



SÍNTESIS QUÍMICA DE ADSORBENTES CROMATOGRÁFICOS HIDROFÓBICOS A BASE DE NANOESTRUCTURAS DENDRÍTICAS PARA LA SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS.

Javier Ceballos-Medina, Beatriz de los Santos-González, Sena Yaman, Canan Tari, Jesús Valencia-Gallegos, Marco Rito-Palomares, José González-Valdez, Marco Mata-Gómez, Tecnológico de Monterrey, Departamento de Bioingeniería y Ciencias, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Puebla, 72453, E-mail: mmatag@tec.mx

Palabras clave: dendrímero, cromatografía hidrofóbica, adsorbente

Introducción. El desarrollo de nuevos adsorbentes cromatográficos es de gran relevancia para la separación y recuperación de proteínas con mayor eficiencia en la industria biotecnológica. La modificación de la superficie de resinas u otros materiales con grupos químicos como ligandos para la generación de nuevos adsorbentes cromatográficos es un área de oportunidad para innovar. Es deseable que estos nuevos materiales tengan altas capacidades de adsorción, por lo tanto la elección del tipo de ligando es de gran importancia. De las diferentes modalidades, la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) es una técnica de gran importancia en el diseño de estrategias de separación de proteínas (1). En este contexto, se propone la incorporación de nano-estructuras dendríticas — moléculas ramificadas con arquitectura bien definida conocidas como dendrones (2)— activadas con ligandos hidrofóbicos en resinas de agarosa para aumentar la superficie de contacto entre la proteína de interés y el ligando, con la finalidad de mejorar la eficiencia en la separación y la capacidad de adsorción.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un adsorbente cromatográfico con estructuras ramificadas para la separación de proteínas mediante interacción hidrofóbica.

Metodología. Para la síntesis del adsorbente, primero se incorporó el dendrón (Bis-MPA de tercera o quinta generación, G3 ó G5) a la resina Sepharose™ 4 FF activada con NHS vía enlace amida en medio alcalino. Luego, el ácido valérico se esterificó a los grupos -OH del dendrón dejando libre una cadena hidrofóbica de cuatro átomos como ligando (Fig. 1). Se realizaron análisis de UV/Vis y FTIR del adsorbente para verificar la presencia del dendrón, y posteriormente se evaluó su capacidad de adsorción y su desempeño en la separación de ribonucleasa A (RNasa A) modificada con poli-etilen-glicol (PEG), conjugado proteína-PEG con propiedades terapéuticas, obtenida de acuerdo al método descrito por Mayolo-Deloisa *et al.* (3).

Resultados.

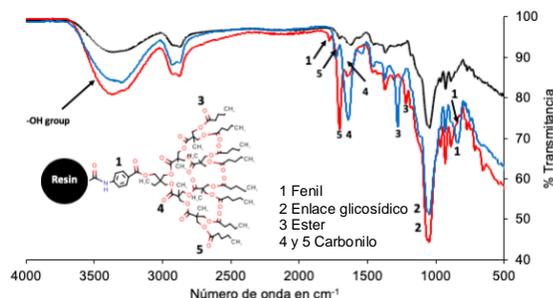


Fig. 1. Análisis FTIR de los adsorbentes dendronizados. Negro: resina sola; rojo: RG3; azul: RG5.

El análisis infrarrojo mostró la presencia de un banda intensa alrededor de los 1050 cm⁻¹ correspondiente al enlace glicosídico de la agarosa, lo que indica que la estructura de la resina se mantiene intacta después de la síntesis química. La presencia de grupos fenilo (~830 cm⁻¹) y carbonilo (1500-1730 cm⁻¹) en las resinas dendronizadas confirman la presencia del dendrón.

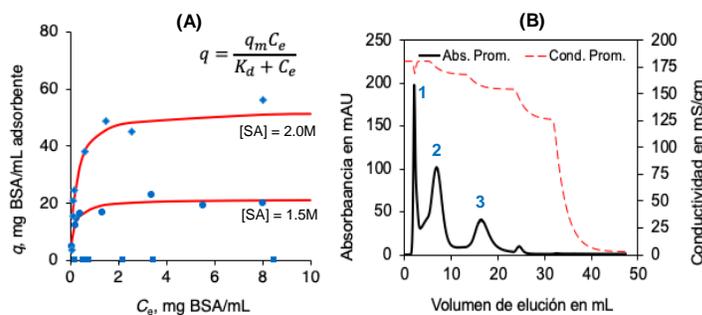


Fig. 2. (A) Modelo de Langmuir que describe la capacidad de adsorción en batch de la resina, [SA]=sulfato de amonio. (B) Separación de una mezcla de reacción de RNasa A PEGilada: 1 nativa, 2 mono-PEG, 3 di-PEG. La elución fue en gradiente por pasos a un flujo de 1.5 mL/min.

La máxima adsorción fue ~60 mg BSA/mL resina cuando se usó SA 1.5M (Fig. 1A). En la Fig. 2B se observan tres picos correspondientes a las varias especies PEGiladas de RNasa A. La Tabla 1 muestra la densidad de dendrón y ligandos en la superficie del adsorbente.

Tabla 1. Densidad de ligandos en la superficie del adsorbente.

Adsorbente	µmol dendrón/mL resina	µmol ligando/mL resina
RG3	10.1 ± 0.5	82.5 ± 4.2
RG5	5.6 ± 0.3	175.6 ± 5.6

Conclusiones. Se logró sintetizar químicamente un adsorbente con nano-estructuras dendríticas, el cual fue capaz de separar proteínas PEGiladas de ribonucleasa A de acuerdo a su hidrofobicidad conferida por el PEG. El adsorbente mostró una capacidad de adsorción comparable con resinas comerciales.

Agradecimientos. Los autores agradecen el financiamiento del GIEE en Bioprocesos (002EICIP01 y 0020DII001), el CONACyT (proyecto 242286 y beca No. 204152) y el fondo Marie Curie Actions (PIRSSES-GA 2010-269211).

Bibliografía.

- Mayolo-Deloisa K *et al.* (2012). *J. Chromatogr. A.* 1242:11–16
- Abbasi E *et al.* (2014). *Nanoscale Res. Lett.* 9(1):247–255
- Mayolo-Deloisa K, Gonzalez-Valdez J & Rito-Palomares M. (2016). *Biotechnol. Prog.* 32(3):702–707.

