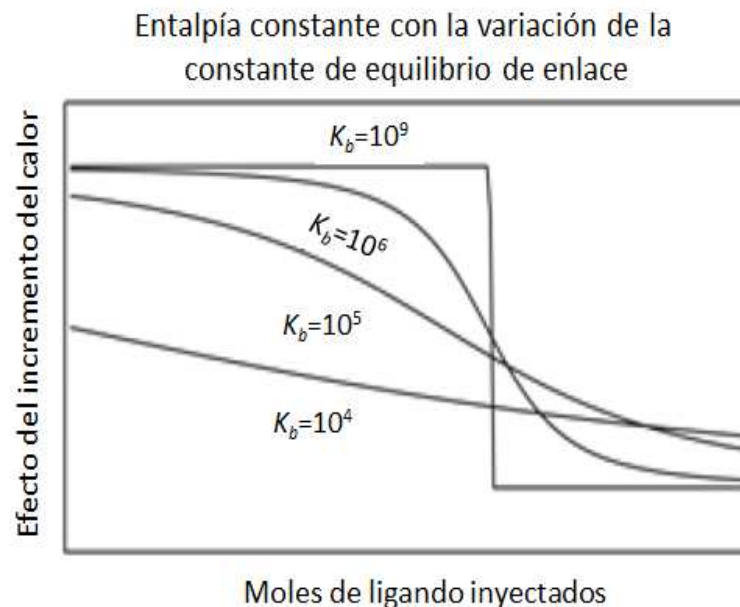


Figura 3-26. Variación de la constante de equilibrio de enlace K_b .

En la práctica las constantes de unión entre 10^3 a 10^8 M^{-1} pueden ser medidas con total precisión (Herding and Chowdry, 2001).

3.6.1.1. Algunas aplicaciones del ITC en biotecnología

A continuación se describen algunas aplicaciones llevadas a cabo utilizando la técnica de nano-calorimetría isotérmica ITC.

3.6.1.1.1. Aplicaciones en bioseparación

La nano-calorimetría isotérmica ITC ha sido aplicada a experimentos de cromatografía de interacción hidrofóbica, ayudando a la elección del adsorbente adecuado, el tipo de sal usada así como la concentración más adecuada para llevar a cabo la separación y purificación de péptidos y proteínas como por ejemplo α -chymotrypsinogen A en diferentes tipos de adsorbentes (Huang *et al*; 2000; Lin *et al*; 1999 y Huang *et al*; 2003). También se han hecho estudios en cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC), estudiando el mecanismo de interacción de diferentes tipos de proteína con diversos tipos de iones metálicos, pH en el medio, fuerzas iónicas etc. (Chen *et al*; 1996; Wu *et al*; 1996; Chen *et al*; 1997; Lin^a *et al*; 2001; Lin^b *et al*; 2001 y Wilcox, 2008; Zhang *et al*; 2000).

De la misma forma, se ha utilizado esta técnica en el análisis de interacciones empleando cromatografía de intercambio iónico, debido a que la fuerza de unión de las proteínas con las resinas utilizadas en este tipo de cromatografía, puede ser afectada por numerosos factores como el pH, la concentración de sal, temperatura etc; (Hallgren, 1999).

3.6.1.1.2. Aplicaciones en el desarrollo de fármacos

La técnica ITC tiene una importante aplicación en la caracterización y optimización de compuestos aplicados al desarrollo de fármacos y medicamentos, donde las afinidades de enlace del fármaco a las dianas son identificados a partir de parámetros termodinámicos tales como: energía libre de Gibbs (ΔG), entalpía (ΔH), entropía (ΔS) y la constante de enlace (K_b). Así para el enlace espontaneo

entre el fármaco y la diana, la energía libre de Gibbs ΔG debería ser negativa y estar directamente relacionada con la afinidad de dicho enlace (Cooper, 1999; Copper *et al*; 2001; Ladbury, 2001 y Olsson *et al*; 2011).

La afinidad entre el fármaco y la diana solo se logra cuando la entropía y la entalpia contribuyen de forma favorable a la reacción, así que para llevar a cabo un enlace favorable, el valor de ΔH debería ser negativo y el de ΔS positivo, debido a que la entalpia favorable para este tipo de aplicaciones está asociada a la formación de puente de hidrogeno, interacciones de Van de Waals (Sergio *et al*; 1981). Por lo tanto el valor de ΔH representa la fuerza de interacción fármaco-diana (Lipinski *et al*; 2001; Jin *et al*; 2004; Iwasaki *et al*; 2004 y Rubén *et al*; 2006).

3.6.1.1.3. Aplicaciones en el metabolismo celular

Asimismo la técnica ITC ha sido utilizada para el estudio de microorganismos, sistemas celulares animales y humanos, plantas y tejidos de algunos mamíferos. Uno de los principales problemas encontrados en el estudio de células utilizando microcalorimetría es que los cultivos se pueden convertir en anóxicos debido a las limitaciones en el suministro de oxígeno (Kemp *et al*; 1997). Este problema fue resuelto desarrollando un birreactor calorimétrico (García-Payoa *et al*; 2002) y posteriormente utilizar una combinación del biorreactor con un microcalorímetro de flujo (Kemp *et al*; 1997).

Con la descripción de la termodinámica de enlace, finaliza el capítulo correspondiente al fundamento teórico concerniente a la investigación descrita en el presente trabajo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Productos químicos

- Acetato de sodio anhidro, PM: 82,03 g/mol (SIGMA)
- Acetona extra pura, PM: 5.08 g/mol (Scharlau)
- Acido acético, 96% v/v, grado reactivo, PM: 60,05 g/mol, ρ : 1,05 g/cm³ (Scharlau)
- Ácido iminodiacético (sal di sódica) di-básico monohidratado
- (SIGMA)
- Agarosa tipo D-5, contenido en agua \leq 7,0% (Laboratorios CONRA)
- Suero de Albumina bovino, polvo liofilizado (libre de ácidos grasos) (SIGMA)
- Catalasa de hígado bovino, 3809 unidades/mg sólido (SIGMA)
- Imidazol, PM: 68,077 g/mol (SIGMA)
- Sefarosa CL-6B, Diámetro de grano húmedo: 40-165 μ m (SIGMA)
- Trizma base, PM: 121,14 g/mol (SIGMA)
- 1,4 butanodiol diglicidil éter \geq 95% (SIGMA)
- CuCl₂ anhídrido puro, PM: 134,45 g/mol (Riedel - de Haen)
- HCl 35% pureza, PM: 36,46 g/mol, ρ : 1,19 g/cm³ (Scharlau)
- KH₂PO₄ para análisis, PM: 136,09 g/mol (Panreac)
- K₂HPO₄ anhidro purísimo, PM: 174,2 g/mol (Panreac)
- KCl grado análisis, PM: 74,65 g/mol (Scharlau)
- NaBH₄ \geq 98% (SIGMA)

- Na_2CO_3 anhidro para análisis, PM: 105,99 g/mol (Panreac)
- Na_2PO_4 Di básico anhidro, PM: 142,0 g/mol (SIGMA)
- NaCl grado reactivo pureza $\geq 99,8\%$, PM: 58,44 g/mol (Scharlau)
- NaOH en lentejas para análisis, PM: 40,0 g/mol (Panreac)
- NaSCN higroscópico, PM: 81,07 g/mol (SIGMA)

4.2. Material y equipos utilizados

- Agitador magnético P-Selecta, Agimatic-N con controlador de agitación (60-1600 rpm)
- Agitador orbital Heidolph Unimax 2010 con controlador de agitación. (0-325 rpm)
- Balanza analítica. Precisa XT 220A
- Bomba de vacío DX2 8614 AWFE2502, 230 V, 50Hz
- Bomba peristáltica EYELA. Micro tube pump MP-3 con controlador de velocidad
- Columna cromatografica encamisada. Phamacia Biotech XK 16
- Cubetas de plástico semimicro (1ml) desechables
- Espectrofotómetro doble haz UV-VIS. Kontron, Uvicon 922. Intervalo de longitud de onda 190-900nm
- Filtros de nylon de 47mm de diámetro
- Material de vidrio
- Micro cubetas de flujo de cuarzo. Hellman
- Micro pipetas automáticas Gilson (P-200, P-1000, P-5000)

- Monolito cerámico corderite (Cor ning NY)
- pH-metro CRISON micro pH 2002
- Reactores encamisados (250 ml) Afora
- Nano ITC. TA Instruments
- Zeta sizer nano ZS-90

4.3. Preparación de la matriz cromatográfica

A continuación se describirá paso a paso la preparación de la matriz cromatografica utilizada en esta investigación.

4.3.1. Preparación de los monolitos cerámicos

Para la preparación de los monolitos cerámicos se utilizó un monolito estándar 400/6 (400 celdas/pulgada²) y 0,006 pulgadas de espesor de pared. El material es corderita, conteniendo trazas de hierro, titanio, potasio y calcio. Las columnas monolíticas se cortaron con un diámetro aproximado de 1,3 cm y longitud 7,5 cm, para ser colocadas en la columna cromatografica.

El monolito 400/6 tiene una densidad de $\rho_M = 0.385 \text{ g/cm}^3$, área específica interna de la celda $a_M = 27.560 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ y porosidad aparente $E_M 0,77 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$, valores comunes para todos los monolitos.

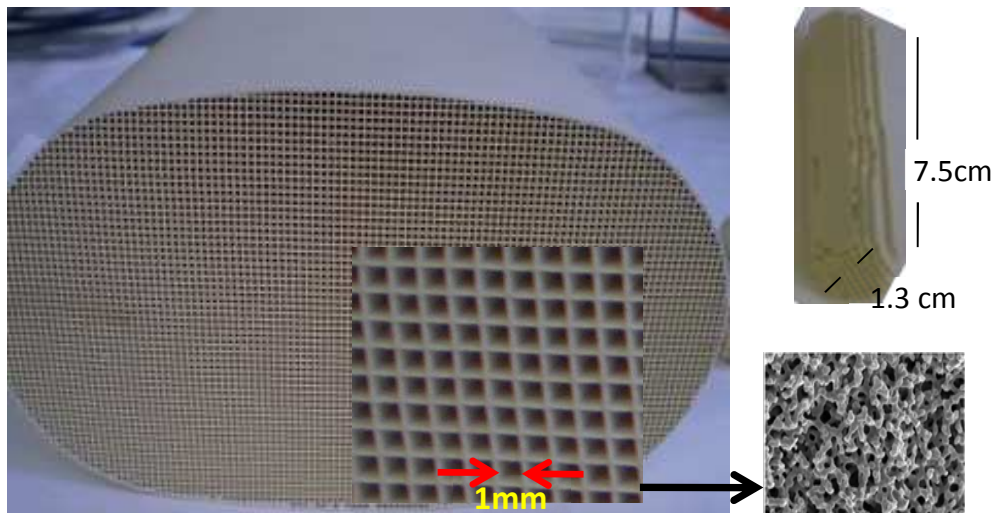


Figura 4-1. Estructura del monolito cerámico.

A todos los monolitos cerámicos usados en esta investigación, se les midió las siguientes propiedades físicas:

- Diámetro (cm)
- Longitud (cm)
- Peso (g)
- Recubrimiento de agarosa (g)
- Espesor del recubrimiento de agarosa (μm)
- Área total de la superficie (cm^2)

Para calcular el área total de superficie del monolito cerámico se cuentan el número de canales cuadrados que se han mantenido abiertos (después del recubrimiento con agarosa del monolito cerámico, ver apartado 4.3.2.) para el flujo, con respecto a los canales totales del monolito, obteniendo así un valor real del área disponible para llevar a cabo el proceso de adsorción de la proteína.

4.3.2. Preparación del recubrimiento de agarosa D5

Con el fin de recubrir el monolito cerámico, se preparó una disolución de agarosa tipo D-5 al 3%(w/v) en agua des-ionizada, la cual fue calentada a 70°C y

agitada vigorosamente hasta obtener una solución homogénea, el monolito previamente pesado (seco) fue introducido por inmersión varias veces en la solución de agarosa, a continuación se hizo circular a través del monolito aire puro con el fin de que el gel no obstruyera los canales del mismo. Posteriormente el monolito fue pesado con el fin de calcular la cantidad de agarosa final depositada en él.

4.3.3. Activación de la matriz de epoxi-agarosa

Como se ha descrito anteriormente, el grupo con el que se ha activado la matriz cromatográfica, es el grupo epoxi, utilizando como reactivo 1,4 butanodiol-diglicidil-éter, un monómero di epóxido de cadena larga que posee 10 átomos de carbono.

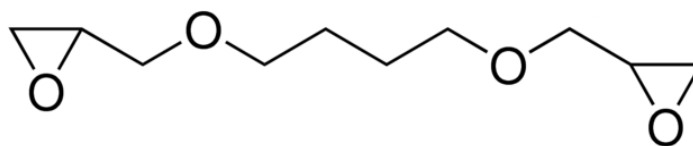


Figura 4-2. Estructura del 1,4 butanodiol-diglicidil-éter.

Este compuesto proporciona además del brazo espaciador, la activación de la matriz obteniéndose así un soporte de epoxi agarosa.

El resultado del proceso de activación, es la formación de un enlace reversible tipo *base de Schiff*, ello supondrá la inmovilización irreversible del ligando IMAC. El tratamiento simultaneo con un agente reductor como el NaBH_4 garantiza la irreversibilidad de los enlaces formados y la inactivación de los grupos reactivos del soporte que no hubiera interactuado y que pasarían a convertirse en hidroxilos.

La reacción entre la agarosa y el 1,4 butanodiol diglicidil éter se llevó a cabo de acuerdo a una modificación en el protocolo de activación propuesto por Armisén *et al*; 1999.

4.3.3.1. Procedimiento

- Introducir el monolito recubierto de agarosa en un reactor que contiene 100 cm³ de una disolución de NaOH 0,4M que contiene 1,13 g de NaBH₄, 38 cm³ de acetona y 19 cm³ de 1,4 butanodiol diglicidil éter.
- Mantener en agitación orbital el reactor 6 horas a una velocidad de 118 rpm a 298K.
- Realizar dos adiciones posteriores de 19 cm³ de 1,4 butanodiol diglicidil éter a las 2 y 4 horas de reacción.
- Lavar el monolito cerámico recubierto con abundante agua desionizada.

Después del proceso de activación la estructura que se obtiene es la que se muestra en la figura 4-3.

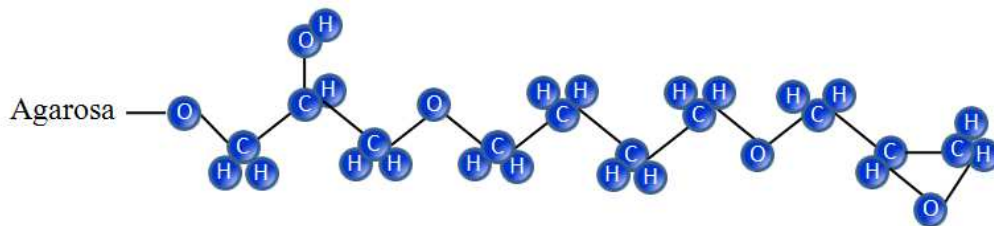


Figura 4-3. Estructura de la agarosa epoxi-activada.

En la figura 4-4 se muestra el esquema de la instalación empleada para llevar a cabo el proceso de activación de la matriz cromatográfica.

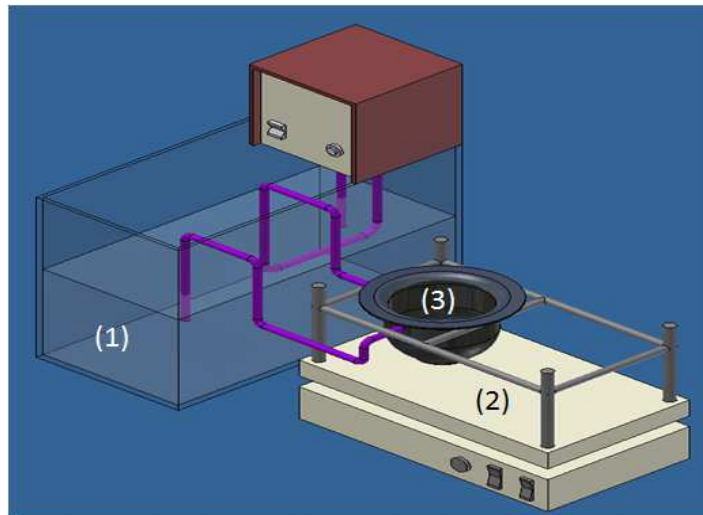


Figura 4-4. Instalación empleada para la preparación de las matrices: 1) Termostato, 2) Agitador orbital, 3) Reactor encamisado.

4.3.4. Unión del compuesto quelante a la matriz activada.

El agente quelante utilizado en este trabajo es el ácido iminodiacético (IDA) (figura 4-5), debido a que utilizando este reactivo se consigue que el ion metálico (que en nuestro caso es el Cu^{2+}) quede coordinado por tres sitios, dejando sus restantes sitios de coordinación disponibles para unirse con el nitrógeno desprotonado del grupo imidazol de la histidina, formándose un complejo ternario entre el IDA y los residuos de aminoácidos que se encuentran en la superficie de las proteínas, manteniéndose así, unido el ion metálico y la proteína de forma reversible (Hochuli *et al*; 1987).

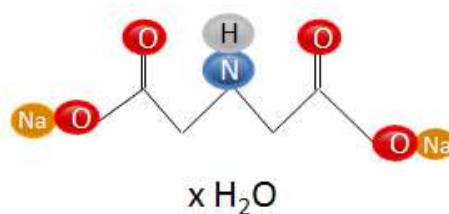


Figura 4-5. Estructura química del ácido iminodiacético monohidratado (IDA).

La unión del grupo quelante al soporte de epoxi agarosa se realizó de acuerdo a una modificación del procedimiento propuesto por Mateo *et al*; 2001.

4.3.4.1. Procedimiento

- El monolito previamente lavado con agua des ionizada es introducido en un reactor que contiene 100 cm^3 de Na_2CO_3 0,1M y 9 g de ácido iminodiacético (IDA).
- Mantener en agitación orbital el reactor 12 horas a una velocidad de 118 rpm a 298K.
- Después de 12 horas de tiempo de reacción el monolito es nuevamente lavado con abundante agua des ionizada.

La estructura obtenida para la matriz después de las 12 horas de reacción se muestra en la figura 4-6.

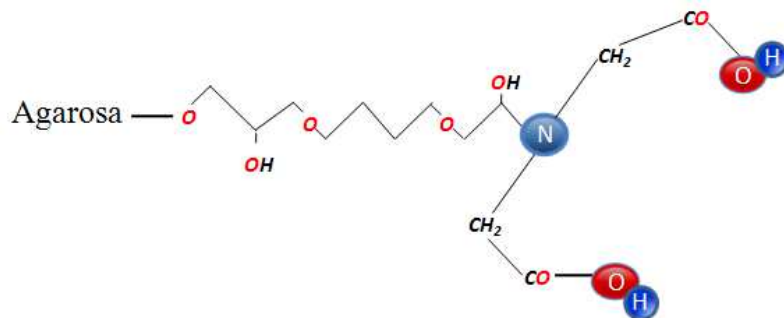


Figura 4-6. Estructura de la matriz de IDA-agarosa.

4.3.5. Unión del metal a la matriz de IDA-agarosa y determinación del contenido en Cu^{2+}

Como se menciona en el capítulo 3, la cromatografía de afinidad IMAC se basa fundamentalmente en la interacción entre determinados residuos de aminoácidos en la superficie de las proteínas, como cisteína, histidina, triptófano etc.; y cationes de metales que se encuentran formando quelatos (Yip *et al*; 1994), de tal forma que estos últimos actúan como aceptores de electrones (Anspach and Hutchens, 1994 y Armisén *et al*; 1999).

La unión del metal a la matriz de IDA-agarosa se llevó a cabo por una modificación en el procedimiento descrito por Mateo *et al*; 2001.

4.3.5.1. Procedimiento

- Introducir el monolito cerámico recubierto de agarosa D5 previamente activado en una columna cromatográfica XK16 Pharmacia.
- Posteriormente, hacer circular a través de la columna 100 cm^3 de una solución que contiene $5 \text{ mg/cm}^3 \text{ CuCl}_2$ por 2 horas a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

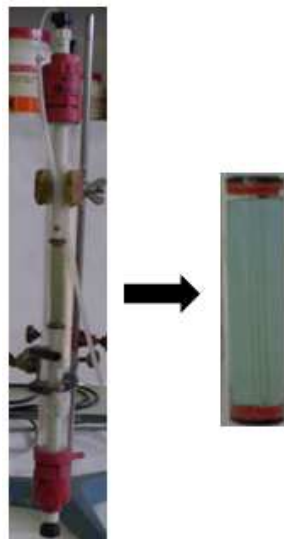


Figura 4-7. Columna cromatográfica empaquetada con el monolito cerámico recubierto de agarosa, activado y cargado con Cu^{2+} .

El exceso de Cu^{2+} no enlazado en la matriz fue retirado haciendo circular a través de la columna 100 cm^3 de agua des ionizada durante 30 minutos a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$. El Cu^{2+} no ligado específicamente se eluyó haciendo circular a través de la columna 100 cm^3 de solución fosfato pH 4,5 durante 30 minutos a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

La estructura obtenida tras haber llevado a cabo la carga con Cu^{2+} es la que se muestra en la figura 4-8:

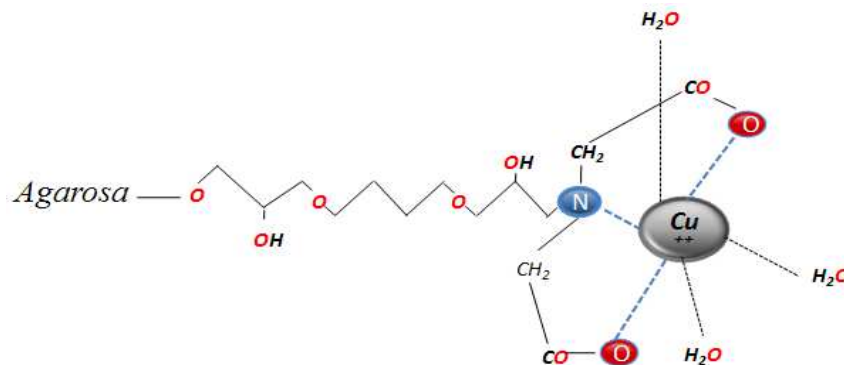


Figura 4-8. Estructura de la matriz de agarosa-IDA Cu^{2+} .

4.3.5.2. Determinación de la cantidad de cobre enlazado

Para la determinación de la concentración de Cu^{2+} enlazado, se empleó el siguiente balance de materia:

$$C_{\text{Cu(II)inicial}} = C_{\text{Cu(II)enlazado}} + C_{\text{Cu(II)sobrenadante}} \quad (4-1)$$

De tal forma que el Cu^{2+} el sobrenadante fue medido espectrofotometría y por diferencia se obtuvo el Cu^{2+} enlazado en la matriz.

Se utilizó CuCl_2 para preparar una disolución madre de concentración $10 \text{ mg}/\text{cm}^3$ a partir de la cual se prepararon los patrones de calibrado.

Los patrones aparecen resumidos en la tabla 4-1 y representados en la figura 4-9, en la cual puede observarse que la ordenada en el origen es prácticamente nula,

lo que indica que en el margen de concentraciones estudiado existe una proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración del CuCl_2 .

Tabla 4-1. Valores de Calibrado CuCl_2 vs Absorbancia.

Concentración (mg/cm^3)	Absorbancia (830 nm)
1,00	0,085
2,00	0,178
3,00	0,278
4,00	0,379
5,00	0,488
6,00	0,575

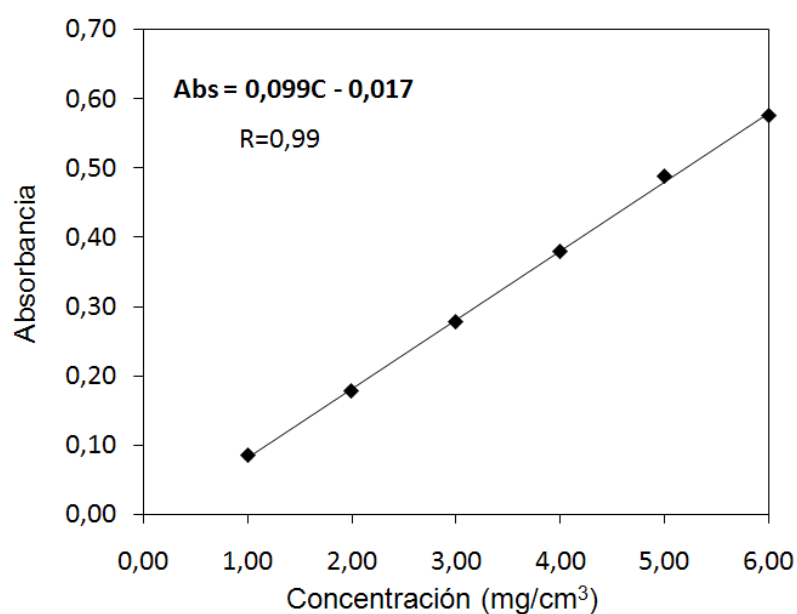


Figura 4-9. Recta de calibrado para la medición de la concentración de CuCl_2 .

4.3.6. Preparación de la columna de afinidad

La preparación de la columna cromatografía es un paso habitual en la separación de biomoléculas. Antes de llevar a cabo el primer ciclo de adsorción, se

somete la columna a un lavado mediante el paso, a través de la misma de tampón Tris-HCl pH 8,0 con el fin de estabilizar el monolito.

Posteriormente se procede a llevar a cabo los citados ciclos de adsorción empleando para ello el tampón en el que está disuelta la proteína.

Para justificar esta etapa se encontró en bibliografía que existen estudios que demuestran la capacidad que posee el tampón tris para eliminar los complejos de los iones metálicos (Mc Phail and Goodman, 1984). Por lo tanto dicho tampón elimina los iones de Cu^{2+} libres en la matriz y que podrían interferir en el proceso de adsorción.

Otros investigadores utilizan para la preparación de la columna el mismo tampón que se utiliza en el proceso de adsorción (Tamagawa *et al*; 1999).

En otro tipo de aplicaciones con el fin de preparar la matriz para cada ciclo de adsorción, hay una etapa donde se lava la matriz con una sal de un ácido fuerte (por ejemplo NaCl pH 4), seguido de otro lavado con una mezcla de fosfato de sodio y cloruro de sodio pH 7,0 y posteriormente se lleva a cabo la adsorción y elución (Vançan *et al*; 2002).

De acuerdo a esto podría decirse que el efecto del tratamiento de la matriz previo al proceso de adsorción con un determinado tampón, dependiendo del tipo de matriz favorece el proceso de adsorción.

Por lo tanto se podría argumentar, que el efecto del tratamiento de la matriz con un tampón, va mas allá de la eliminación de iones metálicos. Lo mas probable es que al lavar la matriz con un tampón tris, éste afecta las propiedades de los electrones de los compuestos quelantes, ayudando a mejorar la capacidad de adsorción de la columna cromatografica.

4.4. Determinación de la concentración de biomoléculas

Teniendo en cuenta que las biomoléculas en solución tales como la proteína BSA o la enzima CAT absorben la luz ultravioleta a 280 nm, puesto que los anillos aromáticos de los aminoácidos que conforman su estructura tales como triptófano, tirosina, histidina, etc., absorben a dicha longitud de onda, se utilizó un espectrofotómetro para conocer la concentración de biomolécula a través de la absorbancia de acuerdo con la ley de Lambert-Beer. Adicionalmente se recomienda este método para llevar a cabo rectas de calibrado para las proteínas de tipo albumina, por la alta presencia de histidinas en su estructura (Stoscheck, 1990).

De acuerdo a lo anteriormente descrito y puesto que la experimentación se llevó a cabo en continuo haciendo un seguimiento de la absorbancia, era preciso comprobar que la relación entre dicha absorbancia y la concentración de la proteína suero de albumina bovino era lineal. Para ello se llevó a cabo un calibrado que permitió comprobar la linealidad de la relación absorbancia-concentración.

4.4.1. Curva de Calibrado para la proteína BSA

Para la obtención de la curva de calibrado se utilizó la proteína BSA a partir de una disolución madre de concentración de $2,0 \text{ mg/cm}^3$ a partir de la cual se prepararon las correspondientes alícuotas que constituyen los patrones de calibrado.

Las mediciones se llevaron a cabo en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso y a una longitud de 280 nm.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4-2 y se representan en la figura 4-10, en la cual se puede observar que la ordenada en el origen es despreciable y los valores determinan una línea recta, lo que indica que en el margen de concentraciones estudiado existe una proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración de proteína.

Tabla 4-2. Valores del calibrado de la proteína BSA vs absorbancia.

Concentración (mg/cm ³)	Absorbancia (280 nm)
0,1	0,081
0,2	0,129
0,3	0,181
0,4	0,239
0,5	0,291
0,6	0,349
0,7	0,415
0,8	0,473
0,9	0,538
1,0	0,597
1,1	0,648
1,2	0,708
1,3	0,787
1,4	0,848

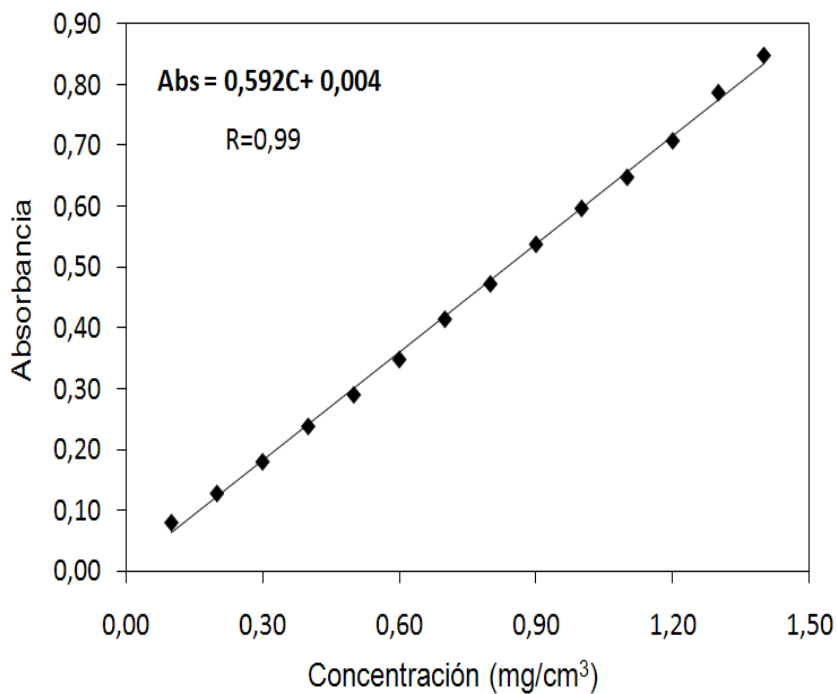


Figura 4-10. Recta de calibrado para la medición de la concentración de la proteína BSA.

4.4.2. Curva de Calibrado para la enzima CAT

Del mismo modo que se llevo a cabo la curva de calibrado para la proteína BSA, se realizó una recta de calibrado para la enzima CAT.

Se utilizó la enzima CAT para preparar una disolución madre de concentración $1\text{mg}/\text{cm}^3$, a partir de la cual se prepararon los patrones de calibrado. Las mediciones se llevaron a cabo en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso y a una longitud de 280 nm.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4-3 y se representan en la figura 4-11, en la cual se puede observar que la ordenada en el origen es despreciable y los valores determinan una línea recta, lo que indica que en el margen de concentraciones estudiado existe una proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración de enzima.

Tabla 4-3. Valores de calibrado de la enzima CAT frente a la absorbancia.

Concentración (mg/cm^3)	Absorbancia (280 nm)
0,1	0,100
0,2	0,199
0,3	0,291
0,4	0,392
0,5	0,496
0,6	0,582
0,7	0,671

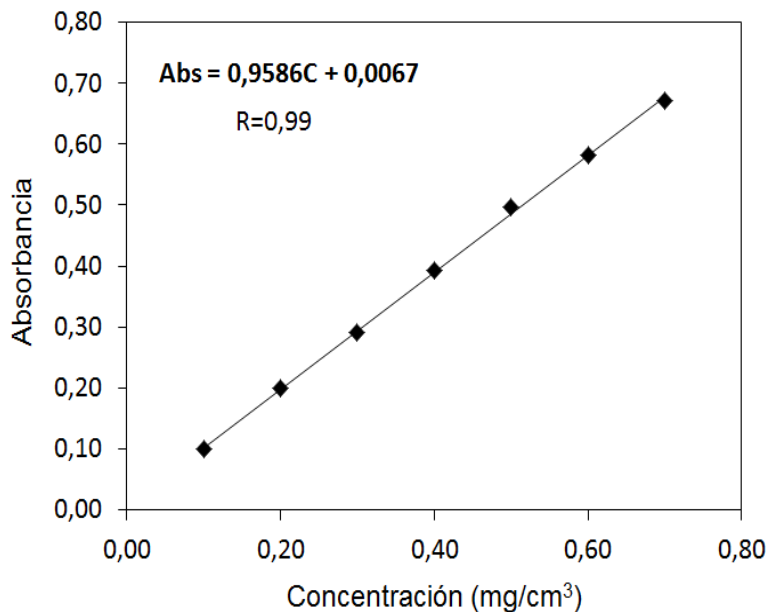


Figura 4-11. Recta de calibrado para la medición de la concentración de la enzima CAT.

A continuación, con el fin de determinar la cantidad de biomolécula total enlazada en la matriz cromatográfica en el estudio de separación de dos biomoléculas (BSA+CAT) se empleó el método Bradford que se describe a continuación:

4.4.3. Método Bradford

El ensayo de proteínas Bradford es un procedimiento espectroscópico analítico, utilizado para medir la concentración de proteína en una determinada solución. Esta medición depende de la composición de aminoácidos que tenga la proteína presente en el medio. Es un método rápido, relativamente sencillo y sensible que permite la detección de las proteínas en poco tiempo (Kruger, 1996).

Dicho método está basado en las interacciones entre el colorante Comassie Blue BG-250 y las proteínas que contienen las cadenas laterales de aminoácidos básicos o aromáticos.

De esta forma, la reacción entre la proteína y el colorante provoca el desplazamiento del equilibrio para formar un colorante aniónico que absorbe fuertemente a la longitud de onda de 595 nm.

Actualmente existen dos protocolos para llevar a cabo el método Bradford, el estándar, usado para medir entre 10 y 100 microgramos de proteína y un microensayo utilizado para detectar entre 1 y 10 microgramos de proteína. Se utilizó el ensayo estándar. El procedimiento para llevar a cabo el método Bradford utilizado en este trabajo se describe a continuación:

4.4.3.1. Procedimiento

- Obtener una recta de calibrado a partir de una disolución madre de proteína de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína BSA en un volumen final de 1 cm^3 .
- Preparar las muestras de proteína en tampón PBS pH 7,4 (tampón fosfato salino) ya que los estudios de adsorción de las proteínas BSA y Catalasa de forma independiente se llevaron a cabo con este tampón. Las muestras a medir serán de 100 μl de proteína en solución.
- Mezclar cada muestra en 1000 μl de reactivo Bradford y dejar reaccionar por 20 minutos. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Las muestras se deben medir entre 20 y 60 min después de su preparación, después de este tiempo la muestra no es adecuada para su medición.

Tabla 4-4. Datos para la curva de calibrado utilizados en el método Bradford.

Concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Absorbancia (595 nm)
20	0,059
40	0,113
50	0,135
60	0,159
80	0,212
100	0,255

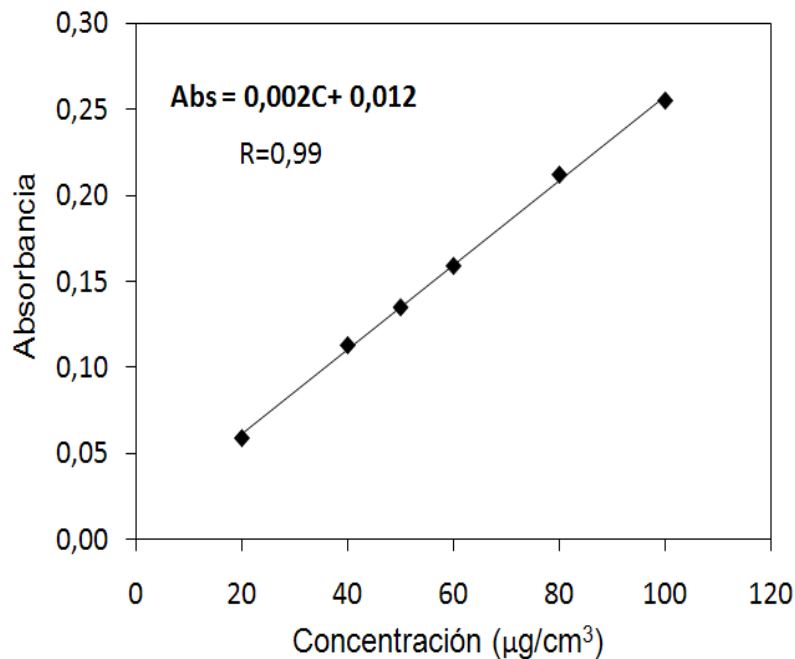


Figura 4-12. Recta de calibrado para la medición de la concentración de la proteína total adsorbida en la matriz IMAC.

Una vez medida la cantidad total de biomolécula por medio del método Bradford, se procedió a cuantificar la concentración de enzima CAT por medio de la medición de su actividad enzimática.

4.4.4. Medición de la actividad de la enzima CAT

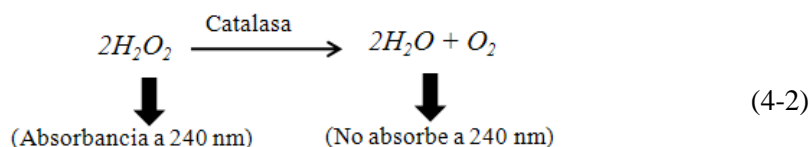
La actividad de una enzima constituye una medida de su pureza, de tal forma que aumenta durante el proceso de purificación y llega a ser máxima y constante cuando ésta se halla en estado puro. Asimismo se define como el número de unidades de enzima por miligramo de proteína, siendo la unidad enzimática la cantidad de enzima que origina la transformación de un micromol de sustrato por minuto a 298 K.

La catalasa como se mencionó anteriormente es una enzima antioxidante presente en todas las células y ayuda a facilitar la eliminación del peróxido de hidrógeno producido por distintas reacciones redox. Así cada molécula de enzima contiene cuatro sub-unidades de igual tamaño que a su vez contiene un grupo

hemo que conforma su centro activo de tal forma que es allí donde se promueve la descomposición del H_2O_2 en agua y oxígeno.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, esta enzima generalmente puede cuantificarse utilizando ya sea ensayos que se basan en la disminución de la absorbancia del peróxido de hidrogeno a una longitud de onda de 240 nm (Beers and Sizer, 1952) o midiendo la liberación de oxígeno mediante electrodos tipo Clark.

Así, utilizando el primer método, la actividad de la enzima CAT puede ser medida siguiendo el consumo de H_2O_2 del sustrato a 240 nm.



Por lo tanto, la concentración de la enzima CAT adsorbida se puede calcular mediante la medición de su actividad, de esta forma se puede relacionar la pérdida de actividad en el tiempo con una disminución de la adsorción de la enzima en el adsorbente. Para ello se ha adaptado un procedimiento de la medición de la actividad de catalasa para nuestro caso particular. Para ello se llevo a cabo el siguiente procedimiento.

4.4.4.1. Procedimiento

- Diluir 50 mM de peróxido de hidrógeno al 3% w/v en tampón fosfato 50 mM pH 7,0.
- Preparar una disolución madre de enzima CAT concentración 1 mg/cm^3 en tampón PBS pH 7,4, a partir de la cual se prepararon los patrones de calibrado.
- Para medir la actividad se mezcló 1 cm^3 de la disolución de tampón fosfato con H_2O_2 y 1 cm^3 de cada uno de los patrones para llevar a cabo el calibrado, midiendo en el espectrofotómetro a 240 nm y garantizando que la

temperatura se conservara en 298K. Debido a la formación de burbujas es necesario hacer la medición rápidamente (dentro de los 20 primeros segundos de preparación de la mezcla).

Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la tabla 4-5 y representados en la figura 4-13, en la cual se puede observar que la ordenada en el origen es prácticamente nula, lo que indica que en el margen de concentraciones estudiado existe una proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración de la enzima CAT y las unidades/cm³.

Tabla 4-5. Valores del calibrado utilizados para llevar a cabo el cálculo de la actividad de la enzima CAT.

Concentración (mg/cm ³)	Unidades/cm ³	Absorbancia (240 nm)
0,1	380,90	0,010
0,2	761,80	0,024
0,3	1142,70	0,032
0,4	1523,60	0,045
0,5	1904,50	0,060
0,6	2285,40	0,072
0,7	2666,30	0,082

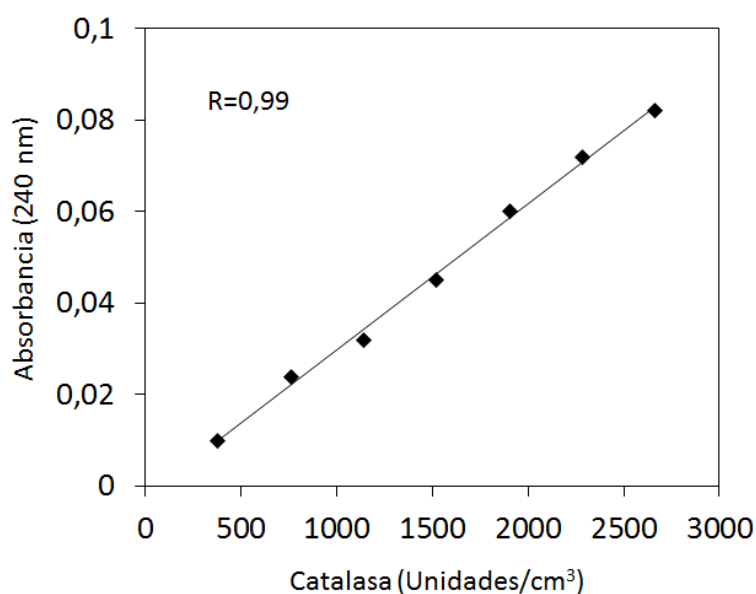


Figura 4-13. Recta de calibrado para la medición de la actividad de la enzima CAT a 240 nm.

4.5. Experimentos nano-calorimetría isotérmica (ITC)

Con el fin de conocer los enlaces que se generan entre las proteínas BSA y la catalasa y el soporte cromatográfico, se utilizó la técnica de nano-calorimetría isotérmica (ITC).

Para ello se determinó la entalpía de enlace (ΔH), la constante de equilibrio de enlace (K_b) y la estequiometría de la reacción (n_b); y una vez obtenidos estos parámetros, se calcularon mediante las ecuaciones termodinámicas (apartado 3.7), la entropía (ΔS), la energía libre de Gibbs (ΔG) y el calor específico (ΔC_p).

4.5.1. Experimentos ITC con el Cu^{2+} en estado libre para el enlace de la proteína BSA.

Como se ha indicado, los parámetros termodinámicos de enlace del Cu^{2+} -BSA fueron calculados usando un nano-ITC (nano Isothermal Titration Calorimetry) a diferentes temperaturas, 296, 298, 300, 302 y 304 K.

Previo a iniciar los experimentos en el nano-ITC, la solución de proteína utilizada, así como la solución de CuCl_2 se degasificaron por 30 min aproximadamente mediante una bomba de vacío antes de ser puesta en la celda de reacción y jeringa respectivamente, con el fin de eliminar las burbujas presentes en las muestras.

En la tabla 4-6 se recogen las condiciones de realización de los experimentos.

Tabla 4-6. Parámetros ITC, para los experimentos de enlace de la proteína BSA con Cu^{2+} en estado libre.

No. Inyecciones	22
Intervalo entre inyección e inyección	300 (s)
Volumen inyección	10 (μl)
Velocidad agitación	250 (rpm)

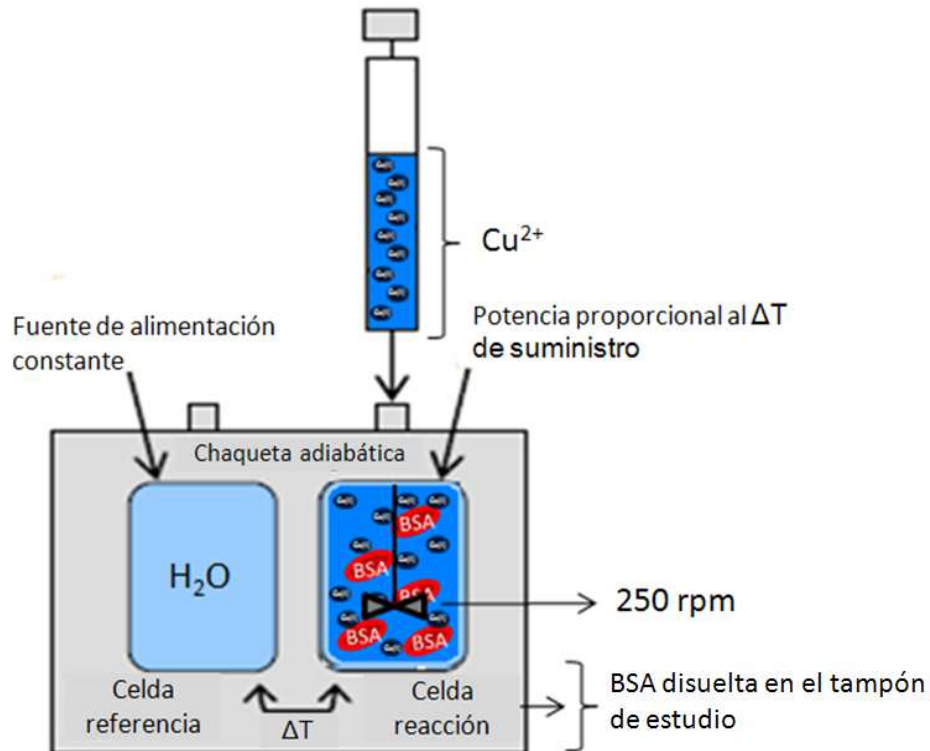


Figura 4-14. Esquema de los experimentos llevados a cabo mediante la técnica ITC, para el enlace de la proteína BSA- Cu^{2+} .

La experimentación se realizó siguiendo la figura 4-14 de la siguiente manera:

Para evaluar el enlace de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 se utilizó una jeringa de 250 μ l, la cual se llenó con una disolución de 3mM de $CuCl_2$ con el fin de valorar la muestra de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 0,1 mM contenida en la celda de reacción.

Asimismo, para evaluar el enlace de la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 se utilizó una jeringa de 250 μ l, la cual se llenó con una disolución de 6mM de $CuCl_2$ con el fin de valorar la muestra de la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 0,1 mM contenida en la celda de reacción

La velocidad de agitación en ambos casos fue de 250 rpm, para garantizar que la mezcla fuera homogénea, evitando la formación de espuma por la proteína en disolución.

Al calor de dilución experimental se le resta el obtenido en una valoración blanco que consistió en llevar a cabo un experimento en idénticas condiciones, solo que en la celda de reacción se colocó únicamente la solución tampón sin la proteína.

Los parámetros termodinámicos (ΔH , K_b , n_b) son calculados mediante el software launch nanoanalyze suministrado por TA Instruments (Anexo F). El error de los experimentos está en torno al 20%, y para cada temperatura se llevaron a cabo 5 experimentos con el fin de comprobar su error y reproducibilidad.

Para ajustar las curvas de ruptura obtenidas a partir del flujo de calor procedente de las alícuotas, con el fin de obtener la relación de equilibrio, se utiliza un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados (ajuste independiente- anexo F) junto con las concentraciones tanto de la proteína como del ligando (Cu^{2+}). De esta forma pueden obtenerse los valores de la estequiometría (n), el cambio en la entalpía (ΔH), y la constante de equilibrio de enlace K_b .

4.5.2. Experimentos ITC con el Cu^{2+} inmovilizado para el enlace de la proteína BSA

Para llevar a cabo los experimentos con el Cu^{2+} inmovilizado, fue necesario preparar un adsorbente similar al del relleno de las columnas cromatográficas convencionales de agarosa, ya que debido a las condiciones del equipo ITC, no es posible utilizar el adsorbente en forma de gel, sino que debe ser en partículas. Para ello se utilizó la sefarosa CL-6B, sobre la cual se inmovilizó el Cu^{2+} , de acuerdo a una modificación en el método descrito por Armisén et al; 1999.

4.5.2.1. Preparación de la matriz cromatográfica para los experimentos de enlace de la proteína BSA y el Cu^{2+} inmovilizado

El soporte utilizado para inmovilizar el Cu^{2+} , fue la sefarosa CL-6B (nombre comercial de la disolución del 6% de agarosa entrecruzada), este tipo de agarosa en

forma de partículas y proporciona una estructura macroporosa de elevada estabilidad tanto física como química.

La activación del soporte se llevó a cabo de acuerdo a una modificación en el protocolo propuesto por Armisén *et al*; 1999; utilizando 1,4 butanodiol diglicidil éter como agente de activación.

4.5.2.1.1. Preparación de los soportes de epoxi-agarosa

1. Lavar intensamente 10 ml de CL agarosa al 6% con agua ultrapura.
2. Mezclar la agarosa lavada con 30 ml de una disolución de NaOH 0,4 M que contiene 340mg de NaBH₄, 11,4 cm³ de acetona y 5,7 cm³ de 1,4 butanodiol diglicidil éter.
3. Mantener en agitación a 190 rpm durante 6h a 298K.
4. Realizar dos adiciones posteriores de 5,7 cm³ cada una de 1,4 butanodiol diglicidil éter a las 2 y 4 horas de reacción.
5. Lavar la agarosa con abundante agua des ionizada.

4.5.2.1.2. Preparación de los soportes de ácido iminodiacético

La unión del compuesto quelante a la matriz activada se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente método:

1. Mezclar 10 ml de epoxi-agarosa con 10 cm³ de tampón de Na₂CO₃ 0,1M que contiene 0,9 g de la sal disódica del ácido iminodiacético (IDA).
2. Ajustar el pH a 11 utilizando NaOH.
3. Agitar a 190 rpm durante 12h a 298K.
4. Lavar la agarosa con abundante agua des ionizada.

4.5.2.1.3. Unión del metal al soporte de IDA-agarosa

La unión del metal se llevo a cabo de la siguiente manera.

1. Mezclar 2,5 g de la matriz IDA-agarosa con 100 cm³ de una solución de CuCl₂ 3mM.
2. Agitar a 190 rpm por 2 horas.
3. Filtrar a vacío.
4. Lavar con abundante agua des ionizada.
5. Mezclar 2,5 g de la matriz de IDA-agarosa lavada previamente con 100 cm³ de una solución fosfato 50 mM pH 4,5 por 30 minutos.
6. Filtrar a vacío.

4.5.2.1.4. Determinación del contenido de Cu²⁺ en la matriz de IDA-agarosa

Para determinar la cantidad de Cu²⁺ enlazados a la matriz de IDA-agarosa se procedió de acuerdo con lo indicado por Mateo *et al*; 2001.

1. Mezclar la matriz IDA-agarosa con una solución de CuCl₂ 3mM.
2. Agitar a 190 rpm durante 2h.
3. Lavar abundantemente con agua deshionizada.

Una vez llevada a cabo la reacción, la cantidad de Cu²⁺ enlazado a la matriz se determino como se indicó anteriormente por diferencia con respecto del Cu²⁺ en el sobrenadante.

La cantidad de Cu²⁺ en el sobrenadante se obtuvo a través de la medición de la absorción del sobrenadante, por triplicado, a 830 nm, (para llevar a cabo esta

determinación se realizó un calibrado previo para la determinación de la relación concentración-absorbancia).

4.5.2.1.5. Curva de calibrado

Tabla 4-7. Valores del calibrado CuCl_2 vs absorbancia.

<i>Concentración (mM)</i>	<i>Absorbancia (830 nm)</i>
1	0,006
2	0,020
3	0,033
4	0,046
5	0,058

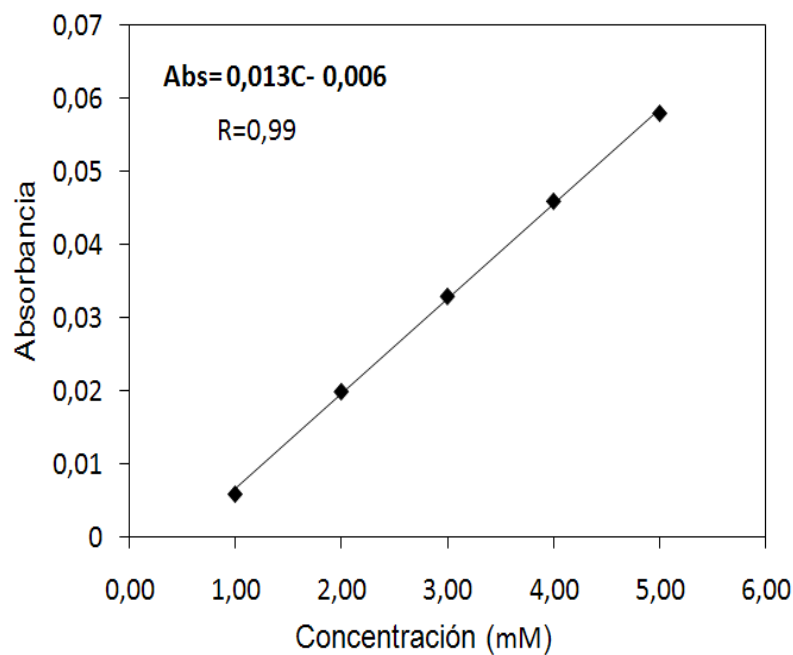


Figura 4-15. Recta de calibrado para la medición de la concentración de CuCl_2 .

4.5.2.2. Procedimiento para llevar a cabo los experimentos en el ITC.

Los parámetros termodinámicos del enlace de la BSA-Cu²⁺-IDA-agarosa fueron obtenidos usando un nano-ITC (nano Isothermal Titration Calorimetry) a diferentes temperaturas 296, 298, 300, 302 y 304K.

Previo a iniciar los experimentos en el nano-ITC, la solución de proteína utilizada, así como el Cu²⁺ inmovilizado, se desgasificaron como se indicó anteriormente, por 30 minutos aproximadamente antes de ser puesta en la jeringa y celda de reacción respectivamente, con el fin de eliminar las burbujas presentes en las muestras. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a los parámetros recogidos en la tabla 4-8:

Tabla 4-8. Parámetros ITC, para los experimentos con Cu²⁺ inmovilizado.

No. Inyecciones	22
Intervalo entre inyección e inyección	300 (s)
Volumen inyección	10 (μl)
Velocidad agitación	400 (rpm)

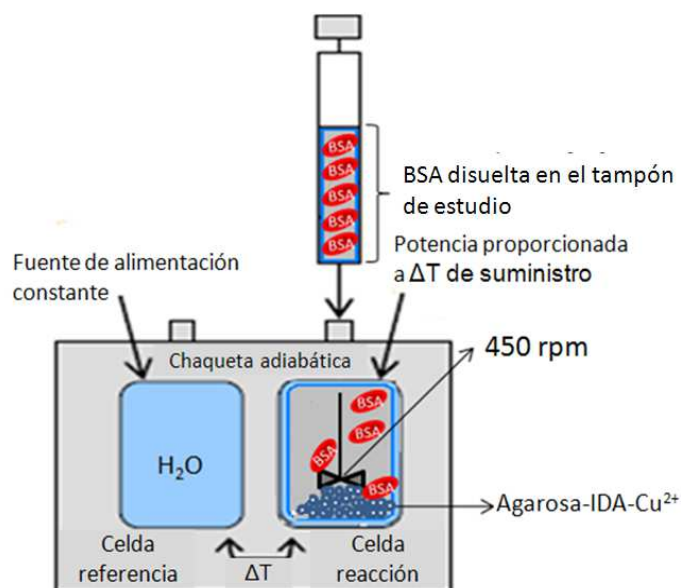


Figura 4-16. Esquema de los experimentos llevados a cabo mediante la técnica ITC para el enlace BSA-agarosa-IDA-Cu²⁺.

De acuerdo a la figura 4-16, para llevar a cabo los experimentos de enlace BSA-Cu²⁺ inmovilizado se procedió de la siguiente manera: Se utilizó una jeringa de 250 µl, la cual fue llenada con una solución de 0,6 mM de proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, la cual fue inyectada (de acuerdo a las especificaciones recogidas en la tabla 4-8) en la celda de reacción donde se colocó el Cu²⁺ inmovilizado en el soporte de Sefarosa CL-6B (concentración de Cu²⁺ 0,74 mM), previamente suspendido en solución fosfato pH 4,5. La velocidad de agitación fue de 400 rpm con el fin de garantizar que el soporte sólido no se depositara en el fondo de la celda de reacción.

Asimismo, para evaluar el enlace de la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 se utilizó una jeringa de 250 µl, la cual fue llenada con una solución de 0,5 mM de proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, la cual fue inyectada (de acuerdo a las especificaciones recogidas en la tabla 4-9) en la celda de reacción donde se colocó el Cu²⁺ inmovilizado en el soporte de Sefarosa CL-6B (concentración de Cu²⁺ 0,025 mM), previamente suspendido en solución fosfato pH 4,5. La velocidad de agitación fue de 400 rpm con el fin de garantizar que el soporte sólido no se depositara en el fondo de la celda de reacción.

De igual forma que en el caso de los experimentos con el Cu²⁺ en estado libre, al calor de dilución experimental se le restó el obtenido en una valoración blanco que consistió en llevar a cabo un experimento en idénticas condiciones, solo que en la jeringa se colocó el tampón correspondiente sin proteína.

Para ajustar las curvas de ruptura obtenidas a partir del flujo de calor procedente de las alícuotas, para obtener la relación de equilibrio, se utilizó un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados (ajuste independent software launch nano-analyze suministrado por TA Instruments, anexo F) y las concentraciones tanto de la proteína como del ligando (Cu²⁺). De esta forma pudieron obtenerse los valores de la estequiometría (n_b), el cambio en la entalpía (ΔH), y la constante de equilibrio de enlace K_b .

4.5.3. Experimentos ITC con Cu^{2+} en estado libre para el enlace de la enzima CAT.

Los parámetros termodinámicos de enlace del Cu^{2+} -CAT fueron calculados usando un nano-ITC a diferentes temperaturas 296, 298, 300, 302 y 304 K.

El procedimiento previo para iniciar los experimentos en el nano-ITC, fueron iguales que los descritos en el apartado 4.6.1., para los experimentos con la proteína BSA. De igual forma los parámetros establecidos para llevar a cabo los experimentos, son los mismos utilizados para la proteína BSA los cuales están recogidos en la tabla 4-6.

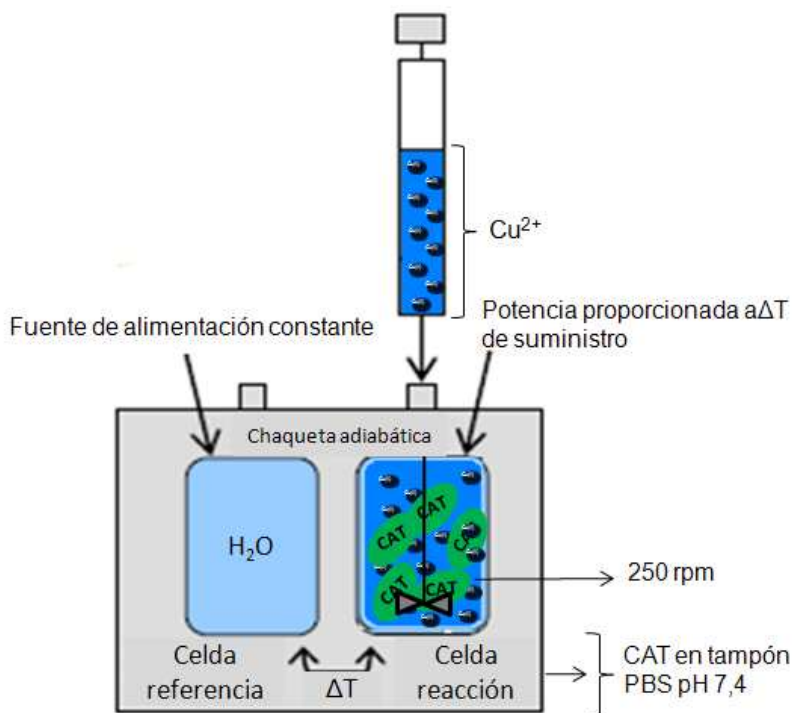


Figura 4-17. Esquema de los experimentos llevados a cabo mediante la técnica ITC, para el enlace de la enzima CAT- Cu^{2+} .

La experimentación se realizó siguiendo la figura 4-17 de la siguiente manera:

Para evaluar el enlace de la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 se utilizó una jeringa de 250 μl , la cual se llenó con una disolución de 6 mM de CuCl_2 con el fin de valorar la muestra de la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 0,1 mM contenida en la celda de reacción.

La velocidad de agitación fue de 250 rpm, para garantizar que la mezcla fuera homogénea, evitando la formación de espuma por la enzima en disolución.

Al calor de dilución experimental se le resta el obtenido en una valoración blanco que consistió en llevar a cabo un experimento en idénticas condiciones, solo que en la celda de reacción se colocó únicamente la solución tampón sin la enzima.

De igual forma que para los experimentos llevados a cabo con la proteína BSA, los parámetros termodinámicos (ΔH , K_b , n_b) fueron calculados mediante el software launch nanoanalyze suministrado por TA Instruments (Anexo F). El error de los experimentos está en torno al 20%, y para cada temperatura se llevaron a cabo 5 experimentos con el fin de comprobar su error y reproducibilidad.

Para ajustar las curvas de ruptura obtenidas a partir del flujo de calor procedente de las alícuotas, con el fin de obtener la relación de equilibrio, se utiliza un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados (ajuste independent software launch nano-analyze suministrado por TA Instruments, anexo F) junto con las concentraciones tanto de la proteína como del ligando (Cu^{2+}). De esta forma pueden obtenerse los valores de la estequiometría (n), el cambio en la entalpía (ΔH), y la constante de equilibrio de enlace K_b .

4.5.4. Experimentos ITC con el Cu^{2+} inmovilizado para el enlace de la enzima CAT

Para llevar a cabo los experimentos de enlace de la enzima CAT y el Cu^{2+} en estado inmovilizado, se utilizó el adsorbente descrito previamente en el apartado 4.67.2.1., debido a que como se mencionó anteriormente, las condiciones del equipo ITC, no hace posible utilizar el adsorbente en forma de gel, sino que debe ser en forma de partículas. Para ello se utilizó la sefarosa CL-6B, sobre la cual se

inmovilizó el Cu^{2+} , de acuerdo a una modificación en el método descrito por Armisen *et al*; 1999.

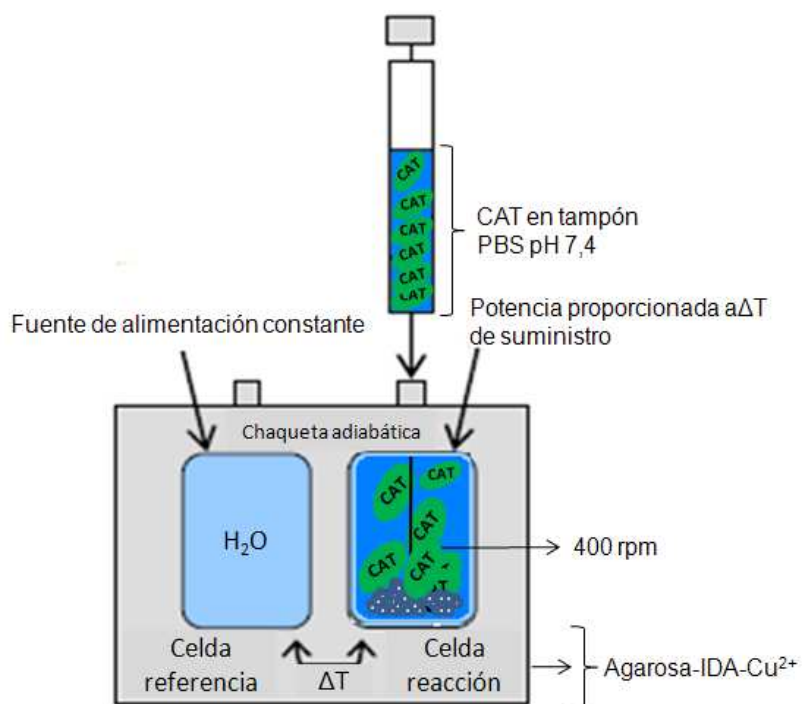


Figura 4-18. Esquema de los experimentos llevados a cabo mediante la técnica ITC para el enlace CAT-agarosa-IDA- Cu^{2+} .

De acuerdo a la figura 4-18, para llevar a cabo los experimentos de enlace CAT-agarosa-IDA- Cu^{2+} se procedió de la siguiente manera:

Se utilizó una jeringa de 250 μl , la cual fue llenada con una solución de 1,0 mM de enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, la cual fue inyectada (de acuerdo a las especificaciones recogidas en la tabla 4-8) en la celda de reacción donde se colocó el Cu^{2+} inmovilizado en el soporte de Sefarosa CL-6B (concentración de Cu^{2+} 0,05 mM), previamente suspendido en solución fosfato pH 4,5. La velocidad de agitación fue de 400 rpm con el fin de garantizar que el adsorbente sólido no se depositara en el fondo de la celda de reacción.

Al calor de dilución experimental se le restó el obtenido en una valoración blanco que consistió en llevar a cabo un experimento en idénticas condiciones, solo que en la jeringa se colocó únicamente tampón PBS pH 7,4 sin la enzima.

Para ajustar las curvas de ruptura obtenidas a partir del flujo de calor procedente de las alícuotas, para obtener la relación de equilibrio, se utiliza un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados (ajuste independent, software launch nano-analyze suministrado por TA Instruments, anexo F) y las concentraciones tanto de la enzima como del ligando (Cu^{2+}). De esta forma pueden obtenerse los valores de la estequiometría (n), el cambio en la entalpía (ΔH), y la constante de unión K_b .

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

5.1. Estudio adsorción/elución de la proteína BSA en el sistema formado por un monolito cerámico recubierto de agarosa D5 y activado con 1,4-butanodiol-diglicidil-éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético IDA, como agente quelante y Cu^{2+} como ligando, BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+} .

Como se ha mencionado, la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) ha sido utilizada ampliamente en la separación y purificación de proteínas (Porath *et al*; 1975; Porath, 1992; Gutiérrez *et al*; 2007). De tal forma que los aminoácidos que se encuentran en las proteínas se unen de forma selectiva a iones metálicos como $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ entre otros (Oyrton *et al*; 1999) a través de cadenas presentes en la superficie de las mismas como por ejemplo la histidina, llevándose allí a cabo el proceso de enlace de alta selectividad de tipo reversible (Arnold, 1991; Hemdan, 1989; Yip *et al*; 1989).

En este tipo de sistemas cromatográficos lo más habitual es la utilización de columnas cromatográficas empaquetadas con un relleno aleatorio de partículas sólidas (Gutiérrez *et al*; 2007).

Las columnas que usan éste tipo de relleno, generan grandes gradientes de presión debido a una alta compacidad y además de quedarse poros y espacios vacíos dentro de la misma, lo que genera una reducción en el transporte de materia.

También han sido probados diferentes tipos de membranas como soportes alternativos en cromatografía de afinidad, presentando ventajas con respecto a soportes tradicionales compuestos por partículas sólidas porosas. (Iwata *et al*; 1991; Graselli *et al*; 1999; Liu *et al*; 2003; Camperi *et al*; 2004; Serpa *et al*; 2005; Lee *et al*; 2009; Ke *et al*; 2010).

Otro tipo de soportes para llevar a cabo separaciones y purificaciones biológicas en cromatografía de afinidad son los monolitos (Motokawa *et al*; 2002; Satínský *et al*; 2003; Tanaka *et al*; 2002; Eeltink *et al*; 2004; Xie *et al*; 2005; Nogueira *et al*; 2006; Josic and Clifton, 2007; Nuñez *et al*; 2008, Walsh *et al*; 2012; Martín del Valle *et al*; 2003).

La sencillez de la preparación de los métodos in-situ y la gran variedad de esquemas de purificación fácilmente disponibles hacen de la cromatografía por medio de monolitos una alternativa atractiva.

Los monolitos cerámicos son soportes de tipo natural que debido a su relación superficie/volumen, presentan una pérdida de carga muy baja con respecto al flujo; la compacta geometría y excelentes propiedades mecánicas, son valiosas características en el diseño de columnas de cromatografía de afinidad estándar reutilizables. Es por esta razón que el objetivo principal de este trabajo es el uso de monolitos cerámicos como soporte cromatográfico.

La reutilización de columnas, es una importante consideración para el desarrollo de procesos de separación, cuando se tiene en cuenta la cantidad de producción por unidad de volumen de columna y que repercute en los costes de producción.

Debido al coste y al tiempo de inactividad necesario para regenerar las columnas cromatográficas, el rendimiento depende en gran medida de la utilización de la misma columna para llevar a cabo varios ciclos de adsorción/elución sin una pérdida significativa de la adsorción.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, uno de los objetivos del presente trabajo, es el estudio de la eficiencia de la adsorción/elución, tras varios ciclos de reuso de la columna cromatográfica monolítica, para el sistema formado por la proteína Suero de albúmina bovina (BSA), sobre un monolito cerámico recubierto por agarosa tipo D5, activado con 1,4-butanodiol-diglicidil-éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante, y Cu^{2+} como ligando.

Se eligió la proteína BSA, como proteína tipo, debido a que ha sido ampliamente estudiada y de la cual se conocen prácticamente todas sus características (Yamasaki *et al*; 1990; Poveit *et al*; 2011; Majorek *et al*; 2012). Además, ha sido empleada en numerosos estudios de adsorción/elución basados en la técnica IMAC (Peters and Blumenstock, 1967; Iwata *et al*; 1991; Su *et al*; 1998; Valenti *et al*; 2007).

La estructura correspondiente del sistema BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+} se muestra en la figura 5-1.

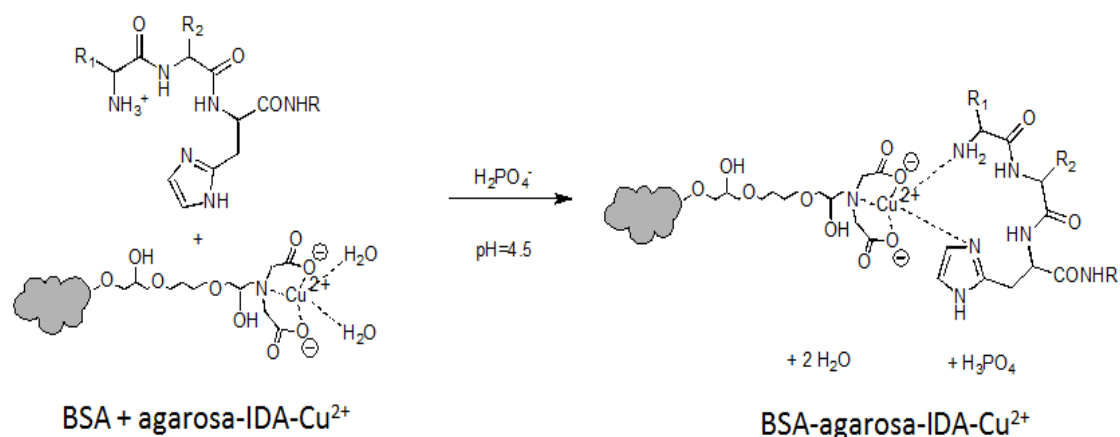


Figura 5-1. Estructura del sistema BSA-agarosa-IDA-Cu²⁺.

Los caudales utilizados para llevar a cabo los experimentos de adsorción para la proteína BSA fueron 1,50, 5,50, 8,40, 10,60 y 14,0 cm³/min. Estos caudales fueron escogidos, debido a que al utilizar una columna monolítica, la pérdida de carga es menor, y de esta forma es posible trabajar con caudales más altos que los usados comúnmente en columnas empaquetadas con partículas. Los caudales anteriormente propuestos, son similares a los utilizados por Martín del Valle *et al*; (2003) (4,5, 6,5 y 12 cm³/min) para la separación de L-asparaginasa y Tripsina usando monolitos cerámicos como fase estacionaria.

Por otra parte, las soluciones tampón utilizadas, para llevar a cabo los experimentos de adsorción fueron las siguientes:

- **Solución fosfato pH 4,5:** Fue seleccionado, con el fin de estudiar el comportamiento del proceso de adsorción a un pH cerca del punto isoeléctrico de la proteína BSA (pH al cual la carga media de la proteína es cero), donde prácticamente no existen cargas. A éste pH se llevaron experimentos de adsorción, utilizando los cinco caudales propuestos anteriormente, con el fin de determinar cuál era el caudal óptimo de trabajo y de esta manera utilizar dicho caudal en los posteriores estudios de adsorción/elución a diferentes soluciones tampón.
- **Tampón fosfato pH 7,0:** Una vez establecido el comportamiento del sistema a un pH 4,5, se procedió a llevar a cabo experimentos de adsorción con tampón fosfato a pH 7,0, debido a que es un tampón que ha sido utilizado en procesos de adsorción, en columnas empaquetadas con partículas de agarosa, activada con el grupo epoxi (Mateo *et al*; 2002;

Gutiérrez *et al*; 2006; Gutiérrez *et al*; 2007), el cual se ha utilizado en la presente investigación.

A éste pH se llevaron a cabo experimentos de adsorción/elución, con caudal de $14,0 \text{ cm}^3/\text{min}$, debido a que como se comprobará más adelante, es el caudal que mejores resultados proporcionó en cuanto a eficiencia de adsorción.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, el esquema propuesto en la figura 5-2, resume los sistemas que se estudiaron para llevar a cabo los procesos de adsorción de la proteína BSA, utilizando como fase estacionaria un monolito cerámico.

En esta investigación no se llevó a cabo un diseño factorial de experimentos, debido a que las variables a analizar eran únicamente dos, el caudal y el pH.

Asimismo, las propiedades físicas de los monolitos cerámicos empleados como fase estacionaria (previamente descritas en el apartado 4.3.1), para llevar a cabo los experimentos de adsorción/elución para la proteína BSA, se recogen en la tabla 5-1 y 5-2 respectivamente.

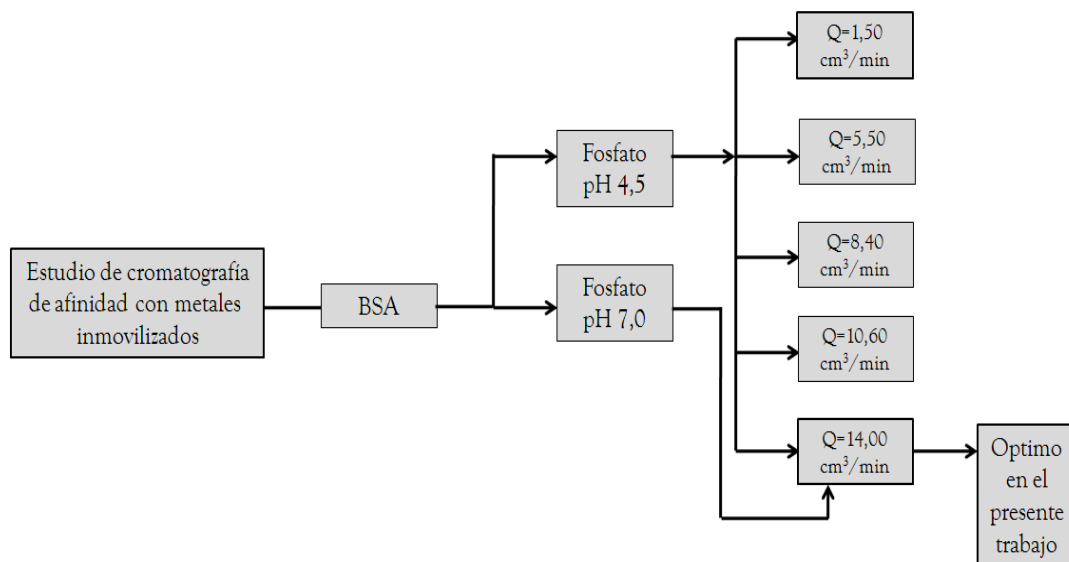


Figura 5-2. Esquema representativo de los sistemas estudiados para la adsorción de la proteína BSA.

Tabla 5-1. Propiedades físicas de los monolitos empleados en los experimentos de adsorción/elución, llevados a cabo en solución fosfato 50 mM pH 4,5.

Propiedades/Monolito	1	2	3	4	5
↓ Caudal(cm ³ /min) →	1,50	5,50	8,40	10,60	14,00
Diámetro (cm)	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
Peso (g)	4,54	4,53	4,53	4,58	4,45
Longitud (cm)	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50
Volumen (cm ³)	11,76	11,76	11,76	11,88	11,56
Recubrimiento de agarosa (g)	2,25	1,79	3,07	3,04	2,03
Área total de la superficie (cm ²)	211	210	204	209	209
Espesor del recubrimiento de agarosa (µm)	108	86	152	147	98

Tabla 5-2. Propiedades físicas de los monolitos empleados en los experimentos de adsorción/elución, llevados a cabo en tampón fosfato 50 mM pH 7,0 a un caudal de 14,0 cm³/min.

Propiedades/Monolito	Tampón fosfato pH 7,0
↓	
Diámetro (cm)	1,30
Peso (g)	4,52
Longitud (cm)	7,50
Volumen (cm ³)	11,75
Recubrimiento de agarosa (g)	2,59
Área total de la superficie (cm ²)	210
Espesor del recubrimiento de agarosa (µm)	124

El método utilizado para llevar a cabo el estudio de la eficiencia de adsorción, para varios ciclos de reutilización de la columna monolítica, se muestra esquemáticamente en la figura 5-3, de igual forma dicho método se describirá a continuación.

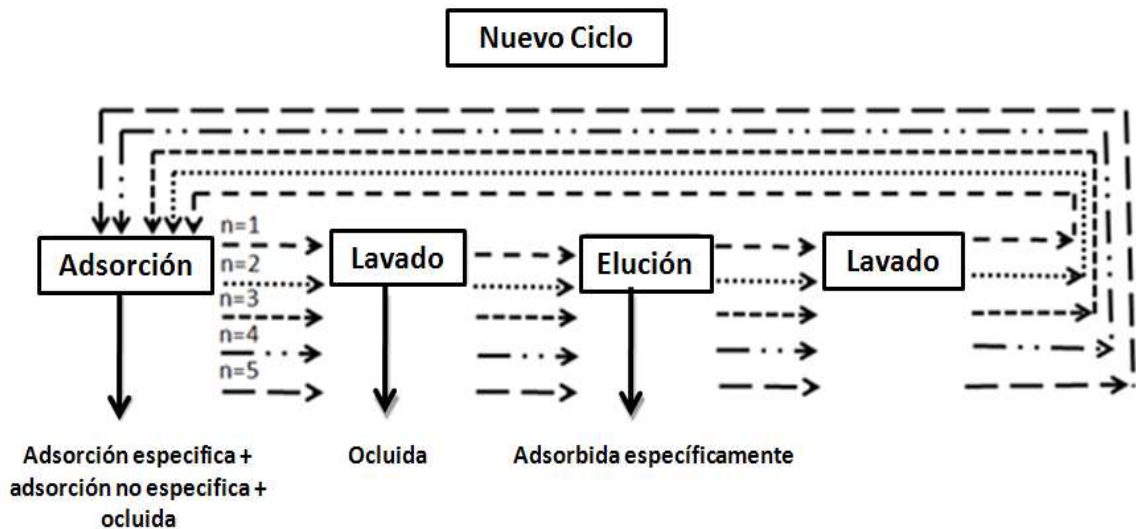


Figura 5-3. Experimentos realizados para estudiar la eficiencia de la matriz cromatográfica.

De acuerdo a la figura 5-3, el primer ciclo de adsorción/elución se define como la utilización del adsorbente (fresco) equivalente a $n=1$, el siguiente ciclo correspondiente a la primera reutilización se denomina $n=2$, el tercer ciclo, correspondiente a la segunda reutilización se denomina $n=3$, el cuarto ciclo, correspondiente a la tercera reutilización se denomina $n=4$, y el quinto ciclo, correspondiente a la cuarta reutilización se denomina $n=5$.

Para llevar a cabo los experimentos de adsorción, se hizo recircular en continuo, a través de una columna de afinidad XK-16 Pharmacy (previamente empacada con un monolito cerámico activado), 50 ml de una solución de proteína BSA con una concentración y caudal conocido. La adsorción de la proteína en la columna, fue seguida mediante la toma de una alícuota de 1 cm^3 cada 20 minutos y se midió la concentración de proteína midiendo la absorbancia de la muestra con un espectrofotómetro UVICON 922, a una longitud de onda de 280 nm, hasta que la concentración de proteína alcanzara un valor constante, indicando que la columna estaba saturada y la absorbancia de la muestra proteína se midió por

medio de un espectrofotómetro UVICON 922, a una longitud de onda de 280 nm, hasta que la concentración de proteína BSA en la muestra a medir alcanzara un valor constante, indicando que el proceso de adsorción había alcanzado el equilibrio.

La figura 5-4 muestra esquemáticamente el proceso de adsorción anteriormente descrito:

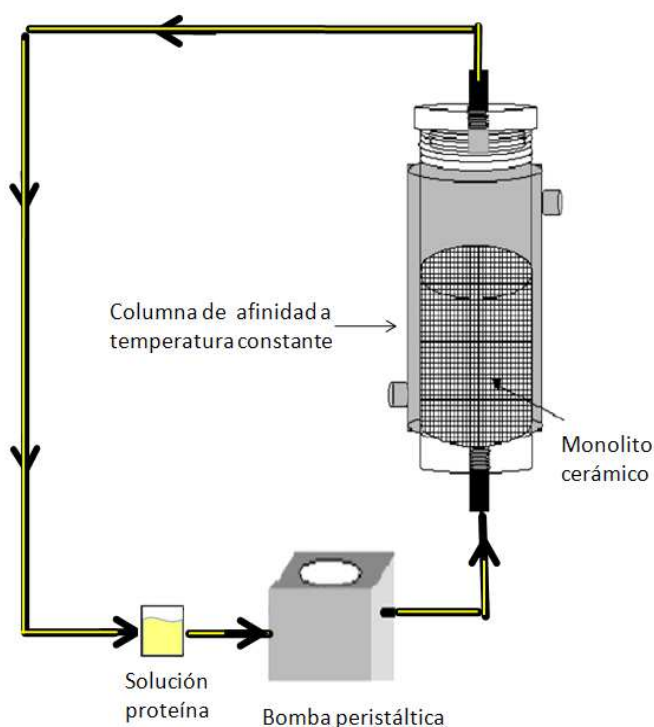


Figura 5-4. Esquema del proceso de adsorción.

Una vez concluido el proceso de adsorción, con el fin de eliminar la proteína que había quedado retenida en el adsorbente mediante enlaces no-específicos, se hizo circular a través de la columna a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, solución fosfato pH 4,5, tampón usado para disolver la proteína previamente.

Para llevar a cabo esta operación, se tomó una muestra a la salida de la columna cada 10 minutos, cuya absorbancia fue medida a 280 nm, hasta que la concentración medida de proteína BSA alcanzara el valor de cero, indicando que no era posible eluir más proteína.

Tras el proceso de elución de la proteína adsorbida no específicamente, se procedió a realizar la elución de la proteína enlazada específicamente en el adsorbente.

Para éste procedimiento se utilizó un inhibidor competitivo, el imidazol, que es un intermediario de la biosíntesis de la histidina, aminoácido que se encuentra en la superficie de las proteínas. Así, el imidazol se encuentra en las cadenas laterales de este aminoácido, de forma que dada la capacidad de este como especie dadora de electrones y por disponer de un anillo pentagonal nitrogenado, hace que presente una gran afinidad por los iones metálicos.

En la técnica IMAC y de acuerdo con Sulkowski, 1985 y Porath *et al*; 1992, las proteínas son retenidas sobre el metal inmovilizado quelado a través de cadenas laterales de residuos de histidina. Por lo tanto es posible recuperar las proteínas retenidas mediante enlaces específicos con imidazol por competición ya que es otra especie donante de electrones.

Es por esta por la razón que éste compuesto ha sido utilizado para la elución de la proteína BSA por varios autores (Jayabharathi *et al*; 2011; Jayabharathi *et al*; 2012; Pathange *et al*; 2006; Roos, 1991; Vunnun and Cramer, 1996; Wizerling *et al*; 1992; Wang *et al*; 2008).

Para llevar a cabo el proceso de elución, se hizo circular por la columna una solución de imidazol 0,2 M en tampón PBS pH 7,4 a un caudal de 1,50 cm³/min. Se tomaron muestras de alícuotas a la salida de la columna, las cuales se analizaron por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm. El proceso de elución continuó hasta que la concentración de proteína BSA medida era no-detectable.

Para elegir esta concentración de imidazol, se llevaron a cabo estudios de elución previos a las concentraciones de 0,01, 0,1, 0,2, y 0,3 M de imidazol en tampón PBS pH 7,4, donde se encontró que los mejores resultados en cuanto a recuperación de proteína eran para la concentración de 0,2 M.

En la figura 5-5 se muestra gráficamente los resultados obtenidos.

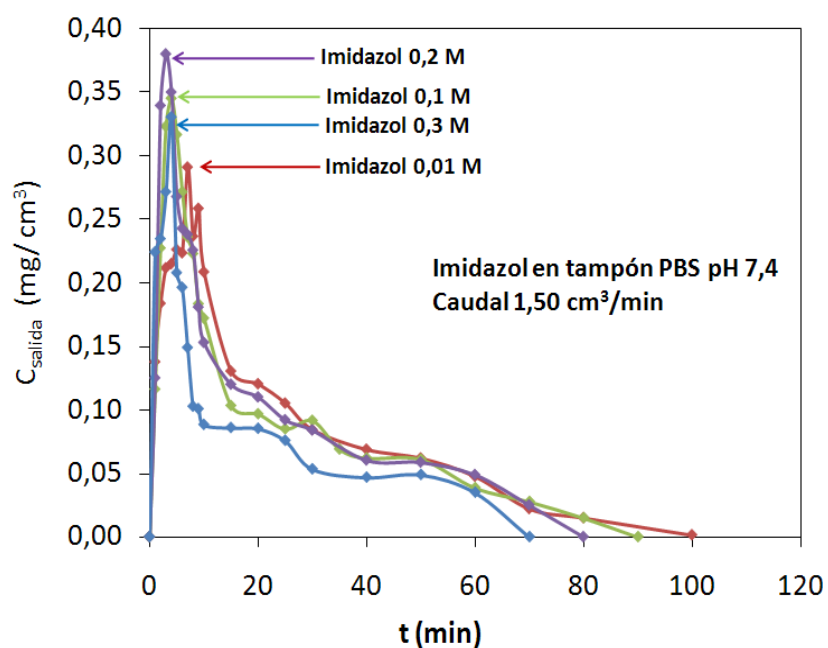


Figura 5-5. Efecto de la concentración de imidazol en la elución de la proteína BSA adsorbida en solución fosfato pH 4,5 y 298K.

Asimismo, con el fin de seleccionar el caudal de trabajo óptimo, se llevaron a cabo experimentos de elución a los siguientes caudales: 1,50, 2,50, 3,75 y 5,0 cm³/min. Los caudales propuestos son similares a los utilizados por Wang *et al*; 2008, para llevar a cabo el proceso de elución utilizando 0,2 M de imidazol para eluir proteína BSA en un sistema de criogel en canales. Estos autores encontraron que a caudales bajos el tiempo de elución es mayor para lograr el equilibrio de dicho proceso. Cuando se trabaja a caudales más altos tales como 4 o 6 cm³/min, el tiempo para llevar a cabo el proceso de elución es menor, lo cual podría conllevar a una disminución en la eficiencia de elución.

En la figura 5-6 se muestra gráficamente los resultados obtenidos.

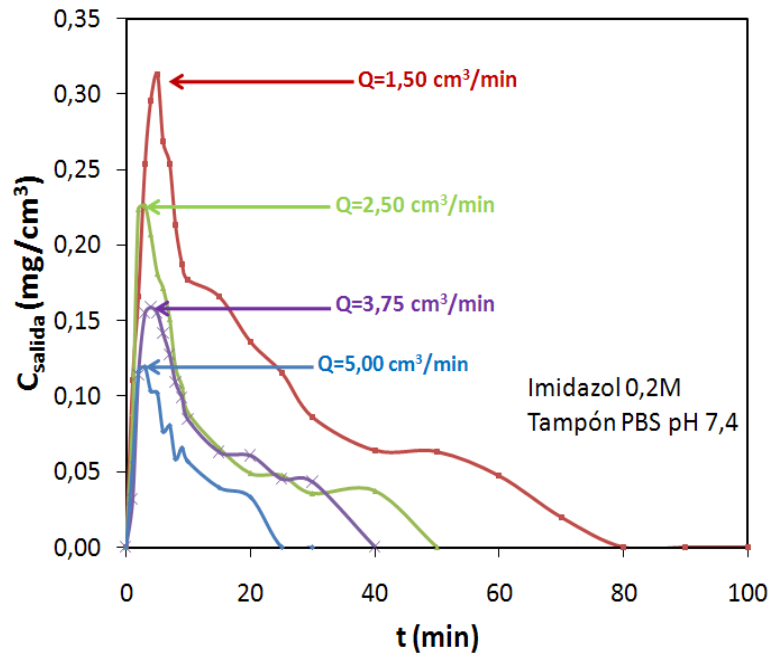


Figura 5-6. Curvas de elución de la proteína BSA adsorbida en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para distintos caudales de elución.

En la figura 5-6 se puede observar, que a medida que aumenta el caudal, el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso de elución disminuye. Así, para el caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, el tiempo medio para que se completase el proceso de elución es de aprox. 80 min, para el caudal de $2,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ es 50 min, para el caudal de $3,75 \text{ cm}^3/\text{min}$ es de 40 min y finalmente para el caudal de $5,00 \text{ cm}^3/\text{min}$ el tiempo requerido para completar la elución es de 30 min.

Por tanto, al aumentar el caudal, el tiempo necesario para conducir el proceso de elución es menor, posiblemente siendo un tiempo insuficiente para que en el proceso se pudiera recuperar toda la proteína. Éste comportamiento es similar al expuesto por Wen-Chie and Chi-Hao (2001) donde obtuvieron que para un soporte basado en partículas no porosas el proceso de elución requería menor tiempo a un mayor caudal, siendo más confiable el pico de elución a un caudal más bajo. Es por esta razón que se decidió llevar cabo los procesos de elución utilizando el caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, con el fin de garantizar que el proceso de elución pudiera alcanzar el equilibrio.

Una vez culminado el proceso de elución, la columna es lavada con tampón tris-HCl pH 8,0 aproximadamente por dos horas con el fin de eliminar el imidazol que ha quedado en el adsorbente, ya que al generar un gradiente de pH, el tampón tris actúa como un donador de protones, siendo capaz de eluirlo. Esta eliminación

de imidazol se monitoreo por absorbancia a 280 nm midiendo alícuotas a la salida de la columna hasta que la absorbancia presentara un valor de cero (tabla 5-3).

Por lo tanto, este paso es fundamental llevarlo a cabo después de cada proceso de elución con imidazol con el fin de condicionar la columna para el siguiente ciclo de adsorción.

Adicionalmente se pudo comprobar que utilizando un pH más alto de tampón tris, la eliminación de imidazol se efectuaba de la misma forma, solo que en menor tiempo. Sin embargo se decidió trabajar al pH de 8,0 debido a que es el pKa de este tampón.

En la tabla 5-3 se muestra a manera de ejemplo los datos monitoreados de absorbancia de la remoción de imidazol de la columna monolítica.

Tabla 5-3. Datos de absorbancia a 280 nm de la eliminación de imidazol de la columna cromatográfica después de un proceso de elución, $Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

t (min)	Abs 280
0	
10	0,2527
20	0,2257
30	0,2133
40	0,1891
50	0,1821
60	0,1658
80	0,1413
90	0,1367
100	0,1358
120	0,0787
140	0,0528
160	0,0128
180	0

De tal forma que concluyendo el lavado de la columna con tampón tris-HCL pH 8,0, la matriz estaría lista para el siguiente ciclo de adsorción.

Como se mencionó anteriormente, la cantidad de proteína eluida con imidazol, es la proteína que se une específicamente a la matriz. De tal forma que si se supone que una molécula de imidazol desplaza una molécula de proteína adsorbida específicamente (relación 1:1), el número de moles de imidazol utilizado para eluir la proteína sería igual al número de moles de proteína adsorbida específicamente. También, cabe señalar que el imidazol, al desplazar la proteína ligada a los sitios de Cu^{2+} , ocupa el sitio dejado por la proteína. Por lo tanto en una nueva reutilización del adsorbente, aunque se haya lavado con tampón tris previamente, es posible que haya menos sitios de Cu^{2+} disponibles debido a que el tris no sea capaz de eliminar todo el imidazol que ha ocupado el sitio de Cu^{2+} donde previamente estaba enlazada la proteína BSA. Por lo tanto en una nueva reutilización, la capacidad de adsorción de la columna monolitica, se ve reducida, como se comprobaba más adelante.

En la figura 5-7 se muestra esquemáticamente el proceso descrito anteriormente.

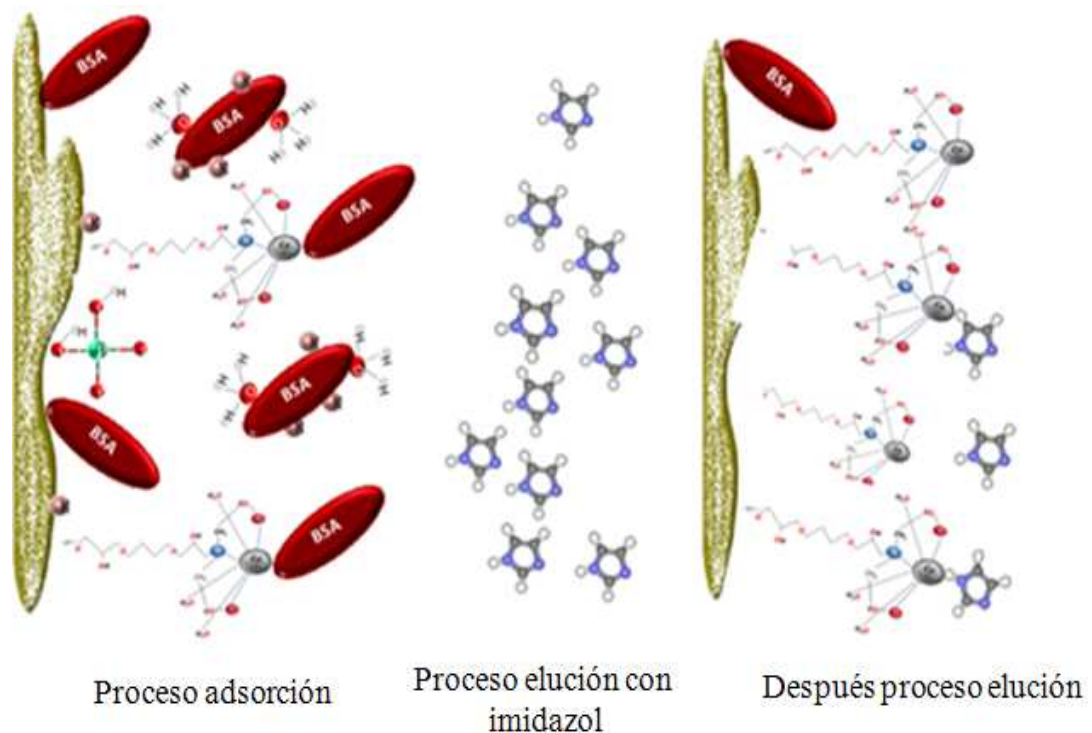


Figura 5-7. Figura representativa de los sitios de Cu^{2+} ocupados por el imidazol.

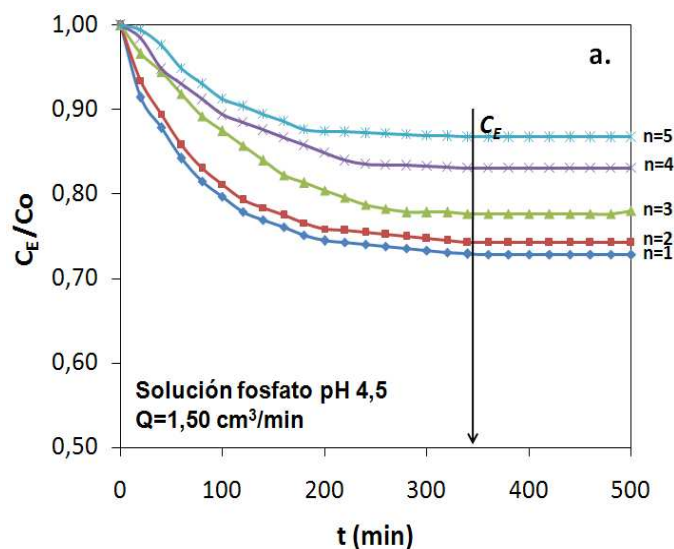
De acuerdo a lo anteriormente descrito, se puede definir el tiempo de un ciclo t_{ciclo} como el tiempo necesario para llevar a cabo un ciclo completo de adsorción/elución. El ciclo involucra tanto el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso de adsorción t_{ads} y los tiempos requeridos para llevar a cabo la elución y el lavado de la columna monolítica. Teniendo en cuenta que en el intermedio de las etapas de lavado se añade 0,5 horas para cada uno de los ciclos, y el proceso de elución se estima que tarda aproximadamente 2 horas, seguido del lavado con tampón Tris-HCl pH 8,0 durante 2 horas más, se puede establecer el tiempo de un ciclo completo como $t_{ciclo} = t_{ads} + 5$ horas.

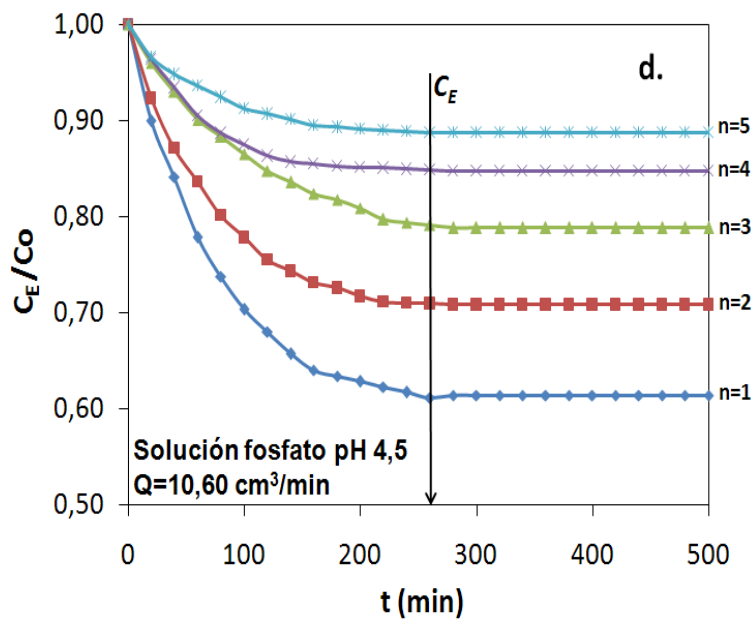
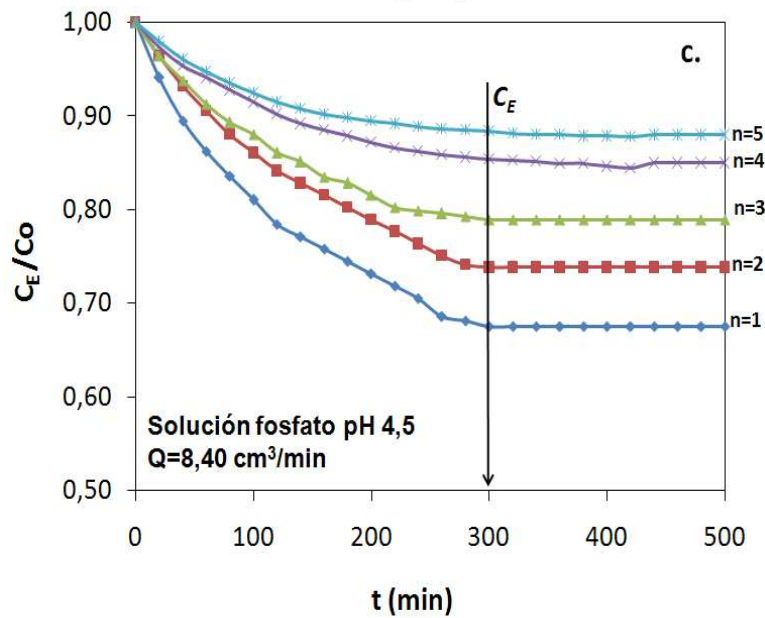
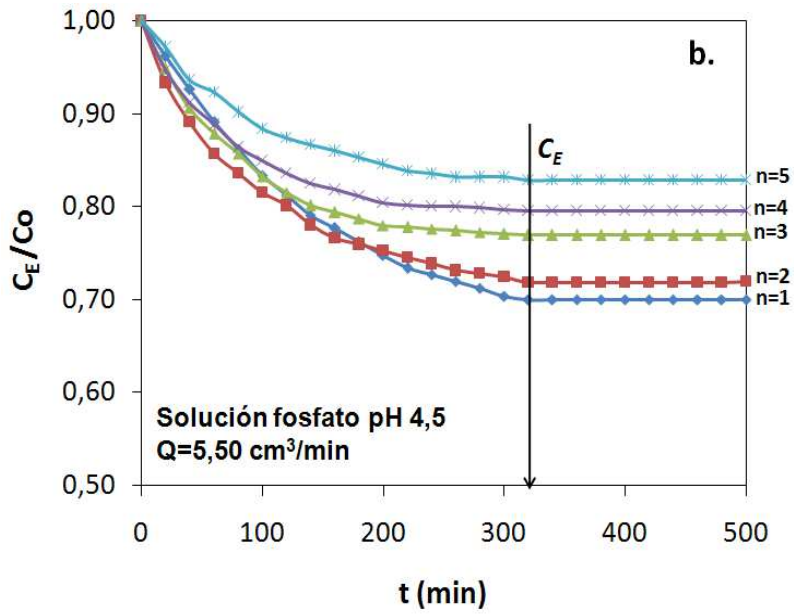
5.1.1. Curvas de equilibrio de adsorción

5.1.1.1. Efecto del caudal

De acuerdo a lo descrito anteriormente, los perfiles de los equilibrios del proceso de adsorción de la proteína BSA, se muestran en la figura 5-8 a, b, c, d y e, para los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5, para cada uno de los caudales estudiados respectivamente. En todos los casos la concentración inicial fue C_0 $1,06 \times 10^{-8}$ mol/cm³ y la temperatura de trabajo 298 K.

De igual forma, en el anexo A se recogen las tablas de datos de concentración en el equilibrio C_E (mol/cm³) frente al tiempo para el proceso adsorción de la proteína BSA para cada uno de los estudios mencionados anteriormente y recogidos en la figura 5-8.





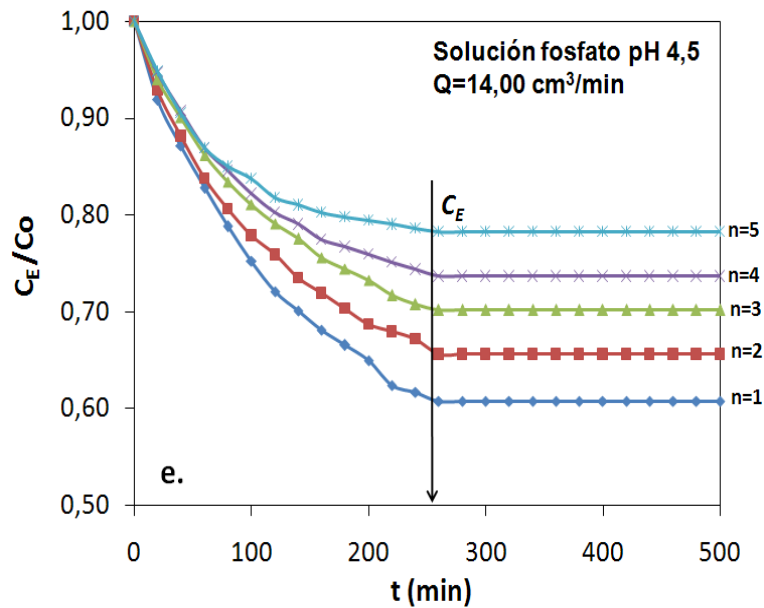


Figura 5-8. Perfiles de equilibrio de adsorción de la proteína BSA, en solución fosfato 50 mM, pH 4,5, 298 K, para los diferentes caudales estudiados.

De forma general se pudo comprobar en primer lugar, que utilizando un mismo caudal en el proceso de adsorción, el tiempo necesario para que el sistema alcanzara el equilibrio era prácticamente el mismo en todas las reutilizaciones (n_1 a n_5). En segundo lugar se observó, que a medida que aumentaba el caudal el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio para un $n=1$ era menor. De esta forma para los experimentos llevados a cabo a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, el tiempo requerido para que el sistema alcanzara el equilibrio fue de 340 minutos aprox., mientras que para el caudal de $14,0 \text{ cm}^3/\text{min}$ el tiempo de equilibrio fue de 260 min aprox. También se pudo establecer de forma general, que a medida que aumentaba el caudal, la capacidad de adsorción de la columna monolítica también aumentaba. Así, para $n=1$ a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, se obtuvo que la relación C_E/C_0 fue de 0,73, mientras que para el caudal de $14,0 \text{ cm}^3/\text{min}$ fue de 0,61; si se observa éste comportamiento para $n=2$, se observa que C_E/C_0 a $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ fue de 0,74, mientras que para el caudal de $14,0 \text{ cm}^3/\text{min}$ fue 0,66.

La variación de la adsorción de equilibrio con el caudal podría explicarse de acuerdo a dos fenómenos. Ambos fenómenos pueden existir simultáneamente y ambos tienen un efecto similar: aumentar la capacidad de adsorción de la columna, lo cual se traduce en una menor concentración en el equilibrio de la solución de proteína.

El primer fenómeno es puramente mecánico, al aumentar el caudal se abren más canales del monolito, aumentando de esta manera el área de la superficie de

adsorción. Éste fenómeno está basado en dos argumentos. El primero se refiere a la naturaleza del recubrimiento con agarosa. A diferencia de los recubrimientos catalíticos secos, la agarosa debe mantenerse húmeda y flexible. Esto hace que haya pequeñas láminas y fibras que pueden desprenderse con cierta facilidad.

El segundo argumento es consecuencia del flujo laminar a muy bajo número de Reynolds dentro de los canales del monolito. El caudal en cada canal, es independiente del flujo en otros canales y es función del diámetro hidráulico del canal (D_{hid}) a la cuarta potencia y del radio hidráulico del canal (R).

$$Q^* \cong RD_{hid}^4 \quad (5-1)$$

Una variación del 50% en el diámetro hidráulico de un canal, hace que el flujo disminuya o aumente 16 veces. Así, los canales afectados por laminillas o fibras pueden estar inactivos a bajos caudales, pero incorporarse al proceso de adsorción para caudales grandes (Bird and Lighfoot, 1962).

El segundo fenómeno podría explicarse teniendo en cuenta, que el complejo IDA-Cu²⁺ es flexible, es decir que no está siempre en una misma posición, de tal manera que es posible que cuando se genera el quelato, el Cu²⁺ no quede de forma accesible a la superficie de la proteína, donde se llevará a cabo el enlace proteína-ligando. De tal forma que si el proceso de adsorción se lleva a caudales bajos como por ejemplo 1,50 cm³/min, con éste flujo másico, los quelatos no son capaces de reorganizarse y por lo tanto la capacidad de adsorción de la matriz sería menor, éste comportamiento se puede explicar de acuerdo a la figura 5-9:

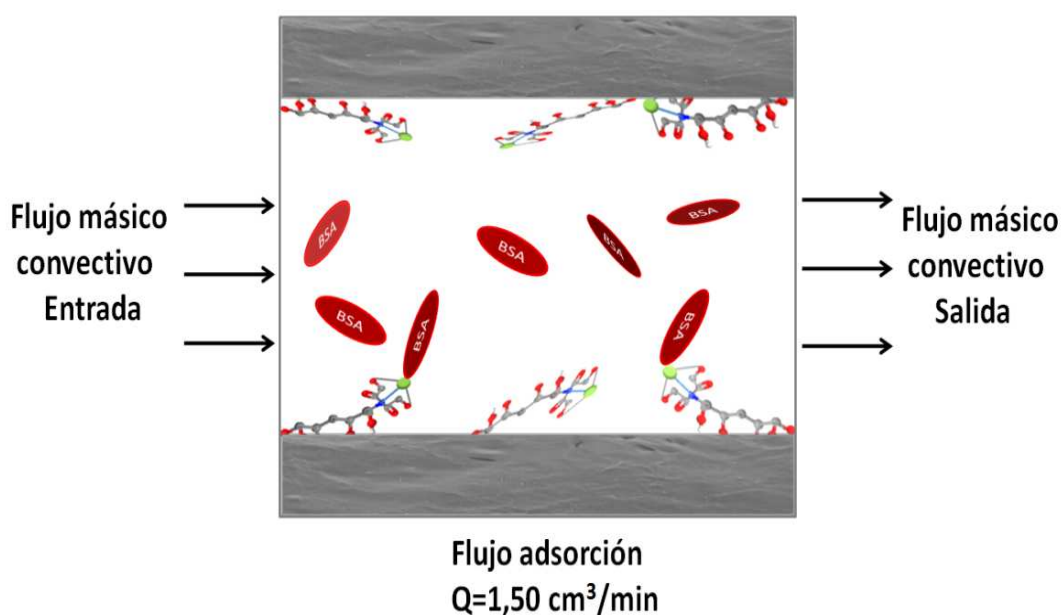


Figura 5-9. Disposición del complejo IDA-Cu²⁺ sobre una matriz microporosa de agarosa a un caudal de 1,50 cm³/min.

La figura 5-9, representa la entrada de proteína por un canal del monolito cerámico, la cual es impulsada por una bomba peristáltica, generando un movimiento convectivo a través del canal.

Para un caudal bajo, los complejos IDA-Cu²⁺ no son capaces de reorganizarse en el espacio y estarían replegados, por lo tanto algunos sitios activos no quedarían disponibles para enlazarse con la proteína presente en la solución.

Sin embargo, al aumentar el caudal para llevar a cabo el proceso de adsorción como 14,0 cm³/min, la estereoquímica del ligando puede verse favorecida, debido a que se genera un estiramiento del quelato que anteriormente estaba plegado. Así, si el ligando está más accesible a la proteína debido a una mejor distribución espacial, la capacidad del adsorbente podría ser mayor.

En la figura 5-10 se muestra esquemáticamente lo anteriormente descrito:

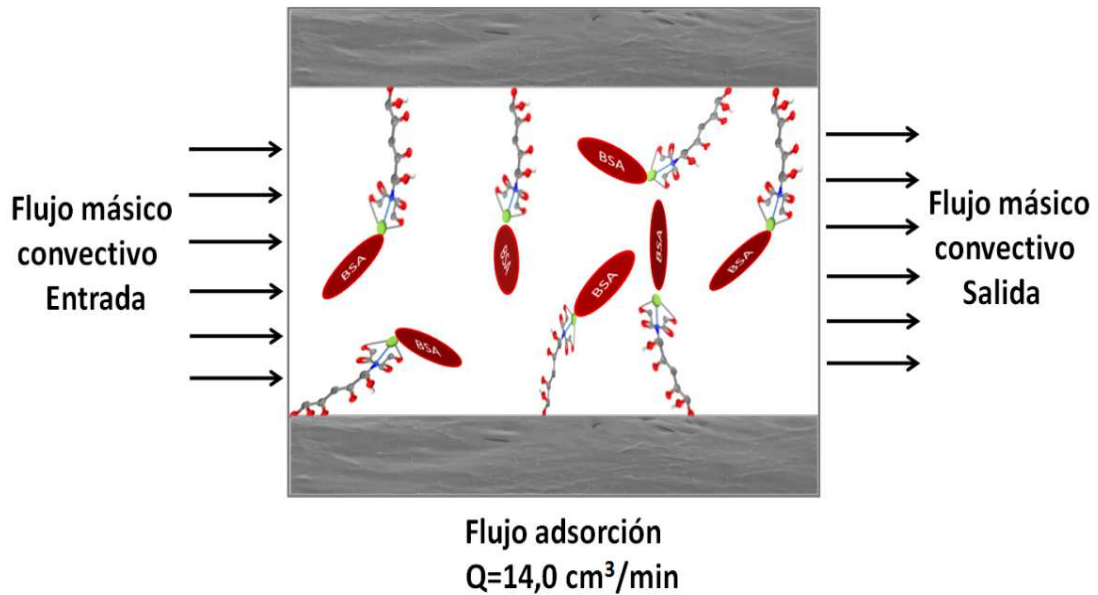


Figura 5-10. Disposición del complejo IDA-Cu²⁺ sobre una matriz microporosa de agarosa a un caudal de 14,0 cm³/min.

De forma general podría decirse que al aumentar el caudal en el proceso de adsorción aumenta la capacidad de adsorción del adsorbente. El aumento de dicha capacidad se debe a un aumento de área disponible para la adsorción y a que las moléculas del ligando son capaces de reorganizarse, de tal manera que son más accesibles a los sitios de enlace de la proteína.

Estos dos fenómenos justificarían que la cantidad de proteína adsorbida sea mayor a medida que aumenta el caudal para llevar a cabo el proceso de adsorción.

Teniendo en cuenta el comportamiento del proceso de adsorción a diferentes caudales, se llevó a cabo un promedio de los valores de C_E para los cinco caudales estudiados, para cada una de las reutilizaciones, con el fin de comprobar si los fenómenos descritos anteriormente, afectan el comportamiento de la adsorción.

Como se mencionó anteriormente, a bajos caudales es posible que no se disponga de toda el área real efectiva de adsorción del monolito, pero a caudales más altos sí. De esta forma al suponer que el área real efectiva de adsorción es la misma, es posible por un lado disminuir el error experimental que conlleva que cada experimento se haga con un monolito independiente, y por otro, ver el comportamiento de las curvas de adsorción independientemente del caudal.

Así, en la figura 5-11 se muestran las curvas promediadas de los experimentos llevados a cabo a los cinco caudales estudiados, donde se observa que a medida

que se reutiliza el monolito cerámico, la capacidad de adsorción disminuye independientemente del caudal utilizado, éste comportamiento implica que el área real disponible de adsorción es un factor relevante en el proceso de adsorción, el cual condiciona la capacidad de adsorción de la matriz.

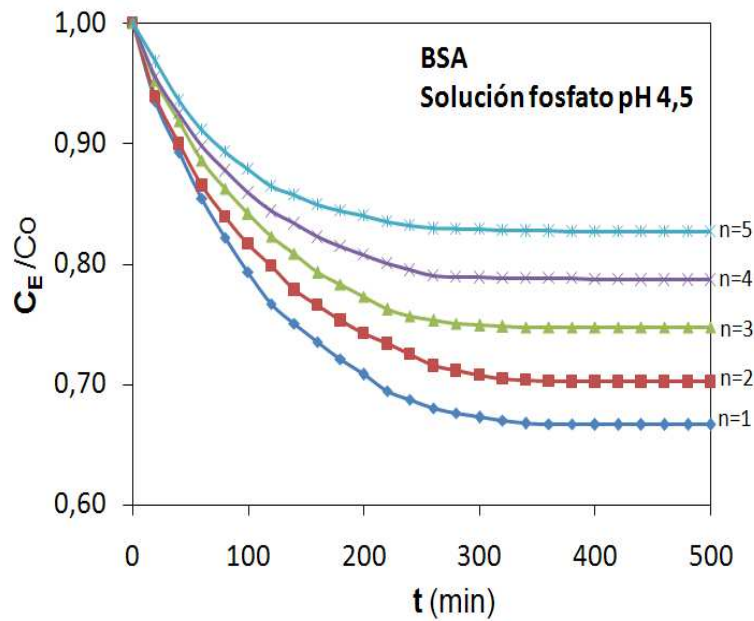


Figura 5-11. Perfiles promediados del equilibrio de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales estudiados con sus correspondientes reutilizaciones.

De esta manera podría decirse que si el área real efectiva de todos los monolitos fuera la misma, sin tener en cuenta que algunos canales estén inactivos por estar parcialmente ocluidos, de tal forma los ligandos estuvieran de forma accesible a la superficie de la proteína, la concentración de proteína adsorbida en el equilibrio sería la misma, independientemente de caudal empleado en el proceso de adsorción y el soporte cerámico disminuiría su capacidad de adsorción con el número de reutilizaciones.

5.1.1.2. Efecto del pH

Una vez establecido que el caudal óptimo de trabajo para este sistema es $14,0 \text{ cm}^3/\text{min}$, se procedió a modificar el pH desde el punto isoeléctrico de la proteína hasta un pH de 7,0. Como se mencionó previamente en el apartado 5.1; se escogió el pH de 7,0 debido a que es un pH que ha sido utilizado en procesos de adsorción en columnas empaquetadas con partículas de agarosa activadas con el grupo epoxi.

La figura 5-12 a y b, representa los perfiles de concentración en función del tiempo para los experimentos llevados a cabo en tampón fosfato pH 7,0 y solución fosfato pH 4,5 a un caudal $14 \text{ cm}^3/\text{min}$.

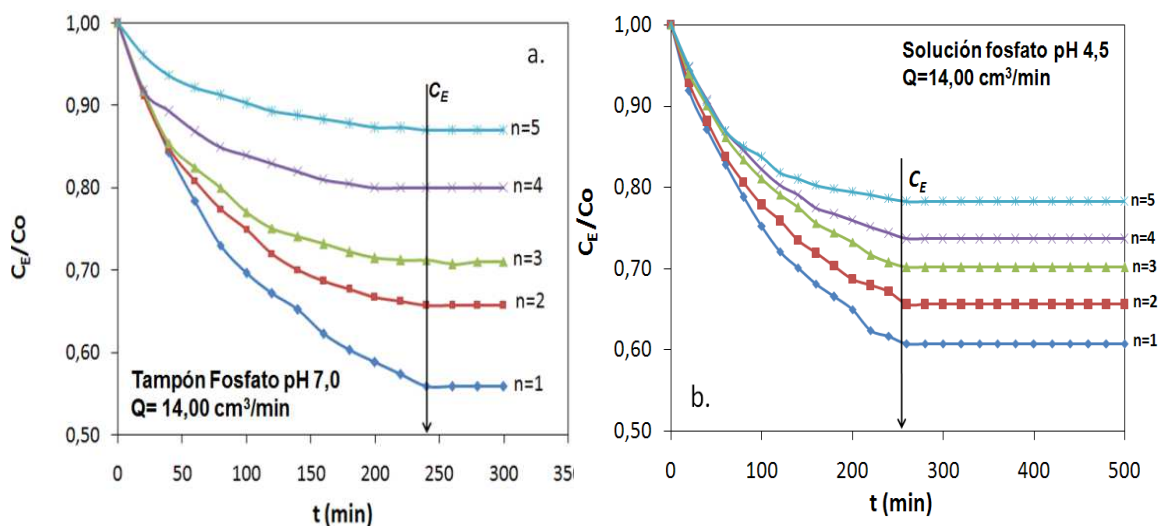


Figura 5-12. Perfiles de equilibrios de adsorción de la proteína BSA, a) en tampón fosfato pH 7,0 y b) solución fosfato pH 4,5 298 K, para el caudal de $14 \text{ cm}^3/\text{min}$.

De forma general, el comportamiento de la figura 5-12 pone de manifiesto que independientemente del pH utilizado, a un caudal de $14 \text{ cm}^3/\text{min}$, el tiempo necesario para que el sistema alcance el equilibrio es prácticamente el mismo.

No obstante se pudo comprobar que aunque las curvas de equilibrio prácticamente eran iguales a las obtenidas para los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4, y $Q=14 \text{ cm}^3/\text{min}$, estas muestran una ligero aumento en la capacidad de adsorción. Así, para $n=1$ en solución fosfato pH 4,5 cm^3/min , se

obtuvo que la relación C_E/C_o fue de 0,61, mientras que para el pH de 7,0 fue de 0,56. Si se observa éste comportamiento para $n=2$, se observa que C_E/C_o a pH 4,5 fue de 0,66, mientras que para pH 7,0 fue 0,65.

El hecho de que el pH utilizado para llevar a cabo el proceso de adsorción se encuentre por encima del punto isoeléctrico de la proteína, podría beneficiar el proceso de adsorción debido a que la proteína está cargada negativamente y por lo tanto se podrían generar más interacciones.

Adicionalmente el hecho de que éste tampón tenga mayor fuerza iónica (anexo B, cálculo de la fuerza iónica, para las soluciones tampón utilizadas), podría beneficiar la interacción entre el Cu^{2+} y los residuos de histidina de la proteína debido al plegamiento de las hélices, haciendo que dichos residuos sean más accesibles.

Ngah *et al*; (2002) obtuvieron un comportamiento similar, para un lecho de bolas (beads) de quitosano, argumentando que el hecho de que se absorba más proteína a un pH más alto puede ser debido a que a pH inferiores, los grupos amino de la proteína se encuentran protonados induciendo a repulsiones electrostáticas con los iones de Cu^{2+} . De esta forma existe una competición entre los protones y los iones de Cu^{2+} por los sitios de adsorción generando una reducción en la capacidad de adsorción de la matriz. Para valores de pH más altos (en torno a 6-7) no se producía este comportamiento.

De acuerdo a lo anteriormente descrito y de forma general se puede decir que según los resultados experimentales obtenidos, el proceso de adsorción aumenta con el caudal y con el pH de la solución.

5.1.2. Curvas de elución

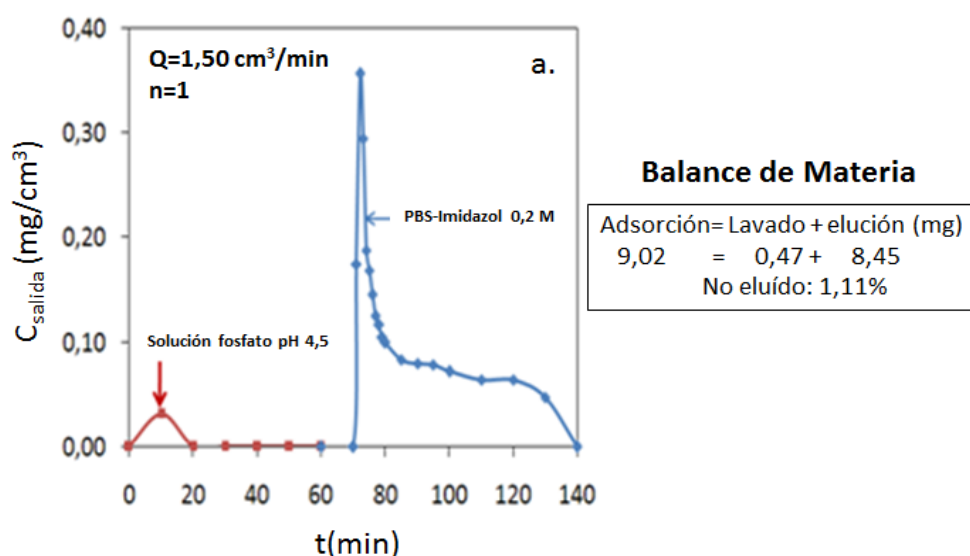
La elución de la proteína BSA se llevó a cabo mediante un proceso de elución competitiva, utilizando imidazol como agente competitivo. Las proteínas que habían sido enlazadas sobre el ion metálico quelado, principalmente a través de las cadenas laterales de los residuos de histidina, son recuperadas mediante una complejación competitiva del ion inmovilizado con el imidazol.

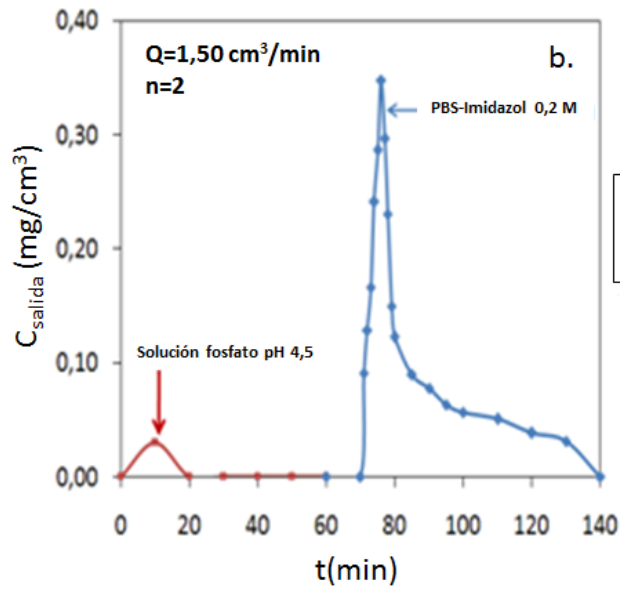
Así, que de acuerdo a lo anteriormente descrito la concentración óptima de imidazol para llevar a cabo el proceso de elución fué 0,2 M en tampón PBS 7,4 a un caudal de trabajo de 1,50 cm³/min.

La figura 5-13 a, b, c, d y e, muestra las curvas de elución correspondiente a los experimentos de adsorción de la proteína BSA llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5 para el caudal de 1,50 cm³/min. De acuerdo al procedimiento descrito anteriormente, las curvas de elución correspondientes a los experimentos de adsorción llevados a cabo a 5,50, 8,40, 10,60 y 14,00 cm³/min, se recogen en el anexo C.

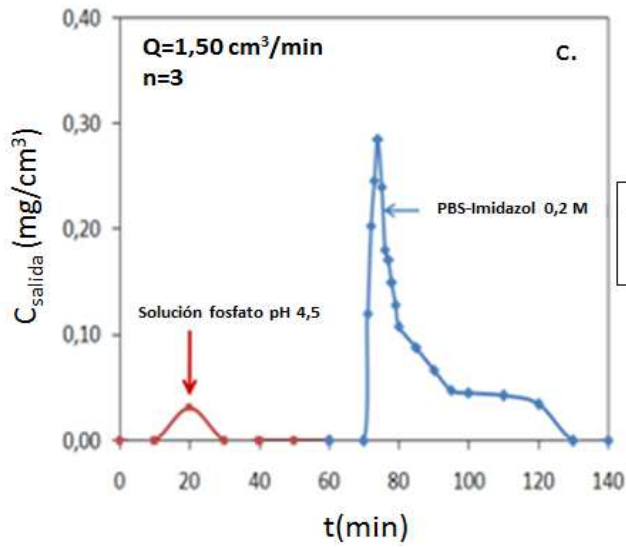
Las gráficas muestran dos picos, el primero, de color rojo, representa la elución de la proteína retenida pero no adsorbida en el adsorbente. La proteína que no se ha ligado específicamente al Cu²⁺, es eliminada con un lavado con el mismo tampón en el cual se ha llevado a cabo el proceso de adsorción de la proteína, que en éste caso es solución fosfato pH 4,5. Éste pico presenta un área bajo la curva pequeña, traducido en una cantidad de proteína inferior al 5% de la proteína total eluída.

El segundo pico, de color azul representa la elución de proteínas adsorbidas de forma específica, es decir, la proteína que ha sido ligada específicamente al Cu²⁺. La proteína ligada de forma específica no puede ser eluída con el tampón usado en el lavado, sino que debe ser eluída competitivamente con imidazol. El área bajo la curva de estos picos representa aproximadamente el 95% de la proteína total adsorbida.

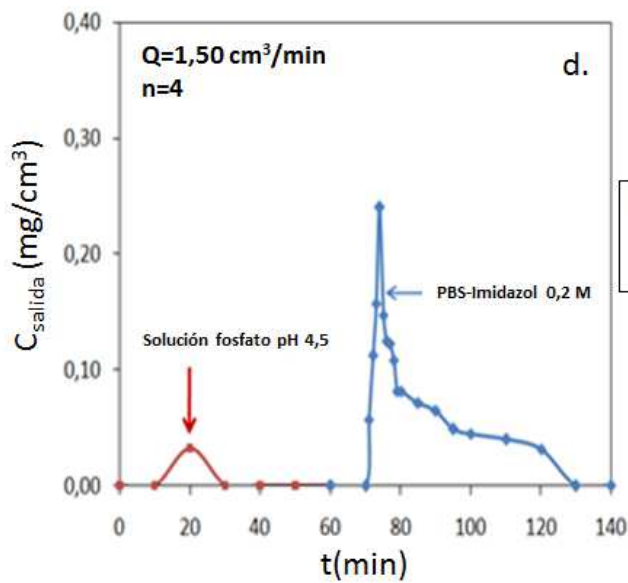


**Balance de Materia**

$$\begin{aligned} \text{Adsorción} &= \text{Lavado} + \text{elución (mg)} \\ 8,46 &= 0,45 + 7,88 \\ \text{No eluido: } &1,53\% \end{aligned}$$

**Balance de Materia**

$$\begin{aligned} \text{Adsorción} &= \text{Lavado} + \text{elución (mg)} \\ 7,22 &= 0,20 + 6,99 \\ \text{No eluido: } &0,41\% \end{aligned}$$

**Balance de Materia**

$$\begin{aligned} \text{Adsorción} &= \text{Lavado} + \text{elución (mg)} \\ 5,98 &= 0,15 + 5,80 \\ \text{No eluido: } &0,50\% \end{aligned}$$

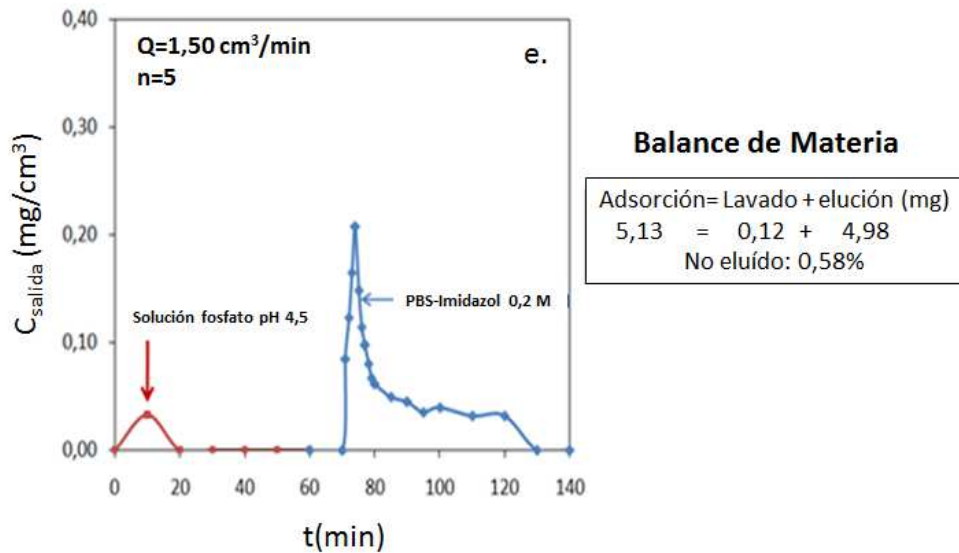


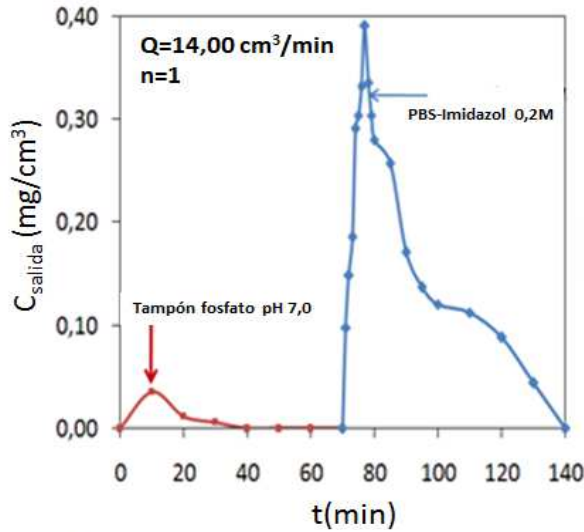
Figura 5-13. Curvas de elución de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para el caudal de adsorción de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ y n_1, n_2, n_3, n_4 y n_5 .

En general la elución de la proteína retenida pero no adsorbida (solución fosfato pH 4,5) tarda aproximadamente 30 min en todos los casos, y la elución específica (imidazol 0,2 M en tampón PBS pH 7,4) tiene un tiempo de duración de aproximadamente 60-80 min. El tiempo de elución es en general un poco menor para los ciclos 4 y 5 debido a que la cantidad de proteína adsorbida es menor.

De igual forma, a la derecha de cada figura se puede observar el balance de materia en mg, es decir, la cantidad de proteína total adsorbida con respecto a la cantidad de proteína eluida con tampón fosfato correspondiente al área bajo la curva roja y con imidazol 0,2 M en tampón PBS, correspondiente al área bajo la curva azul. En todos los casos la cantidad de proteína que no es posible ser eluida y queda dentro de la matriz es inferior del 2%.

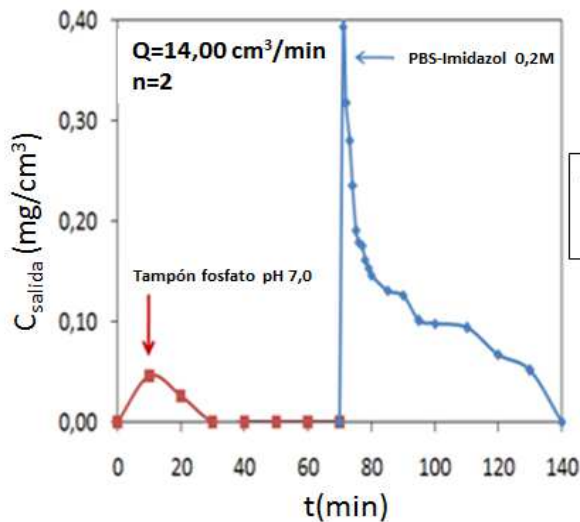
La figura 5-14 muestra las curvas de elución de la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0 para el caudal de $14,0 \text{ cm}^3/\text{min}$. El procedimiento, así como la explicación de las gráficas es el mismo que para llevar a cabo el proceso de elución de la proteína BSA para los experimentos en solución fosfato pH 4,5, es decir, la proteína retenida pero no adsorbida específicamente se eluyó con tampón fosfato pH 7,0 a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ y la proteína adsorbida específicamente se eluyó con imidazol 0,2 M en tampón PBS pH 7,4 también a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

En todos los ciclos se puede observar que la cantidad de proteína eluida con tampón fosfato pH 7,0 es inferior al 5% y que la cantidad de proteína eluida con imidazol 0,2 M en tampón PBS pH 7,4 está en torno al 95%.



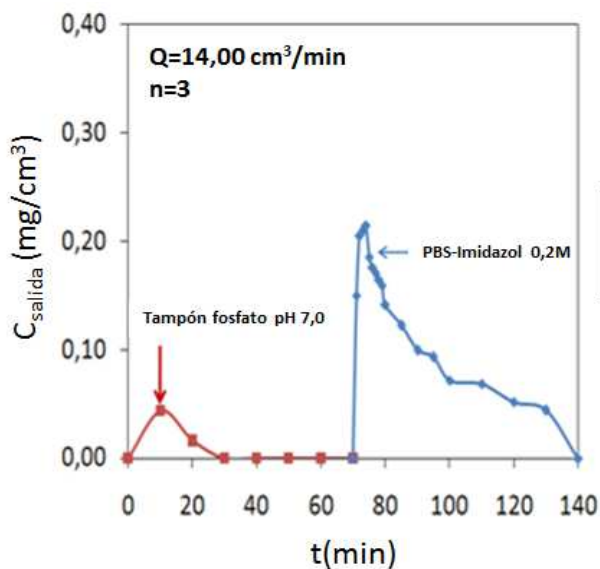
Balance de Materia

$$\begin{aligned} \text{Adsorción} &= \text{Lavado} + \text{elución (mg)} \\ 15,23 &= 0,81 + 14,36 \\ \text{No eluido: } &0,39\% \end{aligned}$$



Balance de Materia

$$\begin{aligned} \text{Adsorción} &= \text{Lavado} + \text{elución (mg)} \\ 12,19 &= 1,08 + 11,02 \\ \text{No eluido: } &0,74\% \end{aligned}$$



Balance de Materia

$$\begin{aligned} \text{Adsorción} &= \text{Lavado} + \text{elución (mg)} \\ 9,96 &= 0,90 + 8,98 \\ \text{No eluido: } &0,82\% \end{aligned}$$

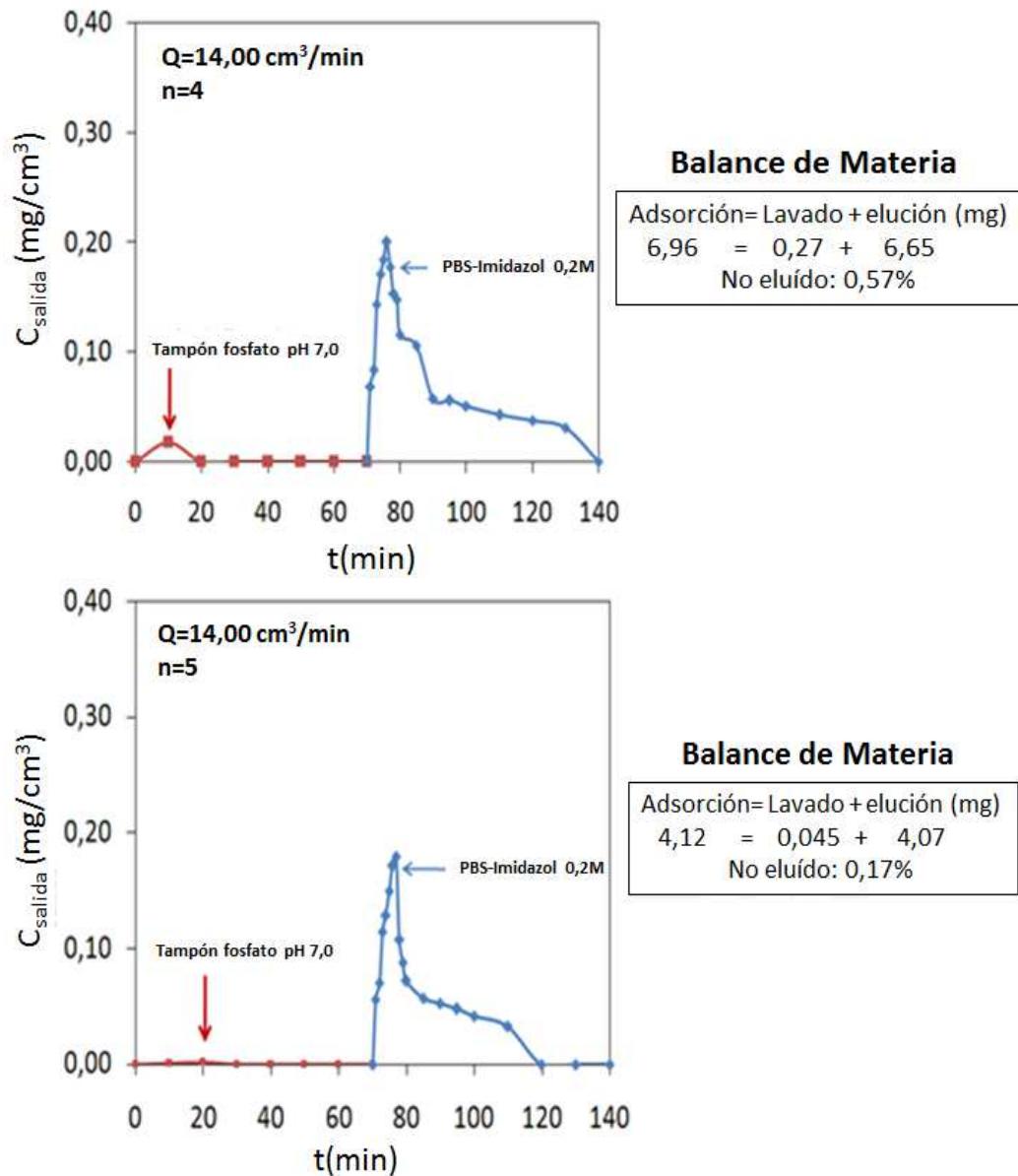


Figura 5-14. Curvas de elución de la proteína BSA adsorbida tampón fosfato pH 7,0 y 298K, para un caudal de adsorción de $14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$ y n_1, n_2, n_3, n_4 y n_5 .

De acuerdo a la información anterior, se desarrolló un modelo para predecir el comportamiento del monolito tras varios ciclos de reutilización y que estimará la reutilización óptima de la columna monolítica. Así, éste modelo se desarrolló para el sistema formado por la proteína BSA sobre un monolito cerámico recubierto por agarosa tipo D5, activado con 1,4 butanodiol diglicidil éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante, y Cu^{2+} como ligando. El desarrollo del modelo se describe a continuación, en el apartado 5.1.3.

5.1.3. Modelo de eficiencia de adsorción

Para el modelo de eficiencia de adsorción se ha encontrado que la porosidad de la agarosa utilizada en esta investigación es despreciable debido a que no presenta microporos donde la proteína se pueda adsorber. Como consecuencia de ello, toda la biomolécula adsorbida en la matriz, esta unida a los sitios localizados en la superficie externa del recubrimiento de la película de agarosa, que envuelve al monolito cerámico.

Asimismo se supone que las proteínas son mucho más grandes que los sitios activos de adsorción sobre la superficie de agarosa. Por ello, cuando una proteína se adsorbe sobre un sitio, puede bloquear otros sitios activos, imposibilitando el acceso de otras proteínas a dichos sitios. En general, el número de sitios activos pueden ser de dos o tres órdenes de magnitud mayor que las proteínas que se pueden adsorber.

En tercer lugar, los procesos de adsorción de las proteínas son aleatorios, donde a veces las proteínas se superponen ligeramente, dejando sitios intermedios activos en la superficie de agarosa no cubiertos. Puesto que la adsorción es un proceso aleatorio que implica un número muy grande de moléculas, se puede considerar el porcentaje de superposición así como el porcentaje de superficie cubierto, como una constante estadística de un ciclo de reuso a otro, como se muestra esquemáticamente en la figura 5-15.

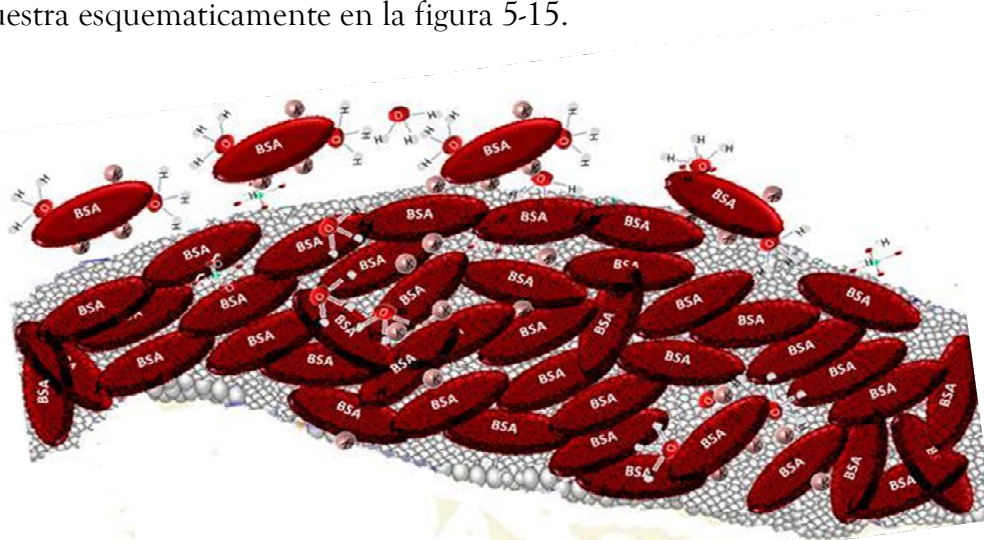


Figura 5-15. Esquema que muestra como de forma aleatoria las proteínas de BSA cubren la superficie de adsorción.

Las figuras rojas representan las moléculas de proteína, mientras que los puntos grises son los sitios de adsorción de la superficie activa. En la figura se puede observar la gran cantidad de superficie disponible y los sitios activos que no pueden ser cubiertos por las moléculas de proteína adsorbida.

Basandose en estas observaciones, se puede decir que el número de moles de proteína adsorbida sobre una superficie dada, está limitado por el área interfacial del sistema agarosa-solución. De hecho, el número de moles de proteína que se unen en la superficie, podría ser calculado como una concentración superficial, es decir, en unidades de moles de proteína por unidad de área de adsorción.

El volumen de control definido en el sistema experimental incluye el volumen del recipiente que contiene la solución, el volumen correspondiente a las tuberías, así como el volumen combinado de los canales del monolito.

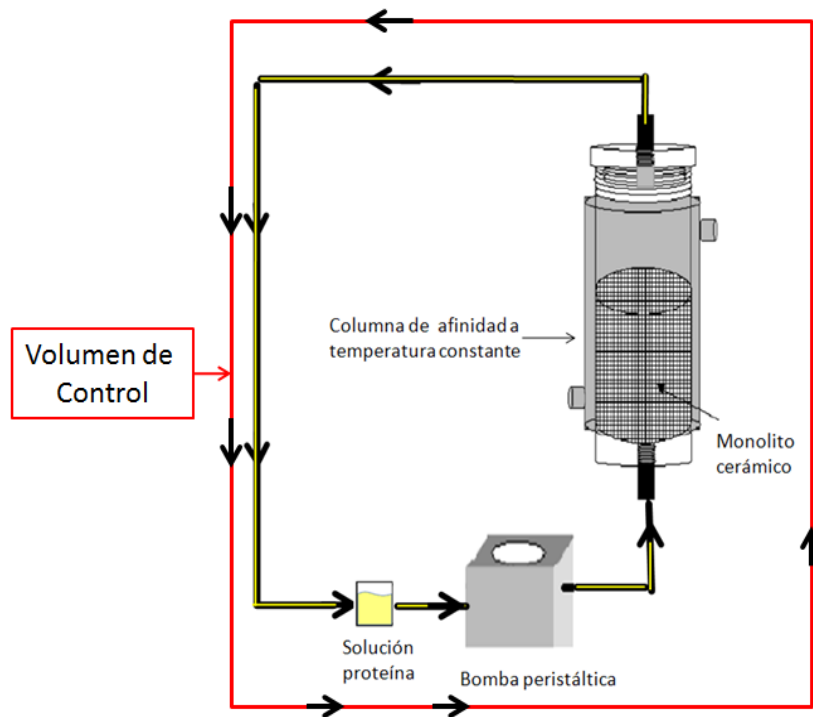


Figura 5-16. Esquema del volumen de control del sistema de adsorción propuesto.

Dentro de esta parte del volumen, la biomolécula se disuelve en la solución circulante y la concentración de la solución estaría cambiando en el tiempo debido a la proteína que se adsorbe en las paredes de los canales del monolito.

Por lo tanto, el balance de materia de la biomolécula se debe tener en cuenta para la biomolécula adsorbida en la superficie de los canales del monolito. Se trata de un volumen de control cerrado el cual no tiene ningún término convectivo, ni un término de fuente de reacción química como se muestra en la ecuación 5-2:

$$\frac{d}{dt} \int_{V_{sol}} \bar{C}_E(\underline{x}, t) dV + \frac{d}{dt} \int_{A_{mon}} \bar{\rho}_{BE} dA = 0 \quad (5-2)$$

Donde $\bar{C}_E(\underline{x}, t)$ es la concentración local en (mol /cm³), $\bar{\rho}_{BE}$ es la cantidad de proteína adsorbida por unidad de superficie local en (mol /cm²), V_{sol} es el volumen de solución de proteína en cm³ y A_{mon} es el área del monolito en cm². La concentración local $\bar{C}_E(\underline{x}, t)$ es una función de las coordenadas espaciales en el interior del volumen de control denotado por el vector espacial de coordenadas x y el tiempo. La concentración local de biomolécula adsorbida en la superficie, es también una función del tiempo y el espacio. No se identifican las coordenadas de superficie, puesto que se supone que la superficie de adsorción puede ser representada como una superficie en un espacio tridimensional definido por x .

La ecuación 5-2 puede ser integrada con respecto a la variable espacio con el fin de encontrar una expresión para el cambio global de la concentración de biomolécula como una función del tiempo, como se muestra en la ecuación 5-3.

$$\frac{d}{dt} \left\{ \int_{V_{sol}} \bar{C}_E(\underline{x}, t) dV \right\} = \frac{d}{dt} C_E(t) V_{sol}(t) = - \frac{d}{dt} \left\{ \int_{A_{mon}} \bar{\rho}_{BE} dA \right\} = - \frac{d \rho_{BE} A_{mon}}{dt} \quad (5-3)$$

$$\text{Donde; } C_E(t) = \frac{1}{V_{sol}(t)} \int_{V_{sol}} \bar{C}_E(\underline{x}, t) dV \quad \text{y} \quad \rho_{BE} = \frac{1}{A_{mon}} \int_{A_{mon}} \bar{\rho}_{BE} dA$$

Así, el volumen promedio define la concentración molar media de la proteína en solución $C_E(t)$, como una función solo del tiempo. La superficie promedio sobre toda la superficie del monolito define la cantidad media de la adsorción de biomolécula $\rho_{BE}(t)$ y también sería solo función del tiempo. Puesto que el área del monolito es constante, se toma el área del monolito de la derivada de la ecuación 5-3. Si también se supone que las muestras tomadas para el análisis introducen cambios insignificantes en el volumen, el volumen de la solución sería casi constante, por lo tanto $V_{sol}(t) \cong V_o$. Bajo estos supuestos, la ecuación 5-3 permite

una mayor simplificación de la integración en el tiempo para demostrar que la cantidad de adsorción representa la cantidad total de biomolécula adsorbida sobre la superficie del monolito en cualquier momento durante el proceso, $\rho_{BE}(t)$.

$$\begin{aligned} V_o \int_{C_o}^{C_E} d[C_E(t)] &= V_o [C_E(t) - C_o] = -A_{mon} \int_{\rho_o}^{\rho_{BE}} d\rho_{BE} \\ &= -A_{mon} \rho_{BE}(t) \left\{ \begin{array}{l} \rho_{BE}(t) \\ \rho_{BE}(t=0) = 0 \end{array} \right. \end{aligned} \quad (5-4)$$

Definiendo la constante, $m(\text{cm}) = V_o/A_{Mon}$, como la relación entre el volumen de la solución de biomolécula que se distribuye en la zona interfacial del monolito, podemos llegar a una ecuación idéntica a la ecuación 5-2, sólo que introduciendo un factor de corrección $\phi \leq 1$, para tener en cuenta la concentración de proteína atrapada dentro de la matriz, es decir no ligada a los sitios disponibles para la adsorción considerándolo como una corrección a la variación real en la concentración de proteína $C_o - C_E|_0$.

$$\rho_{BE}(t) = (C_o - C_E)m\phi \quad (5-5)$$

Donde $m(\text{cm})$ es la relación de volumen de solución de proteína en la sección de interfase de la columna y ϕ que es la fracción de proteína adsorbida. De tal forma $\rho_{BE,n}(\text{mol}/\text{cm}^2)$ es definido como el número de moles de biomolécula, limitado a los ligandos por unidad de superficie de adsorción de la matriz cromatográfica.

La velocidad superficial se define como la cantidad de flujo volumétrico por unidad de área de sección transversal de la columna. Por tanto, existe una velocidad de flujo mínima, que dependiendo del caudal, podría llegar a ser una limitante de la velocidad superficial, sin embargo estos caudales están muy por debajo del tipo de velocidades superficiales que se pueden conseguir usando monolitos cerámicos, debido a la geometría de los mismos.

Así en el presente trabajo, la velocidad de flujo mínimo en nuestro caso, no es un factor limitante. De tal manera que las curvas de adsorción (Figura 5-8 y 5-12), se pueden modelar usando una ecuación cinética simple de primer orden con constante de proporcionalidad k_A , en donde la velocidad de adsorción es igual a la eliminación de los sitios disponibles para llevar a cabo el proceso de adsorción y es proporcional a la concentración de sitios disponibles (ecuación 5-6) :

$$\frac{d\rho_{BE,n}}{dt} = -\frac{d\rho_{AS,n}}{dt} = k_A (\rho_{AS,n}(t) - \rho_{AS,eq}) ; \quad \rho_{AS,n}(0) = \rho_{AS,n}^o \quad (5-6)$$

Integrando y reordenando la ecuación 5-6, se puede obtener una expresión para el cambio de la concentración de proteína en la superficie en función del tiempo, como una función del cambio en la concentración de los sitios disponibles para llevar a cabo el proceso de adsorción, de la siguiente manera (ecuación 5-7):

$$\rho_{BE,n}(t) = \rho_{AS,n}^o - \rho_{AS,n}(t) = [\rho_{AS,n}^o - \rho_{AS,n}^{eq}] (1 - e^{-k_A t}) \quad (5-7)$$

Donde $\rho_{AS,n}^o$ es la concentración superficial disponible de los sitios de adsorción durante los n^{th} ciclos y $\rho_{AS,n}^{eq}$ es la concentración en la superficie restante de los sitios de adsorción en equilibrio, introducidos en la ecuación 5-5 y 5-7 respectivamente.

De acuerdo a lo anterior, se puede desarrollar un modelo para representar el cambio en la concentración de proteína en función del tiempo, como se muestra en las curvas de las figuras 5-5 y 5-9, de acuerdo con la ecuación 5-8:

$$\frac{C_E(t)}{C_0} = 1 - \frac{[\rho_{AS,n}^o - \rho_{AS,n}^{eq}]}{m\phi C_0} (1 - e^{-k_A t}) \quad (5-8)$$

Como se ha mencionado anteriormente, la porosidad de la agarosa D5 es despreciable, de esta forma, es posible relacionar la capacidad de adsorción de la proteína, a una capa teórica depositada sobre la interfase de agarosa/solución. Además, es posible asumir que no hay limitaciones impuestas por el número de sitios de adsorción, siendo una suposición válida, debido que la cantidad de iones de cobre retenidos por la matriz, es al menos tres órdenes de magnitud mayor que la cantidad de proteína que se puede unir a ellos. Éste supuesto a su vez elimina el problema de quelatos polidentados resultantes de complejos de coordinación, en los que participan dos o más enlaces de coordinación.

Los valores $\rho_{BE,n}$ calculados mediante la ecuación 5-5 se recogen en la tabla 5-4, para los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales estudiados y 5-5 se encuentran los experimentos llevados a cabo en tampón fosfato pH 7,0 a un caudal de 14,0 cm³/min.

Tabla 5-4. Valores de $\rho_{BE,n}$ para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, para los cinco caudales estudiados.

Q→	$\rho_{BE,n} \times 10^{10}$ (mol/cm ²)				
	1,50	5,50	8,40	10,60	14,00
n = 1	6,17	7,16	7,70	9,20	9,36
n = 2	5,99	6,71	6,23	6,95	8,17
n = 3	5,33	5,49	5,02	5,04	7,11
n = 4	4,03	4,86	3,85	3,71	6,28
n = 5	3,15	4,16	3,13	2,68	5,11

Tabla 5-5. Valores de $\rho_{BE,n}$ para el sistema formado por la proteína BSA-tampón fosfato pH 7,0 Q= 14 cm³/min.

	$\rho_{BE,n} \times 10^{10}$ (mol/cm ²)
	Tampón fosfato pH 7,0
n = 1	9,90
n = 2	7,62
n = 3	5,92
n = 4	3,80
n = 5	1,88

De acuerdo a los valores mostrados tanto en la tabla 5-4 y 5-5, se puede observar que para los dos pH estudiados los valores de $\rho_{BE,n}$ para un caudal de 14,0 cm³/min son muy parecidos en todos los ciclos.

La eficiencia de adsorción η_A es debida a la transformación natural que sufre el monolito a través de las sucesivas reutilizaciones y relaciona la cantidad de proteína adsorbida durante el primer ciclo de adsorción por unidad de superficie y la cantidad real de proteína que puede ser adsorbida en la superficie del adsorbente.

La ecuación 5-9 recoge lo descrito anteriormente:

$$\eta_A = \frac{\rho_{BE,1}}{\rho_{AS}^R} \quad (5-9)$$

Por lo tanto, la naturaleza estocástica del proceso de adsorción, así como las modificaciones de dichos sitios debido a los procesos de adsorción/elución, medidos por la eficiencia del ciclo de adsorción, η_A , comunes a todos los ciclos, se estudian por separado.

Cuando las moléculas de proteína permanecen unidas a los sitios de adsorción, no todos los sitios originales estarán disponibles para un nuevo ciclo, como se ha indicado anteriormente, (figura 5-7). Por tanto, la combinación de elución incompleta y las modificaciones de los sitios, disminuye la capacidad de adsorción de la columna cromatográfica para el siguiente ciclo de adsorción/elución, como se comprobó experimentalmente.

Para tener en cuenta estos complejos procesos, se introdujo una eficiencia de elución, como la relación entre el número de moles de proteína que se liberan en la superficie de la matriz en la elución $\rho_{DS,1}$ y la concentración de proteína adsorbida en la superficie después del primer ciclo de adsorción (n=1) $\rho_{BE,1}$ de acuerdo a la ecuación 5-10.

$$\eta_D = \frac{\rho_{DS,1}}{\rho_{BE,1}} \quad (5-10)$$

Introduciendo la eficiencia de adsorción y elución, se puede calcular la cantidad de proteína que puede ser adsorbida en el segundo ciclo de adsorción (n=2) usando la ecuación 5-11:

$$\rho_{AS,1} = \rho_{AS}^R - \rho_{BE,0} + \rho_{DS,0} = \rho_{AS}^R [1 - \eta_A (1 - \eta_D)] \quad (5-11)$$

Después del segundo proceso de adsorción, la cantidad de proteína unida a los ligandos, es calculada como el cambio en la concentración de proteína durante el proceso de adsorción, teniendo en cuenta la proteína que no está unida específicamente a la matriz.

Durante éste segundo ciclo, la cantidad de proteína adsorbida es de nuevo afectada por las eficiencias de adsorción, teniendo en cuenta que no todos los

sitios disponibles después de la primera adsorción/elución, pueden ser ocupados por las moléculas de proteína; así, la cantidad de proteína por unidad de superficie es posible calcularla teniendo en cuenta la ecuación 5-5, de acuerdo con la ecuación 5-12:

$$\rho_{BE,2} = \eta_A \rho_{AS}^R [1 - \eta_A (1 - \eta_D)] = (C_0 - C_{E|_2}) \phi m \quad (5-12)$$

A su vez, la concentración de proteína en el equilibrio C_E para el segundo ciclo de adsorción estará relacionada con la eficiencia del proceso de adsorción/elución de acuerdo con la ecuación 5-13:

$$C_{E|_2} = C_0 - \frac{\eta_A \rho_{AS}^R}{\phi m} [1 - \eta_A (1 - \eta_D)] \quad (5-13)$$

A continuación, para estimar la cantidad de proteína eluída por unidad de superficie, en el segundo proceso de elución ($n=2$), se utilizó la eficiencia de elución η_D , de acuerdo a la ecuación 5-14:

$$\rho_{DS,2} = \eta_D \eta_A \rho_{AS}^R [1 - \eta_A (1 - \eta_D)] \quad (5-14)$$

Después del segundo ciclo de adsorción/elución, la cantidad de proteína que podría ser adsorbida durante el próximo ciclo es calculada de acuerdo a la ecuación 5-15.

$$\rho_{AS,2} = \rho_{AS,1} - \rho_{BE,2} + \rho_{DS,2} = \rho_{AS}^R [1 - \eta_A (1 - \eta_D)]^2 \quad (5-15)$$

De acuerdo con lo anterior, se pudo establecer que la cantidad de proteína adsorbida por unidad de superficie tras el tercer ciclo ($n=3$) viene dada por la ecuación 5-16.

$$\rho_{BE,3} = \eta_A \rho_{AS}^R [1 - \eta_A (1 - \eta_D)]^2 = [C_0 - C_{E|_3}] \phi m \quad (5-16)$$

A su vez, la concentración de proteína en equilibrio C_E , correspondiente al tercer ciclo de adsorción pudo ser calculada reorganizando los terminos de la ecuación 5-16, como se muestra en la ecuación 5-17:

$$C_{E|_3} = C_0 - \frac{\eta_A \rho_{AS}^R}{\phi m} [1 - \eta_A (1 - \eta_D)]^2 \quad (5-17)$$

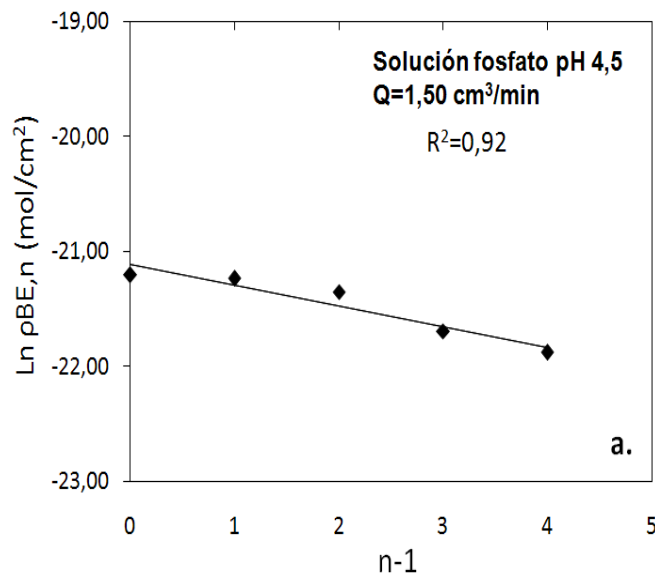
De acuerdo a las ecuaciones 5-10 y 5-14, es posible extender el análisis a un número arbitrario de ciclos donde la concentración de proteína en el equilibrio C_E , estaría dada por la expresión matemática que se muestra en la ecuación 5-18:

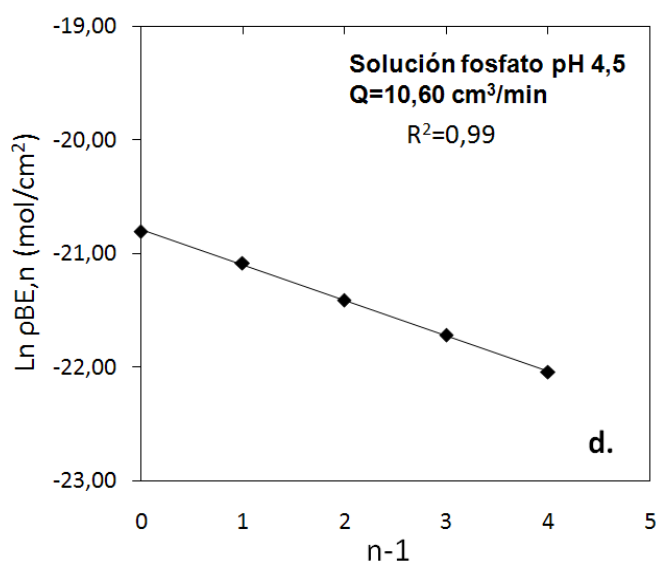
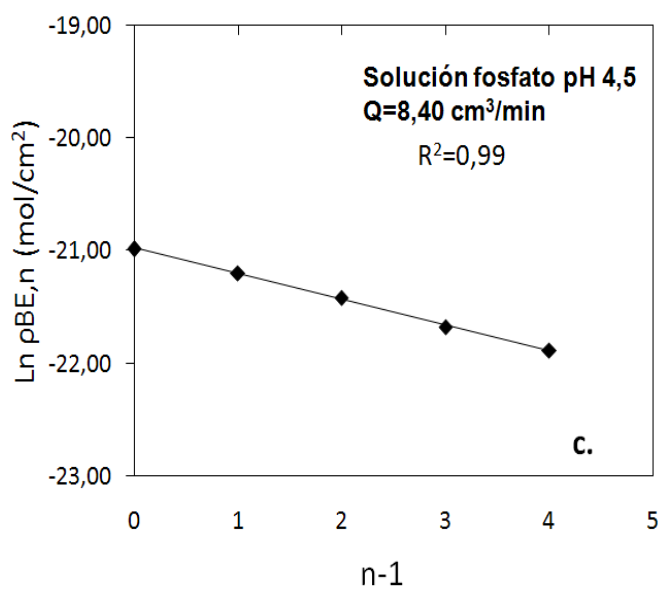
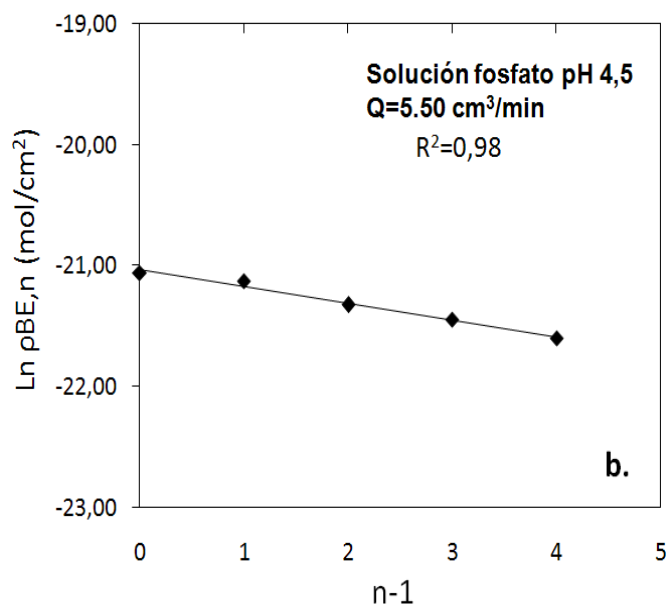
$$C_E|_n = C_0 - \frac{\eta_A \rho_{AS}^R}{\phi m} [1 - \eta_A (1 - \eta_D)]^{n-1} \quad (5-18)$$

De igual forma, la concentración de proteína en la superficie del adsorbente durante el n-ésimo ciclo, de forma logarítmica, estaría dada por la ecuación 5-19:

$$\text{Ln}(\rho_{BE,n}) = \text{Ln}(\eta_A \rho_{AS}^R) + (n-1) \text{Ln}[1 - \eta_A (1 - \eta_D)] \quad (5-19)$$

La ecuación 5-19 representa un gráfico semi-logarítmico con $\rho_{BE,n}$ como ordenada y $n-1$ como abscisa, con $\text{Pendiente} = \text{Ln}[1 - \eta_A (1 - \eta_D)]$ e intersección en $n-1=0$, igual a $\text{Ln}(\eta_A \rho_{AS}^R)$. Así, la figuras 5-17 a, b, c, d y e (para los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5) y 5-18 (experimentos llevados a cabo en tampón fosfato pH 7,0) muestran las gráficas semilogarítmicas $\text{Ln}(\rho_{BE,n})$ vs $n-1$.





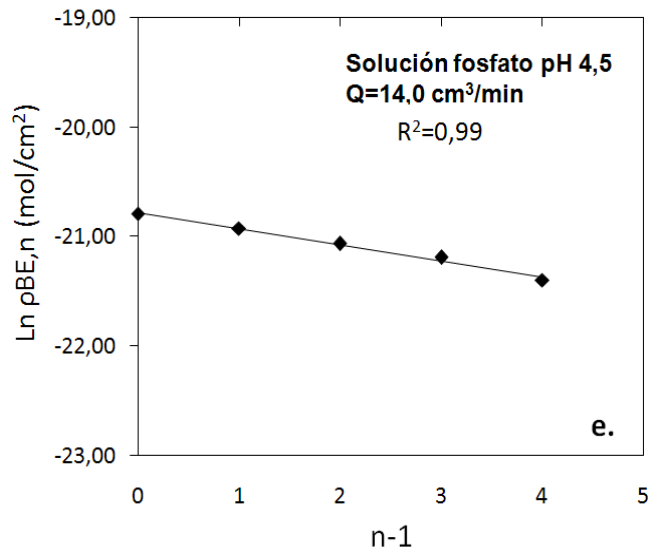


Figura 5-17. Logaritmo de la concentración de proteína experimental por unidad de superficie vs número de reutilizaciones (n-1) para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales estudiados.

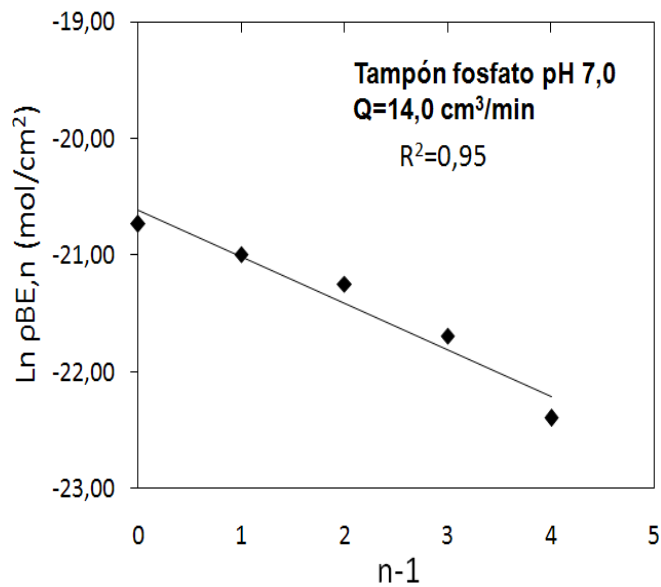


Figura 5-18. Logaritmo de la concentración de proteína experimental por unidad de superficie vs número de reutilizaciones (n-1), para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0 para el caudal de 14 cm³/min.

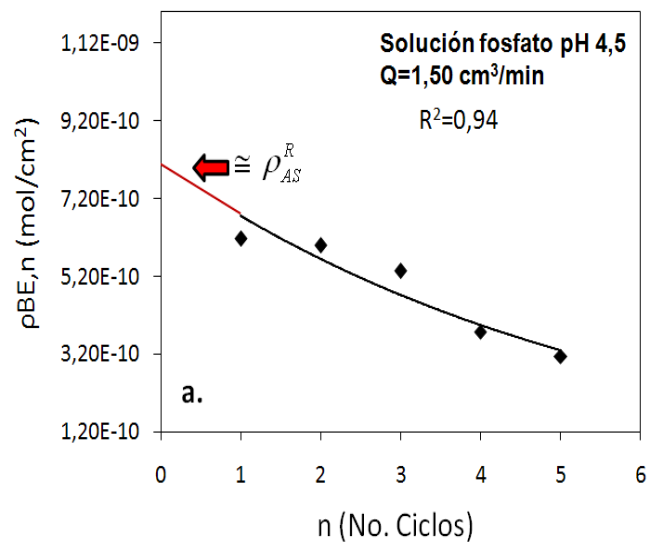
A partir de la intersección de la recta en el origen, se puede obtener la primera cantidad de proteína adsorbida en la superficie $\rho_{BE,1} = \eta_A \rho_{AS}^R$ y de su pendiente se encuentra el valor de $[1 - \eta_A (1 - \eta_D)]$.

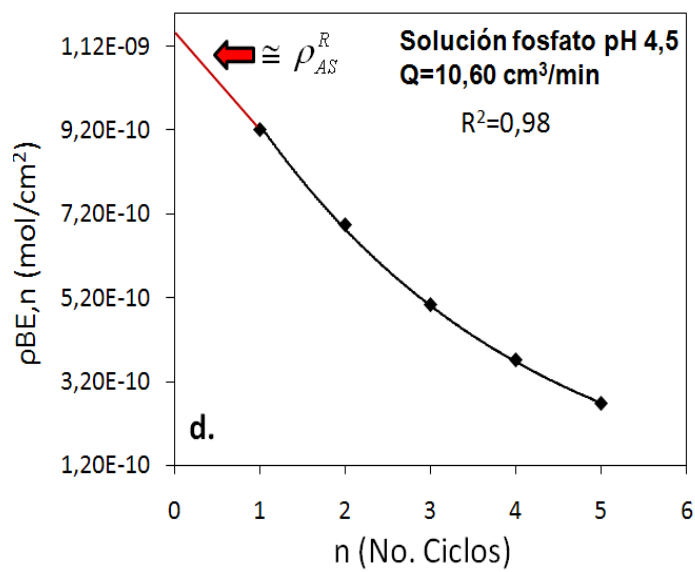
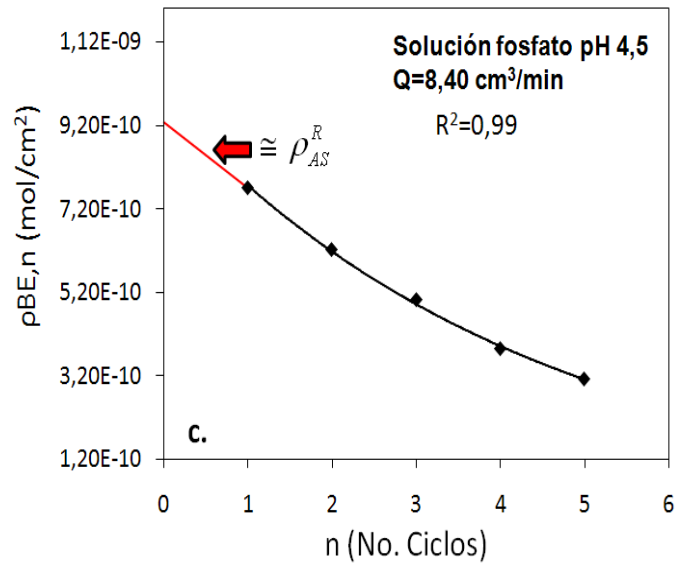
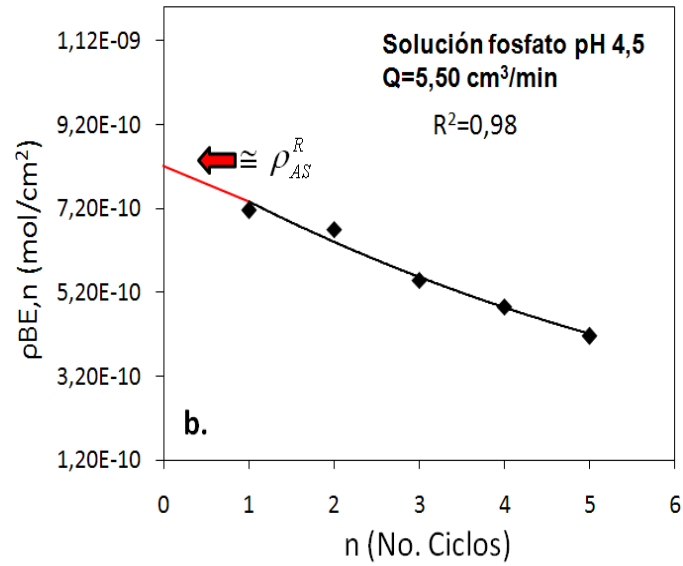
Para calcular la cantidad real de proteína que puede ser adsorbida en la superficie del adsorbente ρ_{AS}^R , se utilizó un gráfico (figura 5-19 a, b, c, d y e, y 5-20) que relacionaba el número de moles de proteína enlazados al ligando por unidad de superficie del adsorbente $\rho_{BE,n}$ y el número de ciclos n .

Estas concentraciones en la superficie son calculadas, suponiendo que la extrapolación de la concentración de proteína adsorbida en la superficie toma valores $n \rightarrow 0$, proporcionando un valor aproximado de la concentración superficial disponible, de acuerdo a la ecuación 5-19.

$$\lim_{n \rightarrow 0} [\rho_{BE,n}] \cong \rho_{AS}^R \quad (5-19)$$

Así, en las figuras 5-19 a, b, c, d y e (para los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5) y 5-20 (experimentos llevados a cabo en tampón fosfato pH 7,0) se muestra una línea sólida de tendencia exponencial, de tal forma que la intersección de la línea de tendencia con la línea para $n=0$, permite calcular el valor aproximado de ρ_{AS}^R . Así con los valores de ρ_{AS}^R fue posible calcular la eficiencia de adsorción estructural η_A , de acuerdo con la ecuación 5-9.





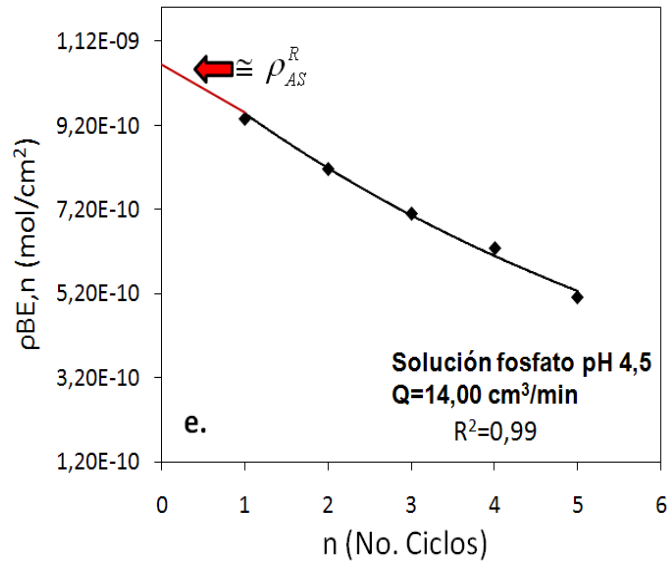


Figura 5-19. Número de proteínas enlazadas a los ligandos por unidad de superficie de adsorción vs el número de ciclos para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, para los cinco caudales estudiados.

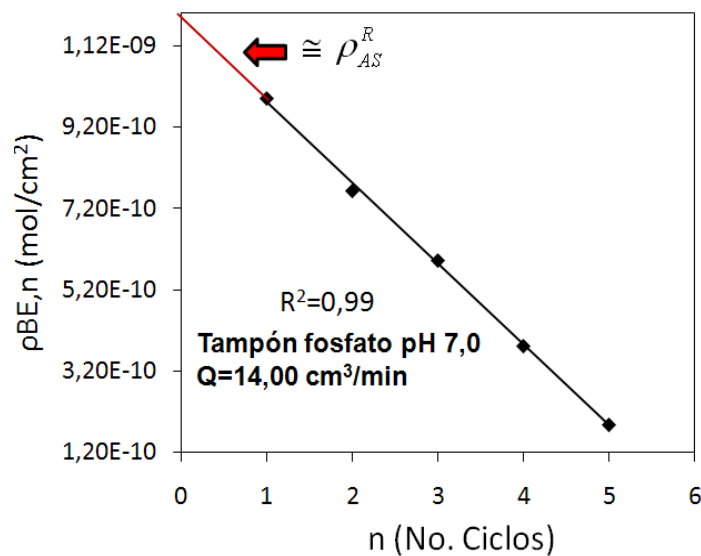


Figura 5-20. Número de proteínas enlazadas a los ligandos por unidad de superficie de adsorción vs el número de ciclos para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0 para el caudal de 14 cm³/min.

En cromatografía de afinidad (Martín del Valle *et al*; 2003), podemos esperar que el área cubierta por la proyección de proteínas adsorbidas, ρ_{AS}^R , sea del mismo orden de magnitud que el área interfacial de agarosa disponible para la adsorción y por lo tanto del área teórica de adsorción, ρ_{AS}^T .

En cromatografía IMAC esta suposición no es válida ya que los valores de $\rho_{AS}^R \ll \rho_{AS}^T$. Esta diferencia en el comportamiento se debe a una menor especificidad de los ligandos metálicos con respecto a las proteínas que se adsorben así como al tipo de lazos con que se unen estas proteínas a los ligandos metálicos.

Los complejos de coordinación proteína/metal adquieren una carga eléctrica específica que inhibe la adsorción de otras proteínas en ligandos cercanos. Dado que estas son coberturas superficiales, es decir sobre superficies de dos dimensiones, los campos eléctricos son más restrictivos y disminuyen en forma considerable la cantidad de proteína que se puede adsorber

Así, los valores de la eficiencia de adsorción, η_A , como los valores de m , ρ_{AS}^R y η_D se recogen en la tabla 5-6 para los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5 y tabla 5-7 para los experimentos llevados a cabo en tampón fosfato pH 7.

Tabla 5-6. Coeficientes de adsorción/elución para el estudio de la proteína BSA, en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales estudiados.

Q (cm ³ /min) →	1,50	5,50	8,40	10,60	14,00
Número ciclos (n)	5	5	5	5	5
m (cm ³ de solución/área cm)	0,237	0,237	0,237	0,237	0,237
ρ_{AS}^R (mol/cm ²) x10 ¹⁰	7,35	8,03	8,64	10,40	10,32
η_A (adimensional)	0,84	0,89	0,89	0,88	0,91
η_D (adimensional)	0,80	0,85	0,77	0,70	0,85

Tabla 5-7. Coeficientes de adsorción/elución para el estudio de la proteína BSA, en tampón fosfato pH 7,0.

Tampón →	Fosfato pH 7,0
Número de ciclos (n)	5
m (cm ³ de solución/área cm)	0,238
ρ_{AS}^R (mol/cm ²) x10 ¹⁰	11,8
η_A (adimensional)	0,84
η_D (adimensional)	0,61

5.1.3.1. Validación del modelo de eficiencia

De acuerdo al modelo desarrollado, y previo al cálculo de los parámetros, η_A , ρ_{AS}^R , y η_D , fue posible en primer lugar, validar los resultados obtenidos de concentración en el equilibrio C_E de forma experimental, al calcular C_E teóricamente mediante las ecuaciones 5-11, 5-15 y 5-17 del modelo para n_1 a n_5 , de tal manera que se pudieran comparar $C_{E,exp}$ y $C_{E,teo}$, y en segundo lugar predecir la concentración de proteína en el equilibrio C_E para un número arbitrario de ciclos ($n=6$, $n=7$ y $n=8$) al utilizar la misma matriz cromatográfica. Así, la concentración en equilibrio C_E se puede predecir para un ciclo determinado sin tener que llevar a cabo experimentalmente el proceso de adsorción.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 5-8 (para los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5), tabla 5-9, porcentajes de error correspondientes a los valores de la tabla 5-7 y tabla 5-10 para los experimentos llevados a cabo en tampón fosfato pH 7,0.

Tabla 5-8. Comparación de la concentración en equilibrio C_E experimental vs obtenida por el modelo para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales estudiados.

Q →	1,50		5,50		8,40		10,60		14,00	
	C_E Exp	C_E Teo	C_E Exp	C_E Teo	C_E Exp	C_E Teo	C_E Exp	C_E Teo	C_E Exp	C_E Teo
1	7,86	7,86	7,42	7,42	7,18	7,18	6,51	6,51	6,44	6,44
2	7,94	8,31	7,62	7,84	7,83	7,88	7,51	7,60	6,97	7,01
3	8,23	8,69	8,16	8,20	8,37	8,43	8,36	8,40	7,44	7,50
4	8,81	9,00	8,44	8,51	8,89	8,87	8,95	8,98	7,81	7,92
5	9,20	9,27	8,75	8,78	9,21	9,23	9,41	9,41	8,33	8,29
6		9,49		9,02		9,51		9,73		8,61
7		9,67		9,23		9,73		9,96		8,88
8		9,82		9,41		9,91		10,1		9,11
								0		
$C_E \text{ Exp} \times 10^9 \text{ (mol/cm}^3\text{)} / C_E \text{ Teo} \times 10^9 \text{ (mol/cm}^3\text{)} / Q \text{ (cm}^3\text{/min)}$										

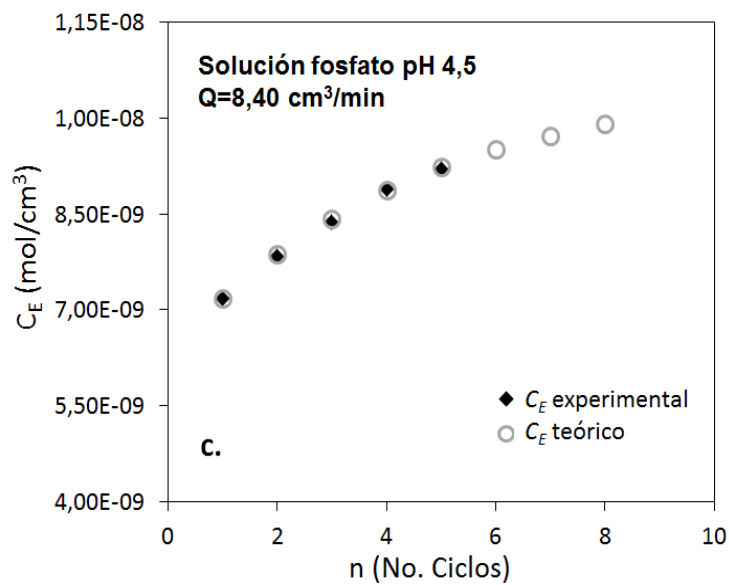
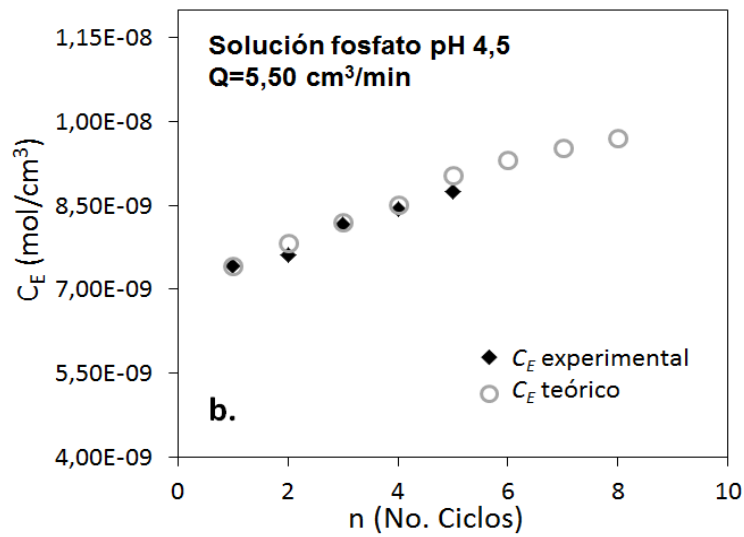
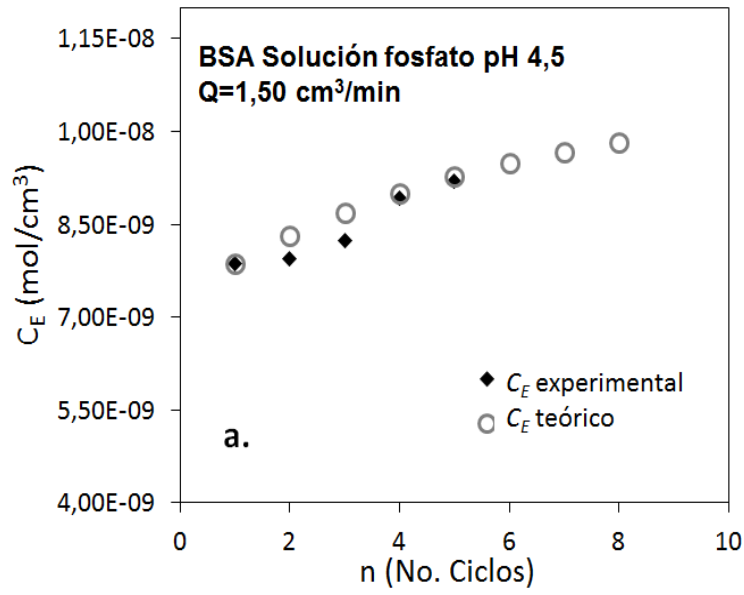
Tabla 5-9. Porcentaje de error de la concentración en equilibrio C_E experimental vs obtenida por el modelo para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales estudiados.

n	% de error				
	1,50 cm ³ /min	5,50 cm ³ /min	8,40 cm ³ /min	10,60 cm ³ /min	14,00 cm ³ /min
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	4,45	2,81	0,63	1,18	0,57
3	5,59	0,49	0,71	0,48	0,80
4	0,90	0,82	0,22	0,33	1,39
5	0,76	0,34	0,22	0,00	0,48

Tabla 5-10. Comparación de la concentración en equilibrio C_E experimental vs obtenida por el modelo para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0 para el caudal de 14 cm³/min, C_E Experimental (Exp) y Teórico (Teo) (mol/cm³) x 10⁹.

n	Tampón Fosfato pH 7,0		
	C_E Exp	C_E Teo	% error
1	6,22	6,22	0,00
2	7,23	7,67	5,74
3	7,98	8,64	7,64
4	8,92	9,28	3,88
5	9,77	9,72	0,51
6		10,00	
7		10,20	
8		10,30	

Los valores recogidos en las tablas 5-8 y 5-10, se representan gráficamente en las figuras 5-21 y 5-22 respectivamente.



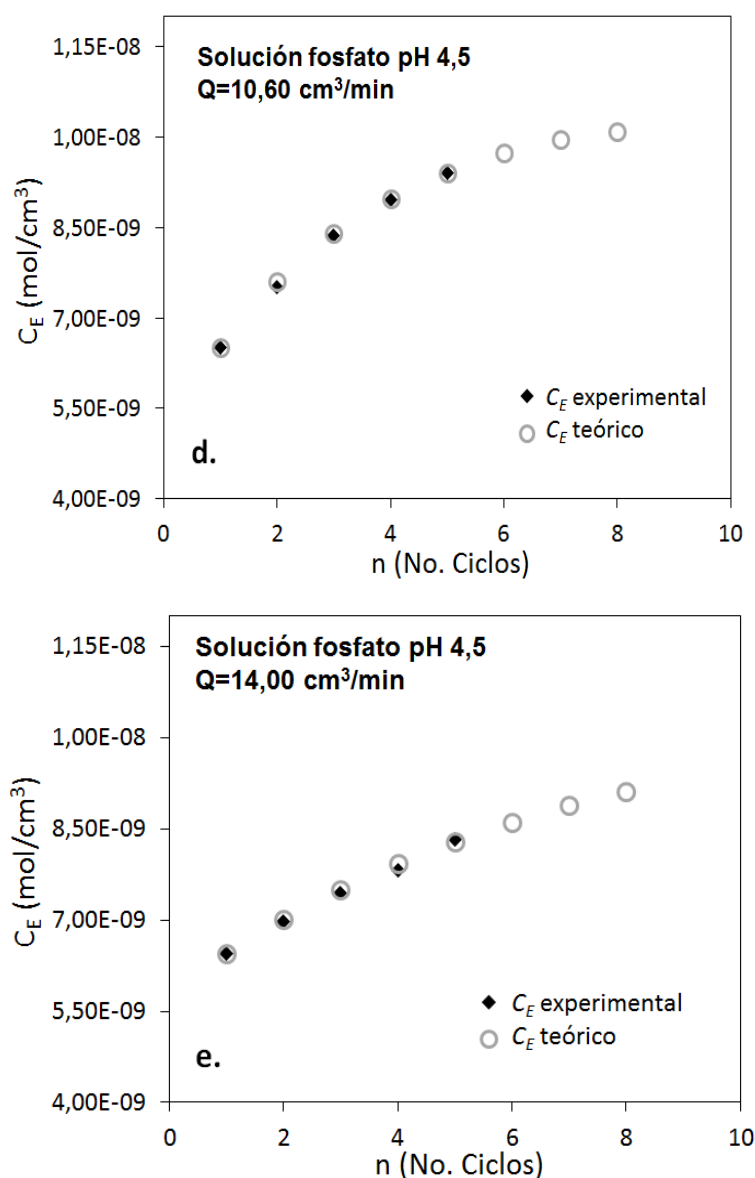


Figura 5-21. Concentración en el equilibrio C_E experimental y teórica vs Número de ciclos n , para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, para los cinco caudales estudiados.

De acuerdo a las figuras 5-21 a, b, c, d y e, se puede decir que en general, para los cinco caudales estudiados, el modelo es capaz de predecir la tendencia del comportamiento de la concentración de proteína en el equilibrio, con errores en general inferiores al 5%, y posteriormente establecer la tendencia del proceso de adsorción para futuros ciclos, con base en el comportamiento inicial y de esta forma decidir si es viable seguir llevando a cabo ciclos de adsorción/elución o si por el contrario es mejor regenerar o cambiar la columna.

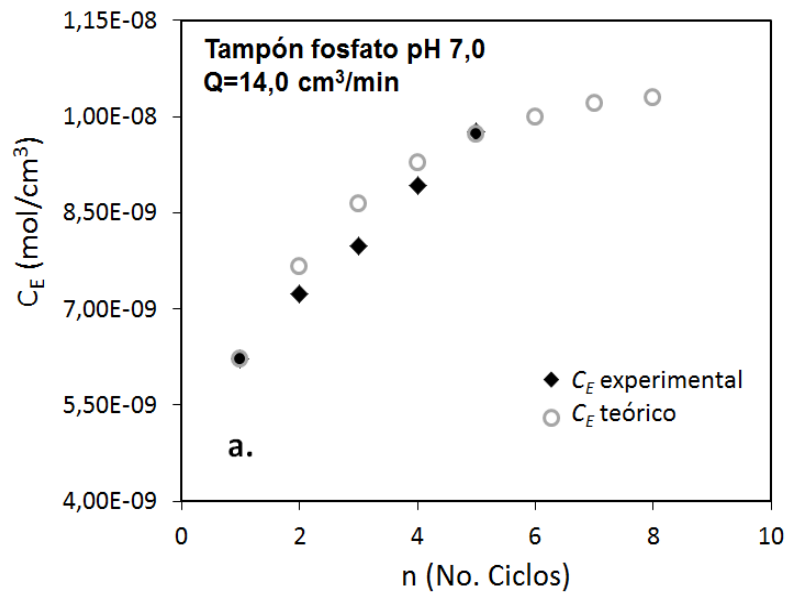


Figura 5-22. Concentración de proteína en el equilibrio C_E experimental y teórica vs Número de ciclos n , para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0 para el caudal de 14 cm³/min.

De igual forma, que los gráficos presentados en la figura 5-21, para los experimentos llevados a cabo en tampón fosfato pH 7,0, el modelo es capaz de predecir el comportamiento de la concentración en equilibrio C_E .

También cabe señalar que de forma general (para los dos estudios), de acuerdo a los valores obtenidos de C_E teórica, si se extrapola aún más estos valores, para más ciclos de reutilización (es decir, por encima de n_{10} aproximadamente), se puede observar que el comportamiento es prácticamente constante, es decir que la columna no sería capaz de adsorber más proteína.

5.1.4. Rendimiento del proceso de separación al reutilizar la columna cromatográfica

Dado que la pérdida de proteína en los procesos de elución es inferior al 2%, se ha considerado en el presente modelo que la cantidad recuperada es total.

Por ello, al final de los n -ciclos, la cantidad de proteína adsorbida en la matriz cromatográfica es posible calcularla, teniendo en cuenta la eficiencia de adsorción η_A y elución η_D , de acuerdo a la relación que se muestra en la ecuación 5-20:

$$\rho_{DS,n} = \eta_D \eta_A \rho_{AS}^R [1 - \eta_A (1 - \eta_D)]^{n-1} \quad (5-20)$$

Adicionando la cantidad de proteína separada en los diferentes ciclos de uso del adsorbente, la cantidad de proteína separada por unidad de área de columna monolítica $\rho_{Prod}|_n$, estaría dada por la ecuación 5-21:

$$\rho_{Prod}|_n \left(\text{mol} / \text{cm}^2 \cdot \text{ciclo} \right) = \eta_D \eta_A \rho_{AS}^R \sum_{j=2}^n [1 - \eta_A (1 - \eta_D)]^{j-1} = \alpha \sum_{j=2}^n \delta^{j-1} \quad (5-21)$$

Las constantes en la ecuación 5-21 están definidas como: $\alpha = \eta_D \eta_A \rho_{AS}^R$ y $\delta = [1 - \eta_A (1 - \eta_D)]$ respectivamente.

El tiempo necesario para completar un ciclo de adsorción/elución se definió anteriormente (ver sección 5.1.) como $t_{ciclo} = t_{ads} + 5$ (5 horas de tiempo muerto) y si la columna monolítica es utilizada para n cantidad de ciclos, la duración total del proceso de separación, deberá incluir también el tiempo de inactividad necesario para regenerar o cambiar la columna t_{inact} .

Así, finalmente la separación total de proteína por unidad de tiempo se calculará dividiendo la ecuación 5-21 por la duración total del proceso de reutilización, de acuerdo a la ecuación 5-22:

$$\rho_{Prod}|_n = \frac{\alpha \sum_{j=2}^n \delta^{j-1}}{n(t_{ads} + 5) + t_{inact}} \phi \quad (5-22)$$

Suponiendo que las etapas de lavado y elución tardan aproximadamente el mismo tiempo, la ecuación 5-22 representa la separación total de proteína por unidad de área de columna monolítica y por unidad de tiempo, presentando tres variables operativas: 1) La cantidad de tiempo permitido para el proceso de adsorción t_{ads} ; 2) El número de ciclos de utilización de la columna antes de la regeneración y 3) El tiempo de inactividad necesario para regenerar la columna o cambiarla, si la regeneración se realiza como un paso independiente. De esta forma, se puede obtener un cálculo aproximado del tiempo de regeneración, siguiendo los pasos de activación de la columna monolítica, descrita previamente en el capítulo de materiales y métodos (ver sección 4.3.3). Así, una estimación conservadora del tiempo de regeneración de la columna monolítica es $t_{inact}=t_{reg}=18$ horas.

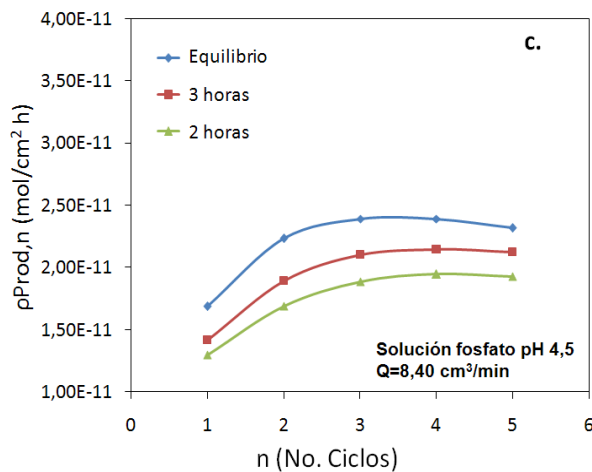
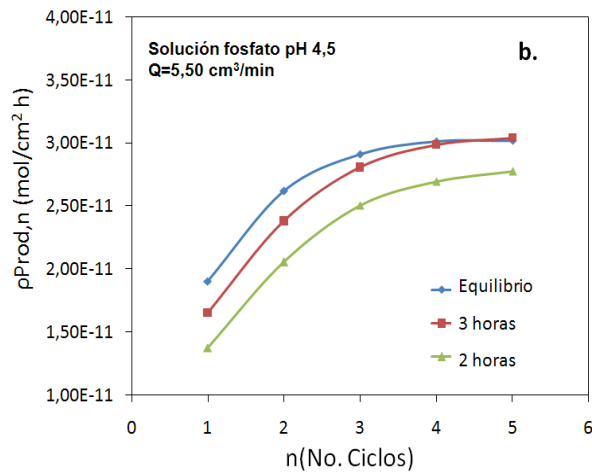
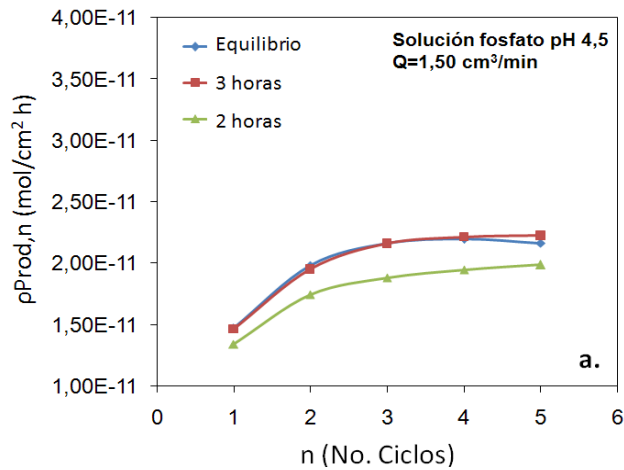
Por otro lado, si el proceso es operado mediante el cambio de la columna monolítica después de un determinado número de ciclos, el tiempo de inactividad (t_{inact}) se basaría en el tiempo necesario para limpiar el sistema y colocar una nueva columna activada en su lugar, así que al tiempo de inactividad habría que añadir aproximadamente 0,5 horas más.

Para tener en cuenta el tiempo de adsorción, se supone que las etapas de adsorción, se llevan a cabo en la misma cantidad de tiempo para todos los ciclos. Así, se estableció de forma general, que 5 horas sería tiempo suficiente para que proceso de adsorción alcanzara el equilibrio.

Así, para los experimentos en solución fosfato pH 4,5 (para los cinco caudales estudiados), de forma general, se pudo establecer, que para un tiempo de 3 horas, se alcanza aproximadamente entre un 85-90% del porcentaje total de proteína adsorbida en la matriz y en las primeras 2 horas se consigue aproximadamente entre el 75-80%, es decir que las 2 horas posteriores son necesarias para que el sistema finalice el proceso de adsorción, quedando solamente por adsorber entre un 10-15% de la proteína total adsorbida.

Para los experimentos llevados a cabo en tampón fosfato pH 7,0 a un caudal de $14,0 \text{ cm}^3/\text{min}$, se pudo establecer que para un tiempo de 3 horas se alcanza aproximadamente entre un 91-100% del porcentaje total de proteína adsorbida en la matriz y en las primeras 2 horas se consigue aproximadamente entre el 75-85%. De esta forma las 2 horas finales serían necesarias para el eluir aproximadamente el 9-10% de proteína total restante en la matriz.

De acuerdo a lo anterior las figuras 5-23 a, b, c, d y e (para los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5 para caudal estudiado) y 5-24 (experimentos llevados a cabo en tampón fosfato pH 7,0, caudal 14,0 cm³/min que se muestran a continuación, representan la cantidad de separación de proteína en mol por unidad de área en cm² por unidad de tiempo en horas, para los cinco ciclos de adsorción/elución, teniendo en cuenta un tiempo de regeneración de 18 horas, calculados mediante la ecuación 5-21.



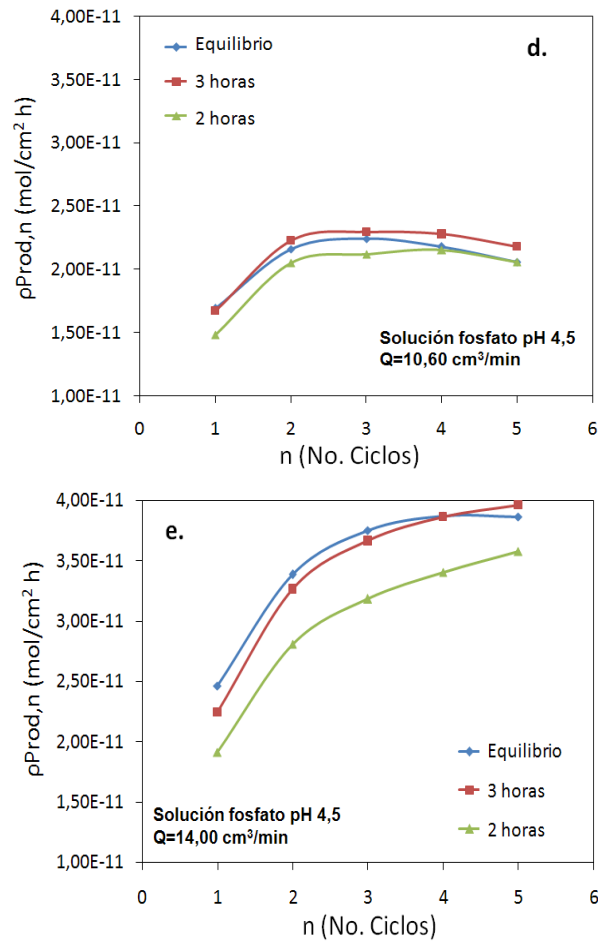


Figura 5-23. Cantidad de proteína separada por unidad de área de la columna por unidad de tiempo, como una función de la cantidad de ciclos de adsorción/elución teniendo en cuenta el tiempo de regeneración, para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, para los cinco caudales estudiados.

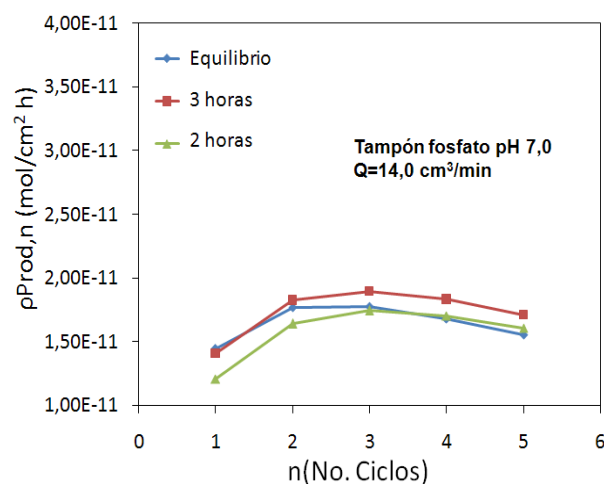


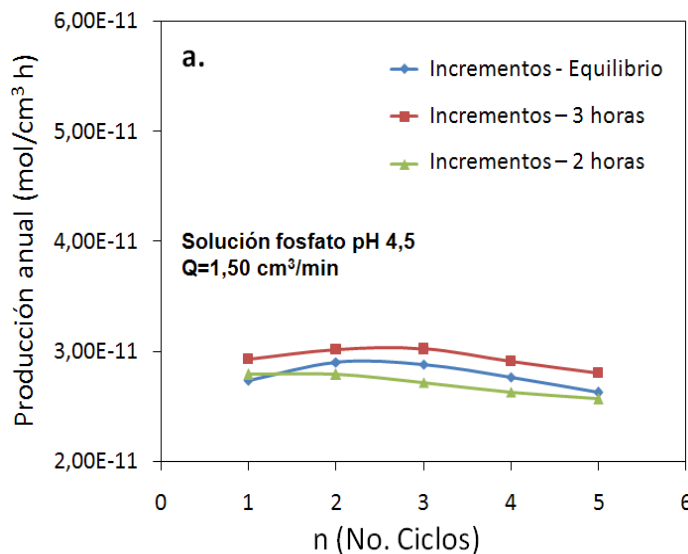
Figura 5-24. Cantidad de proteína separada por unidad de área de la columna por unidad de tiempo, como una función de la cantidad de ciclos de adsorción/elución teniendo en cuenta el tiempo de regeneración, para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0, para un caudal de 14,0 cm³/min.

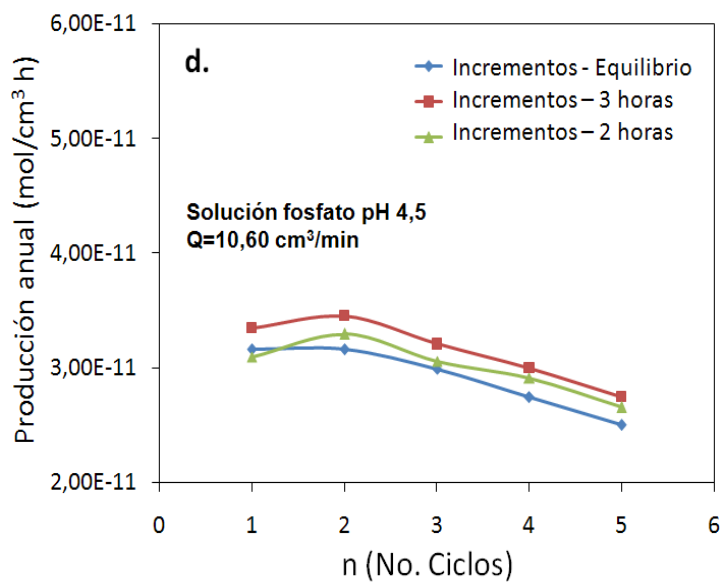
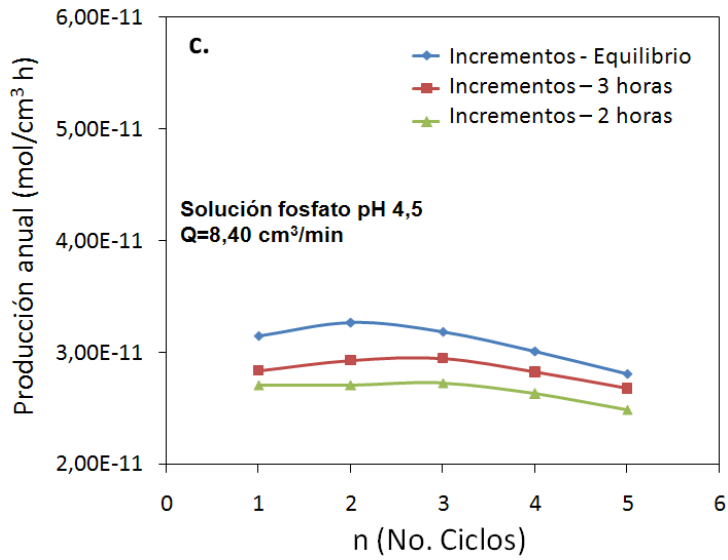
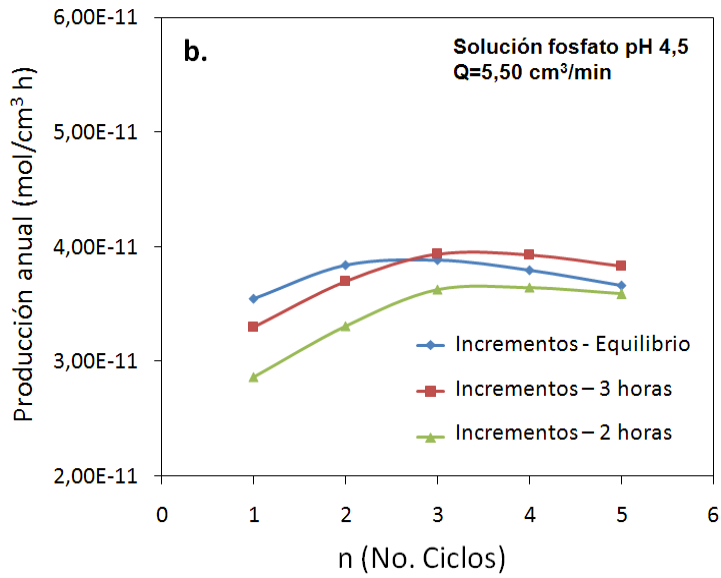
Si los criterios del rendimiento de separación son la cantidad de proteína separada por unidad de tiempo y unidad de volumen de la columna y n la base de una única columna monolítica que se debe regenerar después de un número de ciclos de adsorción /elución, de forma general para los dos estudios realizados, la cantidad de proteína separada indica que, si se alcanza equilibrio en cada ciclo, puede ser obtenida una cantidad máxima de separación con la misma columna, si se utiliza la columna entre tres y cuatro ciclos antes de la regeneración.

Sin embargo si la etapa de adsorción se disminuye a 3 horas, la columna seguiría aumentando lentamente la capacidad de adsorción después de 5 ciclos.

Dado que la cantidad de proteína separada es mostrada por unidad de tiempo, si se supone un funcionamiento continuo de la columna, dichos valores mostrarían características similares como una función del número de ciclos de reutilización y los tiempos de adsorción.

En las figuras 5-25 a, b, c, d y e, y 5-26 muestran los perfiles de las cantidad anual de proteína separada para los dos pH estudiados, en mol por unidad de área en cm^2 por unidad de tiempo en horas, para los cinco ciclos de adsorción/elución, teniendo en cuenta el proceso de elución y lavado de la columna que anteriormente se estableció en 5 horas.





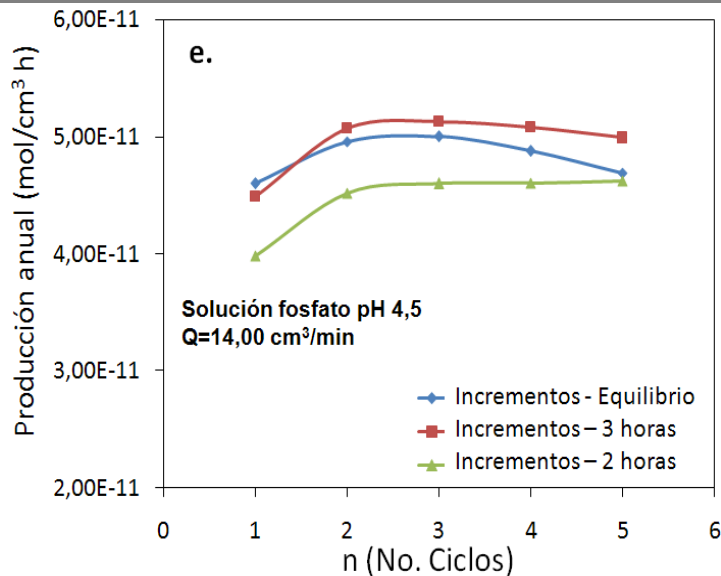


Figura 5-25. Rendimiento de la columna monolítica para el proceso de separación anual, para un tiempo de inactividad de 5 horas, para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, para los cinco caudales estudiados.

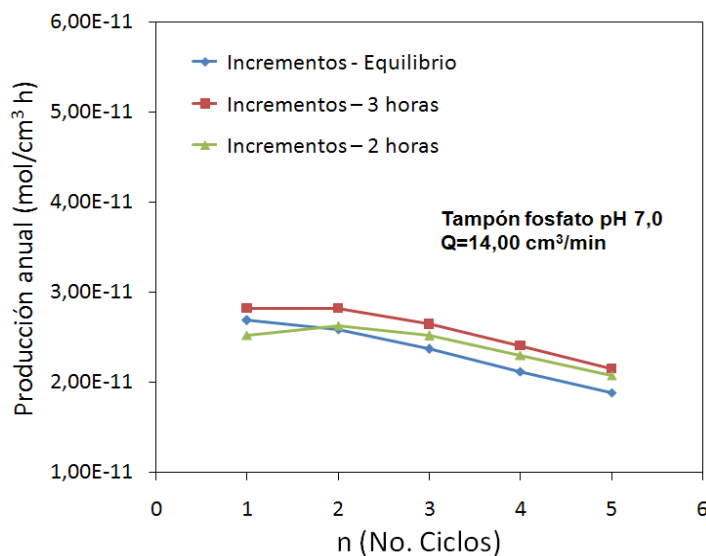


Figura 5-26. Rendimiento de la columna monolítica para el proceso de separación anual, para un tiempo de inactividad de 5 horas, para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0, caudal 14 cm³/min.

De acuerdo a los resultados anteriores de forma general para los dos pH estudiados, se compara la separación de proteína en la columna monolítica cuando el proceso de adsorción alcanza el equilibrio (es decir, 5 horas), con respecto a la cantidad de proteína separada cuando el proceso de adsorción se interrumpe al

cabo de 3 y 2 horas respectivamente. De esta forma, si el proceso de adsorción alcanza el equilibrio, para conseguir una cantidad de separación máxima, la columna sólo se podría reutilizar dos veces (3 ciclos de adsorción).

Si la adsorción termina después de 3 horas, las cantidad de proteína separada por unidad de área de columna son un poco más altas que en el caso de alcanzar el equilibrio y también tiene un máximo para una operación de 3 ciclos.

Finalmente, si el proceso de adsorción termina después de dos horas, para cada ciclo, la cantidad de separación por unidad de área de columna será menor que la alcanzada en el equilibrio (5 horas).

De acuerdo con el comportamiento de los valores recogidos en los anteriores gráficos, es evidente que la reutilización de la columna monolítica, aumentará el rendimiento de la separación de proteína para una operación de proceso dado. Teniendo en cuenta el desgaste y el deterioro que se produce durante el proceso y el reemplazo de toda la columna que se llevaría a cabo después de una serie de varios ciclos.

Las proteínas son moléculas de gran tamaño, que no migran en los micro poros del gel de agarosa, como consecuencia la cantidad de proteína que puede ser adsorbida en la columna del monolito, es directamente proporcional al área interfacial de la columna monolítica.

La medida directa de la cantidad de proteína adsorbida, es la concentración de proteína en la superficie, expresada en moles por unidad de superficie del adsorbente ρ_{AS} . Por tanto, debido a la interferencia y superposición entre las moléculas de proteína adsorbida, la cantidad real de proteína que puede ser adsorbida en la interfase es menor que la cantidad teórica $\rho_{AS}^T \gg \rho_{AS}^R$.

Existen razones de tipo molecular para el hecho de que las concentraciones reales de adsorción sean menores que el límite teórico, tales como la forma de la molécula, la carga eléctrica, la superficie de adsorción y en cierta medida la naturaleza aleatoria de los procesos de adsorción.

A pesar de que la fase estacionaria propuesta en éste trabajo, presenta una menor área específica interfacial con respecto a las columnas empaquetadas, las columnas monolíticas son muy adecuadas para la separación de alto rendimiento de proteínas debido a que presenta una caída de presión baja permitiendo trabajar a diversos caudales. De acuerdo, los monolitos cerámicos pueden ser usados fácilmente en una secuencia de ciclos de adsorción/elución.

5.1.5. Transferencia de materia dentro de los canales del monolito cerámico

En Cromatografía IMAC, la determinación de los parámetros de transferencia de materia así como el conocimiento de la velocidad de adsorción son factores de gran importancia, ya que condicionarán el cambio de escala del proceso.

Así, para la determinación de estos parámetros, se desarrolló el modelo de transferencia de materia que se describe a continuación, utilizando la plataforma MATLAB, que ajusta el coeficiente de dispersión k_{disp} y la constante cinética de adsorción k_{ads} , parámetros que se explicaran a continuación, por un método de búsqueda de mínimos en funciones multiparamétricas.

5.1.5.1. Desarrollo del Modelo

En primer lugar, hay que tener en cuenta que el proceso de adsorción es llevado a cabo sólo en la interfase entre el adsorbente (gel de agarosa) y el líquido circundante. Así, el volumen de control definido en el presente sistema experimental, incluye el volumen del recipiente que contiene la solución de proteína, el volumen del sistema de bomba y tubería, así como el volumen combinado de los canales del monolito, como se puede observar en la figura 5-16, mostrada previamente en el apartado 5.1.

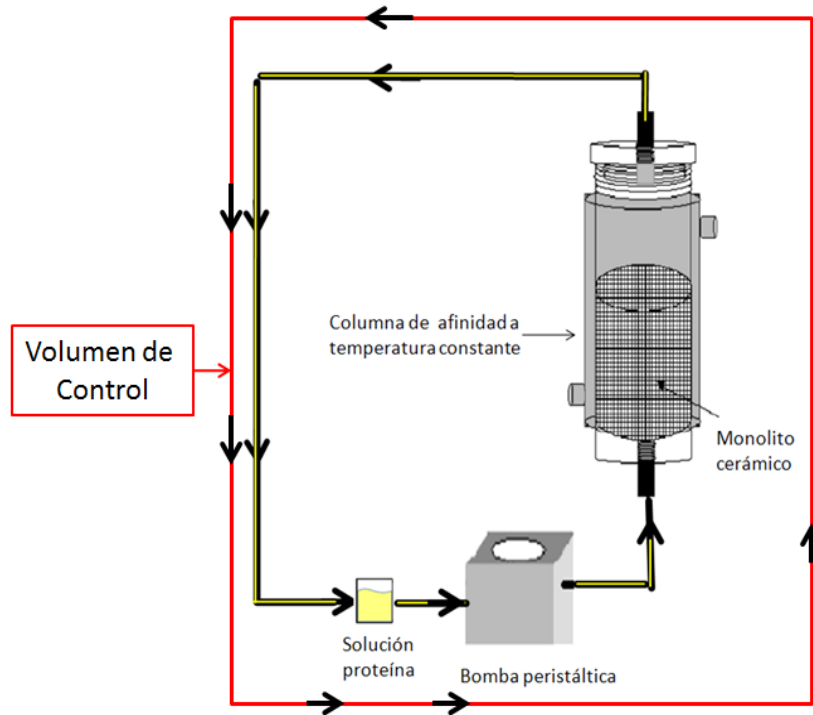


Figura 5-16. Esquema del volumen de control del sistema de adsorción propuesto.

De esta forma, la proteína se disuelve en un volumen definido, y éste volumen el que circula a través de todo el circuito, donde la concentración de proteína de la solución está cambiando con el tiempo, debido a que la proteína se va a adsorbiendo en las paredes de los canales del monolito.

Por lo tanto se ha de tener en cuenta el volumen de control, que como se ha indicado es cerrado, sin termino convectivo ni fuente de reacción química.

De acuerdo a lo enunciado anteriormente, el balance de materia podría describirse como se muestra a continuación.

5.1.5.1.1. Balance de Materia

La variación global de la concentración de proteína en solución y la proteína adsorbida en las paredes del monolito viene dada por la ecuación 5-23 que se muestra a continuación, la cual proviene de las ecuaciones 5-2 y 5-3 descritas anteriormente en el apartado 5.1.3 .

$$m \frac{dC_E}{dt} + \frac{d\rho_{BE}}{dt} = 0 \quad (5-23)$$

Donde

$$m = \frac{V_o}{A_{mon}} \quad (5-24)$$

De tal forma que al final de un ciclo de adsorción hay una determinada cantidad de proteína adsorbida en la superficie del monolito $C_{E,ads}$ (mol/cm³) y una pequeña fracción de proteína que simplemente queda retenida $C_{E,ret}$ (mol/cm³) dentro del monolito con la solución restante en el espacio interior del canal del monolito, lo cual se puede describir de acuerdo con la ecuación 5-25:

$$C_{E|_1} = C_o - C_{E,ads} - C_{E,ret} \quad (5-25)$$

Donde

$$C_{E,ads} = C_o - C_{E|_1} + C_{E,ret} = (C_o - C_{E|_1})\phi \quad (5-26)$$

Y siendo ϕ

$$\phi = \frac{C_o - (C_{E|_1} - C_{E,ret})}{(C_{E|_1} - C_{E,ret})} = \frac{C_o}{(C_{E|_1} - C_{E,ret})} - 1 \quad (5-27)$$

Que como se describió en el apartado 5.1.3 es un término de corrección para tener en cuenta la cantidad de proteína atrapada en el interior de los canales del monolito.

De tal forma que la cantidad de proteína no enlazada específicamente a los ligandos del soporte cromatográfico es muy baja y representa un porcentaje relativamente constante de la proteína total disuelta en la solución circundante.

Así, a su vez la ecuación 5-27 puede escribirse en términos de la concentración superficial de proteína adsorbida, obteniendo nuevamente la ecuación 5-5, descrita en el apartado 5.1.3.

$$\rho_{BE}(t) = (C_o - C_E)m\phi \quad (5-5)$$

5.1.5.1.2. Transferencia de materia en la superficie del adsorbente

Para evaluar la contribución del transporte de proteína desde el volumen global de la solución hasta la superficie de agarosa, el balance de materia es llevado a cabo sobre un pequeño diferencia de longitud dz (figura 5-27), a lo largo de la columna, de tal forma que el cambio en la concentración de proteína a lo largo de un canal da como resultado la proteína adsorbida en la superficie del monolito, como se muestra en la ecuación 5-28:

$$\frac{d}{dt} \int_{dV} \bar{C}_E dV + \frac{d}{dt} \int_{dA} \bar{\rho}_{BE} dA + \iint_{dA} \bar{C}_E \underline{y} \cdot \underline{n} dA = 0 \quad (5-28)$$

Donde el primer término representa la variación local de la concentración de proteína en equilibrio \bar{C}_E en el volumen total con respecto al tiempo, el segundo corresponde a la variación temporal de la proteína adsorbida en la superficie del monolito y el tercer término representa el flujo convectivo de la entrada y la salida de materia que en el presente caso es despreciable.

Esta suposición puede ser justificada suponiendo que, a nivel local, el flujo de materia de proteína que migra desde la solución hasta la interface es igual a la proteína adsorbida sobre la interface de agarosa. Por tanto la ecuación 5-28 queda transformada en la ecuación 5-29:

$$\frac{d}{dt} \left[\int_{dV} \bar{C}_E dV + \int_{dA} \bar{\rho}_{BE} dA \right] \cong 0 \quad (5-29)$$

De la ecuación 5-29 se deduce que el término dentro de los corchetes es una constante y teniendo en cuenta la suposición de que la dispersión de proteína es igual a la adsorción de la misma, habrá un equilibrio local de la concentración.

$$\frac{d\bar{\rho}_{BE}}{dt} = -m \frac{d\bar{C}_E}{dt} = k_{disp} (\bar{C}_{E,Vol}(t) - \bar{C}_{E,int}) \quad (5-30)$$

Donde el coeficiente de dispersión k_{disp} (cm/s), es un coeficiente de dispersión local que permite modelar el proceso de difusión radial.

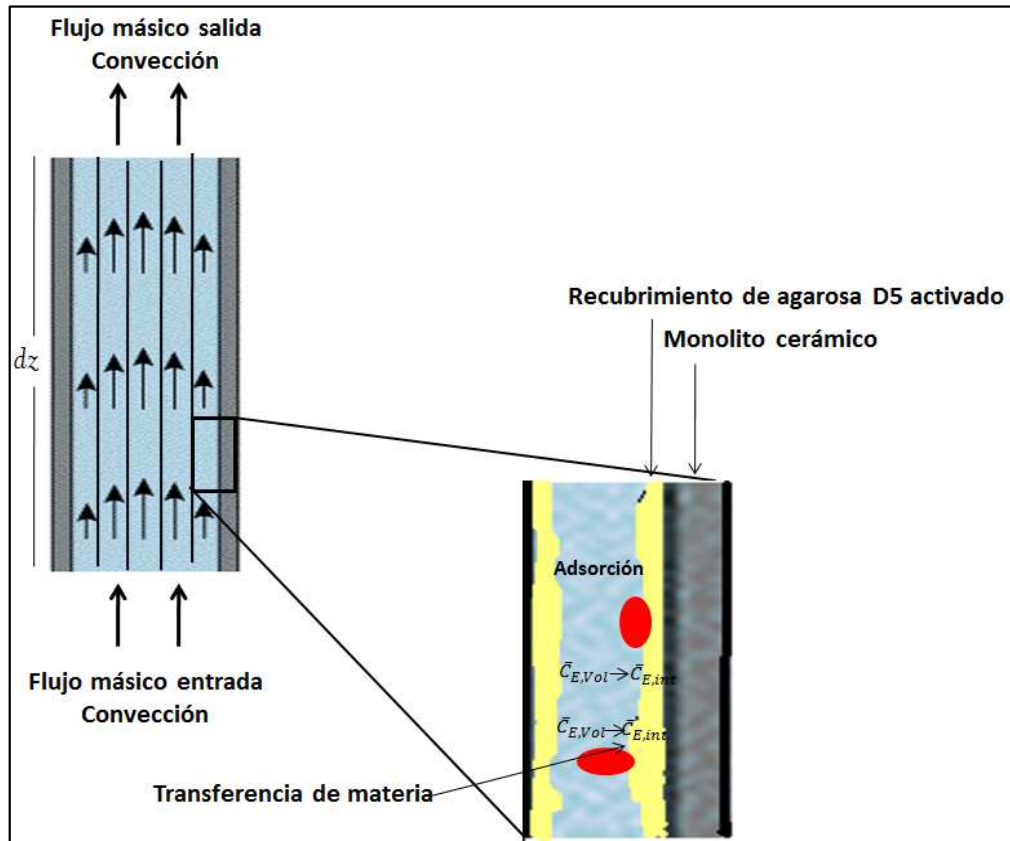


Figura 5-27. Esquema del proceso de adsorción en una columna monolítica multicanal recubierta por agarosa microporosa D5.

5.1.5.1.3. Interacciones proteína-adsorbente

Suponiendo que no hay acumulación de proteína en la superficie de agarosa, la cantidad adsorbida de proteína sobre la superficie sólida es una función de la concentración de proteína en solución en la interfase, $\bar{C}_{E,int}$ y la cantidad de sitios libres disponibles para la adsorción, de acuerdo a la ecuación 5-31:

$$\frac{d\bar{\rho}_{BE}}{dt} = -m \frac{d\bar{C}_E}{dt} = k_{ads} \left[(\rho_{AS}^R - \bar{\rho}_{BE}) m \bar{C}_{E,int} - K_D \bar{\rho}_{BE} \right] \quad (5-31)$$

Donde k_{ads} ($\text{cm}^2/\text{mol s}$), es la constante cinética de adsorción, k_{des} (s^{-1}) es la constante cinética de desorción y K_D es la constante de equilibrio de desorción igual a $K_D = \frac{k_{des}}{k_{ads}}$ (mol/cm^2)

Puesto que se ha asumido que la cantidad de proteína adsorbida es igual a la velocidad de difusión del volumen del canal a la interfase, es posible utilizar las ecuaciones 5-30 y 5-31 para eliminar la concentración de proteína en solución en la interfase de agarosa como se muestra en la ecuación 5-32.

$$\bar{C}_{E,int} = \bar{C}_E(t) + \frac{m}{k_{disp}} \frac{d\bar{C}_E}{dt} = \frac{-m \frac{d\bar{C}_E}{dt} + k_{ads} K_D \bar{\rho}_{BE}}{k_{ads} (\rho_{AS}^R - \bar{\rho}_{BE}) m} \quad (5-32)$$

Resolviendo la ecuación 5-32 para la cantidad adsorbida de proteína en solución, se obtiene una ecuación diferencial que relaciona el coeficiente de dispersión de transferencia de materia y la constante de velocidad de adsorción k_{ads} en la interfase de agarosa, como se muestra en la ecuación 5-33.

$$-\frac{d\bar{C}_E}{dt} \left[\frac{(\rho_{AS}^R - \bar{\rho}_{BE}) m}{k_{disp}} + \frac{1}{k_{ads}} \right] = \bar{C}_E(t) (\rho_{AS}^R - \bar{\rho}_{BE}) - \frac{K_D \bar{\rho}_{BE}}{m} \quad (5-33)$$

Así, para eliminar la concentración de proteína adsorbida por unidad de superficie $\bar{\rho}_{BE}$ de la ecuación 5-33, se utiliza la ecuación 5-5 descrita anteriormente, obteniéndose:

$$\begin{aligned} -\frac{d\bar{C}_E}{dt} \left[\frac{(\rho_{AS}^R - (C_o - \bar{C}_E) m) m}{k_{disp}} + \frac{1}{k_{ads}} \right] &= \bar{C}_E (\rho_{AS}^R - (C_o - \bar{C}_E) m) - K_D (C_o - \bar{C}_E) \\ &= m\bar{C}_E^2 + \bar{C}_E [\rho_{AS}^R - mC_o + K_D] - K_D C_o \end{aligned} \quad (5-34)$$

Finalmente reordenando la ecuación 5-34 e introduciendo las raíces cuadradas del lado derecho de la ecuación como se muestra a continuación, la ecuación 5-34 quedara convertida en la ecuación 5-35 que se muestra a continuación

$$-\frac{d\bar{C}_E}{dt} \left[\frac{1}{M} + \frac{1}{k_{ads}} \right] = (\bar{C}_E - x_1)(\bar{C}_E - x_2) \quad (5-35)$$

$$\bar{C}_E^2 + \bar{C}_E \left[\frac{\rho_{AS}^o}{m} - C_o + \frac{K_D}{m} \right] - \frac{K_D}{m} C_o = \bar{C}_E^2 - B\bar{C}_E - c = (\bar{C}_E - x_1)(\bar{C}_E - x_2)$$

Donde

$$c = \frac{K_D C_o}{m} \quad (5-36)$$

$$M = \frac{E}{(\rho_{AS}^R - (C_o - \bar{C}_E)m)} \quad (5-37)$$

$$E = \frac{k_{disp}}{m} \quad (5-38)$$

Y resolviendo la ecuación cuadrática 5-35 tenemos que:

$$\bar{C}_E^2 + \bar{C}_E \left[\frac{\rho_{AS}^R}{m} - C_o + \frac{K_D}{m} \right] - \frac{K_D}{m} C_o = 0 \quad (5-39)$$

$$\bar{C}_E = \frac{-\frac{\rho_{AS}^R}{m} + C_o - \frac{K_D}{m} \pm \sqrt{\left(\frac{\rho_{AS}^R}{m} - C_o + \frac{K_D}{m} \right)^2 + 4 \frac{K_D C_o}{m}}}{2}$$

Y simplificando podemos decir que:

$$B = \left[\frac{\rho_{AS}^R}{m} - C_o + \frac{K_D}{m} \right] \quad (5-40)$$

Así, las dos soluciones a la ecuación cuadrática son x_1 y x_2 que se muestran en la ecuación 5-41 y 5-42 respectivamente:

$$x_1 = \frac{1}{2} \left[B + \sqrt{B^2 + \frac{4K_D C_o}{m}} \right] \quad (5-41)$$

$$x_2 = \frac{1}{2} \left[B - \sqrt{B^2 + \frac{4K_D C_o}{m}} \right] \quad (5-42)$$

Donde el valor de x_1 corresponde a la predicción de la concentración de proteína en equilibrio local \bar{C}_E mediante el modelo de transferencia de materia propuesto.

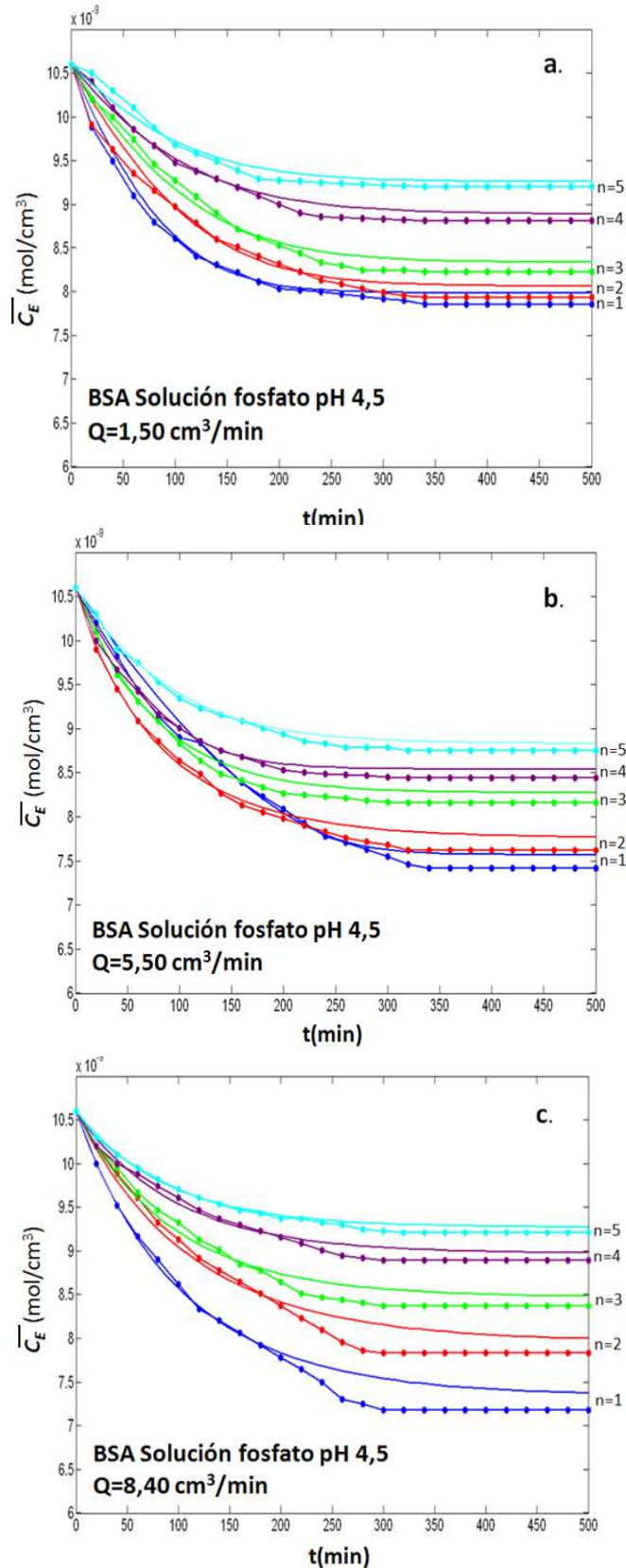
Si bien la definición de las eficiencias local y global son distintas, si se supone que todas las secciones del monolito se comportan en forma similar dentro de un promedio del volumen de la columna, se podría decir que la eficiencia local es idéntica a la eficiencia global, por lo tanto la predicción de concentración en equilibrio global C_E , obtenida por medio del modelo de eficiencia y la concentración en equilibrio local \bar{C}_E obtenida por medio del modelo de transferencia son prácticamente iguales, con un error inferior al 5 como se ha comprobado, como cabía de esperar al ser la conversión por paso menor al 20% de acuerdo con la teoría de reactores tubulares (Smith, 1981).

Los valores correspondientes a los perfiles de concentración-tiempo fueron correlacionados de acuerdo con la ecuación 5-34 del modelo modificado de Mao *et al*, (1993) utilizando la plataforma MATLAB, el cual ajusta el coeficiente de dispersión k_{disp} y la constante cinética de adsorción k_{ads} , por un método de búsqueda de mínimos en funciones multiparamétricas. El diagrama de flujo del proceso de cálculo y los programas utilizados se recogen en el anexo E.

Los perfiles experimentales del proceso de adsorción (C_E vs t) de la proteína BSA para cada uno de los dos sistemas estudiados, con los correspondientes ciclos de uso (n=1, n=2, n=3, n=4 y n=5), fueron comparados con los perfiles teóricos predichos por el modelo.

A continuación se muestran los perfiles de concentración en el equilibrio para la proteína BSA vs el tiempo, obtenidas experimentalmente con respecto a las simuladas mediante el modelo matemático, en primer lugar para los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales estudiados (figura 5-28 a, b, c, d y e), en segundo lugar para los experimentos llevados a cabo

en tampón fosfato pH 7,0 y caudal $14 \text{ cm}^3/\text{min}$ (figura 5-29). En estas figuras las líneas negras continuas son los valores teóricos predichos por el modelo y las líneas en color, los valores experimentales.



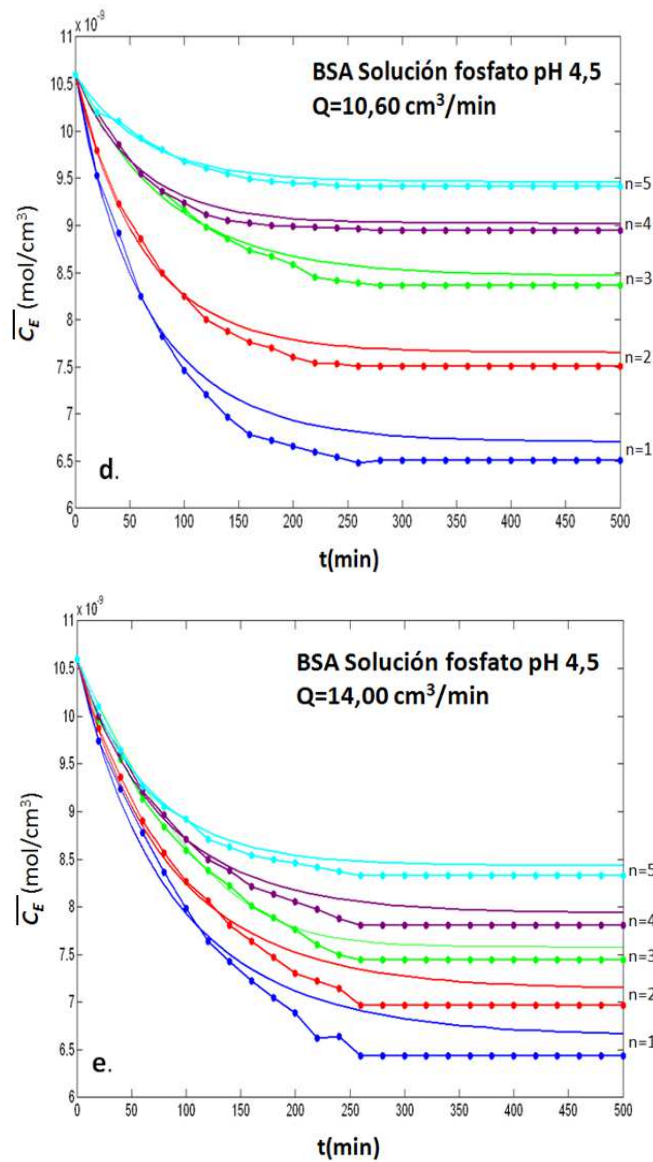


Figura 5-28. Perfiles teóricos y experimentales de concentración en el sobrenadante vs tiempo, correspondientes a la adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para los cinco caudales estudiados.

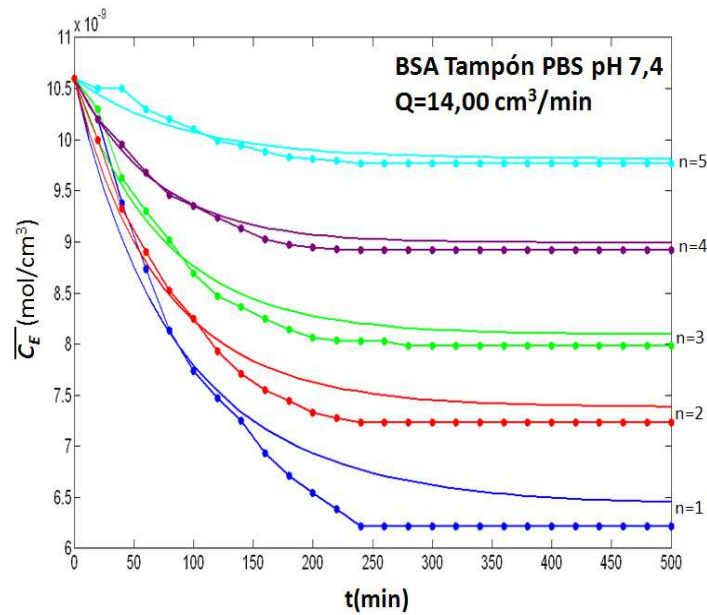


Figura 5-29. Perfiles teóricos y experimentales de concentración en el sobrenadante vs tiempo, correspondientes a la adsorción de la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0 y 298 K, para el caudal de 14 cm³/min.

En general, las gráficas 5-28 y 5-29 reflejan que a medida que se reutiliza el adsorbente la capacidad de adsorción disminuye, como ya se había mencionado anteriormente.

También se puede observar que el modelo se ajusta adecuadamente todos los experimentos, siendo las concentraciones en equilibrio calculadas mediante el modelo similar a las obtenidas experimentalmente en todos los ciclos con un error inferior al 5%.

Con respecto a los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales, el modelo utilizado predice que la concentración de proteína adsorbida, varía con respecto al caudal utilizado, observándose una clara tendencia a adsorber un porcentaje mayor de proteína, en el caudal más alto estudiado.

Asimismo, al caudal de 14 cm³/min, el comportamiento de los perfiles de adsorción es prácticamente igual para los dos pH estudiados.

En la figura 5-30, se muestra el gráfico correspondiente al promedio de los experimentos llevados a cabo a los cinco caudales estudiados para n_1 , n_2 , n_3 , n_4 y n_5 respectivamente.

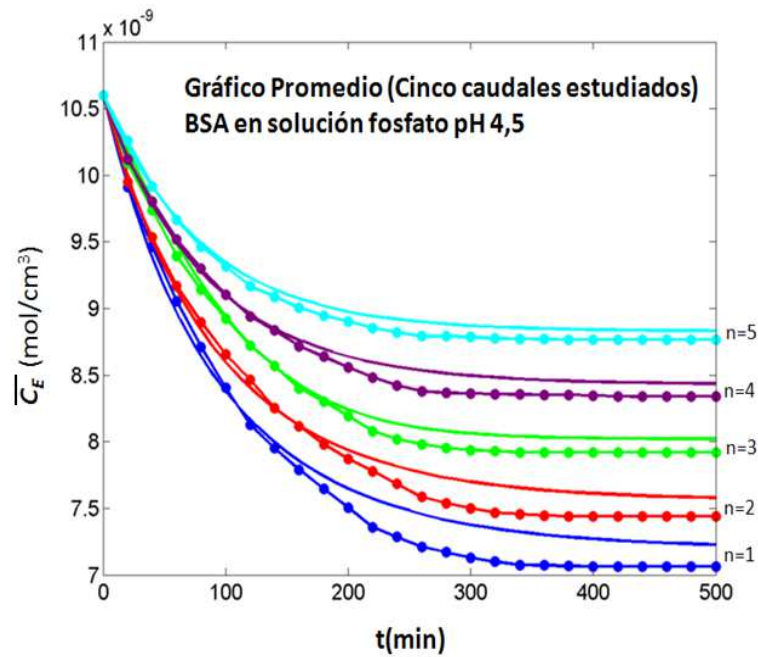


Figura 5-30. Perfiles promediados teóricos y experimentales de concentración en el sobrenadante respecto al tiempo, para el proceso de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 para los cinco ciclos de adsorción.

De acuerdo con la figura 5-30, si promediamos los valores de cada uno de los ciclos para los cinco caudales estudiados, se puede observar que la tendencia efectivamente es que la capacidad de adsorción del monolito decrece con el aumento de los ciclos, independientemente del caudal utilizado. Esto como se mencionó anteriormente podría indicar que si el área real efectiva fuese la misma para todos los monolitos, independientemente del caudal, la concentración de proteína en equilibrio sería la misma independientemente del caudal.

Asimismo, si se comparan los valores de k_{ads} y k_{disp} (como se mostrará más adelante) obtenidos por el modelo matemático de acuerdo a la normalización de los perfiles de adsorción y se compara con el promedio de los valores obtenidos de forma independiente para cada uno de los caudales estudiados, se observa que los valores son muy similares.

Éste hecho supondría que si la única variación de un monolito a otro es el área de adsorción, los valores de la cantidad real de proteína adsorbida por unidad de superficie en el equilibrio, debería ser la misma en todos los casos, sin embargo como se mencionó anteriormente, existe variación entre los monolitos debido al recubrimiento, ya que en algunos casos los canales pueden quedar obstruidos disminuyendo así el área de adsorción, y a caudales altos, estos canales pueden ser liberados, aumentando así la capacidad de adsorción del monolito.

Las tablas que contienen los valores de la concentración en el equilibrio obtenida experimentalmente, comparada con los valores calculados teóricamente mediante el modelo, para los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5 a diferentes caudales, tampón fosfato pH 7,0, $Q=14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$ y los valores correspondientes a los perfiles normalizados para los cinco caudales estudiados se recogen en el anexo D.

5.1.6. Determinación de la constante cinética de adsorción y el coeficiente de dispersión

5.1.6.1. Constante cinética de adsorción k_{ads}

Los valores de las constantes de velocidad obtenidas mediante la plataforma MATLAB son consideradas como un pseudo-parámetro k'_{ads} , debido a que para cada reutilización, el valor obtenido es relativamente distinto, debido a que la proteína que no es posible eluir, puede obstruir sitios de unión que en los siguientes ciclos de uso no estarían disponibles. Sin embargo teniendo en cuenta que a un mismo caudal el tiempo necesario para que el proceso de adsorción alcance el equilibrio es prácticamente el mismo en todos los ciclos, es posible promediar los valores obtenidos de k'_{ads} para los cinco ciclos a un mismo caudal.

Así, para calcular k_{ads} , el valor promedio k'_{ads} se relacionó con un factor que considerara la eficiencia del proceso de adsorción con los diferentes reutilizaciones y para ello se utilizó la eficiencia de adsorción η_A ya que tiene en cuenta la transformación natural que sufre el monolito a través de las sucesivas reutilizaciones, debido a los sitios que quedan bloqueados por el imidazol, y la cantidad de proteína que queda retenida, la cual no es posible eluirla, como se mencionó anteriormente y relaciona la cantidad de proteína adsorbida durante el primer ciclo de adsorción por unidad de superficie y la cantidad real de proteína que puede ser adsorbida en la superficie del adsorbente, de acuerdo a la ecuación 5-9, de la siguiente manera:

$$k_{ads} = \eta_A \cdot k'_{ads} \quad (5-43)$$

En la tabla 5-11 se recogen los resultados correspondientes a los resultados promedio de k_{ads}' y k_{ads} para los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5 para los cinco caudales estudiados y en la tabla 5-12, los resultados para los experimentos llevados a cabo en tampón fosfato pH 7,0 y caudal 14,00 cm³/min.

Tabla 5-11. Determinación de la constante cinética de adsorción k_{ads} a partir de las pseudo-constantes de velocidad k_{ads}' , para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, Q= 1,5 cm³/min.

Caudal (cm ³ /min)	$k_{ads}' \times 10^4$ (cm ² /mol s)	$k_{ads} \times 10^4$ (cm ² /mol s)
1,50	2,31	1,94
5,50	6,48	5,77
8,40	4,25	3,78
10,60	40,0	35,20
14,00	129,00	117,39

Tabla 5-12. Determinación de la constante cinética de adsorción k_{ads} a partir de las pseudo-constantes de velocidad k_{ads}' , para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0, Q= 14,00 cm³/min.

Caudal (cm ³ /min)	$k_{ads}' \times 10^4$ (cm ² /mol s)	$k_{ads} \times 10^4$ (cm ² /mol s)
14,00	140,00	117,60

5.1.6.1.1. Efecto del caudal en la constante cinética de adsorción

En la figura 5-31 se puede observar gráficamente el comportamiento de la constante cinética de adsorción k_{ads} con respecto al número de Reynolds, para los experimentos de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5.

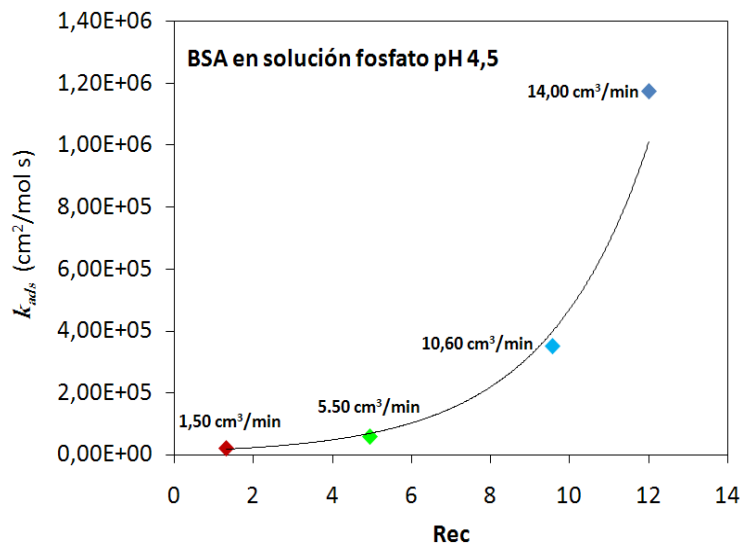


Figura 5-31. Variación de la constante de cinética de adsorción k_{ads} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, con respecto al número de Reynolds.

Como puede observarse en la figura 5-31, la velocidad de adsorción presenta un valor más alto al aumentar el caudal, lo cual pone nuevamente de manifiesto que la esteoquímica del quelato IDA-Cu²⁺ puede verse favorecida a caudales por encima de 5,50 cm³/min de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.1.

Así, de acuerdo a la figura 5-31, la constante cinética de adsorción presenta una tendencia exponencial, la cual se pronuncia claramente al aumentar el caudal por encima de 5,50 cm³/min, ya que por debajo de dicho caudal el comportamiento de k_{ads} es similar.

De esta forma se podría hacer una relación entre la capacidad de adsorción del adsorbente, el caudal y la constante de velocidad, donde de forma general se observa que a caudales bajos, k_{ads} presenta valores bajos (con respecto a los

obtenidos a caudales por encima de 5,50 cm³/min) y la cantidad de proteína adsorbida es menor.

5.1.6.1.2. Efecto del pH en la constante cinética de adsorción

De acuerdo a los valores obtenidos de k_{ads} para los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5 y tampón fosfato pH 7,0 a un caudal de 14,0 cm³/min, se puede observar que los valores obtenidos en ambos casos son prácticamente iguales. De acuerdo a éste resultado, se puede decir que aumentar el pH no varía significativamente la constante cinética de adsorción, lo cual concuerda con el hecho de que al caudal de 14,00 cm³/min, el tiempo necesario para que el sistema alcanzara el equilibrio es prácticamente el mismo, independientemente de la cantidad de proteína adsorbida por unidad de superficie.

5.1.6.2. Coeficiente de dispersión k_{disp}

Los coeficientes de dispersión k_{disp} se obtuvieron mediante el modelo matemático anteriormente descrito, usando la plataforma MATLAB, pero como en el caso de la constante cinética de adsorción, el valor obtenido es un pseudo-coeficiente, por lo que también fue necesario calcularlo con la segunda eficiencia del proceso de adsorción η_A .

Sin embargo, suponiendo que no hay limitaciones impuestas por el número de sitios de adsorción, ya que la cantidad de iones de Cu²⁺ inmovilizados en la matriz, es al menos cuatro órdenes mayor en magnitud que la cantidad de proteína que se puede unir a ellos y que no hay moléculas de proteína residual proveniente de otros ciclos de adsorción/elución que bloquee sitios de enlace, para n=1 cuando el adsorbente es fresco, estarían disponibles todos los sitios para llevar a cabo el enlace CAT-Cu²⁺, por lo tanto se puede decir que $k'_{ads} = k_{ads}$, pero para n≠1 los sitios reales disponibles para la adsorción son menores y además, debido a que la proteína que no puede ser eluída al tener mayor tamaño puede bloquear sitios de

unión, no dejándolos disponibles para el siguiente ciclo de adsorción/elución y así sucesivamente. Así como, el imidazol, que queda enlazado a los sitios de Cu^{2+} , dejados libres previamente por la proteína, los cuales no estarán disponibles para el siguiente ciclo de adsorción/elución.

Por tanto los valores de k'_{disp} para $n \neq 1$, es necesario calcularla con la eficiencia de adsorción η_A como se mencionó anteriormente de acuerdo con la ecuación 5-39.

Así, en las tablas de la 5-13 á 5-17 se recogen los valores obtenidos para k'_{disp} correspondientes a los experimentos llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5, para los cinco caudales estudiados respectivamente, así como los valores correspondientes para k_{disp} , teniendo en cuenta el valor de η_A .

Tabla 5-13. Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

n	$k'_{disp} \times 10^6$ (cm/s)	$k_{disp} \times 10^6$ (cm/s)
1	2,37	2,37
2	2,56	2,15
3	2,14	1,80
4	1,82	1,52
5	1,74	1,46

Tabla 5-14. Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=5,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

n	$k'_{disp} \times 10^6$ (cm/s)	$k_{disp} \times 10^6$ (cm/s)
1	11,0	11,0
2	9,60	8,54
3	7,18	6,39
4	2,46	2,19
5	3,13	2,78

Tabla 5-15. Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=8,40 \text{ cm}^3/\text{min}$.

n	$k'_{disp} \times 10^6$ (cm/s)	$k_{disp} \times 10^6$ (cm/s)
1	16,30	16,30
2	14,20	12,64
3	13,80	12,32
4	13,10	11,66
5	7,03	6,26

Tabla 5-16. Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=10,60 \text{ cm}^3/\text{min}$.

n	$k'_{disp} \times 10^6$ (cm/s)	$k_{disp} \times 10^6$ (cm/s)
1	53,70	53,70
2	39,20	34,50
3	28,50	25,08
4	22,00	19,36
5	17,70	15,58

Tabla 5-17. Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$.

n	$k'_{disp} \times 10^6$ (cm/s)	$k_{disp} \times 10^6$ (cm/s)
1	87,40	87,40
2	58,00	52,78
3	43,80	39,86
4	39,80	36,22
5	34,20	31,12

Aunque teóricamente el coeficiente de dispersión k_{disp} debería ser constante a un mismo caudal y temperatura para los diferentes ciclos de reutilización de la columna monolítica (n_1 a n_5) los valores obtenidos, muestran una tendencia a disminuir a media que aumenta el número de ciclos, y a ser mayor su valor al aumentar el caudal.

Éste último comportamiento es análogo al obtenido para k_{ads} , es decir que a medida que aumenta el caudal, el coeficiente de dispersión es mayor y asimismo la constante cinética de adsorción.

Este comportamiento podría corroborar el hecho de que el caudal que mejores resultados de adsorción presentó (más cantidad de proteína adsorbida) fue el de $14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$.

En la figura 5-32 se puede apreciar gráficamente los resultados anteriormente descritos.

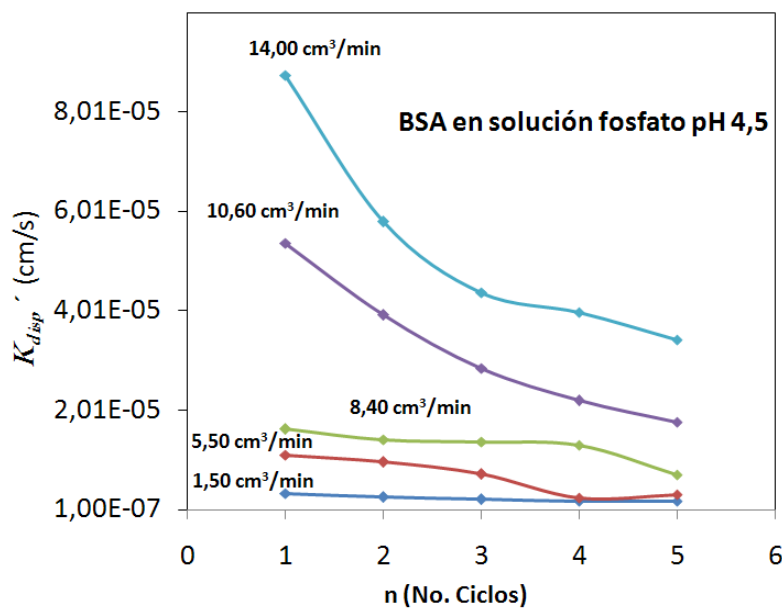


Figura 5-32. Variación del pseudo-coeficiente de dispersión k'_{disp} del proceso de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, con los diferentes ciclos de reutilización y caudal.

En la figura 5-32, se aprecia que a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, los pseudo-coeficiente de dispersión k'_{disp} casi dos órdenes de magnitud menor con respecto al caudal de $14 \text{ cm}^3/\text{min}$. Así, se pone de manifiesto que utilizar un caudal de $14 \text{ cm}^3/\text{min}$, favorece el proceso de adsorción de la proteína BSA para la fase estacionaria propuesta en éste trabajo.

Asimismo, si se promedian los valores obtenidos de k_{disp} para cada uno de los reutilizaciones a un mismo caudal, se obtiene una curva de tendencia exponencial con respecto al número de Reynolds, donde el coeficiente de dispersión aumenta con dicho número. En la figura 5-33, se muestra que el comportamiento es similar al obtenido para los valores promediados de las constantes cinéticas de adsorción con respecto también al número Reynolds.

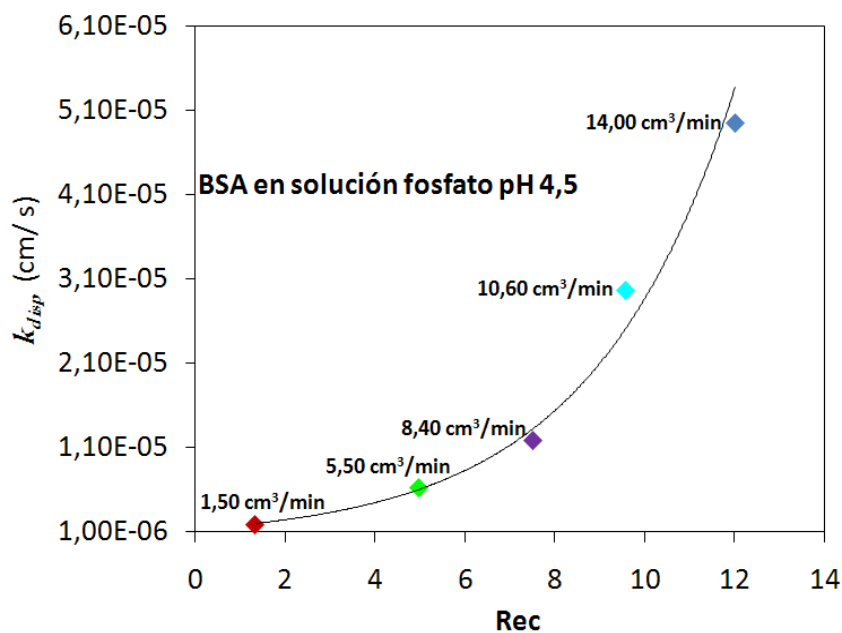


Figura 5-33. Variación del promedio del coeficiente de dispersión k_{disp} del proceso de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 con respecto al número de Reynolds.

5.1.6.2.1. Efecto del caudal en el coeficiente de dispersión

De acuerdo a la tendencia de los valores mostrados en la figura 5-33, se puede observar que el comportamiento de los promedios de los coeficientes de dispersión con respecto al número de Reynolds son análogos al comportamiento mostrado de los promedios de las constantes cinéticas de adsorción con respecto también al número de Reynolds, es decir que a medida que aumenta el caudal, también aumenta k_{ads} . Estos resultados son acordes, ya que a mayor caudal el tiempo requerido para que el proceso de adsorción alcance el equilibrio es menor y el adsorbente es capaz de adsorber mayor cantidad de proteína.

5.1.6.2.2. Efecto del pH en el coeficiente de dispersión

En la tabla 5-18 que se muestra a continuación, se recogen los valores obtenidos para los pseudo-coeficiente de dispersión k'_{disp} y los coeficientes de dispersión k_{disp} teniendo en cuenta la eficiencia estructural n_A , correspondientes a los experimentos llevados a cabo en tampón fosfato pH 7,0 para un caudal de 14 cm³/min respectivamente.

Se puede decir por tanto que aumentar el pH de la proteína, aumenta ligeramente el coeficiente de dispersión favoreciendo el proceso de adsorción de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.1, debido a que la proteína al estar cargada negativamente, se podrían generar más interacciones haciendo que por ejemplo para $n=1$ la cantidad de proteína adsorbida sea mayor con respecto a los valores al mismo caudal en solución fosfato pH 4,5.

Tabla 5-18. Valores de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y k_{disp} para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0, $Q=14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$.

n	$k'_{disp} \times 10^6$ (cm/s)	$k_{disp} \times 10^6$ (cm/s)
1	86,50	72,66
2	83,20	69,88
3	63,20	53,08
4	45,60	38,30
5	18,20	15,29

En la figura 5-34 se puede observar comparativamente el comportamiento de los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} para los experimentos de adsorción de la proteína BSA llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5 y tampón PBS pH 7,4 a un caudal de $14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$ respectivamente, con respecto al número de ciclos (n).

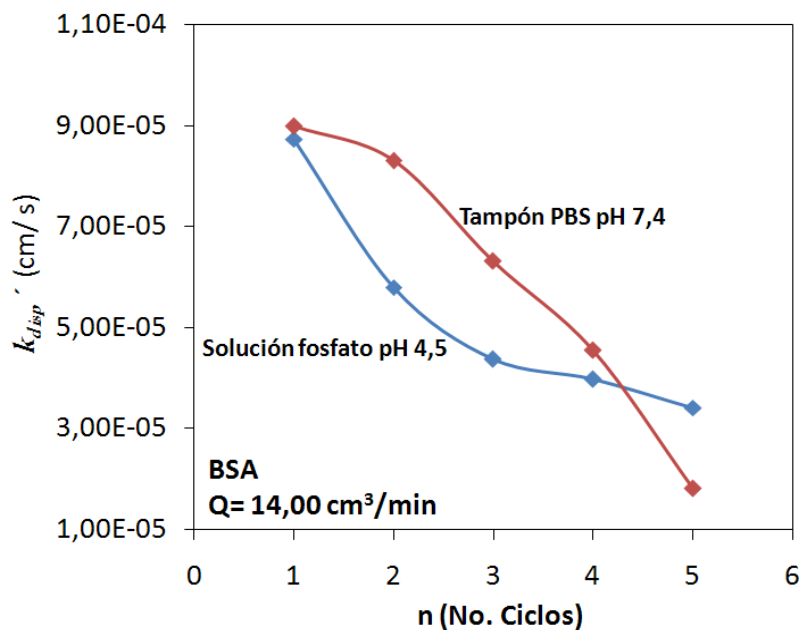


Figura 5-34. Comparativo de la variación del pseudo-coeficiente de dispersión k'_{disp} del proceso de adsorción de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y tampón fosfato pH 7,0 a un caudal de $14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$, con respecto al número de ciclos (n).

5.2. Estudio adsorción/elución de la enzima Catalasa en el sistema formado por un monolito cerámico recubierto de agarosa D5 y activado con 1,4-butanodiol-diglicidil-éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético IDA, como agente quelante y Cu^{2+} como ligando, CAT-agarosa-IDA- Cu^{2+} .

Una vez establecido el comportamiento del sistema BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+} , se llevó a cabo el estudio de la eficiencia de la adsorción, tras varios ciclos de reuso de la columna cromatográfica, para el sistema formado por la enzima catalasa (CAT), sobre un monolito cerámico recubierto por agarosa tipo D5, activado con 1,4 butanodiol-diglicidil-éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante, y Cu^{2+} como ligando. Se eligió la enzima CAT debido a que es una metalo-enzima que presenta gran afinidad hacia los iones metálicos y porque posteriormente se procederá a la validación del modelo de eficiencia para la separación de dos biomoléculas y de esta forma se podrá obtener la información necesaria para hacer un cambio de escala seguro y eficaz.

La estructura correspondiente del sistema CAT-agarosa-IDA- Cu^{2+} no se muestra, debido a que no se tiene información suficiente del mecanismo de reacción entre la enzima CAT y el Cu^{2+} inmovilizado en el soporte de epoxi-agarosa.

En primer lugar se llevó a cabo un estudio preliminar con el fin de estudiar las condiciones óptimas de trabajo. Así, los experimentos llevados a cabo para encontrar el tampón adecuado en el cual disolver la enzima CAT, así como las concentraciones de trabajo se muestran en la figura 5-35:

De acuerdo a la figura 5-35, se estudiaron 4 tipos de tampón y cinco concentraciones. Así, para la fase estacionaria propuesta en esta investigación, el tampón que presentó mejor solubilidad de la enzima CAT, fue el tampón PBS a pH 7,4. La solución fosfato pH 4,5 precipitaba la enzima CAT a cualquier concentración, no siendo adecuada para el proceso de adsorción, el tampón fosfato pH 7,0 presentaba buena solubilidad a bajas concentraciones (hasta 0,5 mg/cm^3), el problema era que pasado un tiempo (aproximadamente una hora) generaba micelas (de mayor tamaño a un caudal de 14,0 cm^3/min) enmascarando los resultados del proceso de adsorción.

Consultando la bibliografía se encontró que varios autores utilizaban el tampón acetato para llevar a cabo procesos de adsorción de la enzima CAT, aunque las matrices de adsorción eran diferentes a la propuesta en éste trabajo (Arica, *et al*, 1997; Akgöl and Denizl, 2004; Bayramoglu and Arica, 2010; Çorman *et al*; 2010; Tüzmen *et al*; 2012), sin embargo al probar el tampón acetato con dos diferentes pH, se encontró que al cabo de una hora incluso a caudales por debajo de $1,5 \text{ cm}^3/\text{min}$ y baja concentración ($0,3 \text{ mg}/\text{cm}^3$), se generaban grandes micelas que impedían llevar a cabo el proceso de adsorción.

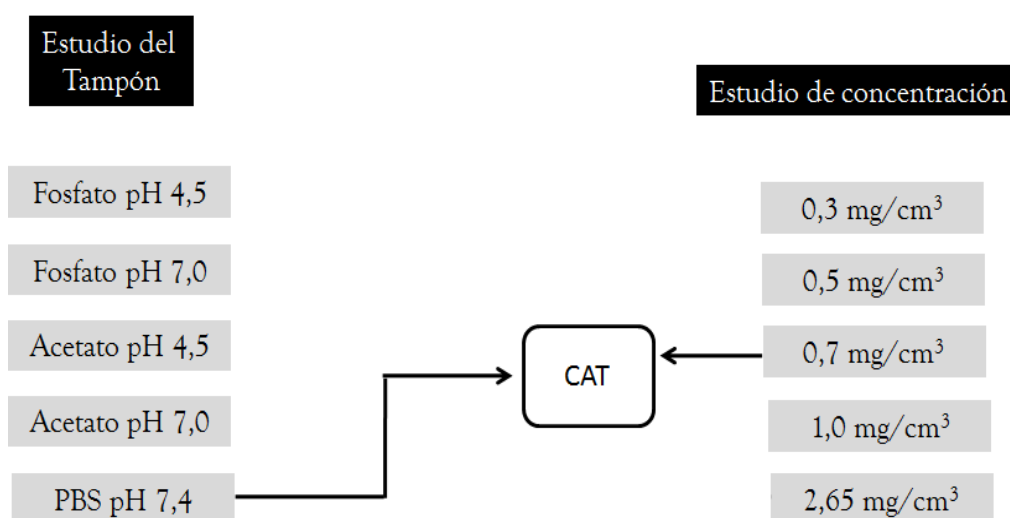


Figura 5-35. Esquema representativo de los sistemas estudiados para la adsorción de la enzima CAT.

Teniendo en cuenta los anteriores resultados, se decidió probar el tampón PBS pH 7,4 utilizado en los experimentos de elución de la proteína BSA ya que la fuerza iónica de dicho tampón es más alta (anexo B), debido a que en algunas investigaciones para la adsorción de la proteína CAT se adicionaba NaCl para aumentar la fuerza iónica ya que favorecía el proceso de adsorción. Así, se observó que hasta una concentración de $0,7 \text{ mg}/\text{cm}^3$ la enzima CAT presentaba buena solubilidad en dicho tampón; por lo tanto no fue posible utilizar la concentración de $2,65 \text{ mg}/\text{cm}^3$ equivalente en concentración molar, a la concentración utilizada para llevar a cabo los experimentos de la proteína BSA. Adicionalmente con el fin

de evitar problemas de formación de micelas se decidió trabajar a un caudal bajo de $1,5 \text{ cm}^3/\text{min}$.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, el esquema propuesto en la figura 5-36, resume el sistema que se estudió para llevar a cabo el proceso de adsorción de la enzima CAT, utilizando como fase estacionaria un monolito cerámico.

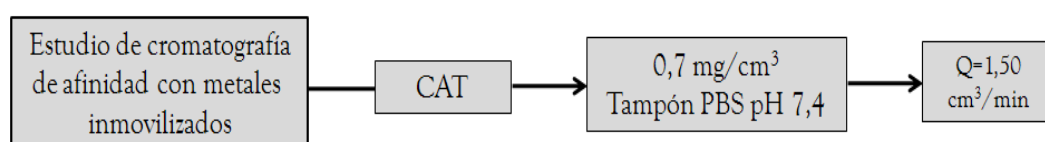


Figura 5-36. Esquema representativo del sistema estudiado para la adsorción de la enzima CAT.

Asimismo, las propiedades físicas del monolito cerámico empleado como fase estacionaria (previamente descritas en el apartado 4.3.1), para llevar a cabo los experimentos de adsorción/elución para la enzima CAT, se recogen en la tabla 5-19 que se muestra a continuación.

Tabla 5-19. Propiedades físicas de los monolitos utilizados en los experimentos de adsorción/elución de la enzima catalasa, llevados a cabo en tampón PBS pH 7,4 y concentraciones de $0,7 \text{ mg}/\text{cm}^3$.

Propiedades/Concentración CAT →	$0,7 \text{ mg}/\text{cm}^3$
↓ Diámetro (cm)	1,30
Peso (g)	4,58
Longitud (cm)	7,50
Volumen (cm^3)	11,89
Recubrimiento de agarosa (g)	2,85
Área total de la superficie (cm^2)	211
Espesor del recubrimiento de agarosa (μm)	136

Los estudios de adsorción se llevaron a cabo del mismo modo que para los experimentos de adsorción con la proteína BSA es decir, se hizo recircular en continuo a través de una columna monolítica cerámica 50 ml de una solución de CAT de concentración conocida en tampón PBS pH 7,4, 298 K y 1,50 cm³/min .

Para la determinación de la adsorción de la enzima CAT en la columna monolítica, se tomó una alícuota de 1 cm³ cada 20 minutos y la absorbancia de la enzima se midió por medio de un espectrofotómetro UVICON 922 a una longitud de onda de 280 nm, hasta que la concentración de la enzima CAT en la muestra alcanzara un valor constante, indicando que el proceso de adsorción había alcanzado el equilibrio.

Una vez concluido el proceso de adsorción, con el fin de eliminar la enzima que había quedado enlazada no específicamente en el adsorbente durante el proceso de adsorción, se hizo circular a través de la columna de afinidad a 1,50 cm³/min, tampón PBS pH 7,4.

Para llevar a cabo esta operación, se tomó una muestra a la salida de la columna cada 10 minutos, la cual fue medida a 280 nm, hasta que la concentración de enzima CAT alcanzara el valor de cero, indicando que no era posible eluir más enzima.

Tras el proceso de elución de la enzima enlazada no específicamente, se procedió a realizar la elución de la enzima enlazada específicamente en el adsorbente.

Para llevar a cabo el proceso de elución, se probó en primer lugar con el imidazol 0,2M en tampón PBS pH 7,4, pero se observó que no eluía la enzima CAT; éste hecho podría indicar que en el proceso de enlace CAT-Cu²⁺ no estarían involucrados directamente los residuos de aminoácidos como la histidina, como sí sucede en el proceso de adsorción con la proteína BSA, ya que de ser así, cabría esperar que la enzima CAT también se pudiera eluir con el imidazol.

De acuerdo a la observación anterior, se llevaron a cabo una serie de experimentos con el fin de poder determinar el mejor metodo para eluir la enzima CAT. Basados en otros sistemas de adsorción de la misma enzima (Argöl and Denizli, 2004; Shentu *et al*; 2005; Özturk *et al*; 2008; Çetinus *et al*; 2009; Çorman *et al*; 2010; Tüzmen *et al*; 2012)), se pudo comprobar que el compuesto tiocianato de sodio NaSCN, era utilizado para llevar a cabo el proceso de elución. En la

figura 5-37 se muestra un esquema de las concentraciones de NaSCN utilizadas para eluir la proteína CAT.

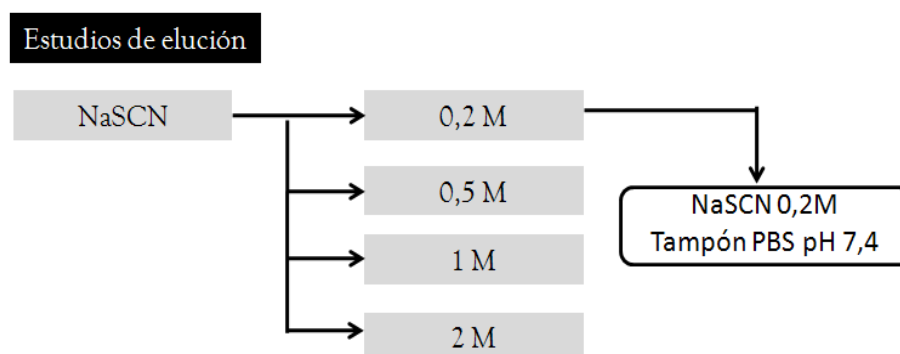


Figura 5-37. Esquema de los ensayos realizados para llevar a cabo el proceso de elución de la enzima CAT.

De acuerdo al esquema 5-37, se concluyó, que la condición más favorable para llevar a cabo el proceso de elución era NaSCN en tampón PBS pH 7,4 0,2 M, ya que con esta concentración se obtuvieron los mejores resultados de recuperación de enzima; todos los experimentos se llevaron a cabo a un caudal de 1,50 cm³/min.

Como se mencionó en el fundamento teórico, la enzima CAT es un tetrámero formado por cuatro subunidades idénticas, así cada monomero contiene un grupo prostético hemo en el centro activo, donde se encuentra unido a un átomo de hierro Fe³⁺.

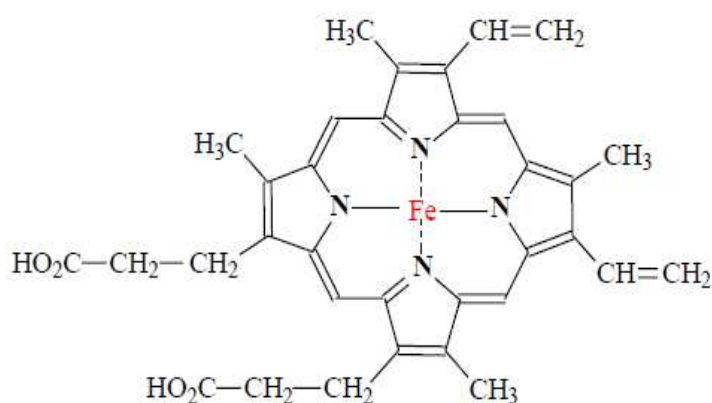


Figura 3-22. Estructura del grupo hemo de la catalasa.

Asimismo, el ion cianuro CN^- presente en el tiocianato de sodio (NaSCN) posee una alta afinidad por complejos metálicos como el hierro trivalente Fe^{+3} , por tanto una vez que está en presencia de la enzima, se combina rápidamente con el hierro del grupo hemo en estado oxidado, e inhibe la actividad de la enzima, donde da lugar a que el enlace formado por la enzima y el ligando se rompa, debido a que hay una alteración en su centro activo y así, que sea posible recuperarla. Por lo tanto la enzima recuperada al estar inhibida por el cianuro tendrá menor actividad.

Éste hecho pudo comprobarse experimentalmente, al llevarse a cabo mediciones de la actividad de enzima CAT libre y en presencia de NaSCN , donde se observó a diferentes concentraciones de CAT que la actividad de la enzima disminuye con el NaSCN aproximadamente un 20%.

Éste hecho también podría indicar que el centro activo de la enzima CAT (grupo hemo) está involucrado en el proceso de adsorción, ya que en el momento en que éste es inhibido, es posible eluir la enzima.

Una vez concluido el proceso de elución de la enzima enlazada específicamente, se procedió a llevar a cabo un lavado de la matriz con tampón Tris-HCl pH 8,0 durante 2 horas aproximadamente, de la misma forma que se hizo con la proteína BSA (apartado 5.1).

5.2.1. Curvas de equilibrio de adsorción de la enzima CAT

De acuerdo a lo descrito anteriormente, el equilibrio del proceso de adsorción de la enzima CAT se muestra en la figura 5-38 (a); de forma comparativa con el obtenido para la proteína BSA (b) a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

De igual forma, En el anexo A se recogen las tablas de datos de concentración en el equilibrio C_E (mol/cm^3) frente al tiempo para el proceso adsorción de la enzima CAT.

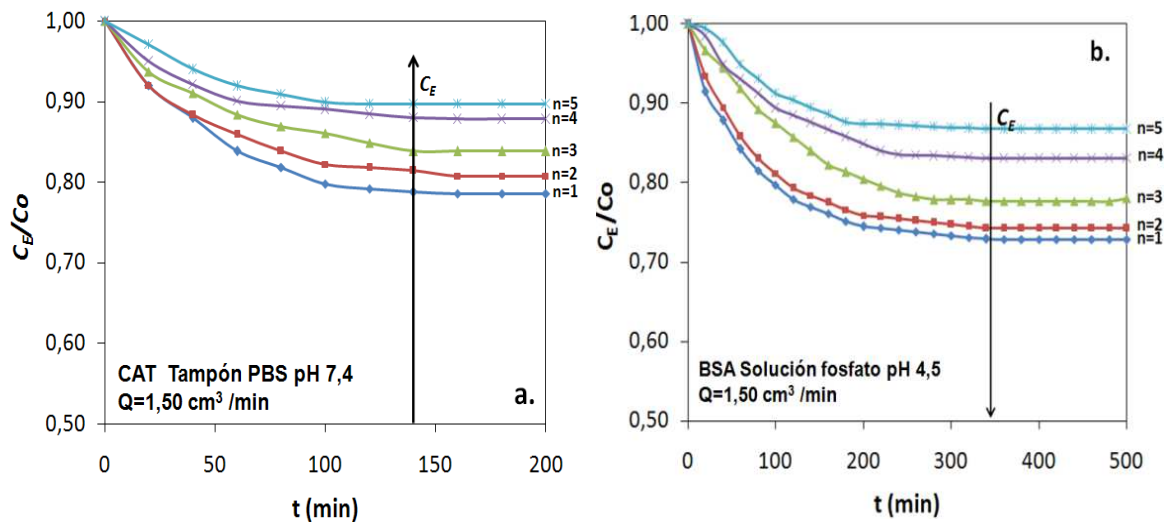


Figura 5-38. Comparación de los perfiles de equilibrio de adsorción para a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 y b) proteína BSA en solución fosfato pH 4,5; 298 K y $Q= 1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

De forma general para la enzima CAT se pudo comprobar que utilizando un mismo caudal ($1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$) en el proceso de adsorción, el tiempo necesario para que el sistema alcanzara el equilibrio era prácticamente el mismo en todos los reutilizaciones (n_1 a n_5), comportamiento análogo al obtenido para la proteína BSA.

El tiempo requerido para que la enzima CAT alcanzara el equilibrio fue de 2,3 horas mientras que para la proteína BSA fue de 5,6 horas, lo cual pone de manifiesto que el comportamiento de la cinética de adsorción es más rápida para la enzima CAT debido a que es una metalo-enzima que presenta mayor afinidad por los iones metálicos que la proteína BSA.

También se observó que la capacidad de adsorción de la enzima CAT en la matriz disminuye ligeramente con el número de ciclos, así para n_1 $C_E/C_o=0,79$, para n_2 $C_E/C_o= 0,81$ y n_3 $C_E/C_o= 0,84$.

Éste comportamiento podría indicar que en el caso de la enzima CAT, aunque no hay un agente como el imidazol que ocupe ligandos después del proceso de elución como es el caso de la proteína BSA, se debe tener en cuenta que esta enzima presenta un mayor tamaño. El tamaño de la enzima CAT utilizada en éste trabajo es $16,60 \text{ nm}$ (promedio de 3 mediciones). En los gráficos 5-39 a y b se muestran comparativamente la distribución de tamaño (representativa) para la

enzima CAT y al proteína BSA respectivamente, donde se puede apreciar que el diámetro de la enzima CAT es mayor.

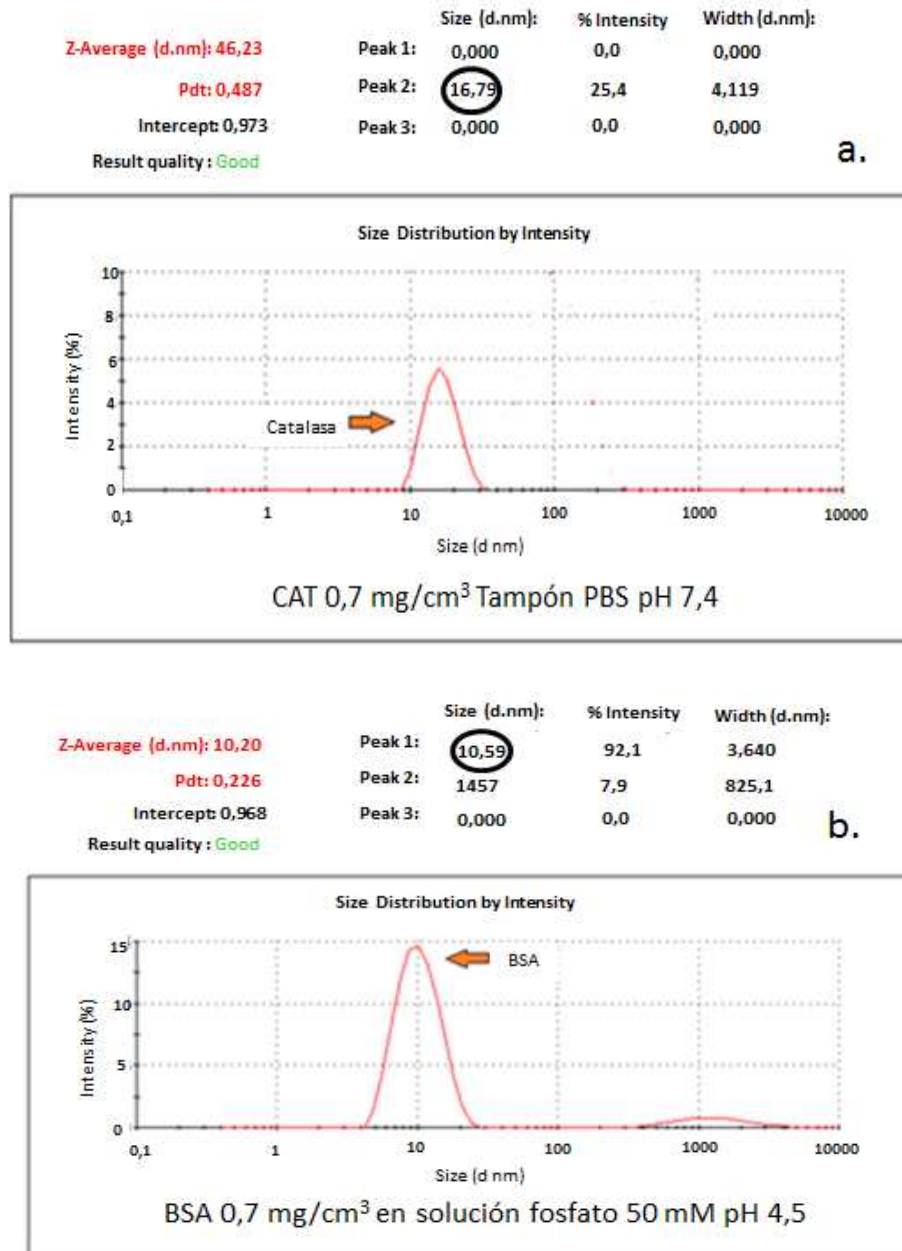


Figura 5-39. Grafico representativo de la medición de tamaño de a) enzima CAT y b) la proteína BSA utilizando el equipo zeta sizer nano ZS-90.

De acuerdo con el tamaño de la enzima CAT, su huella sobre la superficie del adsorbente es mayor con respecto a la de la proteína BSA. Éste hecho podría

influir en la capacidad de adsorción, haciendo que de crezca con el número de reutilizaciones, debido a que aunque el porcentaje de enzima que no puede ser eluída de la matriz es similar con respecto al de la proteína BSA, debido al tamaño la enzima CAT podría llegar a bloquear mayor cantidad de sitios disponibles para el proceso de enlace.

Como se mencionó en el apartado 5.1.3., el proceso de adsorción es aleatorio, lo cual implica un número grande de moléculas.

En el caso de la enzima CAT dichas moléculas ocuparan más área de adsorción debido a su tamaño, por lo que el porcentaje de superposición como el porcentaje de superficie cubierto, como una constante estadística de un ciclo de reutilización a otro, como se propone en la figura 5-40a.

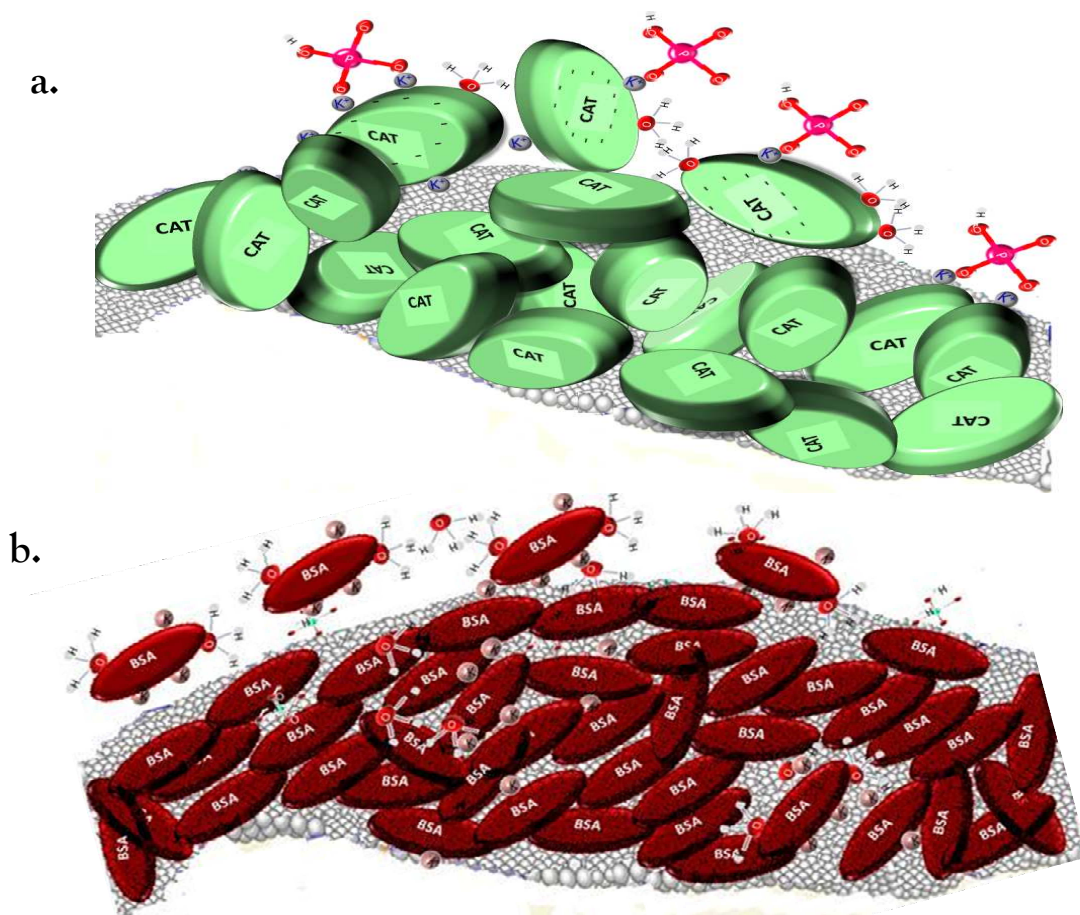


Figura 5-40. Posibles esquemas que muestran como de forma aleatoria **a)** las enzimas de CAT cubren la superficie de adsorción y **b)** las proteínas de BSA cubren la superficie de adsorción.

Comparando las figuras 5-40 a y b, se puede observar que para la enzima CAT debido a su tamaño, la probabilidad de que ocupe más sitios de unión en la superficie del adsorbente es mayor que para la proteína BSA, por lo tanto éste hecho podría afectar la capacidad de adsorción del adsorbente.

Por otro lado, también se observó que la capacidad de adsorción del adsorbente es ligeramente mayor para la proteína BSA que para la enzima CAT, ya para $n_1 C_E/C_0$ para BSA=0,72 mientras que n_2 CAT=0,79.

Teniendo en cuenta que la huella de la enzima CAT sobre la superficie del adsorbente es mayor, la cantidad de enzima teórica que puede ser depositada en la superficie del adsorbente ρ_{As}^T será menor con respecto a la proteína BSA.

5.2.2. Curvas de elución de la enzima CAT

Como se mencionó anteriormente, la elución de la enzima CAT se llevó a cabo por un proceso de inhibición de la enzima CAT, utilizando tiocianato de potasio NaSCN como agente de elución.

De acuerdo a la figura 5-37 los experimentos de elución se llevaron a cabo a una concentración 0,2 de NaSCN en tampón PBS pH 7,4 a un caudal de 1,50 cm³/min, para que el proceso de elución tuviera el tiempo suficiente para recuperar la mayor cantidad de enzima posible.

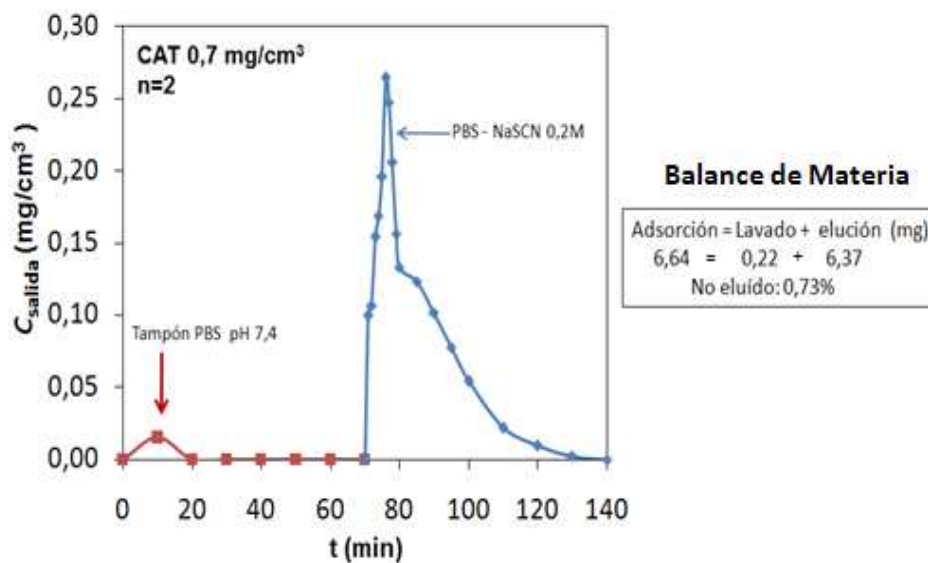
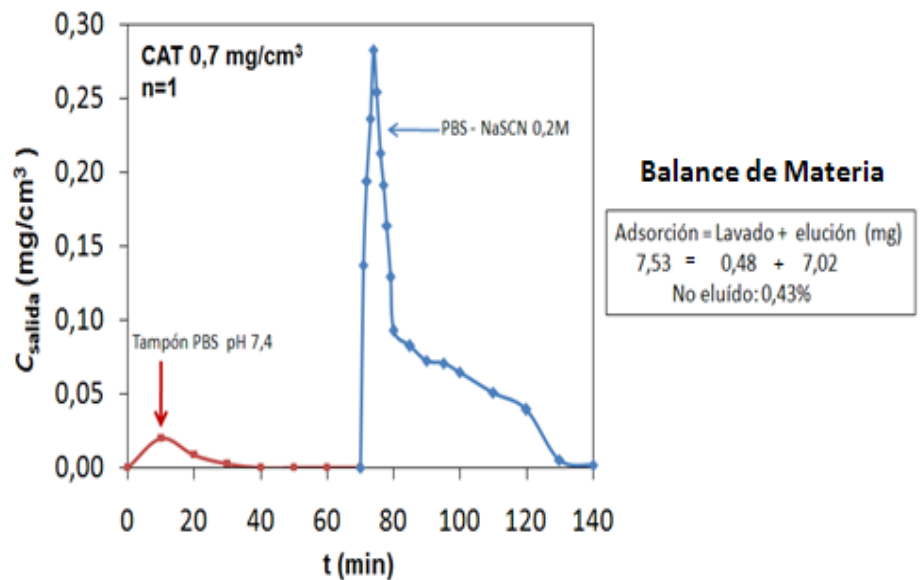
De igual forma, el caudal utilizado para llevar a cabo el proceso de lavado de la enzima CAT retenida pero no adsorbida en el adsorbente también fue de 1,50 cm³/min.

En la figura 5-41 a, b, c, d y e, se muestra las curvas de elución correspondiente a los experimentos de adsorción de la enzima CAT a una concentración de 0,7 mg/cm³ en tampón PBS pH 7,4 a un 1,50 cm³/min, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.

Estas figuras (del mismo modo que los gráficos de los experimentos de elución de la proteína BSA) muestran dos picos, el primero, de color rojo, representa la elución de la enzima retenida por enlaces no específicos en el adsorbente, es decir

la proteína que no se ha ligado específicamente al Cu^{2+} , llevando a cabo un lavado con el mismo tampón en el cual se ha llevado a cabo el proceso de adsorción de la proteína, que en éste caso es tampón fosfato pH 7,4. Éste pico presenta un área bajo la curva pequeña, traducido en una cantidad de proteína inferior al 5% de la proteína total eluída.

El segundo pico, de color azul representa la elución de tipo específico, es decir, la proteína que ha sido ligada específicamente al Cu^{2+} y que por lo tanto no puede ser eluída con el tampón usado en el lavado, sino que debe ser eluída con NaSCN . El área bajo la curva de estos picos representa aproximadamente el 95% de la enzima total adsorbida.



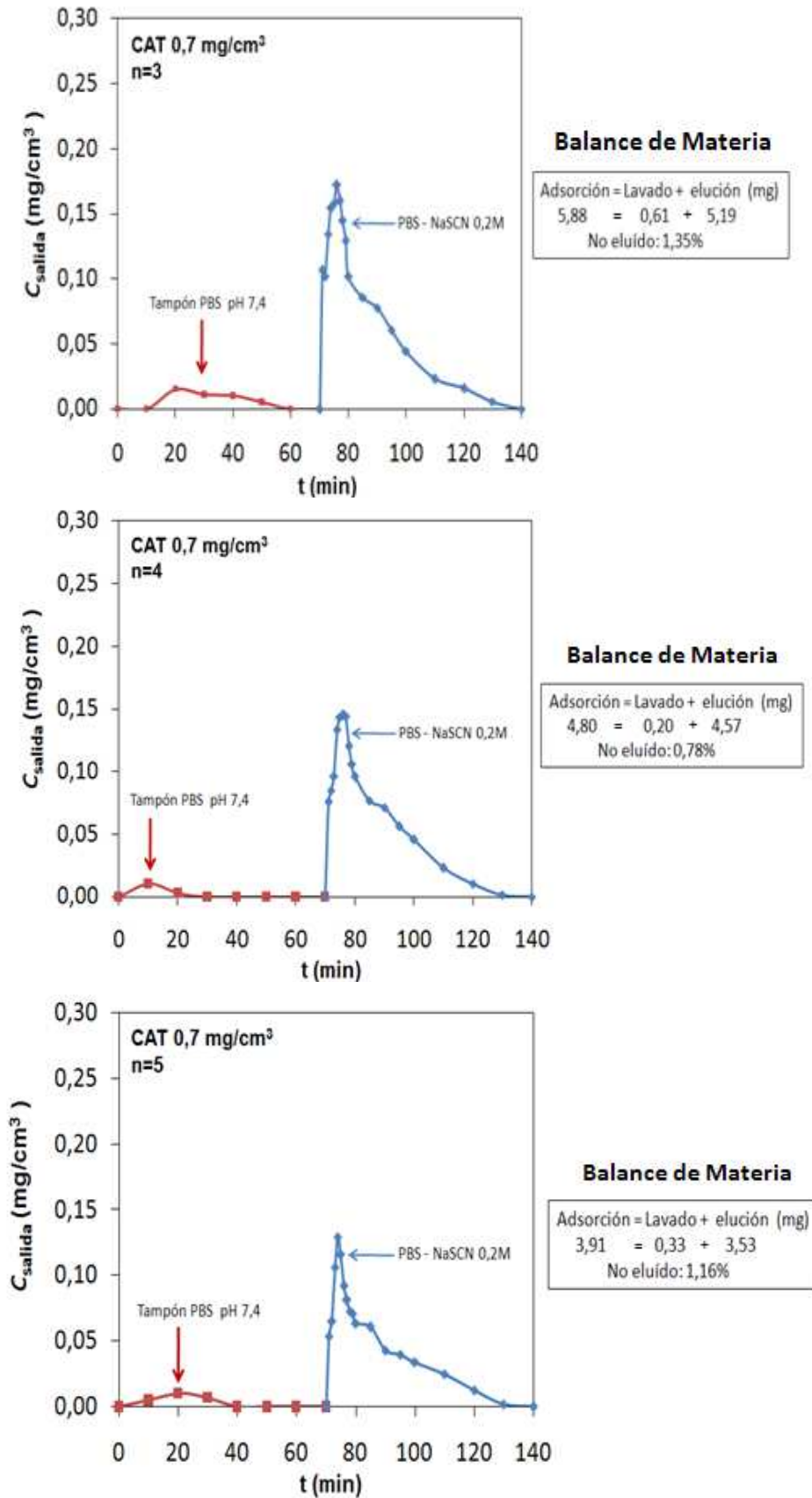


Figura 5-41. Curvas de elución de la enzima CAT adsorbida en tampón PBS pH 7,4 y 298K, para un caudal de adsorción de 1,50 cm³/min, concentración 0,7 mg/cm³ y n₁, n₂, n₃, n₄ y n₅.

En general de acuerdo a la figura 5-41 se puede decir, que la elución de la enzima enlazada no específicamente (tampón PBS pH 7,4) tarda aproximadamente 40 min y la elución específica (NaSCN 0,2 M en tampón PBS pH 7,4) tiene un tiempo de duración de aproximadamente 60-80 min.

De igual forma, a la derecha de cada figura se puede observar el balance de materia en mg, es decir, la cantidad de enzima total adsorbida con respecto a la cantidad de enzima eluída con tampón PBS pH 7,4 correspondiente al área bajo la curva roja y con NaSCN 0,2 M en tampón PBS pH 7,4, correspondiente al área bajo la curva azul. En todos los casos la cantidad de proteína que no es posible ser eluída y queda dentro de la matriz es inferior del 2%.

De acuerdo a la información anterior, se puede establecer una semejanza del comportamiento de elución de la enzima CAT con respecto a la proteína BSA, debido a que los tiempos de elución son prácticamente iguales, utilizando agentes de elución diferentes.

De tal forma que se puede establecer que aunque el proceso de adsorción de la enzima CAT es más rápida, debido a su afinidad por los iones metálicos, el proceso de elución es prácticamente análogo al de la proteína BSA.

5.2.3. Eficiencia de adsorción de la enzima CAT

El comportamiento del proceso de adsorción tras varios ciclos de reutilizaciones, así como la reutilización óptima de la columna monolítica, para el sistema formado por la enzima CAT sobre un monolito cerámico recubierto por agarosa tipo D5, activado con 1,4 butanodiol diglicidil éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante, y Cu^{2+} como ligando, fue estudiado de acuerdo al modelo descrito en el apartado 5.1.3.

Del mismo modo que para la proteína BSA, se calcularon los valores de m , ρ_{AS}^R , η_A y η_D para la enzima CAT descritos en el apartado 5.1.3., siendo estos valores comparados con los resultados obtenidos para proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$. En la tabla 5-20 que se muestra a continuación se recogen dichos valores. De igual forma, los gráficos que relacionan el $\ln \rho_{BE,n}$ con respecto a $n-1$, se muestran en la figura 5-42 a) para la enzima CAT y b, para la proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

Tabla 5-20. Comparativo de los coeficientes de adsorción/elución para el estudio de la enzima CAT y la proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

Biomolécula	CAT	BSA
Número de ciclos (n)	5	5
m (cm^3 de solución/área cm)	0,238	0,237
ρ_{AS}^R (mol/cm^2) $\times 10^{10}$	1,18	7,35
η_A (adimensional)	0,86	0,84
η_D (adimensional)	0,83	0,80

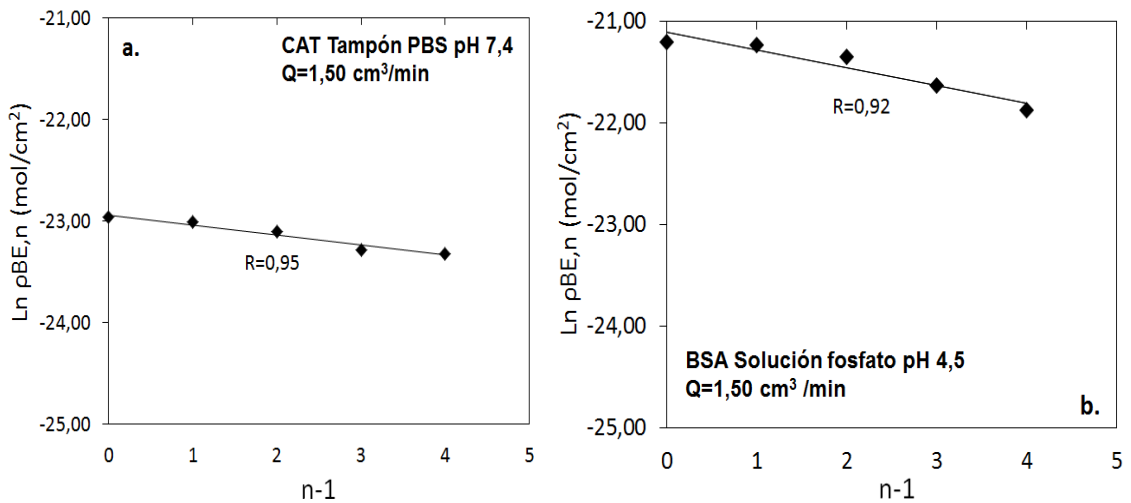


Figura 5-42. Comparativo del logaritmo de la concentración de enzima experimental por unidad de superficie vs número de reutilizaciones $n-1$ para a) la enzima CAT y b) la proteína BSA para el caudal de 14 cm³/min.

La figura 5-43 a) CAT y b) BSA, muestra una línea sólida de tendencia exponencial, la intersección de la línea de tendencia con la línea para $n=0$, permite calcular el valor aproximado de ρ_{AS}^R , estos valores están recogidos de igual forma en la tabla 5-20.

A partir de los valores de ρ_{AS}^R es posible calcular la eficiencia de adsorción η_A que es debida a la transformación natural que sufre el monolito a través de la sucesivas reutilizaciones y relaciona la cantidad de proteína adsorbida durante el primer ciclo de adsorción por unidad de superficie y la cantidad real de enzima que puede ser adsorbida en la superficie del adsorbente, obtenida mediante la ecuación 5-9.

Los valores comparativos de la concentración de enzima por unidad de superficie ρ_{AS}^R para la enzima CAT y la proteína BSA a un caudal de 1,50 cm³/min se recogen de igual forma en la tabla 5-20.

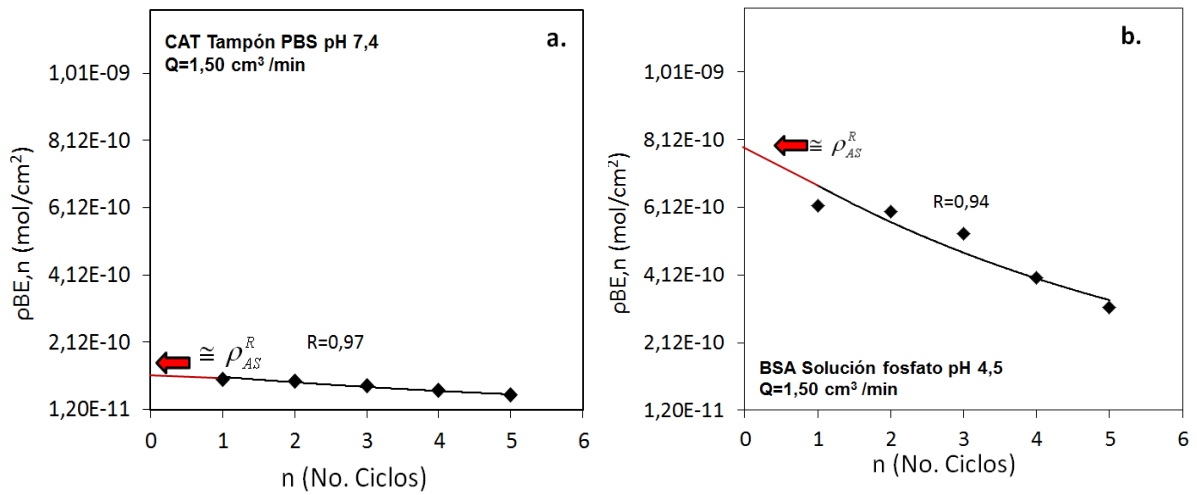


Figura 5-43. Número de enzimas enlazadas a los ligandos por unidad de superficie de adsorción vs el número de ciclos para a) la enzima CAT y b) proteína BSA para el caudal de 1,50 cm³/min.

Es evidente que el valor de ρ_{AS}^R es mayor para la proteína BSA, debido por un lado a que el diámetro de la proteína es menor y además porque la concentración de la enzima CAT en mol/cm³ es menor con respecto a la utilizada para la proteína BSA, debido a la formación de micelas.

5.2.3.1. Validación del modelo de eficiencia para la enzima CAT

De acuerdo al modelo desarrollado y descrito en el apartado 5.1.3, se calculó la concentración teórica de enzima CAT en el equilibrio C_E , para un número arbitrario de ciclos (n). Los valores calculados, fueron comparados con los obtenidos experimentalmente para cada ciclo de adsorción, estos valores se recogen en la tabla 5-21. Adicionalmente se calculó la concentración en el equilibrio teórica C_E para $n=6$, $n=7$ y $n=8$, con el fin de verificar que la tendencia fuera consistente. Estos valores también se recogen en la tabla 5-20. Asimismo, en la figura 5-44 se comparan dichos valores con los obtenidos para la proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ a) enzima CAT y b) proteína BSA.

Tabla 5-21. Comparación de la concentración en equilibrio C_E experimental vs obtenida por el modelo para la enzima CAT, en tampón PBS pH 7,4 para el caudal de $1,5 \text{ cm}^3/\text{min}$ y para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$. $C_E \text{ Exp}$ y $C_E \text{ Teo}$ (mol/cm^3) $\times 10^9$.

Biomolécula	CAT			BSA		
	C_E Exp	C_E Teo	% error	C_E Exp	C_E Teo	% error
n						
1	2,35	2,35	0,00	7,86	7,86	0,00
2	2,37	2,42	2,11	7,94	8,31	4,45
3	2,43	2,48	2,05	8,23	8,69	5,59
4	2,50	2,52	0,80	8,81	9,00	0,90
5	2,56	2,57	0,39	9,20	9,27	0,76
6		2,60			9,49	
7		2,63			9,67	
8		2,66			9,82	

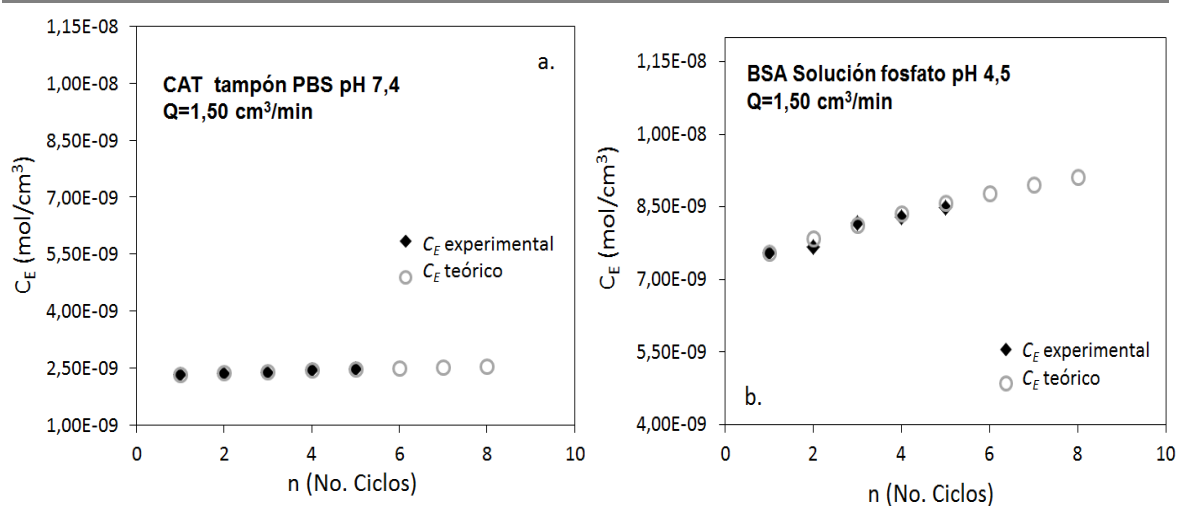


Figura 5-44. Concentración de enzima en el equilibrio C_E experimental y teórica vs Número de ciclos n , para a) la enzima CAT y b) la proteína BSA, para el caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

En la figura 5-44 a se puede observar que el modelo predice adecuadamente el comportamiento de la enzima CAT en el equilibrio con un error inferior al 3%. Se debe tener en cuenta que la concentración inicial de partida de la enzima CAT es menor a la utilizada por la proteína BSA (como se mencionó anteriormente), por esta razón la concentración de enzima CAT en el equilibrio es menor con respecto a la obtenida para la proteína BSA.

Se puede concluir que para las dos biomoléculas estudiadas, el modelo es capaz de predecir el comportamiento de C_E con errores inferiores al 6% y establecer la tendencia del proceso de adsorción para futuros ciclos, en base al comportamiento inicial.

Asimismo, de igual forma que para la proteína BSA, de acuerdo a los valores obtenidos de C_E teórica, si se extrapola aún más estos valores, para más ciclos de reutilizaciones (es decir, por encima de n_{10} aproximadamente), se puede observar que el comportamiento es prácticamente constante, es decir que la columna no sería capaz de adsorber más proteína.

5.2.4. Rendimiento del proceso de separación de la enzima CAT al reutilizar la columna cromatográfica

El estudio de rendimiento del proceso de separación para la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 se llevó a cabo de acuerdo al apartado 5.1.4., con el fin de comparar el rendimiento de separación de la enzima CAT con respecto al comportamiento obtenido para la proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

De acuerdo a las cinéticas de adsorción para la enzima CAT se estableció el tiempo de equilibrio en 2,3 horas.

Aunque experimentalmente se comprobó que para un tiempo de 2 horas se alcanza el 95-100% del porcentaje total de proteína adsorbida en la matriz y al cabo de 3 horas la adsorción es completa.

Mientras que la proteína BSA a un mismo caudal al cabo de 2 horas alcanza entre un 75-80% del porcentaje total de proteína adsorbida y al cabo de 3 horas se alcanza entre un 85-90%.

Éste comportamiento pone de manifiesto que el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso de adsorción es menor para la enzima CAT ya que al ser una metalo-enzima presenta mayor afinidad por los iones metálicos usados como ligando en esta investigación.

En la figura 5-45 a, y b que muestra comparativamente para las biomoléculas CAT y BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, la cantidad de biomolécula separada en mol por unidad de área en cm^2 por unidad de tiempo en horas, para los cinco ciclos de adsorción/elución, teniendo en cuenta un tiempo de regeneración de 18 horas, calculados mediante la ecuación 5-21 descrita en el apartado 5.1.4.

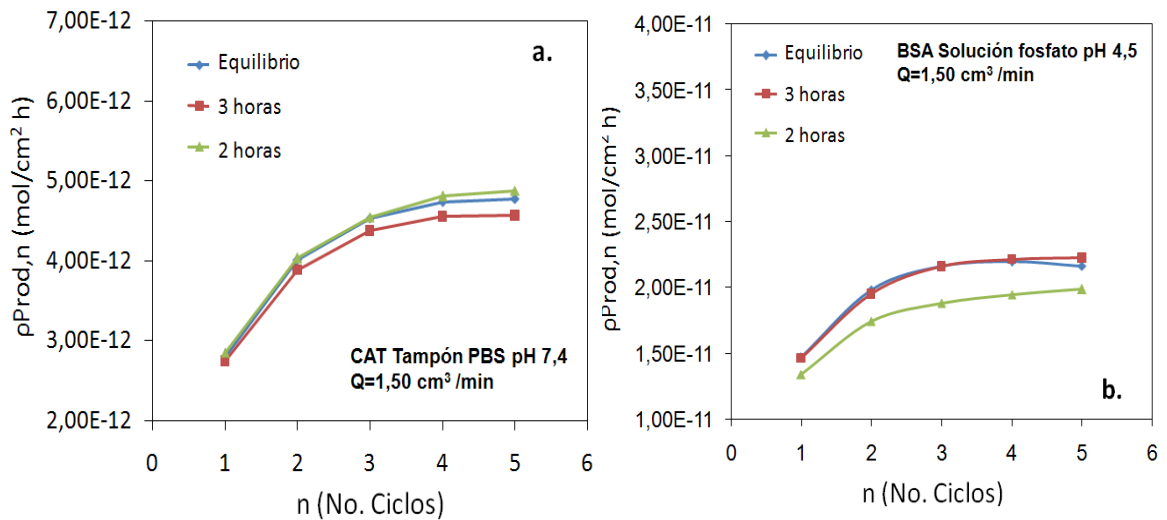


Figura 5-45. Cantidad de biomolécula separada por unidad de área de la columna por unidad de tiempo, como una función de la cantidad de ciclos de adsorción/elución teniendo en cuenta el tiempo de regeneración, para a) enzima CAT y b) proteína BSA para un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

La figura 5-45a pone de manifiesto que la enzima CAT al cabo de 2 horas prácticamente ha alcanzado el equilibrio indicando que el tiempo necesario para que sea adsorbida, es menor que el tiempo necesario para adsorber la proteína BSA, en las mismas condiciones de proceso.

Esta figura también muestra que no es necesario interrumpir la adsorción de la enzima antes de que el proceso alcance el equilibrio como sucede con la proteína BSA y que la columna puede ser utilizada durante 4 ciclos más de adsorción antes de ser regenerada.

En la figura 5-46 a y b muestran los perfiles de las cantidades de biomolécula anual separada (BSA y CAT), en mol por unidad de área en cm^2 por unidad de tiempo en horas, para los cinco ciclos de adsorción/elución, teniendo en cuenta el proceso de elución y lavado de la columna que anteriormente se estableció en 5 horas.

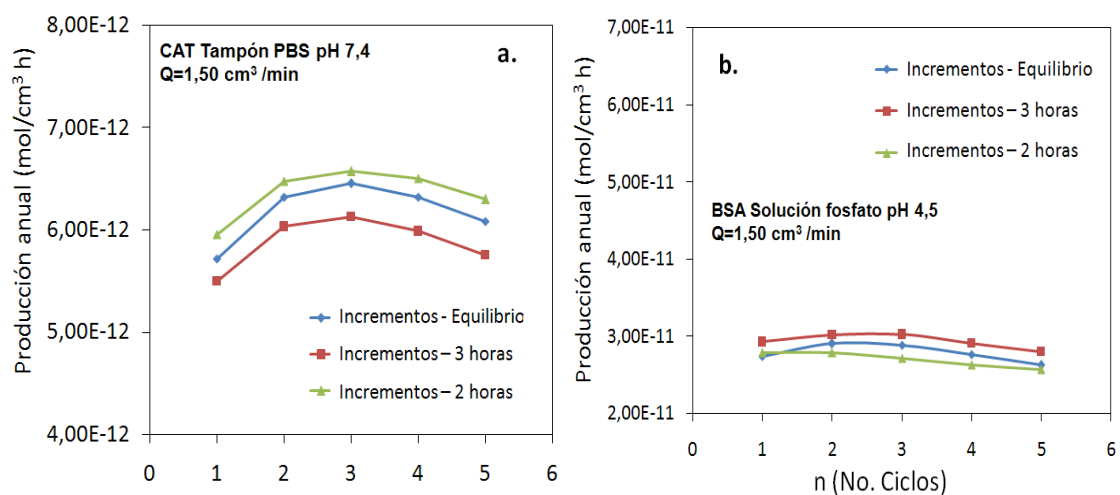


Figura 5-46. Rendimiento de la columna monolítica para el proceso de separación anual de biomolécula, para un tiempo de inactividad de 5 horas, para a) enzima CAT y b) la proteína BSA para un caudal de 1,5 cm³/min.

De acuerdo a los valores recogidos en la figura 5-46^a, es evidente que la reutilización de la columna monolítica, aumentará el rendimiento de la separación de enzima para una operación de proceso dado ya que el porcentaje de adsorción al cabo de 2 horas es prácticamente el 100% en todos los ciclos.

5.2.5. Transferencia de materia dentro de los canales del monolito cerámico

Del mismo modo que para los experimentos llevados a cabo con la proteína BSA, los valores correspondientes a los perfiles de concentración-tiempo correspondientes a los experimentos de adsorción para la enzima CAT fueron correlacionados de acuerdo con la ecuación 5-35 utilizando la plataforma MATLAB, el cual ajusta el coeficiente de dispersión k_{disp} y la constante cinética de adsorción k_{ads} , por un método de búsqueda de mínimos en funciones multiparamétricas.

De tal forma que los perfiles experimentales del proceso de adsorción (\bar{C}_E vs t) de la enzima CAT con los correspondientes ciclos de uso ($n=1$, $n=2$, $n=3$, $n=4$ y $n=5$), fueron comparados con los perfiles teóricos predichos por el modelo.

Así, en la figura 5-47 a y b se muestran comparativamente los perfiles de concentración experimentales y teóricos respectivamente de la enzima CAT y la proteína BSA para un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, donde las líneas en color continuas son los valores teóricos predichos por el modelo y las líneas en color con el marcador, los valores experimentales.

En general, la figura 5-47 a y b refleja que a medida que se reutiliza el adsorbente la capacidad de adsorción disminuye ligeramente.

También se puede observar que el modelo propuesto se ajusta bien para ambas biomoléculas, siendo las concentraciones en equilibrio calculadas mediante el modelo similar a las obtenidas experimentalmente en todos los ciclos con un error inferior al 5%.

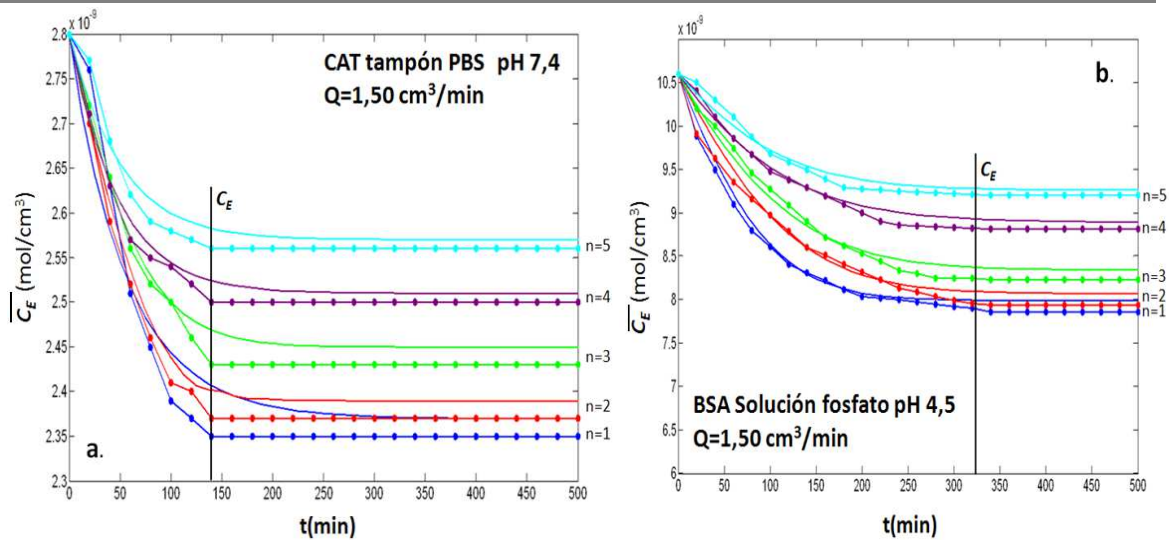


Figura 5-47. Comparativo de los perfiles teóricos y experimentales de concentración en el sobrenadante vs tiempo, correspondientes a la adsorción de a) la enzima CAT y b) proteína BSA a un caudal de 1,50 cm³/min.

Las tablas que contienen los valores de la concentración en el equilibrio obtenida experimentalmente, comparada con los valores calculados teóricamente mediante el modelo, para la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 a un caudal de 1,50 cm³/min se recogen en el anexo D.

5.2.6. Determinación de la constante cinética de adsorción y el coeficiente de dispersión

5.2.6.1. Constante cinética de adsorción k_{ads} para la enzima CAT

De acuerdo al apartado 5.1.6.1., y del mismo modo que se llevó a cabo para los experimento con la proteína BSA, se obtuvieron los valores de las constantes cinéticas de adsorción k_{ads} las cuales fueron obtenidas mediante la plataforma MATLAB.

En las tablas 5-22 se recogen comparativamente los valores de los promedios k'_{ads} y k_{ads} para la enzima CAT y la proteína BSA al caudal de 1,50 cm³/min.

Tabla 5-22. Determinación de la pseudo-constante y la constante cinética de adsorción k'_{ads} y k_{ads} ($\text{cm}^2/\text{mol s}$), para la enzima CAT y la proteína BSA $Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

CAT		BSA	
$k'_{ads} \times 10^4$	$k_{ads} \times 10^4$	$k'_{ads} \times 10^4$	$k_{ads} \times 10^4$
8,72	7,32	2,31	1,94

De acuerdo a los valores de la tabla 5-22, se puede observar que la constante cinética de adsorción para la enzima CAT a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, es mayor con respecto a la obtenida para la proteína BSA al mismo caudal. Éste comportamiento es consecuente si se tiene en cuenta el hecho de que la enzima CAT necesita menos tiempo para alcanzar el equilibrio (2 horas min aprox.) posiblemente debido a que la enzima CAT presenta mayor afinidad hacia los iones metálicos que la proteína BSA al ser una metalo-enzima, con respecto a la proteína BSA (5,4 horas) a un mismo caudal.

5.2.6.2. Coeficiente de dispersión k_{disp} para la enzima CAT

Los valores del coeficiente de dispersión k_{disp} para la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.1.6.1.2.

La tabla 5-23 recoge los valores para los pseudo-coeficientes de dispersión k'_{disp} y coeficiente de dispersión k_{disp} comparativamente para la enzima CAT y la proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ respectivamente.

Tabla 5-23. Valores de los pseudo-coeficientes y coeficiente de dispersión ($\text{cm}^2/\text{mol s}$), para la enzima CAT y la proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

<i>n</i>	CAT		BSA	
	$k'_{disp} \times 10^6$	$k_{disp} \times 10^6$	$k'_{disp} \times 10^6$	$k_{dips} \times 10^6$
1	25,00	25,00	3,37	2,83
2	17,10	14,71	2,56	2,15
3	12,90	11,09	2,14	1,78
4	4,91	4,22	1,82	1,53
5	4,38	3,68	1,74	1,47

En la figura 5-48 se muestra comparativamente la tendencia del coeficiente de dispersión k_{disp} para el proceso de adsorción tanto de la enzima CAT como de la proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

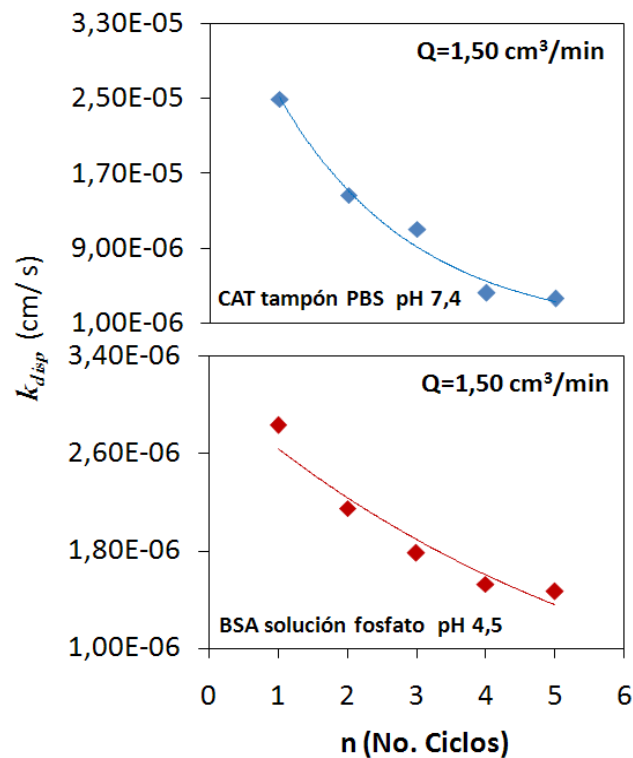


Figura 5-48. Comparación de la variación del coeficiente de dispersión k_{disp} de la enzima CAT con respecto a la proteína BSA para los cinco ciclos de reutilización.

La figura 5-48 muestra un incremento de tipo exponencial en el coeficiente de dispersión tanto para la enzima CAT como para la proteína BSA con el número de reutilizaciones.

Se puede observar que k_{disp} para la enzima CAT es mayor con respecto a los valores obtenidos para la proteína BSA aproximadamente en un orden de magnitud. Éste comportamiento podría indicar que el hecho de que la enzima CAT sea una metalo-enzima que presenta mayor afinidad por los iones metálicos, afecta de manera positiva la transferencia de materia, para el sistema propuesto en esta investigación.

5.3. Estudios de separación de las biomoléculas Suero de albúmina Bovina (BSA) y Catalasa (CAT) en el sistema formado por un monolito cerámico recubierto de agarosa D5 y activado con 1,4-butanodiol-diglicidil-éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético IDA, como agente quelante y Cu^{2+} como ligando, (BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+}) y (CAT-agarosa-IDA- Cu^{2+})

Uno de los principales objetivos de éste trabajo fue establecer el comportamiento de la eficiencia de adsorción en la separación de varias biomoléculas mediante la técnica IMAC usando la matriz cromatográfica propuesta, es decir, un monolito cerámico recubierto por agarosa tipo D-5, activada con 1,4 butanodiol-diglicidil-éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético IDA como agente quelante, y Cu^{2+} como ligando.

Para éste fin se utilizó una mezcla de las biomoléculas BSA y CAT, las cuales fueron estudiadas previamente de forma individual para determinar su comportamiento en el proceso de adsorción/elución en la matriz cromatográfica estudiada.

Sin embargo, teniendo en cuenta que los experimentos de adsorción para la enzima CAT de forma independiente se llevaron a cabo en tampón PBS ya que en tampón fosfato 7,0 formaba micelas y en solución fosfato pH 4,5 presentaba problemas de solubilidad y que la BSA no presenta problemas de solubilidad ni formación de micelas en tampón PBS pH 7,4, se decidió llevar a cabo los experimentos de separación de las dos biomoléculas (BSA+CAT) en tampón PBS pH 7,4.

Así, para llevar a cabo la separación de las dos biomoléculas se utilizaron los siguientes parámetros:

- Concentración de biomolécula (BSA y CAT): $0,7 \text{ mg/cm}^3$.
- Caudal proceso de adsorción: $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.
- Tampón solución proteína: PBS pH 7,4

El proceso de adsorción llevado a cabo para la separación de las dos macromoléculas se muestra a continuación en la figura 5-49:

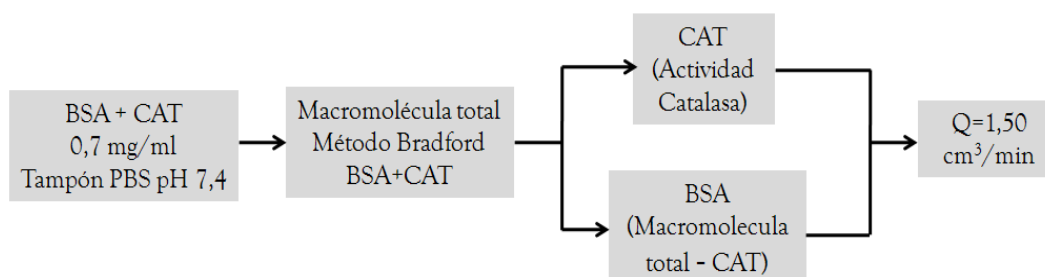


Figura 5-49. Esquema representativo del proceso de adsorción para la separación de dos macromoléculas adsorbidas en un monolito cerámico recubierto con agarosa tipo D5 activada con 1,4 butanodiol diglicidil éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante y Cu^{2+} .

Asimismo, las propiedades del monolito utilizado para llevar a cabo los estudios de separación de dos proteínas se recogen en la tabla 5-24.

Tabla 5-24. Propiedades físicas del monolito usado en los experimentos de adsorción/elución, para la separación de dos biomoléculas.

Propiedades	
Diámetro (cm)	1,30
Peso (g)	4,53
Longitud (cm)	7,50
Volumen (cm ³)	11,76
Recubrimiento de agarosa (g)	3,34
Área total de la superficie (cm ²)	211
Espesor del recubrimiento de agarosa (µm)	156

De acuerdo a lo anteriormente descrito, el procedimiento para llevar a cabo el proceso de adsorción es el que se muestra a continuación:

- Se prepararon 50 cm³ de una solución de proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 de concentración 0,7 mg/cm³ y 50 cm³ de una solución de enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 de concentración 0,7 mg/cm³.
- Los 100 cm³ de solución de BSA+CAT, se hicieron recircular en continuo a través de la columna de afinidad XK-16 Pharmacy. La adsorción de las dos biomoléculas en la columna se siguió, tomando una alícuota de 1 cm³ cada 20 minutos y la absorbancia de la enzima se midió por medio de un espectrofotómetro UVICON 922 a una longitud de onda de 280 nm, hasta que la concentración en la muestra alcanzara un valor constante, indicando que el proceso de adsorción se había detenido.
- De las alícuotas tomadas, en primer lugar se midió la concentración de biomolécula total (es decir la suma de la biomolécula BSA y CAT) mediante el método Bradford descrito en el apartado 4.4.3 del capítulo de materiales y métodos.
- La concentración de enzima CAT fue calculada mediante la medición de su actividad, de acuerdo al método descrito en el apartado 4.4.4 del capítulo de materiales y métodos.
- De esta manera, la concentración de la proteína BSA fue obtenida mediante la diferencia de la concentración total de biomolécula obtenida con el método Bradford y la concentración de la enzima CAT fue obtenida, mediante la medición su actividad.

Una vez concluido el proceso de adsorción, con el fin de eliminar la proteína que había quedado enlazada no específicamente en el adsorbente, durante el proceso de adsorción, se hizo circular a través de la columna de afinidad a un caudal de 1,50 cm³/min, tampón en el cual había sido disuelta la proteína previamente.

Para llevar a cabo esta operación, se tomó una muestra a la salida de la columna cada 10 minutos, la cual fue medida a 280 nm, hasta que la concentración de proteína BSA alcanzara el valor de cero, indicando que no era posible eluir mas proteína.

De las alícuotas tomadas a la salida de la columna se midió la concentración de biomolécula total (es decir la suma de la biomolécula BSA y CAT) mediante el

método Bradford descrito en el apartado 4.4.3 del capítulo de materiales y métodos.

A continuación se procedió a realizar la elución de la proteína enlazada específicamente en el adsorbente. Así, el esquema representativo de la elución de la proteína BSA y la enzima CAT se muestra en la figura 5-50.

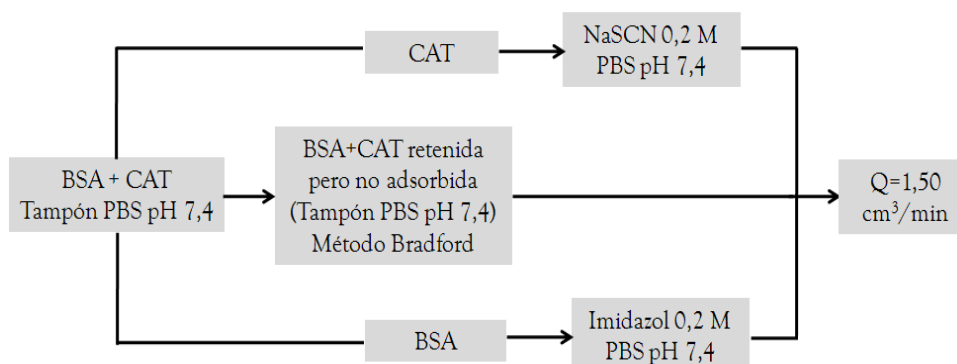


Figura 5-50. Esquema representativo del proceso de elución de las biomoléculas BSA y CAT adsorbidas en una misma columna monolítica.

De acuerdo a la figura 5-50, en primer lugar se llevó a cabo la elución de la biomolécula total retenida pero no adsorbida en la matriz, por medio de un lavado con tampón PBS pH 7,4, el cual fue medido mediante el método Bradford descrito en el apartado 4.4.3, obteniendo como resultado la cantidad de biomolécula total (BSA+CAT) no enlazada específicamente en la matriz.

Seguidamente se procedió a realizar la elución para cada una de las biomoléculas enlazadas en el adsorbente (BSA+CAT).

Como se mencionó en el apartado 5.2, debido a que la enzima CAT no puede ser eluída con imidazol, en primer lugar se procedió a eluir la proteína BSA con imidazol 0,2 M en tampón PBS pH 7,4 del mismo modo que se llevó a cabo el proceso de elución para los estudios anteriores de la proteína BSA descritos en el apartado 5.1.

Una vez eluída la proteína BSA se procedió a eluir la enzima CAT con NaSCN 0,2 M en tampón PBS pH 7,4 de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.2.

5.3.1. Curvas de equilibrio de adsorción

Los perfiles de equilibrio del proceso de adsorción para la mezcla de las biomoléculas BSA y CAT se muestra en la figura 5-51.

De igual forma, En el anexo A se recogen las tablas de datos de concentración en el equilibrio C_E (mol/cm³) frente al tiempo para el proceso adsorción para la proteína BSA proveniente de la separación de las dos (BSA+CAT).

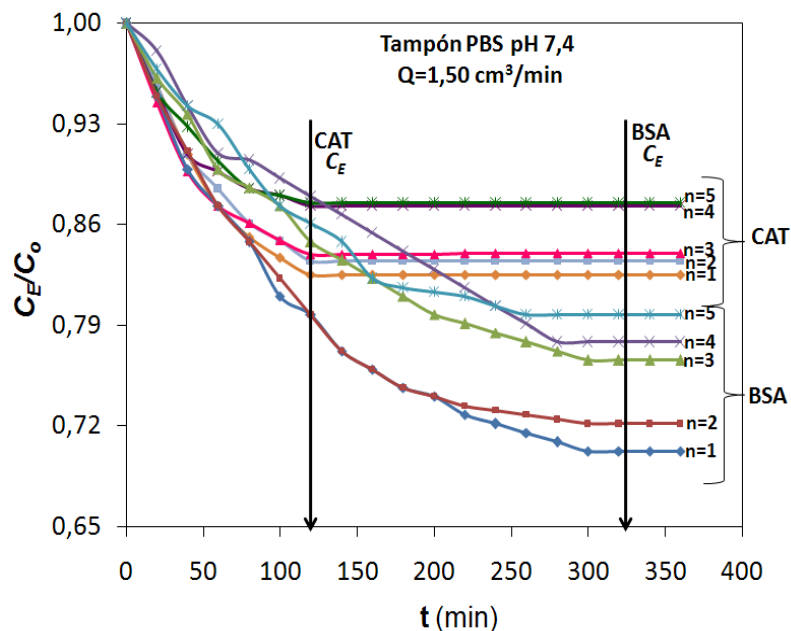


Figura 5-51. Perfiles de equilibrios de adsorción de la proteína BSA, en tampón PBS pH 7,4 proveniente de la separación de BSA+CAT y solución fosfato pH 4,5 a un caudal de 1,50 cm³/min.

En la figura 5-51 se pudo comprobar que utilizando un mismo caudal en el proceso de adsorción para las dos biomoléculas, el tiempo necesario para que el sistema alcanzara el equilibrio era prácticamente el mismo en todos los reutilizaciones (n_1 a n_5) tanto para la enzima CAT como para la proteína BSA.

También se observó que el tiempo requerido para que la proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ fue el mismo que cuando se llevaron a cabo los estudios de adsorción de forma individual (5,4 horas aproximadamente).

Para la enzima CAT se observó que el tiempo requerido para que alcanzará el equilibrio fue de 2,2 horas, del mismo modo que para la enzima estudiada de forma individual; por lo tanto éste comportamiento ratifica el hecho de que es el caudal utilizado es el responsable de marcar el tiempo de equilibrio del proceso de adsorción.

También se observó que a medida que aumentaba el número de ciclos, la capacidad de adsorción de la matriz decreció, comportamiento análogo en todos los estudios de adsorción/elución de la proteína BSA y la enzima CAT estudiada de forma individual.

Así, de acuerdo a los resultados obtenidos la proteína BSA no afecta significativamente el proceso de adsorción de la enzima CAT, por lo tanto se podría decir que la fase estacionaria propuesta en éste trabajo se puede utilizar para la separación de la proteína BSA y la enzima CAT, ya que su comportamiento es análogo al obtenido cuando se llevaron a cabo los procesos de adsorción para cada uno de ellas de forma individual.

5.3.2. Curvas de elución

Los experimentos de elución se llevaron a cabo a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, y una concentración de NaSCN de 0,2 M en tampón PBS pH 7,4, para eluir la enzima CAT enlazada específicamente en la matriz e imidazol 0,2 M en tampón PBS pH 7,4 para eluir la proteína BSA enlazada específicamente en la matriz.

Las biomoléculas enlazadas no específicamente en el adsorbente se eluyeron con tampón PBS pH 7,4.

En la tabla 5-25 se recogen los valores de la cantidad total de biomolécula adsorbida para cada ciclo, así como las cantidades de proteína BSA y enzima CAT adsorbidas de forma independiente.

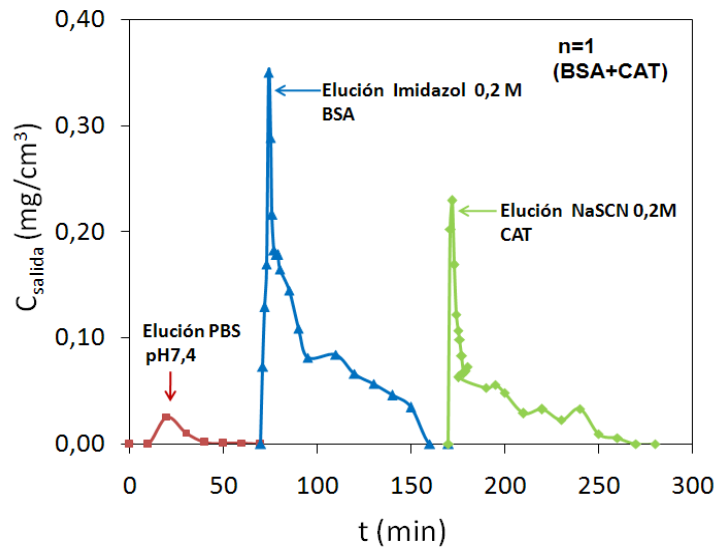
Tabla 5-25. Cantidades totales de biomolécula obtenidas en el proceso de adsorción, así como las cantidades de forma independiente para la proteína BSA y la enzima CAT para cinco ciclos de adsorción/elución.

No Ciclos	Cantidad total biomolécula (mg)	Cantidad BSA (mg)	Cantidad CAT (mg)
n=1	16,50	10,39	6,11
n=2	15,60	9,80	5,80
n=3	13,63	8,03	5,60
n=4	12,14	7,71	4,23
n=5	11,52	7,21	4,31

Los resultados obtenidos para el proceso de elución de BSA+CAT para los cinco ciclos se muestran en las figuras de la 5-52 á 5-56, representando la concentración de enzima a la salida de la columna frente al tiempo; las curvas de elución están identificadas de la siguiente manera: la curva roja corresponde a las biomoléculas retenidas pero no adsorbidas en el adsorbente es decir la biomolécula eluída en el lavado con tampón PBS pH 7,4, la curva verde corresponde a la enzima CAT enlazada específicamente a la matriz y finalmente la curva azul corresponde a la proteína BSA enlazada específicamente.

Debajo de cada gráfico se muestra el balance general del proceso de adsorción/elución, descrito de la siguiente forma:

- Balance General: Indica la cantidad de biomolécula total (es decir la suma de BSA+CAT) adsorbida en un ciclo determinado de adsorción en mg.
- CAT: En el recuadro de CAT se indica tanto la cantidad de enzima adsorbida, como la eluída con NaSCN 0,2 M en mg en un determinado ciclo de adsorción/elución.
- BSA: En el recuadro de BSA se indica tanto la cantidad de proteína adsorbida, como la eluída con imidazol 0,2 M en mg en un determinado ciclo de adsorción/elución.
- El cuadro inferior recoge por un lado la cantidad de biomolécula (BSA+CAT) retenida pero no adsorbida, proveniente del lavado con tampón PBS pH 7,4 y finalmente el porcentaje de biomolécula que no es posible eluir de la matriz.

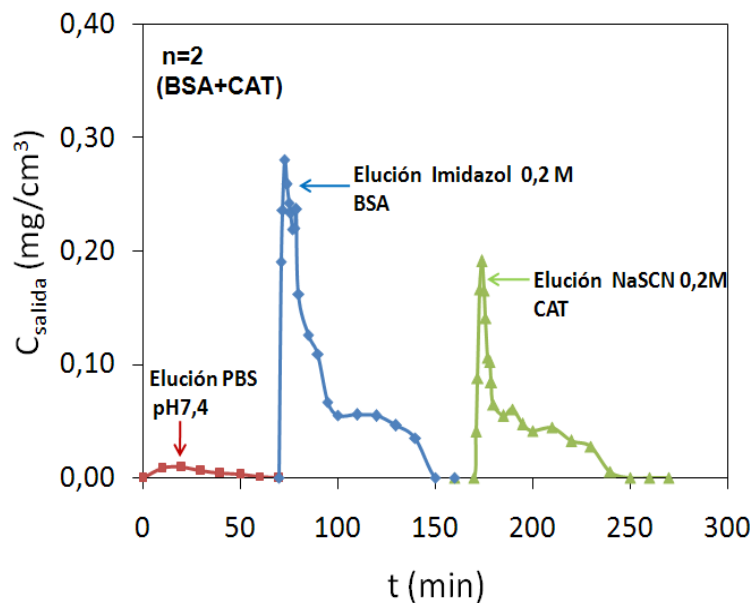


BALANCE GENERAL
n=1
Cantidad total adsorbida
16,50 mg

CAT	BSA
Enzima adsorbida: 6,11 mg	Proteína adsorbida: 10,39 mg
Enzima eluida NaSCN: 5,90 mg	Proteína eluida Imidazol: 9,92 mg

Biomolécula Retenida pero no adsorbida (BSA+CAT): 0,62 mg
% Biomolécula retenida en el adsorbente (BSA+CAT): 0,36%

Figura 5-52. Curvas de elución de la proteína BSA y la enzima CAT, así como el balance general para $n=1$, proveniente de la separación de las dos biomoléculas.



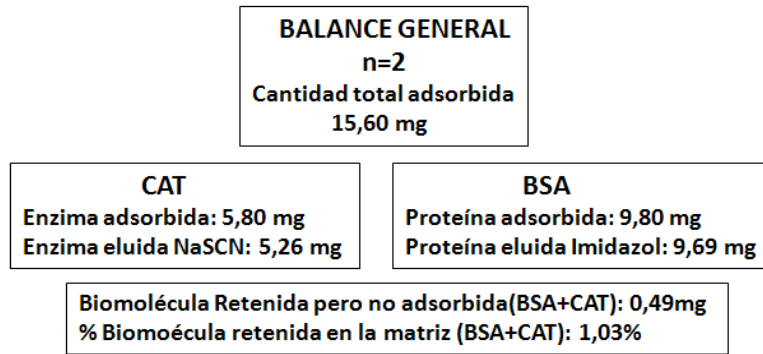


Figura 5-53. Curvas de elución de la proteína BSA y la enzima CAT, así como el balance general para n=2, proveniente de la separación de las dos biomoléculas.

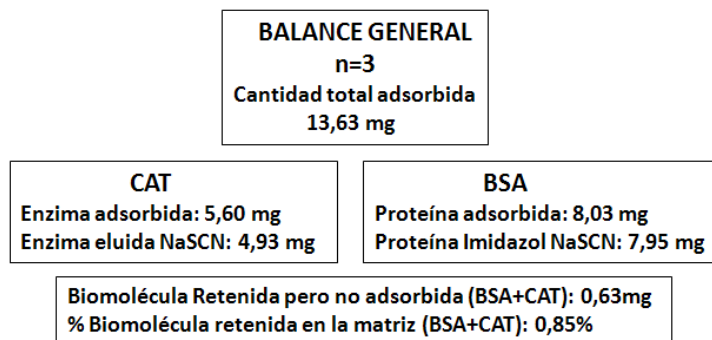
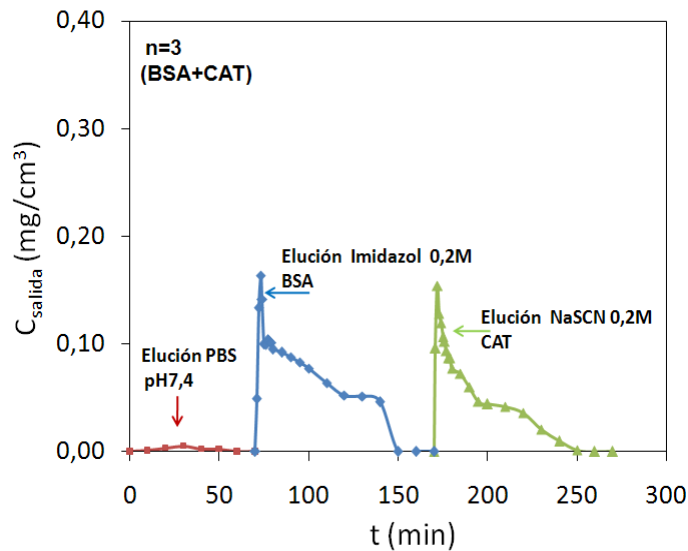


Figura 5-54. Curvas de elución de la proteína BSA y la enzima CAT, así como el balance general para n=3, proveniente de la separación de las dos biomoléculas.

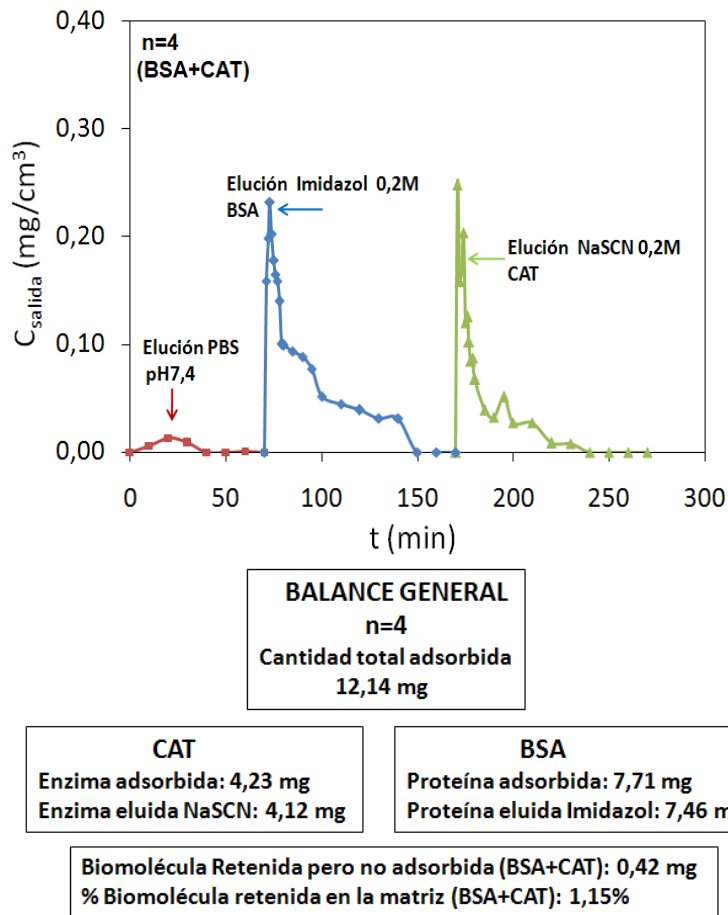
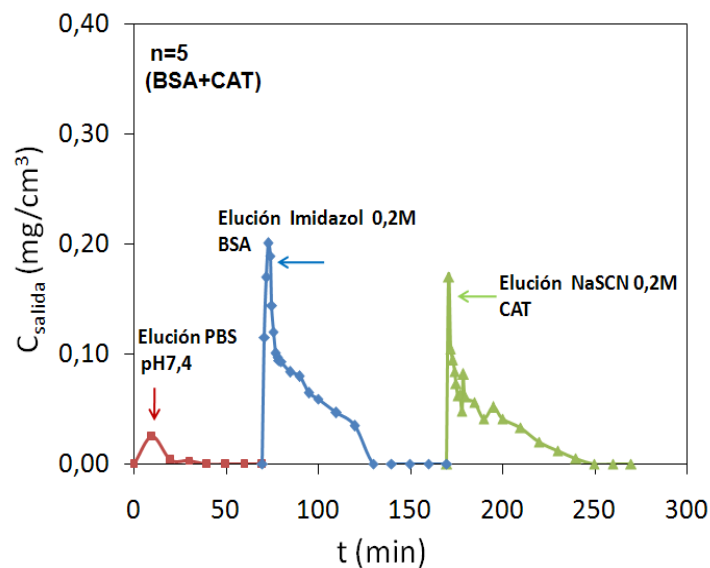


Figura 5-55. Curvas de elución de la proteína BSA y la enzima CAT, así como el balance general para $n=4$, proveniente de la separación de las dos biomoléculas.



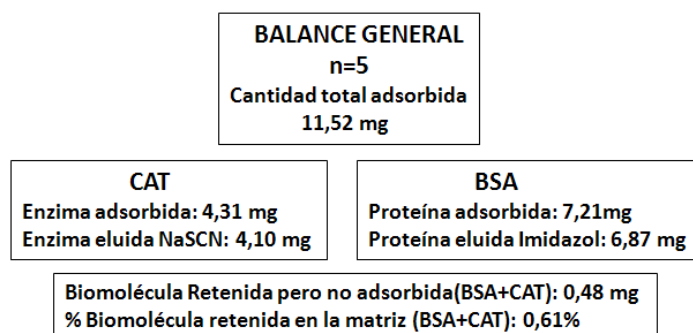


Figura 5-56. Curvas de elución de la proteína BSA y la enzima CAT, así como el balance general para $n=5$, proveniente de la separación de las dos biomoléculas.

De acuerdo a los balances de materia realizados para cada uno de los ciclos de adsorción/elución, se puede concluir que mediante el proceso de elución seleccionado se obtiene más del 95% de la cantidad total de biomolécula que había quedado adsorbida en la matriz cromatográfica, tanto para la proteína BSA como para la enzima CAT.

También se indica que el comportamiento del proceso de elución es análogo al obtenido cuando se estudió la proteína BSA y la enzima CAT de forma independiente.

De estos resultados se podría concluir, que el proceso de elución para cada biomolécula no se ve alterado por la presencia de la otra en el mismo medio.

5.3.3. Eficiencia de adsorción de las biomoléculas (BSA+CAT)

El comportamiento del proceso de adsorción tras varios ciclos de reutilización, así como la reutilización óptima de la columna monolítica, para el sistema formado por la mezcla de las biomoléculas BSA y CAT sobre un monolito cerámico recubierto por agarosa tipo D5, activado con 1,4 butanodiol diglicidil éter como brazo espaciador, ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante, y Cu^{2+} como ligando, fue estudiado de acuerdo al modelo descrito en el apartado 5.1.3.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, se calcularon los valores de ρ_{AS}^R , η_A y η_D para cada una de las biomoléculas separadas en el soporte monolítico, el valor de m es el mismo en ambos casos, ya que el proceso de adsorción de BSA+CAT se llevó a cabo en la misma matriz. En la tabla 5-26 que se muestra a continuación se recogen dichos valores. De igual forma, los gráficos que relacionan el $\ln \rho_{BE,n}$ con respecto a $n-1$, para la proteína BSA y la enzima CAT se muestran en la figura 5-57.

Tabla 5-26. Coeficientes de adsorción/elución para el estudio de separación de la mezcla de biomoléculas BSA y CAT en la misma matriz cromatográfica.

Biomolécula \longrightarrow	BSA	CAT
Número de ciclos (n)	5	5
m (cm^3 de solución/área cm)	0,238	0,238
ρ_{AS}^R (mol/cm^2) $\times 10^{10}$	7,46	1,17
η_A (adimensional)	0,93	0,91
η_D (adimensional)	0,89	0,90

De acuerdo a los valores de los parámetros recogidos en la tabla 5-26, se puede decir que el valor de ρ_{AS}^R es mayor para la proteína BSA, ya que al ser el su tamaño menor, la cantidad que puede ser depositada teóricamente en la superficie del adsorbente ρ_{AS}^T es mayor que la de la enzima CAT, que presenta un tamaño

mayor. Además la concentración de la enzima CAT en mol/cm³ es menor que la empleada para la proteína BSA, debido a la formación de micelas.

La eficiencia de adsorción η_A y la eficiencia de desorción η_D para las dos biomoléculas son prácticamente iguales. Por lo tanto se podría decir que el ensuciamiento que sufre el monolito con el número de reutilizaciones es análogo para las dos biomoléculas.

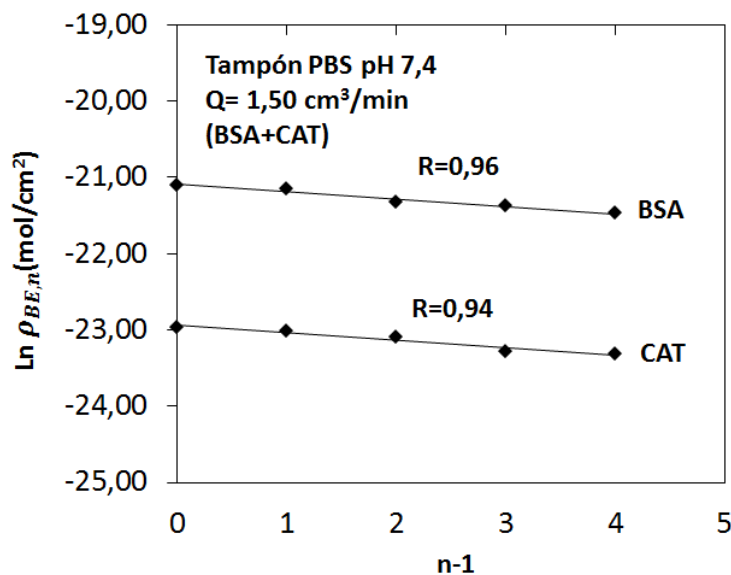


Figura 5-57. Comparativo del logaritmo de la concentración de BSA y CAT experimental por unidad de superficie vs número de reutilizaciones $n-1$ para a un caudal de 1,50 cm³/min.

La figura 5-58 muestra una línea solida de tendencia exponencial, donde los valores de $\rho_{BE,n}$ se ajustan adecuadamente, de forma que la intersección de la línea de tendencia con la línea para $n-1=0$ permite calcular el valor aproximado de ρ_{AS}^R , tanto para la enzima CAT como para la proteína BSA proveniente de la separación de las dos biomoléculas de acuerdo al apartado 5.1.3 descrito anteriormente.

Estos valores están recogidos de igual forma en la tabla 5-26.

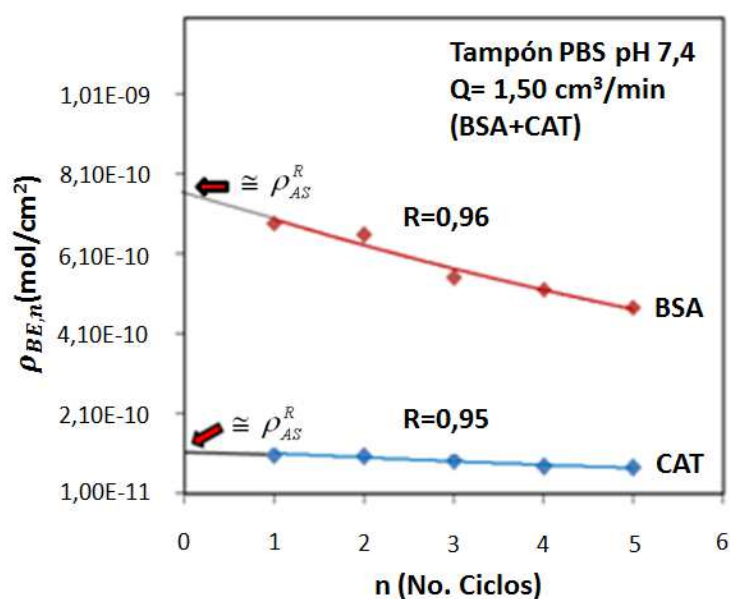


Figura 5-58. Comparativo Número de BSA y CAT enlazados a los ligandos por unidad de superficie de adsorción vs el número de ciclos proveniente de la separación de las dos biomoléculas.

De acuerdo a las figuras 5-57 y 5-58, se puede establecer que el comportamiento del proceso de adsorción de la enzima BSA y la enzima CAT cuando se lleva a cabo de forma simultánea en el mismo adsorbente prácticamente muestra un comportamiento similar al obtenido cuando se llevaron los estudios de adsorción de las misma biomoléculas de forma independiente a un mismo caudal.

5.3.3.1. Validación del modelo de eficiencia para las biomoléculas (BSA+CAT)

A partir del modelo desarrollado y descrito en el apartado 5.1.3, se calculó la concentración teórica de enzima CAT y la proteína BSA en el equilibrio C_E proveniente de la separación de las dos biomoléculas, para un número arbitrario de ciclos (n).

Los valores calculados, fueron comparados con los obtenidos experimentalmente para cada ciclo de adsorción, estos valores se recogen en la tabla 5-27.

Adicionalmente se calculó la concentración en el equilibrio teórica C_E para $n=6$, $n=7$ y $n=8$, con el fin de verificar que la tendencia fuera consistente. Estos valores también se recogen en la tabla 5-27.

La figura 5-59 compara los valores obtenidos para la proteína BSA y la enzima CAT proveniente de la separación de las dos biomoléculas a un caudal de 1,50 cm³/min.

Tabla 5-27. Concentración en equilibrio C_E experimental vs obtenida por el modelo de eficiencia para la enzima CAT y la proteína BSA (proveniente de la separación de las dos biomoléculas). C_E Exp y C_E Teo (mol/cm³) x 10⁹.

Biomolécula	CAT			BSA		
	C_E Exp	C_E Teo	% Error	C_E Exp	C_E Teo	% error
n						
1	2,33	2,33	0,00	7,55	7,55	0,00
2	2,35	2,37	0,85	7,68	7,85	2,99
3	2,39	2,41	0,83	8,16	8,12	0,49
4	2,46	2,45	0,40	8,29	8,37	0,96
5	2,47	2,47	0,00	8,49	8,59	1,18
6		2,50			8,79	
7		2,53			8,97	
8		2,55			9,13	

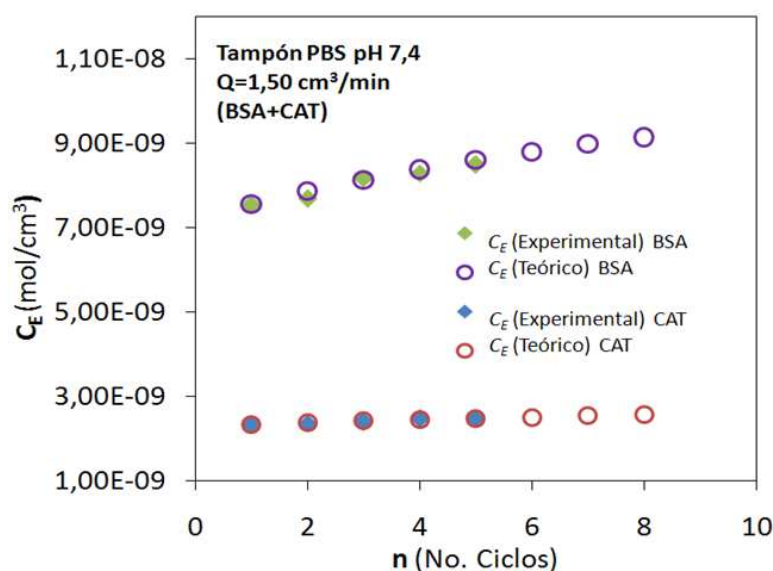


Figura 5-59. Comparativo de C_E experimental y teórica vs Número de ciclos n , para la enzima CAT y la proteína BSA (proveniente de la separación de las dos biomoléculas) a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

De acuerdo con la figura 5-59 se puede observar que el modelo predice el comportamiento de la enzima CAT y la proteína BSA en equilibrio con un error inferior al 3% en ambos casos.

Se debe tener en cuenta que la concentración inicial de partida de la enzima CAT es menor a la utilizada por la proteína BSA (como se mencionó anteriormente), por esta razón la concentración de enzima CAT en el equilibrio es menor con respecto a la obtenida para la proteína BSA.

De forma general se puede concluir que para las dos biomoléculas separadas de una misma matriz cromatográfica, el modelo es capaz de predecir la tendencia del comportamiento de adsorción sin que una biomolécula afecte a la otra, ya que si se comparan los valores obtenidos en la tabla 5-27 con respecto a los obtenidos previamente para la enzima CAT y la proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ de forma independiente se comprobará, que los valores son similares y la tendencia es prácticamente la misma, por lo tanto puede establecerse que no existe competitividad entre las dos biomoléculas por los sitios de unión.

De acuerdo con los valores obtenidos de C_E teórica para las dos biomoléculas, si se extrapola estos valores para ciclos por encima de n_{10} aproximadamente, se puede observar que el comportamiento es prácticamente asintótico, es decir que la columna no sería capaz de adsorber más biomolécula.

5.3.4. Rendimiento del proceso de separación de las biomoléculas (BSA + CAT)

El estudio de rendimiento del proceso de separación de la mezcla de las biomoléculas CAT y BSA en tampón PBS pH 7,4 y caudal 1,50 cm³/min, se llevó a cabo de acuerdo con lo indicado en el apartado 5.1.4., a fin de determinar si existía alguna modificación en el comportamiento del rendimiento de separación de las biomoléculas al ser adsorbidas conjuntamente en el soporte cromatográfico.

Así, para la enzima CAT de acuerdo a los valores de las cinéticas de adsorción de la figura 5-51 se pudo establecer que a las 2 horas de proceso de adsorción la enzima había alcanzado aproximadamente un 99% del total de la enzima adsorbida y al cabo de 3 horas se había adsorbido completamente.

Por otro lado, para la proteína BSA de acuerdo a los valores de las cinéticas de adsorción de la figura 5-51 se pudo establecer que a las 2 horas de proceso de adsorción la proteína había alcanzado entre un 75-80% del total de la proteína adsorbida y al cabo de 3 horas se alcanza aproximadamente un 90% del total de proteína adsorbida.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, los tiempos de equilibrio obtenidos tanto para la proteína BSA como para la enzima CAT, son prácticamente iguales a los obtenidos cuando se llevaron a cabo los estudios de adsorción para las dos biomoléculas de forma independiente.

En la figura 5-60 a y b se muestra de forma comparativa la cantidad separada de biomolécula de la mezcla (BSA+CAT) en mol por unidad de área en cm² por unidad de tiempo en horas teniendo en cuenta el tiempo de regeneración establecido previamente en 18 horas, calculados mediante la ecuación 5-21, apartado 5.1.1.

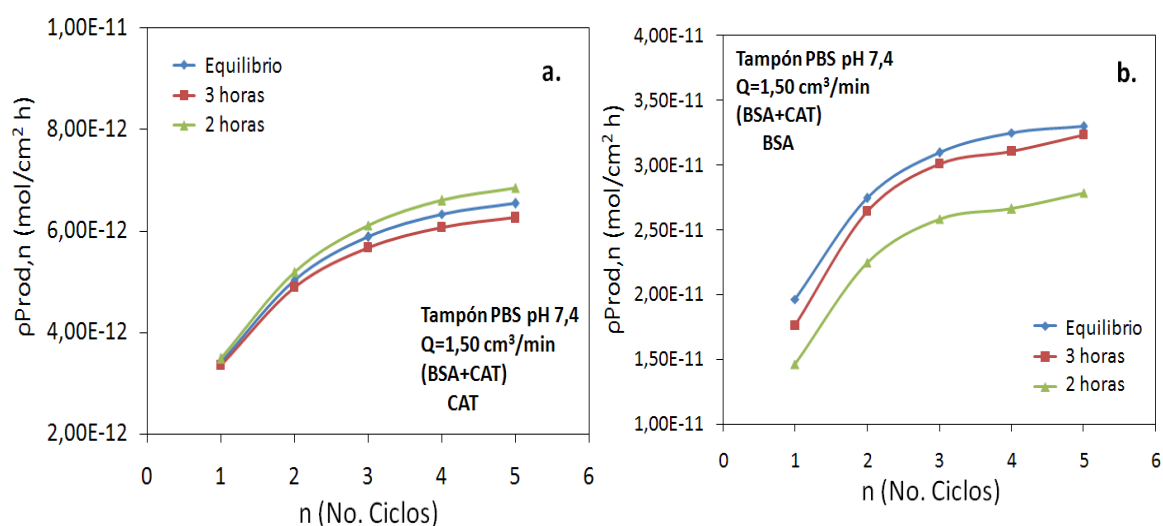


Figura 5-60. Cantidad de biomolécula separada por unidad de área de la columna por unidad de tiempo, como una función de la cantidad de ciclos de adsorción/elución teniendo en cuenta el tiempo de regeneración para a) enzima CAT y b) proteína BSA (proveniente de la separación de las dos biomoléculas) a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

La figura 5-60 a y b pone de manifiesto que el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso de adsorción de la enzima CAT es menor con respecto a la proteína BSA, ya que la curva de la eficiencia de separación al cabo de 2 horas con respecto a la curva de equilibrio es prácticamente igual.

Con respecto a la proteína BSA se puede observar que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es mayor con respecto a la enzima CAT ya que la curva de la eficiencia de separación al cabo de 3 horas con respecto a la curva de equilibrio, son muy cercanas.

Los valores de la figura 5-60 muestran además que la interacción de las biomoléculas no afecta su comportamiento entre sí, ya la adsorción es prácticamente igual que cuando se estudiaron de forma independiente, por lo tanto nuevamente se pone de manifiesto que no existe una competición entre las dos por los sitios de unión.

La figura 5-61 a y b muestra los perfiles de las cantidades de biomolécula separada referidos al año para la mezcla de las dos biomoléculas estudiadas, en mol por unidad de área en cm^2 por unidad de tiempo en horas, para la proteína BSA y la enzima CAT para los cinco ciclos de adsorción/elución, teniendo en cuenta el

proceso de elución y lavado de la columna que anteriormente se estableció en 5 horas.

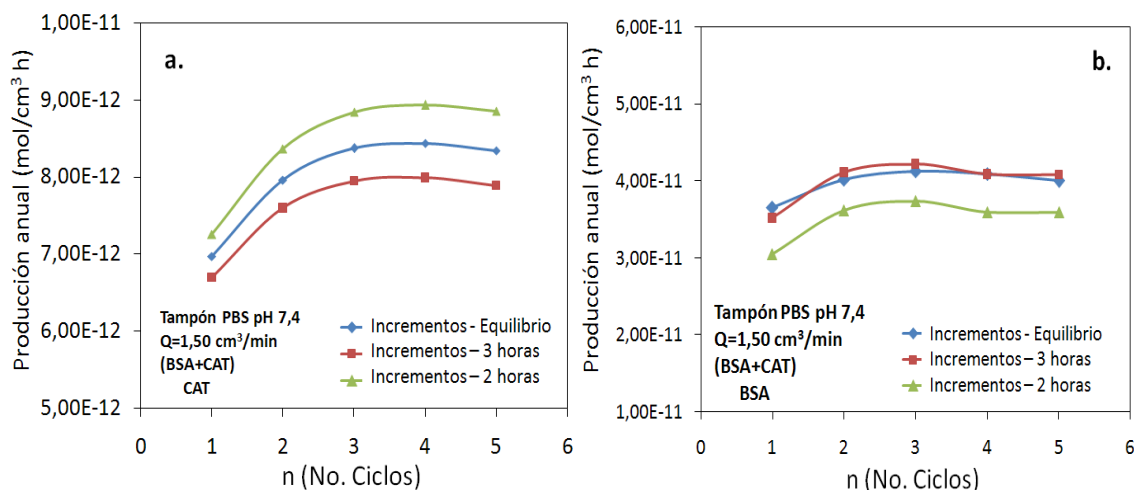


Figura 5-61. Rendimiento de la columna monolítica para el proceso de separación anual, para un tiempo de inactividad de 5 horas, para **a)** enzima CAT y **b)** proteína BSA (proveniente de la separación de las dos biomoléculas) a un caudal de 1,50 cm³/min.

De acuerdo a la figura 5-61a, la reutilización de la columna monolítica aumentará el rendimiento de la separación de la enzima CAT para una operación de proceso dado ya que el porcentaje de adsorción al cabo de 2 horas es prácticamente el 100% en todos los ciclos. Además, teniendo en cuenta que el equilibrio se alcanzará antes de las 2 horas, no sería necesario interrumpir el proceso de adsorción para poder reutilizar la columna cromatográfica eficientemente hasta 4 veces antes de su primera regeneración.

Por otro lado el comportamiento de la enzima CAT en la matriz cuando se adsorbe de forma simultánea con la proteína BSA no afecta el rendimiento del proceso de adsorción, ya que el comportamiento es prácticamente el mismo que para la enzima adsorbida de forma independiente.

Con respecto a la proteína BSA, de acuerdo a la figura 5-61b si el proceso de adsorción alcanza el equilibrio, para conseguir una máxima cantidad de proteína separada, la columna solo se podría reutilizar dos veces (3 ciclos de adsorción), tal y como se observó cuando se llevaron a cabo los experimentos de forma individual

para dicha proteína. Por tanto el proceso debería ser interrumpido a las 3 horas para que la cantidad de proteína separada por unidad de área de columna sea un poco más alta, pudiendo reutilizar la columna hasta 4 ciclos de adsorción.

Así teniendo en cuenta que el proceso de adsorción para la enzima CAT alcanza el equilibrio prácticamente a las 2 horas de proceso, se puede establecer que la proteína BSA es la limitante en el proceso de separación de las dos biomoléculas estudiadas, ya que su cinética es más lenta que la obtenida para la enzima CAT.

Adicionalmente, si se tiene en cuenta que el porcentaje de proteína BSA separado al cabo de 2,5 horas es aproximadamente el 85% de la proteína total adsorbida, es posible llevar a cabo la separación de las dos biomoléculas en un mismo tiempo (2,5 horas aproximadamente) interrumpiendo el proceso de adsorción de la proteína BSA a este tiempo, donde se generaría una pérdida de la eficiencia de adsorción en torno al 14%.

De esta forma, se llevó a cabo un balance para establecer la cantidad de proteína separada anual por unidad de superficie, teniendo en cuenta el tiempo de inactividad de la columna, reduciendo el tiempo de equilibrio de 5 horas a 2,5 horas, con el fin de establecer si el hecho de interrumpir el proceso de adsorción de la proteína BSA en el tiempo que necesita la enzima CAT para alcanzar el equilibrio podría afectar de forma global el rendimiento de la columna monolítica.

En la figura 5-62 se muestra de forma comparativa el rendimiento de separación de la proteína BSA para un tiempo de equilibrio de 2,5 y 5 horas respectivamente.

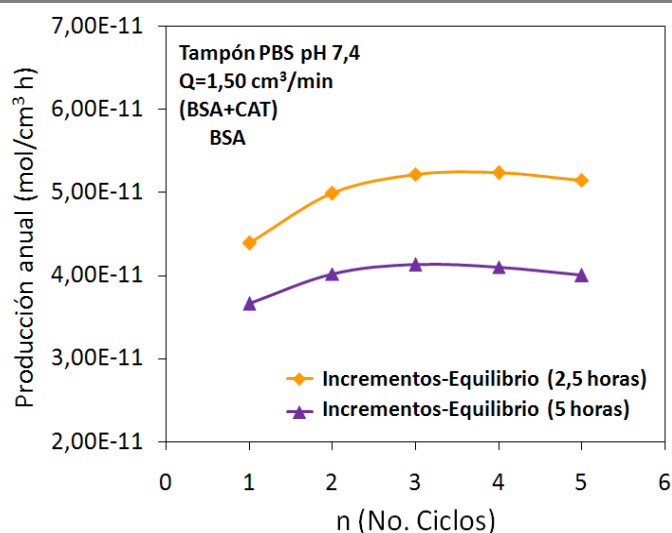


Figura 5-62. Rendimiento de la columna monolítica para el proceso de separación anual, para un tiempo de inactividad de 5 horas, para la proteína BSA, a 5 y 2,5 horas de tiempo de equilibrio.

Los valores de la figura 5-62 indica que interrumpir el proceso de adsorción de la proteína BSA al cabo de 2,5 horas, presenta una mejora en el rendimiento de la columna debido a que el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso de adsorción es menor.

Por tanto se podría concluir que acortar el tiempo de adsorción para la proteína BSA, cuando se lleva a cabo la separación de las dos biomoléculas, no supone un empeoramiento en el rendimiento de la columna.

5.3.5. Transferencia de materia dentro de los canales del monolito cerámico

Del mismo modo que para los experimentos llevados a cabo con la proteína BSA y la enzima CAT de forma independiente, se correlacionaron los valores correspondientes a los perfiles de concentración-tiempo para la mezcla de las biomoléculas BSA y CAT fueron correlacionados de acuerdo al modelo descrito en el apartado 5.1.6.1.3., utilizando la plataforma MATLAB, que ajusta el coeficiente de dispersión k_{disp} y la constante cinética de adsorción k_{ads} , por un método de búsqueda de mínimos en funciones multiparamétricas.

Los perfiles experimentales del proceso de adsorción (\bar{C}_E vs t) para la mezcla binaria de la enzima CAT y la proteína BSA con los correspondientes ciclos de uso (n=1, n=2, n=3, n=4 y n=5), fueron comparados con los perfiles teóricos predichos por el modelo.

En la figura 5-63 a y b se muestran comparativamente los valores de concentración experimentales y teóricos respectivamente de la enzima CAT y la proteína BSA (proveniente de la separación de las dos biomoléculas) para un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, donde las líneas negras continuas son los valores teóricos predichos por el modelo y las líneas en color, los valores experimentales.

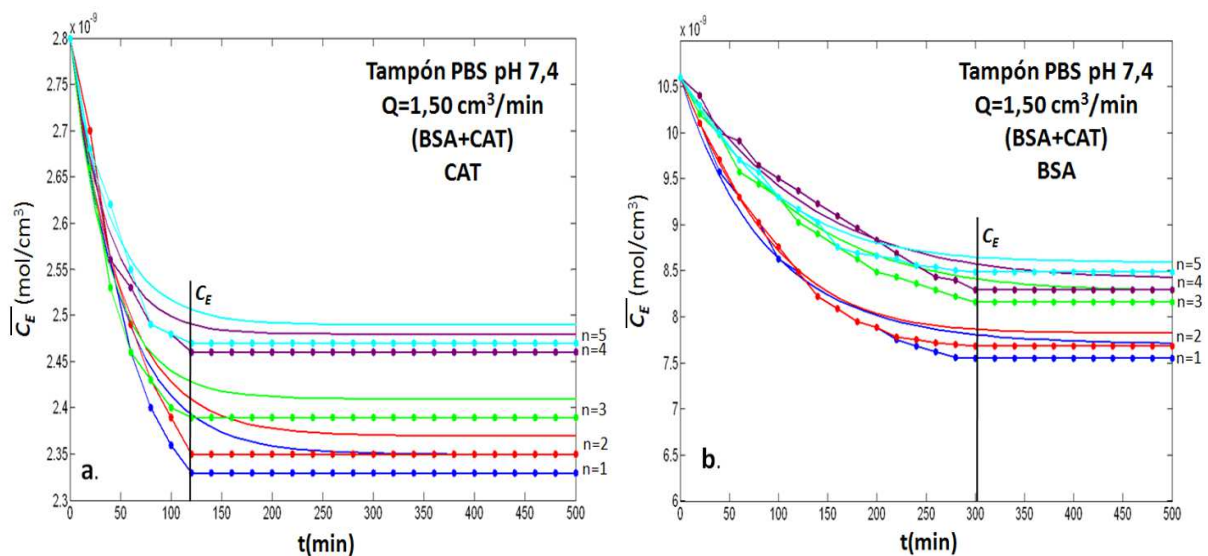


Figura 5-63. Comparativo de los perfiles teóricos y experimentales de concentración en el sobrenadante vs tiempo, correspondientes a la adsorción de a) la enzima CAT y b) proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ (proveniente de la separación de las dos biomoléculas).

En general, la figura 5-63 a y b refleja que a medida que se reutiliza el adsorbente la capacidad de adsorción disminuye, comportamiento análogo al obtenido previamente para las dos biomoléculas estudiadas de forma independiente.

También se puede observar que el modelo se ajusta bien para las dos biomoléculas, siendo las concentraciones calculadas mediante el modelo, similares a las obtenidas experimentalmente en todos los ciclos con un error inferior a 2%.

Las tablas que contienen los valores de la concentración en el equilibrio obtenida experimentalmente, comparada con los valores calculados teóricamente mediante el modelo, mediante el modelo para la enzima CAT y la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ se recogen en el anexo D.

5.3.6. Determinación de la constante cinética de adsorción y el coeficiente de dispersión para la mezcla binaria de biomoléculas BSA+CAT

5.3.6.1. Constante cinética de adsorción k_{ads} para la mezcla binaria de biomoléculas BSA+CAT

Con el fin de comparar la constante cinética de adsorción para la proteína BSA y la enzima CAT con las obtenidas de forma independiente en tampón PBS pH 7,4 y caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, se llevaron a cabo los experimentos de adsorción en dichas condiciones para poder ser comparados con los resultados obtenidos para la proteína BSA proveniente de la separación de dos biomoléculas (BSA y CAT).

En la tabla 5-28 se recogen comparativamente los valores promedio de k'_{ads} y k_{ads} para la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 a caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, proveniente de la separación de dos biomoléculas (BSA y CAT) y estudiada de forma individual y en la tabla 5-29 de igual forma se recogen los valores promedio

de k'_{ads} y k_{ads} para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 a caudal de 1,50 cm^3/min , proveniente de la separación de dos biomoléculas (BSA y CAT) y separada de forma individual respectivamente.

Tabla 5-28. Comparación de la pseudo-constante y la constante cinética de adsorción k'_{ads} y k_{ads} ($\text{cm}^2/\text{mol s}$), para la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, 1,50 cm^3/min estudiada de forma individual y proveniente de la separación de BSA+CAT.

CAT (individual)		CAT (Mezcla BSA+CAT)	
$k'_{ads} \times 10^4$	$k_{ads} \times 10^4$	$k'_{ads} \times 10^4$	$k_{ads} \times 10^4$
8,72	7,32	9,38	8,54

Tabla 5-29. Comparación de la pseudo-constante y la constante cinética de adsorción k'_{ads} y k_{ads} ($\text{cm}^2/\text{mol s}$), para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, 1,50 cm^3/min estudiada de forma individual y proveniente de la separación de BSA+CAT.

BSA (individual)		BSA (Mezcla BSA+CAT)	
$k'_{ads} \times 10^4$	$k_{ads} \times 10^4$	$k'_{ads} \times 10^4$	$k_{ads} \times 10^4$
2,45	2,25	2,51	2,28

De las tablas 5-28 Y 5-29 se puede observar que la constante cinética de adsorción para la enzima CAT es mayor que la obtenida para la proteína BSA. Éste comportamiento es consecuente, con la tendencia observada para las dos biomoléculas estudiadas de forma independiente.

Por otra parte el comportamiento de la constante cinética de adsorción es prácticamente igual para las dos biomoléculas separadas conjuntamente y de forma independiente, lo cual supone que no hay interferencia entre sí en el proceso de adsorción.

5.3.6.2. Coeficiente de dispersión k_{disp} para la mezcla binaria de biomoléculas BSA+CAT

Los valores de los coeficientes de dispersión para la enzima CAT y la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 proveniente de la separación de dos proteínas a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ se obtuvieron de acuerdo a lo descrito anteriormente en el apartado 5.1.6.1.2.

La tabla 5-30 recoge los valores de los pseudo coeficientes y el coeficiente de dispersión k'_{disp} y k_{disp} (cm/s) para la enzima CAT proveniente de la separación de la mezcla de BSA y CAT y estudiada de forma individual. Asimismo, la tabla 5-31 recoge los valores de los pseudo coeficientes y el coeficiente de dispersión k'_{disp} y k_{disp} (cm/s) para la proteína BSA proveniente de la separación de la mezcla de BSA y CAT y estudiada de forma individual, respectivamente.

Tabla 5-30. Determinación del pseudo-coeficiente y coeficiente de dispersión k'_{disp} y k_{disp} (cm/s), para la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, estudiada de forma individual y proveniente de la separación de BSA+CAT.

n	CAT (individual)		CAT (Mezcla BSA+CAT)	
	$k'_{disp} \times 10^6$	$k_{dips} \times 10^6$	$k'_{dips} \times 10^6$	$k_{dips} \times 10^6$
1	25,00	25,00	23,00	23,00
2	17,10	14,71	15,40	14,01
3	12,90	11,09	13,10	11,92
4	4,91	4,22	9,12	8,30
5	4,38	3,68	4,04	3,67

Tabla 5-31. Determinación del pseudo-coeficiente y coeficiente de dispersión k'_{disp} y k_{disp} (cm/s), para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, 1,50 cm³/min, estudiada de forma individual y proveniente de la separación de BSA+CAT.

n	BSA (individual)		BSA (Mezcla BSA+CAT)	
	$k'_{disp} \times 10^6$	$k_{disp} \times 10^6$	$k'_{disp} \times 10^6$	$k_{disp} \times 10^6$
1	9,37	9,37	9,56	9,56
2	4,36	3,97	4,02	3,70
3	3,62	3,29	3,53	3,25
4	3,57	3,25	2,73	2,51
5	3,16	2,88	2,64	2,43

En la figura 5-64 a y b se muestra comparativamente la tendencia del coeficiente de dispersión k_{disp} para el proceso de adsorción tanto de la enzima CAT como de la proteína BSA a un caudal de 1,50 cm³/min, proveniente de la separación de las dos biomoléculas y estudiadas de forma individual.

En dicha figura se pone de manifiesto que la tendencia del comportamiento del fenómeno de transferencia de materia de la mezcla de las biomoléculas BSA y CAT es prácticamente igual al obtenido cuando se estudiaron las dos biomoléculas de forma independiente, es decir, que para un caudal de 1,50 cm³/min el coeficiente de transferencia de materia para la enzima CAT es mayor que el obtenido para la proteína BSA, y esta tendencia se mantiene en todos los ciclos de reutilización.

Por lo tanto se podría establecer que el fenómeno de transferencia de materia es reproducible, lo cual supone que las dos biomoléculas no compiten por los sitios de unión y que evidentemente la enzima CAT presenta mayor afinidad a la matriz que la proteína BSA.

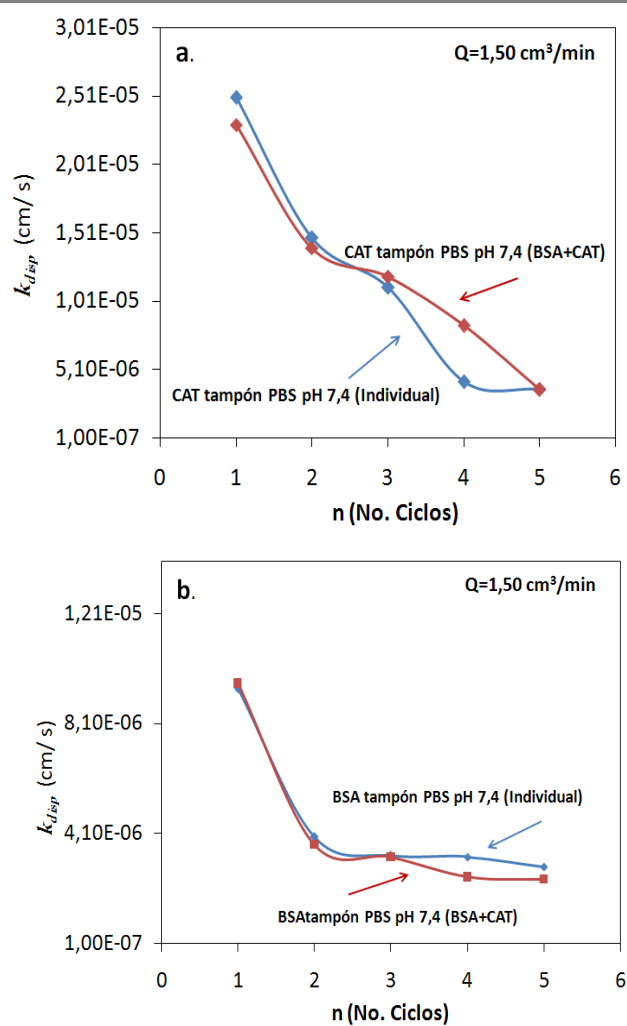


Figura 5-64. Comparación de la variación del coeficiente de dispersión k_{disp} a) de la enzima CAT y b) proteína BSA para los cinco ciclos de reutilización proveniente de la separación de las dos biomoléculas y estudiada de forma independiente, en tampón PBS pH 7,4 y un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

5.4. Caracterización del enlace molecular para los sistemas conformados por la enzima CAT y la proteína BSA.

Como se mencionó en el apartado 3.7 del fundamento teórico la nanocalorimetría isotérmica (ITC) es una técnica termodinámica que permite estudiar el calor de interacción entre dos moléculas, de tal forma que cuando éstas se enlazan, son acompañadas de la liberación o absorción de calor, y la medición de éste calor permite una precisa determinación de la constante de enlace (K_b), la estequiometría de la reacción (n_b) y un perfil termodinámico de la reacción en el cual se incluye la variación de la entalpía (ΔH), de una forma directa.

Con el fin de establecer el comportamiento del proceso de enlace de las biomoléculas, estudiadas en esta investigación BSA y CAT y el ligando seleccionado (Cu^{2+}), se estudió por un lado el enlace con el ligando (Cu^{2+}) en estado libre, es decir BSA- Cu^{2+} y CAT- Cu^{2+} y una vez obtenidos estos resultados, se procedió a estudiar el enlace de las biomoléculas con el ligando inmovilizado, es decir BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+} y CAT-agarosa-IDA- Cu^{2+} con el fin de comparar su comportamiento y determinar si existía alguna diferencia entre los dos enlaces, dado que de acuerdo a los resultados obtenidos en los procesos de adsorción, todo indica que la enzima CAT presenta mayor afinidad hacia el Cu^{2+} que la proteína BSA.

5.4.1. Estudios de nano-calorimetría Isotérmica para las biomoléculas con el ligando (Cu^{2+}) en estado libre

5.4.1.1. Estudio calorimétrico BSA- Cu^{2+} y CAT- Cu^{2+}

El estudio nano-calorimétrico para el enlace de la proteína BSA se llevó a cabo en solución fosfato pH 4,5 y tampón PBS pH 7,4 y el Cu^{2+} en estado libre y la enzima CAT en tampón fosfato PBS pH 7,4 y el Cu^{2+} en estado libre, con el fin de comparar su comportamiento como se mencionó anteriormente.

La unión de la proteína BSA y la enzima CAT con el Cu^{2+} en estado libre se estudió a las siguientes temperaturas: 296, 298, 300, 302 y 304 K. Se seleccionó éste intervalo de temperaturas debido a que la conformación de las proteínas así como la actividad de las enzimas varía significativamente con la temperatura, sufriendo pequeñas modificaciones dentro del intervalo propuesto pero llegándose a destruir dichas estructuras cuando el gradiente térmico es elevado (Aki and Yamamoto, 1989; Kim and Lee, 2007).

Ross and Subramanian, 1981; Shahabadi and Maghsudi, 2009; y Singh and Shore, 2008 han utilizado intervalos de temperatura similares a los utilizados en éste trabajo, siendo 298 K una temperatura adecuada para éste tipo de estudios.

Los experimentos para caracterizar el enlace molecular de la proteína BSA y la enzima CAT con el Cu^{2+} en estado libre a las cinco temperaturas anteriormente mencionadas, se llevaron a cabo de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 4.5.1 (BSA) y 4.5.3 (CAT) del capítulo de materiales y métodos.

Los perfiles de unión obtenidos mediante la técnica ITC para enzima CAT y la proteína BSA con el Cu^{2+} en estado libre, para las diferentes temperaturas estudiadas se muestran de forma comparativa en las figuras de la 5-65 a la 5-69, de tal forma que cada pico en las isotermas de unión representan una única inyección del ligando en la solución de biomolécula. Dichos perfiles de unión presentan una desviación estándar en torno al 20% y un error alrededor del 5%.

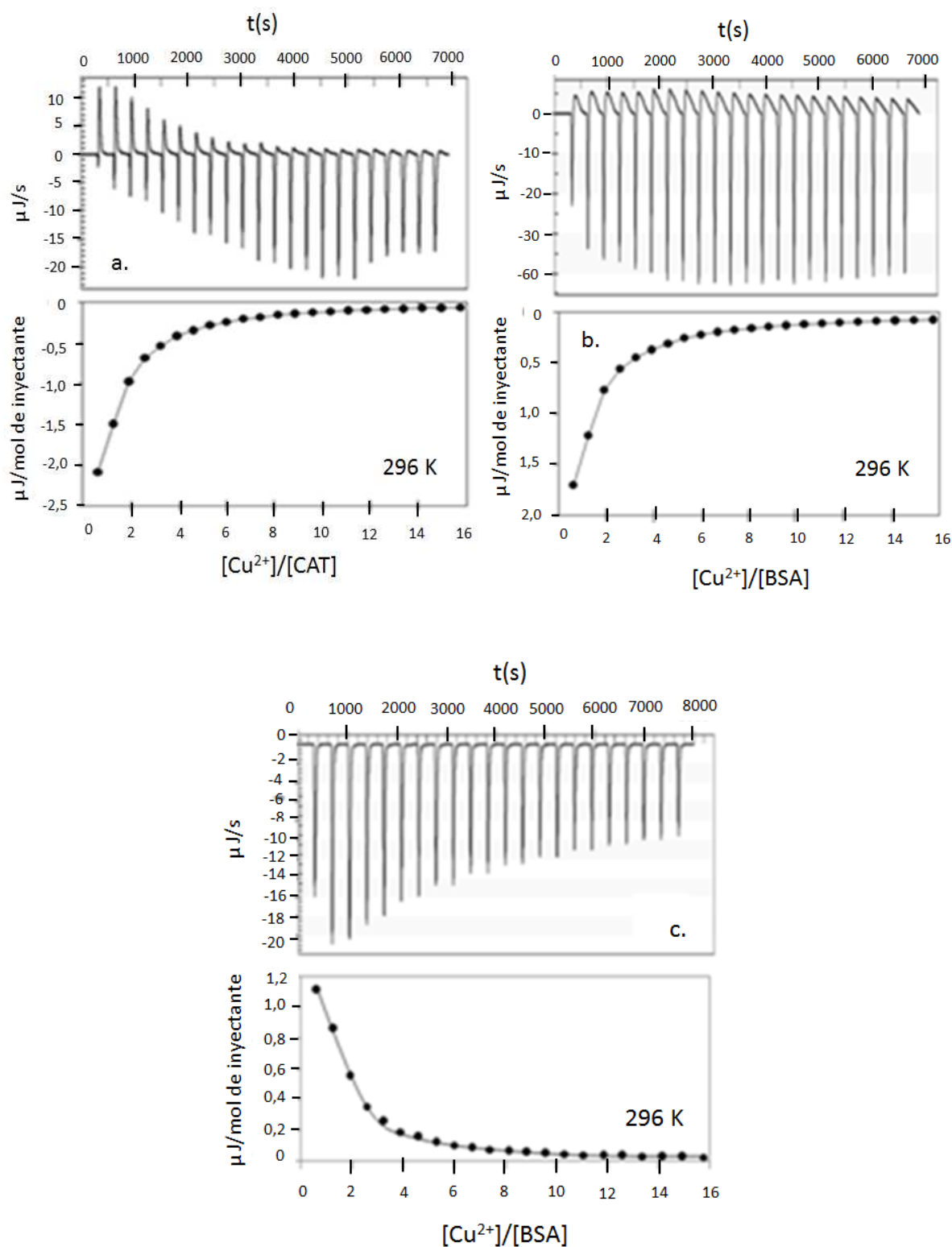


Figura 5-65. Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM, pH 4,5 y la con Cu^{2+} en estado libre, a una temperatura de 296 K.

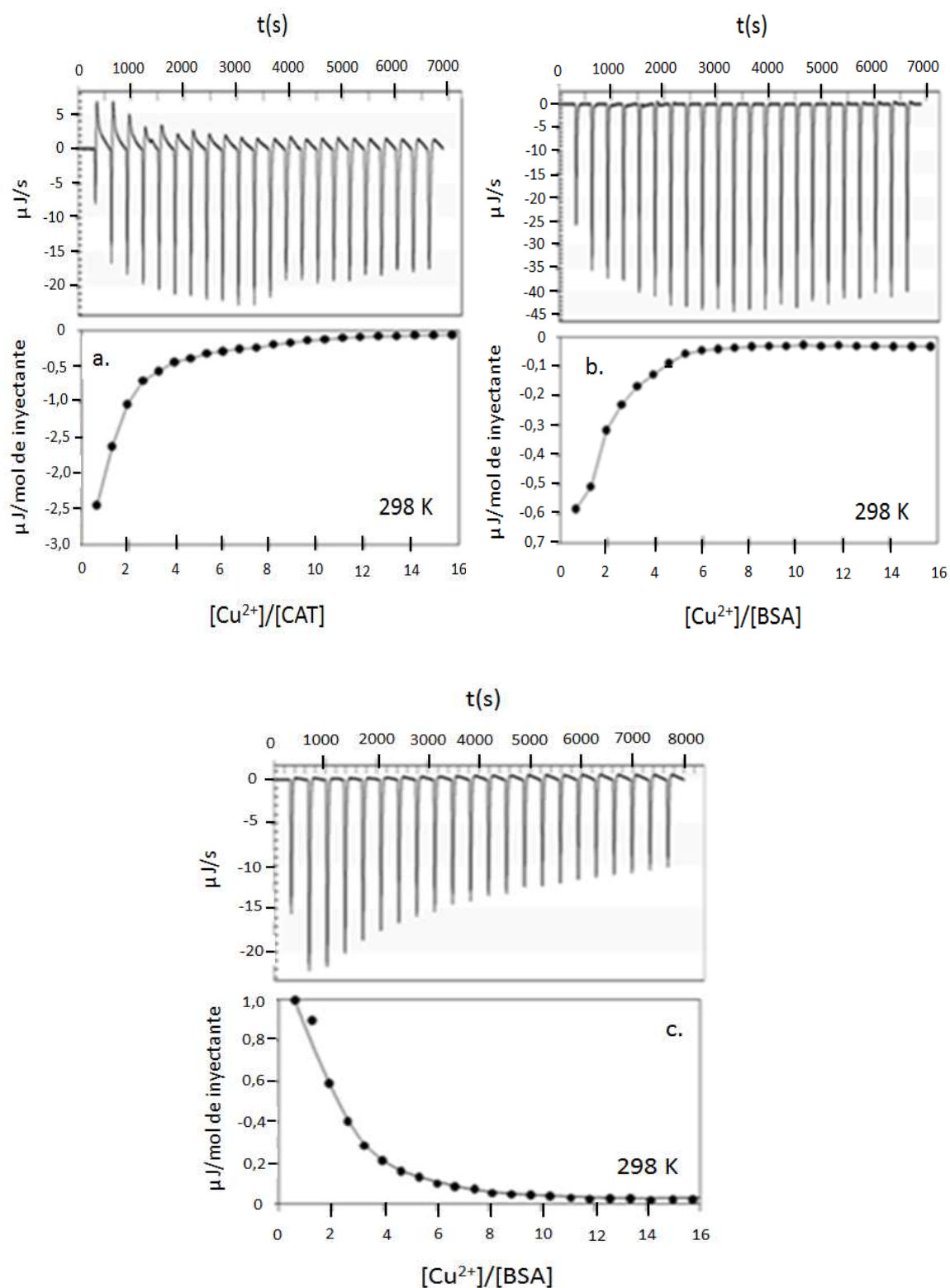


Figura 5-66. Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM, pH 4,5 y la con Cu^{2+} en estado libre, a una temperatura de 298 K.

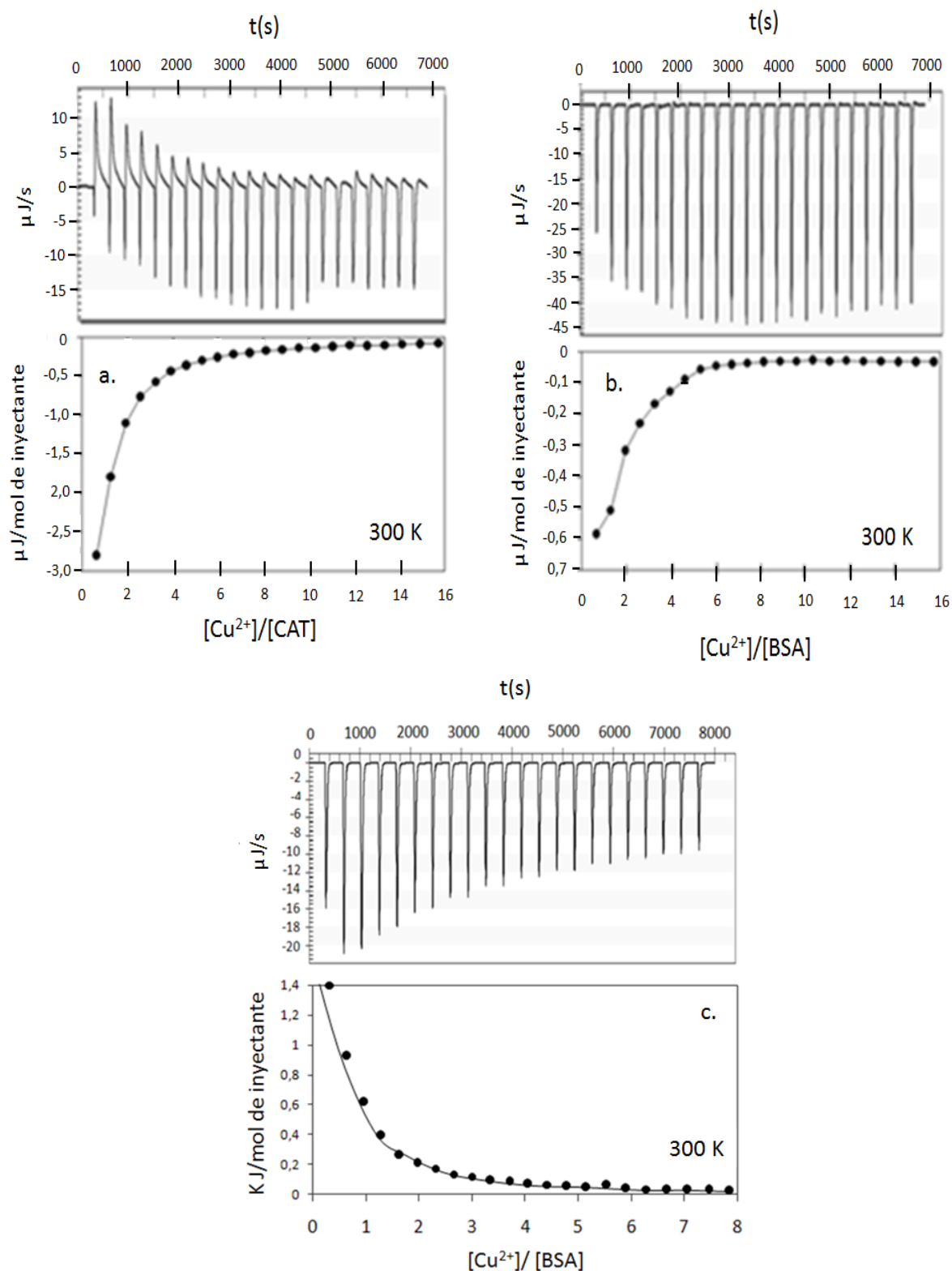


Figura 5-67. Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM, pH 4,5 y la con Cu^{2+} en estado libre, a una temperatura de 300 K.

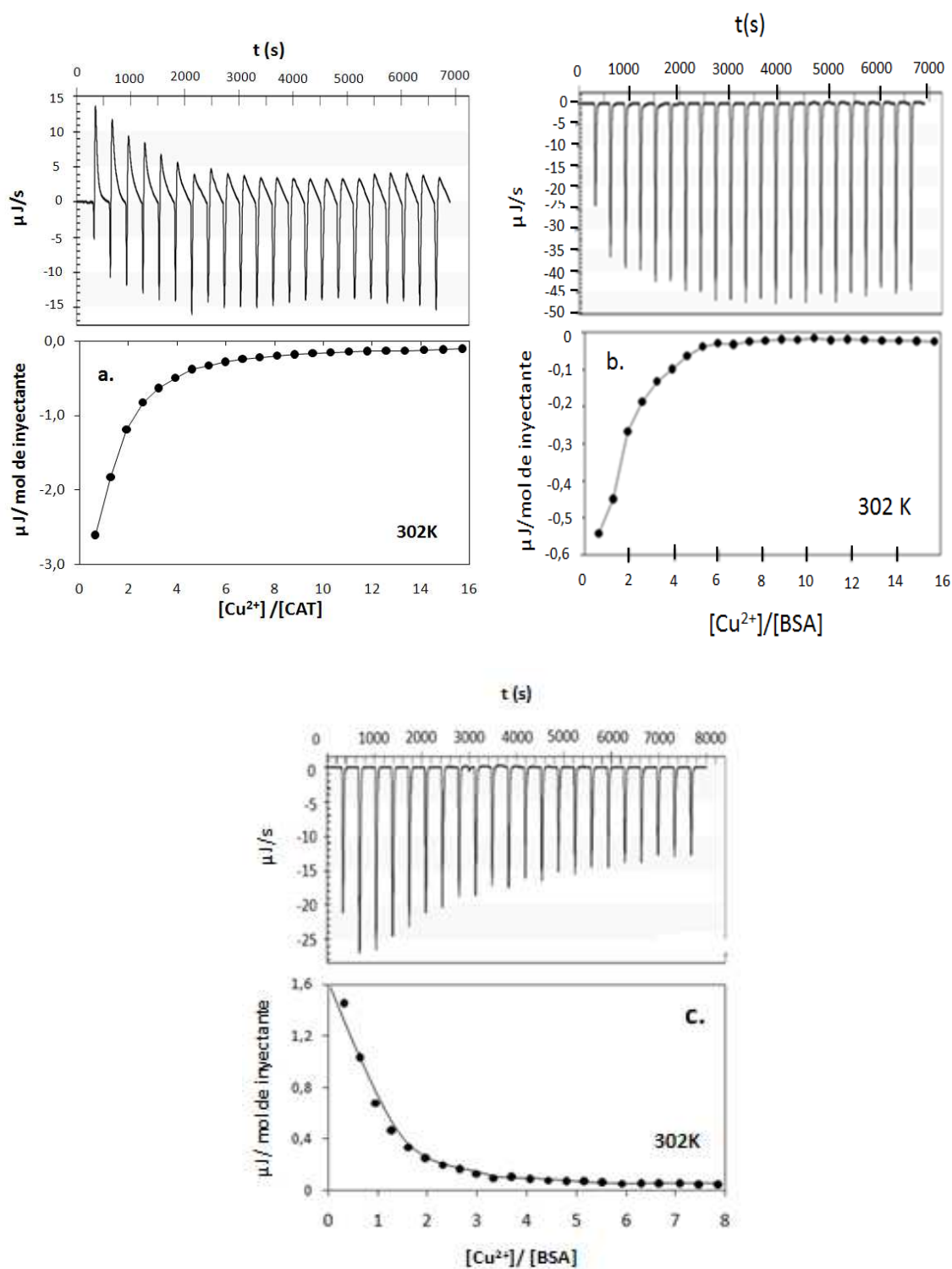


Figura 5-68. Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM, pH 4,5 y la con Cu^{2+} en estado libre, a una temperatura de 302 K.

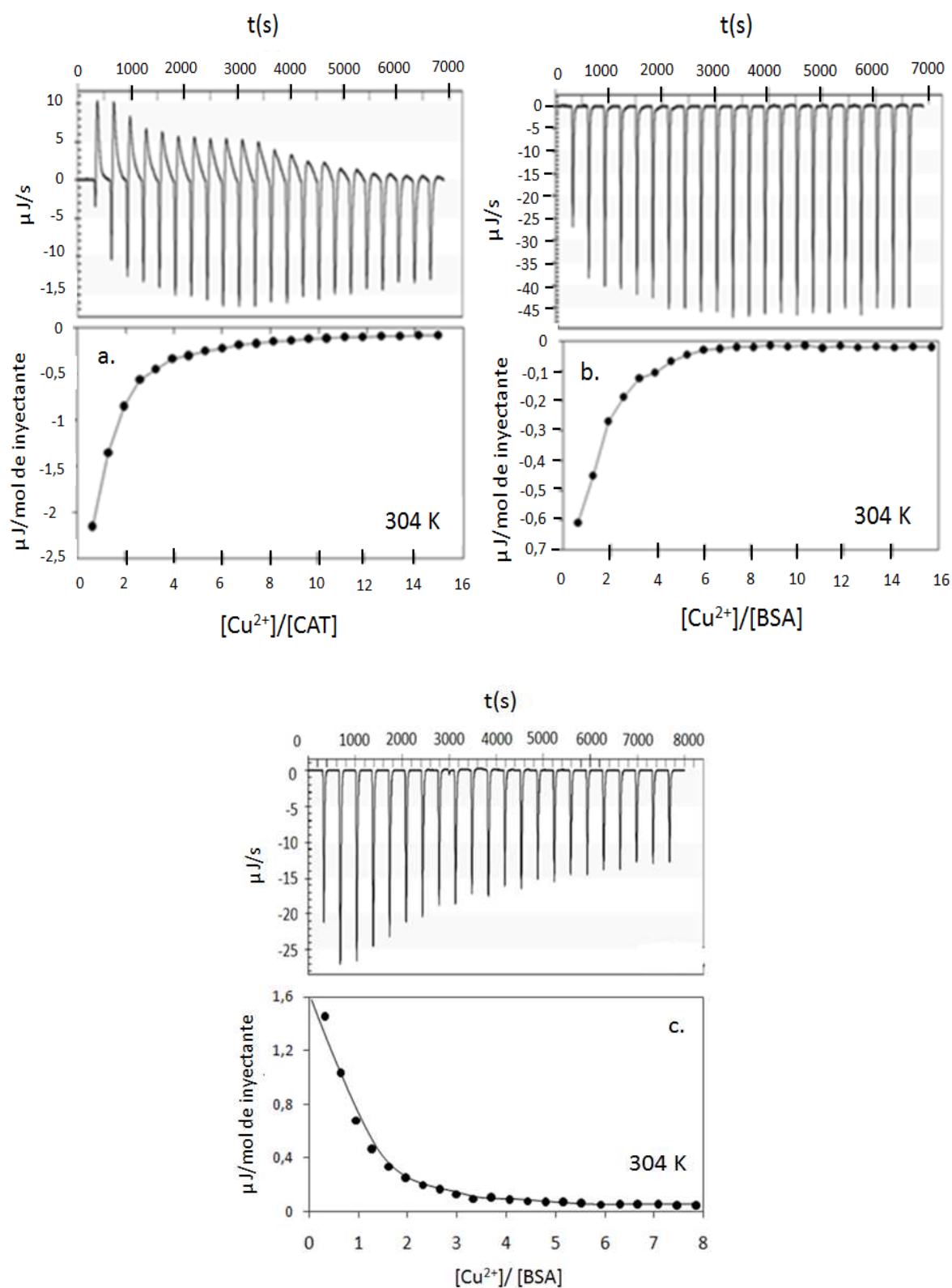


Figura 5-69. Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM, pH 4,5 y la con Cu^{2+} en estado libre, a una temperatura de 304 K.

Los valores de los parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas mostrados en las figuras 5-65 a 5-69 se recogen en la tabla 5-32 para la enzima CAT, y 5-33 para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 y 5-34 para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 respectivamente.

Tabla 5-32. Parámetros termodinámicos, obtenidos a partir de las curvas calorimétricas para el enlace de la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 y el Cu^{2+} en estado libre, para las 5 temperaturas estudiadas.

T K	K_b M^{-1}	ΔH kJ/mol	ΔS kJ/mol K	ΔG kJ/mol	n_b
296	3534,31	-27,88	-0,030	-20,11	5,65
298	4129,01	-24,35	-0,012	-20,63	3,47
300	9227,72	-22,70	0,007	-22,92	4,47
302	17797,75	-20,96	0,011	-24,57	4,65
304	30013,63	-14,19	0,030	-26,06	5,22

Tabla. 5-33. Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas para el enlace de la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 y el Cu^{2+} en estado libre, para las 5 temperaturas estudiadas.

T K	K_b M^{-1}	ΔH kJ/mol	ΔS kJ/mol K	ΔG kJ/mol	n_b
296	2030,87	-24,99	-0,021	-18,73	
298	4764,77	-21,92	-0,003	-20,97	3
300	6215,82	-18,55	0,010	-21,77	
302	7484,30	-16,79	0,018	-22,39	
304	8675,91	-12,79	0,033	-22,91	3,5

Tabla. 5-34. Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas para el enlace de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y el Cu^{2+} en estado libre, para las 5 temperaturas estudiadas.

T K	K_b M^{-1}	ΔH kJ/mol	ΔS kJ/mol K	ΔG kJ/mol	n_b
296	1770	73,79	0,31	-18,40	
298	2590	82,94	0,34	-19,47	3
300	3200	114,74	0,45	-20,13	
302	3840	141,65	0,54	-20,72	
304	5960	198,15	0,72	-21,97	2

Con respecto a los valores recogidos en las tablas 5-32, 5-33 y 5-34 se puede concluir que:

En el caso del proceso de enlace para la enzima CAT y la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,4, el comportamiento del sistema es en general endotérmico, sin embargo al hacer la corrección del calor de dilución con tampón PBS pH 7,4 ambos sistemas se tornan exotérmicos, debido al que el calor generado entre el tampón y el Cu^{2+} en estado libre es mayor que el generado entre las biomoléculas y el Cu^{2+} .

De esta forma estos dos sistemas son energéticamente favorables. Sin embargo el comportamiento del sistema BSA- Cu^{2+} en solución fosfato es predominantemente endotérmico y al hacer la corrección del calor de dilución sigue comportándose de forma endotérmica, debido a que el calor generado entre la solución fosfato a pH 4,5 y el Cu^{2+} es prácticamente inexistente. Por lo tanto éste sistema sería energéticamente desfavorable dado el carácter ácido del tampón y el catión.

Con respecto a la constante de enlace en los tres sistemas estudiados K_b aumenta con el incremento de la temperatura como se puede observar en la figura 5-70 que se muestra a continuación:

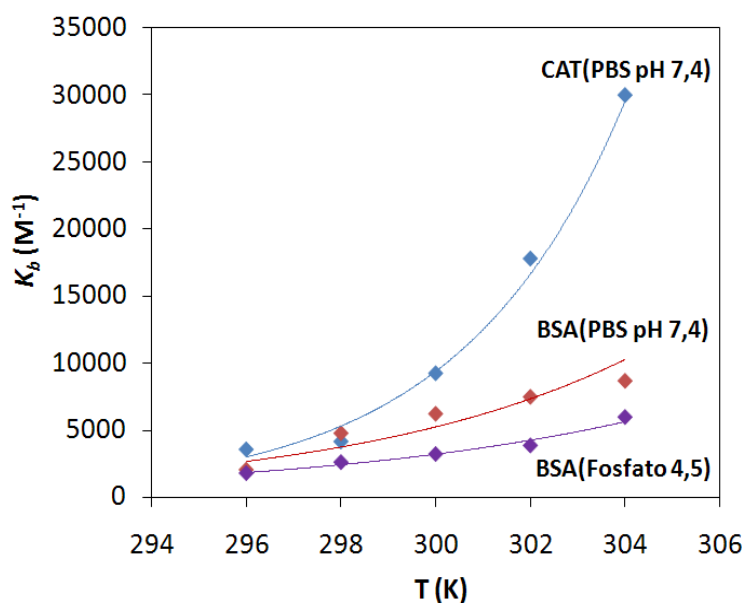


Figura 5-70. Comparación de la constante de enlace K_b para los sistemas CAT- Cu^{2+} y BSA- Cu^{2+} para las cinco temperaturas estudiadas.

De acuerdo a la figura 5-70, la constante de enlace K_b en primer lugar presenta una tendencia de tipo exponencial para los tres sistemas estudiados.

Para la enzima CAT, K_b es mayor con respecto a los valores obtenidos para la proteína BSA, presentando en las dos últimas temperaturas estudiadas (302 y 304 K) un aumento considerable de K_b con respecto a la primera temperatura.

Éste comportamiento puede ser debido a que la temperatura de máxima actividad de la catalasa es 310K (Çorman *et al*; 2010), siendo esta temperatura en muchos casos la temperatura optima de trabajo. De tal forma que a medida que se aproxima a esta temperatura, la enzima CAT podría tener una mayor actividad favoreciendo el proceso de enlace con el ion Cu^{2+} .

Asimismo se puede observar que K_b para la proteína BSA disuelta en tampón PBS es mayor que K_b para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, lo cual puede ser debido a que al estar la proteína en su punto isoeléctrico, la carga de la misma haga que el enlace sea débil, aunque la tendencia en ambos casos sea aumentar con el incremento de la temperatura.

En los tres casos puede decirse que el comportamiento de K_b sugiere la generación de enlaces de coordinación de tipo débil e interacciones electrostáticas ya que $K_b < 10^6 M^{-1}$ en todos los casos.

Asimismo puede decirse que de acuerdo a los valores obtenidos de la energía libre de Gibbs, los enlaces para los tres sistemas estudiados son espontáneos, siendo más espontáneo con el aumento de la temperatura, favoreciéndose la unión y por tanto generando un aumento en la constante de enlace K_b (Ross and Subramanian, 1981).

En la figura 5-71 se muestra comparativamente el comportamiento de ΔG para los tres sistemas estudiados.

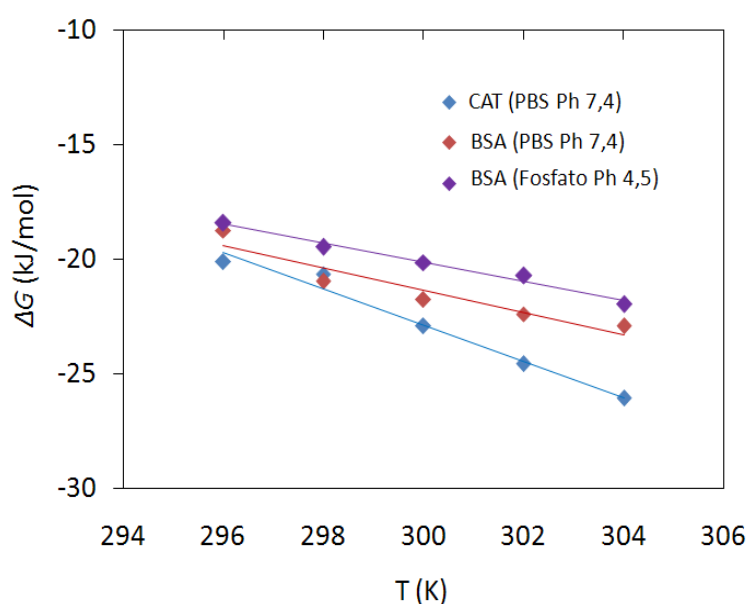


Figura 5-71. Comparación de la energía libre de Gibbs ΔG para los sistemas CAT- Cu^{2+} y BSA- Cu^{2+} para las cinco temperaturas estudiadas.

De acuerdo a la tendencia de ΔG mostrada en la figura 5-71, se puede observar por un lado que el enlace es más espontáneo para el sistema formado por la enzima CAT- Cu^{2+} . Aunque el comportamiento del sistema BSA- Cu^{2+} en solución fosfato es predominantemente endotérmico, el enlace es espontáneo, ya que la constante de enlace aumenta con la temperatura.

Con respecto a los valores obtenidos de entalpía (ΔH) se puede decir que el enlace de la enzima CAT y la proteína BSA con el Cu^{2+} en tampón PBS pH 7,4 a las cinco temperaturas estudiadas es energéticamente favorable, ya que presentan un comportamiento predominantemente exotérmico, mientras que para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 el proceso de enlace no sería

energéticamente favorable ya que el comportamiento en todas las temperaturas estudiadas es endotérmico.

En los tres sistemas estudiados, la entropía es el parámetro fundamental del sistema, ya que ΔS aumenta con la temperatura. En el sistema formado por BSA-Cu²⁺ en solución fosfato pH 4,5, es más notorio éste comportamiento, debido a que los valores son mayores.

Por lo tanto en dicho sistema se estarían generando cambios conformacionales en la estructura de la proteína con el aumento de la temperatura (Shahabadi and Maghsudi, 2009; Lin *et al*; 2002) y por ello el cambio en la entropía es más evidente.

Un aumento en la entropía, se genera principalmente por un proceso de deshidratación, esta observación implica que cuando la temperatura aumenta la polaridad de la solución se reduce, así como la estabilidad de la estructura de la proteína, lo cual conlleva a un aumento de la exposición de residuos hidrofóbicos (Roselin *et al*; 2010).

Como consecuencia de la deshidratación (Arnold, 1991) aumenta el desorden molecular, aumentando la entropía, lo cual motiva que las interacciones de las moléculas en solución acuosa sean energéticamente favorables.

De esta forma para el caso de BSA-Cu²⁺ en solución fosfato pH 4,5 aunque la entalpía sea positiva, se puede observar que la constante de enlace K_b incrementa su valor ligeramente con la temperatura.

Adicionalmente, los parámetros termodinámicos recogidos en la tabla 5-31, 5-32 y 5-33 para los tres sistemas estudiados, muestran una relación lineal dentro del intervalo de temperatura estudiado entre ΔH y $T\Delta S$ (figura 5-72 a, b y c).

Así, el sistema formado por la enzima CAT-Cu²⁺ muestra una pendiente de 0,71. Estos resultados indican que se cumple la segunda ley de la termodinámica para éste sistema debido a que $\Delta S > 0$ a partir de la temperatura de 300K. Por otra parte $\Delta G < 0$ y $\Delta H < 0$ en todas las temperaturas estudiadas.

Para el sistema BSA-Cu²⁺ en tampón PBS pH 7,4 se muestra una pendiente de 0,76. Estos resultados indican que también se cumple la segunda ley de la

termodinámica para éste sistema debido a que $\Delta S > 0$ a partir de la temperatura de 300K, siendo $\Delta G < 0$ y $\Delta H < 0$ en todas las temperaturas estudiadas.

Finalmente, para el sistema BSA-Cu²⁺ en solución fosfato pH 4,5 se muestra un pendiente de 0,97. Estos resultados indican que se cumple la segunda ley de la termodinámica para éste sistema debido a que $\Delta S > 0$ y, $\Delta G < 0$, aunque $\Delta H > 0$. Por lo tanto aunque el comportamiento es endotérmico, también es espontaneo.

La figura 5-72 a, b y c, recoge gráficamente lo anteriormente descrito:

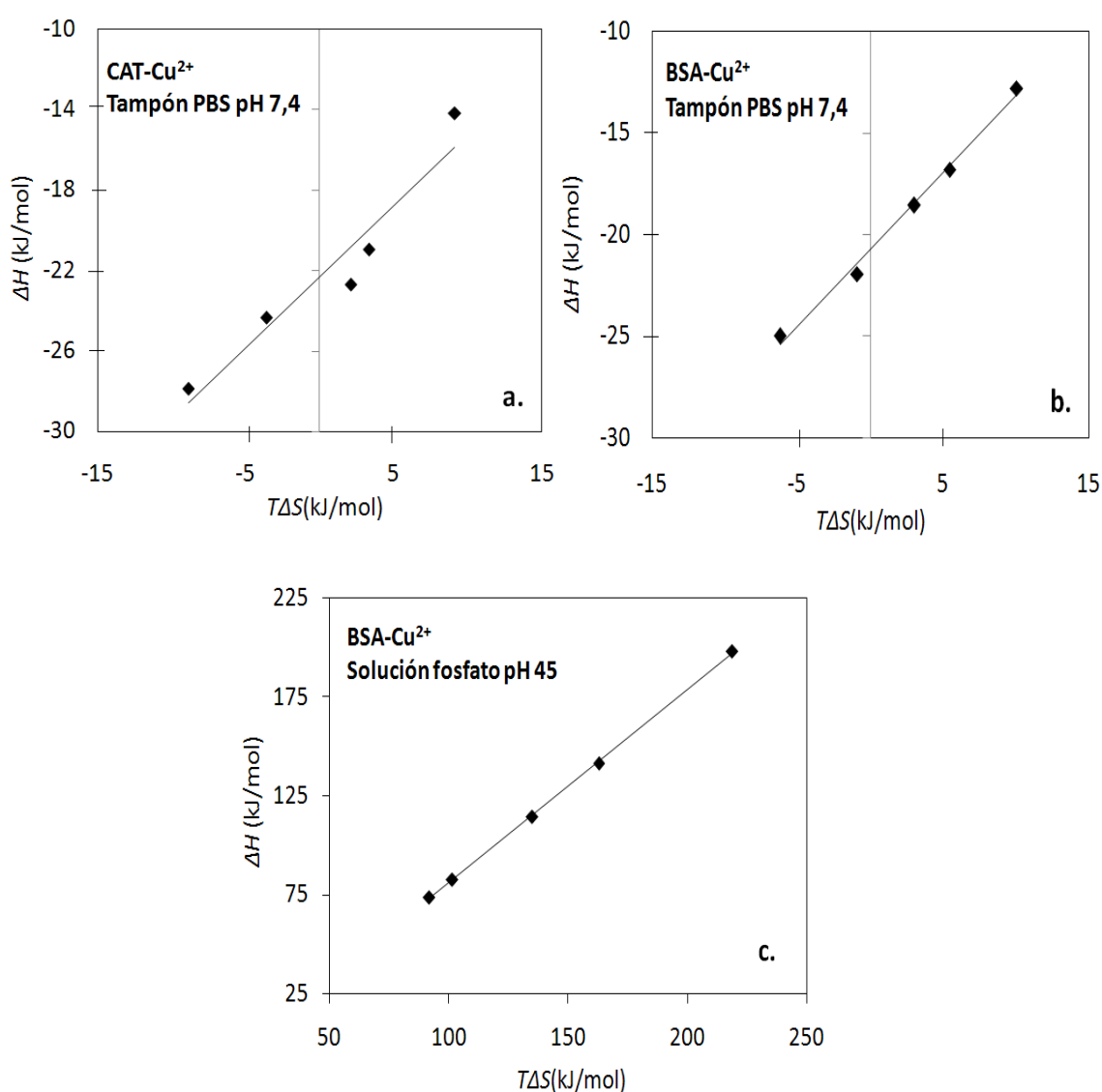


Figura 5-72. Compensación de entalpia-entropía del enlace de a) la enzima CAT-Cu²⁺ en tampón PBS pH 7,4, b) proteína BSA-Cu²⁺ en tampón PBS pH 7,4 y c) la proteína BSA-Cu²⁺ en solución fosfato pH 4,5, para las 5 temperaturas estudiadas.

El cambio en la capacidad calorífica ΔC_p es obtenida a partir de la pendiente de la relación lineal entre ΔH vs T (Wiseman, 1989; Ladbury, 2004). De esta forma, la regresión lineal de la relación ΔH vs T para los tres sistemas estudiados se muestra en la figura 5-73 a, b y c respectivamente.

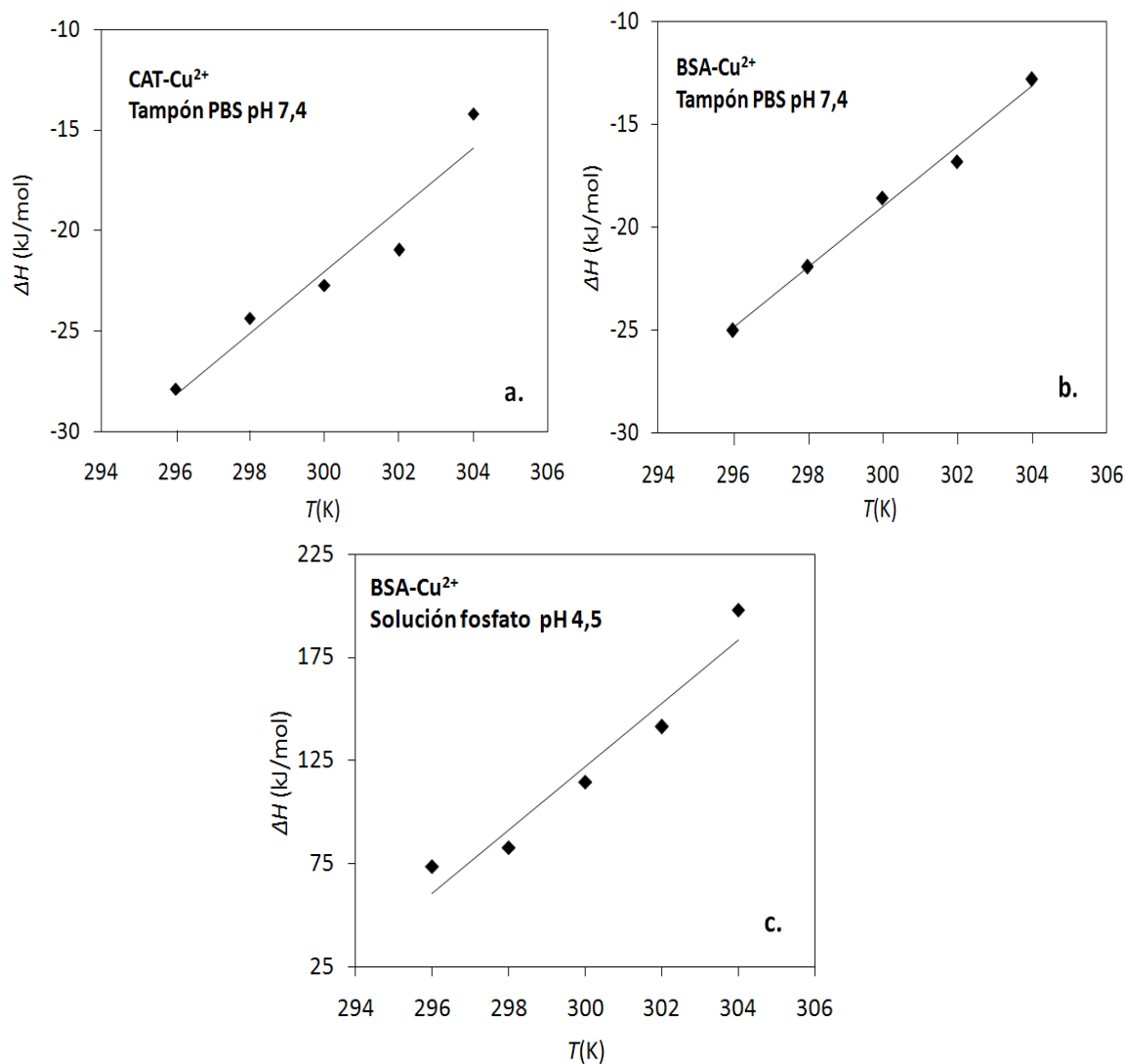


Figura 5-73. Dependencia de la temperatura en el enlace de a) la enzima CAT-Cu²⁺ en tampón PBS pH 7,4 b) la proteína BSA-Cu²⁺ en tampón PBS pH 7,4 y c) la proteína BSA-Cu²⁺ en solución fosfato pH 4,5 con respecto a la entalpía ΔH para las cinco temperaturas estudiadas.

El resultado obtenido para la enzima CAT representa un cambio positivo en la capacidad calorífica cuyo valor es de 1,54 kJ/mol K, asimismo el resultado

obtenido para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 representa también un cambio positivo en la capacidad calorífica cuyo valor es 1,48 kJ/mol K y finalmente para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 presenta un cambio positivo de 15,37 kJ/mol K.

Los valores positivos y altos de capacidad calorífica conlleva a un aumento de la exposición de residuos hidrofóbicos, tendencia que corresponde con los valores obtenidos de entropía para el enlace BSA-Cu²⁺.

También, al ser menor el cambio de ΔC_p para la enzima CAT, y la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,4, indica que el complejo CAT-Cu²⁺ tiene menos energía que la enzima CAT y el Cu²⁺ por separado, por lo que termodinámicamente el enlace es más estable que el formado por la proteína BSA y el Cu²⁺ y por tanto la reacción es energéticamente más favorable que en el caso de la proteína BSA.

Se puede observar que la estequiometría de la reacción disminuye con el aumento de la temperatura, lo cual podría significar que el complejo proteína-ligando presenta una mayor estabilidad cuando la relación estequiométrica es más baja, por lo que el calor liberado es mayor al aumentar la temperatura, lo cual se puede observar experimentalmente. Algunos estudios han demostrado que la constante de enlace K_b disminuye al aumentar la estequiometría de la reacción n_b (Henzler *et al*; 2008; Kumar *et al*; 1999).

En general se puede decir, que el comportamiento del proceso de enlace para el sistema formado por la enzima CAT-Cu²⁺ es más favorable con respecto al sistema formado por la proteína BSA-Cu²⁺ en iguales condiciones de presión y temperatura. Estos resultados como se mencionó anteriormente, eran de esperarse debido a la afinidad que presentan las metalo-enzimas por los iones metálicos.

5.4.2. Estudios de nano-calorimetría Isotérmica para las biomoléculas con el ligando (Cu^{2+}) inmovilizado

5.4.2.1. Estudio calorimétrico BSA-agarosa-IDA- Cu^{2+} y CAT-agarosa-IDA- Cu^{2+}

Con el fin de determinar si existía alguna diferencia en el enlace de las dos biomoléculas estudiadas (CAT y BSA) con el ligando en estado libre e inmovilizado, se procedió a llevar a cabo experimentos el ITC, inmovilizando el Cu^{2+} de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 4.5.2.1 del capítulo de materiales y métodos.

Por tanto, se llevó a cabo un estudio nano-calorimétrico para el enlace de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y tampón PBS pH 7,4 y el Cu^{2+} inmovilizado es un adsorbente de sefarosa, y la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 y el Cu^{2+} inmovilizado igualmente, con el fin de comparar su comportamiento.

La unión de la proteína BSA y la enzima CAT con el Cu^{2+} inmovilizado se estudió en las mismas temperaturas que con el Cu^{2+} en estado libre es decir 296, 298, 300, 302 y 304 K, con el fin de poder comparar los resultados en las mismas condiciones de presión y temperatura.

De tal forma, que los experimentos para caracterizar el enlace molecular de la proteína BSA y la enzima CAT con el Cu^{2+} inmovilizado a las cinco temperaturas anteriormente mencionadas, se llevaron a cabo de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 4.5.2 (BSA) y 4.5.4 (CAT) del capítulo de materiales y métodos.

Los perfiles de unión obtenidos mediante la técnica ITC para proteína BSA y la enzima CAT con el Cu^{2+} en estado libre, para las diferentes temperaturas estudiadas se muestran de forma comparativa en las figuras en la figura 5-74 a la 5-78, de tal forma que cada pico en las isotermas de unión representan una única inyección de la biomolécula en el ligando suspendido en solución fosfato pH 4,5.

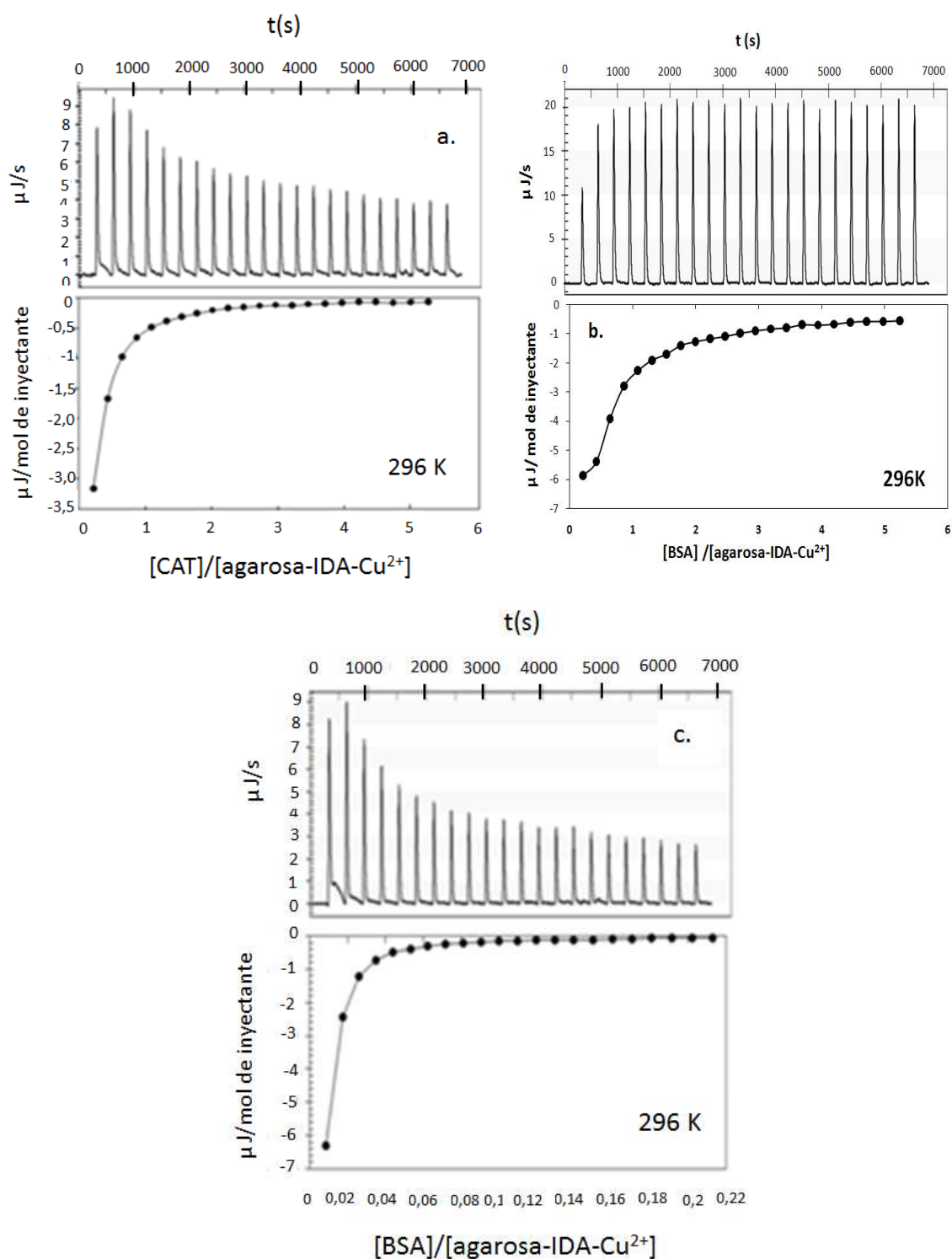


Figura 5-74. Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4. b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM pH 4,5 y el Cu^{2+} inmovilizado, a una temperatura de 296 K.

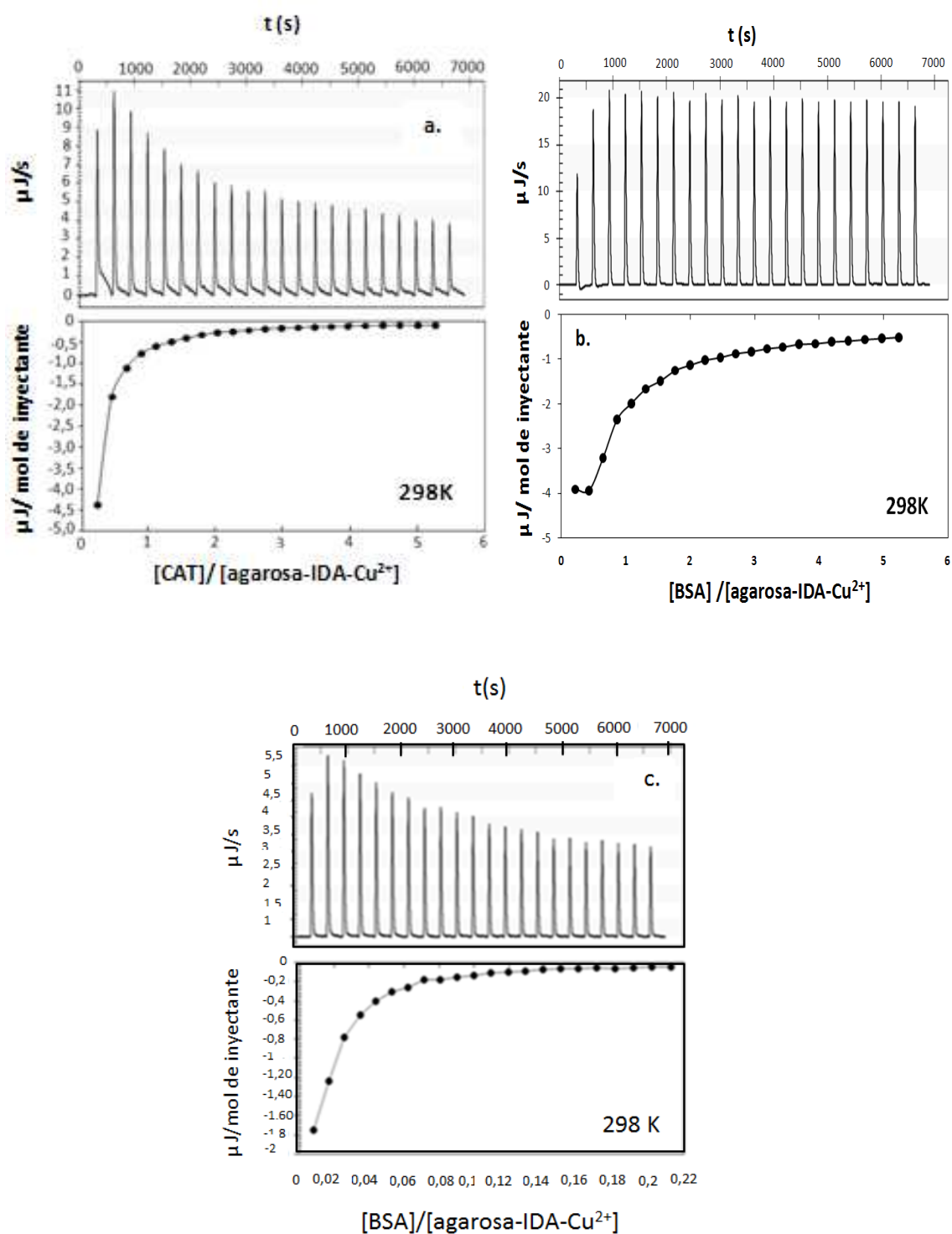


Figura 5-75. Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4. b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM pH 4,5 y el Cu^{2+} inmovilizado, a una temperatura de 298 K.

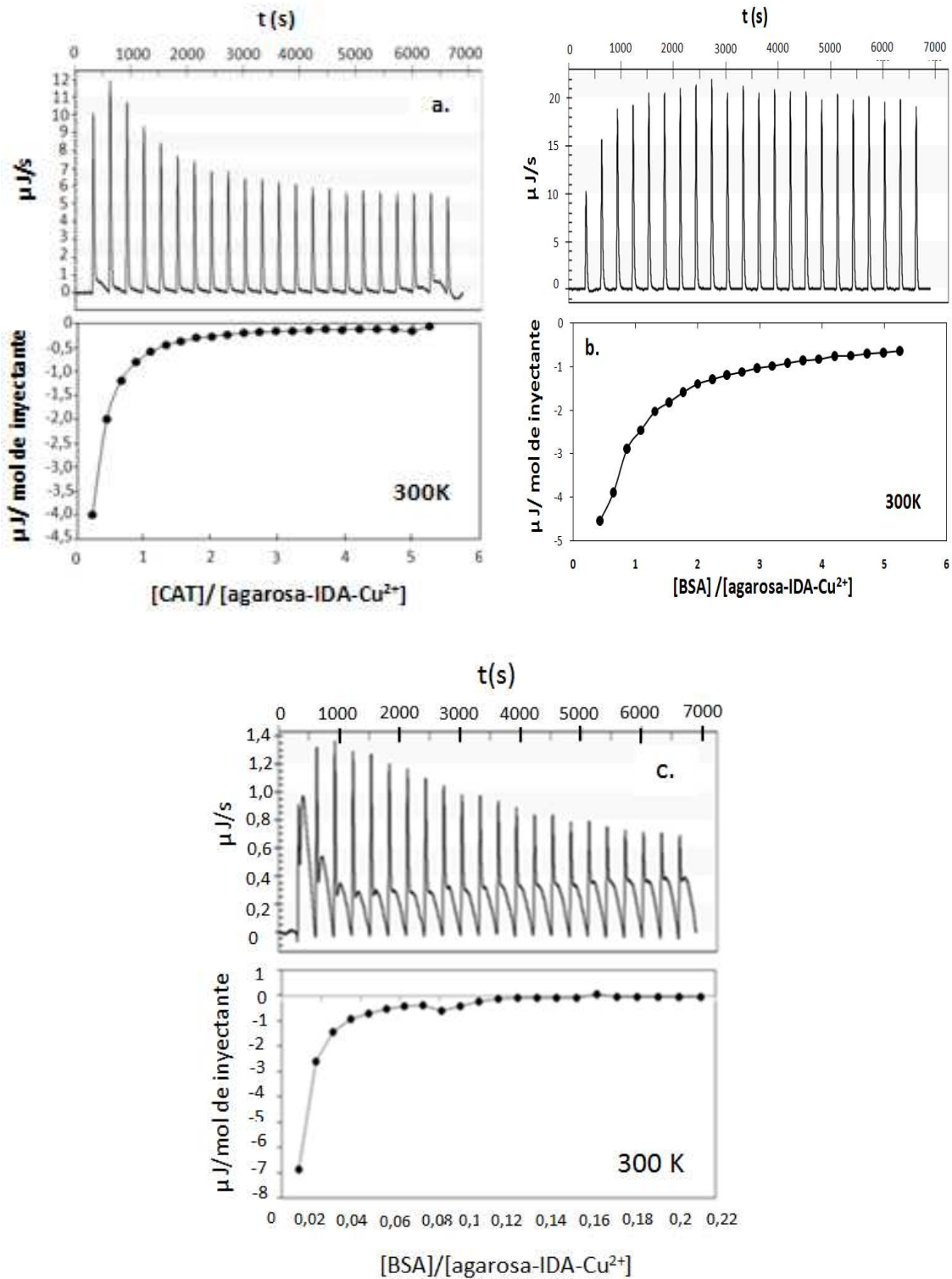


Figura 5-76. Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4. b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM pH 4,5 y el Cu^{2+} inmovilizado, a una temperatura de 300 K.

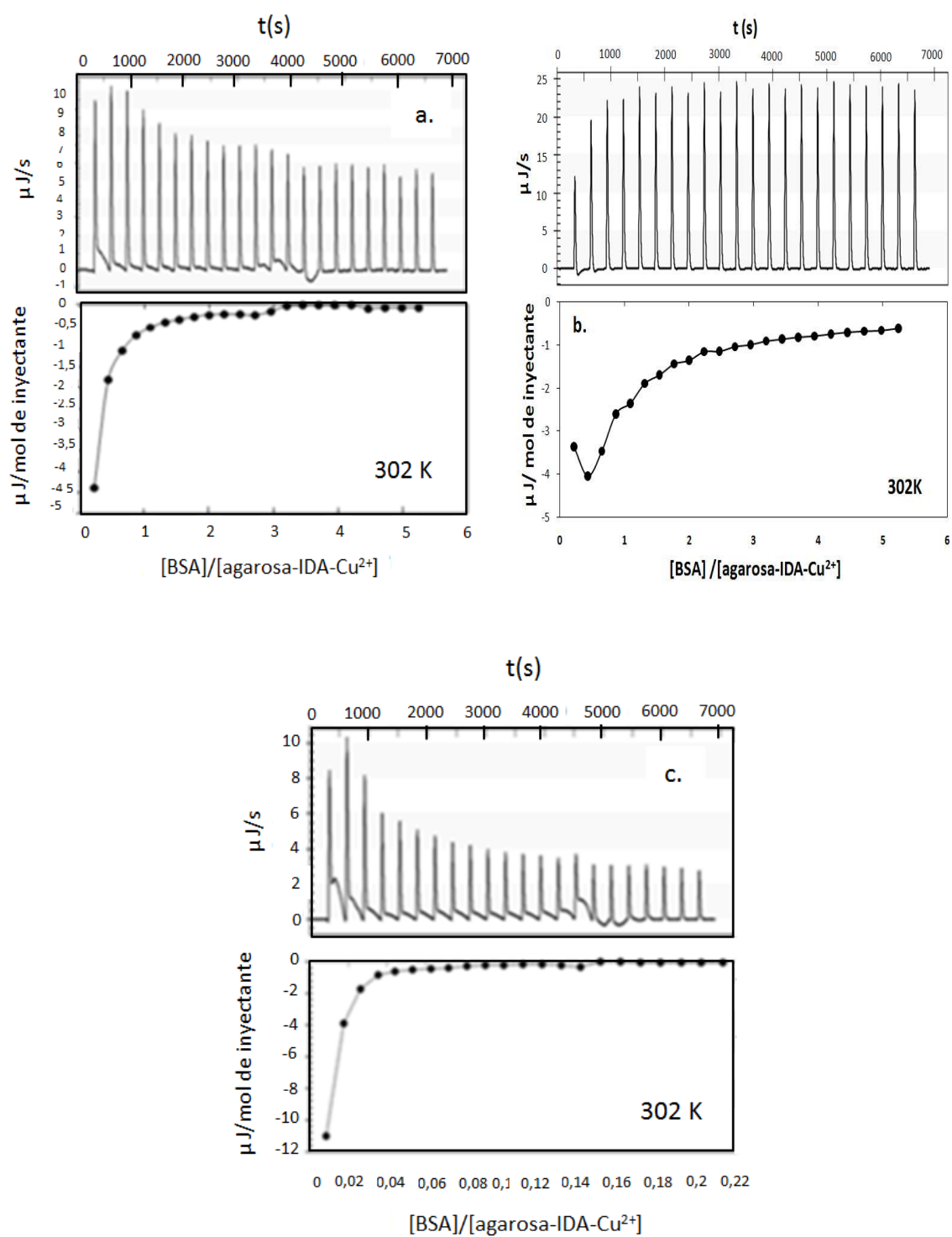


Figura 5-77. Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4. b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM pH 4,5 y el Cu²⁺ inmobilizado, a una temperatura de 302 K.

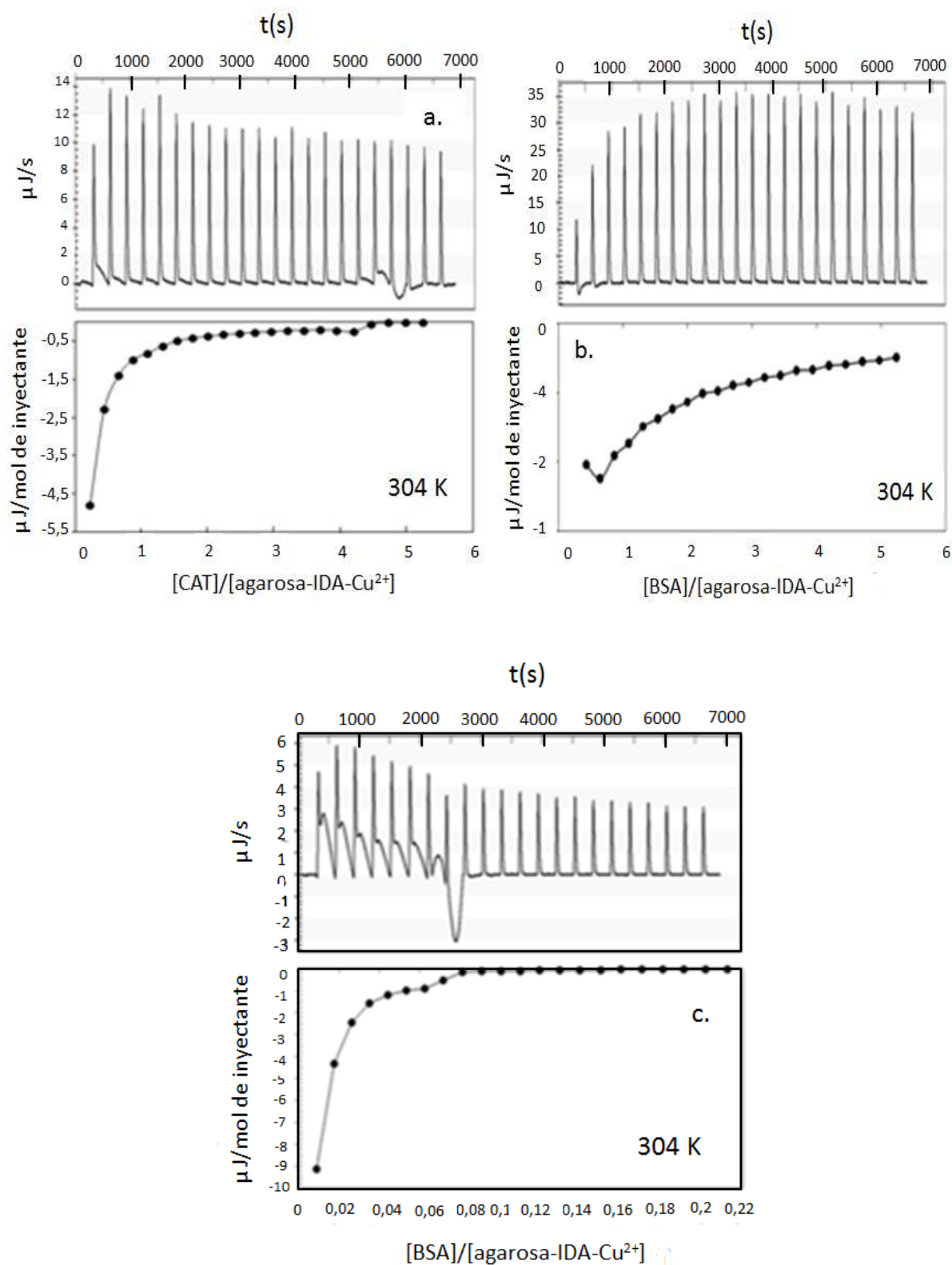


Figura 5-78. Curvas calorimétricas para la unión de a) enzima CAT en tampón PBS pH 7,4. b) proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y c) proteína BSA en solución fosfato 50 mM pH 4,5 y el Cu^{2+} inmobilizado, a una temperatura de 304 K.

Los valores de los parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas que se muestran en las de la figura 5-74 a la 5-78 se recogen en la tabla 5-35 para la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, tabla 5-36 para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 y finalmente la tabla 5-37 para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 respectivamente.

Tabla. 5-35. Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas para el enlace de la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4 y el Cu^{2+} inmovilizado, para las 5 temperaturas estudiadas.

T K	K_b M^{-1}	ΔH kJ/mol	ΔS kJ/mol K	ΔG kJ/mol	n_b
296	43820	-30,52	-0,014	-26,30	1,76
298	60602	-50,09	-0,076	-27,28	1,63
300	72565	-62,39	-0,115	-27,92	0,96
302	149706	-132,28	-0,336	-29,92	1,51
304	214000	-165,90	-0,443	-31,02	1,20

Tabla. 5-36. Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas para el enlace de la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 y el Cu^{2+} inmovilizado, para las 5 temperaturas estudiadas.

T K	K_b M^{-1}	ΔH kJ/mol	ΔS kJ/mol K	ΔG kJ/mol	n_b
296	44839,99	-40,54	-0,047	-26,35	2,85
298	54445,06	-67,15	-0,13	-27,00	1,32
300	71519,05	-72,37	-0,15	-27,97	1,99
302	105727,68	-120,05	-0,30	-29,03	2,10
304	149018,84	-127,05	-0,32	-30,09	2,63

Tabla. 5-37. Parámetros termodinámicos obtenidos a partir de las curvas calorimétricas para el enlace de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y el Cu^{2+} inmovilizado, para las 5 temperaturas estudiadas.

T	K_b	ΔH	ΔS	ΔG	n_b
K	M^{-1}	kJ/mol	kJ/mol K	kJ/mol	
296	73300	-55,98	-0,09	-27,55	0,028
298	43700	-73,19	-0,16	-26,46	0,089
300	32700	-119,80	-0,31	-25,92	0,050
302	16300	-160,22	-0,45	-24,34	0,040
304	13900	-199,99	-0,58	-24,01	0,040

Con respecto a los valores recogidos en las tablas 5-35, 5-36 y 5-37 indican que:

En el caso de los tres sistemas estudiados, el comportamiento es exotérmico, de esta forma dichos sistemas son energéticamente favorables.

Con respecto a la constante de enlace K_b se puede decir que para los experimentos llevados a cabo en tampón PBS pH 7,4, tanto para la enzima CAT como para la proteína BSA, presenta una tendencia de tipo exponencial, donde aumenta K_b , con el aumento de la temperatura. Sin embargo para los experimentos de enlace para la proteína BSA, en solución fosfato pH 4,5, se puede observar que K_b disminuye con el aumento de la temperatura, como se puede observar en la figura 5-79 que se muestra a continuación:

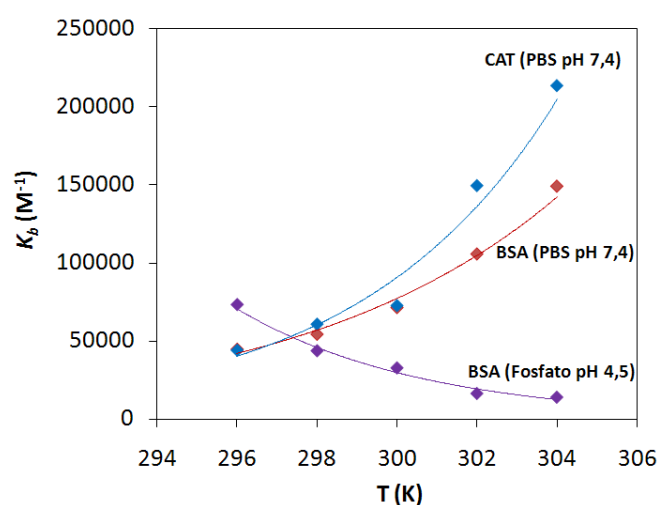


Figura 5-79. Comparación de la constante de enlace K_b para los sistemas agarosa-IDA- Cu^{2+} -CAT y agarosa-IDA- Cu^{2+} -BSA para las cinco temperaturas estudiadas.

K_b para la enzima CAT es mayor con respecto a los valores obtenidos para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, y esta diferencia se hace más notoria sobre todo a las temperaturas de 302 y 304 K. Este comportamiento es análogo al obtenido para los experimentos llevados a cabo con el Cu^{2+} en estado libre y como se mencionó anteriormente, este comportamiento puede ser debido a que la temperatura óptima de máxima actividad de la catalasa es 310 K.

Los valores de K_b para el Cu^{2+} inmovilizado para los tres sistemas estudiados, son en general mayores que los obtenidos para el Cu^{2+} en estado libre. Sin embargo siguen siendo uniones de tipo débil ($K_b < 10^6 \text{ M}^{-1}$).

Estos resultados ponen de manifiesto, que la enzima CAT presenta una afinidad superior a la proteína BSA, en las mismas condiciones de temperatura, presión y tampón.

Por otro lado, los valores obtenidos de la energía libre de Gibbs, indican que en general para los tres sistemas estudiados, el proceso de enlace es espontáneo.

Así, para los experimentos llevados a cabo en tampón PBS pH 7,4, tanto para la enzima CAT como para la proteína BSA, se puede observar que el enlace es más espontáneo con el aumento de la temperatura, siendo ligeramente mayor para la enzima CAT.

Con respecto a la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, a medida que aumenta la temperatura la reacción es menos espontánea, influyendo en la fuerza de enlace, dando como consecuencia una disminución de K_b con el incremento de la temperatura respectivamente.

En la figura 5-80, se observa gráficamente el comportamiento de la energía libre de Gibbs para los tres sistemas estudiados.

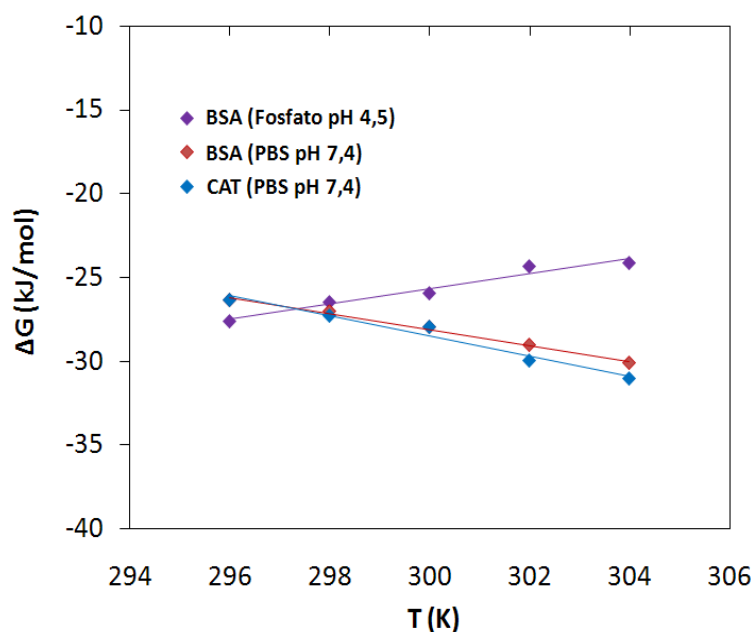


Figura 5-80. Comparación de la energía libre de Gibbs (ΔG) para los sistemas agarosa-IDA- Cu^{2+} -CAT, y agarosa-IDA- Cu^{2+} -BSA, para las cinco temperaturas estudiadas.

A partir de los valores obtenidos de ΔH , se puede indicar que el proceso de enlace para la enzima CAT y la proteína BSA con el Cu^{2+} inmovilizado, para las cinco temperaturas estudiadas es en general energéticamente favorable, ya que los valores corresponden a un comportamiento predominantemente exotérmico.

De acuerdo a los valores obtenidos de K_b , se puede deducir que en estos procesos prevalecen enlaces de tipo electrostático y enlaces de coordinación, además de obtener valores acordes con los indicado anteriormente puesto que para valores de $K_b > 10^6 \text{ M}^{-1}$, prevalecen enlaces de tipo puente de hidrógeno, Van der Waals, etc. (Henzler *et al*; 2008).

Los valores obtenidos de la entropía (ΔS) para los tres sistemas estudiados, indican que dichos sistemas están gobernados por la entalpía, ya que la entropía es negativa y disminuye con el aumento de la temperatura.

Adicionalmente, los parámetros termodinámicos recogidos en las tablas 5-34, 5-35 y 5-36 para los tres sistemas estudiados muestran una relación de tendencia lineal entre ΔH y $T\Delta S$, como se muestra en la figura 5-81 respectivamente.

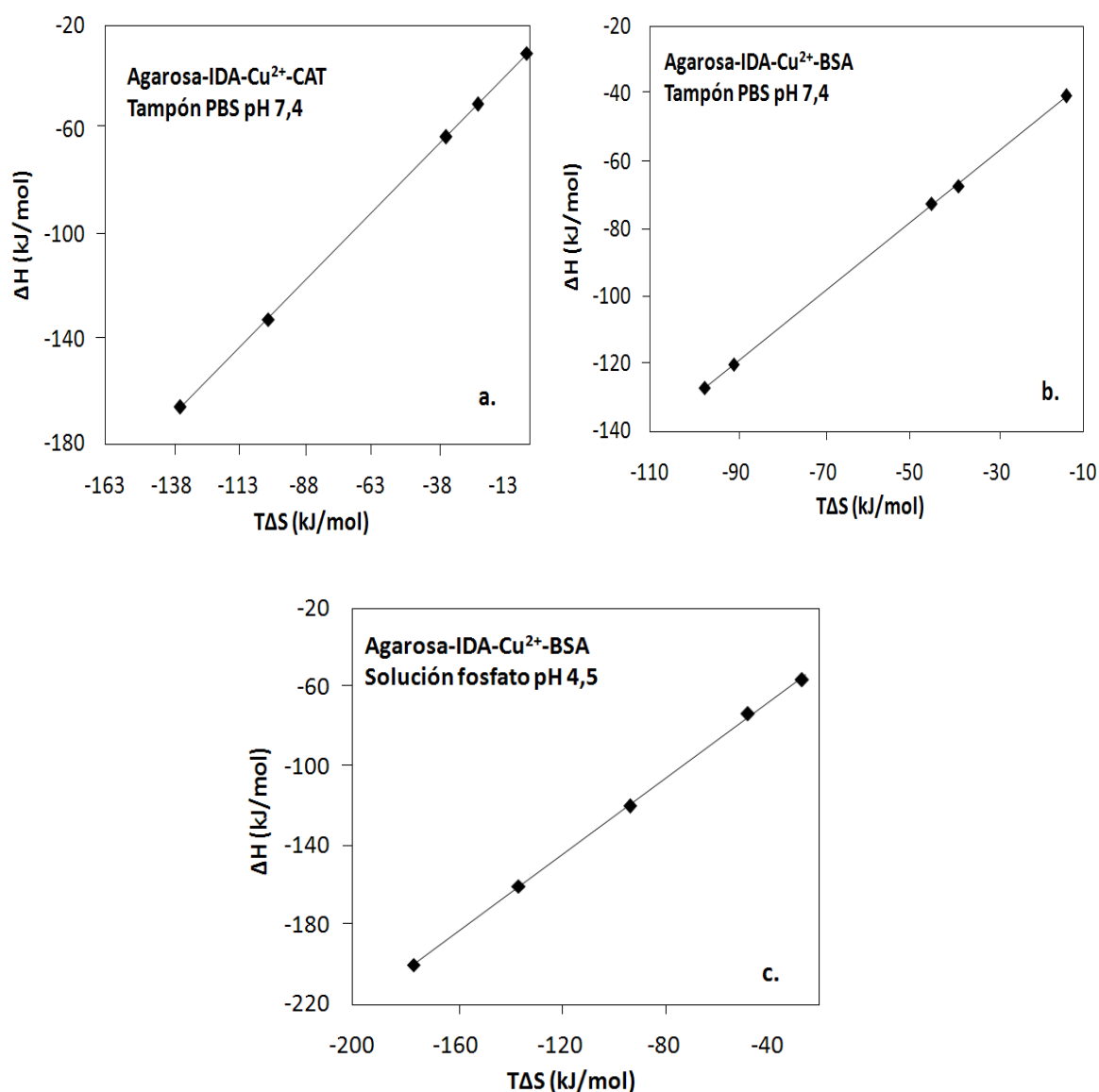


Figura 5-81. Compensación de la entalpía-entropía del enlace de a) agarosa-IDA- Cu^{2+} -CAT en tampón PBS pH 7,4, b) agarosa-IDA- Cu^{2+} -BSA en tampón PBS pH 7,4 y c) agarosa-IDA- Cu^{2+} -BSA en solución fosfato pH 4,5, para las cinco temperaturas estudiadas.

El sistema formado por la enzima CAT y el Cu^{2+} inmovilizado, muestra una pendiente de 1,04 y un coeficiente de correlación de 0,99. Este comportamiento indica que se cumple la segunda ley de la termodinámica para este sistema debido a que ΔH , $\Delta G < 0$ en todas las temperaturas estudiadas, y la tendencia de ΔS es disminuir aunque sus valores sean negativos.

Para el sistema formado por la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 y el Cu^{2+} inmovilizado, se muestra una pendiente de 1,03 y un coeficiente de correlación de 0,99. Este comportamiento es prácticamente igual que el obtenido para la enzima CAT en las mismas condiciones de temperatura, presión y tampón. Así, de igual forma que cumple la segunda ley de la termodinámica ya que ΔH , $\Delta G < 0$ en todas las temperaturas estudiadas, y la tendencia de ΔS es disminuir aunque sus valores sean negativos.

Finalmente, para el sistema formado por la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y el Cu^{2+} inmovilizado, se muestra una pendiente de 0,97 y un coeficiente de correlación de 0,99. Y de igual forma que en los dos casos anteriores, se cumple la segunda ley de la termodinámica, ya que ΔH , $\Delta G < 0$ y la tendencia de ΔS es disminuir aunque sus valores sean negativos.

El cambio en la capacidad calorífica ΔC_p es obtenida a partir de la pendiente de la relación lineal entre ΔH y T (Wiseman, 1989; Ladbury, 2004). De esta forma, la regresión lineal de la relación ΔH vs T para los tres sistemas estudiados se muestran en la figura 5-82 a, b y c respectivamente.

El resultado para la enzima CAT representa un cambio negativo en la capacidad calorífica cuyo valor es -17,64 kJ/mol K, asimismo el resultado obtenido para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4 representa también un cambio negativo con un valor de -11,29 kJ/mol K y finalmente para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 también se obtuvo un cambio en la capacidad calorífica, cuyo valor corresponde a -18,75 kJ/mol K.

Estos resultados corroboran que para los tres sistemas estudiados, el proceso de enlace es predominantemente exotérmico, y el desprendimiento de calor de la reacción es del mismo orden de magnitud tanto para la enzima CAT como para la proteína BSA.

Adicionalmente, al comparar los valores de ΔC_p de la enzima CAT y la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, en las mismas condiciones de presión y temperatura se puede observar que la enzima CAT ha liberado más calor que la proteína BSA, siendo esto energéticamente más favorable para el sistema de enlace.

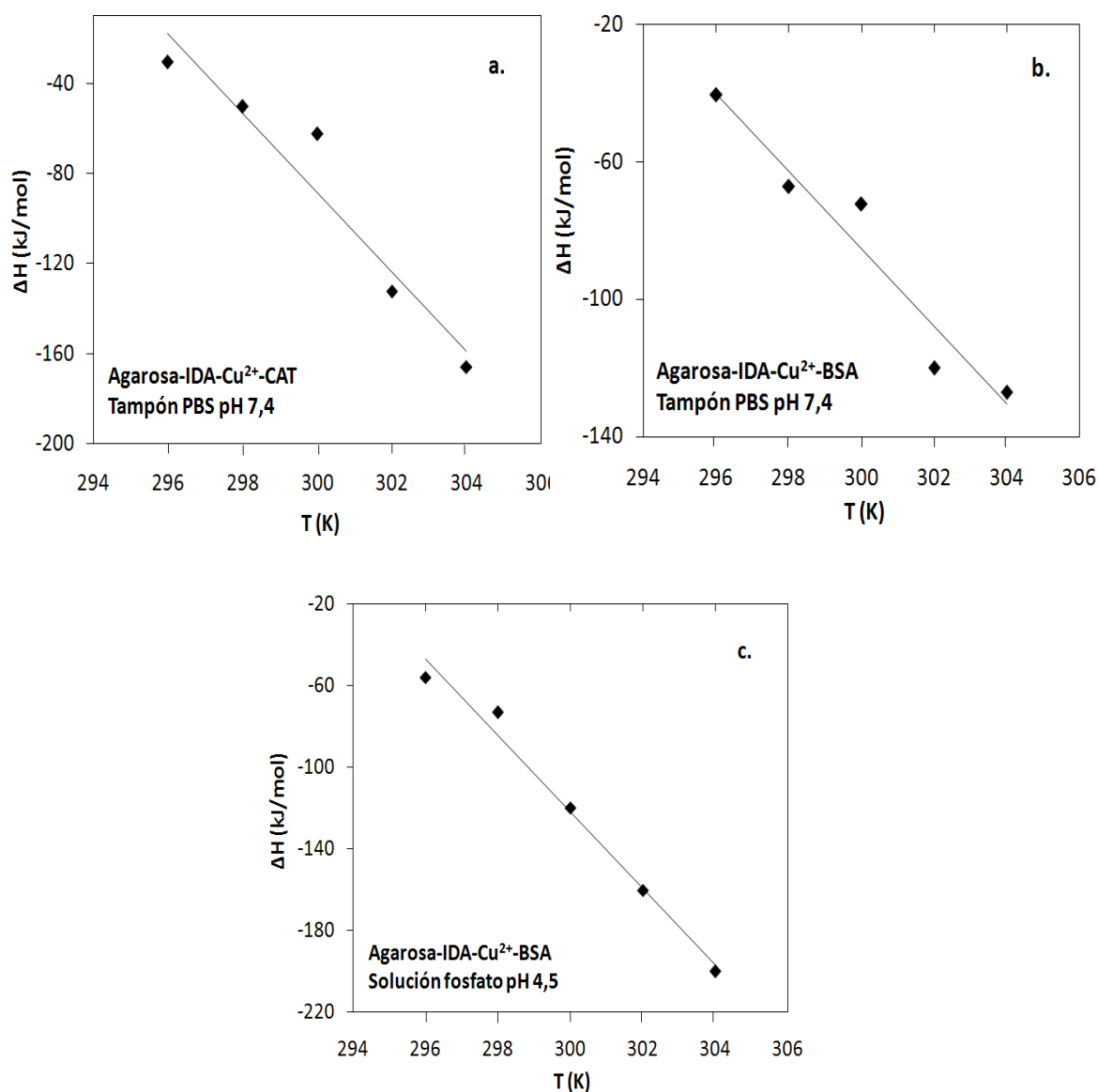


Figura 5-82. Dependencia de la temperatura en el enlace de a) agarosa-IDA-Cu²⁺-CAT en tampón PBS pH 7,4, b) agarosa-IDA-Cu²⁺-BSA en tampón PBS pH 7,4 y c) agarosa-IDA-Cu²⁺-BSA en solución fosfato pH 4,5 con respecto a la entalpía ΔH , para las cinco temperaturas estudiadas.

Por otro lado se puede observar, que la estequiometría de la reacción presenta una tendencia prácticamente constante con el aumento de la temperatura, en los tres sistemas estudiados. No obstante para el sistema agarosa-IDA-Cu²⁺-BSA en solución fosfato pH 4,5 la estequiometría es menor con respecto a los estudios realizados para las dos biomoléculas en tampón PBS pH 4,5. Sin embargo cabe mencionar que las relaciones molares de proteína y ligando utilizadas en estos

experimentos son diferentes a las empleadas para los dos sistemas restantes, es por ello que la estequiometría es más bajo.

Así, para los experimentos llevados a cabo en tampón PBS pH 7,4 la estequiometría para la enzima CAT es ligeramente menor con respecto a la proteína BSA en las mismas condiciones de presión, temperatura y pH. Por tanto una relación estequiometría más baja podría proporcionar más estabilidad en el complejo enzima-ligando, traduciéndose en una constante de enlace más alta, como en este caso.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en general se puede concluir que para el proceso de enlace de la enzima CAT con el Cu^{2+} , se obtiene un enlace más estable cuando el ligando se encuentra inmovilizado y es termodinámicamente más estable con el aumento de la temperatura. Es posible que al disminuir los grados de libertad cuando se inmoviliza el ligando, éste estuviera de forma más accesible a la enzima, debido a que la entropía del sistema es menor, y por tanto no existe un excesivo desorden en las moléculas de ligando, lo cual facilita el proceso de enlace con la enzima.

Asimismo, el sistema que presenta mayor afinidad al ligando utilizado en esta investigación, en las condiciones propuestas, es la enzima CAT, por un lado porque la reacción es más espontánea, energéticamente es más favorable y la constantes de enlace en función de la temperatura son mayores, con respecto a la proteína BSA.

De esta forma finaliza el capítulo correspondiente al análisis e interpretación de los resultados experimentales, obtenidos en el presente trabajo de investigación.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con lo realizado en el presente trabajo se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- La utilización de monolitos cerámicos como fase estacionaria en cromatografía IMAC, muestra una pérdida de presión baja con respecto a las columnas convencionales.

Para realizar la adsorción se recubrió el monolito cerámico con un adsorbente de epoxi-agarosa microporoso con el fin de garantizar que el proceso de adsorción se llevase a cabo en la superficie del adsorbente, manteniendo su geometría y de esta forma mejorar el transporte de materia.

- Se estudió la eficiencia de la adsorción y de la reutilización de la columna (en ciclo cerrado) para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 a cinco caudales (1,50 á 14,00 cm³/min) y en tampón fosfato pH 7,0 a un caudal de 14,0 cm³/min, y se determinó el número de ciclos y las condiciones de operación óptimas de la misma. Se comprobó que al eluir la proteína BSA (a pH 4,5 y 7,0) con imidazol en tampón PBS pH 7,4 a un caudal de 1,50 cm³/min por medio de la elución biospecífica invertida, se podía recuperar en torno al 95% de la proteína enlazada específicamente.

Del estudio de eficiencia se pudo concluir que utilizando el mismo caudal, el tiempo necesario para alcanzar la saturación (equilibrio) era prácticamente el mismo en todos los ciclos de adsorción (n_1 á n_5). Sin embargo, al aumentar el caudal el tiempo necesario para alcanzar la saturación fue menor. Adicionalmente al aumentar el caudal, la capacidad de adsorción de la columna monolítica también aumentó. Por esta razón se concluyo que para el proceso de adsorción de la proteína BSA, el caudal de 14,0 cm³/min era el más óptimo, para las condiciones de trabajo propuestas y que el número de ciclos óptimo de reutilización de la columna monolítica es de tres reusos, aunque la columna puede ser utilizada fuera de este óptimo hasta 10 veces.

- A medida que se reutiliza el monolito cerámico, la capacidad de adsorción decreció debido al ensuciamiento, fuere cual fuese el caudal utilizado en el intervalo seleccionado ($n_1 > n_2 > n_3 > n_4 > n_5$), implicando que el área real disponible de adsorción es un factor relevante en el proceso de adsorción, el cual condiciona la capacidad de adsorción de la columna monolítica.
- Se pone de manifiesto que independientemente del pH utilizado, a un caudal de $14 \text{ cm}^3/\text{min}$, el tiempo necesario para que el proceso de adsorción de la proteína BSA alcance el equilibrio es prácticamente el mismo. Asimismo, al aumentar el pH de la solución de proteína, la capacidad de adsorción de la columna monolítica aumentó ligeramente.
- Se propuso un modelo de eficiencia que permitió obtener la cantidad de proteína adsorbida por unidad de superficie de la columna monolítica cuando esta estaba saturada. Con dicho modelo se predijo la concentración de proteína que existía en la disolución una vez alcanzada la saturación con un error $\pm 5\%$ con respecto del valor obtenido experimentalmente.
- Se desarrollo un modelo de transferencia de materia en la superficie del adsorbente utilizando la plataforma MATLAB, el cual ajusta el coeficiente de dispersión y la constante cinética de adsorción. Con dicho modelo predijeron cuervas de equilibrio teóricas las cuales fueron comparadas con las obtenidas de forma experimental, así como la concentración de proteína en equilibrio con un error inferior al 3,2%.
- La constante cinética de adsorción fue obtenida para los cinco caudales estudiados en solución fosfato pH 4,5, así como en tampón fosfato pH 7,0 a un caudal de $14,0 \text{ cm}^3/\text{min}$. Se comprobó que la velocidad aumenta de forma exponencial a medida que aumenta el caudal, y que al caudal de $14,0 \text{ cm}^3/\text{min}$ los valores de dicha constante para la proteína en solución fosfato pH 4,5 y tampón fosfato pH 7,0 son similares. Este comportamiento pondría indicar que el pH no afecta la constante de adsorción y que la estereoquímica del quelato IDA-Cu²⁺ puede verse favorecida con un aumento del caudal, así como el desbloqueo de canales obstruidos con agarosa, que a bajos caudales estarían inoperantes.
- El coeficiente de dispersión evidencia que la transferencia de materia mejora a medida que aumenta el caudal, y que empeora con el número de reutilizaciones

de la columna monolítica, debido al ensuciamiento de la misma. Este comportamiento es análogo al obtenido para constante cinética de adsorción, ya que a mayor caudal dicho parámetro aumenta. Este hecho corrobora que el caudal que presentó mejores resultados de adsorción (más cantidad de proteína adsorbida y menos tiempo para alcanzar el equilibrio) fue el de $14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$.

- También se llevaron a cabo experimentos de adsorción de la enzima CAT en un monolito cerámico recubierto de adsorbente de epoxi-agarosa microporosa. Dichos experimentos se llevaron a cabo únicamente al caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ y en tampón PBS pH 7,4 debido a que a caudales más altos se formaban micelas que enmascaraban los valores de la concentración de enzima adsorbida.
- El tiempo necesario para alcanzar la saturación (equilibrio) fue de 2 horas aproximadamente, menos de la mitad del tiempo requerido para que la proteína BSA alcanzara el equilibrio al mismo caudal (5,6 horas). El tiempo necesario para que el sistema alcanzara el equilibrio fue prácticamente el mismo en todas las reutilizaciones (n_1 a n_5), comportamiento análogo al obtenido para la proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.
- La capacidad de adsorción de la enzima CAT en la columna monolítica disminuye ligeramente con el número de reutilizaciones.
- Se comprobó que al eluir la enzima CAT con tiocianato de sodio en tampón PBS pH 7,4 a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ por medio de elución bioespecífica normal, se recuperó en torno al 95% de la enzima enlazada. También se comprobó que la enzima pierde aproximadamente el 20% de su actividad después del proceso de elución.
- Del modelo de eficiencia utilizado se obtuvo la cantidad de proteína real adsorbida por unidad de superficie de columna monolítica, siendo este valor inferior al obtenido para la proteína BSA a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$. También fue posible predecir con un error inferior al 3% la concentración de proteína en el equilibrio de forma teórica y extrapolarla de igual forma para más ciclos de reutilización donde se comprobó que al igual que la proteína BSA, por encima de 10 ciclos la columna monolítica no sería capaz de adsorber más proteína.

A diferencia de la proteína BSA, para la enzima CAT no habría necesidad de interrumpir la adsorción antes de que el proceso alcance el equilibrio, para obtener una cantidad máxima de separación de enzima y la columna podría ser utilizada durante 4 ciclos más de adsorción antes de ser regenerada ó cambiada.

- Por medio del modelo de transferencia de materia, se obtuvieron de forma teórica las curvas de equilibrio a partir de los valores experimentales, así como la concentración de enzima en equilibrio con un error inferior al 1%.
- La constante cinética de adsorción obtenida para la enzima CAT a un caudal de $1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, es mayor con respecto a la obtenida para la proteína BSA al mismo caudal. Lo cual es consecuente si se tiene en cuenta que la enzima CAT necesita menos tiempo para alcanzar el equilibrio (2 horas) que la proteína BSA (5,6 horas).
- El valor del coeficiente de dispersión obtenido para la enzima CAT es mayor que para la proteína BSA al mismo caudal. Éste comportamiento podría indicar que el hecho de que la enzima CAT sea una metalo-enzima que presenta mayor afinidad por los iones metálicos, afecta de manera positiva la transferencia de materia, para el sistema IMAC propuesto en esta investigación.
- Del estudio de separación de una mezcla de biomoléculas (BSA + CAT), se pudo concluir que utilizando un mismo caudal, el proceso de adsorción es reproducible ya que las curvas de equilibrio obtenidas son prácticamente iguales a las obtenidas para los estudios de adsorción llevados a cabo para dichas biomoléculas de forma independiente.

Asimismo el comportamiento del proceso de elución es prácticamente igual al llevado a cabo para eluir la proteína BSA y la enzima CAT de forma individual, es decir, con imidazol y tiocianato respectivamente, conservando los porcentajes de recuperación de biomolécula enlazada específicamente en torno al 95%.

- Los parámetros de transferencia de materia son reproducibles para las dos biomoléculas separadas en conjunto (coeficiente de dispersión y constante cinética de adsorción), con respecto a los estudios llevados para la enzima CAT y la proteína BSA de forma independiente.

Por lo tanto en general estos resultados suponen que las dos biomoléculas no compiten entre sí por los sitios de unión y ponen de manifiesto que la enzima CAT presenta mayor afinidad por columna monolítica que la proteína BSA.

- Por medio de los estudios calorimétricos llevados a cabo a 5 temperaturas (296 á 302 K) utilizando la técnica de nano-calorimetría isotérmica ITC, para el proceso de enlace de la proteína BSA y la enzima CAT con el Cu^{2+} tanto en estado libre como inmovilizado en un adsorbente activado de igual forma que los experimentos llevados a cabo en la columna monolítica se concluyo, que para las condiciones de proceso seleccionadas en este trabajo, la enzima CAT presenta mayor afinidad por el Cu^{2+} , tanto en estado libre como inmovilizado, con respecto a la proteína BSA.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aki, H; Yamamoto, H.M. (1989). Thermodynamics of the binding of phenothiazines to human plasma, human serum albumin and alpha 1-acid glucoprotein calorimetric study. *Journal of pharmacy and pharmacology*, **41**, 674-679.
- Alberty, R.A. (1953). Electrochemical properties of the protein and aminoacids, in "the proteins". H. Neurath and K. Bailey, eds, Vol. 1 461-458. Academic Press, New York.
- Allaker-Chase, H. (1984). Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. *Journal of Chromatography*, **297**, 179-202.
- Amnstrong, S.H; Jr. Budka, M.J.E; Morrison, K.C; Hasson, M. (1947). Preparation and properties of serum and plasma proteins XII. The refractive properties of human plasma and certain purified fractions. *Journal of the American chemical Society*, **69**, 1747-1753.
- Anderegg, J.W; Beeman, W.W; Shulma, S; Karsberf, P. (1955). An investigation of the size, shape and hydration of serum albumin by small-angle X-ray scattering. *Journal of the American chemical Society*, **77**, 2927-2937.
- Anderson, L; Porath, J. (1986). Isolation of Phosphoproteins by Immobilized Metal (Fe^{3+}) Affinity Chromatography. *Analytical Biochemistry*, **154**, 250-254.
- Anspach, F. B. (1994). Silica-based metal chelate affinity sorbents. Preparation and characterization of iminodiacetic acid affinity sorbents prepared via different immobilization techniques. *Journal of Chromatography, A* **672**, 35-49.
- Argöl, S; Denizl, A. (2004). Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in Catalase adsorption. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, **28**, 7-14.
- Arica, M.Y; Denzl, A; Salih, B; Piskin, E; asirci, V. (1997). Catalase adsorption onto Cibacron Blue F3GA and Fe (III)-derivatized

poly(hidroxyethyl mehacrylate) membranes and application to a continuous system. *Journal of membranes Science*, **129**, 65-76.

- Armisén, P; Mateo, C; Cortés, E; Barredo, J.L; Salto, F; Diez, B; Rodés, L; García, J.L.; Fernández-Lafuente, R; Guisan, J.M. (1999). Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acyase on tailor-made metal chelate supports. *Journal of Chromatography A*, **848**, 61-70.
- Arnold, F.H. (1991). Metal-affinity separations – A new dimension in protein processing. *Journal of Biotechnology*, **9**, 151-156.
- Arnott, S; Scott, E. (1972). Accurate x-ray diffraction analysis of fibrous polysaccharides containing pyranose rings. Part I. *Journal of chemical society, Perkin transactions*, **11**, 324-335.
- Arvidsson, P; Plieva, F.M; Lozing, V.I; Galaev, I.Y; Mattiason, B. (2003). Direct chromatography capture of enzyme from crude homogenate using immobilization metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. *Journal of chromatography A*, **986**, 275-290.
- Barisani, D; Wessling-Resnick, M. (1996). Fe-nitrilotriacetic acid binding proteins associated with rat liver plasma membrane. *Hepatology*, **24**, 934-938.
- Bayramoglu, G; Arica, M.Y. (2010). Reversible immobilization of catalase on fibrous polymer grafted and metal chelated chitosan membrane. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, **62**, 297-304.
- Beers, R.F; Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The journal of biological chemistry*, **195**, 133-140.
- Belenkii, B.G; Podkladenko, A.M; Kurenbin, O.L; Mal'tsev, V.G; Nasledov, D.G; Trushin, S.A. (1993). Liquid chromatography of proteins with respect to membrane chromatography. *Journal of chromatography A*, **645**, 1-15.
- Belenkii, B.G. (2005). Monolithic Stationary Phases: Yesterday, Today, and Tomorrow. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **32**, No. 4, 323-332.

-
- Belew, M; Tung Yip, T; Andersson, L; Ehrnström, R. (1987). High-Performance Analytical Applications of Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Analytical Biochemistry*, **164**, 457-465.
 - Berna, P.P; Mrabet, N.T; Van Beeumen, J; Devreese, B; Porath, J; Vijayalakshmi, M.A. (1997). Residue accessibility, hydrogen bonding, and molecular recognition: metal-chelate probing of active site histidines in chymotrypsins. *Biochemistry*, **36**, 6896-6905.
 - Bird, R.B; Stewart, E; Lightfoot, E.N. (1962). Transport Fenomena. *John Wiley & Sons, Inc, 2 Ed.*
 - Borrebaeck, C.A.K; Lönnerdal, B; Etzler, M.E. (1981). Metal chelate affinity chromatography of the dolichos biflorus seed lectin and its subunits. *FEBS Letters*, **130**, 194-196.
 - Campbell, A.G; Ray, D.S. (1993). Functional complementation of an Escherichia coli ribonuclease H mutation by a cloned genomic fragment from the trypanosomatid Crithidia fasciculata. *Proceeding of the national academy of sciences*, **90**, 9350-9354.
 - Camperi, S.A; Grasselli, M; Smolko, E.E; Cascone, O. (2004). Preparation and characterisation of immobilised metal ion hollow-fibre polysulphone membranes. Their application in high-speed pectic enzyme fractionation. *Process Biochemistry*, **39**, 1017-1024.
 - Carter, D.C; Ho, J.X. (1994). Structure of serum albumin, *Advances in protein chemistry*, **45**, 153-203.
 - Çetinus, S.A; Sahin, E; Saraydin, D. (2009). Preparation of Cu (II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization. *Food Chemistry*, **114**, 962-969.
 - Chaga, G.S; Ersson, B; Porath; J.O. (1996) Isolation of calcium-binding proteins on selective adsorbents. Application to purification of bovine calmodulin. *Journal of chromatography A*, **732**, 261-269.
 - Chaga, G. (2001). Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *Journal of biochemical and biophysical methods*, **49**, 313-334.

-
- Chelikani, P; Fita, I; Loewen, P.C. (2004). Review Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and molecular life sciences*, **61**, 192-208.
 - Chen, W.Y; Wu, C.F; Liu, C.C. (1996). Interactions of imidazoleand proteins with immobilized Cu(II) ions: Effects of structure,salt concentrations and pH in affinity and bindingcapacity. *Journal of colloid and interface science*, **180**, 135-143.
 - Chen, W.Y.; Lee, J.F; Wu, C.F. (1997).Microcalorimetric studies ofthe interactions of lysozyme with immobilized Cu (II):Effects of pH value and salt concentration. *Journal of colloid and interface science*, **190**, 49-54.
 - Clarwood, P.A. (1961). Ultracentrifugal studies of rat, rabbit, and guinea-pigg serum albumins. *Biochemistry Journal*, **78**, 163-172.
 - Cooper, A. (1999). Thermodynamics analysis of biomolecular interactions. *Current opinion in chemical biology*, **3**, 557-563.
 - Cooper, A; Johnson, C.M.; Lakey, J.H; Nüllman, A. (2001). Heat does not come in different colours: entropy-enthalpycompensation, free energy windows, quantumconfinement, pressure perturbation calorimetry, salvation and multiple causes of heat capacity effects in biomolecularinteractions. *Biophysical Chemistry*, **93**, 215-230.
 - Çorman, E.M; Öztürk, N; Tüzman, N; Akgöl, S; Denizl, A. (2010). Magnetic polymeric nanospheres as an immobilization metal affinity chromatography IMAC support for Catalase. *Biochemical Engineering Journal*, **49**, 159-164.
 - Creeth, J.M. (1952). The use of the gonydifusimeter with dilute protein solutions. An assessment of the accuracy of the method. *Biochemical Journal*, **56**, 10-17.
 - Davankov, V.A; Semechkin, A.V. (1977) Ligand-exchange chromatography. *Journal of Chromatography*, **141**, 313-53.

-
- Dean, P.D.G. (1983). Affinity chromatography in biotechnology- not just a pious thought?. *Biotechnology Focus*, **2**, 80-83.
 - Doolittle, R.F. (1987). The evolution of the vertebrate plasma proteins, *The Biological bulletin*, **172**, 269-283.
 - Eeltink, S; Decrop, W.M.C; Rozing, G.P; Schoenmakers, P.J; Kok, W.T. (2004). Comparison of the efficiency of microparticulate and monolithic capillary columns. *Journal of separation science*, **27**, 1431-1440.
 - Fanou-Ayi, L; Vijayalakshmi, M. 1983. Metal-chelate affinity chromatography as a separation tool. *Annals of the New York academy of sciences*, **413**, 300-306.
 - Feldman, P.A; Bradburg, P.J; Williams, I.D; Sims, G.E; Pinnel, J.W. (1996). Large-scale preparation and biochemical characterization of a new high purity factor IX concentrate prepared by metal chelate affinity chromatography. *Blood coagulation & fibrinolysis*, **5**, 939-948.
 - Fita, I; Rossman M.G. (1985). The NADPH site on liver Catalase. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, **82**, 1604-1608.
 - Foster, J.F. (1977). Plasma album. In "The plasma protein". F.W. Putnam, ed, Vol I, Academic Press, New York, 179-239.
 - Gaberc-Porekar, V; Menart, V. Review: Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. (2001). *Journal of Biochemical and biophysical methods*, **49**, 335-360.
 - Gacén, J; Gacén, I. (1996). Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles. *Boletín Intexter (U.P.C)*, **110**, 67-71.
 - Gaetani, G; Ferraris, A; Rolfo, M; Mangerini, R; Arena, S; Kirkman, H. (1996). Predominant role of catalase in the disposal oh hydrogen peroxide within erythrocytes. *Blood Journal*, **87**, 1595-1599.
 - García-Payoa, M.C; Ampuerob; Liub, J.S; Marisonb, I.W; Von Stockar, U. (2002). The development and characterization of a high resolution bio-reaction calorimeter for weakly exothermic cultures. *Thermochimica Acta*, **391**, 29-39.

-
- Garrido, A; Teijon J.M. (2006). Fundamentos de bioquímica estructural. *Ed TEBAR 2da edición*, 80.
 - Geison, M.J; Beaven, G.H. (1977). Physical and binding properties of large fragments of human serum albumin. *Biochemical Journal*, **163**, 477-484.
 - Guiochon, G. (2007). Review: Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1168**, 101-168.
 - Gmeimer, B; Leibl, H; Zerlauth, G; Seelos, C. (1995). Affinity bindings of distinct functional fibronectin domains to immobilized metal chelates. *Archives of biochemistry and biophysics*, **321**, 40-42.
 - Gemeiner, P; Polacovik, M; Mislovicova, D; Stefuca, V. (1998). Cellulose as bio affinity carrier: properties, design and applications. *Journal of chromatography B*, **715**, 245-271.
 - Gennaro, A.R. (2003). Farmacia Remington, 20 Ed. Editorial Medicina Panamericana Buenos Aires.
 - Goodsell & RCSB Protein Data Bank, 2013.
 - Goubran-Botros, H; Nanak, E; Abdul Nour, J; Birkenmeir, G; Vijayalakshmi, MA. (1992). Immobilized metal ion affinity electrophoresis. A study with several model proteins containing histidine. *Journal of chromatography*, **597**, 357-364.
 - Grasselli, M; Navarro Del Cañizo, A.A; Camperi, S.A; Wolman, F.J; Smolko, E.E. (1999). Immobilized metal ion affinity hollow-fibre membranes obtained by the direct grafting technique. *Radiation Physics and Chemistry*, **55**, 203-208
 - Gray, R.G. (1980). Affinity Chromatography. *Analytical Chemistry Journal*, **52**, 9-15.
 - Gutierrez, R; Martín del Valle, E.M; Galan, M. (2007). Immobilized metal-ion affinity Chromatography: *Status and Trends. Sep. Purif. Technol*, **36**, 1, 71.

-
- Hadju, J; Wyss, S.R; Aebi, H. (1977). Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. *European Journal of Biochemistry*, **80**, 199-207.
 - Hahn, R; Tscheliessing, A; Zöchling, A; Jungbauer, A. (2005). Shallow bed adsorption: Theoretical background and applications. *Chemical engineering & technology journal*, **27**, 1241-1251.
 - Hallgren, E. (1999). Prediction of protein retention at gradient elution conditions in ion-exchange chromatography. *Journal of chromatography A*, **852**, 351-359.
 - Hansen, P; Lindeberg, G. (1995). Importance of the α -amino group in the selective purification of synthetic histidine peptides by immobilized metal ion affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, **690**, 155-159.
 - Hansen, P; Andersson, L; Lindeberg, G. (1996). Purification of cysteine-containing peptides via selective binding of the α -amino group to immobilized Cu^{2+} and Ni^{2+} ions. *Journal of Chromatography A*, **723**, 51-59.
 - Harding, S.E; Chowdhry, B.Z. (2001). Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry. A practical approach. Oxford University Press.
 - Havar, E.A; McHale, N.A. (1989). Enhanced peroxidatic activity in specific Catalase isozymes of tobacco, barley and maize. *Plant Physiology*, **91**, 812-815.
 - Heldin, C.H; Westermark, B. (1989). Platelet-derived growth factor: Three isoforms and two receptor types. *Reviews*, **5(4)**, 1-4.
 - Helfferich, F. (1961). Ligand exchange: a novel separation technique. *Nature*, **189**, 1001-1002.
 - Hemdan, E.S; Porath, J. (1985). Development of immobilized metal affinity chromatography: II Interactions of amino acids with immobilized nickel-iminodiacetate. *Journal of chromatography*, **323**, 255-264.

-
- Hemdan, E.S; Zhao, Y.J; Sulkowski, E; Porath, J. (1989). Surface topography histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**, 1811-1815.
 - Henzler, K; Haupt, B; Ballauff, M. (2008). Enzymatic activity of immobilized enzyme determined by isothermal titration calorimetry. *Analytical Biochemistry*, **378**, 184-189.
 - Hermanson, G.T; Mallia, A.K; Smith, P.K. (1992). Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press, INC.
 - Hochuli, E; Döbeli, H; Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of chromatography*, **411**, 177-184.
 - Hochuli, E; Bannwarth, W; Döbeli, H; Gentz, R; Stüber, D. (1988). Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Nature Biotechnology* **6**, 1321-1325.
 - Holdgate, G.A. (2001). Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetic. *Biotechniques*, **30**, 164-184.
 - Holmes, L.D; Martin, R.S. (1997). Immobilized Iron (III) metal affinity chromatography for the separation of phosphorylated macromolecules: Ligand and application. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, **20**, 123-142.
 - Holowachuk, E.W. (1991). C DNA sequence of bovine prealbumin. GeneBank Database Accession No. M73993.
 - Hörlein, D; Gallis, B; Brautigan, D.L; Bornstern, P. (1982). Partial purification and characterization of phosphotyrosyl-protein phosphatase from ehvlich ascites tumor cells. *Biochemistry*, **21**, 5577-5581.
 - Huang, H.M; Lin, F.Y; Chen, W.Y; Ruaan, R.C. (2000). Isothermal titration microcalorimetric studies of the effect of temperature on hydrophobic interaction between proteins and hydrophobic adsorbents. *Journal of colloid and interface science*, **229**, 600-606.

-
- Huang, H.M; Chen, W.Y; Ruaan, R.C. (2003). Microcalorimetric studies of the interactions between designed peptides and hydrophobic adsorbents. *Journal of colloid and interface science*, **26**, 23-28
 - Hubert, P; Porath, J. (1986). Metal chelate affinity chromatography I. Influence of various parameters on the retention of nucleotides and related compounds. *Journal of chromatography*, **198**, 247-255.
 - Hughes, W.L. (1954). The proteins of blood plasma. "In the proteins". A. Hevrat and K. Bailey, cds. Vol IIB, Academic Press New York, 663-674.
 - Hunter, M.J. (1966). A method for the determination of protein partial specific volume. *Journal of physical chemistry*, **70**, 3285-3292.
 - Iwasaki, N; Yamane, S.T; Majima, T; Kasahara, Y. (2004). Feasibility of polysaccharide hybrid materials for scaffolds in cartilage tissue engineering. Evaluation of chondrocyte adhesion to polyon complex fiber prepared from alginate and chitosan. *Bio macromolecules*, **5**, 828-833.
 - Iwata, H; Saito, K; Furusaki, S. (1991). Adsorption characteristics of an immobilized metal affinity membrane. *Biotechnology Progress Journal*, **7**, 412-418.
 - Janatova, J; Fuller, J.K; Hunter, M.J. (1968). The heterogeneity of bovine albumin with respect to sulfhydryl and dimer content. *The Journal of biological chemistry*, **243**, 3612-3622.
 - Jayabharathi, J; Thanikachalam, V; Devi, K.B; Perumal, M.V. (2011). Binding interaction of bioactive imidazole with bovine serum albumin—A mechanistic investigation. *Spectrochimica Acta Part A*, **83**, 587-591.
 - Jayabharathi, J; Thanikachalam; Perumal, M.V. (2012). Studies on interaction between an imidazole derivative and bovine serum by spectral methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **95**, 622-626.
 - Jelesorov, I; Bosshard, H.R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetic of biomolecular recognition. *Journal of molecular recognition*, **12**, 3-18.

-
- Jiang, T; Mallik, R; Hage, D.S. (2005). Affinity monoliths for ultrafast immunoextraction. *Analytical chemistry*, **77**(8), 2363-2372.
 - Jin, J; Song, M; Hourston, D.J. (2004). Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improvised physical properties. *Biomacromolecules*, **5**, 162-168.
 - Josic, D; Buchacher, A; Junbauer, A. (2001). Review Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion. *Journal of Chromatography B*, **752**, 191-205.
 - Josic, D; Clifton, J.G. (2007). Use of monolithic supports in proteomics technology. *Journal of Chromatography A*, **1144**, 2-13.
 - Jungbauer, A; Hahn, R. Monolithics materials, preparation, properties and application. (2002). *Journal of chromatography library, New York*, 561.
 - Jungbauer, A; Hahn, R. (2004). Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their in biotechnology. *Journal of Separation Science*, **27**, 767-778.
 - Jungbauer, A. (2005). Chromatographic media for bio separation. *Journal of chromatography a*, **1065**, 3-12.
 - Kaczmarek, K; Bellot, J. (2003). Effect of particle-size distribution and particle porosity changes on mass transfer kinetics. *Acta chromatography journal*, **12**, 22-37.
 - Kalyanpur, M. (2000). Downstream Processing of Proteins: Methods and Protocols. *Methods in Biotechnology*, **9**, 1-10.
 - Kaminski, W; Modrzejewska, Z. (1997). Application of chitosan membranes in separation of heavy metals ions. *Separation science and technology*, **32**, 2659-2668.
 - Kang, K; Sun, Y. (2007). Structure parallel diffusion model for intraparticle mass transport of proteins to porous adsorbent. *Biochemical engineering journal*, **37**, 298-310.

-
- Kastner, M; Neubert, D. (1991). Isolation of cytochrome P-450 components from marmoset liver microsomes by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, **587**, 43-54.
 - Kastner, M. (1999). Immobilized metal ion affinity, Chapter 6. *Protein liquid chromatography*, 301-383.
 - Kato, Y; Nakamura, K; Hashimoto, T. (1986). High-performance metal chelate affinity chromatography of proteins. *Journal of chromatography A*, **354**, 511-517.
 - Kawamura; Yoshihide, Mitsuhashi, Masaki. (1993). Adsorption of metals ions on polyaminated highly porous chitosan chelating resin. *Industrial & Engineering Chemistry Reserach*, **32**, 386-391.
 - Ke, Y-M; Chen, C-I; Kao, P-M; Chen, H-B; Huang, H-C; Yao, C-J; Liu, Y-C. (2010). Preparation of the immobilized metal affinity membrane with high amount of metal ions and protein adsorption efficiencies. *Process Biochemistry*, **45**, 500-506.
 - Kemp, R.B; Guan, Y. (1997). Heat flux and the calorimetric-respirometric ratio as measures of catabolic flux in mammalian cells. *Thermochimica Acta*, **300**, 199-222.
 - Khalikova, E; Susi, P; Korpela, T. (2005). Microbial Dextran-Hydrolizing enzymes: Fundamental and application. *Microbiology and molecular biology Reviews*, 306-235.
 - Khan, M.Y. (1986). Direct evidence for the involvement of domin III in the N-F transition of bovine serum albumin. *Biochemical Journal*, **236**, 307-310.
 - Khazaeli, M.B. Mitra, R.S. (1981). Cadmium-binding component in escherichia coli during accommodatio to low levels of this ion. *Applied and environmental microbiology*, **41**, 46-50.
 - Kim, K.H; Lee, E.K. (2007). Biothermodynamic analysis of BSA adsorption to alum gel using isothermal titration calorimetry. *Biotechnol Bioprocess Engineering*, **12**, 366-371.

-
- King, T.P; Spencer, E.M. (1970). Structural studies and organic ligand-binding properties of bovine plasma albumin. *The Journal of biological chemistry*, **245**, 6134-6148.
 - King, T.P; Spencer, E.M. (1972). Amino acid sequences of the amino and the carboxyl terminal cyanogens bromide peptides of bovine plasma albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **153**, 627-640.
 - Kolthoff, J.M; Anastasi, ADA; TAN, B. (1958). Reactivity of sulfhydryl and disulfide proteins. II. Reactive disulfide as related to viscosity and optical rotation in denatured bovine serum albumin, *Journal of the American chemical Society*, **80**, 3235-3240.
 - Kruger, N.J. 1996. The Bradford Method for Protein Quantitation. The protein protocols handbook. *Biomedical and life sciences, Part I*, 15-20.
 - Kubin, M; Spacek, P; Chromecek, R. (1967). Gel permeation chromatography on porous polyethylene glycol methacrylate. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **32**, 3884-3888.
 - Kumar, A; Galaex, I.Y; Mattiason, B. Metal chelate affinity precipitation: a new approach to protein purification. *Bioseparation* **7**, 185-194.
 - Kurecki, T; Kress, L.F; Laskowski, M. (1979). Purification of human plasma α -2 macroglobulin and α -1 proteinase inhibitor using zinc chelate chromatography. *Analytical biochemistry*, **99**, 415-420.
 - Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan. Functional biopolymers from marine crustaceans, *Marine Biotechnology*, **8**, 203 -226.
 - Ladbury, J.F. (2001). Isothermal titration calorimetry: application to structure-based drug design. *Termochimica Acta*, **380**, 209-215.
 - Ladbury, J.E. (2004). Application of isothermal titration calorimetry n the biological sciences. Things are heating up! *Biotechniques*, **97(6)**, 885-887.
 - Lárez Velásquez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, **1(2)**, 15-21.

-
- Le Grice, S.F; Grüninger-Leitch. (1990). Rapid purification of homodimer and heterodimer HIV-1 reverse transcriptase by metal chelate affinity chromatography. *European Journal of biochemistry*, **187**, 307-314.
 - Leavitt, S; Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetic by isothermal titration calorimetry. *Current opinion in structural biology*, **11**, 560-566.
 - Lee, J.K; Pierce, M. (1995). Purification and characterization of human serum N-acetylglucosamine phosphodiester α -N-Acetylglucosamidase. *Archives of biochemistry and biophysics*, **319**, 413-425.
 - Lee, D-S; Kim, B-M; Seol, D-W. (2009). Improved purification of recombinant adenoviral vector by metal affinity membrane chromatography. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **378**, 640-644.
 - Liapis, A.J. (1989). Theoretical aspects of affinity chromatography. *Journal of Biotechnology*, **11**, 143-160.
 - Lin, F.Y; Chen, W.Y; Sang, L.C. (1999). Microcalorimetric studies of the interactions of lysozyme with immobilized metal ions: Effects of ion, pH value and salt concentration. *Journal of colloid and interface science*, **240**, 373-379.
 - Lin^a, F.Y; Chen, C-S; Chen, W-Y; Yamamoto, S. (2000). Microcalorimetric studies of the interactions mechanism between proteins and Q-Sepharose at pH near the isoelectric point (pI) Effects of NaCl concentration, pH value, and temperature. *Journal of chromatography A*, **912**, 281-289.
 - Lin^b, F-Y; Chen, W-Y; Chen, H-M. (2000). Microcalorimetric study of the effect of hexa-histidine tag and denaturant on the interaction mechanism between protein and metal-chelating gel. *Journal of Colloid and Interface Science* **238**, 333-339.
 - Lin, F-Y; W-Y. Chen, W-Y; Hearn, M.T.W. (2002). Thermodynamic analysis of the interaction between proteins and solid surfaces: application to liquid chromatography. *Journal of Molecular Recognition*, **15**, 55 -93.

-
- Lipinski, C.A; Lombardo, F; Dominy, B.W; Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting. *Advance drug delivery review*, **46**, 3-26.
 - Liu, Y-C; ChangChien, C-C; Suen, S-Y. (2003). Purification of penicillin G acylase using immobilized metal affinity membranes. *Journal of Chromatography B*, **794**, 67-76.
 - Lönnnerdal, B; Keen, C.L. (1982). Metal chelate affinity chromatography of proteins. *Journal of applied biochemistry*, **9**, 203-208.
 - Lowe, C.R; Dean, P.D.G. (1974). Affinity chromatography. *John Wiley Cop.*
 - Lydiatt, A. (2002). Process chromatography: Current constraints and future options for the adsorptive recovery of bioproducts. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 95-103.
 - Machida, S; Saito, M. (1993). Purification and characterization of membrane-bound chitin synthase. *Journal of biological chemistry*, **268**, 1702-1707.
 - Magdelin, S; Moser, A. (2012). Affinity Chromatography: Principles and Applications. (Ed.), ISBN: 978-953-51-0325-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/affinity-chromatography/affinity-chromatography-principles-and-applications>.
 - Majorek, K.A; Porebski, P.J; Dayal, A; Zimmerman, M.D; Jablanska, K; Stewart, A.J; Chruzcz, M; Minar, W. (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, **52**, 174-182.
 - Mallik, R; Jiang, T; Hage, D.S. (2004). High-performance affinity monolithic chromatography development and evaluation of human serum albumin columns. *Analytical chemistry*, **76**, 7013-7022.
 - Mallik, R; Hage, D. (2006). Review Affinity monolith chromatography. *Journal of Separation Science*, **29**, 1686 -1704.
-

-
- Mao, Q.M; Stockmann, R; Prince, I.G.; Hearn, M.T.W. (1993). High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and protein. *Journal of chromatography*, **646**, 67-80.
 - Margolis, S.A; Fatiadi, A.J; Alexander, L; Edwards, J.J. (1989). Chromatographic Separations of Serum Proteins on mmobilized Metal Ion Stationary Phases. *Analytical Biochemistry*, **183**, 108-121.
 - Martin del Valle, E; Galan, M; Cerro, R. (2003). Use of ceramic monoliths as stationary phase in affinity chromatography. *Biotechnology Progress Journal*, **19**, 921-927.
 - Mateo, C; Fernandez-Lorente, G; Abian, O; Fernandez-La fuente, R; Guisan, J.M. (2001). Multifunctional epoxy suport. A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the support before their covalent linkage. *Biomacromolecules*, **1**, 739-745.
 - McMillan, D.E. (1974). A comparison of five methods for obtaining the intrinsic viscosity of bovine serum albumin, *Journal of Biological Chemistry*, **245**, 4744 - 4750.
 - Mc Phail, D.B; Goodman, B.A. (1984). Tris buffer-a case for caution in its use in copper-containing systems. *Biochemical Journal Letters*, **221**, 559-560.
 - Michaelis, M.L; Nunley, E.W; Jayawickreme, C; Hurlbert, M; Schueler, S; Guilly, C. (1992). Purification of a synaptic membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter and immunoextraction with antibodies to a **36-kDa** protein. *Journal of neurochemistry*, **58**,147-157.
 - Min, C; Verdine, GL. (1996). Immobilized metal ion affinity chromatography of DNA. *Nucleid acid research*, **24**, 149-154.
 - Minghetti, P.P; Ruffner, D.E; Kuang, W.J; Dennison, O.E. Hawkins, J.W. Beattie, W.G. Dugaiczuk, A. (1986). Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *The Journal of biological chemistry*, **261**, 6747-6757.

-
- Montovaara, T; Pertoft, H, Porath, J. (1991). Purification of factor VIII: coagulant activity from rat liver nonparenchymal cell culture medium by immobilized metal ion affinity chromatography. *Biotechnology and applied biochemistry*, **13**, 120-126.
 - Moore, W.E; Foster, J.F. (1968). The microheterogeneity of plasma albumins IV. Evidence from reversible denaturation that three-dimensional folding is not responsible for microheterogeneity. *Biochemistry Journal*, **7**, 3409-3417.
 - Motokawa, M; Kobayashi, H; Ishizuka, N; Minakuchi, H; Nakanishi, K; Jinnai, H; Hosoya, K; Ikegami, T; Tanaka, N. (2002). Monolithic silica columns with various skeleton sizes and through-pore sizes for capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **961**, 53-63.
 - Muszyńska, G; Andersson, L; Porath, J. (1986). Selective adsorption of phosphoproteins on gel-immobilized ferric chelate. *Biochemistry*, **25**, 6850-6853.
 - Muszyńska, G; Dobrowolska, G; Medin, A; Ekman, P; Porath, J.O. (1992). Model studies on iron (III) ion affinity chromatography. II. Interaction of immobilized iron (III) ions with phosphorylated amino acids, peptides and proteins. *Journal of chromatography*, **604**, 19-28.
 - Ngah, W.S; Endud, C.S; Mayanar, R. (2002). Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. *Reactive & Functional Polymers*, **50**, 181- 190.
 - Nakawa, Y; Yip, T-T; Belew, M; Porath, J. (1988). High-performance immobilized metal ion affinity chromatography of peptides: Analytical separation of biologically active synthetic peptides. *Analytical Biochemistry*, **168**, 75-81.
 - Noel, J.K; Hunter, M.J. (1972). Bovine mercaptalbumin and non-mercaptalbumin monomers interconversions and structural differences. *The Journal of biological chemistry*, **247**, 7391-7406.
 - Nogueira, R; Lubda, D; Leitner, A; Bicker, W; Maier, M.N; Lämmerhofer, M; Lindner, W. (2006). Silica-based monolithic columns with mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange selectivity principle

for high-performance liquid chromatography. *Journal of separation Science*, **29**, 966-978.

- Nuñez, O; Nakanishi, K; Tanaka, N. (2008). Review Preparation of monolithic silica columns for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1191**, 231-252.
- Ohkubo, I; Kondo, T; Taniguchi, N. (1980). Purification of nucleosidediphosphatase of rat liver by metal-chelate affinity chromatography. *Biochimica et biophysica acta*, **616**, 89-93.
- Olsson, T.S.G; Ladbury, J.E; Pitt, W.R; Williams, M.A. (2011). Extent of enthalpy-entropy compensation in protein-ligand interactions. *Protein science*, **20**, 1607-1618.
- Oncley, J.L; Scatchard, G; Brown, A. (1946). Physicochemical characteristics of certain of the proteins of normal human plasma. *Journal of physical and colloid chemistry*, **51**, 184-198.
- Oyrton, A.C.; Monteiro, Jr.; Airoidi, C. (1999). Some thermodynamic data on copper-chitin and copper-chitosan biopolymer interactions. *Journal of Colloid Interface Science*, **212**, 212.
- Öztürk, N; Tabak, A; Akgöl, S; Denizli, A. (2008). Reversible immobilization of catalase by using a novel bentonite-cysteine (Bent-Cys) microcomposite affinity sorbents. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **322**, 148-154.
- Pathange, L.P; Bevan, D.R; Larson, T.J; Zhang, C. (2006). Correlation between Protein Binding Strength on Immobilized Metal Affinity Chromatography and the Histidine-Related Protein Surface Structure. *Analytical chemistry*, **78**, 4443-4449.
- Pavlou, A.K; Reichert, J.M. (2010). Recombinant protein therapeutics - success rates, market trends and values to 2010. *Nature biotechnology*, **22**, 1513-1519.

-
- Peters, T.Jr; Blumenstock, F.A. (1967). Copper-binding properties of bovine serum albumin and its aminoterminal peptide fragment. *Journal of Biological Chemistry*, **242**, 1574-1578.
 - Pearson, R.G. (1973). Hard and soft acids and bases. In: Pearson R.G; editor. Stroudsburg, PA: Hutchinson & Ross; 53-59 and 67-85.
 - Peters, T Jr. (1995). All about albumin. *Biochemistry Genetics and medical applications*.
 - Phillips, T.M. (1992). Chapter 7. Affinity chromatography. *Journal of chromatography library part A*, A309-A338.
 - Pfliegerl, K; Podgornik, A; Berger, E; Jungbauer, L. (2002). Direct synthesis of peptides on convective interaction media monolithic columns for affinity chromatography. *Journal of combinatorial chemistry*, **4**, 33-37.
 - Porath, J; Carlsson, J; Olsson, I; Belfrage, G. (1975). Metal Chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature*. **258**, 598-599.
 - Porath, J; Olin, B. (1983). Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry Journal*, **22**, 1621-30.
 - Porath, J. (1988). IMAC-immobilized metal ion affinity based chromatography. *TrAC Trends in analytical chemistry*, **7**, 254-259.
 - Porath, J. (1992). Review Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Protein Expression and Purification*, **3**, 263-281.
 - Poveit, M.J.W; Moore, J.D; Braybrook, J; Simons, H; Belchamber, R; Raganathan, M; Pinfield, V. (2011). Investigation of bovine serum albumin denaturation using ultrasonic spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, **25**, 1233-1241.
 - Price, AE; Logvinenko, KB; Higgins, EA; Cole, ES; Richards, SM. (1995). Studies on the microheterogeneity and in vitro activity of
-

glycosylated and nonglycosylated recombinant human prolactin separated using a novel purification process. *Endocrinology journal*, **136**, 4827-4833.

- Reed, R.G; Feldhoff, R.C; Clute, O.L; Peters, T.Jr. (1975). Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis conformation and ligand binding. *Biochemistry Journal*, **14**, 4578-4583
- Reed, R.G. Putnam, F.W; Peters, T.Jr. (1980). Sequence of residues 400-403 of bovine serum albumin. *Biochemical Journal*, **191**, 867-868.
- Riddiford, C.L; Jennings, B.R. (1966). Discussion on the shape of bovine plasma albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **126**, 171-173.
- Rijken, D.C; Wijngaards, G; Zaal De Jong, M; Welbergen, J. (1979). Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*, **580**, 140-153.
- Roos, P.H. (1991). Immobilized metal affinity chromatography as a means fractionating microsomal cytochrome P-450 isozymes. *Journal of Chromatography*, **587**, 33-42.
- Roselin, L-S; Li, M.S. Lin, P.H; Chang, Y; Chen, W.Y. (2010). Recent trends and some applications of isothermal titration calorimetry in biotechnology. *Biotechnology Journal*, **5**, 85-98.
- Ross, W.D; Jefferson, R.T. (1970). In situ formed open pore polyurethane as chromatography supports. *Journal of chromatography science*, **8**, 386-389.
- Ross, P.D; Subramanian, S. (1981) Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochemistry*, **11**, 3096-3102.
- Rowe, J.M; Henry, S.F; Friesen, H.G. (1986). Purification and characterization of a human pituitary growth factor. *Journal of biochemistry*, **25**, 6421-6425.
- Roy, P; Colas, B; Durand, P. (1996). Purification, kinetic and molecular characterization of a serine collagenolytic protease from

greenshore crab (*carcinus maenas*) digestive gland. *Journal of physiology and biochemistry*, **1153**, 87-95.

- Ruben, A; Kiso, Y; Freire, E. (2006). Overcoming roadblockes in lead optimization: A thermodynamic perspective. *Chemical Biology & Drug Design*, **67**, 2-4.
- Sargent, T.D; Yang, M; Bonner, J. (1981). Nucleotide sequence of cloned rat serum albumin messenger RNA. *Proceedings of the national academy of sciences*, **78**, 243-246.
- Šatínský, D; Solich, P; Chocholouš, P; Karlíček, R. (2003). Monolithic columns-a new concept of separation in the sequential injection technique. *Analytica Chimica Acta*, **499**, 205-214.
- Sawadogo, M; Van Dike, M.W. (1995). Indirect use of immobilized metal affinity chromatography for isolation and characterization of proteins partners. *Genet Eng (NY)*, **17**, 53-65.
- Scanff, P; Yuan, M; Pelissier, J.P. (1991). Immobilized Fe³⁺ affinity chromatography isolation of phosphopeptides. *Journal of chromatography A*, **539**, 425-432.
- Schiel, J.E; Mallik, R; Soman, S; Joseph, K.S; Hage, D. (2006). Review Applications of silica supports in affinity chromatography. *Journal of Separation Science*, **29**, 719-737.
- Schmid, K; Beneze, W.L; Wehrmüller, J.O. (1959). Studies on the structure of α 1-acid glycol-protein. *Journal of biological chemistry*, **234**, 529-533.
- Schulte, M; Dingenen, J. (2001). Monolithic silica sorbents for the separation of diastereomers by means of simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A*, **923**, 17-25.
- Scully, M.F; Kakkar, V.V. (1982). Structural features of fibrinogen associated with binding to chelated zinc. *Biochimica et biophysica Acta*, **700**, 130-133.

-
- Sergio, C; Gianni, P; Molica, V; Lepori, L. (1981). Group contributions to the thermodynamic properties of non-ionic organic solutes in dilute aqueous solution. *Journal of solution chemistry*, **10**, 563-595.
 - Serpa, G; Pires Augusto, E.F; Silva Cunha, W.M; Borçoe Ribeiro, M. (2005). Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G1 monoclonal antibody. *Journal of Chromatography B*, **816**, 259-268.
 - Shahabadi, N; Maghsudi, M. (2009). Binding studies of a new copper (II) complex containing mixed aliphatic and aromatic dinitrogen ligands with bovine serum albumin using different instrumental methods. *Journal of molecular structure*, **929**, 193-199.
 - Shearer, W.T; Bradshaw, R.A; Gurd, F.R.N, Peters, T,Jr. (1967). The aminoacid sequence and copper (II) binding properties of peptide (1-24) of bovine serum albumin. *The Journal of biological chemistry*, **242**, 5451-5459.
 - Shentu, J; Wu, J; Song, W; Jia, Z. (2005). Chitosan microspheres as immobilized dye affinity support for catalase adsorption. *International Journal of Biological Macromolecules* **37**, 42-46.
 - Singh, S.K; Kishore, N.K. (2008). Calorimetric and Spectroscopic Studies on the Interaction of Methimazole with Bovine Serum Albumin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**, 2362-2372.
 - Singla, A.K; Chaula, M. (2001). Some pharmaceutical and biological aspects and update. *Journal of pharmacy and pharmacology*, **53**, 1047-1067.
 - Sjödin, T; Ljungstedt, I. (1973). Studies on the tryptophan and drug-binding properties of human serum albumin fragments by affinity chromatography and circular dichroism measurements. *The Journal of biological chemistry*, **248**, 8434-8441.
 - Smith, J.M; Van Ness, H.C. (1975). Introduction to chemical engineering thermodynamics. McGraw Hill.
 - Smith, J.M. (1981). Chemical engineering kinetics. MacGraw Hill, 3ra edición.
-

-
- Smith, M.C; Furman, T.C; Ingolia, T.D; Pidgeon, C. (1988). Immobilized metal ion affinity chromatography. A new concept in affinity chromatography for recombinant proteins. *Journal of biological chemistry*, **263** (15), 7211-7215.
 - Stoscheck, CM. (1990). Quantitation of protein. *Methods in enzymology*, **182**, 50-68.
 - Sulkowski, E. (1985). Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, **3**, 1-7.
 - Sun, Y; Yang, K. (2008). Analysis of mass transport models based on Maxwell-Stefan theory and Fick's law for protein uptake to porous anion exchange. *Separation and purification technology*, **60**, 180-189.
 - Squire, P.G; Mose, P; O`Konski, C.T. (1968). The hydrodynamics properties of bovine serum albumin monomer and dimer. *Biochemistry Journal*, **7**, 4261-4271.
 - Srivastava, S.K; Ansari, N.H. (1980). The peroxidatic and catalytic of Catalase in normal and acatalasemic mouse liver. *Biochimicaet Biophysical Acta*, **633**, 317-322.
 - Su, T.J; Lu, J.R; Thomas, R.K; Cui, Z.F; Penfold, J. (1998). The Conformational Structure of Bovine Serum Albumin Layers Adsorbed at the Silica-Water Interface. *The Journal of Physical Chemistry B*, **102**, 8100-8108.
 - Switala, J; Loewen, P.C. (2002). Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **401**, 145-154.
 - Syverud, K; Kirsebom, H; Hajizadeh, S; Chinga-Carrasco, G. (2011). Cross-linking cellulose nanofibrils for potential elastic cryo-structured gels. *Nanoscale Research Letters*, **6**, 626.
 - Tamagawa, R.E.; Azzoni, A.R.; Miranda, E.A.; Vijayalakshmi, M.A. (1999). Aprotinin recovery: Comparison between biospecific and pseudo-

- biospecific affinity adsorption. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **16**, 2.
- Tanaka, N; Kobayashi, H; Ishizuka, N; Minakushi, H; Nakanishi, K; Hosoya, K; Ikegami, T. (2002). Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations. *Journal of chromatography*, **965**, 35-49.
 - Tanford, C. (1950). Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXIII hydrogen ions equilibria in native and modified human serum albumins. *Journal of the American chemical Society*, **72**, 441-451.
 - Taylor, G. I. (1953). Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube. *Proceedings of the Royal Society London, Ser. A*, **219**, 186-203.
 - Todd, M.J; Gomez, J. (2001). Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme activity? *Analytical Biochemistry*, **296**, 179-187.
 - Torres, A.R; Peterson, E.A; Evans, W.H; Mage, M.G.; Wilson, S.M. (1979). Fractionation of granule proteins of granulocytes by copper chelate chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*, **576**, 385-392.
 - Tullis, J.L. (1953). In blood cells and plasma proteins. *Academy Press, New York, Sect IV chap I*, 326.
 - Turková. J. (1978). A review of: "affinity chromatography", *Elsevier, Amsterdam, New York*, **7**.
 - Tüzmen, N; Kalburcu, T; Denizl, A. (2012). Immobilization of Catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. *Process Biochemistry*, **74**, 26-33.
 - Ueda, E.K.M; Gout, P.W; Morganti, L. (2003). Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *Journal of chromatography A*, **988**, 1-23.
 - Ueno, A; Hong, Y.M; Arakaki, N; Takeda, Y. (1985). Insulin-stimulating peptide from a tryptic digests of bovine serum albumin: purification and characterization. *Biochemical Journal*, **98**, 269-278.

-
- Valenti, L.E; Fiorito, P.A; García, C.D; Giacomelli, C.E. (2007). The adsorption-desorption process of bovine serum albumin on carbon nanotubes. *Journal of Colloid and Interface Science*, **307**, 349-356.
 - Vançan, S; Everson, M; Alves, S. (2002). IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized cooper, nickel, zinc and cobalt ions and different buffer systems. *Process Biochemistry*, **37**, 573.
 - Veiga-Ochoa, M.D; Ruiz-Caro, R. (2004). El quitosano: Usos farmacéuticos y biológicos. *Revista de la OFIL*, **14**, 33-42.
 - Velazquez-Campoy, A; Freire, E. (2005). ITC in the post genomic era?. *Priceless Biophys Chem*, **115**, 115-124.
 - Vijayalakshmi, M.A; Krishnan, S. (1987). Immobilized metal ion affinity chromatography of bio molecules: Principles and methods. *Bio-Sciences*, **6**, 89-92.
 - Voet, D. (2006). Bioqímica. *Ed Médica Panamericana 3ra edición*, 152.
 - Voet, D; Voet, J; Pratt; C.W. (2006). Fundamentos de bioquímica, la vida a nivel molecular. *Ed Médica Panamericana 2da edición*, 107.
 - Vunnum, S; Cramer, S. (1996). IMAC: Nonlinear Elution Chromatography of Proteins. *Biotechnology and bioengineering*, **54**, 372-390.
 - Wagner, M.L; Schereaga, H.A. (1956). Guoy diffusion studies of bovine serum albumin. *The Journal of physical chemistry*, **60**, 1066-1076.
 - Wallevik. (1973). Reversible denaturation of human serum albumin by pH, temperature and guanidine hydrochloride followed by optical rotation. *The Journal of biological chemistry*, **245**, 2650-2655.
 - Walsh, Z; Paull, B; Macka, M. (2012). Inorganic monoliths in separation science: A review. *Analytica Chimica Acta*, **750**, 28-47.
 - Wang, L; Shen, S; He, X; Yun, J; Yao, K; Yao, S-J. (2008). Adsorption and elution behaviors of bovine serum albumin in metal-chelated affinity cryogel beds. *Biochemical Engineering Journal*, **42**, 237-242.

-
- Weijesrs, R.N.M. (1977). Amino acid sequence in bovine serum albumin. *Clinical Chemistry*, **23**, 1361-1362.
 - Wen-Chien, L; Chi-Hao, C. (2001). Predicting the elution behavior of proteins in affinity chromatography on non-porous particles. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **49**, 63-82.
 - Wetzels, R; Becker, M; Behlke, J; Billwitz, H; BoHM, M; Ebert, B; Hamann, H. (1980). Temperature Behaviour of Human Serum Albumin, *European Journal of Biochemistry*, **104**, 469-478.
 - Wilcox, D. (2008). Review: Isothermal titration calorimetric of metal ions binding to proteins: An overview of recent studies. *Inorganica chimica Acta*, **361**, 857-867.
 - Winzerling, J; Berna, P; Porath, J. (1992). How to use immobilized metal ion chromatography. *Methods: A companion to methods in enzymology*, **4**, 4-13.
 - Wiseman, T; Williston, S; Brandts, J; Lin, F. (1989). Rapid measurement of binding constants heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry*, **179**, 131-137,
 - Wright, A.K; Thompson, M.R. (1975). Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence, *Biophysical Journal*, **15**, 137-141.
 - Wu, C.F; Chen, W.Y; Lee, J. F.(1996). Microcalorimetric studies of the interactions of imidazole with immobilized Cu (II): Effects of pH value and salt concentration. *Journal of colloid and interface science*, **183**, 236-242.
 - Xie, C; Hu, J; Xiao, H; Su, X; Dong, J; Tian, R; He, Z; Zou, H. (2005). Preparation of monolithic silica column with strong cation-exchange stationary phase for capillary electrochromatography. *Journal of Separation Science*, **28**, 751-756.
 - Yamasaki, M; Yano, H. (1990). Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin: I. Effects of pH and ionic strength. *International Journal of Biological macromolecules*, **12**, 263-268.

-
- Yip, T.T; Nakagawa, Y; Porath, J. (1989). Evaluation of the Interaction of Peptides with Cu(II), Ni(II), and Zn(II) by High-Performance Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Analytical Biochemistry*, **183**, 159-171.
 - Yip, T.T; Hutchens, T.W. (1994). Immobilized metal ion affinity chromatography protocol. *Molecular Biotechnology*, **1**, 151-164.
 - Zachariou, M; Hearn, M.T. (1995). Protein selectivity in immobilized metal affinity chromatography based on the surface accessibility of aspartic and glutamic acid residues. *Journal of protein chemistry*, **14**, 419-430.
 - Zhang, Y; Akilesh, S; Wilcox, D.E. (2000). Isothermal Titration Calorimetry Measurements of Ni (II) and Cu (II) Binding to His, GlyGlyHis, HisGlyHis, and Bovine Serum Albumin: A Critical Evaluation. *Inorganic Chemistry*, **39**, 3057-3064.
 - Zou, H; Luo, Q; Dongmei, Z. (2001). Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. *Journal of biochemical and biophysical methods*, **49**, 199-240.

ANEXO A

Datos de equilibrio de los experimentos de
adsorción

Tabla A-1. Datos de equilibrio de BSA-agarosa-IDA-Cu²⁺, solución fosfato 50 mM, pH 4,5 Q=1,50 cm³/min. Concentración mol/cm³.

t(min)	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
	C _E x 10 ⁹ (mol/cm ³)				
0	10,60	10,60	10,60	10,60	10,60
20	9,88	9,91	10,24	10,40	10,50
40	9,49	9,63	10,03	10,10	10,30
60	9,10	9,35	9,74	9,86	10,10
80	8,80	9,16	9,46	9,67	9,87
100	8,61	8,97	9,27	9,48	9,68
120	8,41	8,79	9,09	9,38	9,58
140	8,31	8,60	8,90	9,29	9,49
160	8,22	8,51	8,72	9,19	9,39
180	8,12	8,41	8,62	9,10	9,29
200	8,04	8,32	8,53	9,00	9,27
220	8,02	8,23	8,44	8,90	9,26
240	8,00	8,13	8,34	8,86	9,25
260	7,97	8,09	8,30	8,85	9,24
280	7,95	8,04	8,25	8,84	9,23
300	7,92	7,99	8,25	8,83	9,22
320	7,90	7,96	8,25	8,82	9,21
340	7,86	7,94	8,23	8,81	9,20
360	7,86	7,94	8,23	8,81	9,20
380	7,86	7,94	8,23	8,81	9,20
400	7,86	7,94	8,23	8,81	9,20
420	7,86	7,94	8,23	8,81	9,20
440	7,86	7,94	8,23	8,81	9,20
460	7,86	7,94	8,23	8,81	9,20
480	7,86	7,94	8,23	8,81	9,20
500	7,86	7,94	8,23	8,81	9,20

Tabla A-2. Datos de equilibrio de BSA-agarosa-IDA-Cu²⁺, solución fosfato 50 mM, pH 4,5 Q=5,50 cm³/min. Concentración mol/cm³.

t(min)	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
	C _E x 10 ⁹ (mol/cm ³)				
0	10,60	10,60	10,60	10,60	10,60
20	10,20	9,90	10,10	10,00	10,30
40	9,82	9,45	9,61	9,67	9,90
60	9,44	9,09	9,31	9,42	9,75
80	8,90	8,86	9,09	9,16	9,53
100	9,14	8,64	8,83	9,01	9,34
120	8,84	8,49	8,64	8,86	9,23
140	8,61	8,27	8,49	8,75	9,16
160	8,39	8,13	8,42	8,68	9,08
180	8,23	8,05	8,34	8,60	9,01
200	8,08	7,98	8,27	8,53	8,94
220	7,93	7,90	8,25	8,50	8,86
240	7,78	7,83	8,23	8,49	8,83
260	7,71	7,76	8,21	8,48	8,79
280	7,63	7,72	8,19	8,47	8,79
300	7,55	7,68	8,17	8,45	8,79
320	7,46	7,62	8,16	8,44	8,75
340	7,42	7,62	8,16	8,44	8,75
360	7,42	7,62	8,16	8,44	8,75
380	7,42	7,62	8,16	8,44	8,75
400	7,42	7,62	8,16	8,44	8,75
420	7,42	7,62	8,16	8,44	8,75
440	7,42	7,62	8,16	8,44	8,75
460	7,42	7,62	8,16	8,44	8,75
480	7,42	7,62	8,16	8,44	8,75
500	7,42	7,62	8,16	8,44	8,75

Tabla A-3. Datos de equilibrio de BSA-agarosa-IDA-Cu²⁺, solución fosfato 50 mM, pH 4,5 $Q=8,40 \text{ cm}^3/\text{min}$. Concentración mol/cm³.

t(min)	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
	$C_E \times 10^9 \text{ (mol/cm}^3\text{)}$				
0	10,60	10,60	10,60	10,60	10,60
20	10,00	10,20	10,20	10,20	10,30
40	9,52	9,88	9,95	10,00	10,10
60	9,17	9,61	9,67	9,88	9,95
80	8,90	9,33	9,47	9,74	9,82
100	8,62	9,13	9,33	9,61	9,71
120	8,34	8,92	9,13	9,47	9,61
140	8,20	8,78	9,02	9,37	9,54
160	8,06	8,65	8,85	9,30	9,47
180	7,92	8,51	8,78	9,23	9,43
200	7,78	8,37	8,65	9,16	9,37
220	7,65	8,23	8,51	9,09	9,37
240	7,50	8,10	8,47	9,01	9,33
260	7,30	7,96	8,44	8,95	9,30
280	7,25	7,86	8,41	8,92	9,25
300	7,18	7,83	8,37	8,89	9,23
320	7,18	7,83	8,37	8,89	9,21
340	7,18	7,83	8,37	8,89	9,21
360	7,18	7,83	8,37	8,89	9,21
380	7,18	7,83	8,37	8,89	9,21
400	7,18	7,83	8,37	8,89	9,21
420	7,18	7,83	8,37	8,89	9,21
440	7,18	7,83	8,37	8,89	9,21
460	7,18	7,83	8,37	8,89	9,21
480	7,18	7,83	8,37	8,89	9,21
500	7,18	7,83	8,37	8,89	9,21

Tabla A-4. Datos de equilibrio de BSA-agarosa-IDA-Cu²⁺, solución fosfato 50 mM, pH 4,5 Q=10,60 cm³/min. Concentración mol/cm³.

t(min)	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
	C _E x 10 ⁹ (mol/cm ³)				
0	10,60	10,60	10,60	10,60	10,60
20	9,53	9,79	10,20	10,20	10,20
40	8,92	9,23	9,86	9,86	10,10
60	8,25	8,86	9,55	9,55	9,93
80	7,82	8,50	9,36	9,36	9,80
100	7,46	8,25	9,17	9,24	9,68
120	7,21	8,00	8,98	9,11	9,61
140	6,97	7,88	8,86	9,05	9,55
160	6,78	7,76	8,73	9,03	9,49
180	6,72	7,70	8,67	9,00	9,47
200	6,66	7,60	8,58	8,99	9,45
220	6,60	7,54	8,45	8,98	9,44
240	6,54	7,53	8,42	8,97	9,42
260	6,48	7,52	8,39	8,96	9,41
280	6,51	7,51	8,36	8,95	9,41
300	6,51	7,51	8,36	8,95	9,41
320	6,51	7,51	8,36	8,95	9,41
340	6,51	7,51	8,36	8,95	9,41
360	6,51	7,51	8,36	8,95	9,41
380	6,51	7,51	8,36	8,95	9,41
400	6,51	7,51	8,36	8,95	9,41
420	6,51	7,51	8,36	8,95	9,41
440	6,51	7,51	8,36	8,95	9,41
460	6,51	7,51	8,36	8,95	9,41
480	6,51	7,51	8,36	8,95	9,41
500	6,51	7,51	8,36	8,95	9,41

Tabla A-5. Datos de equilibrio de BSA-agarosa-IDA-Cu²⁺, solución fosfato 50 mM, pH 4,5 Q=14,00 cm³/min. Concentración mol/cm³.

t(min)	C _E x 10 ⁹ (mol/cm ³)				
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
0	10,60	10,60	10,60	10,60	10,60
20	9,74	9,87	9,96	10,00	10,10
40	9,24	9,36	9,55	9,62	9,64
60	8,78	8,90	9,13	9,21	9,26
80	8,36	8,57	8,84	8,96	9,05
100	7,98	8,27	8,59	8,71	8,92
120	7,64	8,06	8,38	8,50	8,71
140	7,43	7,81	8,22	8,38	8,63
160	7,22	7,64	8,01	8,21	8,54
180	7,05	7,47	7,89	8,13	8,50
200	6,89	7,30	7,76	8,05	8,46
220	6,62	7,22	7,60	7,97	8,42
240	6,54	7,14	7,50	7,88	8,37
260	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33
280	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33
300	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33
320	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33
340	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33
360	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33
380	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33
400	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33
420	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33
440	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33
460	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33
480	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33
500	6,44	6,97	7,44	7,81	8,33

Tabla A-6. Datos de equilibrio de BSA-agarosa-IDA-Cu²⁺, tampón fosfato 50 mM, pH 7,0 , Q=14,00 cm³/min. Concentración en mol/cm³.

t(min)	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
	C _E x 10 ⁹ (mol/cm ³)				
0	10,60	10,60	10,60	10,60	10,60
20	10,20	10,00	10,30	10,20	10,50
40	9,38	9,33	9,63	9,95	10,50
60	8,73	8,90	9,30	9,68	10,30
80	8,13	8,52	9,02	9,46	10,20
100	7,74	8,25	8,69	9,35	10,10
120	7,47	7,93	8,47	9,24	9,99
140	7,25	7,71	8,36	9,13	9,94
160	6,93	7,55	8,25	9,03	9,88
180	6,71	7,44	8,14	8,97	9,83
200	6,54	7,33	8,06	8,95	9,81
220	6,38	7,28	8,04	8,93	9,79
240	6,22	7,23	8,03	8,92	9,77
260	6,22	7,23	8,03	8,92	9,77
280	6,22	7,23	7,98	8,92	9,77
300	6,22	7,23	7,98	8,92	9,77

Tabla A-7. Datos de equilibrio de CAT-agarosa-IDA-Cu²⁺; tampón PBS, pH 7.4, Q=1,50 cm³/min. Concentración en mol/cm³.

t(min)	C _E x 10 ⁹ (mol/cm ³)				
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
0	2,81	2,80	2,80	2,80	2,80
20	2,76	2,70	2,72	2,71	2,77
40	2,63	2,59	2,64	2,63	2,68
60	2,51	2,52	2,56	2,57	2,62
80	2,45	2,46	2,52	2,55	2,59
100	2,39	2,41	2,50	2,54	2,58
120	2,37	2,40	2,46	2,52	2,57
140	2,35	2,37	2,43	2,50	2,56
160	2,35	2,37	2,43	2,50	2,56
180	2,35	2,37	2,43	2,50	2,56
200	2,35	2,37	2,43	2,50	2,56

Tabla A-8. Datos de equilibrio para BSA-agarosa-IDA-Cu²⁺, tampón PBS, pH 7.4, Q=1,50 cm³/min. Proveniente de la separación de dos proteínas (BSA+CAT) Concentración en mol/cm³.

t(min)	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
	C _E x 10 ⁹ (mol/cm ³)				
0	10,60	10,60	10,60	10,60	10,60
20	10,10	10,10	10,20	10,40	10,30
40	9,57	9,71	9,98	10,00	10,00
60	9,30	9,30	9,57	9,91	9,71
80	9,03	9,03	9,44	9,64	9,57
100	8,63	8,76	9,30	9,50	9,30
120	8,49	8,49	9,03	9,37	9,17
140	8,22	8,22	8,90	9,23	9,03
160	8,09	8,09	8,76	9,10	8,76
180	7,95	7,95	8,63	8,96	8,69
200	7,89	7,89	8,49	8,83	8,66
220	7,75	7,78	8,43	8,69	8,63
240	7,68	7,75	8,36	8,56	8,56
260	7,62	7,72	8,29	8,43	8,54
280	7,56	7,70	8,22	8,40	8,50
300	7,55	7,68	8,16	8,29	8,49
320	7,55	7,68	8,16	8,29	8,49
340	7,55	7,68	8,16	8,29	8,49
360	7,55	7,68	8,16	8,29	8,49

Tabla A-9 Datos de equilibrio para la CAT-agarosa-IDA-Cu²⁺, tampón PBS, pH 7.4, Q=1,50 cm³/min. Proveniente de la separación de dos proteínas (BSA+CAT) Concentración en mol/cm³.

t(min)	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
	C _E x 10 ⁹ (mol/cm ³)				
0	2,82	2,82	2,82	2,82	2,82
20	2,70	2,70	2,66	2,68	2,68
40	2,56	2,56	2,53	2,56	2,62
60	2,46	2,49	2,46	2,53	2,55
80	2,40	2,43	2,43	2,49	2,49
100	2,36	2,39	2,40	2,48	2,48
120	2,33	2,35	2,39	2,46	2,47
140	2,33	2,35	2,39	2,46	2,47
160	2,33	2,35	2,39	2,46	2,47
180	2,33	2,35	2,39	2,46	2,47
200	2,33	2,35	2,39	2,46	2,47

ANEXO B

Cálculo de la fuerza iónica de los tampones
empleados

Anexo B.

La fuerza iónica de los tres tampones utilizados para hacer los estudios de la proteína BSA se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$I = \frac{1}{2} [Z_1^2 C_1 + Z_2^2 C_2 + Z_3^2 C_3 + \dots] \quad (\text{B-1})$$

Simplificando, queda de la siguiente forma:

$$I = \frac{1}{2} \sum Z_i^2 C_y \quad (\text{B-2})$$

Donde Z_1, Z_2, Z_3, \dots representan las cargas de los distintos iones presentes en el tampón y C_1, C_2, C_3, \dots la concentración de dichos iones. En la tabla B-1 se recogen los valores obtenidos de fuerza iónica para los tampones utilizados en los estudios de la proteína BSA y la enzima CAT.

Tabla B-1. Determinación de la fuerza iónica para los tampones usados en los estudios de adsorción/elución de las biomoléculas BSA y CAT.

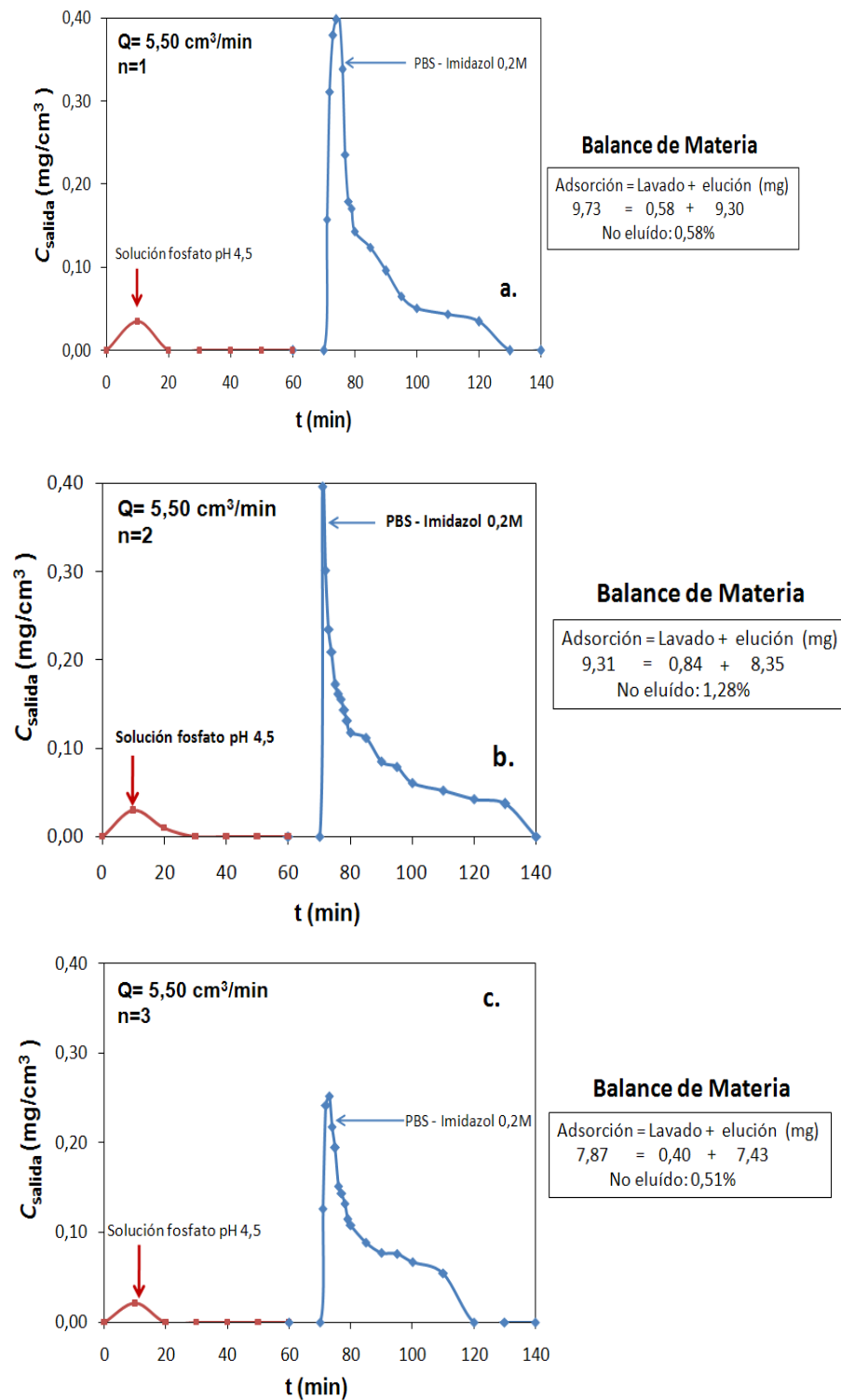
	Solución fosfato pH 4,5	Tampón fosfato pH 7,0	Tampón PBS pH 7,4
Fuerza iónica (M)	0,05	0,104	0,172

ANEXO C

Curvas de elución correspondientes a la proteína
BSA

Anexo C.

Curvas de elución correspondiente a los experimentos de adsorción de la proteína BSA llevados a cabo en solución fosfato pH 4,5 para los caudales de 5,50, 8,40, 10,60 y 14,00 cm^3/min , respectivamente.



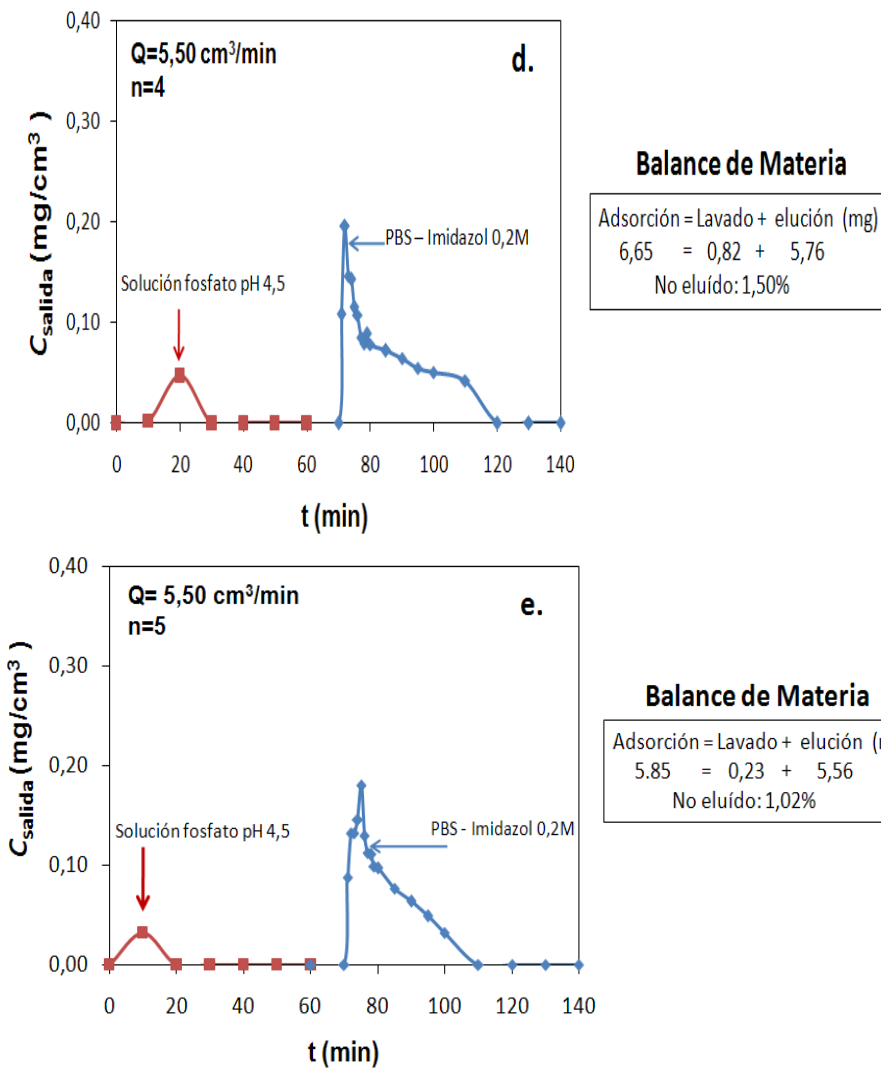
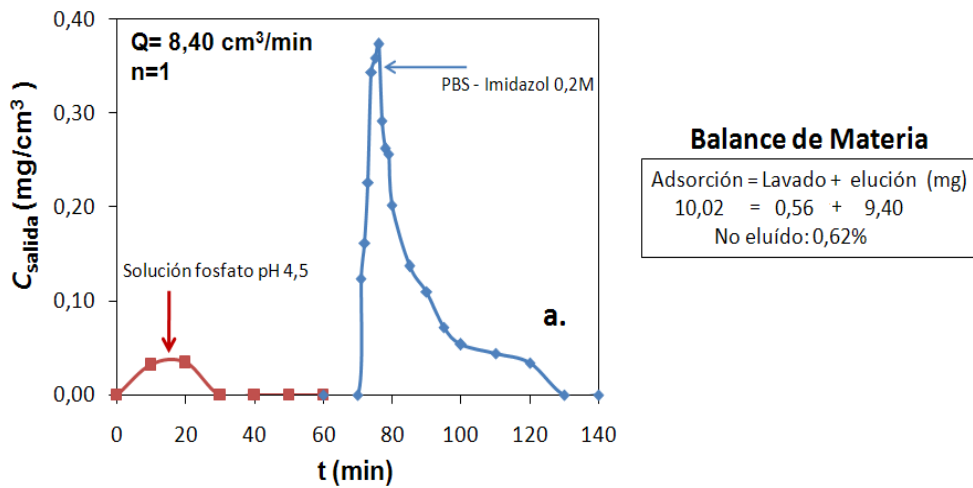
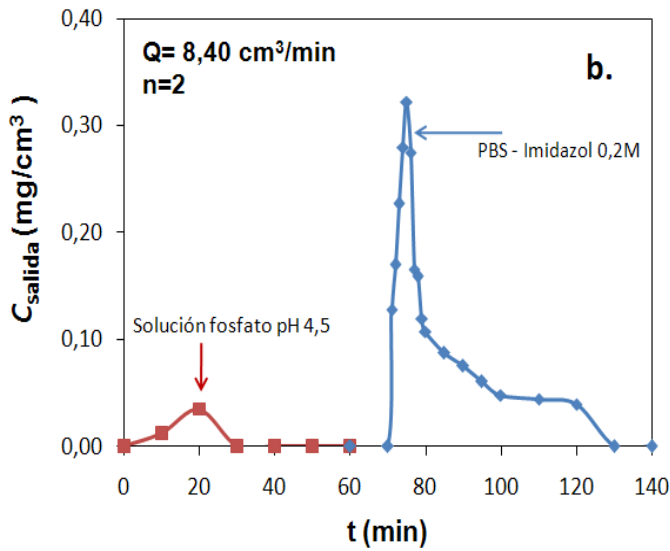


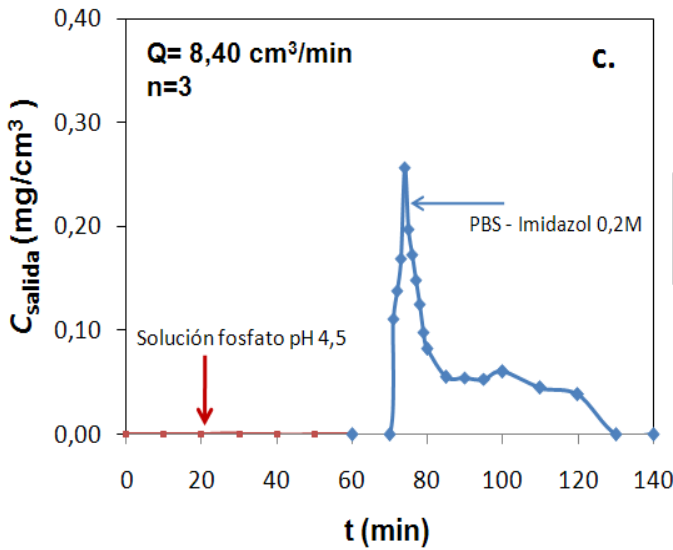
Figura C-1. Curvas de elución de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para el caudal de adsorción de $5,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ y n_1, n_2, n_3, n_4 y n_5 .





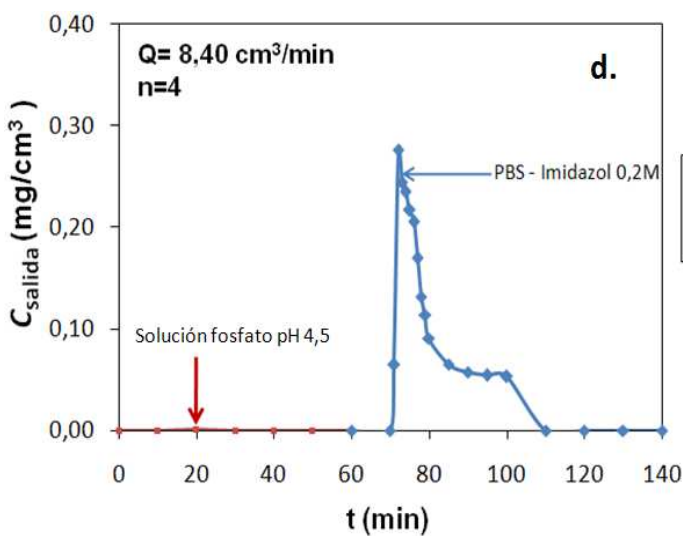
Balance de Materia

Adsorción = Lavado + elución (mg)
 8,23 = 0,73 + 7,44
 No eluido: 0,73%



Balance de Materia

Adsorción = Lavado + elución (mg)
 6,54 = 0,14 + 6,38
 No eluido: 0,30%



Balance de Materia

Adsorción = Lavado + elución (mg)
 4,99 = 0,15 + 4,80
 No eluido: 0,80%

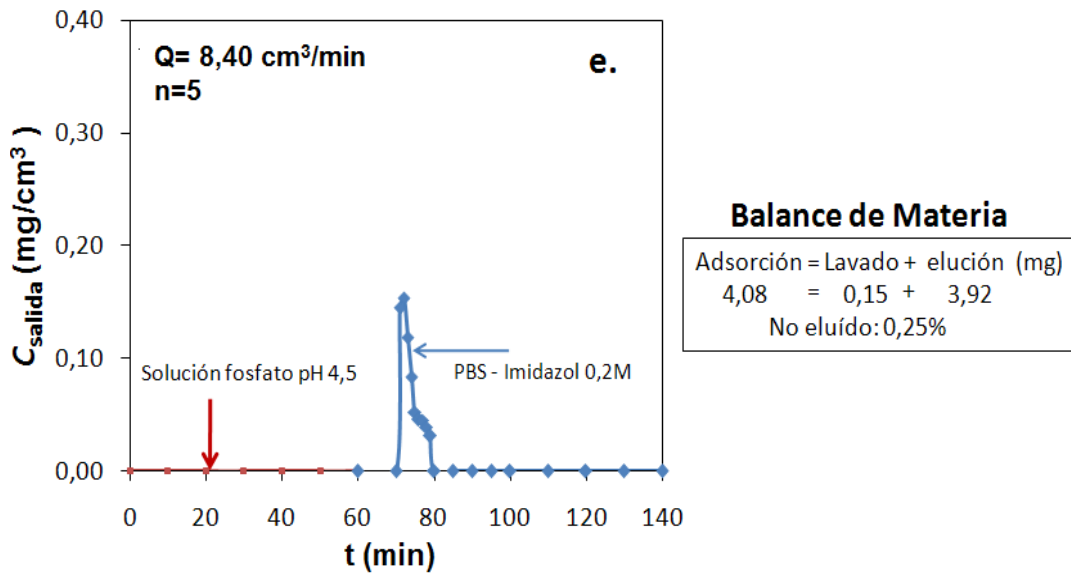
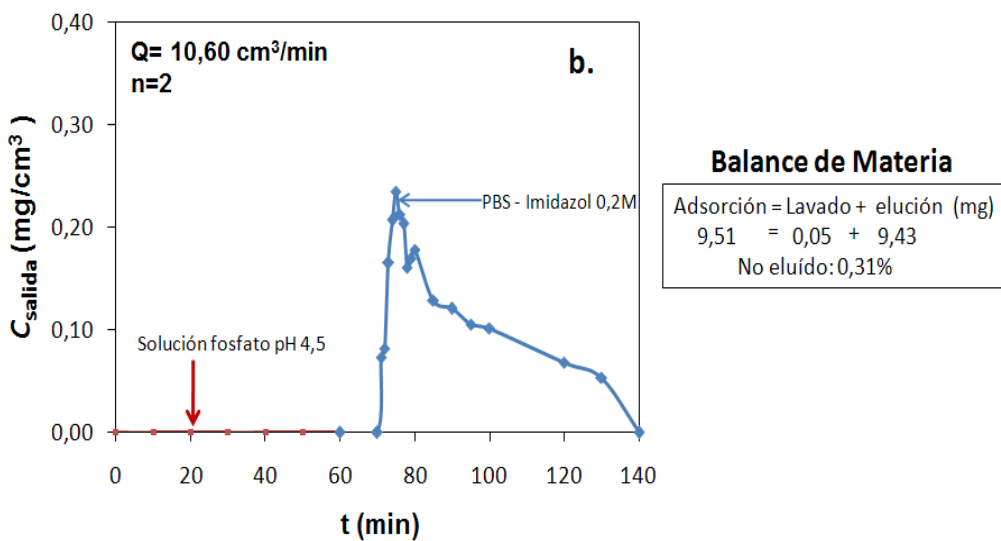
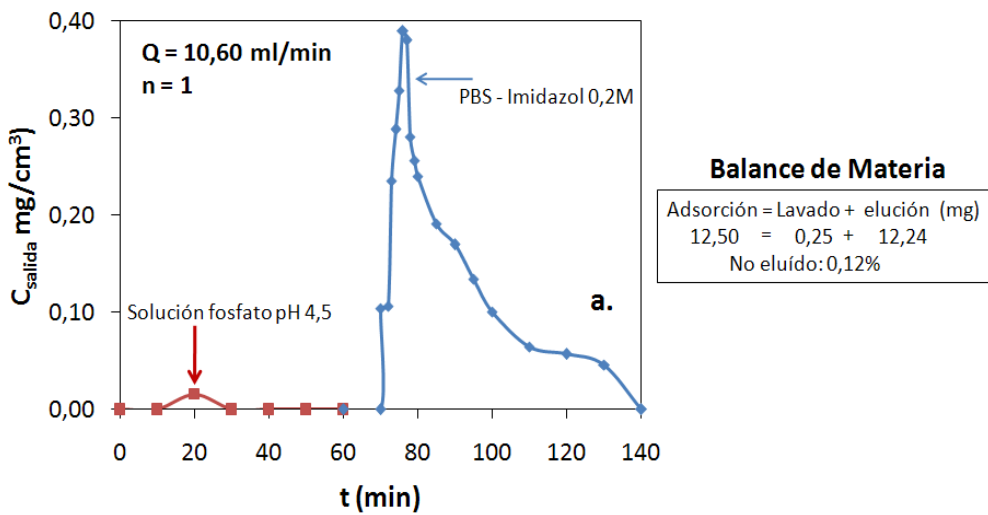


Figura C-2. Curvas de elución de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para el caudal de adsorción de $8,40 \text{ cm}^3/\text{min}$ y n_1, n_2, n_3, n_4 y n_5 .



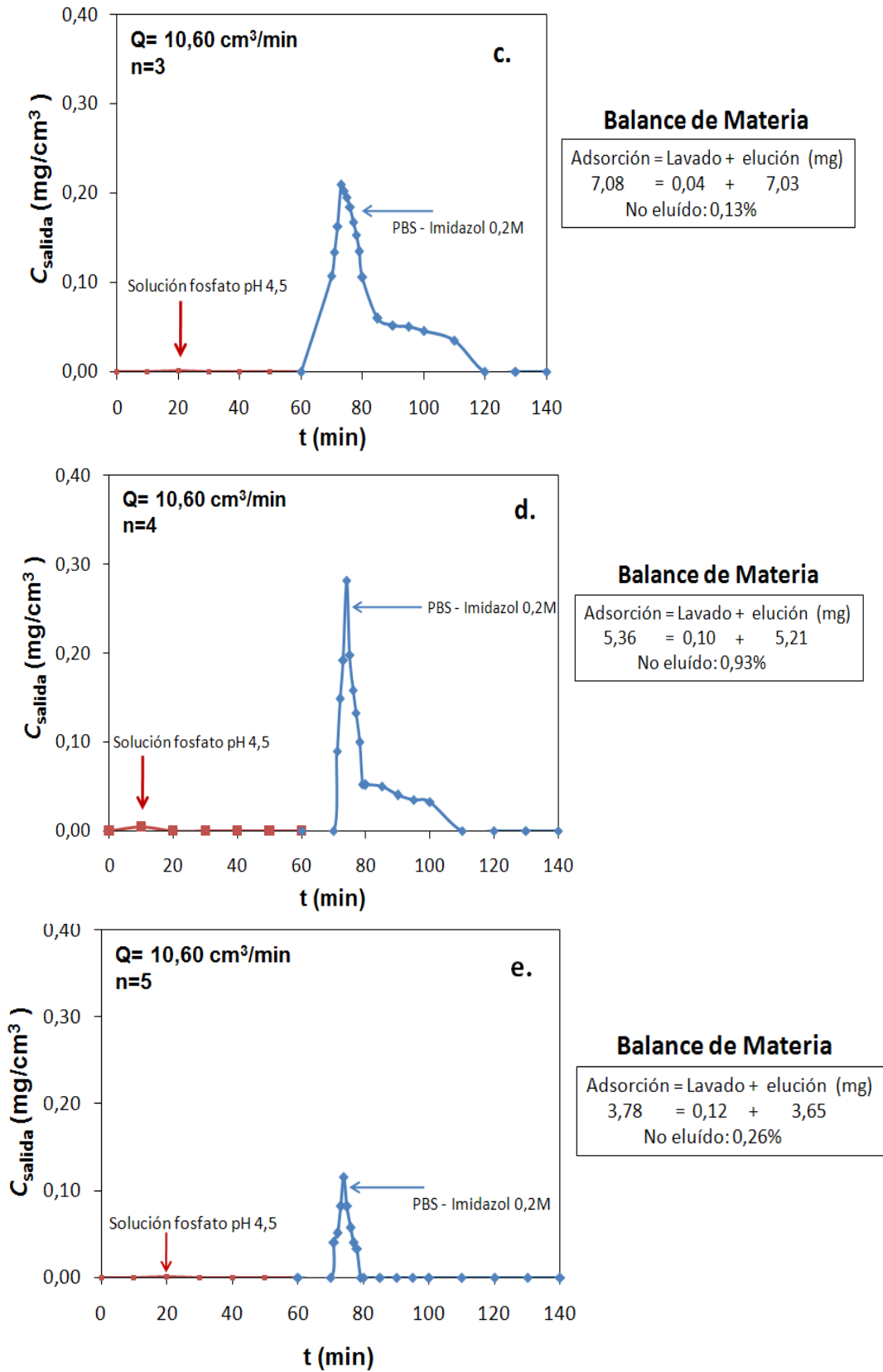
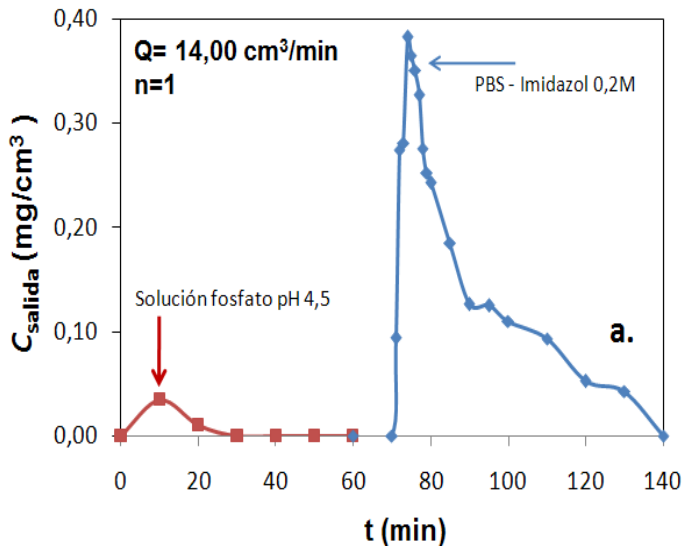
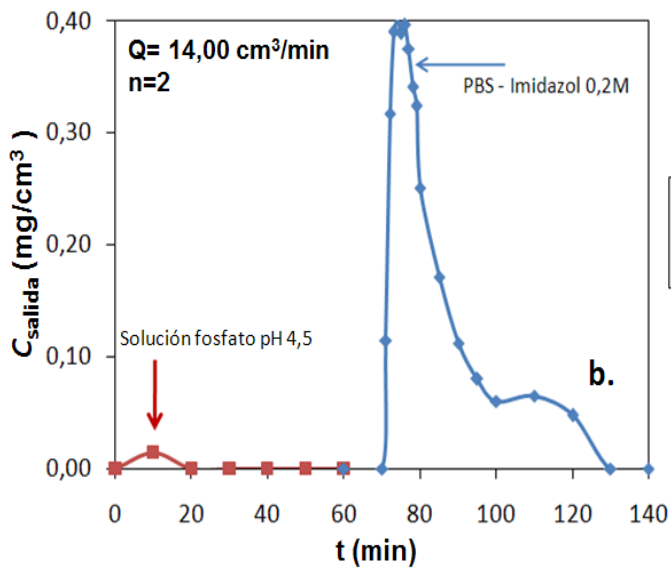


Figura C-3. Curvas de elución de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para el caudal de adsorción de $10,60 \text{ cm}^3/\text{min}$ y n_1, n_2, n_3, n_4 y n_5 .



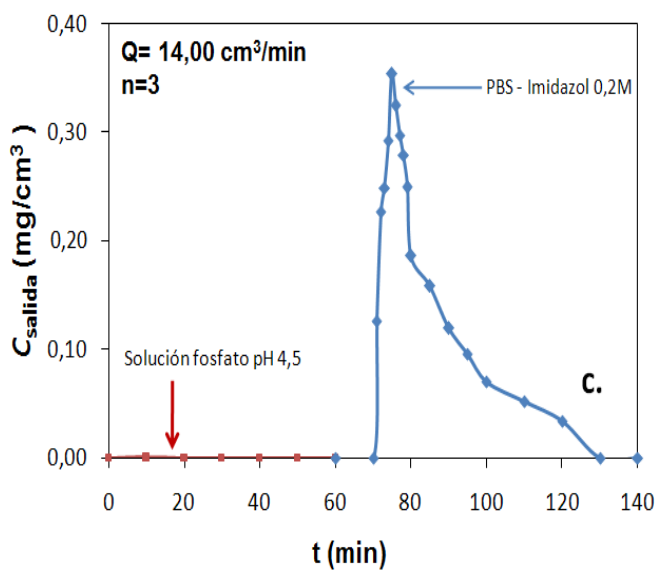
Balance de Materia

Adsorción = Lavado + elución (mg)
13,13 = 0,48 + 12,57
No eluido: 0,61%



Balance de Materia

Adsorción = Lavado + elución (mg)
11,78 = 0,20 + 11,52
No eluido: 0,51%



Balance de Materia

Adsorción = Lavado + elución (mg)
10,14 = 0,05 + 10,05
No eluido: 0,39%

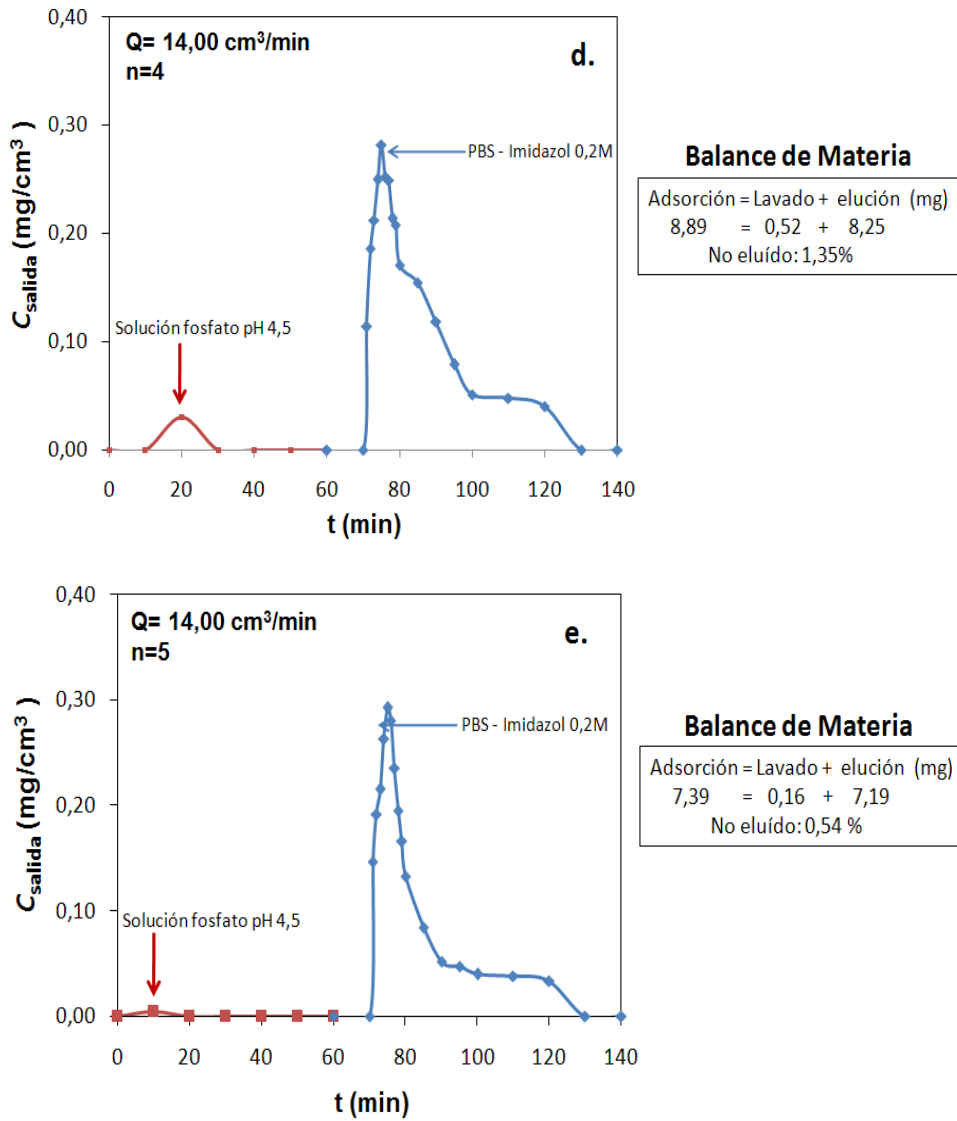


Figura C-4. Curvas de elución de la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5 y 298K, para el caudal de adsorción de $14,0 \text{ cm}^3/\text{min}$ y n_1, n_2, n_3, n_4 y n_5 .

ANEXO D

Valores de la concentración en equilibrio local
teórica predicha por el modelo de transferencia de
materia

Tabla D-1. Valores obtenidos de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

$Q=1,50$ cm^3/min	C_E (exp) $\times 10^9$ mol/cm^3	\overline{C}_E (calc) $\times 10^9$ mol/cm^3	% error
n=1	7,86	7,99	1,66
n=2	7,94	8,07	1,58
n=3	8,23	8,34	1,34
n=4	8,81	8,89	0,93
n=5	9,20	9,26	0,70

Tabla D-2. Valores obtenidos de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=5,50 \text{ cm}^3/\text{min}$.

$Q=5,50$ cm^3/min	C_E (exp) $\times 10^9$ mol/cm^3	\overline{C}_E (calc) $\times 10^9$ mol/cm^3	% error
n=1	7,42	7,57	2,05
n=2	7,62	7,76	1,84
n=3	8,16	8,27	1,37
n=4	8,44	8,54	1,17
n=5	8,75	8,83	0,96

Tabla D-3. Valores obtenidos de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=8,40 \text{ cm}^3/\text{min}$.

$Q=8,40$ cm^3/min	C_E (exp) $\times 10^9$ mol/cm^3	\overline{C}_E (calc) $\times 10^9$ mol/cm^3	% error
n=1	7,18	7,34	2,27
n=2	7,83	7,96	1,62
n=3	8,37	8,47	1,21
n=4	8,89	8,97	0,87
n=5	9,21	9,27	0,69

Tabla D-4. Valores obtenidos de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=10,60 \text{ cm}^3/\text{min}$.

$Q=10,60$ cm^3/min	$C_E (\text{exp}) \times 10^9$ mol/cm^3	$\overline{C}_E (\text{calc}) \times 10^9$ mol/cm^3	% error
n=1	6,51	6,70	2,94
n=2	7,51	7,65	1,82
n=3	8,36	8,46	1,19
n=4	8,95	9,02	0,83
n=5	9,41	9,46	0,58

Tabla D-5. Valores obtenidos de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB para la proteína BSA en solución fosfato pH 4,5, $Q=14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$.

$Q=14$ cm^3/min	$C_E (\text{exp}) \times 10^9$ mol/cm^3	$\overline{C}_E (\text{calc}) \times 10^9$ mol/cm^3	% error
n=1	6,44	6,64	3,06
n=2	6,97	7,13	2,37
n=3	7,44	7,58	1,89
n=4	7,81	7,93	1,58
n=5	8,33	8,43	1,21

Tabla D-6. Valores normalizados de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB para la proteína BSA en solución fosfato.

BSA Normalizado	$C_E (\text{exp}) \times 10^9$ mol/cm^3	$\overline{C}_E (\text{calc}) \times 10^9$ mol/cm^3	% error
n=1	7,06	7,20	1,88
n=2	7,44	7,56	1,57
n=3	7,92	8,02	1,24
n=4	8,35	8,43	0,99
n=5	8,77	8,83	0,78

Tabla D-7. Valores obtenidos de la concentración en equilibrio experimental vs obtenida por el modelo MATLAB, para la proteína BSA en tampón fosfato pH 7,0, $Q=14,00 \text{ cm}^3/\text{min}$.

$Q=14,00$ cm^3/min	C_E (exp) $\times 10^9$ mol/cm^3	\overline{C}_E (calc) $\times 10^9$ mol/cm^3	% error
n=1	6,22	6,42	3,18
n=2	7,23	7,38	2,02
n=3	7,98	8,09	1,42
n=4	8,92	8,99	0,84
n=5	9,77	9,81	0,40

Tabla D-8. Valores obtenidos de la concentración en equilibrio, experimental vs obtenida por el modelo MATLAB, para la proteína CAT en tampón PBS pH 7,4, $Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$ y concentración $0,7 \text{ mg}/\text{cm}^3$.

CAT	C_E (exp) $\times 10^9$ mol/cm^3	\overline{C}_E (calc) $\times 10^9$ mol/cm^3	% error
n=1	2,35	2,37	0,93
n=2	2,37	2,39	0,88
n=3	2,43	2,45	0,73
n=4	2,50	2,51	0,57
n=5	2,56	2,57	0,45

Tabla D-9. Valores obtenidos de la concentración en equilibrio experimental vs obtenida por el modelo MATLAB, para la proteína BSA en tampón PBS pH 7,4, $Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, proveniente de la separación de dos biomoléculas.

BSA	C_E (exp) $\times 10^9$ mol/cm^3	\overline{C}_E (calc) $\times 10^9$ mol/cm^3	% error
n=1	7,55	7,70	1,96
n=2	7,68	7,82	1,82
n=3	8,16	8,27	1,39
n=4	8,29	8,40	1,29
n=5	8,49	8,59	3,52

Tabla D-10. Valores obtenidos de la concentración en equilibrio experimental vs obtenida por el modelo MATLAB, para la enzima CAT en tampón PBS pH 7,4, $Q=1,50 \text{ cm}^3/\text{min}$, proveniente de la separación de dos biomoléculas.

CAT	$C_E \text{ (exp)} \times 10^9$ mol/cm ³	$\overline{C}_E \text{ (calc)} \times 10^9$ mol/cm ³	% error
n=1	2,33	2,35	0,99
n=2	2,35	2,37	0,94
n=3	2,39	2,41	0,83
n=4	2,46	2,48	0,66
n=5	2,47	2,49	0,64

ANEXO E

Diagrama de flujo del modelo de transferencia de
materia simulado mediante la plataforma
MATLAB

Anexo E.

A continuación se muestra en la figura E-1; el diagrama de flujo del proceso de cálculo derivado del modelo empleado para la estimación de coeficientes cinéticos y de transferencia de materia. El programa incluye todos los pasos indicados en el diagrama.

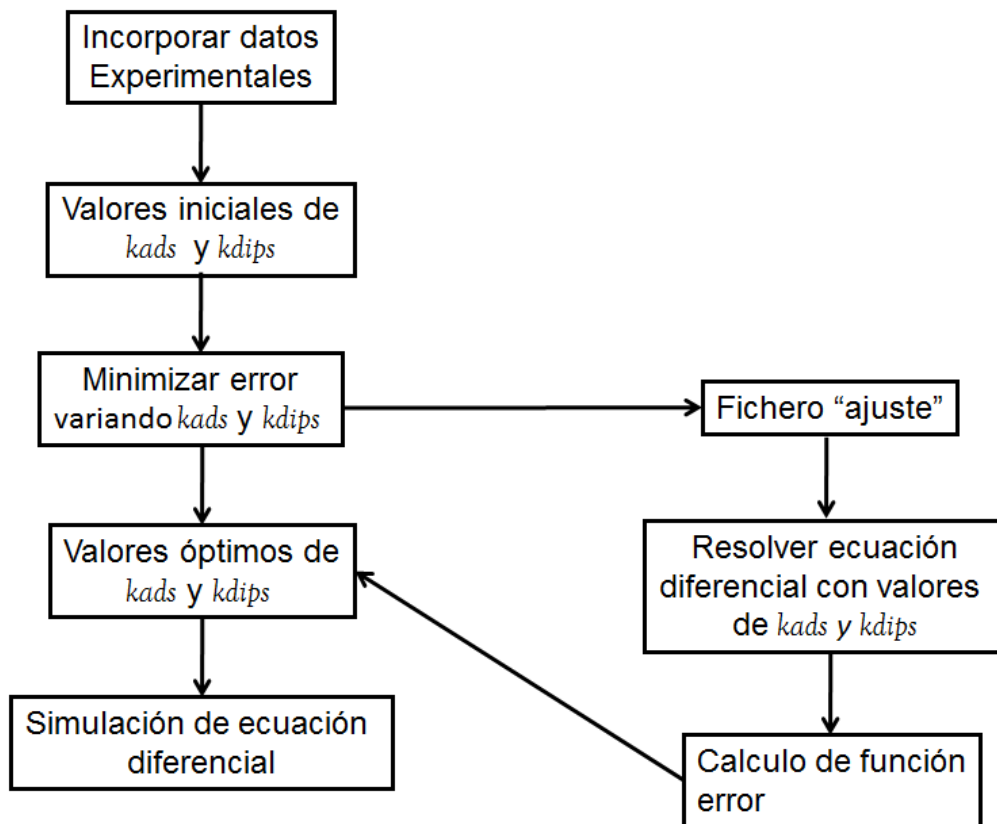


Figura E-1. Diagrama de flujo del proceso de cálculo.

Los listados de programas utilizados en el cálculo mediante la plataforma MATLAB se presentan a continuación.

Los listados de programas utilizados en el cálculo mediante la plataforma MATLAB se presentan a continuación:

MODELO: PROGRAMA CINADSOR

```
function Cpunto=cinadsor(t,C)
% Simula la Ec diferencial de una
% cinetica de adsorcion
global kdisp kads
Cpunto=((C-7.70e-9)*(C+9.02e-10))/-(1/((kdisp/0.237)/(7.64e-10-(1.06e-8-
C)*0.237)))+(1/kads));
```

PROGRAMA ESTIMA

```
% Consider the following data:
global Data
Data = ... [ ];
t = Data(:,1);
y = Data(:,2);

kdisp=2.05e-4
kads=1.27e6
lam = [kdisp kads]';
trace = 0;
tol = 1e-11;
lambda = fmins('ajus755',lam,[trace tol])
kdisp=lambda(1);
kads=lambda(2);
[ts,Cs]=ode45('cinad755',min(t),max(t),y(1));
plot(t,y,'oy',ts,Cs,'g')
hold off
echo off
```

PROGRAMA AJUSTE

```
function err = ajuste2(lambda)
%lambda(1)=kdisp
%lambda(2)=kads
```

```
global Data kdips kads

tr = Data(:,1);
Cr = Data(:,2);
kdisp=lambda(1);
kads=lambda(2);
%t0=min(tr)
%tf=max(tr)
%C0=Cr(1)
[ts,Cs]=ode45('cinad755',min(tr),max(tr),Cr(1));
Cs2=zeros(size(tr));
for k=1:length(tr)
    ind=min(find(ts>=tr(k)));
    Cs2(k)=Cs(ind);
end
err = norm(Cs2-Cr);
```


ANEXO F

Modelo matemático empleado en la técnica ITC

Anexo F.

A continuación se muestra el modelo matemático utilizado para obtener mediante la técnica ITC, la constant de equilibrio de enlace K_b , la entalpía de enlace ΔH y la estequiometría de la reacción n_b , a presión y temperature constante, para el enlace de la biomoléculas descritas anteriormente.

MAIN FUNCTION

A = MolesSyringe(i)

B = MolesCell(i)*n

C = -K*A-K*B*(CellVolume(i)/1e6)

Bound = (-C-sqr(C*C-4*K*K*A*B))/(2*K)

if OverfillMode then

OldBound= OldBound*(CellVolume(i)/(CellVolume(i)+InjectionVolume(i)))

end if

y = 1e9*(Bound-OldBound)*dH

OldBound = Bound

i = i + 1

GLOBAL

Option Explicit

Dim i

Dim OldBound

Dim OverfillMode

Dim A

Dim B

Dim C

Dim Bound

CONSTANT

'Constants are automatically initialized whenever a model is used.

Const DefaultInjVol = 5

Const InitTitrateVol = 950

Const TitrantmM = 1

Const TitratemM = 0.1