



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTAMPADO MOLECULAR DE
GAMMA-INMUNOGLOBULINAS
DE SUERO EQUINO”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
GONZÁLEZ PORTUGUEZ MARIBEL



MÉXICO, DF

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA
Vocal	DRA. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRES GONZÁLEZ SARAVIA
Secretario	DR. MIQUEL GIMENO SECO
1er Suplente	DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES
2do Suplente	DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

Sitio donde se desarrolló el tema:
LABORATORIO 314, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA,
FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO E,
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Asesor:

Dr. Miquel Gimeno Seco

Sustentante

Maribel González Portuguese



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por formarme como universitario

A la Facultad de Química, por formarme como profesionista.

Al Dr. Eduardo Bárzana García, por permitirme formar parte de su grupo de investigación. Por la asesoría técnica y de redacción para la escritura de esta Tesis.

A la Dra. Amelia María De Guadalupe Farres González Saravia por la asesoría técnica y de redacción para la escritura de esta Tesis.

Al Dr. Miquel Gimeno Seco, por mostrarme otra perspectiva de la investigación científica.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano, al Dr. Alejandro Paniagua Solís y a la empresa SILANES S. A. de C. V. por donar amablemente la proteína purificada IgG.

A la M. en C. Idalia Flores Arguello, por la asesoría técnica para la realización de electroforesis en gel (SDS-PAGE).

Al M. en I. Iván Puente Lee y a la USAI por la realización de las microscopías electrónicas de barrido (SEM).



ESTAMPADO MOLECULAR DE GAMMA- INMUNOGLOBULINAS DE SUERO EQUINO

RECONOCIMIENTO

Esta Tesis de Licenciatura se realizó en el Laboratorio 314, Departamento De Alimentos y Biotecnología, Facultad De Química, Edificio E, Universidad Nacional Autónoma De México. Se Reconoce la Asearía Técnica de la **M. en C. Sandra Paola Sánchez Rodríguez** en la aplicación de las Técnicas de Biología Molecular para la Realización de este Trabajo.



DEDICATORIAS

Dedico esta Tesis con todo mi cariño:

A mi Madre, Sra. Maribel Amalia Portuguez Calette, quien con su amor, entrega, apoyo, paciencia y ejemplo me ha estimulado a lograr esta meta que también es tuya. Mamita, me haz dado todo.

A Luís Humberto porque eres una parte muy importante de mi vida, por el apoyo, por la compañía en todo momento pero sobre todo en esta etapa tan difícil, por tu infinita paciencia, por todo el tiempo que tuvimos que sacrificar. Te amo cielo.



A mi familia: Mamita, me haz dado todo. Papá, por todo el apoyo. Irving y Cindy por el gran amor que nos une. Abuelita Vange por la paciencia y cariño.

A Víctor Hugo Lemus Neri y Jorge Juárez, los quiero como hermanos.

A mis amigos: Juan Carlos, Natzul, por estar conmigo cuando un abrazo lo es todo. te admiro mucho. Linda, gracias por ayudarme a descubrir la paz interna. Tere, por tu ternura y valentía. Vane, eres una encanto, como te quiero y admiro. Normita, sabes que haz sido un ejemplo. Miriam, por ser como eres, por la confianza. Teresita, por tu bondad para dejarme ver en ti. Moy, por enseñarme el valor de la sencillez. Beto, por tu locura. Ariel, por tu ansia de sabiduría. Gracias por su amistad y por animarme a seguir, los admiro y quiero muchísimo.

A Gaby, quien con esfuerzo y entereza muy pronto llegará a este momento. Gracias por ser una mujer inefable y por ser transparente. Eres maravillosa amiga.

A Polita, no hay palabras para agradecer tu apoyo incondicional y tu amistad, por ser para mí una maestra que más que técnicas de análisis me enseñó el sentido de la palabra ciencia y compromiso, por que me diste lecciones de vida. Mi gratitud y admiración infinita.

A Brendita, te quiero mucho. Gracias por tu amistad, por cuidarme, por todos los momentos en el 314, por tu hermosa forma de ver la vida, por el apoyo, por tu sentido de responsabilidad y compromiso.

A Anel, por abrir mis ojos, por mostrarme un mundo diferente, por ser un ejemplo, por tu amistad.

A Maricruz, por tu amistad.

Al M. en C. Mauro Cruz, gracias por mostrarme el camino de la investigación científica, Usted cambio mi forma de pensar.



CONTENIDO

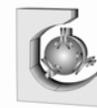
	Página
RESUMEN	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Estampado Molecular mediante interacción no-covalente “plantilla”/monómero.	3
2.1.1 Molécula Plantilla	5
2.1.1.1 Inmunoglobulina	6
2.1.2 Monómeros Funcionales	8
2.1.3 Agentes Entrecruzantes	10
2.1.4 Iniciación Por Radicales Libres	11
2.2 Características de Polímeros Molecularmente Estampados	15
2.3 Aplicaciones de Estampado Molecular	15
2.3.1 Estructura Artificial del Complejo Anticuerpo/Receptor	16
2.3.2 Ventajas potenciales de MIPS como reemplazos para los anticuerpos biológicos en inmunoensayos	17
2.3.3 Uso de catalizadores sintéticos	18
2.3.4 Biosensores	18
2.3.5 Cromatografía de Estampado Molecular (MIC)	19
3. OBJETIVO	20
4. HIPÓTESIS	20
5. METODOLOGÍA	21
5.1 Metodología para la estandarización de la técnica de estampado molecular con BSA	21
5.2 Metodología para la estandarización de la técnica de estampado molecular con IgG	21
5.3 Materias Primas	22



5.4 Material y Reactivos	22
5.5 Equipo e Instrumentación	23
5.6 Procedimiento	23
5.6.1 Síntesis de un blanco mediante la técnica de polimerización en fase inversa iniciada por radical libre vía redox.	23
5.6.2 Diseño de la Curva Estándar de Inmunoglobulina (IgG)	24
5.6.3 Síntesis de Polímero Molecularmente Estampado de proteína	24
5.6.4 Análisis de adsorción	24
5.6.5 Estandarización de la actividad enzimática Catalasa	24
6. RESULTADOS	24
6.1 Resultados de la Estandarización de la técnica de Estampado Molecular con BSA	24
6.2 Resultados Obtenidos Para el polímero estampado con IgG	25
6.2.1 Rendimientos de polimerización del polímero estampado con IgG	26
6.3 Adsorción de proteína	26
6.4 Morfología	27
6.5 Características de adsorción del polímero estampado con IgG	29
6.6 Especificidad del reconocimiento del polímero estampado con IgG	30
6.7 Características de reutilización del polímero estampado	34
7. CONCLUSIONES	36
8. RECOMENDACIONES	37
9. BIBLIOGRAFÍA	37
10. APÉNDICE	37



10.1 Curva estándar de BSA (Método de Bradford, 595nm)	41
10.2 Curvas Estándar de IgG (Método de Bradford, 595nm)	44
10.3 Metodología para la estandarización de la técnica de estampado molecular	47
10.4 Resultados de la Estandarización de la técnica de Estampado Molecular con BSA	48
10.4.1 Rendimiento de polimerización	48
10.4.2 Adsorción de proteína	48
10.4.3 Morfología	49
10.4.4 Característica de Adsorción del polímero estampado con BSA	51
10.4.5 Especificidad del Reconocimiento del polímero estampado con BSA	54
10.4.6 Características de Reutilización del polímero Estampado con BSA	32



CONTENIDO DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Esquema representativo del estampado molecular.</i>	4
Figura 2. <i>Esquema de la estructura de la inmunoglobulina en función de sus diferentes cadenas peptídicas.</i>	7
Figura 3. <i>Monómeros funcionales utilizados comúnmente en la preparación de estampado molecular.</i>	9
Figura 4. <i>Monómeros entrecruzantes comúnmente utilizados en el estampado molecular.</i>	11
Figura 5. <i>Ejemplos de escisión radicalaria de iniciadores comerciales; a) Azo-bis-isobutironitrilo (AIBN), B) Peróxido de benzoilo (BPO).</i>	12
Figura 6. <i>Ejemplos de escisión radicalaria tipo redox; a) sistema hidroperóxido de cumilo con ión Fe^{3+}, b) sistema ión persulfato (KPS) con ión bisulfito (bisulfito sódico).</i>	13
Figura 7. <i>Esquema de la adición radicalaria y propagación.</i>	14
Figura 8. <i>Esquema de los mecanismos de terminación de las cadenas crecientes de polímeros.</i>	14
Figura 9. <i>Representación esquemática del proyecto. Estampado Molecular de IgG.</i>	21
Figura 10. <i>Evaluación de la Actividad Especifica de Catalasa</i>	24
Figura .11. <i>Esquema del estampado y proteína retenida después del lavado</i>	27
Figura. 12. <i>Fotografía SEM de Polímero Estampado PE3</i>	28
Figura. 13. <i>Fotografía SEM de Polímero Estampado PE3</i>	28
Figura. 14. <i>Ecuación de la capacidad de adsorción</i>	29
Figura. 15. <i>Cinética de adsorción de IgG para PE1, PE2 y PE3.</i>	30

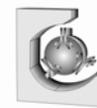
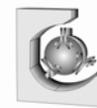


Figura 16.	<i>Curva estándar de la actividad enzimática de la Catalasa en la zona de la luz ultravioleta (240nm)</i>	31
Figura 17.	<i>Curva de velocidad inicial de la actividad enzimática de la Catalasa en la zona de la luz ultravioleta (240nm).</i>	32
Figura 18.	<i>Especificidad de polímero estampado al competir con otra proteína globular (Catalasa) no empelada como molécula plantilla.</i>	32
Figura 19.	<i>Verificación de la Actividad Catalítica de Catalasa en ciclos de re uso.</i>	33
Figura 20.	<i>Adsorción máxima de la proteína empleada como plantilla en el polímero estampado al competir con otra proteína globular (Catalasa)</i>	33
Figura 21.	<i>Electroforesis desnaturalizante (SDS- PAGE) de IgG</i>	34
Figura 22.	<i>Reproducibilidad de adsorción del polímero estampado.</i>	35
Figura 23.	<i>Curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) determinada por el método de Bradford (595nm)</i>	41
Figura 24.	<i>Curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) determinada por el método de Bradford (595nm)</i>	42
Figura 25.	<i>Curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) determinada por el método de Bradford (595nm)</i>	43
Figura 26.	<i>Curva estándar de Gamma Inmunoglobulina (IgG) determinada por el método de Bradford (595nm)</i>	44
Figura 27.	<i>Curva estándar de Gamma Inmunoglobulina (IgG) determinada por el método de Bradford (595nm)</i>	45
Figura 28.	<i>Curva estándar de Gamma Inmunoglobulina (IgG) determinada por el método de Bradford (595nm)</i>	46
Figura 29.	<i>Representación esquemática del proyecto. Estandarización de la técnica de estampado molecular.</i>	47
Figura 30.	<i>Fotografía SEM de Polímero Estampado con BSA</i>	50
Figura 31.	<i>Fotografía SEM del Polímero Blanco</i>	50

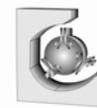


Figura 32.	<i>Fotografía SEM de Polímero Estampado con BSA</i>	51
Figura 33.	<i>Cinética de adsorción de BSA.</i>	54
Figura 34.	<i>Especificidad de Polímero Estampado con BSA al competir con otra proteína globular (Lacoferrina) no empelada como molécula plantilla.</i>	55
Figura 35.	<i>Electroforesis desnaturalizante (SDS- PAGE) de BSA</i>	56
Figura 36.	<i>Reproducibilidad del polímero estampado con BSA.</i>	58



CONTENIDO DE TABLAS Y CUADROS

	Página
Tabla 1. <i>Pesos Moleculares de las IgGs equinas.</i>	8
Cuadro 1. <i>Rendimiento de Polimerización para PE1</i>	25
Cuadro 2. <i>Rendimiento de Polimerización para PE2</i>	25
Cuadro 3. <i>Rendimiento de Polimerización para PE3</i>	26
Cuadro 4. <i>Proteína (IgG) estampada</i>	26
Cuadro 5. <i>Proteína (IgG) eluída</i>	27
Cuadro 6. <i>Comparación de PE1, PE2 y PE3</i>	29
Cuadro 7. <i>Absorbancias de la curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) determinada por el método de Bradford (595nm)</i>	41
Cuadro 8. <i>Absorbancias de la curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) determinada por el método de Bradford (595nm)</i>	42
Cuadro 9. <i>Absorbancias de la curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) determinada por el método de Bradford (595nm)</i>	43
Cuadro 10. <i>Absorbancias de la curva estándar de Gamma Inmunoglobulina (IgG) determinada por el método de Bradford (595nm)</i>	44
Cuadro 11. <i>Absorbancias de la curva estándar de Gamma Inmunoglobulina (IgG) determinada por el método de Bradford (595nm)</i>	45
Cuadro 12. <i>Absorbancias de la curva estándar de Gamma Inmunoglobulina (IgG) determinada por el método de Bradford (595nm)</i>	46
Cuadro 13. <i>Rendimiento de Polimerización. Estandarización de la Técnica de Estampado Molecular con BSA</i>	48
Cuadro 14. <i>Proteína (BSA) estampada</i>	49
Cuadro 15. <i>Proteína (BSA) eluída</i>	49
Cuadro 16. <i>Capacidad de Adsorción del polímero estampado con BSA (QA)</i>	52



<i>Cuadro 17.</i>	<i>Capacidad de Adsorción del polímero estampado con BSA (QB)</i>	52
<i>Cuadro 18.</i>	<i>Capacidad de Adsorción del polímero estampado con BSA (QC)</i>	53
<i>Cuadro 19.</i>	<i>Capacidad de Adsorción del polímero estampado con BSA</i>	53
<i>Cuadro 20.</i>	<i>Especificidad de reconocimiento del polímero estampado con BSA</i>	55
<i>Cuadro 21.</i>	<i>Capacidad de reutilización del polímero estampado con BSA. Primer ciclo</i>	57
<i>Cuadro 22.</i>	<i>Capacidad de reutilización del polímero estampado con BSA. Segundo ciclo</i>	57
<i>Cuadro 23.</i>	<i>Capacidad de reutilización del polímero estampado con BSA. Tercer ciclo</i>	58
<i>Cuadro 24.</i>	<i>Capacidad de Adsorción del PE1(Q1)</i>	59
<i>Cuadro 25.</i>	<i>Capacidad de Adsorción del PE2(Q2)</i>	59
<i>Cuadro 26.</i>	<i>Capacidad de Adsorción del PE3(Q3)</i>	60
<i>Cuadro 27.</i>	<i>Capacidad de Adsorción. PE1, PE2 y PE3</i>	60
<i>Cuadro 28.</i>	<i>Curva estándar de Actividad Enzimática de Catalasa</i>	61
<i>Cuadro 29.</i>	<i>Especificidad de Reconocimiento</i>	62
<i>Cuadro 30.</i>	<i>Verificación de la Actividad de Catalasa en ciclos de re-uso</i>	62
<i>Cuadro 31.</i>	<i>Especificidad del reconocimiento</i>	63
<i>Cuadro 32.</i>	<i>Capacidad de reutilización. Primer ciclo</i>	63
<i>Cuadro 33.</i>	<i>Capacidad de reutilización. Segundo ciclo</i>	64
<i>Cuadro 34.</i>	<i>Capacidad de reutilización. Tercer ciclo</i>	64
<i>Cuadro 35.</i>	<i>Capacidad de Reutilización</i>	65



RESUMEN

El estampado molecular es un área científica de creciente interés enfocada en la preparación y el diseño de compuestos para el reconocimiento molecular. Entre las metodologías y materiales reportados, aquellos basados en matrices poliméricas formadas por micro o nano-esferas con alta superficie de contacto, son los que ofrecen mayor eficacia y versatilidad en la separación o reconocimiento selectivo de ciertas moléculas. Esta metodología está basada en la síntesis de una matriz polimérica a partir de los monómeros, principalmente acrilamidas, y el compuesto a estampar a modo de “plantilla molecular”. La interacción no covalente entre el monómero y la “plantilla” previa a la polimerización, y posterior extracción de ésta del polímero formado, da como resultado la formación de una matriz con cavidades creadas por la molécula “plantilla”. El material resultante tiene la propiedad de retener mediante adsorción selectiva esa misma “plantilla” o molécula estampada. Esta metodología permite construir receptores activos en estructuras poliméricas muy estables y resistentes a condiciones drásticas de operación. Estos materiales, usualmente acrílicos, son notablemente estables a la tensión mecánica, temperaturas elevadas o altas presiones. También son resistentes contra el tratamiento con ácido, álcali, o iones metálicos y encuentran aplicación en una amplia gama de solventes. La resistencia al almacenaje de los polímeros es también muy alta, pues su retención estática por varios años a temperatura ambiente no conduce a ninguna reducción evidente del funcionamiento. Además, los polímeros estampados se pueden reutilizar en muchos ciclos sin la pérdida del “efecto memoria”. Esto representa una mejora notable respecto a otros procesos de purificación, como los de extracción o fraccionamiento, los cuales utilizan generalmente grandes volúmenes de disolventes orgánicos volátiles o largos y costosos procesos de purificación.

Los Polímeros Estampados pueden servir como sitio receptor de anticuerpos naturales y ser utilizados como elementos de reconocimiento en el análisis inmunológico. La naturaleza polimérica de los Polímeros Estampados da lugar a receptores de diversos anticuerpos naturales siendo esto una ventaja tecnológica. Por ejemplo, su resistencia física y química conduce a la posibilidad de esterilizar los polímeros, la alta durabilidad asegura una alta estabilidad de las características de reconocimiento, y el costo de producción es considerablemente más bajo. Otra



ventaja es la eliminación del empleo de animales como hospederos en la producción del anticuerpo.

Se estandarizó la técnica de Estampado Molecular para proteínas del tipo inmunoglobulinas con la proteína BSA fabricando tres polímeros estampados con BSA donde las proporciones de proteína y monómero fueron las siguientes: 1: 15 000(MIP1); 1: 22 500(MIP2) y 1: 54 000 (MIP3). Asimismo, se fabricaron tres polímeros estampados con IgG donde las proporciones de proteína y monómero fueron las siguientes: 1: 22 500 (PE1); 1: 54 000 (PE2) y 1: 130 000 (PE3).

La síntesis de los polímeros estampados se llevó a cabo a 25 °C. La reacción se llevó a cabo en atmósfera inerte. Se disolvieron en el medio Tolueno-agua los siguientes compuestos: monómero acrilamida, entrecruzante bis-acrilamida, surfactante etil celulosa y en buffer de fosfatos: la molécula plantilla IgG. Se agregó desde un embudo de adición de presión compensada una disolución acuosa del iniciador persulfato de potasio y bisulfito sódico. La estructura de los materiales se determinó visualmente mediante microscopía electrónica de barrido.

El material sintetizado es capaz de adsorber y reconocer selectivamente a la proteína empleada como plantilla.

La constante de adsorción del polímero estampado con IgG se determinó poniéndolo en contacto con una disolución de IgG. El análisis se realizó por espectrofotometría dando como resultado 7.73mg de proteína/g de polímero.

El Polímero estampado con IgG es selectivo a la adsorción de ésta en contacto con una mezcla de Catalasa e IgG.

La capacidad de reutilización no disminuye con los ciclos de uso en ambos polímeros estampados.



1. INTRODUCCIÓN:

El estampado molecular es un área científica de creciente interés enfocada en la preparación y el diseño de compuestos para el reconocimiento molecular.^{1, 2} Entre las metodologías y materiales reportados, aquellos basados en matrices poliméricas formadas por micro o nano-esferas con alta superficie de contacto son los que ofrecen mayor eficacia y versatilidad en la separación o reconocimiento selectivo de ciertas moléculas. Esta metodología está basada en la síntesis de una matriz polimérica a partir de los monómeros, principalmente acrilamidas, y el compuesto a estampar a modo de “plantilla molecular”. La interacción no covalente entre el monómero y la “plantilla” previa a la polimerización, y posterior extracción de ésta del polímero formado da como resultado la formación de una matriz con cavidades creadas por la molécula “plantilla”. El material resultante tiene la propiedad de retener mediante adsorción selectiva esa misma “plantilla” o molécula estampada. Esta metodología permite construir receptores activos en estructuras poliméricas muy estables y resistentes a condiciones drásticas de operación, lo cual representa una mejora notable respecto a otros procesos de purificación, como los de extracción o fraccionamiento, los cuales utilizan relativamente grandes volúmenes de disolventes orgánicos volátiles o largos y costosos procesos de purificación.

El uso industrial de estas partículas poliméricas, estampadas y fabricadas con las características físicas de los catalizadores típicos de la industria, han sido objeto de estudio de diversas publicaciones donde la mayoría se han usado para aplicaciones analíticas, por tener capacidad de resolución quiral. Estos incluyen la extracción de la fase sólida (SPE) para la preparación de la muestra en el análisis de elementos traza,³ usando la cromatografía de gas y así poder determinar la concentración del analito después del tratamiento de SPE. Se ha demostrado la viabilidad de usar polímeros estampados como receptores artificiales para la investigación de bibliotecas combinatorias.⁴ En el estudio del estampado molecular de órgano-sulfuros del petróleo,⁵ en el diseño de columnas cromatográficas (HPLC)⁶ y de afinidad⁷ para la detección temprana de virus,⁸

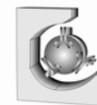


estereoselectividad de esteroides⁹ con sensores de microanálisis,¹⁰ inmovilización enzimática^{11,12}, entre otros.

La producción de micro o nano-partículas con alta resistencia mecánica mediante la técnica del estampado molecular ha mostrado gran potencial en el reconocimiento de moléculas pequeñas. Recientemente se ha mostrado la capacidad de emplear dicha técnica en el campo del reconocimiento de moléculas de mayor tamaño, como proteínas, siendo éste un campo de investigación de tecnología de punta y de gran interés en sectores farmacéuticos, entre otros.^{13,14} Reportes recientes han mostrado la posibilidad de la creación de matrices acrílicas selectivas al reconocimiento de ciertas proteínas e incluso recientemente con la participación de biopolímeros.¹⁵ En general, existe un fuerte incentivo en la preparación de polímeros bio-estampados para su uso en diagnósticos, sensores o bio-separaciones.

2. ANTECEDENTES

La aparición del estampado molecular tiene su origen en el área de la inmunología. En el 1930 Breinl y Haurowitz, seguidos por Mudd, propusieron una teoría para la diversidad de la formación del anticuerpo en su encuentro con los antígenos xenobióticos. En la especificidad del complejo anticuerpo-antígeno, cada unidad estructural del anticuerpo fue seleccionada y orientada mediante un proceso sintético. Éstas consideraciones teóricas fueron elaboradas más a fondo por Pauling, que postuló que la diversidad en la formación del complejo antígeno - anticuerpo era debido a la formación de diversas configuraciones tridimensionales de la cadena del polipéptido del anticuerpo inducida por la interacción con los antígenos. Después de estas teorías iniciales basadas en la diversidad del anticuerpo, éstos podrían cambiar su estructura tridimensional para formar tantos puntos de interacción como sea posible con los antígenos. Así, el anticuerpo que combinaba sitios “fue moldeado” con el antígeno, es decir, fueron estampados molecularmente con los antígenos.



Como consecuencia de las teorías de Pauling sobre los anticuerpos, la tendencia en investigación se orienta en el estudio de este mismo concepto en matrices sintéticas. Las tentativas iniciales hacia ese objetivo fueron realizadas en las décadas siguientes, pero no fue sino hasta la década de los 80s que se abrió una brecha verdadera para que esta tecnología fuera considerada.

La técnica de estampado molecular sin embargo, comenzó a tomar forma en la década de los 1970's cuando tuvieron lugar estudios de polimerizaciones en disolventes orgánicos, basándose en las teorías usadas para explicar la selectividad del reconocimiento molecular. En 1972 se inicia el estampado molecular como lo conocemos hoy, cuando Wulff¹⁶ y Klotz reportan de manera independiente la preparación de polímeros sintéticos con ligando selectivo y predeterminado.¹⁷ El primer reporte de Wulff y Sarhan describe un “método controlado”, involucrando la copolimerización de D-glicero (*p*-vinilánilida)- 2,3-O- *p*-vinil fenilbornato y divinilbenzeno. La subsiguiente hidrólisis de glicerato estampado exhibió reconocimiento quiral del ácido D-glicérico.

Actualmente, existen dos acercamientos básicos al estampado molecular. El primero, desarrollado principalmente por Wulff *et al*,¹⁶ consiste en el acercamiento pre-organizado, donde los compuestos en la disolución antes de la polimerización son mantenidos por enlaces covalentes, y el segundo, desarrollado principalmente por Mosbach *et al*,¹⁷ donde el pre-arreglo entre la molécula a estampar y los monómeros funcionales están formado interacciones no-covalentes. Ambos procedimientos de estampado hacen uso de un alto porcentaje del monómero entrecruzante dando como resultado los polímeros con elevada rigidez y resistencia mecánica.

2.1 Estampado molecular mediante interacción no-covalente “plantilla”/monómero.

El estampado molecular es un área científica de creciente interés enfocada en la preparación y el diseño de compuestos para el reconocimiento molecular.^{18, 19} Esta técnica



se basa en la preparación y el diseño de estructuras poliméricas muy estables y resistentes a condiciones drásticas de operación. Esta metodología consiste en la síntesis de una matriz polimérica a partir de los monómeros, principalmente acrilamida, y el compuesto a estampar a modo de “plantilla molecular”. El material resultante tiene la propiedad de retener mediante adsorción selectiva esa misma “plantilla” o molécula estampada.^{14, 15, 20} En la Figura 1 se muestra el esquema general del estampado molecular.

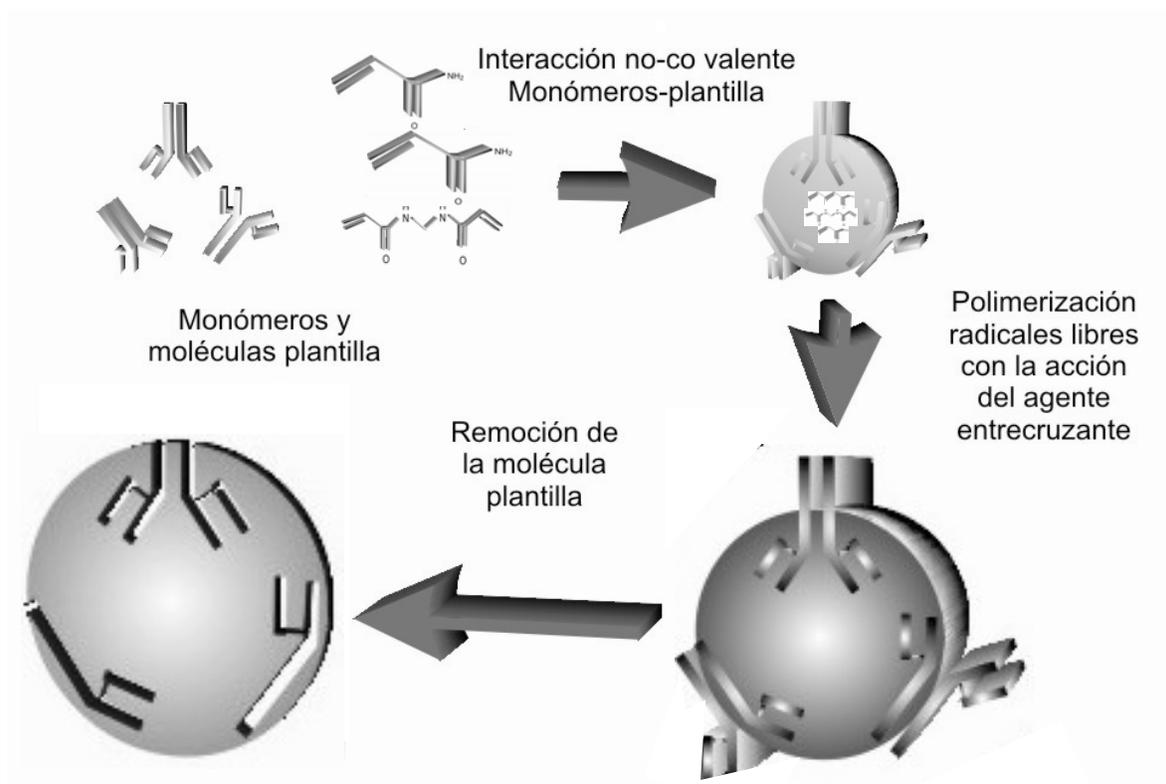


Figura 1. Esquema representativo del estampado molecular.

El estampado molecular se da en tres pasos, los cuales se enumeran en los siguientes párrafos:^{16, 21}

- 1) La interacción de los monómeros funcionales con la plantilla. Este paso consiste en el arreglo tridimensional de los grupos funcionales e interacciones



complementarias: Puentes de Hidrogeno, Fuerzas de Van der Waals o fuerzas electrostáticas.^{16,20, 22.}

- 2) Polimerización del monómero con la acción del agente entrecruzante. En este paso se fijan los sitios de interacción no covalente entre la molécula plantilla y los monómeros.
- 3) Remoción de la plantilla por extracción con disolvente adecuado. En este proceso se crea una cavidad que es complementaria a la plantilla en tamaño, forma e interacción y que será capaz de reconocer específicamente esa misma molécula plantilla en experimentos de adsorción selectiva. De esta manera se viene creando el material conocido como **MIP**, de los términos en inglés “*Molecular Imprinting Polymer*”.^{16, 23}

El paso crucial y más importante en la síntesis del MIP es la fase del pre-arreglo donde se forma un complejo entre la plantilla y un monómero funcional. La comprensión de las reglas que gobiernan la formación o complejación del monómero con la plantilla es fundamental para poder diseñar sistemas poliméricos con alta selectividad y afinidad.²⁴

2.1.1 Molécula Plantilla

La molécula plantilla en el estampado molecular es la que dirige la organización de los monómeros funcionales. Desafortunadamente, no todas las plantillas son favorables para el estampado en cualquier condición de polimerización. En términos de la compatibilidad con la polimerización por radical libre, las plantillas deben idealmente ser químicamente inertes bajo las condiciones de la polimerización; así una alternativa estratégica puede ser buscar una metodología en la cual la molécula a estampar sea estable bajo las condiciones de reacción.²⁴ Por otra parte, la cantidad y la calidad de los sitios molecularmente estampados, son función directa de los mecanismos y del grado de las interacciones entre monómero y plantilla anteriores a la polimerización.^{23, 24}



2.1.1.1 Inmunoglobulina IgG

Los antivenenos terapéuticos^{25, 26} son producidos generalmente en caballos y están basados en inmunoglobulinas (IgG's) polivalentes,^{27, 28} a partir del fraccionamiento²⁹ de las IgG's para obtener Fragmentos Fab³⁰. Estos preparados farmacéuticos son empleados para uso intravenoso como antídotos de picaduras de alacrán o de víbora. Su administración en dosis suprafisiológicas, brinda la posibilidad de manipular la compleja red de regulación a la que está sujeto el sistema inmune, y por lo tanto, regular la respuesta inmunológica. El empleo del estampado molecular permitirá inicialmente un método alternativo para la purificación o separación de la Inmunoglobulina Ig de otros componentes del plasma sanguíneo.³¹

Los anticuerpos están formados por glucoproteínas especializadas o inmunoglobulinas (Igs) que tienen la característica de reaccionar específicamente^{32, 33, 34} con el antígeno. La composición de las Igs es de un 82-96% proteica y 4 a 18% de carbohidratos. Las Igs, a diferencia de otras proteínas, tienen dos regiones funcionales diferentes:³⁵ una encargada del reconocimiento del antígeno, que posee gran variabilidad y tiene la capacidad de reconocer un gran número de moléculas diferentes. El otro segmento tiene una función efectora, donde tiene la capacidad de fijar al complemento y facilitar el paso de los anticuerpos a través de barreras como la placenta y ser efectoras de los mecanismos de inmunidad

Las inmunoglobulinas son tetrámeros formados por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas idénticas de unos 446 aa. (cadenas pesadas, H1 y H2) y dos cadenas, también idénticas, de unos 214 aa. (cadenas livianas, L1 y L2). Las cadenas H y las L se unen por puentes disulfuro intercatenarios. La estructura secundaria predominante en todos los dominios de las IgG es la hoja plegada beta (Figura 2).

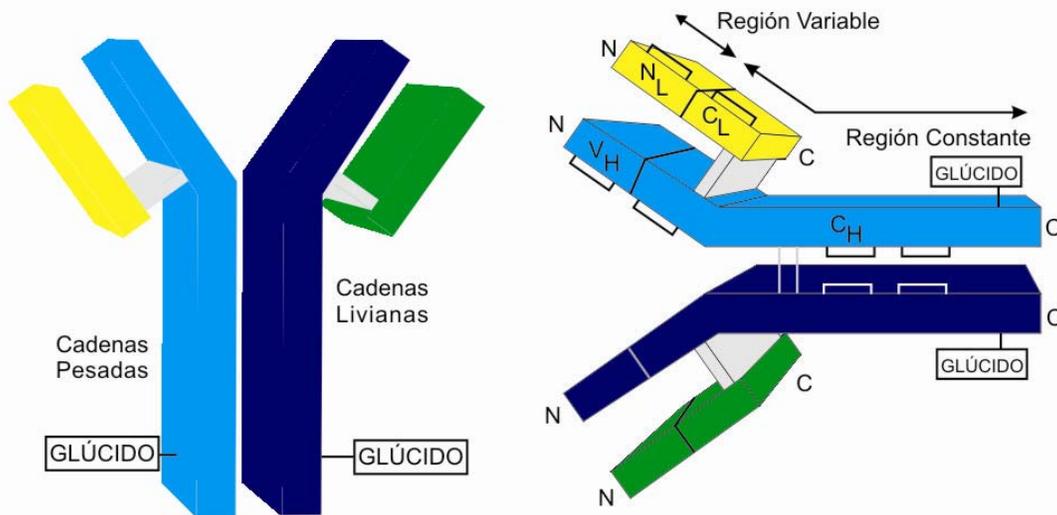


Figura 2. Esquema de la estructura de la inmunoglobulina en función de sus diferentes cadenas peptídicas.

Las IgG están constituidas por una porción Fc ó porción constante, responsable de las acciones biológicas de éstas, como la fijación del complemento, la opsonización³⁶ y la citotoxicidad mediada por anticuerpos (Ac), entre otras, y una porción variable o porción Fab, la cual tiene como acción fundamental la interacción con el antígeno (Ag).

La respuesta inmune está regulada por una fina red de interacciones moleculares, donde las inmunoglobulinas son las moléculas efectoras de la respuesta inmune humoral y desempeñan un papel primordial en dichos procesos.

Las inmunoglobulinas tienen como función localizar y fijarse a un antígeno para inmovilizarlo o aglutinarlo. Esto es efectuado por la región Fab,^{30, 37} y desencadena una serie de reacciones biológicas encaminadas a destruirlo. La fracción Fab³⁸ cumple con tres funciones principales. Una de ellas es la inmovilización, ya que ésta puede unir flagelos o inmovilizar microorganismos patógenos y disminuir su capacidad invasora. Otra es la neutralización, donde los anticuerpos reaccionan con toxinas o partículas virales, impidiendo así su fijación a membranas celulares, y por último la activación de la



fagocitosis por unión a los receptores específicos que existen para esta fracción (Fc) en microorganismos, como son granulocitos y células del retículo endotelial.^{35, 39}

La mayoría de las especies de mamíferos tienen inmunoglobulinas que “a grosso modo” corresponden a la IgG, IgA, e IgM y entre las especies que más se han estudiado se ha encontrado que por lo general tienen uno o dos grupos principales de Igs análogas.

Las clases o isotipos de inmunoglobulinas equinas son IgG (con subisotipos :IgGa, IgGb, IgGc, IgG(T)a, b) IgA, IgM, sus pesos moleculares se muestran en la Tabla 1.^{40,41}

Tabla 1. Pesos Moleculares de las IgGs equinas.^{40, 41}

Inmunoglobulina	Cadena Pesada	Cadena ligera	Peso molecular
IgGa	50 000	27 000	154 000
IgGb	54 000	27 000	162 000
IgGc	52 000	27 000	152 000
IgG(Ta)	59 500	27 000	173 000
IgG(Tb)	59 500	27 000	173 000
IgA	61 000	27 000	150 000-700 000
IgM	89 000	-	900 000

2.1.2 Monómeros funcionales en interacciones no-covalentes con la molécula

“plantilla”.

Varios sistemas poliméricos se han desarrollado en la aplicación del estampado molecular. Los sistemas poli acrílicos, como los basados en poliacrilamida, son mayoritariamente empleados, en detrimento de aquellos basados en poliestireno, los cuales son empleados en menor grado.

Los monómeros funcionales, en nuestro caso vía interacciones no covalentes, son los responsables de generar los sitios de interacción con la plantilla.²²



Los monómeros funcionales mas usados son ácidos carboxílicos (ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido vinilbenzoico), ácidos sulfónico (ácido acrilamido-metilpropanosulfónico), y bases (débiles) heteroaromáticos (vinilpiridina, vinilimidazol),^{13,23, 42}. En la Figura 3 se muestran varios de los diferentes tipos de monómeros funcionales empleados en el estampado molecular.

Monómeros Funcionales	Tipo de Interacción	
Ácidos		
	Ácidos Acrílicos (R=H, CH ₃ , CF ₃ , CH ₂ COOH)	Cargas Iónicas Enlaces de Hidrogeno
	Ácidos Vinilbenzoicos	Cargas Iónicas Enlaces de Hidrogeno
	Ácidos Acrilamidossulfónicos	Cargas Iónicas
Básicos		
	Aminometacrilamidas (R=H ₂ , C ₂ H ₃)	Cargas Iónicas
	Vinilpiridinas	Cargas Iónicas Enlaces de Hidrogeno Transferencia de Carga
	Vinilimidazoles	Cargas Iónicas Enlaces de Hidrogeno Coordinación Metálica
Neutro		
	Acrilamidas	Enlaces de Hidrogeno

Figura 3. Monómeros funcionales utilizados comúnmente en la preparación de estampado molecular.^{20, 24,42}



2.1.3 Entrecruzantes

El agente entrecruzante cumple con tres funciones. Este controla la morfología de la matriz del polímero, si es tipo gel, macroporoso o un polvo microgel. Por otro lado, sirve para estabilizar el sitio de interacción estampado, y por último, imparte estabilidad mecánica a la matriz del polímero.²²

Puesto que un grado muy alto de reticulación (70-90%) es necesario para alcanzar especificidad, suele utilizarse una proporción moderada de entrecruzante. La solubilidad del entrecruzante en la solución pre-polimérica y la solubilidad del monómero y la plantilla reducen el número de alternativas posibles. Originalmente, los isómeros del divinilbenzeno fueron utilizados para reticular el estireno y de otros monómeros funcionales. Más adelante, fue demostrado que los sistemas basados en ácido acrílico se podrían preparar con una especificidad mucho más alta. El dimetacrilato del etilenglicol (EDMA) y el trimetacrilato del trimetilolpropano han sido descritos en varios sistemas (Figura 4).²³

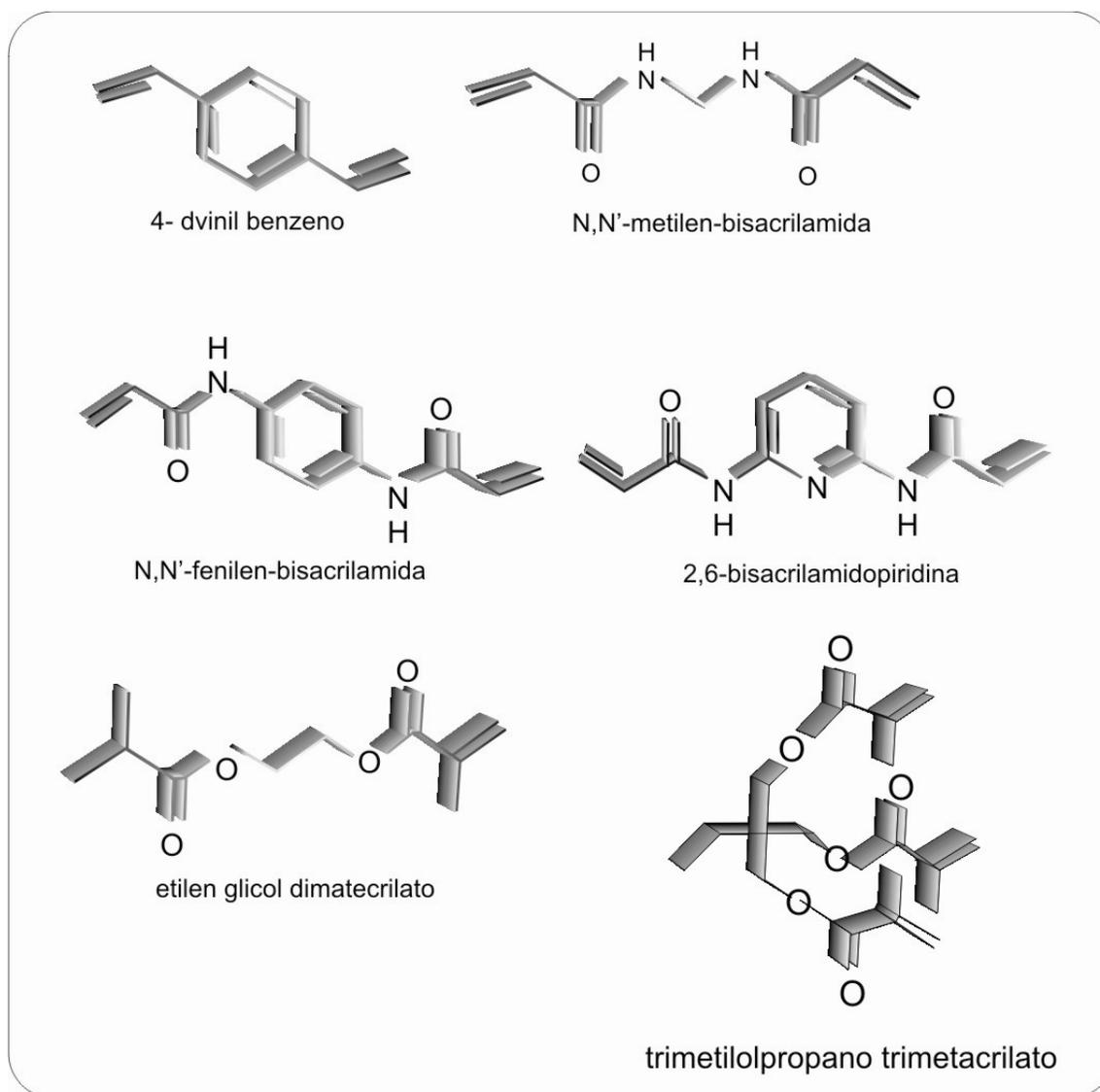


Figura 4. Monómeros entrecruzantes comunmente utilizados en el estampado molecular.^{24, 42}

2.1.4 Iniciación. Polimerización por radicales libres.

La iniciación por radicales libres es la forma más usada en la conversión del monómero en polímero, y se explota extensamente en la industria para la producción de estos materiales. Los monómeros vinílicos se pueden polimerizar con alta eficacia por los métodos de polimerización por radical libre, incluyendo el etileno, el estireno y el



metacrilato de metilo que son de gran importancia industrial. Las polimerizaciones por radical libre se pueden realizar bajo condiciones suaves de la reacción (e.g. temperatura ambiente y presiones atmosféricas) y son relativamente tolerantes a otros grupos funcionales en los monómeros o a impurezas en el sistema (e.g. agua). Por estas razones, así como el hecho de que muchos monómeros vinílicos están disponibles comercialmente a bajo costo, la polimerización del radical libre es generalmente el método de opción para preparar los polímeros estampados. El mecanismo de la polimerización iniciada por radicales libres a partir de vinílicos se caracteriza por tres etapas distintas; iniciación, propagación y terminación. La iniciación consiste en la creación de las especies activas del radical libre y la creación del centro activo en el monómero.²² La creación de las primeras especies radicales por parte del denominado iniciador puede producirse por dos vías diferentes dependiendo del tipo de iniciador radicalario empleado. Estos pueden ser creados vía escisión homolítica (homólisis) de un enlace N=N, denominado azo o O-O, denominado peróxido, o bien mediante transferencia de electrón desde o hacia un ión o molécula, también denominadas reacciones redox. La homólisis puede darse lugar mediante la aplicación de temperatura (50-100°C) por lo que suelen denominarse procesos de termólisis, aunque también pueden iniciarse mediante irradiación, gamma o ultravioleta, en un proceso de fotólisis. Ejemplos de mecanismos de este tipo de iniciación radicalica vienen descritos en la Figura 5.

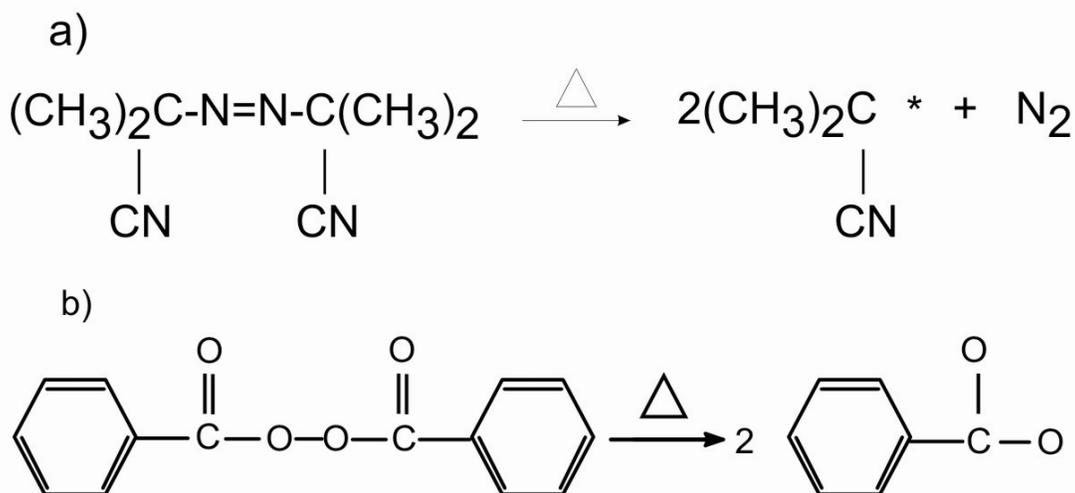


Figura 5. Ejemplos de escisión radicalica de iniciadores comerciales;
 a) Azo-bis-isobutironitrilo (AIBN), B) Peróxido de benzoilo (BPO).



Las reacciones redox sin embargo suelen emplearse cuando es necesario realizar la polimerización a bajas temperaturas, y ejemplos de este tipo de escisión se encuentran descritos en la Figura 6.

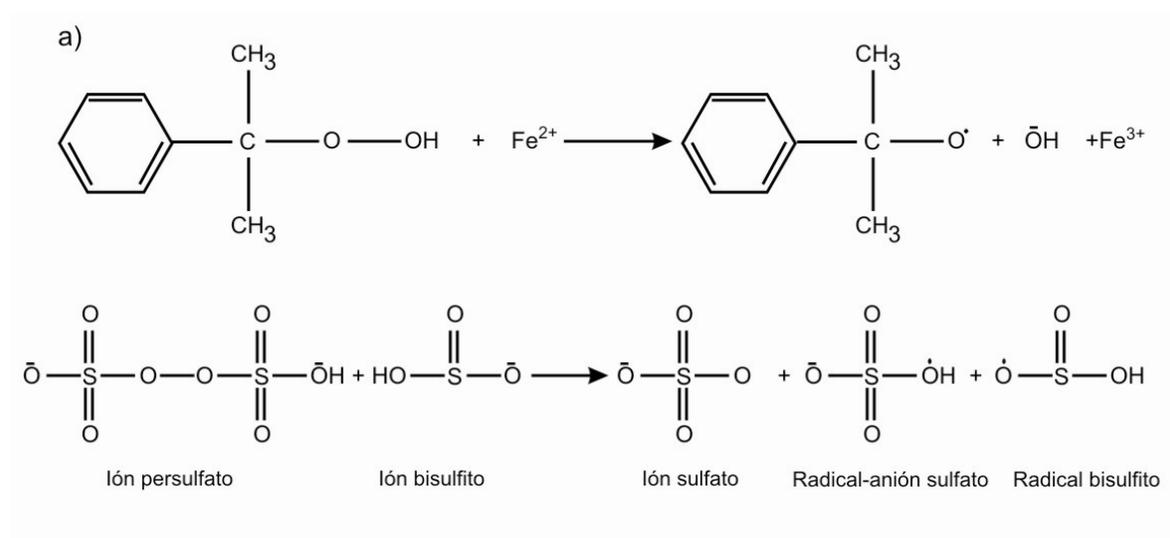


Figura 6. Ejemplos de escisión radicalica tipo redox; a) sistema hidropérido de cumilo con ión Fe^{3+} , b) sistema ión persulfato (KPS) con ión bisulfito (bisulfito sódico).

En general, existen muchos iniciadores químicos comerciales con un gran abanico de características los cuales se pueden utilizar como la fuente radical en polimerización por radicales libres y éstos se utilizan normalmente en concentraciones bajas respecto al monómero, e.g. 1 wt%, o de 1 a 5 mol %.²²

La adición del radical formado (R^\bullet) en el grupo vinilo o enlace- π del monómero tiene lugar principalmente por la posición menos oculta del doble enlace, según se muestra en la Figura 7, creando de esta manera una nueva especie radical en el monómero la cual principia la polimerización vía adición a otros monómeros en el proceso de propagación.



2.2 Características de polímeros molecularmente impresos

Además del reconocimiento molecular, sus características físicas y químicas están siendo empleadas en los sistemas diseñados de cara a posibles aplicaciones prácticas. De esta forma los polímeros estampados son notablemente estables a la tensión mecánica, temperaturas elevadas y altas presiones. También son resistentes contra el tratamiento con ácido, álcali, o iones metálicos y encuentran aplicación en una amplia gama de disolventes. La resistencia al almacenaje de los polímeros es también muy alta, pues su retención estática por varios años a temperatura ambiente no conduce a ninguna reducción evidente en su funcionamiento. Además, los polímeros se pueden reutilizar en muchos ciclos,¹³ hasta 100 veces durante largos períodos de tiempo sin la pérdida del “efecto de la memoria”. En comparación con aquellos de origen natural, en especial en la aplicación en el estampado de proteínas, estas características son altamente ventajosas.^{21,43}

2.3 Aplicaciones del estampado molecular

La técnica del estampado molecular se ha empleado en separaciones quirales, en diseño de catalizadores y biosensores, como imitadores del anticuerpo (anticuerpo artificial ó plástico) y del receptor en inmunoensayo, extracción en fase sólida, separación de muestras complejas, separaciones substrato-selectivas para la recuperación de metabolitos de caldos de fermentación, control de cristalización, separación y concentración de proteínas^{5,19} y células,⁵ como fase estacionaria en cromatografía,⁴² como sitio de reconocimiento específico para una gran variedad de moléculas.^{16, 19, 43} En cuanto al campo del estampado de proteínas, ésta ha sido utilizado específicamente para quelar proteínas y como inhibidor de enzimas.⁴⁴ También se ha empleado en la extracción en fase sólida debido a su capacidad de anclar específicamente a un antígeno. Así los anticuerpos naturales se han utilizado en la cromatografía y en inmuno extracción de inmunoafinidad para concentrar un analito antes de su cuantificación, con empleo en el campo de la



biomedicina, alimentación y análisis ambiental.¹⁵ Se ha mostrado que los receptores naturales se pueden substituir con éxito por polímeros estampados. El uso de los MIPs para la concentración de la muestra y de la purificación por la extracción en fase sólida es atractivo debido a su alta especificidad y estabilidad, y también a su compatibilidad con los disolventes acuosos y orgánicos.¹³ A menudo, el tratamiento de muestras en análisis de rutina implica un paso de solvente o de la extracción en fase sólida con un adsorbente convencional, tal como una resina de intercambio iónico o hidrofóbica. Esto se podría substituir por la extracción en fase sólida con MIPs. La aplicabilidad de este método se ha demostrado en un número de compuestos tales como herbicidas, pesticidas y drogas,^{15, 19} las cuales se pueden extraer selectivamente incluso de muestras complejas tales como extracto de tejido (e.g. hígado de vaca, suero de sangre y orina).²³ La droga analgésica sameridina se pudo extraer de plasma de sangre en una concentración de 20nM y cuantificar posteriormente por cromatografía de gas. De esta manera, los cromatogramas obtenidos fueron más claros comparados con el método estándar de la extracción del líquido-líquido.^{13, 21}

2.3.1 Estructura artificial del complejo Anticuerpo/receptor

Las estructuras artificiales del complejo anticuerpo y receptor preparados por estampado molecular son complementos conceptualmente atractivos a sus contrapartes naturales. En los últimos años, varios estudios han demostrado que los MIPs pueden servir como sitio receptor de anticuerpos naturales y ser utilizados como elementos de reconocimiento en el análisis inmunológico. La naturaleza polimérica de los MIPs da lugar a receptores de diversos anticuerpos naturales siendo esto una ventaja tecnológica. Por ejemplo, la resistencia física y química de MIPs conduce a la posibilidad de esterilizar los polímeros, la alta durabilidad asegura una alta estabilidad de las características de reconocimiento, y el costo de producción es considerablemente más bajo. Otra ventaja es la eliminación del empleo de animales como hospederos en la producción del anticuerpo.



La variedad de técnicas desarrolladas para la determinación de analitos por inmunoensayo incluye varias configuraciones de radioinmunoanálisis (RIAs), los inmunoensayos de la enzima (ELISAs),⁴⁵ y Western Blot⁴⁶. La mayoría de estas técnicas confían en la inmovilización del anticuerpo sobre una fase sólida para simplificar la separación del antígeno libre del complejo del anticuerpo-antígeno. Se ha demostrado que los polímeros molecularmente impresos se pueden emplear en este tipo de inmunoensayos en lugar de los anticuerpos. El formato principal del análisis usado con los polímeros estampados es que el MIP enlaza competitivamente al analito. Esto es análogo al inmunoensayo en fase sólida, que es un radioanálisis competitivo para la determinación del crecimiento de hormonas humanas.²¹ La posibilidad de substituir los anticuerpos por los polímeros estampados primero fue demostrada con el desarrollo de un MIP para el broncodilatador theophyllina.¹

2.3.2 Ventajas potenciales de MIPS como reemplazos para los anticuerpos biológicos en inmunoensayos:¹⁸

Las principales ventajas se describen a continuación:

- Es difícil producir anticuerpos selectivos para moléculas pequeñas (deben ser ligados a una proteína del portador antes de la inoculación). Sin embargo, tales compuestos son compatibles con el estampado molecular.
- Es complicado recuperar los anticuerpos naturales contra compuestos o inmunosupresores altamente tóxicos. Pero no hay problemas adicionales en la fabricación de los MIPS para tales analitos.
- En algunos casos, puede ser deseable realizar análisis en medios no acuosos. Los anticuerpos proteícos funcionan mal en tales condiciones pero la función de los MIPS a menudo funcionan mejor en disolventes orgánicos que en condiciones acuosas.
- Los MIPS son estables en comparación con los anticuerpos biológicos.
- La producción de MIPS no requiere el sacrificio de animales.¹⁸



2.3.3 Usos de catalizadores sintéticos

Uno de los desafíos más importantes de los MIPs es su uso como imitadores de las enzimas. En paralelo al trabajo hecho con los anticuerpos, se han realizado experimentos para evidenciar la actividad catalítica ejercida por los sitios estampados. El enfoque más común ha sido el uso de los análogos del estado de la transición (TSAs) en el protocolo de estampado, así estabilizando la transición de la reacción y realzando el índice de la formación del producto. Cierta énfasis se ha puesto en la hidrólisis de ésteres activos. Otras estrategias son el uso análogo de la coenzima para proporcionar un mecanismo catalítico predeterminado y útil, así como el uso de los compuestos de coordinación para la mediación de reacciones catalíticas y el uso de las estrategias diseñadas para la organización correcta de sitios catalíticos.⁴⁷

2.3.4 Biosensores

Uno de los usos más atractivos desarrollados en el área del estampado molecular es el uso de MIPs como elementos de reconocimiento (biosensores). Normalmente, un elemento de detección, tal como una enzima, un anticuerpo o un receptor, se inmoviliza en la interfase entre el sensor y la muestra del analito. Una señal química selectiva, que resulta del proceso de reconocimiento del analito al elemento del reconocimiento, se transduce posteriormente en una señal eléctrica, amplificada y convertida. La característica de estos dispositivos es la proximidad entre el elemento de detección y el elemento transducido. La posibilidad de substituir elementos de detección naturales con los MIPs tiene un número de ventajas potenciales similares a éstas encontradas con los substitutos ya mencionados del anticuerpo. Así, son más estables y resistentes a tratamientos ácidos y alcalinos, y en los casos donde no se encuentra ningún elemento de reconocimiento biológico, son la única alternativa. Dado las ventajas de los MIPs sobre sus contrapartes naturales, los MIPs tienen el potencial de convertirse en alternativas de detección altamente resistentes.^{16,21}



2.3.5 Cromatografía de estampado molecular (MIC)

El estampado es altamente conveniente para la separación de los componentes de una mezcla compleja. En esta línea son de interés especial las separaciones quirales. Las características de estos materiales permiten la elución de los enantiómeros, sólo dependiendo de qué forma enantiomérica fue utilizada como plantilla para estampado. Por ejemplo, cuando el R-r-enantiómero se utiliza como antígeno, la S-forma será eluida primero, y viceversa para el S-s-enantiómero. Puesto que hay actualmente cerca de 500 fármacos ópticamente activos en el mercado, la resolución racémica de fármacos es un uso potencial importante.^{16, 46}



3. OBJETIVO:

- Determinar el alcance de la técnica del estampado molecular, basada en la polimerización en fase inversa en el sistema tolueno-agua a 25°C, para la purificación de gamma inmunoglobulina IgG (150KDa) equina.

3.1. Objetivos específicos

- Construir partículas poliméricas por polimerización en fase inversa iniciada por radical libre vía redox, implantados con anticuerpos.
- Determinar la eficiencia de remoción para la proteína gamma inmunoglobulina IgG (150KDa) equina purificada.
- Establecer las constantes de adsorción de gamma inmunoglobulina IgG (150KDa) equina en los polímeros estampados.
- Evaluar la adsorción de gamma inmunoglobulina IgG (150KDa) equina en competencia con la enzima catalasa (peroxidasa) en los polímeros estampados.

4. HIPÓTESIS:

La polimerización por radicales libres vía redox en fase inversa en el sistema tolueno/agua a 25°C con la adición de una plantilla molecular de una proteína pura permitirá obtener un material en forma de microesferas las cuales serán selectivas a la adsorción de dicha proteína presente en mezclas complejas.



5. METODOLOGÍA

5.1 Metodología para la estandarización de la técnica de estampado molecular con BSA

La metodología a emplear para la estandarización de la técnica de estampado molecular se realizó con la proteína BSA y está descrita en el Apéndice 10.3

5.2 Metodología para la técnica de estampado molecular con IgG

La metodología a emplear está descrita en el esquema de la Figura 9.

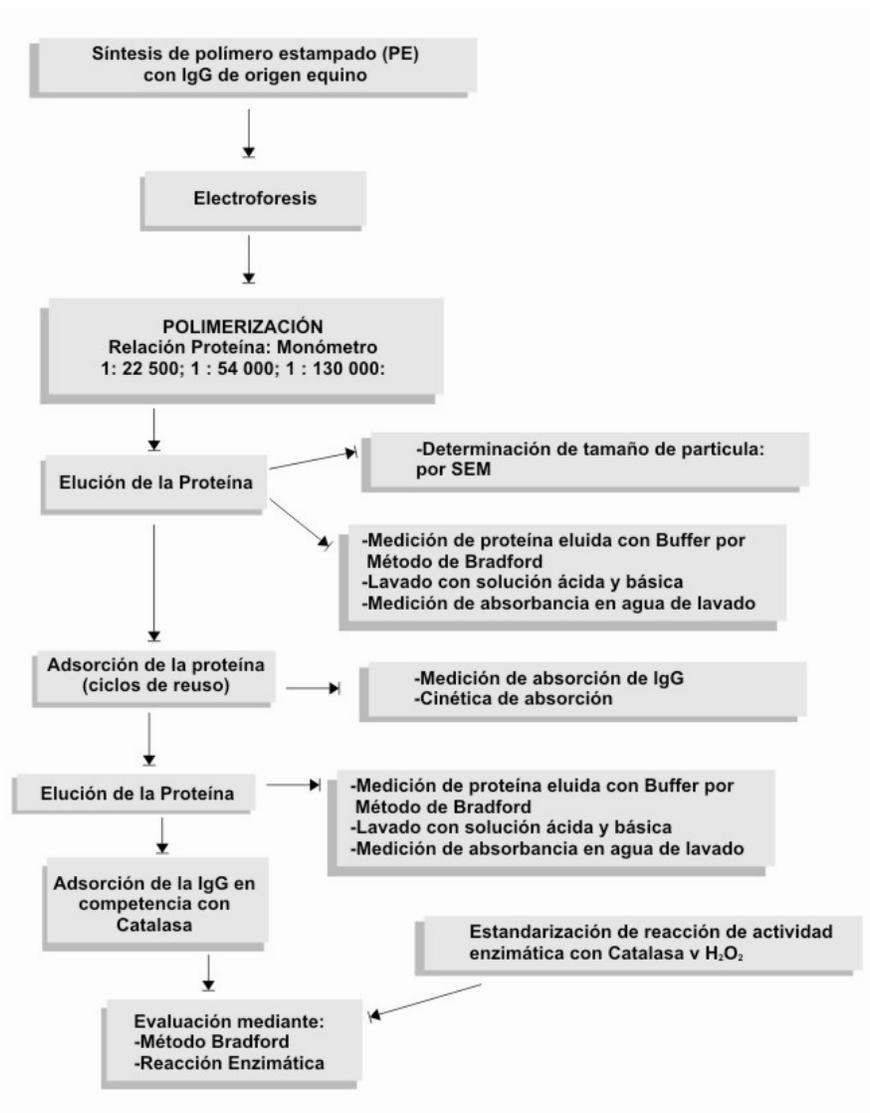


Figura 9. Representación esquemática del proyecto Estampado Molecular de IgG.



5.3 Materias primas:

- La muestra de proteína IgG purificada fue amablemente proporcionada por la empresa SILANES SA de CV.
- Proteína BSA SIGMA-ALDRICH. Lote 13H0331. Pureza 99% electroforesis en gel.
- Enzima Catalasa SIGMA-ALDRICH. Lote 23F-7035 Pureza 99% electroforesis en gel

5.4 Material y Reactivos:

- Ácido acético glacial. J.T. Baker. CAS 64-19-7. CH_3COOH , FW. 60.05
- Acrilamida (AC). SIGMA-ALDRICH (pureza 99+% pureza-grado electroforesis). CAS 79-06-1. $\text{CH}_2\text{:CHCONH}_2$, FW. 71.08. Almacenada a 5°C.
- Buffer de referencia pH 4,7 y 10. Hycel de México SA de CV
- Dodecil sulfato de sodio. SIGMA-ALDRICH. CAS 151-21-3. $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{S}\cdot\text{Na}$ FW288.38
- Etil celulosa. SIGMA-ALDRICH. CAS 9004-57-3
- Fosfato de sodio monobásico. J.T. Baker. . CAS 7778-770. NaH_2PO_4 , FW. 135.09
- Fosfato de sodio dinobásico dodecahidratado. J.T. Baker. . CAS 10034-32-4. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ FW. 358.14
- Hidrogen Sulfito de sodio. SIGMA-ALDRICH. CAS 7631-90-5. NaHSO_3 FW.
- N,N'-Metilen-Bis acrilamida (MBA). SIGMA-ALDRICH. CAS 110-26-9. $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ FW. 154.17. Almacenada a 5°C
- Nitrógeno gaseoso. Grado de Pureza Industrial. AGA
- Persulfato de Potasio (KPS). SIGMA-ALDRICH. CAS 7727-21-1. $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ FW. 270.33.
- Reactivo de Bradford: Bio Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate CAS Nr 7664-38-2.
- Tolueno. J.T. Baker. Pureza HPLC. CAS 108-88-3. $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$, FW. 92.14 Almacenada a 5°C.
- Reactivos de Electroforesis: Bio Rad Protein Assay. CAS Nr 7664-38-2.



5.5 Equipo e Instrumentación:

- Reactor redondo de tres bocas: Marca ALDRICH
- Embudo de presión compensada: Marca ALDRICH
- Parrilla de agitación y termostato: Marca IKA RTC Basic Modelo ETS-D4 fuzzy. Temperatura -10° a 400°C.
- Espetrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Lambda 2S
- Micropipetas:
 - 0.5-10µL Labsystem Finnpipette Colour A22172
 - 5-40µL Labsystem Finnpipette Colour K47234
 - 40-200µL Labsystem Finnpipette Colour K47082
 - 0.5-10µL Labsystem Finnpipette Colour A21297
- Potenciómetro: Marca Beckman Modelo Φ41 pH meter.
- Equipo de electroforesis: marca Bio-Rad.

5.6 Procedimientos

5.6.1 Síntesis de un blanco mediante la técnica de polimerización en fase inversa iniciada por radical libre vía proceso redox: La síntesis del blanco se llevó a cabo a 25 °C con la ayuda de un termostato en un reactor de vidrio agitado redondo de 3 bocas. La reacción se llevó a cabo en atmósfera inerte. Se disolvieron en el medio Tolueno-agua los siguientes compuestos: monómero acrilamida, entrecruzante bis-acrilamida y surfactante etil celulosa. La mezcla de reacción se burbujeó con nitrógeno con ayuda de una jeringa a través de un septa por 30 minutos para el desplazamiento del oxígeno presente en la mezcla de reacción. Posteriormente se agrego desde un embudo de adición de presión compensada una disolución acuosa del iniciador persulfato de potasio y bisulfito sódico gota a gota. La correcta adición y concentraciones relativas de los reactantes dieron lugar a la creación de microesferas poliméricas. La cantidad de entrecruzante respecto a monómero, agitación, concentración de monómero, y tiempo de adición del iniciador son las variables del proceso. La estructura de los materiales se determinó visualmente mediante microscopía electrónica de barrido.



5.6.2 Diseño de la curva estándar de IgG: La curva patrón de gamma inmunoglobulina de suero equino se realizó mediante espectroscopia visible con la utilización de un cromóforo mediante el método de Bradford. (Ver apéndice 10.2)

5.6.3 Síntesis del polímero estampado de proteína: El procedimiento y resultados físicos es idéntico al descrito para el blanco salvo por la adición de un buffer de fosfatos en lugar de agua destilada para disolver la proporción deseada de la proteína. La concentración de la proteína es otra variable del proceso. Posteriormente el polímero se lavó con agua acidificada y con la acción del surfactante SDS para recuperar la proteína adsorbida.

Se fabricaron tres polímeros estampados con BSA donde las proporciones de proteína y monómero fueron las siguientes: 1: 15 000(MIP1); 1: 22 500(MIP2) y 1: 54 000 (MIP3). Asimismo, se fabricaron tres polímeros estampados con IgG donde las proporciones de proteína y monómero fueron las siguientes: 1: 22 500 (PE1); 1: 54 000 (PE2) y 1: 130 000 (PE3).

5.6.4 Análisis de absorción: El polímero se puso en contacto con una disolución acuosa de la gamma inmunoglobulina de suero equino o en mezclas de proteínas (gamma inmunoglobulina de suero equino y catalasa). El análisis de la adsorción se llevó a cabo tomando alícuotas del sobrenadante que fueron analizadas por espectrofotometría en función de la curva patrón anteriormente descrita.

5.6.5 Estandarización de la actividad enzimática Catalasa. La actividad de esta enzima se determinó espectrofotométricamente a 240nm. Se empleó como sustrato una disolución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a la cual se adicionó el extracto enzimático de catalasa. Inmediatamente se tomó lectura de la absorbancia para determinar los tiempos y concentraciones a los cuales la reacción enzimática es lineal. La actividad específica de catalasa (micromol de H₂O₂ descompuestos por minuto por miligramo de proteína total) se calculó mediante la ecuación descrita en la figura 10.⁴⁸

$$\frac{1000 * \Delta A_{240} / \text{min}}{43.6 * \text{mg de proteína/mL de mezcla de reacción}}$$

Figura 10. Ecuación de la actividad específica de catalasa.



6. RESULTADOS

6.1 Resultados de la Estandarización de la Técnica de Estampado Molecular con BSA

Los resultados de la Estandarización de la Técnica de Estampado Molecular se describen en el Apéndice 10. 4

6.2 Resultados obtenidos para el polímero estampado con IgG

6.2.1 Rendimientos de polimerización del polímero estampado con IgG:

La polimerización en fase inversa en el sistema Tolueno-agua a 25°C se realizó por triplicado bajo las mismas condiciones de reacción para las diferentes concentraciones de IgG descritas en la sección 5. El rendimiento de polimerización es en promedio de 98% (Cuadro 1, 2 y 3)

Cuadro 1. Rendimiento de Polimerización para PE1

	A	B	C
Acrilamida	3.65g	3.61g	3.63g
N,N' -Metilen-Bis Acrilamida	0.24g	0.24g	0.24g
Peso del polímero	3.8g	3.7g	3.8g
Rendimiento	97.1%	96.8%	97.3%
Promedio	97.1%		

Cuadro 2. Rendimiento de Polimerización para PE2

	A	B	C
Acrilamida	3.63g	3.64g	3.64g
N,N' -Metilen-Bis Acrilamida	0.24g	0.24g	0.23g
Peso del polímero	3.7g	3.7g	3.7g
Rendimiento	95.3%	95.7%	95.1%
Promedio	95.4%		



Cuadro 3. Rendimiento de Polimerización para PE3

	A	B	C
Acrilamida	3.67g	3.65g	3.65g
N,N' -Metilen-Bis Acrilamida	0.24g	0.24g	0.24g
Peso del polímero	3.6g	3.6g	3.6g
Rendimiento	91.5%	91.6%	92.4%
Promedio	91.9%		

6.3. Adsorción de Proteína

La proteína estampada es de 80 % para PE1, 74% para PE2 y 69.9% para PE3 (Cuadro 4). La cantidad de proteína eluída es de 87.57% para PE1, 94.12% para PE2 y 92.62% para PE3 (Cuadro 5), es decir, la proteína que queda atrapada dentro de las microesferas sin poder removerse después del lavado del polímero es de 39.4% para PE1, 21.5% para PE2 y 19.3% para PE3 bajo las condiciones de estampado descrita en el Cuadro 15 y Cuadro 16. Para la elución de la proteína se empleó una disolución de ácido acético 10%(v/v) y SDS 1% (w/v). En la Figura 11 se representa esquemáticamente el proceso de elución a partir del polímero estampado.

Cuadro 4. Proteína (IgG) estampada

Polímero Estampado	concentración inicial		concentración final		Proteína estampada	%
	Absorbancia	mg/mL	Absorbancia	mg/mL		
PE1	0.7397	10.97	0.1476	2.18	8.78	80.0
PE2	0.3994	5.92	0.1036	1.53	4.38	74.0
PE3	0.3073	4.55	0.09254	1.37	3.18	69.9



Cuadro 5. Proteína (IgG) eluída

Polímero Estampado	Proteína Inicial (mg/mL)	Proteína estampada (mg/mL)	Proteína Eluída (mg/mL)	%
PE1	10.97	8.78	7.69	87.5
PE2	5.92	4.38	4.13	94.1
PE3	4.55	3.18	2.95	92.62

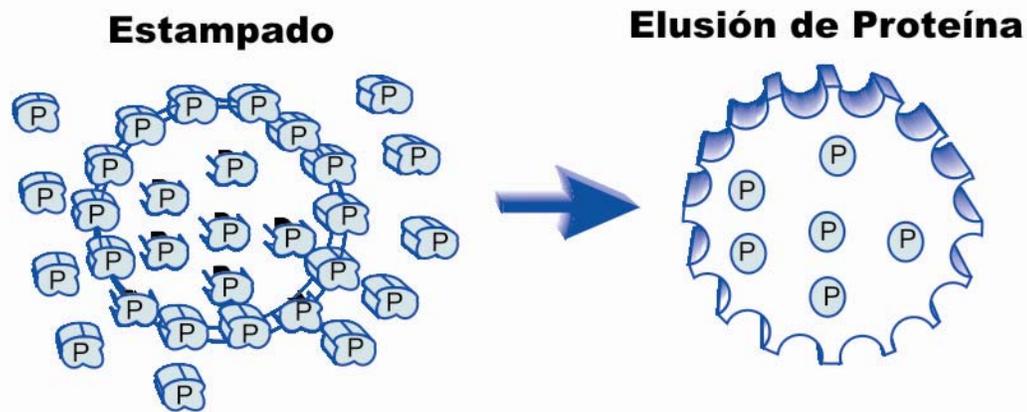


Figura 11. Esquema del estampado molecular y proteína retenida después del lavado

6.4. Morfología

Se realizó Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para determinar la morfología de las partículas. Las partículas estampadas con IgG mostraban una morfología esférica. Las microesferas del polímero estampado PE3 se muestran en la figura 12 y 13.

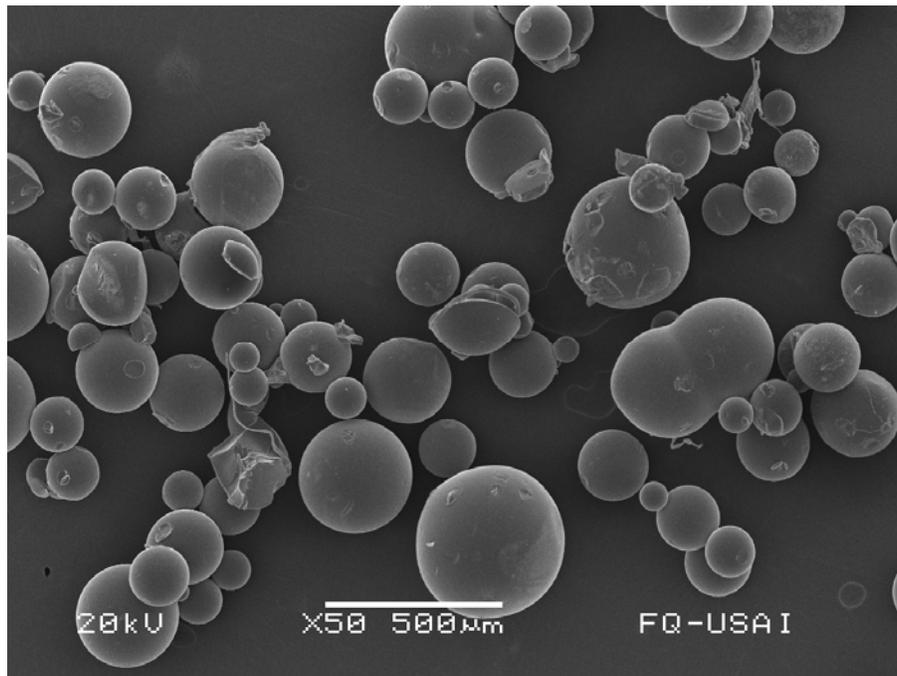


Figura. 12. Fotografía SEM de Polímero Estampado PE3

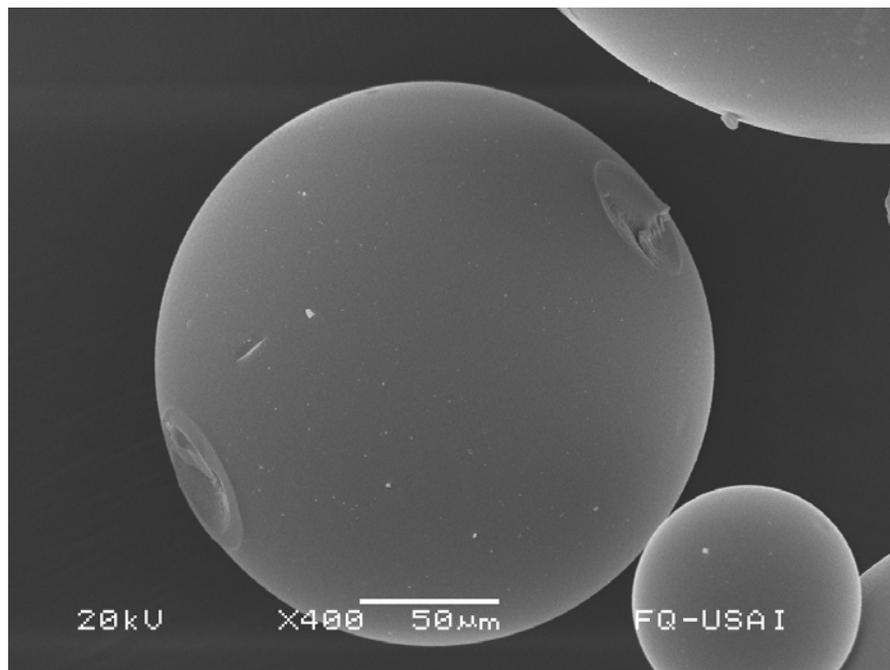


Figura. 13. Fotografía SEM de Polímero Estampado PE3



6.5. Características de la adsorción del Polímero Estampado con IgG

Se determinó la capacidad de adsorción del polímero estampado con un estudio de la cinética de adsorción para PE1 (Q1), PE2 (Q2) y para PE3 (Q3). En el proceso de incubación se empleó 1g de polímero en 10mL de disolución de IgG (gamma inmunoglobulina de suero equino) de concentración 1mg/mL, y se sometió a agitación tangencial a 25°, pH=7.2 por 7 horas. La capacidad de adsorción (Q) del polímero estampado se determinó en 9.73mg/g para PE1, 8.47mg/g PE2 y 7.86mg/g para PE3 según la fórmula descrita en la Figura 14. En la figura 15 se muestra la capacidad de adsorción, Q, del polímero estampado. La eficiencia del estampado bajo las condiciones de operación fue del 93%.

Al comparar la cinética de adsorción de PE1, PE2 y PE3, la cantidad de proteína empleada para imprimir y la capacidad de adsorción (Q) se determinó que el resto de los estudios se realizarían con PE3 ya que utiliza una menor cantidad de proteína para el estampado y su capacidad de adsorción es aceptable (Cuadro 6).

En el apéndice 10.5 se muestran los Cuadros correspondientes a la Capacidad de Adsorción para PE1 (Q1), PE2 (Q2) y para PE3 (Q3).

$$Q = (C_o - C_s) * (v/m)$$

Figura 14. Ecuación de la capacidad de adsorción

Cuadro 6. Comparación de PE1, PE2 y PE3

	PE1	PE2	PE3
Proteína: Monómero	1:54 000	1:100 000	1: 130 000
% Rendimiento de polimerización	97.1	95.3	91.9
mg iniciales proteína	10.9	5.9	4.5
mg estampados proteína	8.7	4.3	3.1
% estampado	80.0	74.0	69.9
mg recuperados proteína	7.6	4.1	2.9
% recuperación	87.5	94.1	92.6
Qc (mg de proteína/g polímero)	9.7	8.7	7.8

QC (Capacidad de Adsorción)

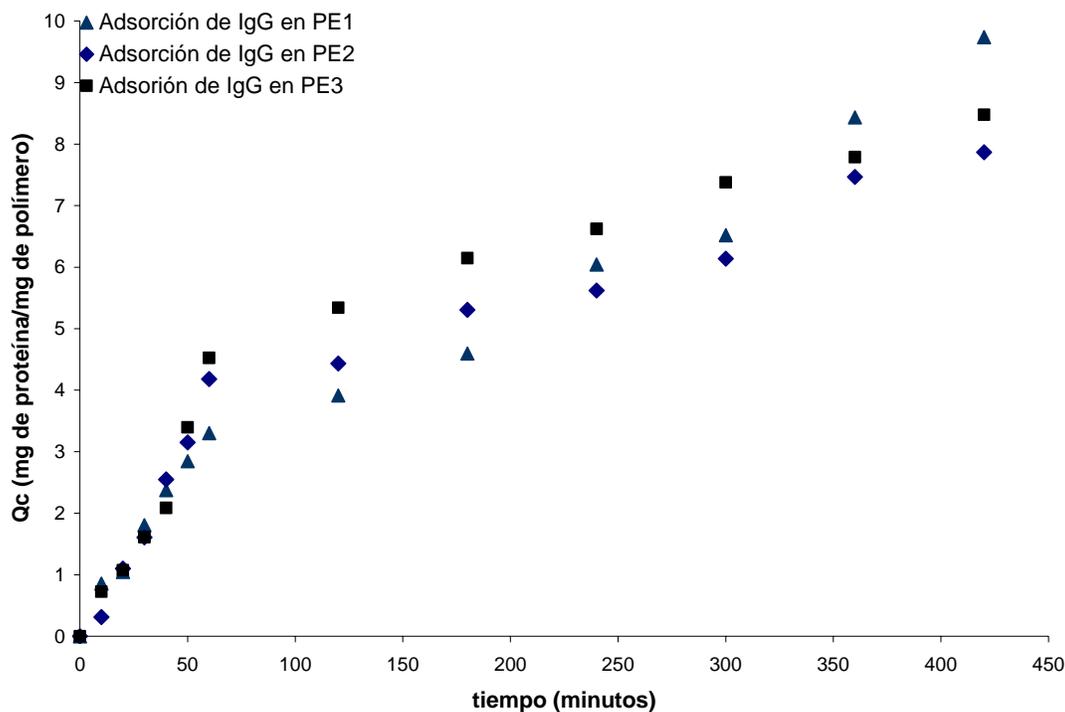


Figura 15. Cinética de adsorción de IgG para PE1, PE2 y PE3.

6.6. Especificidad del reconocimiento del polímero estampado con IgG

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. El peso molecular de la catalasa se encuentra en el rango de 210 – 280kD (Kiseler *et al.* 1967), consta de 4 subunidades idénticas, (Sund *et al.* 1967). La curva estándar de Actividad Enzimática de Catalasa se determinó por el método propuesto por Beer *et. al* (1951) en la zona de la luz ultravioleta (204nm). Se encontró que la enzima presenta linealidad en los primeros tres minutos de la reacción. (Figura 16 y Figura 17). El cuadro correspondiente a la curva estándar de Actividad Enzimática de Catalasa se describe en el Apéndice 10.5.

Se repitió el estudio de cinética de adsorción para PE3 con la enzima Catalasa y la proteína empleada como molécula plantilla (IgG) (Figura 18); Se observó que la adsorción del material para la proteína catalasa fue nula, ya que después de haber sido incubada presenta la misma actividad catalítica. (Figura 19); para la IgG la adsorción fue máxima



(Figura 20); esto se verificó realizando una electroforesis (SD-PAGE) (Figura 21) donde se observó en el carril 3. Para este proceso se incubó 1g de polímero en 10mL de una disolución de Catalasa (1mg/mL) y IgG(1mg/mL), a 25°C, pH=7.2 por 7 horas.

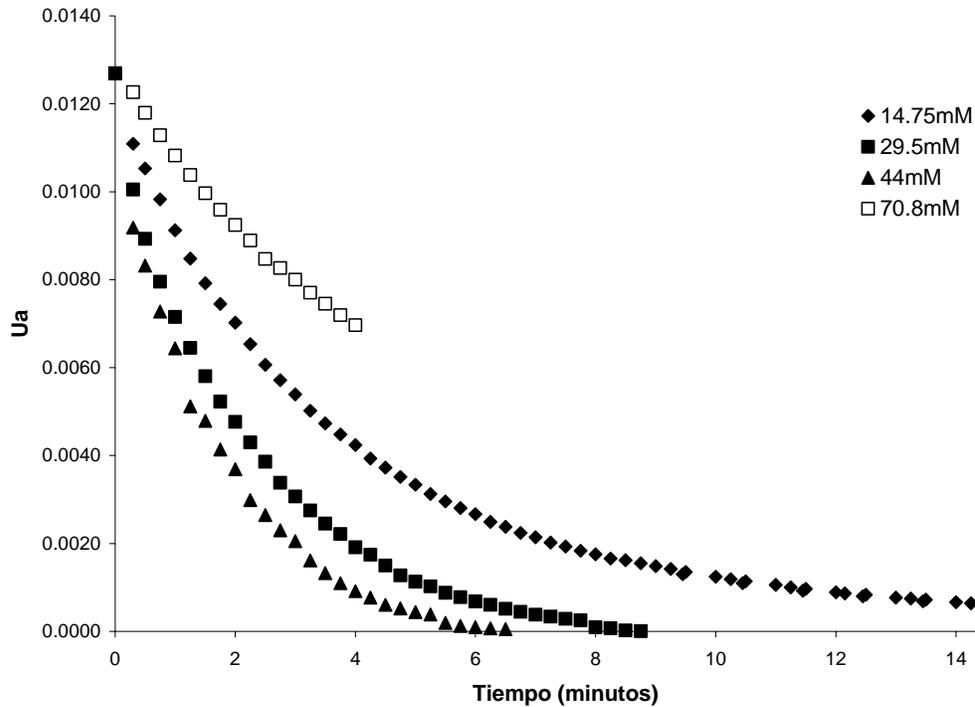


Figura 16. Curva estándar de la actividad enzimática de la Catalasa en la zona de la luz ultravioleta (240nm).

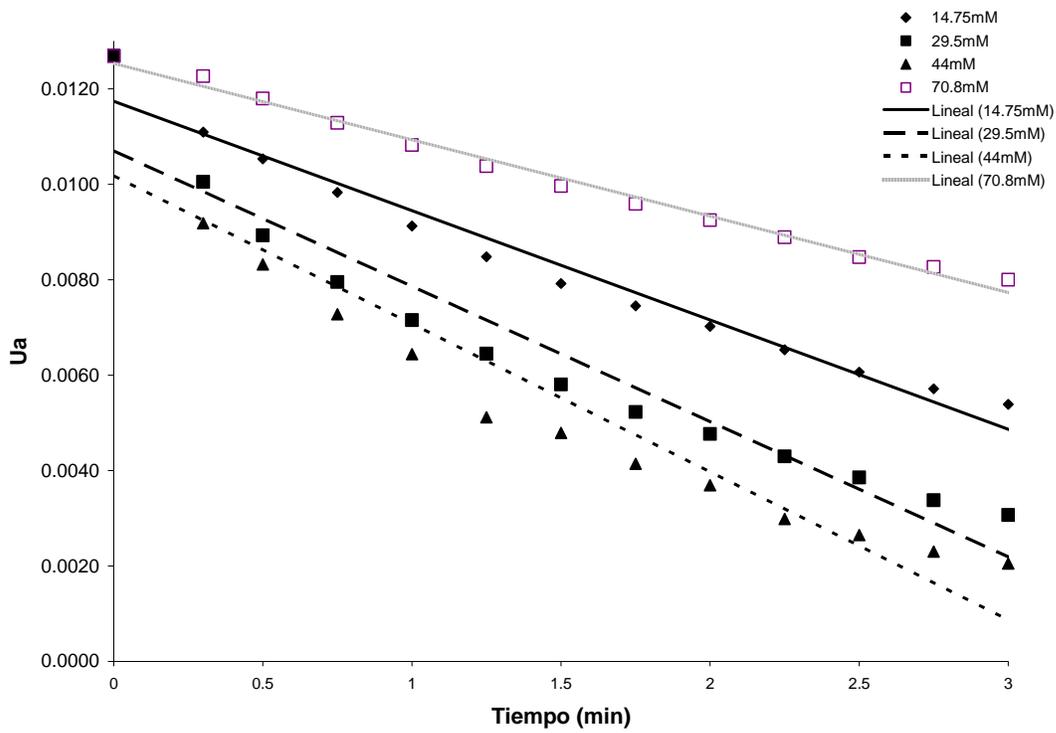


Figura 17. Curva de velocidad inicial de la actividad enzimática de la Catalasa

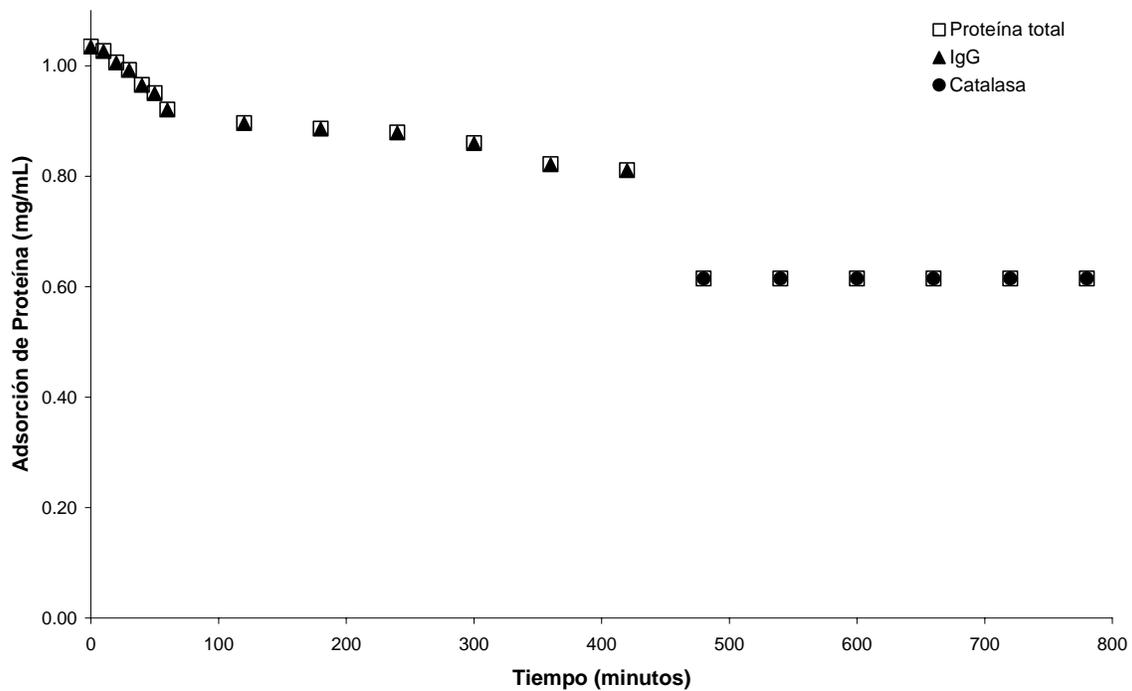


Figura 18. Especificidad de adsorción del polímero estampado al competir con otra proteína globular (Catalasa) no empelada como molécula plantilla.

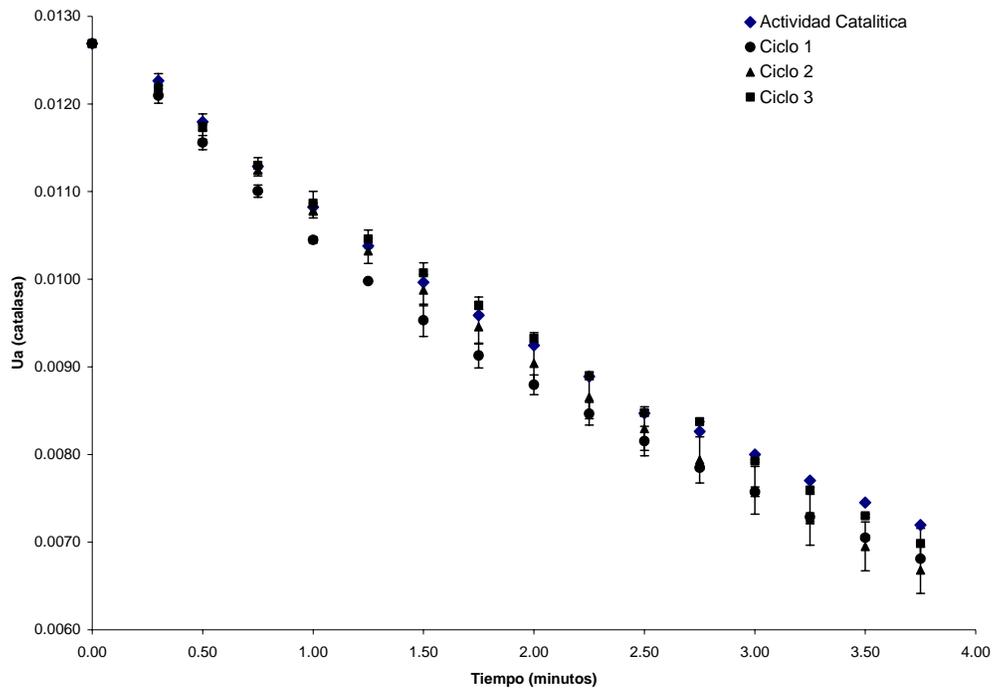


Figura 19. Verificación de la Actividad Catalítica de Catalasa en ciclos de re uso.

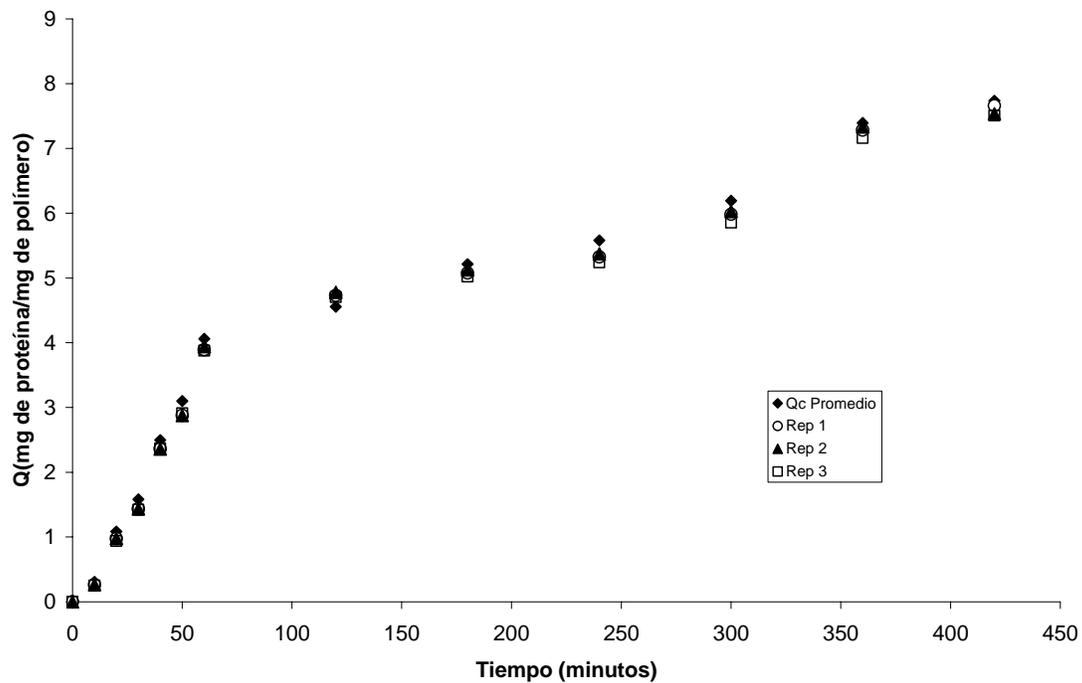


Figura 20. Adsorción máxima de la proteína empleada como plantilla en el polímero estampado al competir con otra proteína globular (Catalasa)

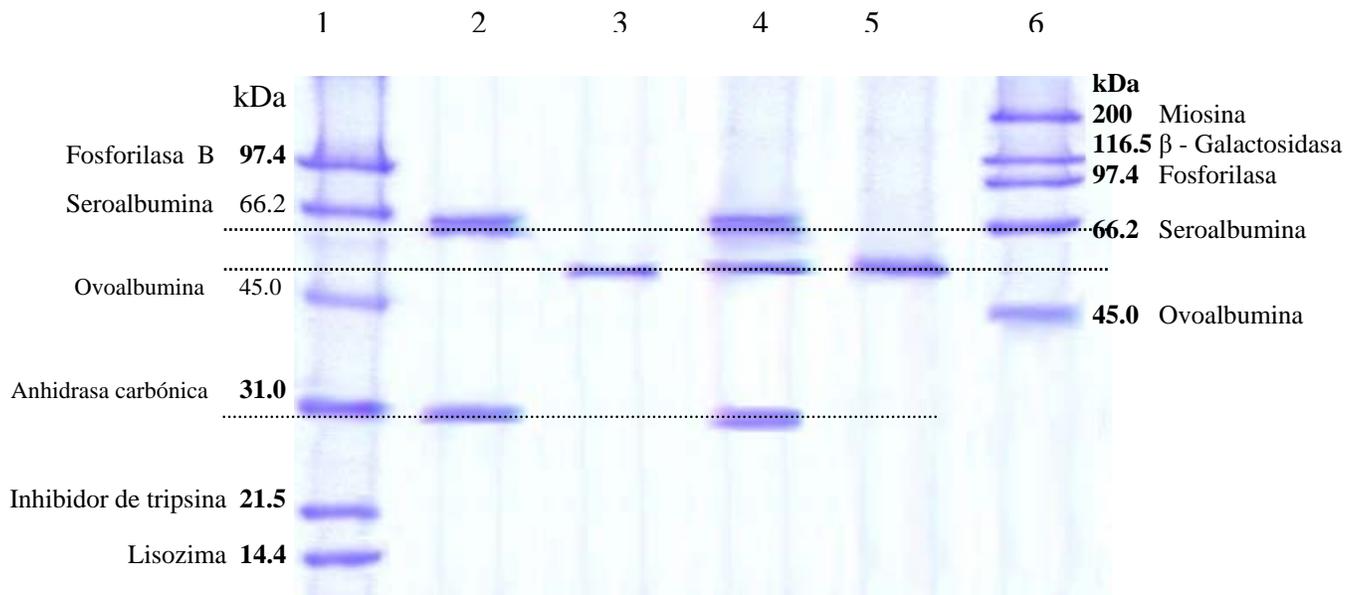


Figura 21. Electroforesis desnaturalizante (SDS- PAGE) de IgG. En el carril 1, estándares de peso molecular de amplio rango. Carril 2, IgG (proteína empleada como molécula plantilla antes de ser incubada con el polímero estampado). Carril 3, Catalasa (antes de ser incubada con el polímero estampado). Carril 4 Mezcla de Proteínas (IgG y Ctalasa) Carril 5, Sobrenadante después de la incubación (Catalasa). Carril 6 estándares de peso molecular de alto rango.

6.7. Características de reutilización del polímero estampado

Los polímeros estampados fueron considerados para su uso en subsiguientes ocasiones o ciclos con el fin de evaluar su capacidad de reutilización y se estudió la cinética de adsorción (Figura 22). Las microesferas estampadas con IgG fueron lavadas con una disolución de ácido acético al 10% (v/v) que contenía 1% (w/v) SDS para remover la proteína IgG. Posteriormente estas microesferas fueron utilizadas para adsorber repetidas veces IgG en el mismo material. Se midió la capacidad de adsorción incubando 0.5g de polímero en 5mL de disolución de IgG (Inmunoglobulina) de concentración 1mg/mL, en agitación tangencial a 25°, pH=7.2 por 12 horas. Como puede observarse de los datos representados en la Figura 22 el material no presenta deterioro ni disminución de la



adsorción después de estos ciclos con lo que se comprobó su reproducibilidad. Los cuadros que representan los ciclos de reutilización en la adsorción de la proteína empleada como plantilla se describen en el apéndice 10.5.

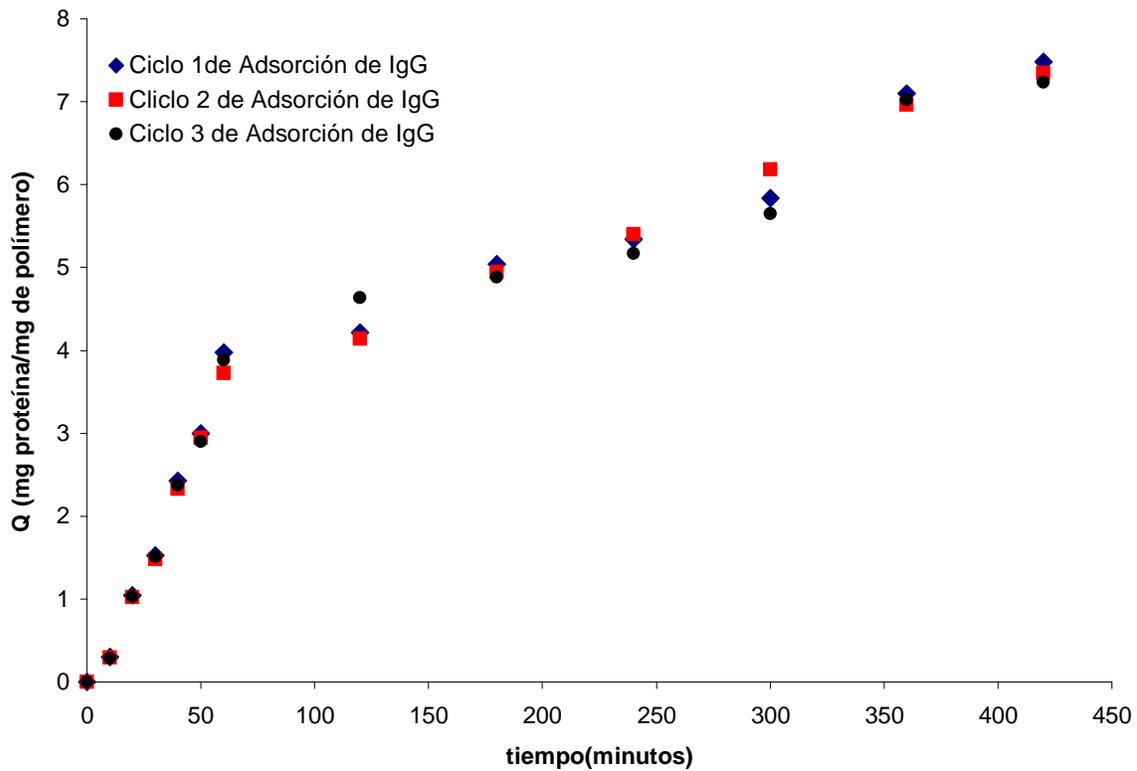


Figura 22. Reproducibilidad de adsorción del polímero estampado.



7. CONCLUSIONES

- Se estandarizó la metodología para el estampado molecular de proteínas.
- El material sintetizado es capaz de adsorber y reconocer selectivamente a la proteína empleada como plantilla.
- El polímero estampado con BSA presenta un rendimiento de polimerización de 92% y el polímero estampado con IgG de 97%,
- El porcentaje de estampado de proteína para BSA es de 93% y para IgG es de 70% y la capacidad de adsorción es reproducible en cada caso.
- La capacidad de adsorción del polímero estampado con BSA es de 9mg de proteína/g de polímero y la para el polímero estampado con IgG es de 7.73mg de proteína/g de polímero.
- El polímero estampado con IgG es selectivo a la adsorción de ésta en contacto con una mezcla de Catalasa e IgG.
- La capacidad de reutilización no disminuye con los ciclos de uso en ambos polímeros estampados.



8. RECOMENDACIONES

- Verificar la actividad de la IgG antes y después del estampado.
- Adaptar esta metodología para la purificación de proteínas globulares.
- Evaluar la adsorción de la proteína empleada como plantilla a partir del suero equino completo.

9. BIBLIOGRAFÍA

Libros:

B. Sellergren, “Molecularly Imprinted Polymers”, B. Sellergren Editor, ELSEVIER 2001.

L. Fainborm y J. Geffner. “Introducción a la Inmunología Humana” Ed. Médica Panamericana 2005.

Publicaciones:

1. Vlatakis, G., Andersson, L.I., Muller, R., Moschbach, K., *Nature*, 361, (1993), 645-654.
2. Dickert, F.L., Hayden, O., *Analytical Chemistry*, 74, (2002), 1302-1306.
3. Ye, L., Yu, Y., Mosbach, K., *Analyst*, 126, (2001), 760-767.
4. Vallano, P.T., Remecho, V.T., *Journal of Chromatography*, 23, (2000), 888-895.
5. Castro, B., Withcombe, M.J., Vulfson, E.N., Vázquez-Duhalt, R., Bárzana, E. *Analytica Chimica Acta*, 435, (2001,) 83-90.
6. Hayden, O., Lieberzeit, P.A., Blaas, D., Dickert F.L. *Advanced Funcional Materials*, 16, (2006), 1269-1278.
7. Rao, S.V, Anderson K.W., Bachas, L.G., *Mikrochimica Acta*, 128, (1998), 127-143.
8. Hayden, O., Dickert, F.L., *Advanced Funcional Materials*, 13, (2001), 1480-1487.
9. Byström, S.E., Börje, A., Akermark, B., *Journal of American Chemical Society*,. 115, (1993), 2081



10. Yan, M., Kapua, A., *Analytica Chimica Acta*, 435, (2001), 163-171.
11. Mosbach, K., *Analytica Chimica Acta*, 435, (2001), 3-12.
12. Knez, M., Sumerr, M., Bitter, A.M., Wege, C., Jeske, H., *Langmuir*, 20, (2004), 441.
13. Hawkins, D.M., Stevenson, D., Reddy, S.M., *Analytica Chimica Acta*, 542, (2005), 61-65.
14. Pang, X., Cheng, G., Li, R., Lu, S., Zhang, Y., *Analytica Chimica Acta*, 550, (2005), 13-17.
15. Guo T, Xia, Y, Hao, G, *Carbohydrate Polymers*, 62, (2005), 214-221.
16. Ye, L., Mosbach, K., *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 41, (2001), 107-113.
17. Haupt, K., Mosbach, K., *Tibtech*, 16, (1998), 468-475.
18. Ansell, R., *Journal of Chromatography*, 804, (2004), 151-165.
19. Bossi, A., Piletsky, S., Piletska, E., Righetti, P., Turner, A., *Analytical Chemistry*, 73, (2001), 5281- 5286.
20. Paniagua, G., Fernandez, P., Durand, J.S., *Analytica Chimica Acta*, 557, (2006), 179-183.
21. Spivak, D., *Advance Drug Delivery Reviews*, 57, (2005), 1779-1794.
22. Andersson, H.S. Karlsson, J.G., Piletsky, S.A., Koch-Schmidt, A.-C., Mosbach, K., Nicholls, I.A., *Journal of Chromatography*, 848, (1999) 39– 49.
23. Cormack, P., Elorza, A., *Journal of Chromatography*, 804, (2004), 173-182
24. Oral, E., Peppas, N., *Polymer* , 45, (2004), 6163-6173.
25. Karim, K., Breton, F., Rouillon, R., Piletska, E., Guerreiro, A., Chinella, I., Piletsky, S., *Advance Drug Delivery Reviews*, 57, (2005), 1795-1808.
26. Fernandez, I., Takehara, H.A., Santos, C.R., Cormont, F., Latinne, D., Bazin, H., Mota, I., 1997. *Toxicol*, 35:6, (1997), 931–936.
27. Gutierrez, J.M., Leon, G., Lamonte, B., *Clinical Pharmacokinetic*, 42, (2003), 721-741.
28. Raweerith, R., Ratanabanangkoon K., *Journal of Immunological Methods*, 282, (2003), 63– 72.



29. Jones, R.G.A., Landon, J., *Journal of Immunological Methods*, 263, (2002), 57–74.
30. Morais, V., Massaldi, H., *Toxicon*, 46, (2005), 876–882.
31. Leon, G., Stiles, B., Alape, A., Rojas, G., Gutierrez, J.M., *American Journal Tropic Medicine Hygiene*, 61, (1999), 266–27.
32. Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., Griffiths, E., *Toxicon*, 41:5, (2003), 541–557.
33. Dowdall, S.M.J., Matthews, J.B., Mair, T., Murphyc, D., Lovec, S., Proudmana, C.J., *Veterinary Parasitology*, 106, (2002), 225–242.
34. Hooper-McGrevy, K.E., Wilkie, B.N., Prescott J.F., *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 10 (2003) 345-351.
35. Wager, B., Robeson, J., McCracken, M., Watrang, E., Antczak, D.F., *Veterinary immunology and immunopathology*. 105, (2005) 1-14.
36. Takai, S.T., Nakata, I., Fujui, N., Kimura, Y., Sasaki, Y., Kakuda, T., Tsubaki, S., Kondo, T., Sugiura, T. *Journal Equine Science*, 13, (2002), 63-70.
37. Gröndahl, G., Johannisson, A., Jensen-Waern, M., Nilsson-Ekdahl, K., *Veterinary immunology and immunopathology*, 80, (2001), 209-223.
38. López, A.M., Hines, M.T., Palmer, G.H., Alperin, D.C., Hines, S.A., *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9, (2002), 1270-1276.
39. Proudman, J.C., Trees, A.J., *Parasite Immunology*, 18 (1996), 499-506.
40. Sheoran, A.S., Holmes, A., *Veterinary immunology and immunopathology*, 55 (1996), 33-43.
41. Cuhna, C.W., McGuire, T.C., Kappmeyer, L.S., Hines, S.A., López, A.M., Dellagostin, O.A., Knowles, D.P. *Clinical and Vaccine immunology*, 13,2 (2006) 297-300.
42. Hirayama, K., Sakai, Y., Kameoka, K., *Journal of Applied Polymer Science*. 81, (2001), 3378-3387.
43. Ou, S. H., Wu, M.C., Chou, T.C., Liub, C.C. *Analytica Chimica Acta*, 504 (2004) 163-166.
44. Mizukoshia, F., Maedaa, K., Hamanoa, M., Iwatab, H., Matsumurac, T., Kondoc, T., Sugiurac, T., *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88, (2002), 97–101.



-
45. Pozio, E., Sofronic-Milosavljevic, L., Gomez-Morales, M.A., Boireau, P., Nöckler, K., *Veterinary Parasitology*, 108 (2002) 163–178.
 46. Shi, H., Tsai, W-B., Garrison, M., Ferrari, S., Ratner, B., *Nature*, 398, (1999) 593-597.
 47. Guo T, Xia, Y, Hao, G, *Carbohydrate Polymers*, 62 (2005) 214-221.
 48. Beer F., Sizer W., *Journal of Biological Chemistry*. (1952), 133-139.



10. APÉNDICE

10.1 Curvas Estándar de BSA (Método de Bradford, 595nm)

La curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) se determinó por el método de Bradford (595nm) Se realizó por triplicado (Cuadro 7, Cuadro 8, Cuadro 9, Figura 23, Figura 24 y Figura 25).

Cuadro 7. Absorbancias de la curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) determinada por el método de Bradford (595nm).

Concentración BSA (mg/mL)	Absorbancia 595nm
0.0	0.0000
0.1	0.0798
0.2	0.1832
0.3	0.2764
0.4	0.3792
0.5	0.4689
0.6	0.5768
0.7	0.6603
0.8	0.7661
0.9	0.8713

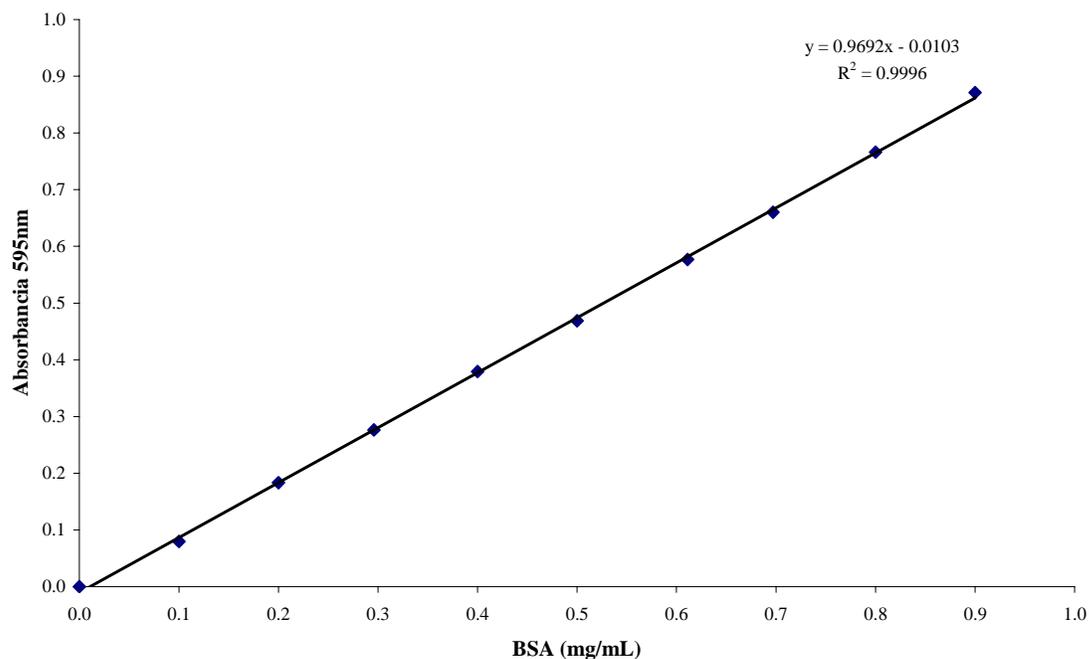


Figura 23. Curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) determinada por el método de Bradford (595nm).



Cuadro 8. Absorbancias de la curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) determinada por el método de Bradford (595nm).

Concentración BSA (mg/mL)	Absorbancia 595nm
0.1	0.0000
0.2	0.0776
0.3	0.1750
0.4	0.2724
0.5	0.3792
0.6	0.4689
0.7	0.5802
0.8	0.6910
0.9	0.7596

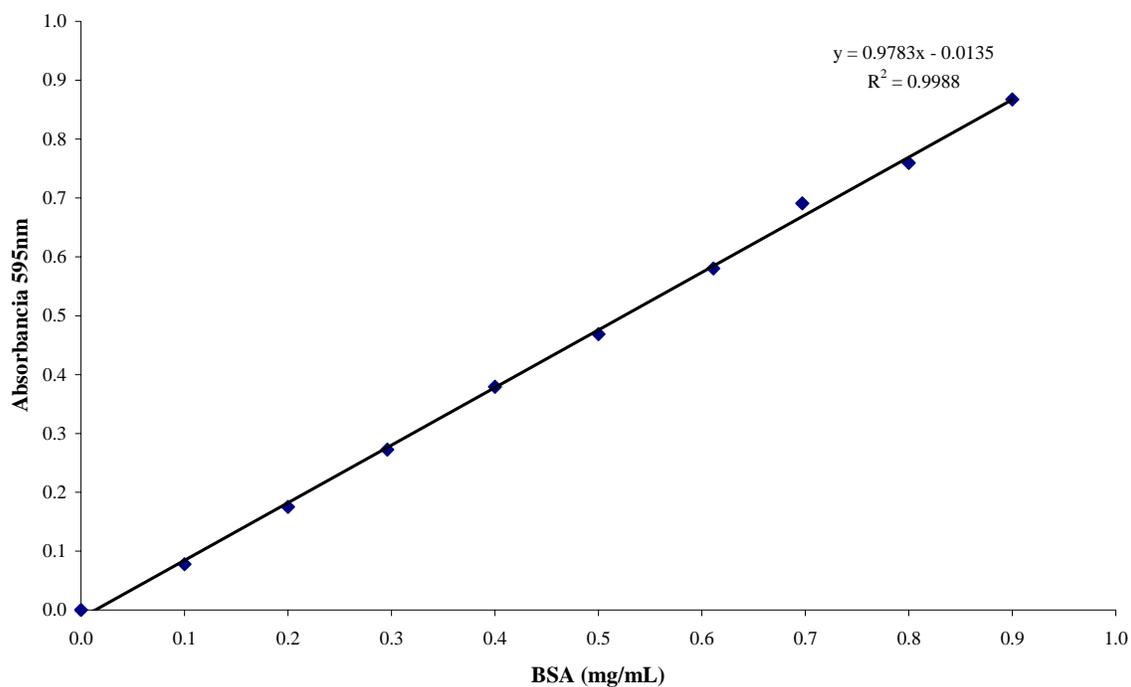


Figura 24. Curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) determinada por el método de Bradford (595nm).



Cuadro 9. Absorbancias de la curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) determinada por el método de Bradford (595nm).

Concentración BSA (mg/mL)	Absorbancia 595nm
0.1	0.0000
0.2	0.0785
0.3	0.1842
0.4	0.2767
0.5	0.3745
0.6	0.4560
0.7	0.5752
0.8	0.6680
0.9	0.7661

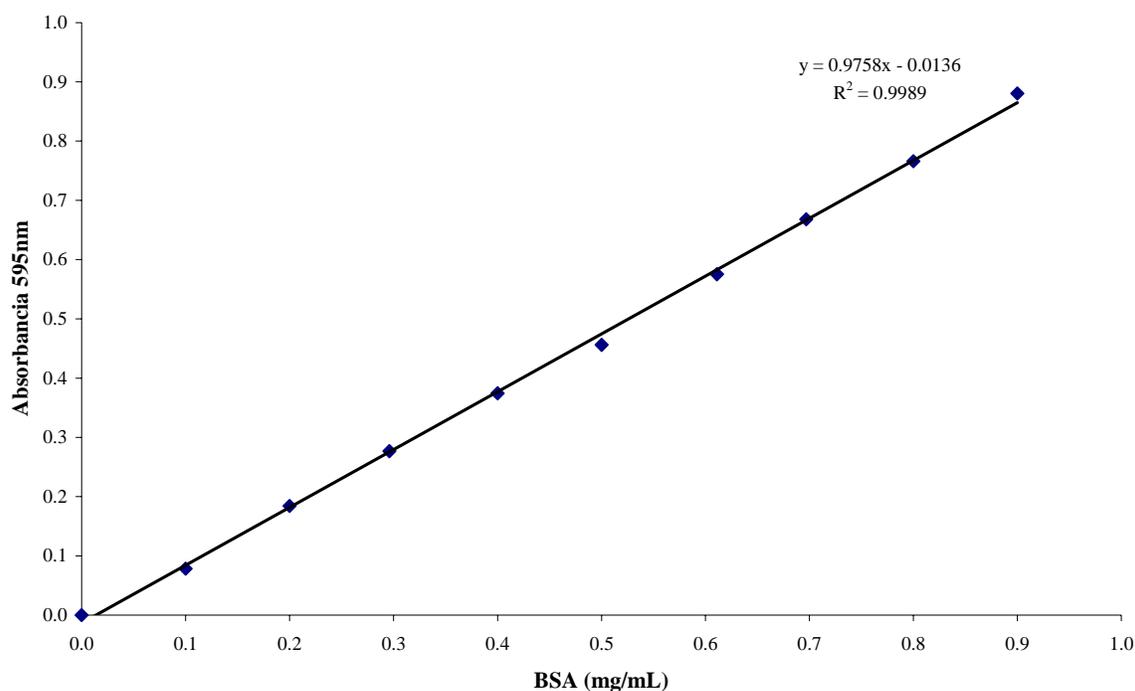


Figura 25. Curva estándar de Albúmina Sérico Bovina (BSA) determinada por el método de Bradford (595nm).



10.2 Curvas Estándar de IgG (Método de Bradford, 595nm)

La curva estándar de Gamma Inmunoglobulina (IgG) se determino por el método de Bradford (595nm) Se realizó por triplicado (Cuadro 10, Cuadro 11, Cuadro 12, Figura 26, Figura 27, y Figura 28).

Cuadro 10. Absorbancia de la curva estándar de Gamma Inmunoglobulina (IgG) determinada por el método de Bradford (595nm).

Concentración IgG (mg/mL)	Absorbancia 595nm
0.0	0.0000
0.1	0.0576
0.2	0.1001
0.3	0.1672
0.4	0.2247
0.5	0.2943
0.6	0.3486
0.7	0.4169
0.8	0.4655
0.9	0.5327
1.0	0.5852
1.1	0.6504
1.2	0.7020

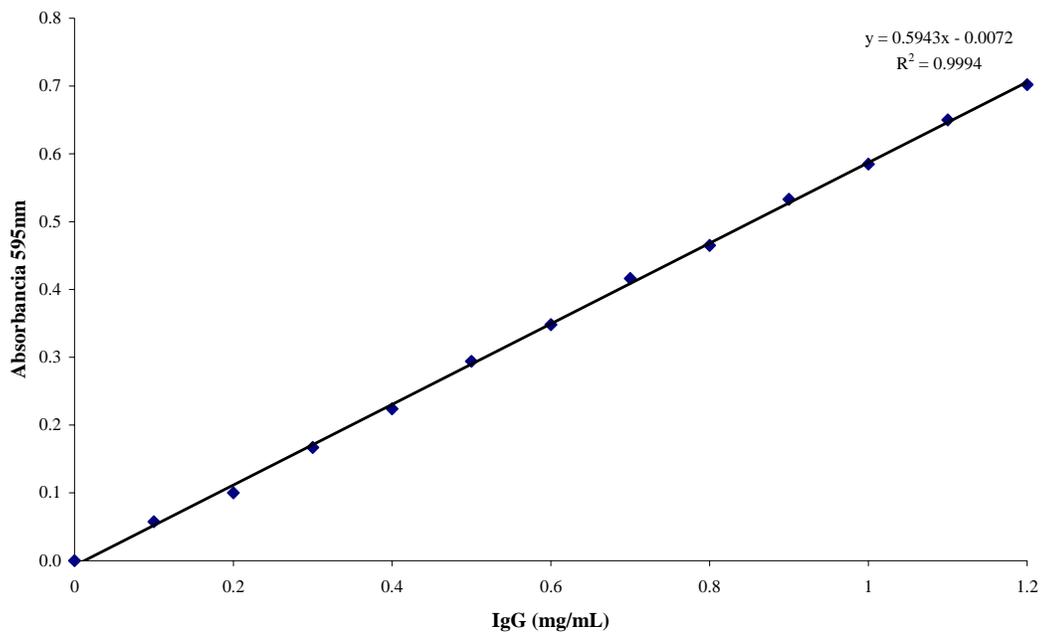


Figura 26. Curva estándar de gamma inmunoglobulina (IgG) determinada por el método de Bradford (595nm).



Cuadro 11. Absorbancias de la curva estándar de gamma inmunoglobulina (IgG) determinada por el método de Bradford (595nm).

Concentración IgG (mg/mL)	Absorbancia 595nm
0.0	0.0000
0.1	0.0572
0.2	0.1055
0.3	0.1720
0.4	0.2295
0.5	0.2927
0.6	0.3562
0.7	0.4117
0.8	0.4658
0.9	0.5343
1.0	0.5926
1.1	0.6440
1.2	0.7112

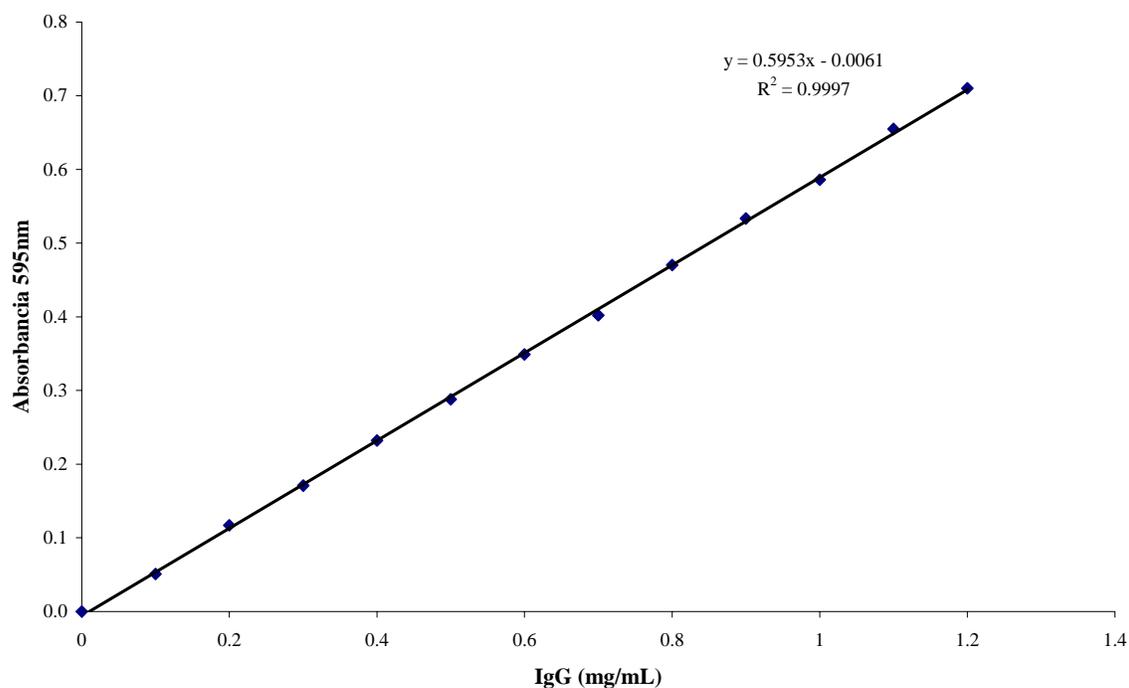


Figura 27. Curva estándar de gamma inmunoglobulina (IgG) determinada por el método de Bradford (595nm).



Cuadro 12. Absorbancias de la curva estándar de Gamma Inmunoglobulina (IgG) determinada por el método de Bradford (595nm).

Concentración IgG (mg/mL)	Absorbancia 595nm
0.0	0.0000
0.1	0.0510
0.2	0.1170
0.3	0.1710
0.4	0.2320
0.5	0.2880
0.6	0.3490
0.7	0.4020
0.8	0.4702
0.9	0.5335
1.0	0.5860
1.1	0.6550
1.2	0.7102

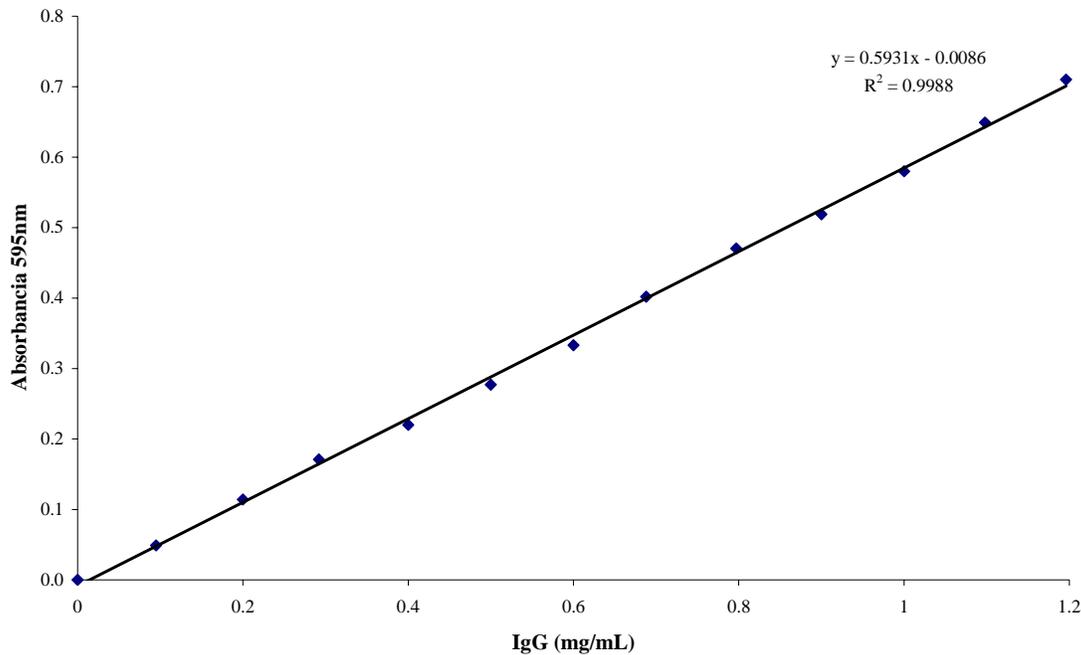


Figura 25. Curva estándar de gamma inmunoglobulina (IgG) determinada por el método de Bradford (595nm).



10.3 Metodología para la estandarización de la técnica de estampado molecular

La metodología a emplear está descrita en la figura 29.

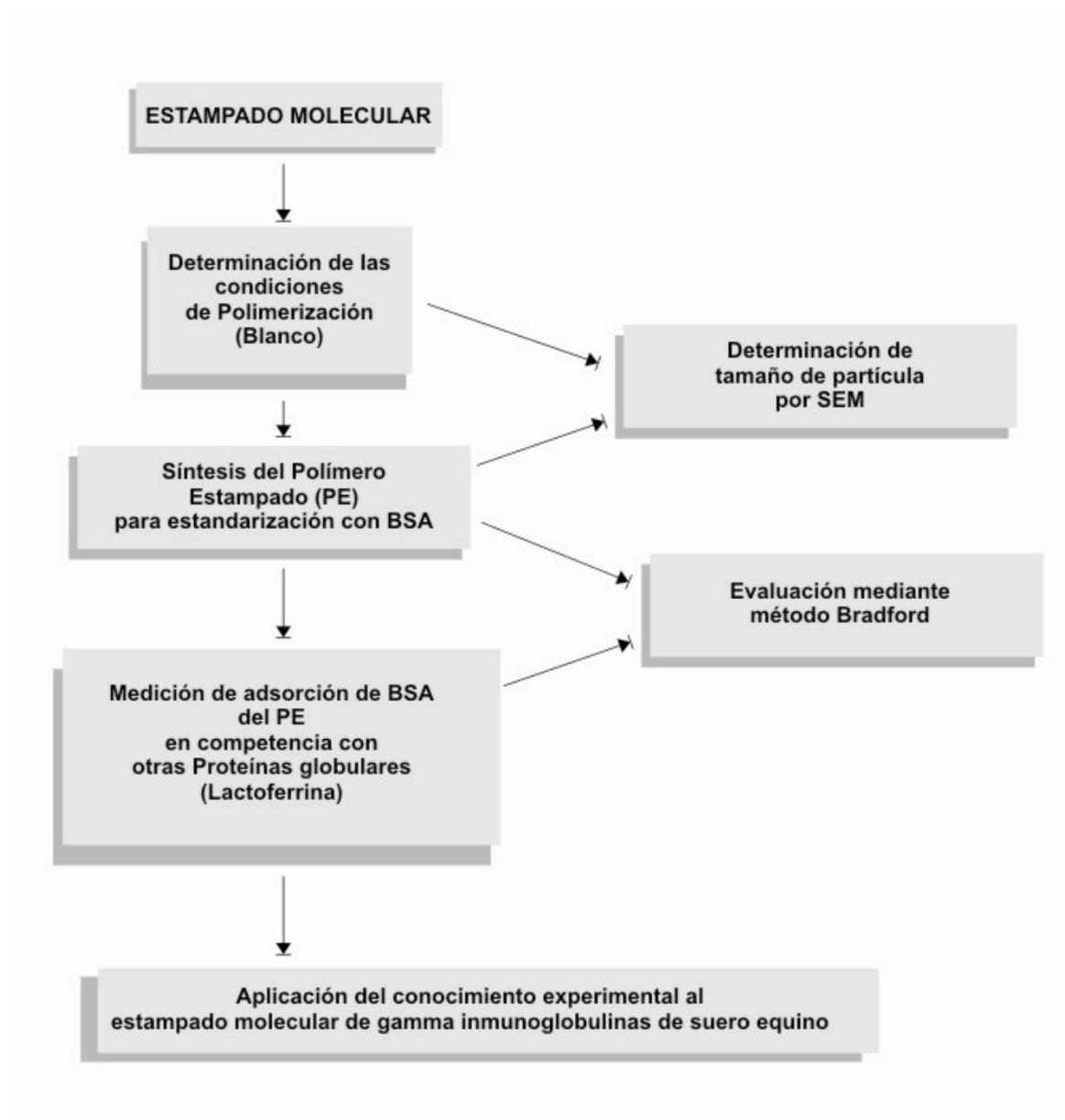


Figura 29. Representación esquemática del proyecto. Estandarización de la técnica de estampado molecular



10.4 Resultados de la Estandarización de la Técnica de Estampado Molecular con BSA

Los resultados presentados a continuación son los obtenidos para la estandarización del método de estampado molecular para proteínas, mediante polimerización en fase inversa en el sistema Tolueno-agua a 25°C.

Se obtuvieron tres polímeros diferentes en función de las concentraciones de proteína: 1: 15 000(MIP1); 1: 22 500(MIP2) y 1: 54 000 (MIP3).

10.4.1 Rendimientos de polimerización:

La polimerización se realizó por triplicado bajo las mismas condiciones de reacción. El rendimiento de polimerización es en promedio de 98% (Cuadro 13).

Cuadro 13. Rendimiento de Polimerización. Estandarización de la Técnica de Estampado Molecular con BSA

	A	B	C
Acrilamida	3.99g	4.09 g	4.10 g
N,N' -Metilen-Bis Acrilamida	0.27 g	0.27 g	0.27 g
Peso del polímero	4.17 g	4.29 g	4.30 g
Rendimiento	97.8%	98.0%	98.4%
Promedio	98.0%		

10.4.2. Adsorción de Proteína

La proporción de proteína estampada es de 93.2 % (Cuadro 14). La cantidad de proteína eluída ó el porcentaje de las cavidades selectivas disponibles es de 82.8% (Cuadro 15), es decir, la proteína que queda atrapada dentro de las microesferas sin poder removerse después del lavado del polímero es de 17.2% bajo las condiciones de estampado descrita en el Cuadro 14 y en el Cuadro 15. Para la elución de la proteína se empleó una disolución



de ácido acético 10%(v/v) y SDS 1% (w/v). En la Figura 11 se representa esquemáticamente el proceso de elución a partir del polímero estampado.

Cuadro 14. Proteína (BSA) estampada

	concentración inicial		concentración final		Proteína estampada	%
	Absorbancia	mg/mL	Absorbancia	mg/mL		
1	1.7436	3.00	0.1284	0.20	2.80	93.2
3	1.7411	3.00	0.1290	0.21	2.79	93.1
4	1.7409	3.00	0.1272	0.20	2.80	93.2
Prom.	1.7418	3.00	0.1282	0.20	2.80	93.2

Cuadro 15. Proteína (BSA) eluída

	Proteína Inicial (mg/mL)	Proteína estampada (mg/mL)	Proteína Eluída (mg/mL)	%
1	3.00	2.80	2.30	82.3
2	3.00	2.79	2.33	83.4
3	3.00	2.80	2.31	82.7
Prom.	3.00	2.80	2.31	82.8

10.4.3. Morfología

Se realizó Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para determinar la morfología de las partículas. El polímero estampado con BSA presentó una morfología esférica (Fig. 30). El tamaño medio del polímero estampado es de 200 μ m y para el polímero blanco es de 50 μ m. La Figura 31, que corresponde al polímero blanco, se observó una superficie poco rugosa. En la Figura 32, en el polímero estampado se observó una superficie más rugosa que sugiere la macroporosidad en la superficie del polímero.

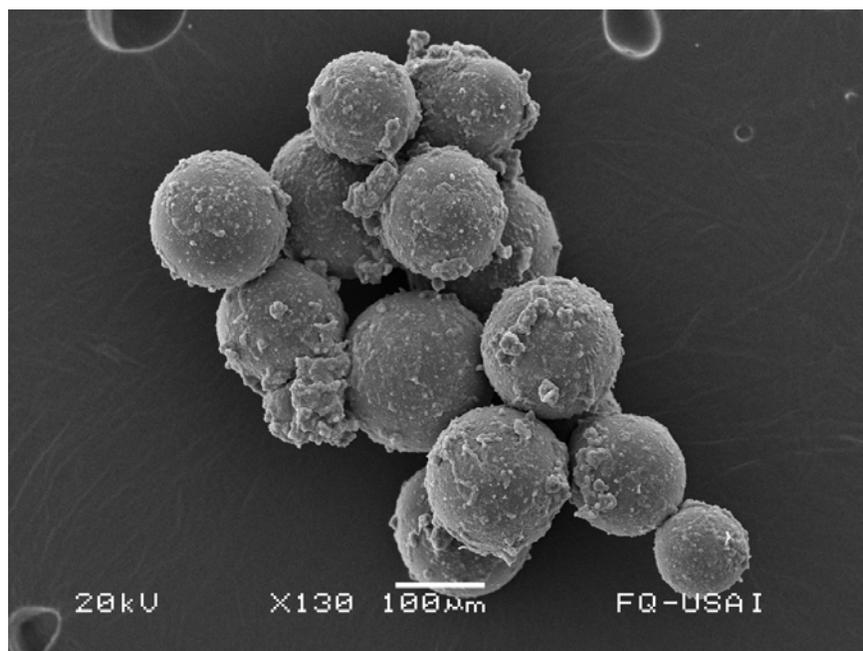


Figura 30. Fotografía SEM de Polímero Estampado con BSA

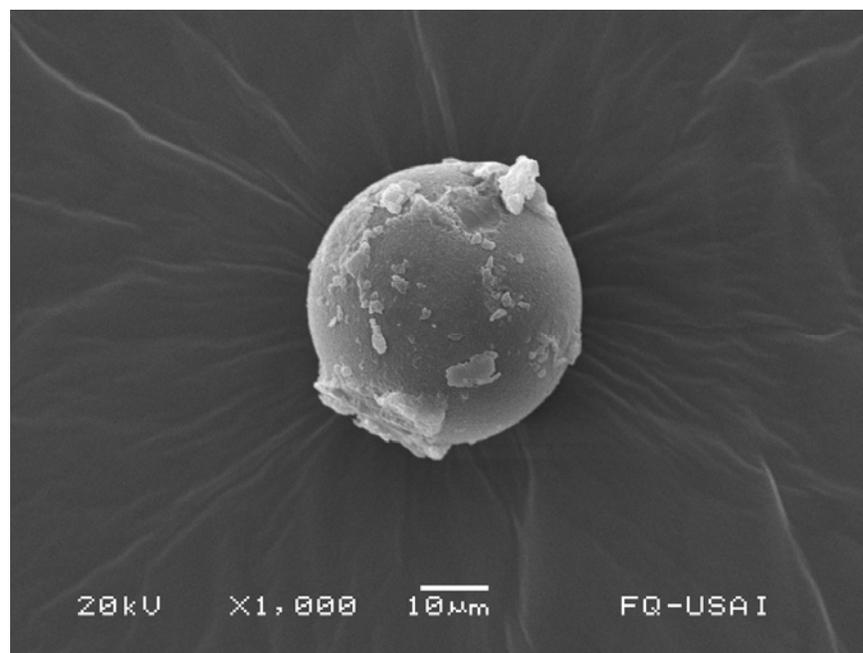


Figura 31. Fotografía SEM del Polímero blanco



Figura 32. Fotografía SEM de Polímero Estampado con BSA

10.4.4. Características de la adsorción del Polímero Estampado con BSA

Se determinó la capacidad de adsorción del polímero estampado MIP3 con un estudio de la cinética de adsorción por triplicado (QA, QB, QC). En el proceso de incubación se empleó 1g de polímero en 10mL de disolución de BSA (albúmina sérica bovina) de concentración 1mg/mL, y se sometió a agitación tangencial a 25°, pH=6.2 por 12 horas. La capacidad de adsorción (Q) del polímero estampado se determinó en 9.1mg/g, según la fórmula descrita en la Figura 14. Se observó que el 50% de la capacidad de adsorción se lleva a cabo en los primeros 10 minutos. Después de 6 horas la adsorción es asintótica (Figura 33). En los cuadros 16, 17, 18, y 19 se muestra la capacidad de adsorción, Q, del polímero estampado. La eficiencia del estampado bajo las condiciones de operación fue del 93%.



Cuadro 16. Capacidad de Adsorción del polímero estampado con BSA (QA)

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	QA (mg proteína/g polímero)
0	0.9918	1.01	0.00	0.00
10	0.8813	0.90	0.11	4.39
20	0.8488	0.88	0.14	5.52
30	0.8248	0.85	0.16	6.50
40	0.8201	0.85	0.17	6.69
50	0.8075	0.83	0.18	7.21
60	0.7919	0.82	0.20	7.85
80	0.7828	0.81	0.21	8.21
100	0.7805	0.81	0.21	8.31
130	0.7765	0.80	0.21	8.48
160	0.7706	0.80	0.22	8.71
190	0.7649	0.79	0.22	8.95
210	0.7625	0.79	0.23	9.05
240	0.7591	0.78	0.23	9.19

QA (Capacidad de Adsorción)

Cuadro 17. Capacidad de Adsorción del polímero estampado con BSA (QB)

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	QB (mg proteína/g polímero)
0	0.9900	1.03	0.00	0.00
10	0.8849	0.92	0.11	4.26
20	0.8549	0.89	0.14	5.52
30	0.8295	0.87	0.16	6.51
40	0.8285	0.86	0.17	6.60
50	0.8141	0.85	0.18	7.19
60	0.7993	0.83	0.19	7.80
80	0.7895	0.82	0.20	8.20
100	0.7872	0.82	0.21	8.29
130	0.7819	0.82	0.21	8.51
160	0.7773	0.81	0.22	8.70
190	0.7716	0.81	0.22	8.93
210	0.7692	0.80	0.23	9.03
240	0.7671	0.80	0.23	9.12

QB (Capacidad de Adsorción)



Cuadro 18. Capacidad de Adsorción del polímero estampado con BSA (QC)

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	QC (mg proteína/g polímero)
0	0.9837	1.03	0.00	0.00
10	0.8639	0.91	0.12	4.90
20	0.8420	0.88	0.14	5.79
30	0.8274	0.87	0.16	6.39
40	0.8153	0.86	0.17	6.89
50	0.8084	0.85	0.18	7.16
60	0.8024	0.84	0.19	7.41
80	0.7933	0.83	0.19	7.78
100	0.7876	0.83	0.20	8.02
130	0.7805	0.82	0.21	8.30
160	0.7741	0.81	0.21	8.56
190	0.7693	0.81	0.22	8.76
210	0.7623	0.80	0.23	9.05
240	0.7609	0.80	0.23	9.10

QC (Capacidad de Adsorción)

Cuadro 19. Capacidad de adsorción del polímero estampado con BSA

Polímero estampado	BSA (μmol)	Q (mg proteína/g polímero)
1	5	9.19
2	5	9.12
3	5	9.10
Prom	5	9.1

Q (capacidad de adsorción)

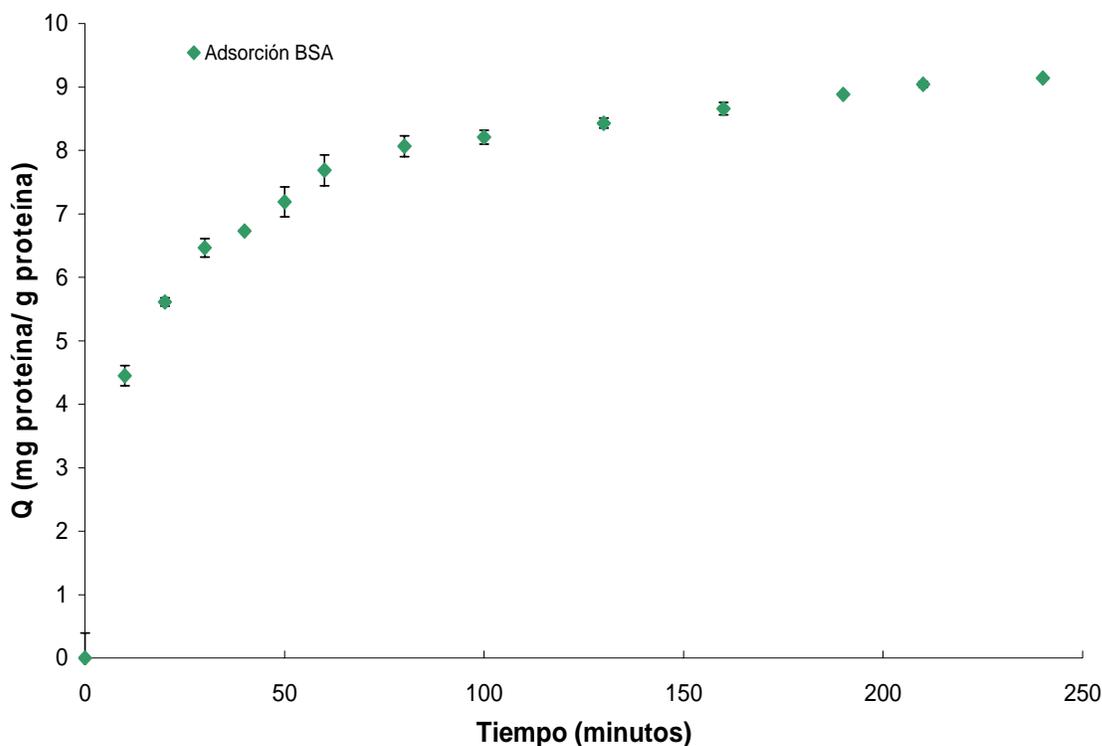


Figura 33. Cinética de adsorción de BSA

10.4.5 Especificidad del reconocimiento del polímero estampado con BSA

Al repetir el estudio de cinética de adsorción con la proteína Lactoferrina, proteína no empleada como molécula plantilla, se observó que la adsorción del material fue mínima (Cuadro 20 y Figura 34) esta adsorción también podría deberse a que la Lactoferrina empleada era impura y contenía BSA como impureza, esto se verificó realizando una electroforesis (SD-PAGE). En la Figura 35 se muestra los resultados de la electroforesis donde aparecen las bandas que corresponden a BSA y a Lactoferrina. Se podría decir que el polímero estampado con BSA no presenta reconocimiento molecular por la Lactoferrina. Para este proceso se incubó 1g de polímero en 10mL de una disolución de Lactoferrina (1mg/mL), a 25°C, pH=6.2 por 12 horas.



Cuadro 20. Especificidad de reconocimiento del polímero estampado con BSA

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína en disolución (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	QL (mg proteína/ de polímero)
0	0.9795	1.04	0.00	0.00
10	0.9771	1.04	0.00	0.10
20	0.9679	1.03	0.01	0.47
30	0.9640	1.03	0.01	0.63
40	0.9615	1.03	0.01	0.73
50	0.9593	1.03	0.01	0.82
60	0.9552	1.03	0.01	0.99
80	0.9504	1.02	0.01	1.18
100	0.9483	1.02	0.02	1.28
130	0.9439	1.02	0.02	1.45
160	0.942	1.02	0.02	1.53
190	0.9371	1.02	0.02	1.74
210	0.9341	1.02	0.02	1.85
240	0.9329	1.01	0.02	1.90

QL (Capacidad de adsorción de Lactoferrina)

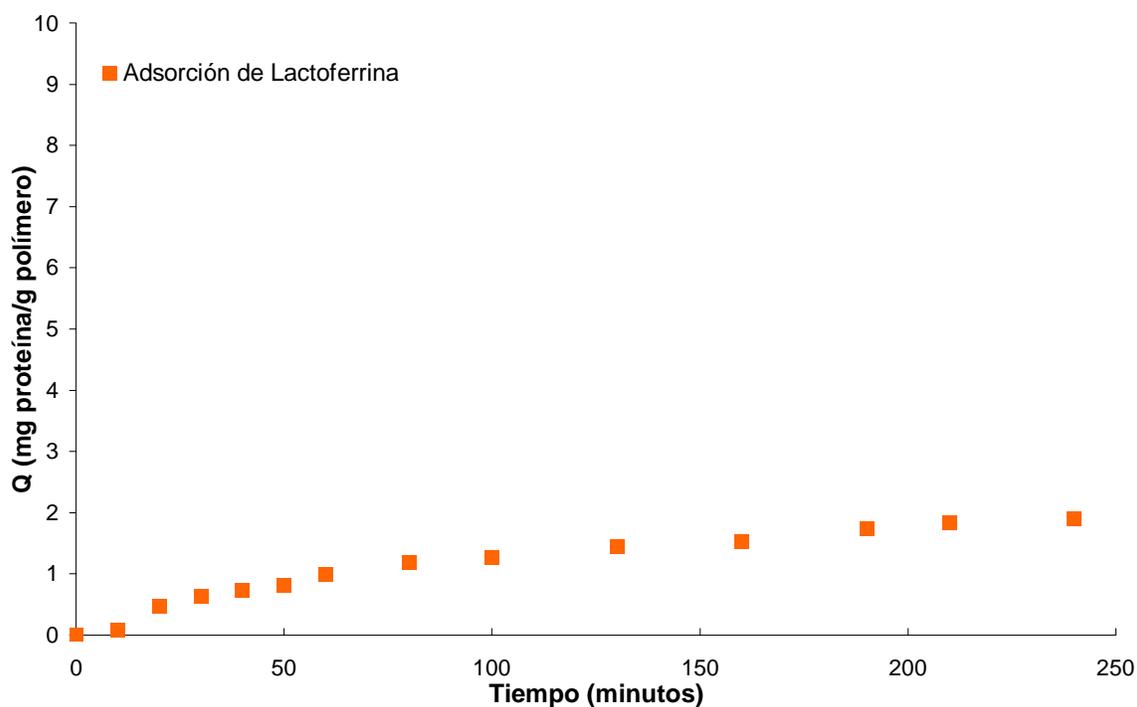


Figura 34. Especificidad de polímero estampado del polímero estampado con BSA al competir con otra proteína globular (Lactoferrina) no empleada como molécula plantilla.

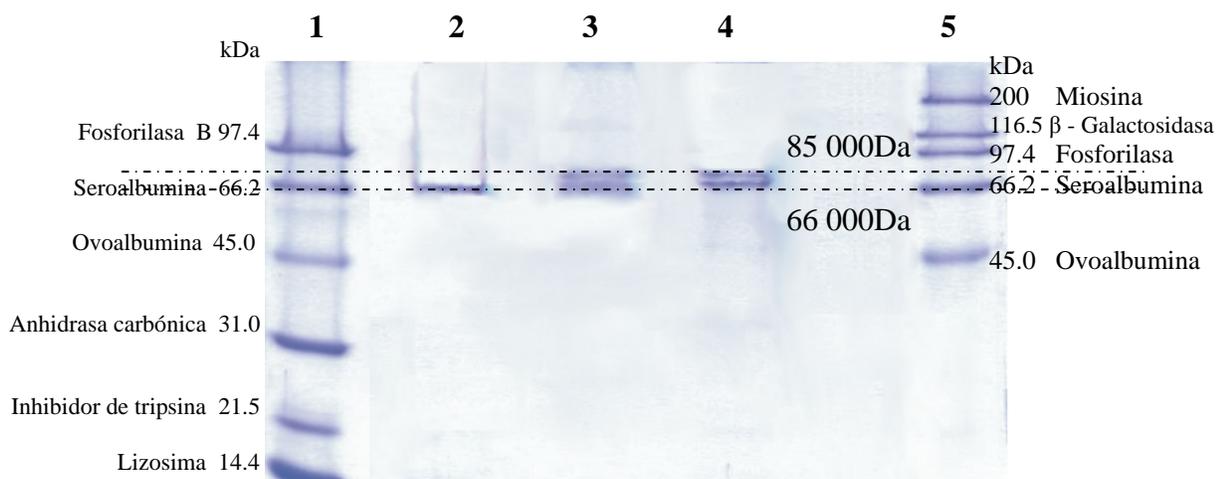
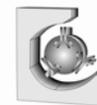
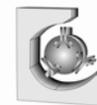


Figura. 35. Electroforesis desnaturalizante (SDS- PAGE) de BSA, En el Carril 1, estándares de peso molecular de amplio rango. Carril 2 BSA (molécula plantilla), Carril 3, Mezcla de Proteínas (BSA y Lactoferrina, proteínas empleadas en el estudio de especificidad de reconocimiento del polímero estampado con BSA). Carril 4 Lactoferrina (proteína no empleada como molécula plantilla) y Carril 5, estándares de peso molecular de alto rango.

10.4.6 Características de reutilización del polímero estampado de BSA

Los polímeros estampados fueron considerados para su uso en subsiguientes ocasiones o ciclos con el fin de evaluar su capacidad de reutilización y se estudió la cinética de adsorción (Figura 36). Las microesferas estampadas con BSA fueron lavadas con una solución de ácido acético al 10% (v/v) que contenía 1% (w/v) SDS para remover la proteína BSA, después estas microesferas fueron utilizadas para adsorber repetidas veces BSA en el mismo material. Se midió la capacidad de adsorción incubando 1g de polímero en 10mL de disolución de BSA (albúmina sérico bovina) de concentración 1mg/mL, en agitación tangencial a 25°, pH=6.2 por 12 horas. Como puede observarse de los datos representados en el Cuadro 21, Cuadro 22 y Cuadro 23 y la Figura 36 el material no presenta deterioro ni disminución de la adsorción después de estos ciclos, con lo que se comprobó su reproducibilidad.



Cuadro 21. Capacidad de reutilización del polímero estampado con BSA. Primer ciclo

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	CR1° Ciclo (mg proteína/g polímero)
0	0.9958	1.01	0.00	0.00
10	0.8925	0.90	0.11	4.20
20	0.8699	0.88	0.12	4.94
30	0.8447	0.85	0.15	6.13
40	0.8351	0.84	0.16	6.55
50	0.8211	0.83	0.18	7.12
60	0.8062	0.81	0.19	7.74
80	0.7961	0.80	0.20	8.14
100	0.7931	0.80	0.21	8.26
130	0.7883	0.80	0.21	8.45
160	0.7861	0.79	0.21	8.54
190	0.7804	0.79	0.22	8.78
210	0.7782	0.78	0.22	8.95
240	0.7743	0.78	0.23	9.04

CR (Capacidad de reutilización)

Cuadro 22. Capacidad de reutilización del polímero estampado con BSA. Segundo ciclo

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	CR 2° ciclo (mg proteína/g polímero)
0	0.9978	1.00	0.00	0.00
10	0.8839	0.88	0.12	4.66
20	0.8519	0.85	0.15	5.96
30	0.8353	0.83	0.17	6.63
40	0.8298	0.83	0.17	6.94
50	0.8185	0.82	0.18	7.32
60	0.8088	0.81	0.19	7.72
80	0.7991	0.80	0.20	8.13
100	0.7946	0.79	0.21	8.31
130	0.7895	0.79	0.21	8.52
160	0.7839	0.78	0.22	8.75
190	0.7804	0.78	0.22	8.84
210	0.7792	0.78	0.22	8.89
240	0.7797	0.78	0.22	8.92

CR (Capacidad de reutilización)



Cuadro 23. Capacidad de reutilización del polímero estampado con BSA. Tercer ciclo

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	CR 3° ciclo (mg proteína/g polímero)
0	0.9763	1.01	0.00	0.00
10	0.8778	0.91	0.10	4.03
20	0.8481	0.88	0.13	5.24
30	0.8227	0.86	0.16	6.28
40	0.8127	0.85	0.17	6.69
50	0.7906	0.82	0.19	7.59
60	0.7835	0.82	0.20	7.88
80	0.7652	0.80	0.22	8.63
100	0.7701	0.80	0.21	8.43
130	0.7617	0.80	0.22	8.78
160	0.7605	0.79	0.22	8.83
190	0.7591	0.79	0.22	8.88
210	0.7587	0.79	0.22	8.90
240	0.7545	0.79	0.23	9.07

CR (Capacidad de reutilización)

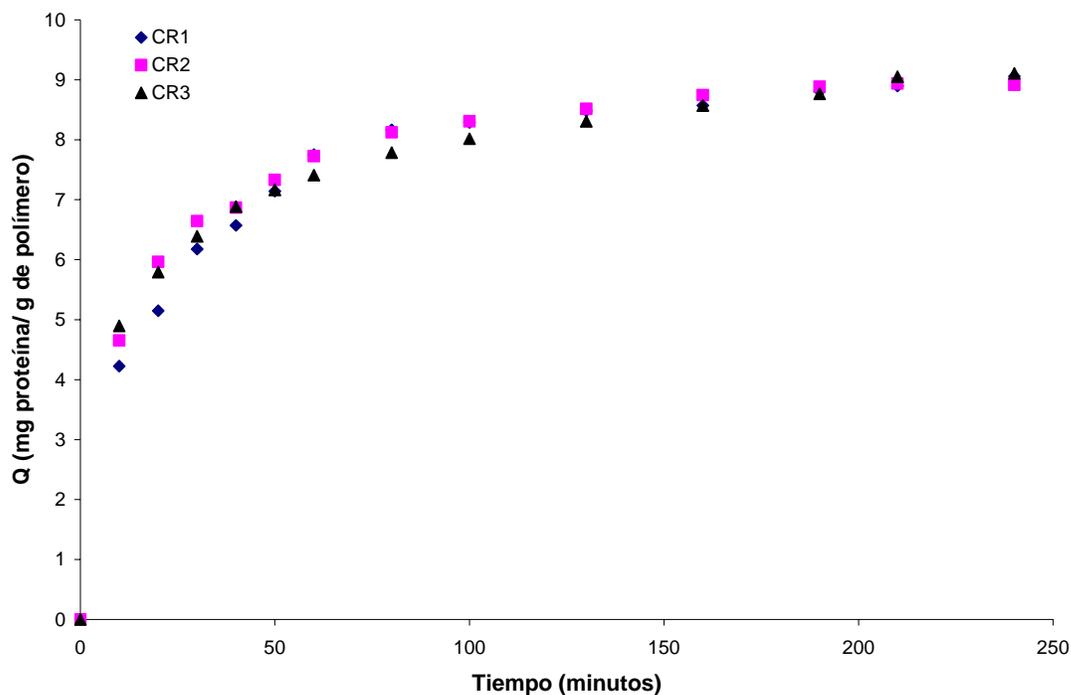


Figura 36. Reproducibilidad del polímero estampado del polímero estampado con BSA.



Apéndice 10.5 Cuadros de Resultados del Estampado Molecular con IgG

Los Cuadros de Resultados presentados a continuación son los obtenidos del Estampado Molecular empleando como molécula plantilla la proteína IgG

Cuadro 24. Capacidad de Adsorción del PE1 (Q1)

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	Q1 (mg proteína/g polímero)
0	0.7078	1.03	0.00	0.00
10	0.6905	1.00	0.03	0.86
20	0.6867	1.00	0.03	1.05
30	0.6714	0.98	0.05	1.81
40	0.6599	0.96	0.07	2.38
50	0.6504	0.95	0.09	2.85
60	0.6412	0.93	0.10	3.31
120	0.6289	0.91	0.12	3.92
180	0.6151	0.89	0.14	4.60
240	0.5860	0.85	0.18	6.04
300	0.5764	0.84	0.20	6.52
360	0.5378	0.78	0.25	8.43
420	0.5115	0.74	0.29	9.74

Q1 (Capacidad de Adsorción)

Cuadro 25. Capacidad de adsorción del PE2 (Q2)

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	Q2 (mg proteína/g polímero)
0	0.7078	1.03	0.00	0.00
10	0.7003	1.02	0.01	0.73
20	0.6967	1.01	0.02	1.08
30	0.6912	1.01	0.02	1.61
40	0.6863	1.00	0.03	2.09
50	0.6728	0.98	0.05	3.40
60	0.6612	0.96	0.07	4.53
120	0.6528	0.95	0.08	5.34
180	0.6445	0.94	0.09	6.15
240	0.6396	0.93	0.10	6.63
300	0.6318	0.92	0.11	7.38
360	0.6276	0.91	0.12	7.79
420	0.6205	0.90	0.13	8.48

Q2 (Capacidad de Adsorción)



Cuadro 26. Capacidad de adsorción del PE3 (Q3)

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	Q3(mg proteína/g polímero)
0	0.7078	1.03	0.00	0.00
10	0.7022	1.02	0.01	0.32
20	0.6882	1.00	0.03	1.10
30	0.6792	0.99	0.04	1.61
40	0.6624	0.96	0.07	2.55
50	0.6517	0.95	0.08	3.15
60	0.6334	0.92	0.11	4.18
120	0.6289	0.91	0.12	4.44
180	0.6134	0.89	0.14	5.31
240	0.6078	0.88	0.15	5.62
300	0.5986	0.87	0.16	6.14
360	0.5749	0.83	0.20	7.47
420	0.5678	0.82	0.21	7.87

Q3 (Capacidad de Adsorción)

Cuadro 27. Capacidad de adsorción. PE1, PE2 y PE3.

Polímero Estampado	Q (mg proteína/g polímero)
PE1	9.7
PE2	8.4
PE3	7.8

Q (capacidad de adsorción)



Cuadro 28. Curva estándar de Actividad Enzimática de Catalasa.

Tiempo (min)	14.75mM	29.5mM	44mM	70.8mM
	Ua (Catalasa)			
0	0.0127	0.0127	0.0127	0.0127
0.3	0.0111	0.0101	0.0092	0.0123
0.5	0.0105	0.0089	0.0083	0.0118
0.75	0.0098	0.0080	0.0073	0.0113
1	0.0091	0.0072	0.0064	0.0108
1.25	0.0085	0.0064	0.0051	0.0104
1.5	0.0079	0.0058	0.0048	0.0100
1.75	0.0074	0.0052	0.0041	0.0096
2	0.0070	0.0048	0.0037	0.0092
2.25	0.0065	0.0043	0.0030	0.0089
2.5	0.0061	0.0039	0.0026	0.0085
2.75	0.0057	0.0034	0.0023	0.0083
3	0.0054	0.0031	0.0021	0.0080
3.25	0.0050	0.0027	0.0016	0.0077
3.5	0.0047	0.0025	0.0013	0.0075
3.75	0.0045	0.0022	0.0011	0.0072
4	0.0042	0.0019	0.0009	0.0070
4.25	0.0039	0.0017	0.0008	0.0000
4.5	0.0037	0.0015	0.0006	0.0000
4.75	0.0035	0.0013	0.0005	0.0083
5	0.0033	0.0011	0.0004	0.0080
5.25	0.0031	0.0010	0.0004	0.0077
5.5	0.0030	0.0009	0.0002	0.0000
5.75	0.0028	0.0008	0.0001	
6	0.0027	0.0007	0.0001	
6.25	0.0025	0.0006	0.0001	
6.5	0.0024	0.0005		
6.75	0.0022	0.0004		
7	0.0021	0.0004		
7.25	0.0020	0.0003		
7.5	0.0019	0.0003		
7.75	0.0018	0.0002		
8	0.0018	0.0001		
8.25	0.0017	0.0001		
8.5	0.0016	0.0000		
8.75	0.0015			
9	0.0015			
10	0.0012			
11	0.0011			
12	0.0009			
13	0.0008			
14	0.0007			
15	0.0003			



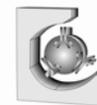
Cuadro 29. Especificidad de reconocimiento

Tiempo (min)	Absorbancia (595nm)	Proteína total (mg/mL)	IgG adsorbida (mg/mL)	Catalasa adsorbida (mg/mL)	Proteína en sobrenadante (mg/mL)	Q (mg proteína/g polímero)
0	0.7105	2.07	0.00	0.00	2.07	0.0
10	0.7053	2.05	0.03	0.00	2.04	0.3
20	0.6913	2.01	0.11	0.00	1.96	1.0
30	0.6822	1.98	0.17	0.00	1.90	1.4
40	0.6640	1.93	0.28	0.00	1.79	2.4
50	0.6538	1.90	0.34	0.00	1.73	2.9
60	0.6339	1.84	0.45	0.00	1.62	3.9
120	0.6174	1.79	0.55	0.00	1.52	4.7
180	0.6106	1.77	0.59	0.00	1.48	5.1
240	0.6057	1.76	0.62	0.00	1.45	5.3
300	0.5928	1.72	0.70	0.00	1.37	6.0
360	0.5672	1.64	0.85	0.00	1.22	7.3
420	0.5598	1.62	0.89	0.00	1.18	7.7
480	0.4276	1.23		0.00	1.18	
540	0.4276	1.23		0.00	1.18	
600	0.4276	1.23		0.00	1.18	

Cuadro 30. Verificación de la Actividad Catalítica de Catalasa en ciclos de re uso

Tiempo (min)	Ua catalasa						
	Estándar	Ciclo 1	Desviación Estandart	Ciclo 2	Desviación Estandart	Ciclo 3	Desviación Estandart
0.00	0.0127	0.0127	0.00E+00	0.0127	0.00E+00	0.0127	0.00E+00
0.30	0.0123	0.0121	1.69E-04	0.0122	1.01E-05	0.0122	1.98E-05
0.50	0.0118	0.0116	1.45E-04	0.0117	3.26E-05	0.0117	8.11E-05
0.75	0.0113	0.0110	8.81E-05	0.0112	6.24E-05	0.0113	6.89E-05
1.00	0.0108	0.0104	1.35E-04	0.0108	8.45E-05	0.0109	3.47E-05
1.25	0.0104	0.0100	1.03E-04	0.0103	1.43E-04	0.0105	2.42E-06
1.50	0.0100	0.0095	1.16E-04	0.0099	1.77E-04	0.0101	1.84E-04
1.75	0.0096	0.0091	9.40E-05	0.0095	1.97E-04	0.0097	1.41E-04
2.00	0.0092	0.0088	6.67E-05	0.0090	2.36E-04	0.0093	1.13E-04
2.25	0.0089	0.0085	4.50E-05	0.0087	2.46E-04	0.0089	1.30E-04
2.50	0.0085	0.0082	3.25E-05	0.0083	2.49E-04	0.0085	1.68E-04
2.75	0.0083	0.0078	2.79E-06	0.0079	2.64E-04	0.0084	2.33E-05
3.00	0.0080	0.0076	1.66E-05	0.0076	2.72E-04	0.0079	5.38E-05
3.25	0.0077	0.0073	2.99E-05	0.0073	2.90E-04	0.0076	4.73E-05
3.50	0.0075	0.0071	1.74E-05	0.0070	2.79E-04	0.0073	2.81E-05
3.75	0.0072	0.0068	1.72E-04	0.0067	2.66E-04	0.0070	2.36E-05

Ua Unidades de actividad



Cuadro 31. Especificidad de reconocimiento

Tiempo (minutos)	QC(mg proteína/g polímero)	Repetición 1 QC(mg proteína/g polímero)	Repetición 2 QC(mg proteína/G polímero)	Repetición 3 QC(mg proteína/g polímero)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.31	0.26	0.27	0.25
20	1.10	0.97	0.98	0.94
30	1.61	1.44	1.43	1.42
40	2.55	2.36	2.36	2.37
50	3.15	2.88	2.88	2.91
60	4.18	3.89	3.94	3.88
120	4.43	4.73	4.78	4.71
180	5.30	5.08	5.13	5.02
240	5.62	5.33	5.37	5.24
300	6.14	5.98	6.03	5.85
360	7.47	7.28	7.33	7.16
420	7.87	7.66	7.53	7.51

QC (Capacidad de Adsorción)

Cuadro 32. Capacidad de reutilización. Primer ciclo

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	CR1° Ciclo (mg proteína/g polímero)
0	0.4078	0.59	0.00	0.00
10	0.4022	0.58	0.01	0.31
20	0.3882	0.56	0.03	1.10
30	0.3792	0.54	0.04	1.61
40	0.3624	0.52	0.07	2.55
50	0.3517	0.50	0.08	3.15
60	0.3334	0.47	0.11	4.18
120	0.3289	0.47	0.12	4.43
180	0.3134	0.45	0.14	5.30
240	0.3078	0.44	0.15	5.62
300	0.2986	0.42	0.16	6.14
360	0.2749	0.39	0.20	7.47
420	0.2678	0.38	0.21	7.87

CR (Capacidad de reutilización)



Cuadro 33. Capacidad de reutilización. Segundo ciclo

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	CR 2° ciclo (mg proteína/g polímero)
0	0.4078	0.59	0.00	0.00
10	0.4024	0.58	0.01	0.30
20	0.3886	0.56	0.03	1.08
30	0.3801	0.54	0.04	1.56
40	0.3642	0.52	0.06	2.45
50	0.3527	0.50	0.08	3.09
60	0.3380	0.48	0.10	3.92
120	0.3303	0.47	0.12	4.35
180	0.3152	0.45	0.14	5.20
240	0.3067	0.44	0.15	5.68
300	0.2921	0.41	0.17	6.50
360	0.2775	0.39	0.19	7.33
420	0.2703	0.38	0.20	7.73

CR (Capacidad de reutilización)

Cuadro 34. Capacidad de reutilización. Tercer ciclo

Tiempo (minutos)	Absorbancia (595nm)	Proteína (mg/mL)	Proteína Adsorbida (mg/mL)	CR 3° ciclo (mg proteína/g polímero)
0	0.4078	0.59	0.00	0.00
10	0.4024	0.58	0.01	0.30
20	0.3886	0.56	0.03	1.08
30	0.3795	0.54	0.04	1.59
40	0.3634	0.52	0.07	2.49
50	0.3535	0.50	0.08	3.05
60	0.3351	0.48	0.11	4.08
120	0.3210	0.46	0.13	4.88
180	0.3164	0.45	0.14	5.13
240	0.3110	0.44	0.14	5.44
300	0.3021	0.43	0.16	5.94
360	0.2764	0.39	0.20	7.39
420	0.2723	0.38	0.20	7.61

CR (Capacidad de reutilización)



Cuadro 35. Capacidad de Reutilización

Polímero Estampado	CR (mg proteína/g polímero)
Ciclo 1	7.86
Ciclo 2	7.72
Ciclo 3	7.61
Promedio	7.73

CR (capacidad de recuperación)