

TRABAJO FIN DE GRADO

RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE PROTEÍNAS MEDIANTE PARTÍCULAS DE ALGINATO SÓDICO



Claudia Barbuzano Armas

Tutora: Carmen M. Évora García

Cotutor: Edgar Pérez Herrero

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Facultad Ciencias de la Salud, Sección Farmacia
Dpto. Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica

Grado en Farmacia

ÍNDICE

ABSTRACT

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales.

2.2. Métodos.

2.2.1. Método analítico.

2.2.2. Generación de partículas con proteína mediante impresión molecular no
– covalente (MIP) y sin proteína (NIP).

2.2.3. Eliminación de la molécula plantilla (proteína).

2.2.4. Proceso de reconocimiento de la proteína.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Validación de los métodos analíticos.

3.2. Generación partículas MIP y NIP.

3.3. Eliminación de la molécula plantilla.

3.4. Proceso de reconocimiento de la proteína.

4. CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ABSTRACT

Molecular imprinting is a technique that allows to obtain polymers that are able to recognize, bind or selectively absorb that molecule. It is a method that has been successfully used for the recognition of small molecules in chemical detection tests, catalysis processes, separation processes and as an analytical tool, among others. However, the application of this technique in the field of health sciences, for the recognition of large molecules (like proteins) presents more complications, being precisely in this aspect in which the present work is focused.

In this work, alginate – based particles with molecular recognition characteristics in order to selectively absorb a model protein (bovine serum albumin, BSA) have been generated. For this purpose, the protein was non – covalently bound to the polymer structure through electrostatic interactions, before the generation of the particles by ionic gelation, a technique that is easy to perform and use, unlike the classical techniques employed for the production of molecularly printed polymers (MIPs), only sodium alginate and calcium chloride, biocompatible, non – toxic, and non-carcinogenic compounds, making this technique highly applicable in biomedical and food fields. To create the template within the particles, the protein was completely extracted by an elution solution, in such a way that the particles were endowed with highly specific recognition sites for the protein for which it was imprinted. Likewise, to verify the acquisition of such specificity, those particles were subjected to a recognition process, where the results obtained reflect a maximum recognition capacity of 1.3 mg of protein per gram of particles.

RESUMEN

La impresión molecular es una técnica que permite obtener polímeros con capacidad de reconocer, unir o secuestrar selectivamente aquella molécula para cuya selectividad han sido diseñados. Se trata de un método que se ha utilizado con éxito para el reconocimiento de moléculas pequeñas en ensayos de detección química, procesos de catálisis, procesos de separación y como herramienta analítica, entre otras. Sin embargo, la aplicación de esta técnica en el campo de las ciencias de la salud, para el reconocimiento de moléculas de mayor tamaño, como las proteínas, presenta más complicaciones, siendo precisamente en este aspecto en el que se centra el presente trabajo^[1,2].

En este trabajo se han generado partículas basadas en alginato con características de reconocimiento molecular capaces de absorber selectivamente una proteína modelo (albúmina de suero bovino, BSA). Para ello, la proteína se unió de forma no covalente a la estructura del polímero a través de interacciones electrostáticas, antes de la generación de las partículas por gelificación iónica, una técnica de fácil realización, y que, a diferencia de las técnicas clásicas empleadas para la producción de polímeros impresos molecularmente (MIPs), los únicos materiales utilizados son alginato sódico y cloruro cálcico, compuestos biocompatibles, no tóxicos y no carcinógenos, y que la hace de gran aplicabilidad en campos biomédicos y alimenticios. Para crear la plantilla dentro de las partículas, la proteína fue extraída por completo mediante una solución de elución, de tal forma que las partículas fueron dotadas de lugares de reconocimiento altamente específicos para la proteína para la que fue impreso^[2,3]. Asimismo, para verificar la adquisición de tal especificidad, esas mismas partículas fueron sometidas, posteriormente, a un proceso de reconocimiento, donde los resultados obtenidos reflejan una capacidad de reconocimiento máxima de 1,3 mg de proteína por gramo de partículas.

1. INTRODUCCIÓN

La publicación del científico Polyakov en 1931 acerca de los efectos que pueden tener diferentes disolventes sobre la estructura de los poros durante el secado de una sílice recién preparada, podría decirse que marcó el comienzo en la comunidad científica de una nueva tecnología conocida como impresión o reconocimiento molecular^[4].

La impresión molecular es una técnica innovadora que permite originar lugares de reconocimiento altamente específicos y afines a una molécula concreta dentro de matrices poliméricas, similares a ciertos sistemas naturales, tales como anticuerpos y receptores biológicos o sistemas de enzima – sustrato. Para conseguir esta especificidad se debe llevar a cabo una polimerización o entrecruzamiento en presencia de aquella molécula que posteriormente se quiera reconocer (molécula plantilla o molde), la cual es a posteriori extraída, quedando así en el polímero cavidades que son complementarias, en tamaño y forma, a la molécula plantilla. Las interacciones que se establecen entre el polímero y la molécula plantilla, las cuales pueden ser covalentes, no covalentes y semicovalentes, marcan la dinámica de eliminación de la molécula molde^[1,5,6].

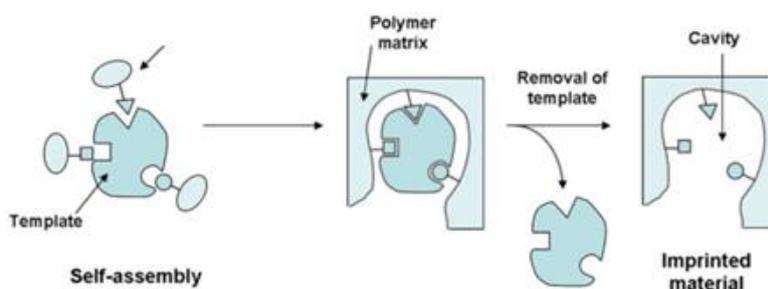


Figura 1. Esquema de preparación de polímeros impresos molecularmente (MIPs)^[7]

Se trata de una tecnología ampliamente estudiada para moléculas pequeñas (iones metálicos, herbicidas y aminoácidos), convirtiéndose en una herramienta muy útil en áreas como separación y purificación, sensores y biosensores, catálisis y terapia médica, siendo esta última donde mayor desafío se plantea. No obstante, su desarrollo con moléculas de mayor peso molecular (por ejemplo, las proteínas) ha presentado grandes dificultades^[1,2].

Con el objetivo de mejorar la aplicabilidad de estos polímeros impresos en áreas con fines médicos y alimenticios, como pueden ser el diagnóstico de enfermedades, administración de fármacos o detección en la industria alimentaria, es necesario partir de materiales biocompatibles que no sean tóxicos y/o carcinógenos y utilizar técnicas de generación de las partículas que no utilicen condiciones drásticas para su generación,

como disolventes orgánicos, calentamiento o fuerzas de homogenización de alta cizalla^[2].

En este sentido, los alginatos, que son polisacáridos lineales hidrosolubles derivados de algas pardas y compuestos por cantidades variables de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico, podrían considerarse un excelente material de partida en la impresión molecular, pues presentan una gran biocompatibilidad y biodegradabilidad. Su composición, en cuanto a la relación entre las unidades manurónico/gulurónico y la secuencia de los mismos, varían dependiendo de la fuente de la cual proviene el polisacárido. En contacto con cationes divalentes, como el calcio, se generan interacciones que conllevan la gelificación de soluciones acuosas de alginato. Este tipo de asociaciones que se establecen siguen el modelo conocido como “modelo caja de huevos” (‘eggs – box model’), el cual ilustra cómo los cationes de calcio se disponen entre dos cadenas lineales de alginato, estabilizándose la estructura mediante uniones con las unidades de β -D-manurónico^[2,8,9].

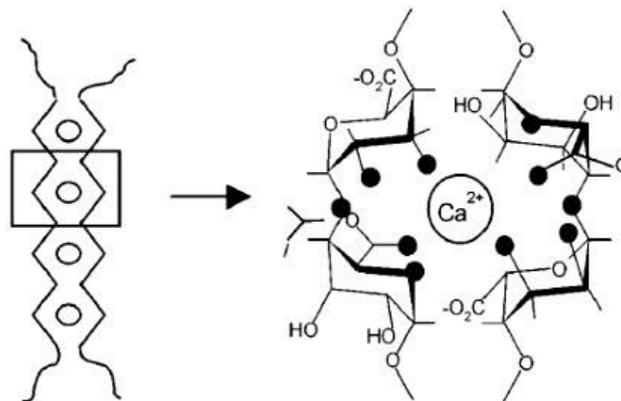


Figura 2. Modelo de “caja de huevos” (‘eggs – box model’) que explica la interacción entre los iones Ca^{2+} con las unidades de β -D-manurónico presentes en el alginato^[9]

El **objetivo** de este trabajo es generar partículas basadas en alginato con características de reconocimiento molecular selectivo de una proteína modelo, la albúmina sérica bovina (BSA). Para ello, previamente a la generación de las partículas, la proteína se unió a la estructura del polímero a través de interacciones electrostáticas, teniendo en cuenta el punto isoeléctrico de la misma. Para crear la plantilla dentro de las partículas, la proteína fue extraída por completo mediante una solución de elución a un pH muy superior al punto isoeléctrico de la misma, de tal forma que las partículas fueron dotadas de lugares de reconocimiento altamente específicos para la proteína para la que fue impreso^[2].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

El polisacárido empleado fue alginato sódico (Protanal® HF120 RBS, FMC Corporation, UK, distribuido por IMCD, Barcelona, España) con una viscosidad de 616 mPa·s y pH 6,7 a una concentración del 1% en agua a 20°C. La proteína de reconocimiento elegida, por su bajo coste, fue la albúmina de suero bovino (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA, con pureza mínima del 98% para electroforesis). Los medios acuosos utilizados en los distintos procesos estuvieron constituidos por agua ultrapura (MQ) y disoluciones acuosas de cloruro cálcico dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, peso molecular 147,02 g/mol, Merck KGaA, Alemania), Tris – hidroximetil – amino – metano y Tris – clorhidrato (Tris – buffer) (Trizma® Pre–set crystals, peso molecular 150,6 g/mol, pH 7,5, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA). Para ajustar los valores de pH requeridos en ciertas ocasiones, se empleó ácido clorhídrico diluido a partir del disponible comercialmente (HCl, 35%, $\rho = 1,185 \text{ kg/L}$, Panreac Química SA, Barcelona).

2.2 Métodos

2.2.1 Método analítico

Se utilizó un método espectrofotométrico a una longitud de onda de 280 nm, utilizando un espectrofotómetro UV – Vis Ultrospec 3300 Pro (Amersham Pharmacia Biotech, UK).

Para la validación del método analítico, se prepararon disoluciones patrón, a partir de tres disoluciones madre diferentes de 10 mg/ml de BSA, en un intervalo de concentraciones entre 50 $\mu\text{g/ml}$ hasta 3 mg/ml, en todos los medios en los que se analiza la proteína a lo largo del proceso de reconocimiento (agua MQ, CaCl_2 al 2% w/v, tris – buffer 0,05M pH 7,4 con CaCl_2 al 1% w/v y tris – buffer 0,05M pH 7,4), con el único objetivo de poder determinar posteriormente la cantidad de proteína liberada o absorbida. Las disoluciones patrón se analizaron en tres días diferentes a lo largo de una semana y el método se validó de acuerdo al análisis de la varianza (ANOVA).

2.2.3 Generación de partículas con proteína mediante impresión molecular no – covalente (MIP) y sin proteína (NIP)

Se preparó una disolución de proteína (BSA) de 10 mg/mL en agua MQ ajustada a un pH 4,2. Posteriormente, a esta disolución se incorporó la cantidad suficiente de alginato sódico hasta obtener una concentración del 2% w/v.

Para generar las partículas impresas (MIP), aproximadamente unos 3 ml de la solución alginato/BSA se incorporó gota a gota en una disolución de CaCl_2 al 2% w/v con la ayuda de una jeringa provista con aguja de 20 G, que fue pesada antes y después del proceso

para determinar la masa de partículas producidas. Las partículas generadas se mantuvieron en agitación durante 2 minutos y posteriormente se filtraron a través de filtros de membrana de 0,45 μm (Pall Corporation, Sigma – Aldrich, México). La cantidad de proteína no incorporada durante el proceso de generación de las partículas fue determinada espectrofotométricamente analizando el sobrenadante.

Por otra parte, también se generaron de la misma manera partículas blancas, sin BSA, denominadas como partículas NIP (non – imprinted polymers).

2.2.3 Eliminación de la molécula plantilla (proteína)

Las partículas anteriormente generadas se pusieron en contacto con soluciones de elución de tris – buffer 0,05M, pH 7,4, en agua MQ, con y sin CaCl_2 al 1% w/v, y se sometieron a procesos combinados de agitación magnética y recirculación continua mediante el uso de bombas peristálticas. Después de cada proceso, el medio se renovó, previa filtración de las partículas, y se analizó el sobrenadante mediante espectrofotometría para hacer un seguimiento de las cantidades de proteína que se iba eliminando hasta que éstas fueran indetectables.

Tras el proceso de eliminación de la molécula plantilla, las partículas se almacenaron a 4°C durante varios días en agua MQ que fue renovada cada día, para permitir el proceso de hinchamiento y la liberación de la proteína residual que pueda permanecer en las mismas.

Las partículas denominadas NIP fueron sometidas al mismo proceso, para así mantener las mismas condiciones que las partículas MIP.

2.2.4 Proceso de reconocimiento de la proteína

Para verificar la capacidad de reconocimiento de las partículas, se introdujo una cantidad conocida de partículas hidratadas, previa retirada del exceso de humedad superficial con papel de filtro, en un frasco conteniendo 30 mL de una disolución de BSA de 1 mg/mL y se mantuvieron bajo agitación orbital (Grant Bio – POS 300) a temperatura ambiente. Este proceso se realizó tanto con las partículas MIP como con las NIP.

Asimismo, para este ensayo, una cierta cantidad de partículas NIP, se dispersaron en 30 mL de agua MQ, utilizándose como blanco (partículas control), para restar la posible interferencia en la absorbancia (280 nm) debida a la degradación del alginato con el paso del tiempo.

A lo largo del tiempo, de cada una de las tres suspensiones de partículas (MIP, NIP y Control) se tomó una alícuota (1 mL), se filtró, utilizando filtros de jeringa de 0,45 μm (Acrodisc® 25 mm Syringe Filter, Pall Corporation, South Wagner Road, USA) para eliminar restos de alginato, y se determinó la absorbancia a 280 nm. Las medidas se continuaron hasta que las concentraciones de albúmina en el medio se mantuvieron constantes, lo que indica que se ha alcanzado el máximo de absorción por cada tipo de partículas.

La capacidad de reconocimiento de las partículas fue determinada comparando los resultados obtenidos de las partículas MIP y NIP.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Validación de los métodos analíticos

En las Figuras 3 – 6 se muestran las distintas rectas de calibrado absorbancia – concentración de BSA en los diferentes medios empleados durante el proceso de generación de las partículas de alginato y eliminación y reconocimiento de BSA. Asimismo, adjunto a cada figura se muestran los correspondientes análisis de varianza (ANOVA) de la regresión (Tablas 1 – 4).

A partir de los resultados de los análisis de varianza se puede indicar que en todos los casos el modelo lineal propuesto es correcto.

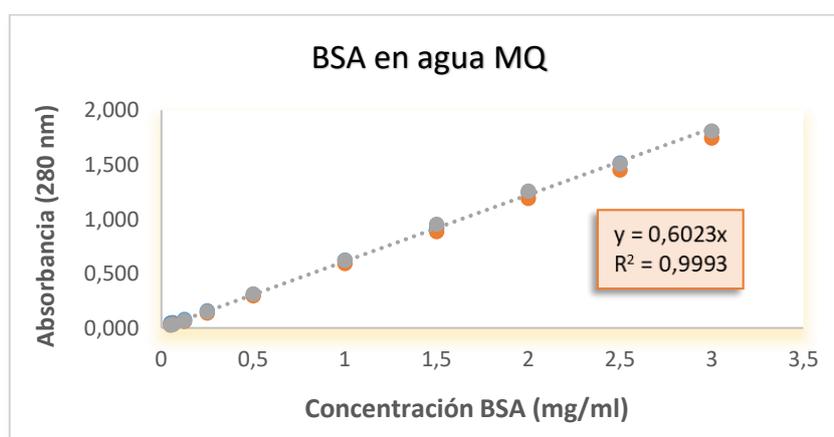


Figura 3. Recta de calibrado de BSA en agua MQ

Tabla 1. Análisis de la varianza de la regresión lineal del BSA en agua MQ.

| Origen de variación | Suma de cuadrados (SC.) | Grados de libertad (g.l) | Cuadrados medios (C.M) | F calculadas |
|---------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|--------------|
| Total | 11,621 | 29 | | |
| Regresión | 11,605 | 1 | 11,605 | 20358,143 |
| Residual | 0,016 | 28 | $6 \cdot 10^{-4}$ | |
| D.L | 0,005 | 8 | $5,89 \cdot 10^{-4}$ | 1,0472 |
| Error puro | 0,011 | 20 | $5,62 \cdot 10^{-4}$ | |

| Hipótesis ensayada | Estadístico calculado | Estadístico tabulado ($\alpha = 0,05$) | Decisión |
|---|-----------------------|--|---|
| $H_0: \beta_0 = 0$ $H_1: \beta_0 \neq 0$ | $t_{cal} = 0,914$ | $t_{tab} = 2,048$ | Acepto hipótesis nula ($b_0 = 0$) |
| $H_0: \beta_1 = 0$ $H_1: \beta_1 \neq 0$ | $F_{cal} = 20358,143$ | $F_{tab} = 4,2$ | Rechazo hipótesis nula ($b_1 \neq 0$) |
| H_0 : No existe D.L H_1 : Existe D.L | $F_{cal} = 1,0472$ | $F_{tab} = 2,45$ | Acepto hipótesis nula (\nexists D.L) |

Coefficiente de variación del método (CV) = 3,646%

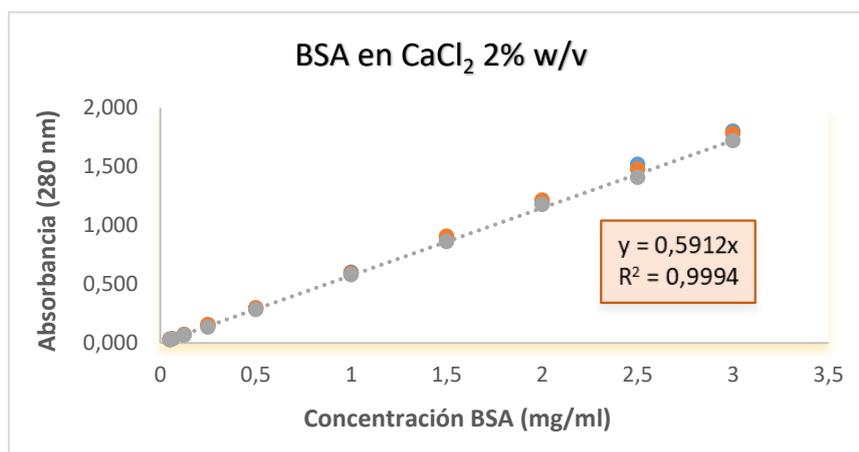


Figura 4. Recta de calibrado de BSA en CaCl₂ 2% w/v

Tabla 2. Análisis de la varianza de la regresión lineal del BSA en CaCl₂ 2% w/v

| Origen de variación | Suma de cuadrados (SC.) | Grados de libertad (g.l) | Cuadrados medios (C.M) | F calculadas |
|---------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|--------------|
| Total | 11,267 | 29 | | |
| Regresión | 11,254 | 1 | 11,254 | 23215,788 |
| Residual | 0,014 | 28 | $4,9 \cdot 10^{-4}$ | |
| D.L | 0,0010 | 8 | $1,24 \cdot 10^{-4}$ | 0,1968 |
| Error puro | 0,013 | 20 | $6,29 \cdot 10^{-4}$ | |

| Hipótesis ensayada | Estadístico calculado | Estadístico tabulado ($\alpha = 0,05$) | Decisión |
|---|------------------------------|--|---|
| H ₀ : $\beta_0 = 0$ H ₁ : $\beta_0 \neq 0$ | t _{cal} = 0,305 | t _{tab} = 2,048 | Acepto hipótesis nula ($b_0 = 0$) |
| H ₀ : $\beta_1 = 0$ H ₁ : $\beta_1 \neq 0$ | F _{cal} = 23215,788 | F _{tab} = 4,2 | Rechazo hipótesis nula ($b_1 \neq 0$) |
| H ₀ : No existe D.L H ₁ : Existe D.L | F _{cal} = 0,1968 | F _{tab} = 2,45 | Acepto hipótesis nula (\nexists D.L) |

Coefficiente de variación del método (CV) = 3,390%

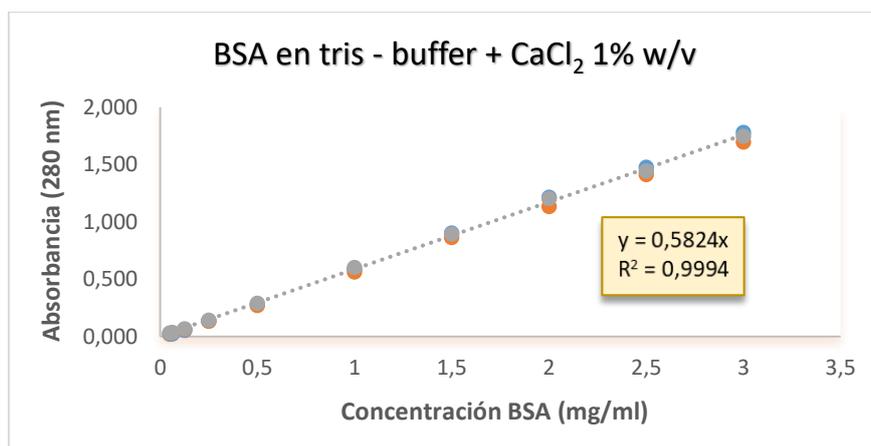


Figura 5. Recta de calibrado de BSA en tris – buffer 0'05M pH 7'4 CaCl₂ 1% w/v

Tabla 3. Análisis de la varianza de la regresión lineal del BSA en tris – buffer 0'05M pH 7,4 CaCl₂ 1% w/v

| Origen de variación | Suma de cuadrados (SC.) | Grados de libertad (g.l) | Cuadrados medios (C.M) | F calculadas |
|---------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|--------------|
| Total | 11,049 | 29 | | |
| Regresión | 11,035 | 1 | 11,035 | 21726,724 |
| Residual | 0,014 | 28 | $5 \cdot 10^{-4}$ | |
| D.L | 0,003 | 8 | $3,6 \cdot 10^{-4}$ | 0,6345 |
| Error puro | 0,011 | 20 | $5,67 \cdot 10^{-4}$ | |

| Hipótesis ensayada | Estadístico calculado | Estadístico tabulado ($\alpha = 0,05$) | Decisión |
|---|-----------------------|--|---|
| H ₀ : $\beta_0 = 0$ H ₁ : $\beta_0 \neq 0$ | $t_{cal} = -0,767$ | $t_{tab} = 2,048$ | Acepto hipótesis nula ($b_0 = 0$) |
| H ₀ : $\beta_1 = 0$ H ₁ : $\beta_1 \neq 0$ | $F_{cal} = 21726,724$ | $F_{tab} = 4,2$ | Rechazo hipótesis nula ($b_1 \neq 0$) |
| H ₀ : No existe D.L H ₁ : Existe D.L | $F_{cal} = 0,6345$ | $F_{tab} = 2,45$ | Acepto hipótesis nula (\nexists D.L) |

Coefficiente de variación del método (CV) = 3,571%

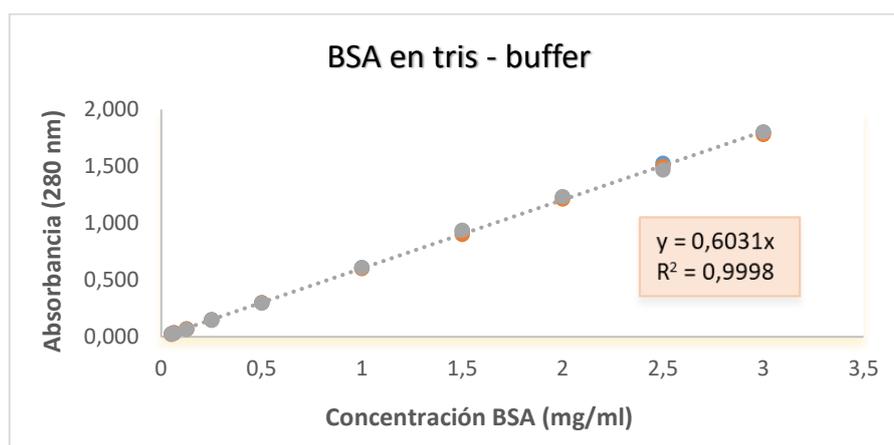


Figura 6. Recta de calibrado de BSA en tris – buffer 0'05M pH 7'4

Tabla 4. Análisis de la varianza de la regresión lineal del BSA en tris – buffer 0’05M pH 7’4

| Origen de variación | Suma de cuadrados (SC.) | Grados de libertad (g.l) | Cuadrados medios (C.M) | F calculadas |
|---------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|--------------|
| Total | 11,738 | 29 | | |
| Regresión | 11,733 | 1 | 11,733 | 58048,856 |
| Residual | 0,006 | 28 | $2,02 \cdot 10^{-4}$ | |
| D.L | 0,0028 | 8 | $3,47 \cdot 10^{-4}$ | 2,4039 |
| Error puro | 0,0029 | 20 | $1,44 \cdot 10^{-4}$ | |

| Hipótesis ensayada | Estadístico calculado | Estadístico tabulado ($\alpha = 0,05$) | Decisión |
|---|-----------------------|--|---|
| $H_0: \beta_0 = 0$ $H_1: \beta_0 \neq 0$ | $t_{cal} = 0,167$ | $t_{tab} = 2,048$ | Acepto hipótesis nula ($b_0 = 0$) |
| $H_0: \beta_1 = 0$ $H_1: \beta_1 \neq 0$ | $F_{cal} = 58048,856$ | $F_{tab} = 4,2$ | Rechazo hipótesis nula ($b_1 \neq 0$) |
| $H_0: \text{No existe D.L}$ $H_1: \text{Existe D.L}$ | $F_{cal} = 2,048$ | $F_{tab} = 2,45$ | Acepto hipótesis nula (\nexists D.L) |

Coefficiente de variación del método (CV) = 2,145%

Tal y como era de esperar, al tratarse de medios acuosos, las pendientes obtenidas en las cuatro rectas de calibrado fueron similares. Esto permitirá, en futuros ensayos, hacer las determinaciones a partir de la aplicación de una sola de ellas, por ejemplo, la realizada en agua, usando como blanco el medio correspondiente. No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo se obtuvieron a partir de la aplicación de las diferentes rectas.

3.2 Generación partículas MIP y NIP

En este trabajo se plantea una técnica de impresión de proteínas basada en la generación de partículas de alginato de sodio mediante gelificación iónica. Se trata de una técnica simple y rápida, en la que no hay más productos químicos añadidos que alginato de sodio y cloruro de calcio. El proceso de preparación es bastante sencillo en comparación con los procesos de polimerización tradicionales y, además, es una técnica que permite obtener poros uniformes con un tamaño fácilmente controlable. De hecho, se aprovecha la propiedad de gelificación del alginato para la obtención de MIPs.

Los grupos hidroxilo y carbonilo del alginato permiten interacciones dipolo – dipolo, enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas con la proteína a reconocer, en este caso BSA, para posteriormente llevar a cabo el proceso de entrecruzamiento entre

el alginato de sodio y los iones de calcio, quedando así las moléculas de proteína retenidas dentro de la red^[2]. Por tanto, en este paso, se consigue la unión no – covalente de los grupos carboxílicos del alginato con la molécula plantilla (proteína).

Con el fin de obtener interacciones electrostáticas entre el alginato y la proteína se debe conseguir que esta última adquiera carga neta positiva, lo cual se logra ajustando el pH de la disolución de proteína a un valor inferior al punto isoeléctrico de la misma (PI = 4,7 para la BSA). Es por este motivo por el que se ajustó el pH del medio, donde va disuelta la proteína, a 4,2.

Durante la generación de tales partículas la eficiencia media de encapsulación del BSA en las mismas fue de un $69,326\% \pm 7,468$.

3.3 Eliminación de la molécula plantilla

El objetivo final de este paso es romper el enlace no – covalente entre el BSA y las cadenas de alginato, para así eliminar la proteína de las partículas generadas anteriormente y producir la plantilla (template).

Gracias al pH de 7,4 de la solución de elución, el BSA que estaba cargado positivamente, pasa a ser una molécula con carga neta negativa, de manera que se reducen las interacciones de ésta con las cadenas de alginato, cargadas negativamente. Por otro lado, el calcio incluido en la solución de elución interacciona con la proteína forzándola a difundir hacia fuera de las partículas.

Es importante tener en cuenta que el tiempo de este proceso de eliminación ha de ser reducido al mínimo al utilizar una solución de elución que contiene CaCl_2 que puede engrosar la membrana de las partículas desde fuera hacia dentro por difusión de los cationes de calcio a través de la membrana porosa, dificultando el proceso posterior de reconocimiento. Por este motivo, la solución de elución completa, anteriormente descrita, se utilizó durante menos de cuatro horas, para posteriormente, durante las siguientes 24 horas emplear una solución de elución basada exclusivamente en tris – buffer 0,05M pH 7,4.

Como se describió anteriormente, después del proceso de eliminación de la proteína, las partículas se mantuvieron a 4°C en agua MQ durante varios días para permitir el proceso de hinchamiento y recuperación del tamaño que tenían antes de ser sometidas al proceso de eliminación, de tal manera que puedan incorporar la proteína en el posterior proceso de reconocimiento. Además, en este paso se permite la liberación de la proteína residual que pueda permanecer en las mismas.

La cantidad de proteína eliminada a lo largo del proceso se recoge en la Figura 7, en la cual se representa los porcentajes medios de proteína que se elimina en cada una de las etapas que componen el proceso de eliminación.

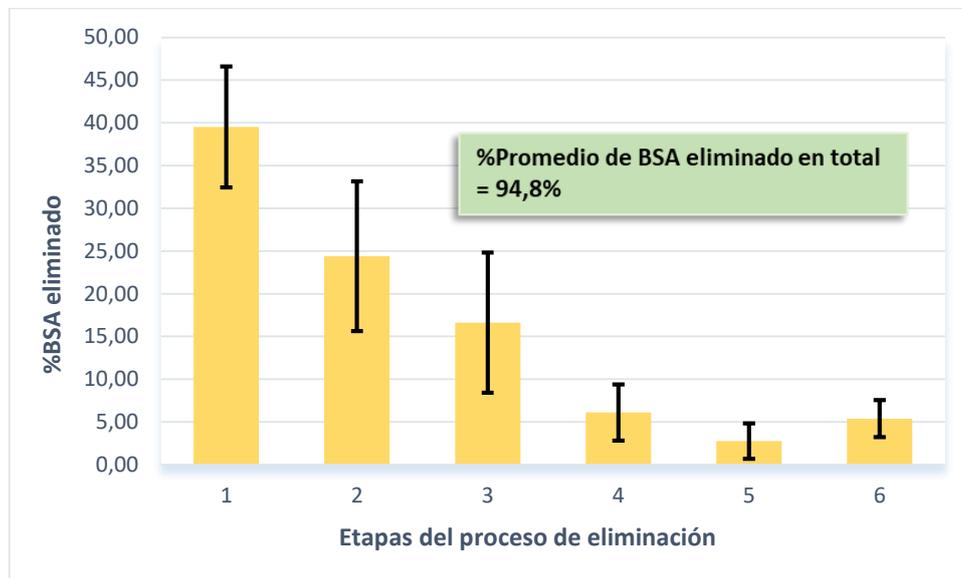


Figura 7. Cantidad de BSA eliminada a través de las distintas etapas del proceso de eliminación: (1) 20 minutos en agitación con tris – buffer, CaCl₂ 1%; (2) 1 hora en agitación junto con recirculación usando bombas peristálticas en tris – buffer, CaCl₂ 1%; (3) 2 horas en agitación en tris – buffer, CaCl₂ 1%; (4) 20 minutos en agitación junto con recirculación en tris – buffer, CaCl₂ 1%; (5) 24 horas en tris –buffer; (6) 3 días en agua con renovación diaria de la misma.

Como se puede observar en la Figura 7, a lo largo del proceso de eliminación de la proteína, las primeras etapas son esenciales, ya que es donde mayor cantidad de proteína se elimina, mientras que a medida que va pasando el tiempo tal cantidad se ve disminuida. Asimismo, también es importante la duración y el procedimiento que se lleva a cabo, es decir, el tiempo que se tiene en agitación y/o recirculación con bomba peristáltica con una solución u otra, ya que, por ejemplo, al combinar ambos procesos se consigue eliminar una mayor cantidad de proteína en etapas avanzadas que si exclusivamente permanecieran en agitación (datos no mostrados), además de que una agitación muy intensa puede deteriorar las partículas.

3.4 Proceso de reconocimiento de la proteína

Las partículas presentadas en este trabajo y sometidas al proceso descrito con anterioridad son capaces de reconocer hasta 1,3 mg de BSA por gramo de partículas, obteniéndose tal resultado por diferencia entre lo que son capaces de reconocer las MIP con respecto a las NIP, y que está de acuerdo con los datos recogidos en la bibliografía sobre el tema^[2,3]. Esta capacidad de reconocimiento puede observarse en la Figura 8.

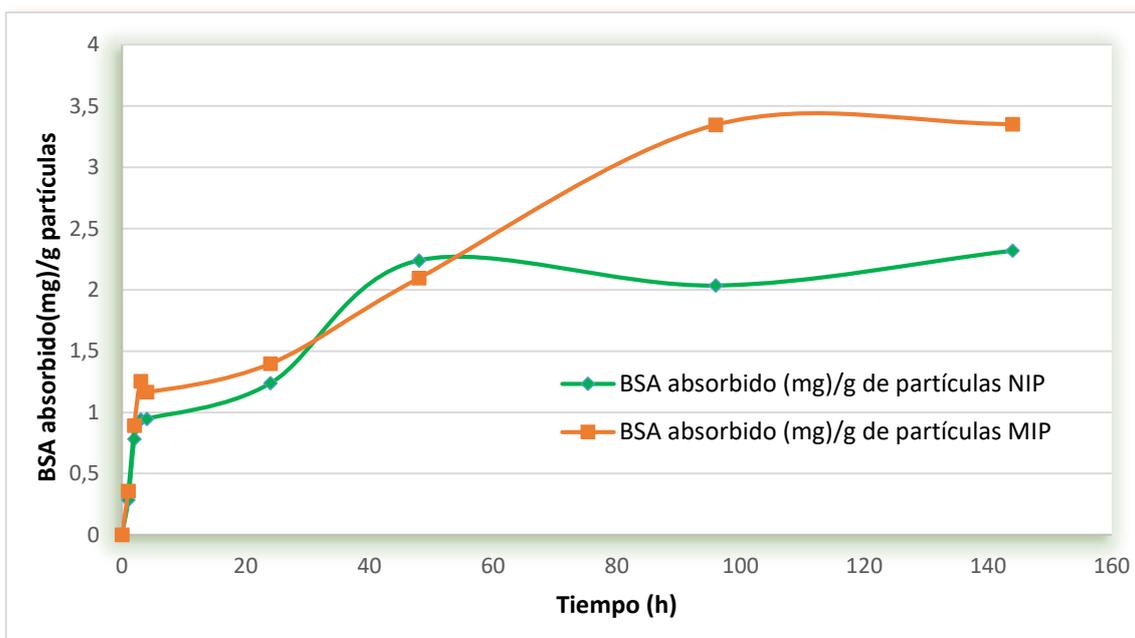


Figura 8. Representación de las cantidades de BSA absorbido (mg) por g de partículas MIP y NIP a lo largo del tiempo.

Con el fin de verificar que este procedimiento propuesto permite obtener partículas de alta especificidad de reconocimiento, sería conveniente realizar en un futuro este último proceso con otras proteínas, para así poder comparar la absorción específica de BSA frente a la absorción no específica de otras proteínas.

Otro de los factores que podría mejorar el proceso de reconocimiento molecular sería la disminución del tamaño de las partículas, para así aumentar su superficie específica y por lo tanto, aumentar su capacidad de absorción.

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha logrado generar partículas de polímeros impresos molecularmente (MIP) capaces de reconocer una proteína modelo (BSA) mediante la técnica de gelificación iónica del alginato de sodio.

Las partículas de alginato generadas y sometidas a los procedimientos descritos en este trabajo son capaces de reconocer una cantidad máxima de 1,3 mg de BSA por gramo de partículas, que está de acuerdo con lo reportado en la literatura sobre el tema.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Vasapollo, G.; Del Sole, R.; Mergola, L.; Lazzoi, M. R.; Scardino, A.; Scorrano, S.; Mele, G. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal Molecular Science*, **(2011)**, 12, 5908-5945.
- [2] Pérez, E.; Martín del Valle, E.M.; Peppas, N. A. Protein Imprinting by Means of Alginate-Based Polymer Microcapsules. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **(2010)**, 49, 9811–9814.
- [3] Bayer, C. L.; Pérez, E.; Peppas, N. A. Alginate Films as Macromolecular Imprinted Matrices. *Journal of Biomaterials Science* **(2011)**, 22, 1523–1534.
- [4] Lingxin, C.; Wang, X.; Lu, W.; Wua, X.; Lia, J. Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chemical Society Reviews*, **(2016)**, 45, 2137-2211.
- [5] Barranco, A.; Argarate, N.; Baliño L. ELIKAMIP – Desarrollo de polímeros de impresión molecular (MIP) para la detección y eliminación de contaminantes químicos en alimentos líquidos. *Convenio AZTI/DAPA*, Informe final, **(2007)**.
- [6] Janiak, D.S.; Kofinas, P. Molecular imprinting of peptides and proteins in aqueous media. *Analytical and bioanalytical chemistry* **(2007)**, 389, 399-404.
- [7] Chen, L.; Muhammad, T.; Yakup, B.; Piletsky, S. A. New immobilisation protocol for the template used in solid-phase synthesis of MIP nanoparticles. *Applied Surface Science*, **(2017)**, 406, 115–121.
- [8] Rowley, J. A.; Madlambayan, G.; Mooney, D.J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, **(1999)**, 20, 45-53.
- [9] Méndez, D. A.; Quintero, J. P.; Váquiro, H. A.; Solanilla J. F. Alginato de sodio en el desarrollo de películas comestibles. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **(2014)**, 5, 89-113.