

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
INDUSTRIAL DE BARCELONA

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CATALUÑA

**“Synthesis, characterization and biomedical
applications of microbial polymalic
and polyglutamic acids derivatives.”**

Presentado por: José Antonio Portilla Arias

Trabajo realizado bajo la dirección de los Drs.
Sebastián Muñoz Guerra y Montserrat García Álvarez

Barcelona, Febrero 2008

Apéndice A

Producción y purificación del ácido poli(β ,L-málico)

Esta etapa de la Tesis se realizó en una estancia de investigación en el Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie de la Universidad de Regensburg, Alemania, en el grupo de investigación del Dr. Eggehard Holler.

Para producir el PMLA se llevó a cabo la siguiente metodología:

A.1. Fermentación semilla

Se realiza una fermentación semilla en matraces Erlenmeyer de 2 litros con deflectores y posteriormente en matraces de 5 litros, durante 48 horas a 150 rpm y 24 °C, con el medio de cultivo descrito en la Tabla 1. El medio se ajusta a pH 4,5 con NaOH 5N y se esteriliza. Al inocular se agrega al medio 0,0025 g·L⁻¹ de Hemin(ferriprotoporfirina IX cloruro) disuelta en NaOH 0,25 M. Se inoculan 3 mL de células de *Physarum polycephalum* por cada 100 mL de medio de cultivo semilla.

A.2. Fermentación en reactor de 20 L

Las células de los matraces semilla de 5 L se cosechan y lavan dos veces con medio salino estéril a 24 °C y ajustado a pH 4,5 con NaOH 5N

Por otra parte se esteriliza por separado en autoclave:

- 90 mL de una disolución de Hemin 0,5 g por L en NaOH 0,25M (para tener en el fermentador una concentración final de 0,0025 g por L)
- 900 mL de una disolución al 40 % p vol de CaCO₃
- Disolución al 30 % de antiespumante tipo A

Todas las soluciones y medios de cultivo se preparan con agua destilada con una conductividad inferior a 2 mS-cm. La composición del medio de cultivo para el fermentador se detalla en la Tabla 1.

El medio se ajusta a pH 4,5 con NaOH 5N y se esteriliza todo a 121° C por 30 min. En el fermentador una vez atemperado a 24°C se agregan las disoluciones de Hemin y de CaCO₃.

Las condiciones de fermentación son:

Temperatura	24 °C
Agitación	150 rpm
Flujo de aire	10 vvm
Antiespumante	3mL cada 40 min.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo

	Fermentación semilla	Medio salino	Fermentación 20 L
	g·L ⁻¹	g·L ⁻¹	g·L ⁻¹
Bacto triptona	10	-	10
Extracto de levadura	1,5	-	2,5
Acido cítrico monohidratado	3,5	3,5	3,5
Cloruro de calcio dihidratado	0,6	0,6	1,0
Fosfato de potasio dihidrogeno	2	2	2
Sulfato de hierro II heptahidratado	0,085	0,085	0,085
Sulfato de magnesio heptahidrato	0,6	0,6	0,6
Cloruro de magnesio tetrahidratado	0,084	0,084	0,084
Sulfato de Zinc heptahidratado	0,034	0,034	0,034
D-Glucosa monohidratado	11	-	33

El pH inicial de la fermentación es de 5.4 aproximadamente y va decreciendo conforme avanza el proceso de producción del PMLA

La figura 1 ejemplifica el proceso de fermentación.

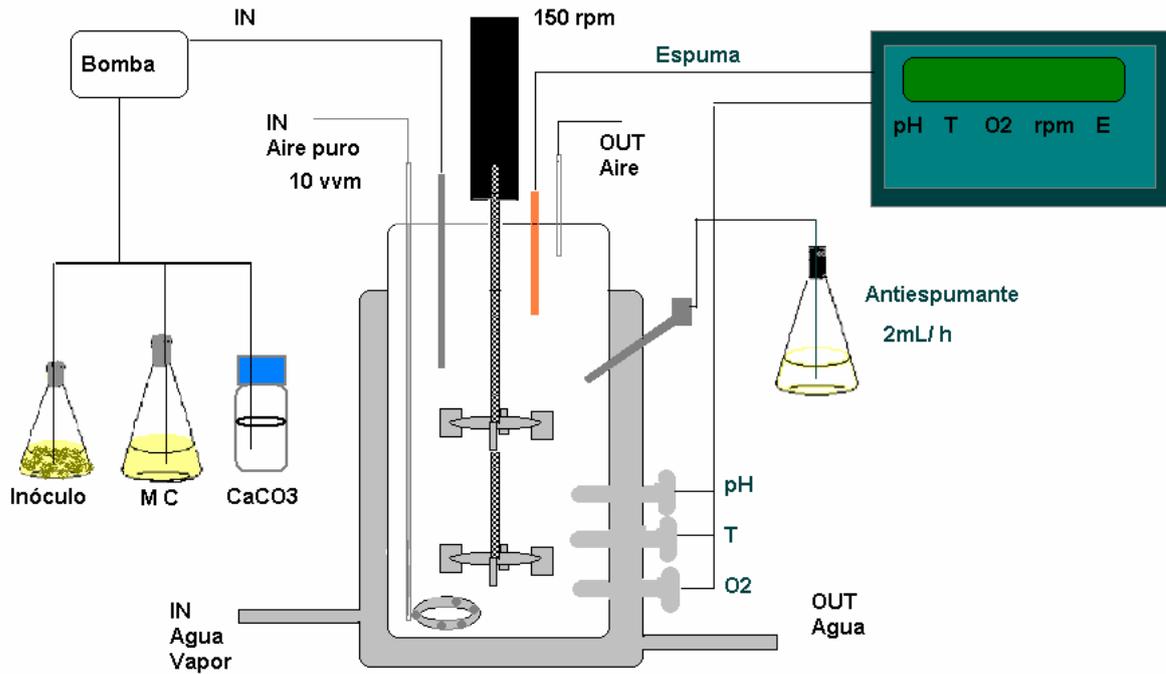


Figura 1. Esquema del biorreactor empleado para la biosíntesis del PMLA.

A.3. Proceso de purificación del PMLA

La figura 2 resume el proceso de cosecha y purificación del PMLA.

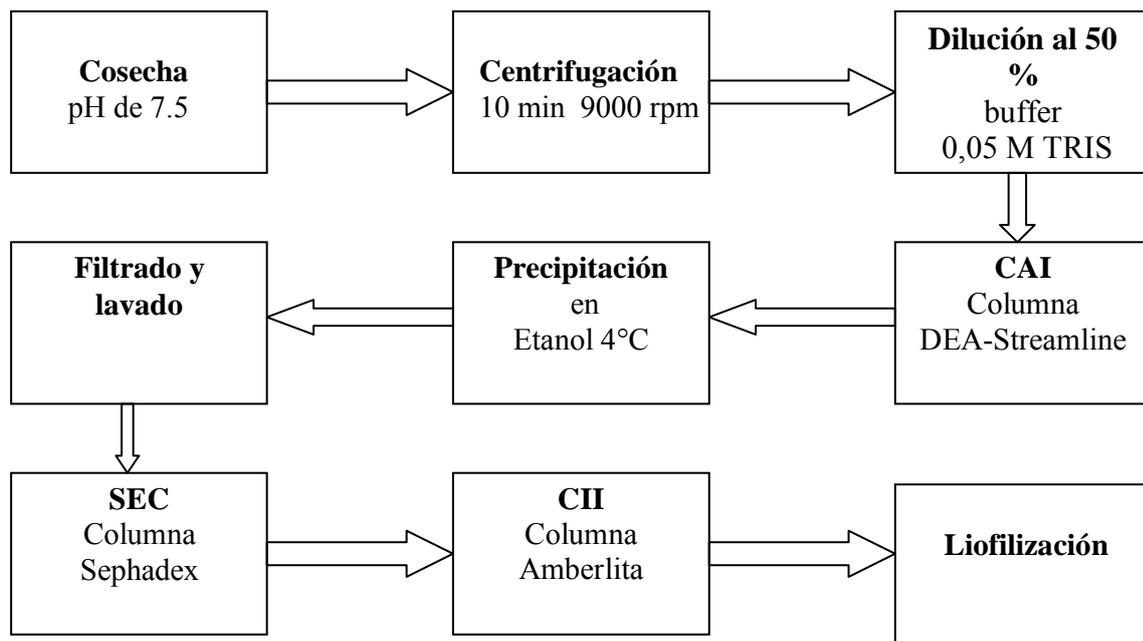


Figura 2. Proceso de purificación del ácido poli(β ,L-málico).

A.3.1. Centrifugación

El contenido del fermentador se centrifuga durante 10 minutos a 9000 rpm, y se deshecha la biomasa, el sobrenadante se filtra por una gasa y se diluye al 50 % con un tampón 0,05 M TRIS HCl pH 7,5 a 4° C.

A.3.2. Columna DEA-Streamline

Antes de utilizar la columna con el medio de cultivo, se hace pasar un Buffer 0,1 M TRIS HCl pH 7,5 a 4° C hasta que la conductividad del tampón a la salida de la columna sea de 6,5 -7 mS-cm con ayuda de una bomba peristáltica a una velocidad de 20 -25 rpm.

Se hace pasar el sobrenadante del medio de cultivo diluido por la columna desde la parte inferior para permitir el fenómeno de expansión del relleno de la columna, cuando se ha incorporado todo el medio, se inicia el proceso de lavado con tampón 0,2 NaCl Tris HCL pH 7,5 con una conductividad de 19-21 mS-cm, hasta que la disolución a la salida de la columna sea incolora.

Se cambia la dirección de la bomba peristáltica y ahora se agrega a la columna desde la parte superior el tampón de elución (0,7 M NaCl TRIS pH 7,5). Conductividad de 60 mS-cm aproximadamente, se realiza constantemente una prueba de ésteres al eluato (Apartado 3.7) y cuando es positiva se colecta en un frasco de vidrio hasta que deje de eluir.

La columna se lava según el siguiente procedimiento:

- 1.- Lavado con 6 litros de una disolución 0,5 M NaOH 1M NaCl
- 2.- Lavado con agua destilada hasta un eluato de pH neutro
- 3.- Lavado con 6 litros de isopropanol al 30%
- 4.- Lavado con 6 L de ácido acético al 25%
- 5.- Lavado con tampón 0,1 M tris HCl pH 7,5 hasta una conductividad de 5-6

A.3.3. Precipitación y Filtración

Al eluato que contiene el PMLA Ca^{+2} se le agregan 100 mL de CaCl_2 se agita 30 min y se precipita sobre 3 volúmenes de etanol a 4°C, se agita durante 4 horas y se guarda 12 horas a -20°C.

El precipitado se filtra al vacío con papel filtro, y se lava con etanol al 80% para eliminar el exceso de CaCl_2 , la torta se disuelve en agua bidestilada a 4°C y se congela en fracciones de 100 mL.

A.3.4. Columna de Sephadex

Antes de utilizar la columna de Sephadex se opera con agua bidestilada a 4°C hasta que la conductividad del agua de salida sea 0,5-0,9 mS-cm y pH 8. Se introducen 100mL de la disolución de PMLA Ca^{+2} y se eluyen con agua bidestilada durante varias horas para separar los compuestos que tienen color. El eluato se colecta en un colector de fracciones.

Las fracciones se dividen en 3 o 4 dependiendo de su color y su peso molecular, se congelan con nitrógeno líquido en las paredes de matraces balón de 1 L. Se liofilizan para reducir el volumen, ya que en los mismos matraces se irán concentrando todas las fracciones de una misma fermentación.

A.3.5. Columna de Amberlita

La columna se opera con 1 litro de HCl 2N y luego se lava con agua bidestilada hasta que el eluato tenga un pH neutro y una conductividad similar a la del agua bidestilada. Se disuelve la sal del PMLA en 100 mL de agua bidestilada y se hace pasar por la columna, eluyendo con agua destilada. Se monitorea el eluato con papel pH y cuando el papel indica un pH ácido se colecta en un matraz balón sumergido en nitrógeno líquido. Se recupera todo el ácido y se liofiliza hasta una total eliminación de agua.

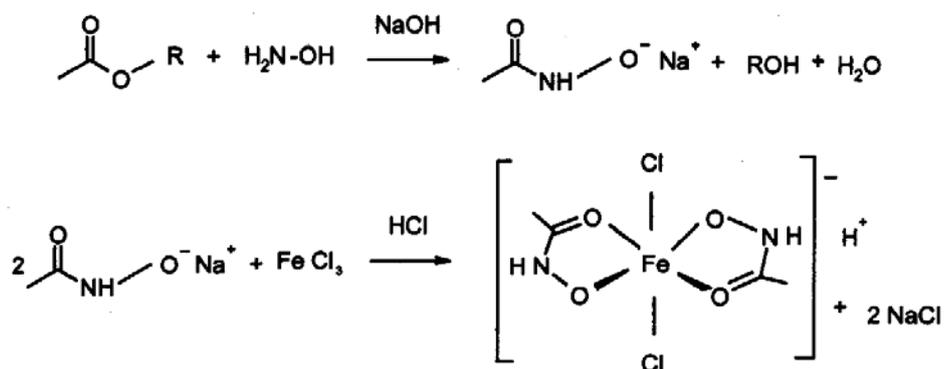
A.3.6. Envasado

El polímero se guarda en tubos de plástico cerrados con film plástico y se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro de bolsas de plástico con gel de sílice para evitar la humedad.

A.4. Ensayo cuantitativo del ácido poli(β ,L-málico)

A.4.1. Test de cuantificación de ésteres

La reacción con hidroxilamina y Fe (III) produce un color intenso que se puede cuantificar por espectrofotometría ultravioleta. Los enlaces éster se rompen por hidroxilaminólisis para formar ácido málico β -hidroxamato. En presencia de HCl, este producto desarrolla un color púrpura intenso al complejarse con el Fe (III).



Procedimiento:

Colocar en un tubo eppendorf los siguientes reactivos, en orden y agitando cada vez que se adiciona un reactivo:

30 μL de muestra

30 μL de una disolución de cloruro de hidroxilamonio al 10 % (p/v) (1,4M)

30 μL de NaOH al 10 % p/v (2,5M)

Esperar 10 minutos y adicionar 30 μL de una disolución de FeCl_3 al 5% p/v (0,3M) en 12% (v/v) (4M) HCl y medir la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

1 mg/mL de ácido poli málico = $2,5^{\circ}_{540}$

A manera indicativa y solo para controlar el proceso se puede ver a simple vista si en la mezcla hay polímero observando el color de la mezcla de reacción, si el color de la mezcla de reacción no cambia, el test es negativo. Si el color de la mezcla de reacción se torna púrpura o tonos intermedios, el test es positivo.

Agradecimientos

En primer lugar, expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Sebastián Muñoz Guerra por recibirme en su grupo de investigación, por su enorme dedicación y esfuerzo en la dirección de ésta tesis, así como por la confianza que me tuvo para iniciar una nueva línea de investigación acorde con mis intereses profesionales. También quiero agradecerle de forma muy especial su apoyo y amistad, que han hecho mucho más llevaderos estos años lejos de casa.

A mi codirectora de Tesis la Dra. Montserrat García Álvarez, por su constante apoyo en el trabajo día a día, así como el tener siempre una palabra amable y aliciente en los momentos que más se necesitan.

Al doctor Juan Antonio Galbis del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Sevilla y todo el personal de su laboratorio, por recibirme y enseñarme su encantadora ciudad, así como por su enorme apoyo para la metilación del PMLA y valiosas discusiones entorno a los biopolímeros, así como su amistad y compañía en varios congresos, donde hemos pasado muy buenos ratos.

Al profesor Eggehard Holler y todo su grupo de investigación de la Universidad de Regensburg, en especial a Sonja Fuchs por sus facilidades para la biosíntesis del PMLA, y por haberme hecho pasar tres meses inolvidables conociendo Bavaria, sus costumbres y su gente.

Al Dr. Antxon Martínez de Ilarduya, por su apoyo en la experimentación con RMN y en la discusión de casi todos los resultados de ésta tesis, así como su predisposición constante resolver cualquier duda y compartir sus conocimientos.

Al Dr. Adelillah Alla por la realización de calorimetrías y termogravimetrías, así como por su apoyo en la interpretación de los resultados.

A Montserrat Marsal por su apoyo y paciencia para tomar fotografías de SEM, al Dr. Xavier Ramis por su disposición para ayudarme con los ensayos de IR, a Oriol Ossó de MATGAS, por su ayuda en la determinación de tamaño de partícula.

A todos mis compañeros de departamento por su amistad y haber hecho muy agradable mi estancia en el laboratorio, los doctores: Jordi Bou, Marta Bermúdez, Ma. Antonia Majó y Concha Herranz, y los doctorandos: Robert Quintana, Romina Marín, Natalia Sanchez y Carlos Fernández.

A Nathalie González Vidal por su entrañable amistad y enorme apoyo tanto a nivel profesional como personal durante estos años. Gracias Naty!

A Irene Pérez Campdepadrós por su valiosa orientación en los trámites administrativos, desde el primero hasta el último día.

Al CONACYT por la beca predoctoral que ha hecho posible la realización de ésta tesis.

CURRICULUM VITAE

José Antonio Portilla Arias nació el 3 de Marzo de 1980 en México, D.F. Se graduó de bachilleres en 1998. A continuación estudió la Licenciatura en Ingeniería Bioquímica en el Instituto Tecnológico de Veracruz, donde obtuvo el grado en 2002. De Agosto de 2002 a Agosto de 2003 trabajó como ingeniero de desarrollo farmacéutico en la empresa STREGER S.A. de Jalapa, Veracruz.

En septiembre de 2003 obtuvo una beca predoctoral del CONACYT e inició sus estudios en la Universidad Politécnica de Cataluña, en el doctorado Polímeros y Biopolímeros bajo la dirección del Dr. Sebastián Muñoz Guerra y la Dra. Montserrat García Álvarez. Durante su formación doctoral impartió docencia en las asignaturas: Ciencia y Tecnología de los Materiales y Química II de la titulación de Ingeniería Industrial.

Los principales resultados de su Ph.D. se describen en ésta tesis.

LISTA DE PUBLICACIONES

1. “Nanostructured Complexes of Poly(β ,L-malate) and Cationic Surfactants: Synthesis, Characterization and Structural Aspects”. J.A. Portilla-Arias, M. García-Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, E. Holler, S. Muñoz-Guerra. *Biomacromolecules*, 2006, 7, 161-170.
2. “Thermal degradation of fungal poly(β ,L-malic acid) and poly(β ,L-malates)”. J.A. Portilla-Arias, M. García-Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, S. Muñoz-Guerra. *Biomacromolecules*, 2006, 7, 3283-3290.
3. “Biodegradation of Nanostructured Complexes of Poly(β ,L-malate) and Cationic Surfactants”. J.A. Portilla-Arias, M. García-Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, S. Muñoz-Guerra. *Macromolecular Bioscience*, 2007, 7, 897-906.
4. “Thermal decomposition of microbial poly(γ -glutamic acid) and poly(γ -glutamate)s”. J.A. Portilla-Arias, M. García-Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, S. Muñoz-Guerra. *Journal of Polymer Degradation and Stability*, 2007, 92, 1916-1924.
5. “Synthesis, Hydrodegradation and Drug Releasing Properties of Methyl Esters of Fungal Poly(β ,L-malic acid).” J.A. Portilla-Arias, M. García-Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, E. Holler, J.A. Galbis, S. Muñoz-Guerra. *Macromolecular Bioscience*, 2008 (in press).

6. “Biodegradable nanoparticles made of partially methylated fungal poly(β ,L-malic acid) as a novel protein delivery carrier.” J.A. Portilla-Arias, M. García-Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, J.A. Galbis, S. Muñoz-Guerra. *Macromolecular Bioscience*, 2008 (in press)
7. “Nanoparticles made of microbial poly(γ -glutamate)s for encapsulation and delivery of drugs and proteins.” J.A. Portilla-Arias, B. Camargo, M. García-Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, S. Muñoz-Guerra. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 2008 (submitted).
8. “Polímeros biotecnológicos funcionalizados para aplicaciones biomédicas. El ácido poli(β ,L-málico) ” J.A. Portilla-Arias, M. García-Álvarez, S. Muñoz-Guerra. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 2008 (in press).

PATENTES

1. **Número de publicación: ES 2 259 910** “Complejos estequiométricos del ácido poli(β ,L-málico) y tensioactivos catiónicos.”
Inventores: S. Muñoz-Guerra, M. García-Álvarez, J.A. Portilla-Arias.
Solicitante: Universidad Politécnica de Cataluña. **2005**
2. **Numero de solicitud: P 20 050 456:** “Micro y nanoesferas de ésteres metílicos del ácido poli(β ,L-málico).”
Inventores: S. Muñoz-Guerra, M. García-Álvarez, J.A. Portilla-Arias.
Solicitante: Universidad Politécnica de Cataluña. **2006**
3. **Numero de solicitud: P 200 702 918.** “Nanoesferas de ésteres alquílicos del ácido poli(γ -glutámico).”
Inventores: S. Muñoz-Guerra, M. García-Álvarez, J.A. Portilla-Arias.
Solicitante: Universidad Politécnica de Cataluña. **2007**

COMUNICACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

1. “Nanostructured Complexes of Poly(β ,L-malate) and Cationic Surfactants: Synthesis, Characterization and Structural Aspects”. J.A. Portilla-Arias, M. García-Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, E. Holler, S. Muñoz-Guerra. *Congreso Europeo de Polímeros EPF 2005* Moscú, Rusia 2005. (cartel)
2. “Poly(α -methyl, β L-malate): Biosynthesis, Modification, Structure and Biodegradation”. J.A. Portilla-Arias , M. García-Álvarez, C. E. Fernández , M. Mancera , E. Holler, J. A. Galbis, S. Muñoz-Guerra. *European Symposium on Biopolymers ESBP05 SEBIOT/CIB-CSIC* Madrid, España 2005. (cartel)
3. “Amphiphilic nanostructures made of ionic complexes of biosynthetic poly(γ -glutamic and poly(β ,L-malic acids)”. S. Muñoz-Guerra, M. García-Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, G. Pérez-Camero, J.A. Portilla-Arias. *European Symposium on Biopolymers ESBP05 SEBIOT/CIB-CSIC* Madrid, España 2005. (comunicación oral)
4. “Nanoestructuras anfífilicas basadas en complejos iónicos de biopolímeros tecnológicos con tensioactivos catiónicos”. S. Muñoz-Guerra, M. García Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, J.A. Portilla-Arias. *IX Reunión del Grupo Especializado en Polímeros*. Jaca, España 2005. (comunicación oral)
5. “Degradación hidrolítica de complejos iónicos de tensioactivos catiónicos con biopolímeros”. S. Muñoz-Guerra, M. García Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, J.A. Portilla-Arias. *JIP 3^{er} Congreso de Nacional de jóvenes investigadores en polímeros*. Ferrol, España 2006. (comunicación oral)
6. “Methyl esters of Poly(β ,L-malic acid): Synthesis, Characterization and biorrelated properties.” J.A. Portilla-Arias, M. García-Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, E. Holler, J.A. Galbis, S. Muñoz-Guerra. *Congreso Europeo de Polímeros EPF2007* Portoroz, Eslovenia 2007. (comunicación oral)
7. “Nanosferas de ácido polimálico parcialmente metilado para transporte y dosificación de proteínas”. J.A. Portilla-Arias, M. García-Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, E. Holler, J.A. Galbis, S. Muñoz-Guerra. *X Reunión del Grupo especializado en polímeros GEP* Sevilla, España 2007. (comunicación oral)

8. “Combined WAXS and SAXS-real time study of phase transitions in comb-like ionic complexes of biosynthetic polypeptides and polyesters”. A. Alla, J.A. Portilla-Arias, M. García-Álvarez, E. Muñoz-Mahamud, S. Muñoz-Guerra. *X Reunión del Grupo Especializado en Polímeros GEP* Sevilla, España 2007. (cartel)
9. “Combined WAXS and SAXS-real time study of phase transitions in comb-like ionic complexes of biosynthetic polypeptides and polyesters”. A. Alla, J.A. Portilla-Arias, M. García-Álvarez, E. Muñoz-Mahamud, S. Muñoz-Guerra. *II Workshop on applications of Synchrotron Light to non-crystalline diffraction in materials and life sciences*. Madrid, España 2007. (cartel)
10. “Ionic complexes of biotechnological polyacids with cationic surfactants”. S. Muñoz-Guerra, M. García-Álvarez, A. Martínez de Ilarduya, J.A. Portilla-Arias, A. Alla. *7th International Conference Polymer-Solvent Complexes & Intercalates* Marrakech, Marruecos 2008. (comunicación oral)