

“POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS PARA EL RECONOCIMIENTO SELECTIVO DE MOLÉCULAS DE INTERÉS BIOLÓGICO”

Citta, María de los Milagros

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (CONICET-UNL)

Director/a: Busatto, Carlos
Codirector/a: Estenoz, Diana

Área: Ingeniería

Palabras claves: Impresión molecular, Micropartículas, Proteínas

INTRODUCCIÓN

La tecnología de impresión molecular permite sintetizar polímeros con sitios de unión específicos hacia una molécula utilizada como plantilla, mediante la formación de una matriz polimérica entrecruzada alrededor de dicha molécula (Rico-Yuste y Carrasco, 2019). Estos materiales se han propuesto para amplia variedad de aplicaciones, incluyendo la extracción en fase sólida, como fases estacionarias en HPLC y el desarrollo de sensores químicos, entre otras (Nematollahzadeh y col., 2013).

Las proteínas presentan gran complejidad estructural y su mayor tamaño dificulta la penetración en el polímero molecularmente impreso (MIP) para acceder a los sitios de unión (Idil y Mattiasson, 2017). La técnica de impresión molecular de superficie permite resolver esta limitación mediante la polimerización de monómeros funcionales en la superficie de diferentes sustratos. Así, las proteínas pueden acceder fácilmente a los sitios de reconocimiento del MIP. La dopamina es un monómero funcional soluble en agua con excelente compatibilidad biológica. La autopolimerización de la dopamina por oxidación en medio básico sobre distintos sustratos permite preservar la integridad conformacional de las proteínas durante la síntesis de los materiales.

OBJETIVOS

Sintetizar micropartículas de CaCO_3 y emplearlas como soportes de MIPs basados en polidopamina para el reconocimiento selectivo de albúmina de suero bovino (BSA). Caracterizar los MIPs a fin de determinar sus propiedades morfológicas, estructurales y de reconocimiento de la proteína empleada como modelo.

Título del proyecto: “Monómeros y Polímeros Funcionales Basados en Recursos Naturales Vegetales para Aplicaciones en Materiales, Energía y Agroquímicos de Bajo Impacto Ambiental”

Instrumento: CAID (Código: 50620190100093LI)

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: UNL

Directora: Dra. Diana Estenoz

METODOLOGÍA

Síntesis de las micropartículas de carbonato de calcio

Las micropartículas de CaCO_3 se sintetizaron mediante el método de precipitación química a partir de soluciones acuosas saturadas de carbonato de sodio y nitrato de calcio. Para tal fin, se añadió gota a gota 40 mL de solución de nitrato de calcio a 40 mL de solución de carbonato de sodio, bajo agitación continua a 9000 rpm y en baño de hielo. La dispersión resultante se agitó durante 1 h. Las partículas se separaron por centrifugación, se lavaron con agua destilada y se secaron a 90 °C.

Síntesis de los MIPs basados en polidopamina

Se prepararon soluciones acuosas de BSA conteniendo dopamina para su posterior polimerización sobre la superficie de las micropartículas de CaCO_3 . La polimerización de la dopamina se inició mediante la adición de buffer Tris (0,01 M, pH = 8,5) a 25 °C, y la mezcla se dejó reaccionar durante diferentes tiempos. Las estructuras obtenidas se lavaron con etanol y agua destilada. Posteriormente, la molécula plantilla de BSA se eliminó mediante lavados sucesivos con solución de NaCl 0,5 M. A modo de control, se prepararon estructuras poliméricas no impresas (NIPs), es decir, sintetizadas en ausencia del analito de interés.

Caracterización de los sistemas particulados

Las micropartículas se analizaron por microscopía óptica en medio acuoso para estudiar la morfología y el tamaño de partícula.

El análisis termogravimétrico de las micropartículas se realizó utilizando un analizador termogravimétrico (instrumento Q500 TA) bajo una atmósfera de nitrógeno a un caudal de 80 mL/min. Se calentaron muestras de aproximadamente 5 mg de 10 a 800 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

Para conocer la capacidad de reconocimiento de los MIPS se realizaron experimentos de adsorción incubando los MIPs y NIPs en soluciones acuosas de BSA hasta alcanzar el equilibrio. Luego las micropartículas se centrifugaron y se determinó la concentración remanente de BSA en el sobrenadante de las muestras mediante espectroscopia UV, siguiendo el método de Bradford. Para la cuantificación se prepararon soluciones patrones de BSA de concentración variable. La eficiencia de impresión del polímero (EI) se calculó como el cociente entre las capacidades de reconocimiento de los MIPs y NIPs.

RESULTADOS

La Figura 1 muestra una micrografía óptica de las partículas sintetizadas. Las mismas exhibieron una morfología esférica, y los resultados del tamaño de partícula indicaron una distribución de tamaño con un diámetro medio de partícula de $1,64 \pm 0,61 \mu\text{m}$.

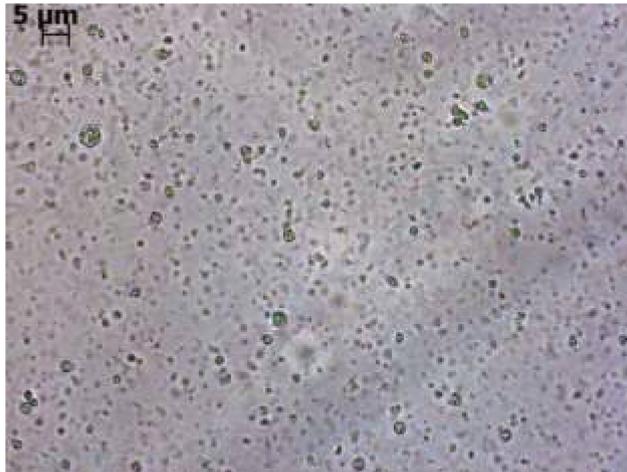


Figura 1. Imagen de microscopía óptica de las micropartículas de CaCO_3

Los resultados de TGA de las partículas de CaCO_3 se presentan en la Figura 2. Los termogramas revelaron un primer proceso de descomposición que comienza a 110°C relacionado con la pérdida de agua adsorbida. Las partículas de CaCO_3 presentan una alta estabilidad térmica en el rango de temperatura de 25 a 600°C . La pérdida de peso observada entre 600 y 720°C corresponde a la descomposición térmica del CaCO_3 en óxido de calcio y dióxido de carbono. El análisis de las muestras recubiertas con MIPs a 500°C a diferentes tiempos de reacción indicó que el recubrimiento polimérico exhibe mayor pérdida de masa a medida que aumenta el tiempo de reacción. A partir de estos resultados es posible concluir que el espesor del recubrimiento polimérico es mayor a mayores tiempos de reacción, obteniéndose resultados similares para las muestras de 5 y 24 h de reacción.

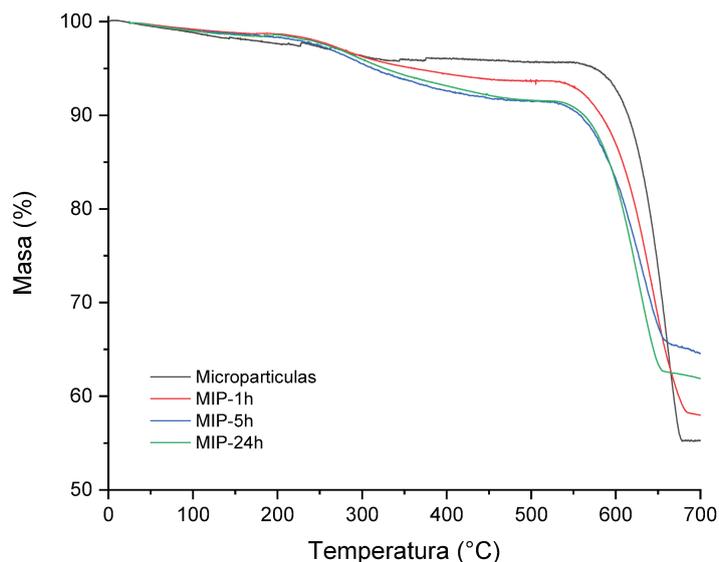


Figura 2. Termogramas de TGA de las micropartículas de CaCO_3 recubiertas con MIPs

Se realizaron experimentos de capacidad de adsorción para determinar las propiedades de unión de los MIPs y NIPs hacia la BSA. La Tabla 1 presenta las capacidades de adsorción de las muestras a

diferentes tiempos de reacción. Los resultados mostraron que las capacidades de unión de los MIPs son notablemente mayores en comparación con los NIPs, indicando una mayor interacción con la proteína debido a los sitios de unión específicos generados durante la síntesis del material. Este comportamiento no fue observado en el caso de las muestras obtenidas luego de 1 h de reacción, debido posiblemente a que no se completó la polimerización de la dopamina para generar los sitios específicos de unión a la BSA. La eficiencia de impresión (EI) fue mayor para el caso de las muestras sintetizadas durante 24 h de reacción.

Muestra	Q (mg BSA/g muestra)	EI
MIP-1h	4,4 ± 3,7	-
NIP-1h	7,9 ± 6,2	
MIP-5h	53,7 ± 0,8	2,1
NIP-5h	25,7 ± 3,8	
MIP-24h	50,2 ± 5,9	8,1
NIP-24h	6,2 ± 4,8	

Tabla 1. Resultados de los ensayos de capacidad de adsorción de los MIPs Y NIPs.

CONCLUSIÓN

Se sintetizaron micropartículas de CaCO₃ impresas con BSA mediante la autopolimerización de dopamina en solución alcalina. La polidopamina como monómero funcional soluble en agua no afecta la estructura de la proteína, por lo cual la estructura de la cavidad impresa en la superficie de los MIPs permite la unión de las moléculas de la proteína molde. Los polímeros de impresión de BSA con dopamina exhibieron una excelente capacidad de adsorción hacia la BSA. Se propone realizar ensayos de selectividad en las estructuras obtenidas empleando proteínas con propiedades fisicoquímicas similares a la BSA y evaluar diferentes soportes poliméricos.

BIBLIOGRAFÍA

- Idil, N. & B. Mattiasson** (2017). Imprinting of Microorganisms for Biosensor Applications. *Sensors*, **17**(4), 708.
- Rico-Yuste, A. & S. Carrasco**, (2019). Molecularly Imprinted Polymer-Based Hybrid Materials for the Development of Optical Sensors. *Polymers*, **11**(7), 1173.
- Nematollahzadeh, A., Shojaei, A., Abdekhodaie, M., Sellergren, B.** (2013). Molecularly imprinted polydopamine nano-layer on the pore surface of porous particles for protein capture in HPLC column. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2013. 404, 117-126.