

OBTENCIÓN DE ALBUMINA BOVINA

DANIELLA VALENTINA PEÑA PUENTES

INFORME DE PASANTÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERA QUÍMICA

DIRECTOR

DAVID LEONARDO SOTELO TOBON

QUÍMICO, MSC., CPHD.

CODIRECTORA

ADRIANA KATERINE HOSMAN AGUIRRE

BACTERIÓLOGA

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA

FACULTAD DE INGENIERÍAS

PROGRAMA DE INGENIERIA QUIMICA

BOGOTÁ D.C

2024



## DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

**Dr. Mario Posada García-Peña**

Consejero Institucional

**Dr. Luis Jaime Posada García-Peña**

Vicerrectoría Académica

**Dra. María Fernanda Vega de Mendoza**

Vicerrectoría Administrativo y Financiero

**Dr. Ricardo Alfonso Peñaranda Castro**

Vicerrectoría de Investigaciones y extensión

**Dra. Susan Margarita Benavides Trujillo**

Secretaría General

**Ing. José Luis Macías Rodríguez**

Decano de la Facultad de Ingenierías

**Ing. Naliny Patricia Guerra Prieto**

Director del Programa de Ingeniería Química

**Ing. Nubia Liliana Becerra Ospina**

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>1. MARCO CONCEPTUAL</b>	<b>12</b>
1.1 Suero fetal bovino	12
1.2 Albumina bovina	12
1.3 Obtención de proteínas por precipitación fraccionada con sales y caracterización	12
1.4 Método de cuantificación de proteínas Biuret	15
1.5 Cromatografía en HPLC para proteínas	15
<b>2. METODOLOGÍA</b>	<b>16</b>
2.1 Análisis fisicoquímicos y microbiológicos del SFB	16
2.2 Realización de precipitación fraccionada con sulfato de amonio	18
2.3 Desalación de las fracciones	22
2.4 Microfiltración de sobrenadante de la fracción 3	23
2.5 Evaluación de esterilidad de la albumina microfiltrada	23
2.6 Cuantificación de albumina en cada fracción	24
2.7 Determinación por cromatografía líquida	24
<b>3. RESULTADOS Y ANÁLISIS</b>	<b>25</b>
3.1 Caracterización del suero fetal bovino marca LABG&M	25
3.2 Obtención de albumina bovina	30
3.3 Purificación de albumina por microfiltración	34
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>38</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>39</b>



## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> Diagrama de flujo ensayo 1 fracción I	18
<b>Figura 2</b> Diagrama de flujo ensayo 1 fracción II .	19
<b>Figura 3.</b> Diagrama de flujo ensayo 1 fracción III	20
<b>Figura 4</b> Diagrama de flujo ensayo 2 fracción I	21
<b>Figura 5</b> Diagrama de flujo ensayo 2 fracción II	22
<b>Figura 6</b> Montaje para desalación o diálisis	23
<b>Figura 7</b> Siembra de SFB en agar sangre	25
<b>Figura 8</b> Siembra de SFB en caldo tioglicolato	26
<b>Figura 9</b> Control positivo. Siembra E. coli agar sangre y caldo tioglicolato	26
<b>Figura 10</b> Siembra de SFB en agar Mycoplasma.	27
<b>Figura 11</b> Curva de calibración para determinación de proteínas totales	28
<b>Figura 12</b> Patrón de albúmina sérica bovina (BSA) en cromatografía HPLC	29
<b>Figura 13</b> Cromatograma HPLC de SFB.	29
<b>Figura 14</b> Gráfica comparativa de concentración de cada fracción obtenida	31
<b>Figura 15</b> Cromatograma en HPLC del sobrenadante 3	32
<b>Figura 16</b> Cromatograma en HPLC para precipitado 3	33
<b>Figura 17</b> Siembra de cada fracción dializada y micro-filtrada en agar sangre	35
<b>Figura 18</b> Siembra de cada fracción dializada y micro-filtrada en caldo tioglicolato	36
<b>Figura 19</b> Diagrama de flujo de proceso para obtención de albúmina bovina	37

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1</b> Precálculo para saturación con sulfato de amonio	14
<b>Tabla 2</b> Tabla para curva de calibración de albúmina para cuantificación de proteínas totales	17
<b>Tabla 3</b> Dilución y resultados para concentración de SFB	28
<b>Tabla 4</b> Tabla de resultados de la caracterización de SFB.	30
<b>Tabla 5</b> Cuantificación de proteína en cada fracción obtenida.	31
<b>Tabla 6</b> Porcentaje de recuperación por fracción.	34

## RESUMEN

En el marco del presente estudio teórico-experimental llevado a cabo durante periodo de pasantía en la empresa “Microgen Ltda.”, especializada en la producción y comercialización de reactivos de diagnóstico *in vitro* y dispositivos médicos, se ha desarrollado una propuesta para la obtención de albúmina bovina partiendo de suero fetal bovino marca LABG&M por medio de precipitación fraccionada con sulfato de amonio seguida de un proceso de desalación o diálisis por membrana y microfiltración a 0,2 $\mu$ m.

El proceso propuesto implica la utilización del método de precipitación fraccionada con sulfato de amonio, seguida por una etapa de desalación o diálisis mediante membrana y microfiltración con un tamaño de poro de 0,2  $\mu$ m. Como resultado de estos pasos, se logró obtener albúmina tipo B con una concentración de 6425 ppm.

Un hallazgo clave de esta investigación fue determinar que la concentración óptima de sulfato de amonio que debe tener la muestra inicial para obtener la mencionada proteína se encuentra en un rango de saturación, situándose entre el 30% y el 33%, contribuyendo significativamente a la eficiencia del proceso y a la obtención de resultados satisfactorios en la producción de albúmina bovina.

**Palabras clave:** Albumina bovina, proteínas, precipitación fraccionada, suero fetal bovino.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Desarrollar una propuesta para la obtención de albúmina tipo de B de suero fetal bovino marca LABG&M.

### **Objetivos específicos**

Cuantificar contenido proteico del suero fetal bovino por método Biuret.

Obtener albúmina tipo B a nivel laboratorio partiendo de suero fetal bovino por método de precipitación fraccionada con sulfato de amonio.

Purificar la albumina tipo B por método de microfiltración.

## INTRODUCCIÓN

Para la empresa Microgen Ltda. es de gran importancia “ir a la vanguardia” en términos de investigación para brindar al mundo un diagnóstico efectivo, esto con el desarrollo de nuevos productos.

La albumina bovina es ampliamente usada en investigación y estudios inmunológicos e inmunohematológicos. Así como en, administración de fármacos, terapéutica, ingrediente de medios de cultivo, ingrediente de vacunas y otras aplicaciones. [1] Su uso en área de medicina y farmacia, por ejemplo, en el enriquecimiento de medios de cultivo y la inoculación directa en medios donde se aíslan micobacterias lo hacen un producto con demanda significativa.

Actualmente, esta demanda en Colombia se suple importando desde el exterior la albumina bovina lo que conlleva a gastos adicionales y posibles tiempos de espera prolongados. Debido a esto, se tomó la iniciativa de aprovechar el mercado demandante y poco ofertado con el trabajo de investigación teórico-práctico enfocado en la obtención de esta proteína usando como precursor el suero fetal bovino comercializado actualmente por Microgen Ltda.

Así mismo, se pretende contribuir al cumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible [2]: (3) salud y bienestar, ya que este producto permite mejor diagnóstico *in vitro* de enfermedades por el enriquecimiento de medios de cultivo y por su potencial como biosensor para determinar o detectar compuestos. (8) Trabajo decente y crecimiento económico, ya que se apoya a la generación de empleo al implementar la iniciativa de comercializar un nuevo producto de Microgen Ltda. (9) Industria, innovación e infraestructura, ya que se aporta a la industria en áreas de medicina, farmacia e investigación, dando la alternativa de nacionalizar la producción de albumina bovina.

Este trabajo pretende desarrollar un precedente para la estandarización de un proceso productivo de albúmina bovina para su uso interno y comercialización por parte de la empresa Microgen Ltda.

## **1. MARCO CONCEPTUAL**

### **1.1 Suero fetal bovino**

FBS por sus siglas en inglés (Fetal Bovine Serum), es el suplemento más utilizado para el cultivo celular, ya que su compleja composición aporta los nutrientes necesarios para el crecimiento de la mayoría de las células. Es un subproducto de la industria cárnica, y su disponibilidad y producción dependen principalmente de dos factores externos incontrolables: las condiciones climáticas y los cambios en el consumo de carne vacuna.<sup>[3]</sup>

El suero fetal bovino producido y comercializado por Microgen Ltda es una mezcla compuesta de factores de crecimiento, oligoelementos, vitaminas, proteínas, glucosa y hormonas, esenciales para el crecimiento, mantenimiento y proliferación de células (líneas celulares).<sup>[4]</sup>

### **1.2 Albumina bovina**

Más conocida como BSA por sus siglas en inglés (Bovine Serum Albumin) es una proteína de gran tamaño presente en la proteína sérica de vaca o bovino, rica en aminoácidos esenciales y compuestos con puentes disulfuro y grupos tiol. Esta proteína pasa a la leche materna desde el torrente sanguíneo por difusión, tiene capacidad antioxidante y protege las grasas de la oxidación.<sup>[5]</sup> La albúmina en el torrente de los bovinos, tiene la capacidad de inhibir los factores tumorales y unirse a las grasas, movilizarlas en el organismo para realizar otras funciones como obtener energía o formar membranas. Además, tiene la capacidad de reducir la absorción de colesterol, complejos de metales pesados y es un agonista de opioides (actúa sobre los receptores de opioides y favorece la analgesia). La unión o compatibilidad de la albúmina como factor en medicamentos, influye en el destino de los fármacos en el organismo. <sup>[5]</sup> Con relación a estas características tiene un uso como biosensor, además de ayudar a mantener cultivos celulares en óptimas condiciones.

### **1.3 Obtención de proteínas por precipitación fraccionada con sales y caracterización**

La precipitación de proteínas se produce de forma gradual. La adición de un agente precipitante y una mezcla constante, provoca que el precipitante y el objetivo colisionen, desestabiliza la solución de proteína. Se requiere suficiente tiempo de mezcla para que las moléculas se difundan a través de los remolinos de fluido. Se cree que la precipitación produce la mayor recuperación y es adecuada para extractos de proteínas de bajo volumen. <sup>[6]</sup>

La precipitación ocurre porque el cambio de pH o hidrofobicidad altera las interacciones entre la proteína y el ambiente acuoso o mediante la unión de sales o metales a grupos funcionales de proteínas. De modo que las interacciones intramoleculares se interrumpen y las proteínas se desnaturalizan. Las proteínas son generalmente solubles en sales diluidas; La solubilidad de una proteína generalmente aumenta con la concentración de sal a baja fuerza iónica. El “salting in” es el fenómeno por el cual la concentración de sal aumenta la solubilidad de la proteína. Sin embargo, cuando aumenta la concentración de sal, la solubilidad disminuye y, con ciertas sales, las proteínas se vuelven insolubles. La concentración debe ser muy alta para precipitar las proteínas; por lo tanto, generalmente se utilizan sales muy solubles para la precipitación de proteínas, este fenómeno se conoce como “salting out”. [7]

La sal más común para la precipitación de proteínas es el sulfato de amonio [8]. Es una de las primeras sales liotrópicas y probablemente la más eficaz para la precipitación de proteínas [9]. Es la sal ideal para la precipitación de proteínas es más eficaz para una composición de aminoácidos particular, es económica y no amortigua. [6][10]

**Tabla 1***Precálculo para saturación con sulfato de amonio.*

Concentración inicial (% de saturación)	Porcentaje de saturación a 0 °C									celda vacía
	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
	<b>Sulfato de amonio sólido (gramos) por 10 ml de solución de proteína</b>									
0	1.06	1,64	2.26	2.91	3.61	4.36	5.16	6.03	6.97	
10	0,53	1.09	1,69	2.33	3.01	3.74	4.52	5.36	6.27	
20	0	0,55	1.13	1,75	2.41	3.12	3.87	4.69	5.57	
30		0	0,56	1.17	1.81	2.49	3.23	4.02	4,88	
40			0	0,58	1.20	1,87	2.58	3.35	4.18	
50				0	0,60	1.25	1,94	2.68	3.48	
60					0	0,62	1.29	2.01	2,79	
70						0	0,65	1.34	2,09	
80							0	0,67	1,39	
90								0	0,7	
100									0	

**Nota.** Precálculo de sulfato de amonio necesario para la precipitación de 10 mL de solución de proteínas. Tomado de: Righetti, P. G., & Boschetti, E. Chapter 8 - Detailed Methodologies and Protocols. In P. G. Righetti & E. Boschetti (Eds.), *Low-Abundance Proteome Discovery* (pp. 263–319). Elsevier. (2013). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-401734-4.00008-7>

Determinar la técnica analítica adecuada (centrifugación, cromatografía líquida o electroforesis) depende de la fragilidad de las proteínas y de la robustez de las células. Las proteínas solubles permanecerán en el disolvente después del proceso de extracción y pueden separarse de las membranas celulares y los ácidos nucleicos mediante centrifugación [6]. La centrifugación o filtración se utiliza para crear un sobrenadante o filtrado libre de partículas. Además, algunas proteínas no precipitan incluso en presencia de concentraciones extremadamente altas de sales, especialmente proteínas de bajo peso molecular [7].

En este caso se espera que la proteína de interés este en el sobrenadante junto con las proteínas de mayor peso molecular a esta. Así como esta proteína estaría presente en el sobrenadante de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio en suero equino. [8]

#### **1.4 Método de cuantificación de proteínas Biuret.**

En este método, las sales de cobre en solución alcalina forman un complejo violeta con sustancias que contienen dos o más enlaces peptídicos. La absorbancia producida es proporcional al número de enlaces peptídicos que están reaccionando y por tanto al número de moléculas de proteína presentes en el sistema de reacción. Por tanto, la reacción de Biuret con proteínas es adecuada para la determinación de proteínas totales mediante espectrofotometría (a 540-560nm). El uso de albúmina sérica bovina o humana para estandarizar el método de Biuret está bien establecido. La albúmina de alta pureza contiene sólo aminoácidos. El contenido de nitrógeno es una fracción constante de su masa molecular y se conoce el número de enlaces peptídicos por molécula. Dado que el enlace peptídico es la unidad que reacciona con el Biuret en todas las proteínas y el número de enlaces peptídicos determina la absorbancia del producto coloreado, la albúmina es un estándar de enlace peptídico razonable para todas las proteínas de la mezcla. [11]

#### **1.5 Cromatografía en HPLC para proteínas**

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica de separación establecida que se usa ampliamente para la separación de especies no volátiles. Se describen los componentes instrumentales de un HPLC, incluidos desarrollos e innovaciones notables, particularmente con respecto a la tecnología de bombas y columnas. La detección de compuestos es una parte esencial del proceso y se proporcionan detalles para los detectores más comunes y los más nuevos.[12] Las técnicas cromatográficas pueden llevarse a cabo por diferentes mecanismos como son: absorción continua, adsorción, partición e intercambio iónico. Aventura a otras técnicas en la purificación de proteínas.

Consiste en una fase estacionaria columna (no polar) y una fase móvil. La fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo con las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar. [13][14]

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Análisis fisicoquímicos y microbiológicos del SFB

Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos que se realizaron para el suero fetal bovino marca LABG&M son: valor de pH, esterilidad, concentración de proteína total y la presencia o ausencia de *Mycoplasma sp.* de acuerdo con las pruebas solicitadas por la Asociación Internacional de la Industria del Suero (ISIA). [15]

La materia prima utilizada de suero fetal bovino marca LABG&M corresponde al lote 0310-23.

#### 2.1.1 Evaluación del pH en el suero fetal bovino marca LABG&M

Se midió el pH por medio de potenciómetro “Hanna Instruments” basado en escala de calibración en tres puntos.

#### 2.1.2 Evaluación de esterilidad por pruebas microbiológicas del suero fetal bovino marca LABG&M

La evaluación de esterilidad por pruebas microbiológicas se realizó en Agar sangre y caldo Tioglicolato marca LABG&M. Se sembró SFB por triplicado en cada una de las muestras con asas estériles en el Agar Sangre y 0,6 ml en cada caldo. Se realiza control positivo con siembra de *E. coli*, ATCC 25922. Se deja en incubadora “JS Research Inc.” durante 48 horas a una temperatura de 37°C.

#### 2.1.3 Evaluación de presencia o ausencia de *Mycoplasma sp.* en suero fetal bovino marca LABG&M

La evaluación de presencia/ausencia de *Mycoplasma sp.* sobre el medio de crecimiento selectivo con agar *Mycoplasma sp* con materia prima Sigma Aldrich se prepara según las indicaciones de la casa comercial. Se sembró por triplicado con asas estériles en cada placa. Se deja en incubación por 48 horas a 37°C en incubadora “incubadora “JS Research Inc.”

#### 2.1.4 Concentración total de proteínas del suero fetal bovino marca LABG&M

La medición total de proteínas se hace por el método Biuret. Siguiendo el protocolo propuesto. [16]

- Reactivo Biuret

Inicialmente se preparará reactivo de Biuret, disolviendo 1,9g de Sulfato de cobre (II) pentahidratado y 3,35g de EDTA disódico en 200 ml de agua desionizada, agitando hasta disolver ambos sólidos.

Se agrega 50g de hidróxido de sodio y se agita hasta disolver completamente. Finalmente se afora con agua.

- Curva de calibración de albúmina.

Para realizar la solución madre estándar, que será el punto más alto de la curva de calibración, se pesa 1,000g de albúmina y se transfiere a un balón de 100mL, se agrega agua desionizada. Para disolver se agita vigorosamente hasta que el sólido desaparezca.

Se realiza la disolución en cada tubo de ensayo, según la siguiente tabla.

**Tabla 2.**

*Tabla para curva de calibración de albúmina para cuantificación de proteínas totales.*

Punto de la curva	Volumen de patrón (mL)	Volumen de agua (mL)	Volumen de reactivo Biuret (mL)	Concentración final (ppm)
1	0,5	8,5	1	500
2	1	8	1	1000
3	2	7	1	2000
4	5	4	1	5000
5	8	1	1	8000

**Nota.** Esta tabla se usa para realizar la curva de calibración de albúmina para cuantificación de proteínas totales. Tomado de: Sotelo. D Guía para practica de laboratorios y talleres “Cromatografía en análisis de metabolitos”. Fundación Universidad de América. (2023)

Para preparar la muestra a leer en el espectrofotómetro: se adicionará 1mL de SFB a un tubo de ensayo limpio, 1mL de reactivo Biuret y se completa con 8mL de agua desionizada. Se agita suavemente y se debe dejar reposar al menos 15 minutos. Para preparar el blanco será 9mL de agua desionizada y 1mL de reactivo Biuret.

Se realiza la lectura en el espectrofotómetro “Genesys 30 Visible Spectrophotometer” Marca Thermo Scientific a 545 nm. Se realiza regresión lineal y se rectifica el valor de  $R^2$  para confiabilidad de la curva de calibración.

Se lee el valor de la muestra y con la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración se calcula la concentración total.

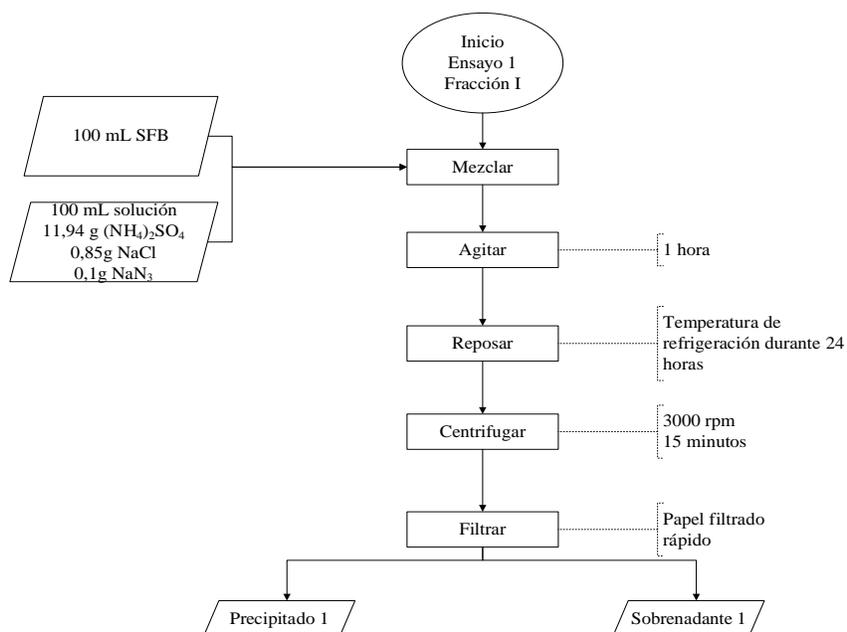
## 2.2 Realización de precipitación fraccionada con sulfato de amonio

### 2.2.1 Ensayo 1.

Fracción I: Se prepara una solución de 100mL de con 11, 94g de sulfato de amonio, 0,85g de cloruro de sodio y 0,1g de azida de sodio. Se añadió a 100mL de SFB, de dejó agitando durante 1 hora y se dejó en reposo en temperatura de refrigeración durante 24 horas. Pasado este tiempo se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos en centrifuga marca “International Equipment Co.” Referencia: Serie No.428-17923 y se filtró por papel de filtrado rápido. Esto para realizar la primera “Salting in”.

Figura 1.

Diagrama de flujo ensayo 1 fracción I

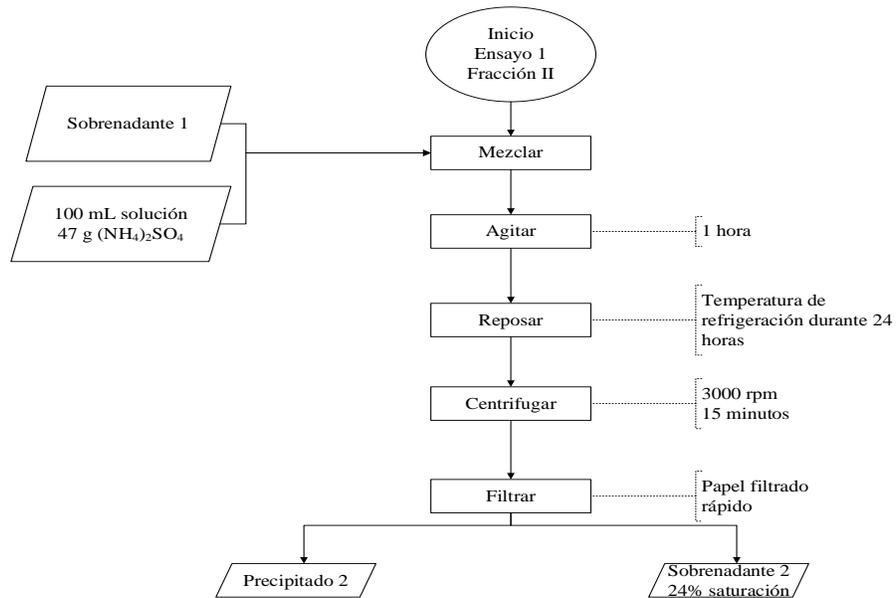


**Nota.** Esta figura refleja la metodología experimental del ensayo 1 fracción I.

Fracción II: Se realizó una segunda solución de 100mL de sulfato de amonio al 47% la cual fue agregada al sobrenadante de la etapa anterior. Este se agitó durante una hora y se dejó en reposo en refrigeración durante 24 horas. Quedando a 24% de saturación de sulfato de amonio. Pasadas las 24 horas se centrifuga a 3000 rpm por 15 minutos y se filtra con filtro de papel de filtrado rápido.

**Figura 2.**

*Diagrama de flujo ensayo 1 fracción II*

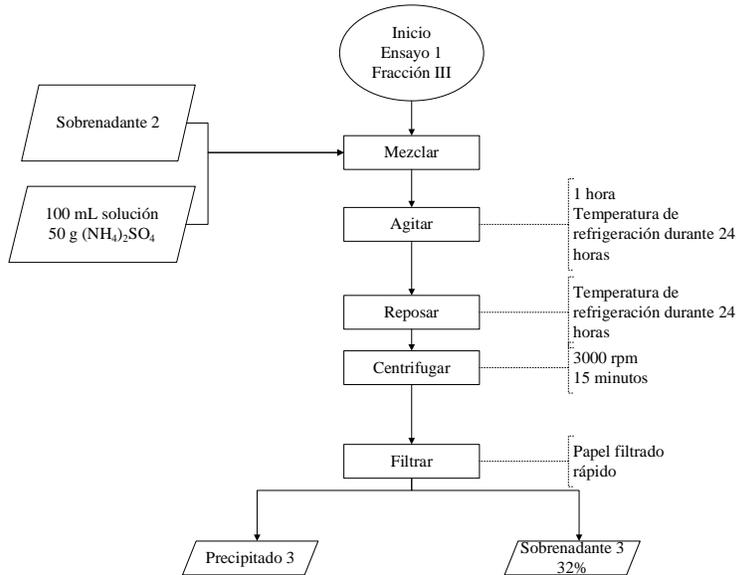


**Nota.** Esta figura refleja la metodología experimental del ensayo 1 fracción II.

Fracción III: Se realiza tercera solución de 100mL de sulfato de amonio al 50% la cual es agregada al sobrenadante de la etapa anterior. Este se centrifugó y filtró de igual manera de la etapa anterior.

**Figura 3.**

*Diagrama de flujo ensayo 1 fracción III*



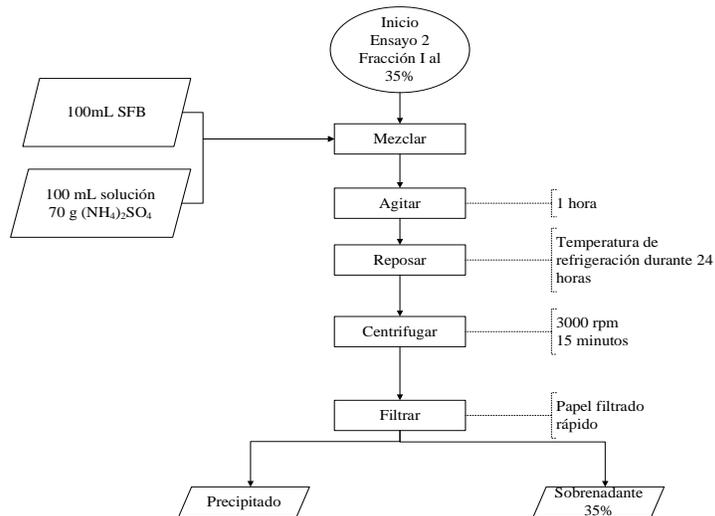
*Nota.* Esta figura refleja la metodología experimental del ensayo 1 fracción III.

### **2.2.2 Ensayo 2.**

Fracción I al 35%: Se realiza solución de 100mL sulfato de amonio al 70% que se agrega a 100mL de suero fetal bovino para obtener una saturación del 35% en la muestra. Se agita durante una hora. Se deja en reposo por 24 horas en refrigeración. Pasado este tiempo se centrifuga a 3000 rpm por 15 minutos y se filtra por papel de filtro.

**Figura 4.**

*Diagrama de flujo ensayo 2 fracción I*

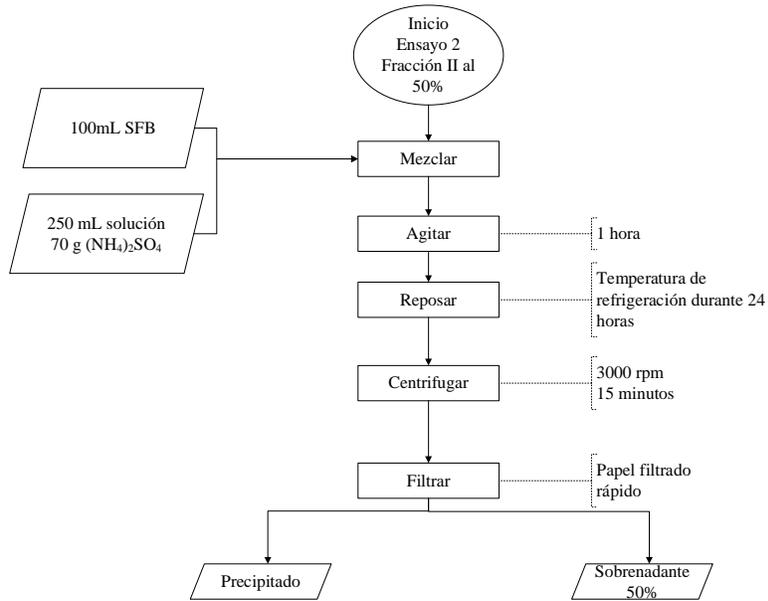


**Nota.** Esta figura refleja la metodología experimental del ensayo 2 fracción I.

Fracción II al 50%: Se realiza solución de 125mL sulfato de amonio al 70% que se agrega a 50mL de suero fetal bovino para obtener una saturación del 50% en la muestra. Se agita durante una hora. Se deja en reposo por 24 horas en refrigeración. Pasado este tiempo se centrifuga a 3000 rpm por 15 minutos y se filtra por papel de filtro.

**Figura 5.**

*Diagrama de flujo ensayo 2 fracción II*



*Nota.* Esta figura refleja la metodología experimental del ensayo 2 fracción II.

### 2.3 Desalación de las fracciones

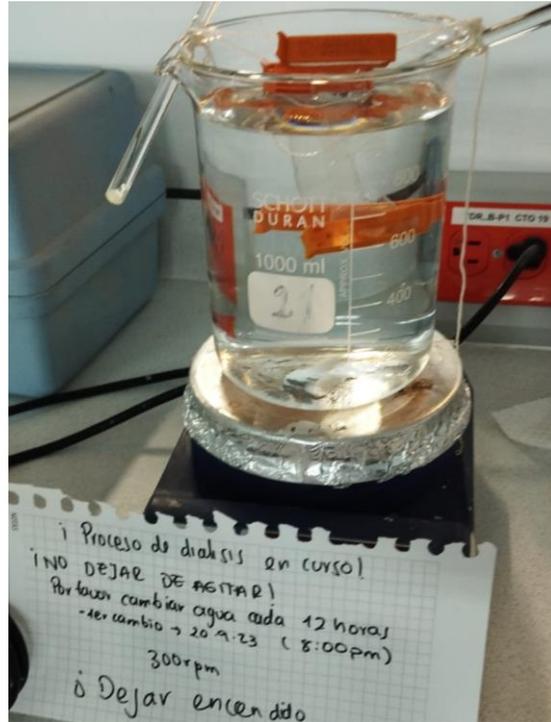
La realización de las fracciones se realiza mediante diálisis por membrana donde el medio de contraste es agua desionizada fría.

Se tomó 1mL de cada fracción al cual se le agrega 9mL de agua para posteriormente pasar al proceso de diálisis.

La diálisis se llevó a cabo durante 3 días cambiando el agua desionizada cada 12 horas máximo con agitación constante de 1500 rpm.

**Figura 6.**

*Montaje para desalación o diálisis*



*Nota.* Esta figura evidencia el montaje para la desalación de muestras suspendidas medio acuoso con agitación constante.

Después de desalar las muestras se plantea el porcentaje de recuperación partiendo de la concentración de proteínas del suero fetal bovino, comparando a partir de allí la recuperación de proteína en cada fracción.

#### **2.4 Microfiltración de sobrenadante de la fracción 3**

Con el fin de eliminar contaminantes de las muestras de interés, se pasan por filtros marca Sartorius de 0,2 $\mu$ m Ministart Referencia “17845-ACK 0,2” dentro de una cabina de flujo laminar, garantizando esterilidad de cada fracción dializada.

#### **2.5 Evaluación de esterilidad de la albumina microfiltrada.**

La evaluación de esterilidad por pruebas microbiológicas se realizó en Agar sangre y caldo Tioglicolato marca LABG&M. Se sembró en cada una de las muestras con asas estériles en el Agar Sangre y 0,6 ml en cada caldo Se realiza control positivo con siembra de E. coli, ATCC 25922. Se deja en incubadora “JS Research Inc.” durante 48 horas a una temperatura de 37°C.

## **2.6 Cuantificación de albumina en cada fracción**

De los 10mL que componen cada fracción se toma 1mL para realizar prueba de concentración de proteína por método Biuret como en la sección de caracterización del suero fetal bovino

## **2.7 Determinación por cromatografía líquida**

Las muestras fueron inyectadas en un equipo de cromatografía líquida marca Merck D7000, empleando una columna Lichrospher de 4,5 x 250 mm y 5 um de tamaño de partícula. Las condiciones cromatográficas incluyen un flujo de 1,0 mL/min, longitud de onda de 280 nm, fase móvil de agua con 0,1 % de ácido trifluoroacético (A) y acetonitrilo con 0,1 % de ácido trifluoroacético (B) en un gradiente de concentración que inicia con 95 % de A y 5 % de B por 4 min; luego se inicia una rampa de incremento de B hasta alcanzar el 50 % durante 10 min; para un total de tiempo de corrida de 14 min.

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

#### 3.1 Caracterización del suero fetal bovino marca LABG&M

##### 3.1.1 Evaluación de pH de SFB

El resultado del pH del suero fetal bovino es 7,2 para el lote en cuestión. El resultado es correcto con respecto a los estándares proporcionados por el ISIA, los cuales indican que debe estar en un rango de 7.0 a 8.0.

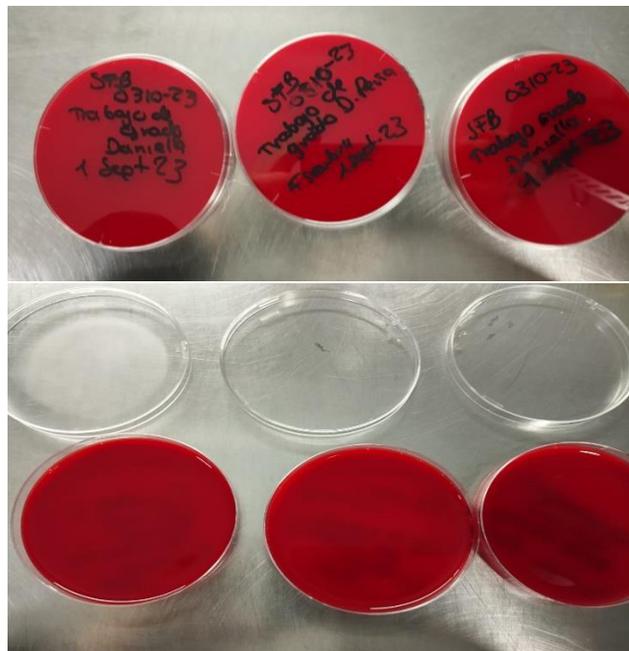
##### 3.1.2 Evaluación de esterilidad por pruebas microbiológicas del suero fetal bovino marca LABG&M

Los resultados de las pruebas microbiológicas para el SFB precursor de la albumina han sido negativas, es decir, sin presencia de microorganismos, se garantiza la esterilidad del reactivo.

No se evidencia crecimiento en ninguna placa ni caldo. A diferencia del control positivo. Véase a continuación.

#### Figura 7.

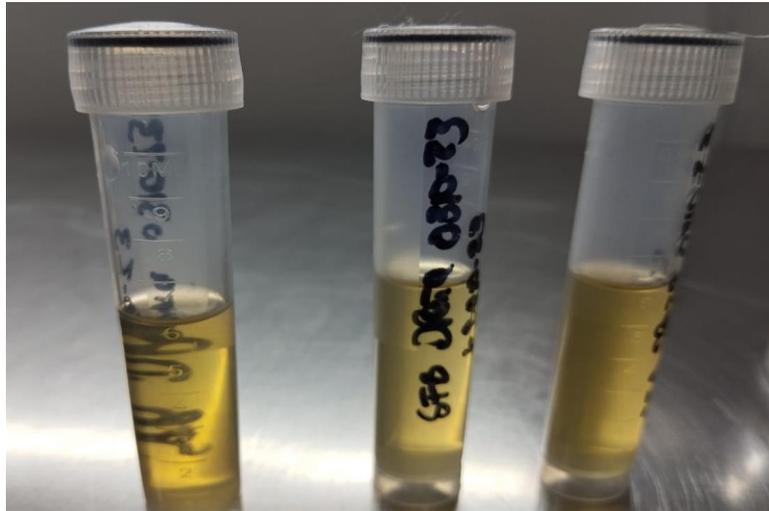
*Siembra de SFB en agar sangre*



**Nota.** En la figura se refleja la siembra de SFB en agar sangre.

**Figura 8.**

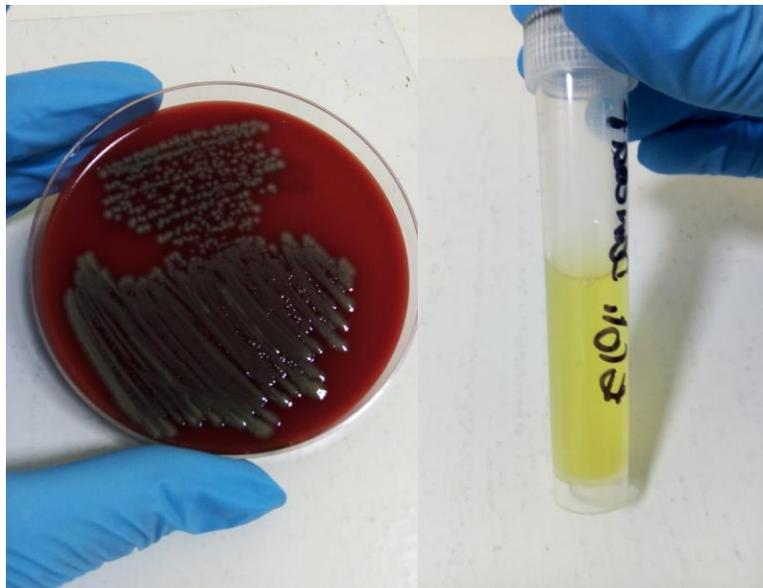
*Siembra de SFB en caldo tioglicolato*



*Nota.* En la figura se refleja la siembra de SFB en caldo tioglicolato..

**Figura 9.**

*Control positivo. Siembra E. coli agar sangre y caldo tioglicolato*



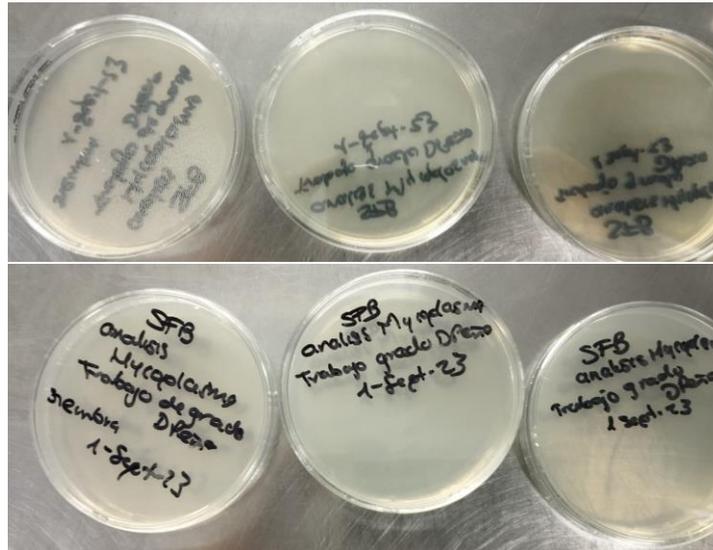
*Nota.* En la figura se evidencia el control positivo realizado mediante la siembra de *E.coli* en agar sangre y en caldo tioglicolato.

### **3.1.3 Evaluación de presencia o ausencia de *Mycoplasma sp.* en suero fetal bovino marca LABG&M**

Los resultados de la evaluación de presencia o ausencia de *Mycoplasma sp.*, da como resultado ausencia de esta puesto que en este medio selectivo no se evidencia crecimiento.

**Figura 10.**

*Siembra de SFB en agar Mycoplasma*



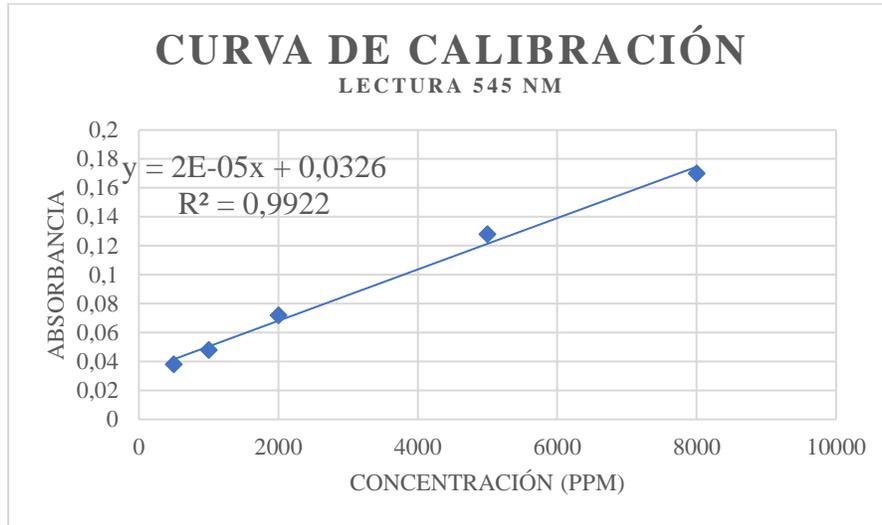
*Nota.* En la figura se muestra la siembra de SFB para detectar presencia/ausencia de Mycoplasma.

### **3.1.4 Concentración de proteína en el SFB.**

La curva de calibración obtenida presenta un  $R^2$  de 0,992 lo cual es un parámetro aceptable de confiabilidad.

**Figura 11.**

*Curva de calibración para determinación de proteínas totales*



*Nota.* En la figura se evidencia el resultado de la curva de calibración para la cuantificación de proteínas.

**Tabla 3.**

*Dilución y resultados para concentración de SFB*

Volumen de la muestra (mL)	Volumen de agua (mL)	Volumen de Biuret (mL)	Absorbancia 545 nm	Concentración (ppm)
1	8	1	0,094	30700

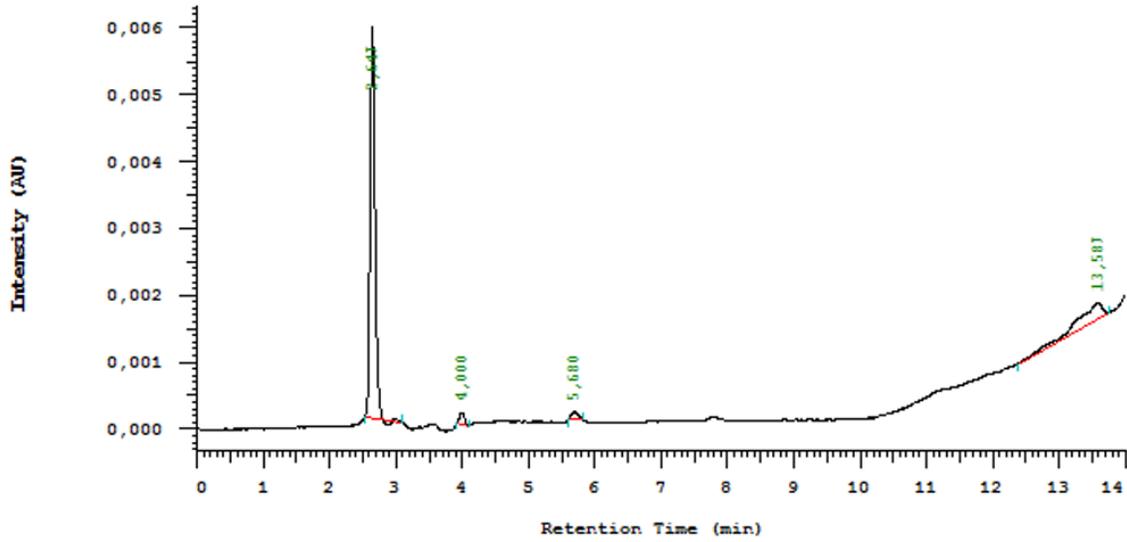
*Nota.* La tabla 3 evidencia los resultados en concentración y su factor de dilución.

La concentración de proteínas se encuentra en el rango sugerido por la ISIA el cual comprende desde 30000 hasta 45000ppm.

### 3.1.5 Prueba cromatografía en HPLC para SFB

Figura 12.

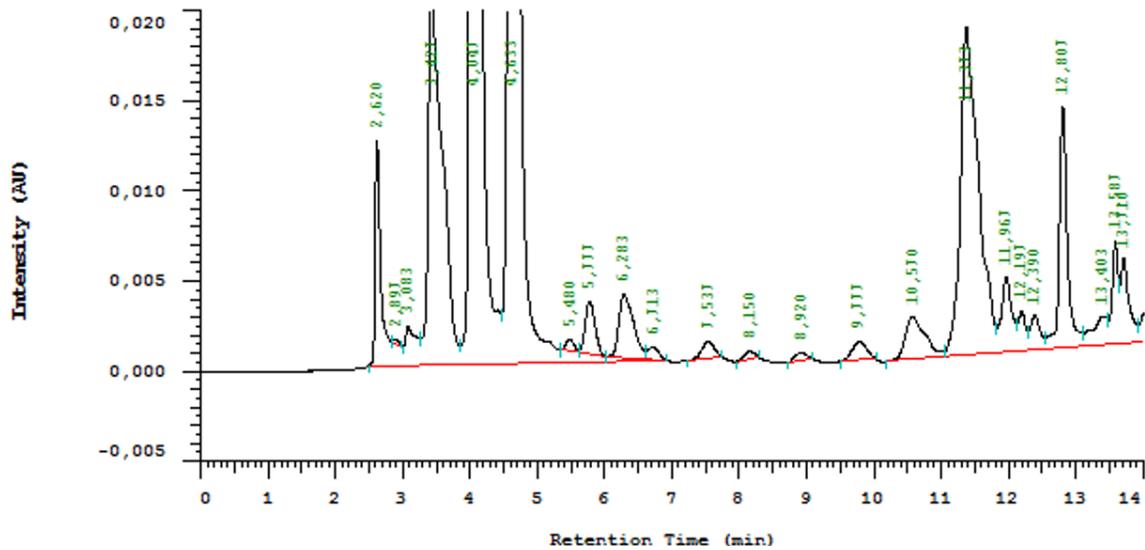
Patrón de albúmina sérica bovina (BSA) en cromatografía HPLC



*Nota.* Se presenta el cromatograma obtenido del patrón de albúmina sérica bovina.

Figura 13.

Cromatograma HPLC de SFB



*Nota.* Se presenta el cromatograma del suero fetal bovino y se evidencia además de la albúmina, presencia de demás proteínas.

Nótese en los cromatogramas que en la figura 12 que la albúmina presenta un tiempo de retención de 2,643 minutos. En comparación con la figura 13 donde se presenta el cromatograma del suero fetal bovino, se evidencia presencia de albúmina puesto que se presenta un pico al mismo tiempo de retención. Sin embargo, es notable que otras proteínas presentes en el SFB presentan una mayor concentración en comparación con la albúmina presente, interpretable debido a que presentan una respuesta mucho más alta comparada con la señal de la proteína de interés.

**Tabla 4.**

*Tabla de resultados de la caracterización de SFB*

<b>Prueba</b>	<b>Resultado</b>	<b>Valor de referencia</b> [15]	<b>Técnica</b>
Color	Ámbar	Ámbar	Macroscópica
pH	7,2	7,0 a 8,0	Uso de potenciómetro
Esterilidad	Negativo	Negativo	Cultivos microbiológicos
<i>Mycoplasma</i>	Negativo	Negativo	Cultivos microbiológicos
Proteínas totales	30700 ppm	30000-45000 ppm	Biuret

*Nota.* Se presentan las características del suero fetal bovino. Junto con los valores de referencia. Tomado de ISIA. International Serum Industry Association. Certificate of Analysis (CofA) Vol. 16. ISIA website 2017. <https://www.serumindustry.org/standardization/certificate-ofanalysis-cofa>.

El color y el pH están correctamente dentro del rango establecido, esto apoya la viabilidad celular y también es indicador de que el suero no ha sido adulterado.

Las pruebas de esterilidad han salido negativas por lo que indica garantía de que se han eliminado hongos y bacterias durante el proceso de fabricación.

Las pruebas de *Mycoplasma* indican ausencia de este contaminante que puede crear problemas metabólicos en cultivos celulares.

El valor de proteínas totales se encuentra dentro del rango establecido por lo que da viabilidad al suero de aplicarse en cultivos celulares y en este caso como precursor rico en proteínas, particularmente en albúmina.

### **3.2 Obtención de albumina bovina**

Se realizan las diferentes diluciones y mediciones para cada fracción obtenida tras cada uno de los ensayos. Los resultados se muestran a continuación.

**Tabla 5.**

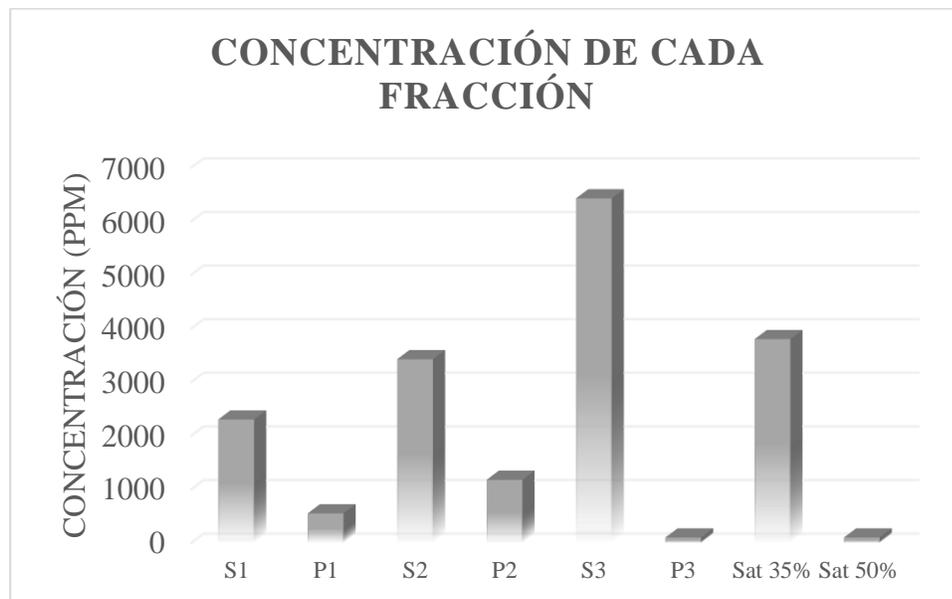
*Cuantificación de proteína en cada fracción obtenida.*

Ensayo	Fracción	Volumen de la muestra (mL)	Volumen de agua (mL)	Volumen de Biuret (mL)	Absorbancia 545 nm	Concentración (ppm)
1	Sobrenadante 1	4	5	1	0,051	2300
	Precipitado 1	4	5	1	0,037	550
	Sobrenadante 2	4	5	1	0,060	3425
	Precipitado 2	4	5	1	0,042	1175
	Sobrenadante 3	4	5	1	0,084	6425
	Precipitado 3	4	5	1	0,008	<500
2	Saturación 35%	4	5	1	0,063	3800
	Saturación 50%	4	5	1	0,022	<500

*Nota.* Se evidencia el factor de dilución, absorbancia y la concentración de cada fracción de los dos ensayos correspondientes.

**Figura 14.**

*Gráfica comparativa de concentración de cada fracción obtenida.*



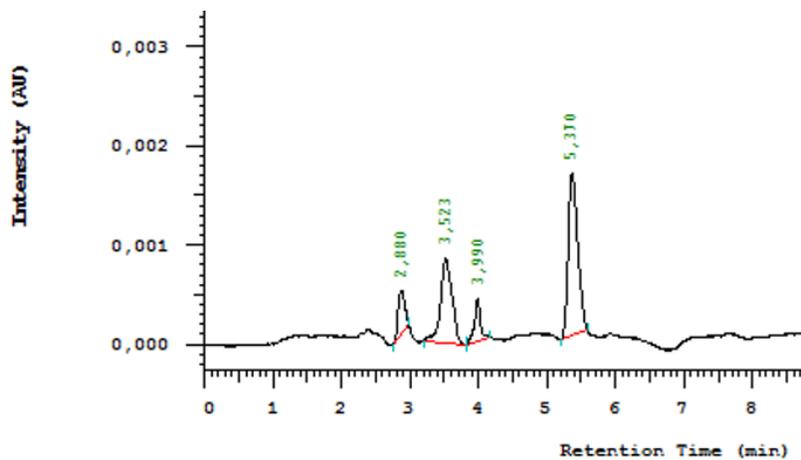
*Nota.* La figura evidencia una comparación entre la concentración de cada fracción.

Se evidencia mayor concentración de proteína en el sobrenadante 3 del ensayo I con una saturación del 33%, el valor que le antecede es la concentración obtenida al saturar al 35% la muestra. Véase en el caso de la saturación al 50% y en el precipitado 3 donde no se obtiene proteína a una concentración mayor o igual de 500 ppm, esto indica que se obtuvo la mayor cantidad de proteína en el sobrenadante 3 por la ausencia de esta en el precipitado 3.

Se realizan pruebas de cromatografía HPLC para la cada fracción, se comparan el tiempo de retención de la figura 12.

**Figura 15.**

*Cromatograma en HPLC del sobrenadante 3*

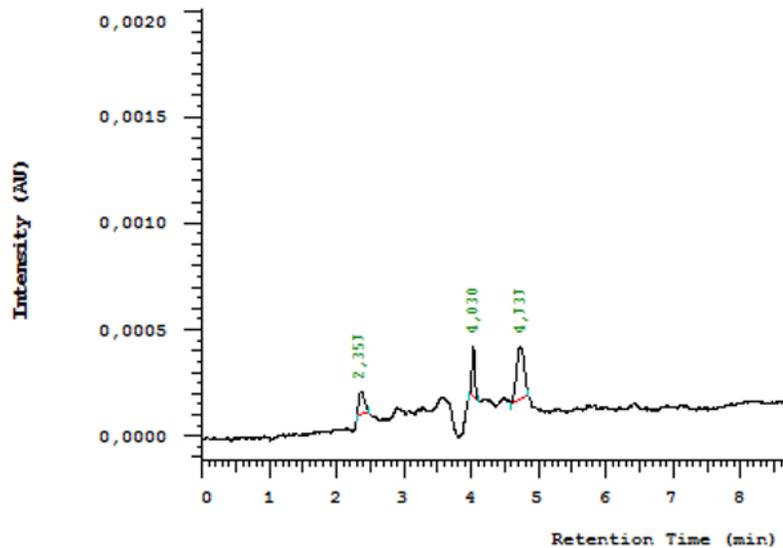


*Nota.* Se presenta el cromatograma del sobrenadante 3, resaltado por su concentración de proteína.

La siguiente prueba de cromatografía se realiza para el precipitado 3.

**Figura 16.**

*Cromatograma en HPLC para precipitado 3.*



*Nota.* Se presenta ensayo de cromatografía para el precipitado 3.

Se compara el tiempo de retención con respecto a estándares conocidos, en este caso con el tiempo de retención 2,64 minutos ilustrado en la figura 12. Con relación a esto, se evidencia la presencia de albumina por el primer pico que se presenta, a pesar de que en el precipitado 3 se obtiene una concentración menor a 500ppm, en el cromatograma se evidencia presencia de albúmina.

Al analizar estos resultados, se plantea que existe la posibilidad de que en cada precipitación también se pierda un poco de albúmina como en el caso de P3, el cual es el único precipitado que mostró albumina en los cromatogramas. Por otro lado, la fracción que obtuvo albúmina corresponde al sobrenadante 3 con relación al tamaño del pico y al tiempo de retención equivalente a 2,64 minutos. Comparando el cromatograma del SFB (figura 13) donde aparecen alrededor de 23 señales; con el del sobrenadante S3 (figura 15) donde salen 4 señales, se entiende que a pesar de que se obtiene albumina en cada fracción, esta no está completamente pura, por la presencia de los demás picos a diferentes tiempos de retención.

Para cada etapa se realiza un análisis sobre el porcentaje de recuperación, los resultados se evidencian en la tabla a continuación

**Tabla 6 .**

*Porcentaje de recuperación por fracción.*

<b>Ensayo</b>	<b>Fracción</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Masa de proteína(g)</b>	<b>% recuperación de proteína</b>
NA	SFB	100	3,070	100,00
1	Sobrenadante 1	180	0,414	13,49
	Precipitado 1	20	0,011	0,36
	Sobrenadante 2	230	0,788	25,66
	Precipitado 2	50	0,059	1,91
	Sobrenadante 3	280	1,799	58,60
	Precipitado 3	50	0,020	0,65
2	Saturación 35%	120	0,456	14,85
	Saturación 50%	50	0,020	0,65

*Nota.* Se evidencia la tabla para el porcentaje de recuperación de proteína por fracción junto al patrón de suero fetal bovino.

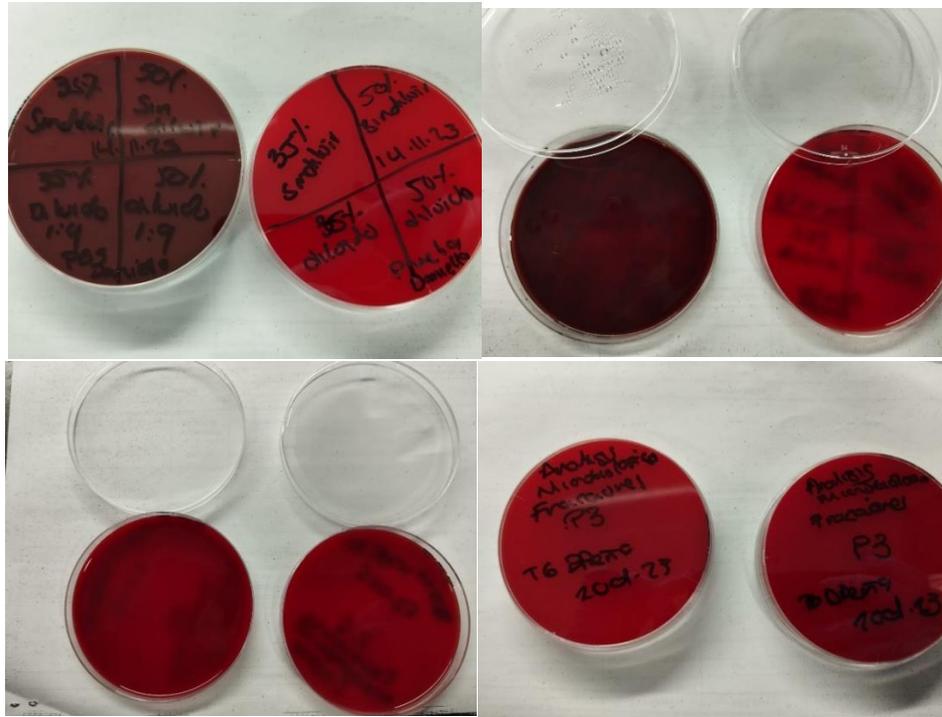
Esta tabla muestra el volumen después de cada filtración en la culminación de las precipitaciones correspondientes. Nótese que el sobrenadante 3 muestra el mayor porcentaje de recuperación en masa, con relación a la concentración de la proteína y el volumen obtenido después de centrifugar y filtrar.

### **3.3 Purificación de albumina por microfiltración**

La evaluación de esterilidad para la albumina filtrada por membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  da resultado negativo, es decir, sin presencia de microorganismos.

**Figura 17.**

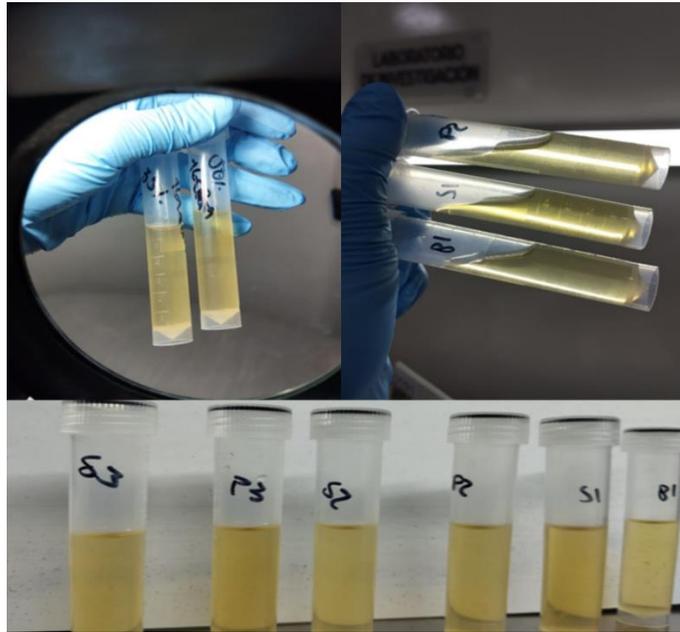
*Siembra de cada fracción dializada y micro-filtrada en agar sangre.*



**Nota.** Prueba de esterilidad en agar sangre de cada fracción.

**Figura 18.**

*Siembra de cada fracción dializada y micro-filtrada en caldo tioglicolato*



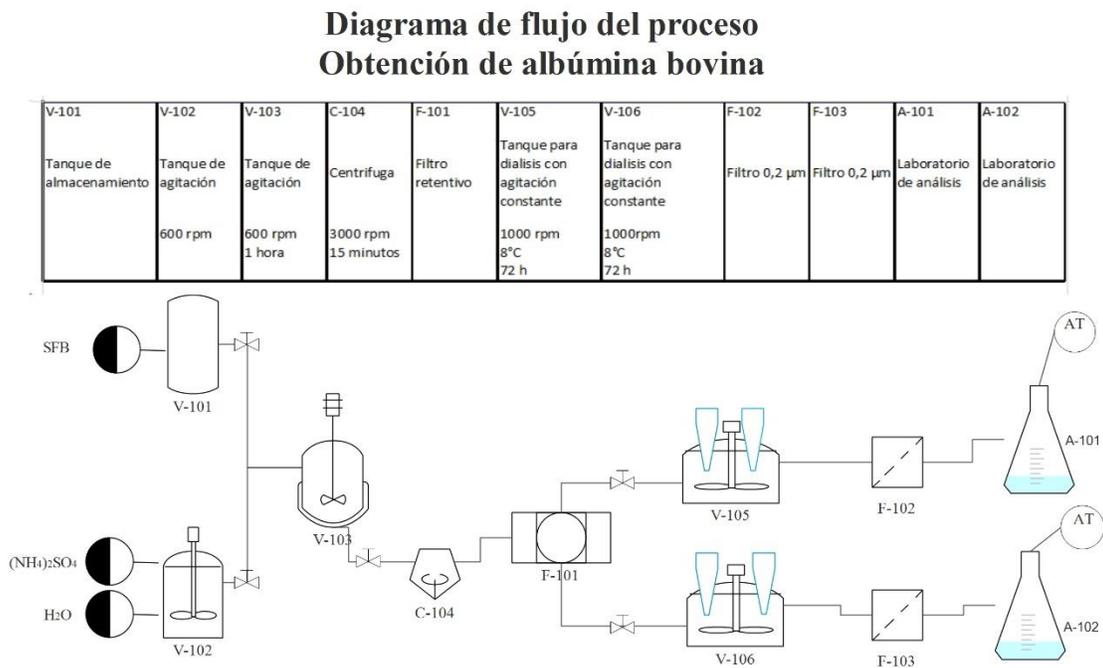
*Nota.* La figura presenta las pruebas de esterilidad en caldo tioglicolato.

De cada siembra se obtienen resultados microbiológicos negativos comparados con el control positivo de cada lote utilizado de agar sangre y de caldo tioglicolato en la ilustración 5. Esto indica que no hay contaminantes como hongos y bacterias.

En vista de los resultados obtenidos, se plantea el siguiente diagrama de proceso (PFD) sugiriendo la estandarización preliminar del precedente analizado en este documento.

**Figura 19.**

*Diagrama de flujo de proceso para obtención de albúmina bovina.*



*Nota.* Diagrama de flujo de proceso para la obtención de albúmina bovina.

#### 4. CONCLUSIONES

En el diseño de la propuesta para la obtención de albumina bovina a partir del suero fetal bovino de la marca LABG&M utilizando el método de precipitación fraccionada, se ha determinado que el rango óptimo de saturación con sulfato de amonio se encuentra entre el 30% y el 33%. Esta elección se basa en la maximización de la recuperación de proteína, en comparación con saturaciones más bajas (23.4%) y más altas (50%).

Se lleva a cabo una caracterización fisicoquímica y microbiológica del suero fetal bovino, con especial énfasis en la cuantificación de proteínas totales. Los resultados obtenidos confirman la idoneidad del suero como medio de cultivo para el enriquecimiento de cultivos celulares. En particular, se destaca su utilidad como precursor en la producción de albúmina.

La albumina purificada, sometida a un filtrado a través de una membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ , ha superado las pruebas de esterilidad, asegurando la integridad microbiológica del producto final. La concentración resultante es de 6425 ppm sometiéndola a pruebas en cromatografía en HPLC.

Con base en los resultados obtenidos, se analiza la posibilidad de que durante cada proceso de precipitación se pueda perder una cantidad apreciable de albúmina. Se evidencia en el caso específico de la fracción P3, la cual se destaca como el único precipitado que exhibió la presencia de albúmina en los cromatogramas resultantes.

Por otro lado, se observó que la fracción que efectivamente contenía más albúmina correspondía al sobrenadante 3, identificado mediante el tamaño del pico y un tiempo de retención de 2,64 minutos. Sin embargo, comparando el cromatograma del suero fetal bovino (SFB), que presenta alrededor de 23 señales, con el del sobrenadante S3, que muestra solo 4 señales, se concluye que, aunque se logra obtener albúmina en cada fracción, la pureza del compuesto no es total. La presencia de otros picos en diferentes tiempos de retención sugiere la existencia de otras proteínas o impurezas en las muestras obtenidas.

Esto indica la necesidad de ajustar las condiciones experimentales para mejorar la selectividad del proceso de purificación. En consecuencia, se recomienda llevar a cabo una revisión de las condiciones de precipitación con el objetivo de optimizar la purificación de la albúmina evitando pérdidas en el precipitado, y así, obtener un producto más puro para futuras investigaciones y aplicaciones.

## REFERENCIAS

- [1] Sellers, E. M., & Koch-Weser, J. Clinical Implications Of Drug—Albumin Interaction. In V. M. Rosenoer, M. Oratz, & M. A. Rothschild (Eds.), *Albumin: Structure, Function And Uses* (Pp. 159–182). Pergamon. (1977). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-019603-9.50014-4>
- [2] Madronero-Palacios, S; Guzman-Hernandez, T. Desarrollo sostenible. Aplicabilidad y sus tendencias. *Tecnología en Marcha*, Cartago , v. 31, n. 3, p. 122-130, Sept. 2018 . Available from <http://dx.doi.org/10.18845/tm.v31i3.3907>
- [3] Preciado-Gutiérrez, Francisco Javier, Masuoka-Ito, David, Barrera-Bernal, José Luis, Martín del Campo-Téllez, Bryan Ivan, Esparza-Villalpando, Vicente, & Ramírez-Orozco, Ricardo Ernesto. Characterization of fetal bovine serum obtained from the meat industry for cell culture. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 14(2), 277-292. (2023) <https://doi.org/10.22319/rmcp.v14i2.6277>
- [4] Microgen Ltda. Ficha técnica e inserto de Suero Fetal Bovino marca LABG&M (2023)
- [5] Lazo Delgado, L., Gassmann, J., & Masuelli, M. *Bovine serum albumin. Properties and applications*. (2020).
- [6] Novák, P., & Havlíček, V. 4 - Protein Extraction and Precipitation. In P. Ciborowski & J. Silberring (Eds.), *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)* (Second Edition, pp. 51–62). Elsevier. . (2016) <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00004-5>
- [7] Righetti, P. G., & Boschetti, E. Chapter 8 - Detailed Methodologies and Protocols. In P. G. Righetti & E. Boschetti (Eds.), *Low-Abundance Proteome Discovery* (pp. 263–319). Elsevier. (2013). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-401734-4.00008-7>
- [8] Vargas Arroyo, M. “Implementación de un método para la purificación de albúmina a partir de plasma equino” Instituto Tecnológico De Costa Rica (2006).
- [9] Burgess RR. Protein precipitation techniques. *Methods Enzymol*. 2009;463:331–342.
- [10] Bull HB, Breese K. Protein solubility and the lyotropic series of ions. *Arch Biochem Biophys*. 1980;202:116–120.

- [11] Ladewig, P. Precipitation of Protein Fractions in Solutions Particularly Poor in Proteins. *Nature*, 144(3636), 76. <https://doi.org/10.1038/144076c0>
- [12] Robards, K., & Ryan, D. Chapter 5 - High performance liquid chromatography: Instrumentation and techniques. In K. Robards & D. Ryan (Eds.), *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods (Second Edition)* (pp. 247–282). Academic Press. (2022). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822096-2.00009-8>
- [13]Rotkāja, O., Goluško, J. Mekss, P. (2016). Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Analysis of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\alpha$ -Lactalbumin in Different Types of Milk. <https://doi.org/10.1515/msac-2016-0007>
- [14]Mayolo-Deloisa, K.; Martinez, L.M. Y Rito-Palomares, M.. Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Rev. Mex. Ing. Quím* [online]. 2012 [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S166527382012000300006&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S166527382012000300006&lng=es&nrm=iso) . ISSN 1665-2738.
- [15]ISIA. International Serum Industry Association. Certificate of Analysis (CofA) Vol. 16. ISIA website 2017. <https://www.serumindustry.org/standardization/certificate-ofanalysis-cofa>
- [16]Sotelo. D Guía para practica de laboratorios y talleres “Cromatografía en análisis de metabolitos”. Fundación Universidad de América. (2023)

## **ANEXOS**

## ANEXO 1.

### TABLAS

Punto de la curva	Concentración final (ppm)	Absorbancia
1	500	0,038
2	1000	0,048
3	2000	0,072
4	5000	0,128
5	8000	0,17

Ejes de la curva de calibración de albúmina.

## ANEXO 2.

### RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un diseño de experimentos variando la temperatura y el pH con el uso de soluciones tampón o buffer acetato, siendo este el fraccionamiento por termo-coagulación. Para esto se plantea la siguiente tabla basada en diferentes documentos.

		pH		
		4.0	5.0	7.0
Temperatura °C	65			
	16			
	8			
	-5			

De modo que esta tabla sugiere como número de réplicas:3; y la variable de respuesta será la concentración de albúmina y/o proteínas totales.