



TESTEO DE COLORANTES TRIAZÍNICOS COMO LIGANDOS DE AFINIDAD EN SOPORTES DE QUITOSANO PARA LA PURIFICACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA DE INTESTINO DE POLLO

AUTORES

Baieli, María Fernanda; Wolman, Federico Javier

INSTITUCIÓN / ES

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC), UBA, CONICET, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Los inmunoensayos son herramientas fundamentales en el monitoreo y control de procesos biotecnológicos y en la práctica médica. La fosfatasa alcalina (AP) es una enzima ampliamente utilizada como marcador y amplificador de señal en inmunoensayos, así como en diversas aplicaciones analíticas y preparativas en biología molecular. Las principales fuentes de AP han sido *E. coli* y el intestino de ternero. Sin embargo, el intestino de pollo representa una fuente alternativa con gran potencial. Los métodos de purificación suelen ser complejos y requieren múltiples pasos. En este contexto, los colorantes triazínicos han demostrado ser ligandos de afinidad efectivos para una amplia gama de proteínas. Este trabajo se centró en la síntesis de matrices a base de quitosano con colorantes triazínicos inmovilizados, para la purificación de AP del intestino de pollo.

DESARROLLO

Síntesis de las matrices. Se sintetizaron 38 matrices, empleando mini-esferas de quitosano y Sepharose® como soportes. Se inmovilizaron 19 colorantes triazínicos diferentes, y se utilizaron soportes sin colorante inmovilizado como control. Las mini-esferas de quitosano (diámetro 1.3 ± 0.1 mm) se sintetizaron siguiendo un protocolo previamente descrito por el grupo. Posteriormente, se procedió a la inmovilización de los colorantes en ambos tipos de soportes, utilizando un protocolo también previamente descrito.

Generación de extractos de AP. Se obtuvieron tres extractos de AP a partir de intestinos de pollo. El extracto principal se generó siguiendo el protocolo de Roy y Gupta (2000), donde la AP en la fase acuosa fue dializada con buffer de fosfatos 10 mM pH7. Con el fin de optimizar el proceso, se evaluó reemplazar la etapa de diálisis por una de diafiltración empleando membranas con un corte de PM de 10 kDa contra el mismo buffer de diálisis. Adicionalmente, se analizó el uso del extracto sin ningún pre-tratamiento (pH 6.4).

Puesta a punto de la adsorción de AP. Se llevó a cabo un screening inicial de los 19 colorantes triazínicos inmovilizados en ambos soportes para evaluar la capacidad de adsorción de AP en modo *batch* sobre cada extracto generado.

Desarrollo del proceso de extracción y purificación de AP. Se optimizaron los parámetros de pH de adsorción, la relación cantidad de matriz (mg)/volumen de extracto (ml) y el eluyente a utilizar. Posteriormente, se desarrolló un proceso optimizado, el cual fue evaluado durante varios ciclos consecutivos para determinar la reutilización de la matriz.

RESULTADOS

En el testeo inicial de las 40 matrices con el extracto dializado de AP usando una relación matriz/extracto de 100/1 (mg/ml):

- Adsorción → matrices con soporte de quitosano 0.8-44.2% y con soporte de Sepharose® 0-18.7%
- Mejores resultados → quitosano con los colorantes Reactive Brown 10 y Reactive Red 8 y el quitosano sin colorante

Optimización relación matriz/extracto				
Matriz	Relación	Extracto sin tratar	Extracto dializado	Extracto diafiltrado
		Adsorción (%)		
Quitosano-Brown 10	50/1	$53,9 \pm 0,8$	$93,6 \pm 0,1$	-
	100/1	$54,8 \pm 0,3$	$98,3 \pm 0,9$	-
	200/1	$70,4 \pm 0,8$	$98,3 \pm 0,2$	$18,2 \pm 0,9$
Quitosano-Red 8	50/1	$38,9 \pm 1,1$	$79,6 \pm 0,4$	-
	100/1	$39,1 \pm 0,5$	$79,4 \pm 0,6$	-
	200/1	$52,1 \pm 2,3$	$80,9 \pm 1,3$	$17,7 \pm 0,2$
Quitosano	50/1	$51,7 \pm 0,5$	$55,2 \pm 0,3$	-
	100/1	$52,6 \pm 0,2$	$54,8 \pm 0,7$	-
	200/1	$73,7 \pm 0,7$	$71,0 \pm 1,9$	$42,0 \pm 0,5$

Proceso de purificación de AP				
Matriz	Extracto sin tratar		Extracto dializado	
	Adsorción (%)	AE eluido	Adsorción (%)	AE eluido
Quitosano-Brown 10	72.6 ± 4.7	1.4 ± 0.2	91.2 ± 2.1	0.3 ± 0.1
Quitosano-Red 8	58.4 ± 2.6	0.9 ± 0.2	93.0 ± 0.4	0.7 ± 0.1
Quitosano	82.8 ± 8.0	1.7 ± 0.7	74.9 ± 12.1	0.2 ± 0.0

Extracto sin pre-tratar AE=0.24 mg/mg y extracto dializado AE=0.08 mg/mg

A lo largo de 3 ciclos consecutivos de purificación se mantuvo la performance del proceso con un error menor al 8.1% en todos los casos

CONCLUSIÓN

En el trabajo exploramos la utilización de colorantes triazínicos como ligandos de afinidad y el quitosano como material base para soportes cromatográficos aplicados a desarrollar un método económico para la obtención de AP. Este proyecto busca aprovechar un subproducto de la industria avícola nacional, como son los intestinos de pollo. En resumen, el extracto dializado permitió obtener buenos rendimientos de AP, pero con baja actividad específica (AE) debido a pérdidas durante el acondicionamiento inicial. Por el contrario, los procesos que partieron del extracto crudo (mayor AE inicial) mostraron altos porcentajes de adsorción, pero bajos porcentajes de elución, lo que resultó en rendimientos bajos, aunque con una mayor actividad específica final.