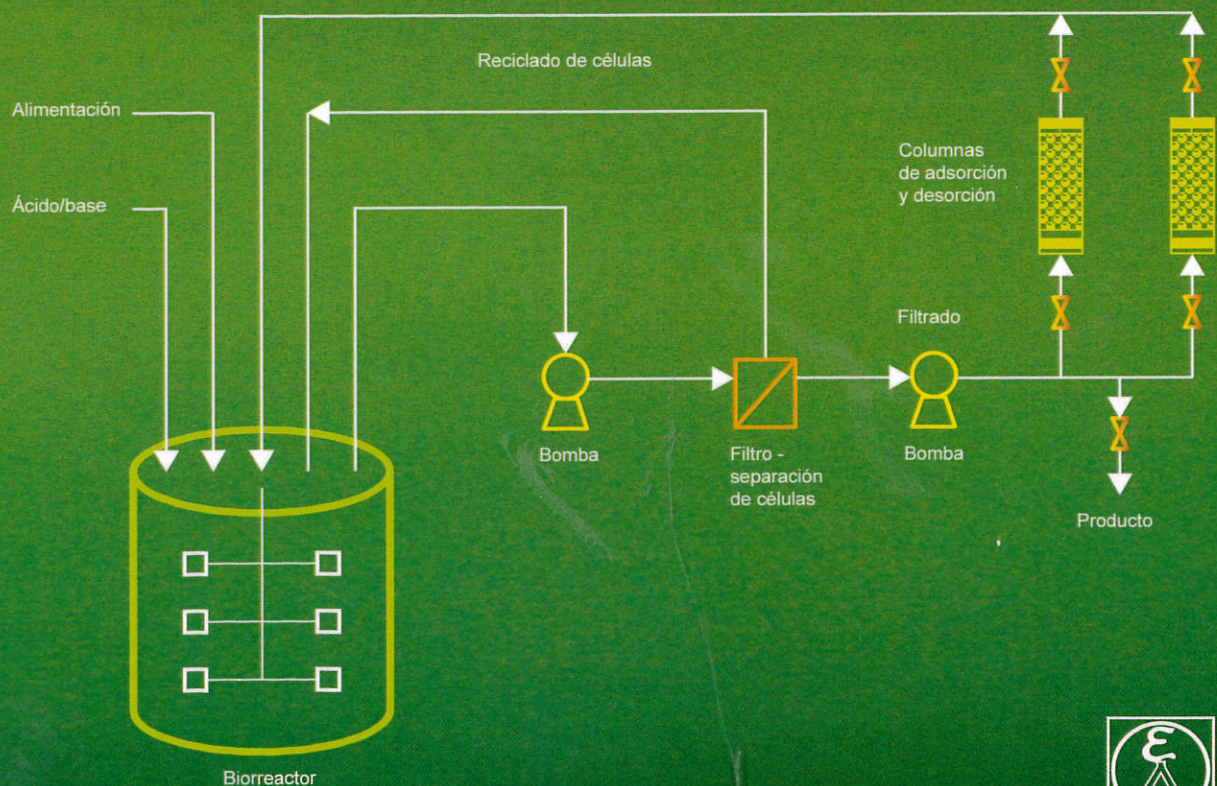


ADALBERTO PESSOA JR.
BEATRIZ VAHAN KILIKIAN
Coordinadores

BIBIANA NERLI
LUCIANA PELLEGRINI MALPIEDI
LUCIANA LARIO
Traductoras

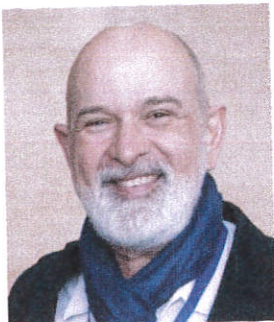
PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS

Operaciones y procesos
con aplicaciones industriales



Editorial ACRIBIA, S.A.





ADALBERTO PESSOA JR. Profesor de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de São Paulo (FCF-USP) de la asignatura Biotecnología Farmacéutica desde 1998. Ingeniero en Alimentos, Universidad Federal de Viçosa (UFV, 1984); Máster en Tecnología Bioquímica-Farmacéutica, USP (1991); Doctor en Tecnología Bioquímica-Farmacéutica, USP (1995) con doctorado-sandwich en Alemania (*Gesellschaft für Biotechnologische Forschung* - GBF). Postdoctorado del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT, 2000), EE.UU. En 2001 fue ascendido a profesor titular y en 2007, a catedrático. Es profesor del doctorado en Ingeniería Química-Civil-Medioambiental de la *Università degli Studi di Genova* (Italia) desde 2006. Se desempeñó como vicedirector de la FCF/USP (2014 a 2018); coordinador del Programa de Posgrado en Tecnología Bioquímica-Farmacéutica (2006 a 2014); presidente de la Sociedad Brasileña de

Microbiología (SBM, 2009 a 2013) y vicepresidente de la Asociación Latinoamericana de Microbiología (ALAM, 2010-2014). Desde 2006, es editor asociado de la Revista Brasileña de Microbiología, de la que también fue redactor jefe (2008 a 2014). Es profesor visitante del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología Aplicada de la Universidad de La Frontera, Chile, desde 2011; profesor visitante sénior extranjero del *King's College London*, Inglaterra (2020); coordinador del convenio de doble doctorado con el *Institute of Pharmaceutical Sciences, King's College London*, desde 2017. Tiene 11 patentes registradas, más de 300 artículos publicados, más de 7.000 citas y un índice ISI H de 40. Ha formado a 23 másteres, 32 doctorados y supervisado 29 becas posdoctorales.



BEATRIZ VAHAN KILIKIAN Licenciada en Ingeniería Química, Máster y Doctora en Procesos Bioquímicos, Escuela Politécnica de la Universidad de São Paulo (EPUSP). Se desempeñó en la mencionada institución como profesora de la asignatura Ingeniería Química desde 1983 a 2012, habiendo orientado a decenas de estudiantes de iniciación científica. Fue coordinadora del Programa de Posgrado en Ingeniería Química de la EPUSP y del Programa Interunidades de Posgrado en Biotecnología de la USP, para el que dictó un curso de posgrado sobre Separación y Purificación de Moléculas Microbianas ha formado decenas de estudiantes de posgrado, máster y doctorado. Ha publicado docenas de artículos completos en revistas y un libro, además de ocho capítulos en libros. Su investigación en procesos bioquímicos se centra en los siguientes temas: procesos de cultivo en medios sólidos en biorreactor - ampliación del proceso; procesos de cultivo microbiano

en medios sumergidos; purificación de productos microbianos; biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados. Sus proyectos de investigación fueron financiados por la Fundación de Apoyo a la Investigación del Estado de São Paulo (Fapesp), la Financiadora de Estudios y Proyectos (Finep), el Banco Nacional de Desarrollo Económico y Social (BNDES), las empresas Vale, Braskem y el Grupo Ultra.

PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS

Operaciones y procesos
con aplicaciones industriales

Coordinadores:

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.
Profa. Dra. Beatriz Vahan Kilikian

Traducción a cargo de:

Profa. Dra. Bibiana Nerli
Profa. Dra. Luciana Pellegrini Malpiedi
Profa. Dra. Luciana Lario



Editorial Acribia, S.A.
ZARAGOZA (España)

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.2 TIPOS DE BIOMOLÉCULAS Y CÉLULAS.....	3
1.3 CARACTERIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS Y PUREZA.....	6
1.4 DISEÑO DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN.....	7
1.5 COSTO DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN.....	12
1.6 TENDENCIAS EN PROCESOS DE PURIFICACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.....	13
1.7 ORGANIZACIÓN DE LOS CAPÍTULOS.....	14
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
2. PROCESO DE PURIFICACIÓN: MÉTODOS ANALÍTICOS Y ESTABILIDAD DE ENZIMAS 17	
2.1 INTRODUCCIÓN.....	19
2.2 MÉTODOS DE DOSAJE DE PROTEÍNAS.....	20
2.3 APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA EN EL ANÁLISIS DE BIOMOLÉCULAS.....	21
2.4 MÉTODOS INDIRECTOS DE DOSAJE DE PROTEÍNAS.....	21
2.5 MÉTODOS DE DOSAJE DE ANTIBIÓTICOS Y POLICÉTIDOS.....	22
2.6 CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN COLUMNA MONOLÍTICA.....	24
2.7 MÉTODOS DE DOSAJE Y ELIMINACIÓN DE ENDOTOXINAS.....	25
2.8 ELECTROFORESIS.....	26
2.8.1 Electroforesis en zona capilar (EC).....	28
2.8.2 Electroforesis capilar en gel.....	28
2.8.3 Electro cromatografía micelar.....	28
2.9 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (η) Y EL FACTOR DE PURIFICACIÓN (FP).....	28
2.10 CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.....	29
2.10.1 Determinación de la masa molar de proteínas.....	30
2.10.2 Determinación de la solubilidad e hidrofobicidad de proteínas.....	31
2.10.3 Determinación de la movilidad electroforética de proteínas.....	31
2.10.4 Determinación de la estructura química de biomoléculas.....	32
2.10.4.1 Cromatografía de adsorción por hidrofobicidad en fase reversa (RP-HPLC).....	32
2.10.4.2 Electroforesis capilar.....	32
2.10.4.3 Espectrometría de masas (MS).....	32
2.11 ESTABILIDAD DE ENZIMAS.....	33
2.11.1 Desnaturalización de proteínas.....	33
2.11.2 Interacción de una proteína con el solvente: interacción preferencial.....	35
2.11.3 Estabilización termodinámica de macromoléculas con solutos.....	36
2.11.4 Estabilización cinética.....	37
2.11.5 Aditivos estabilizantes de proteínas.....	39
2.11.6 Otras posibilidades para aumentar la estabilidad de una enzima.....	40
2.12 CONSIDERACIONES FINALES.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

3. RUPTURA CELULAR	43
3.1 INTRODUCCIÓN.....	45
3.2 FACTORES QUE AFECTAN A LA RUPTURA CELULAR.....	45
3.2.1 Tipo, tamaño de la célula a romper y condiciones de cultivo.....	46
3.2.2 Medios de cultivo y estado fisiológico.....	48
3.2.3 Tensiones de cizallamiento.....	48
3.2.4 Temperatura.....	48
3.2.5 Tiempo operacional, costo energético y de inversión.....	49
3.3 RUPTURA MECÁNICA.....	49
3.3.1 Ultrasonido.....	49
3.3.2 Homogeneizador a alta presión.....	51
3.3.3 Prensa francesa – extrusión por presión.....	53
3.3.4 Molinos de bolas.....	54
3.3.4.1 Tipo de cámara de ruptura.....	56
3.3.4.2 Velocidad de agitación y tipo de agitador.....	56
3.3.4.3 Bolas o esferas.....	56
3.3.4.4 Concentración y velocidad de alimentación de la suspensión de células.....	56
3.3.4.5 Temperatura.....	57
3.4 CURVA DE RUPTURA CELULAR.....	58
3.5 RUPTURA FÍSICA O NO MECÁNICA.....	59
3.5.1 Choque osmótico.....	59
3.5.2 Congelamiento/descongelamiento.....	60
3.5.3 Termólisis.....	61
3.6 RUPTURA QUÍMICA.....	61
3.6.1 Alcalis.....	61
3.6.2 Detergentes.....	62
3.6.3 Solventes.....	63
3.7 RUPTURA CON ENZIMAS.....	64
3.8 PRESERVACIÓN DEL BIOPRODUCTO DURANTE LA OPERACIÓN DE RUPTURA CELULAR.....	65
EJERCICIOS.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
4. FILTRACIÓN Y CENTRIFUGACIÓN	71
4.1 INTRODUCCIÓN.....	73
4.1 FILTRACIÓN.....	73
4.2.1 Fundamentos.....	73
4.2.2 Auxiliares filtrantes.....	78
4.2.3 Filtros.....	80
4.3 CENTRIFUGACIÓN.....	82
4.3.1 Fundamentos.....	83
4.3.2 Centrífugas.....	85
4.3.3 Ampliación de escala.....	90
4.3.4 Auxiliares de centrifugación.....	92
4.3.5 Aplicación de la centrifugación al proceso de fermentación alcohólica.....	93
4.4 CONSIDERACIONES FINALES.....	93
4.4.1 Nuevas estrategias para la clarificación de suspensiones celulares.....	94
4.4.2 Observaciones para ensayos en escala de laboratorio.....	94

EJERCICIOS.....	95
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
5. PROCESOS DE SEPARACIÓN POR MEMBRANAS	101
5.1 INTRODUCCIÓN.....	103
5.2 PROCESOS DE SEPARACIÓN POR MEMBRANAS.....	103
5.2.1 Morfología de membranas, fuerza motriz y transporte.....	104
5.2.2 Filtración de flujo tangencial <i>versus</i> convencional.....	107
5.2.3 Flujo permeado y selectividad.....	109
5.2.4 Geometría de las membranas y tipos de módulos.....	111
5.2.5 Modos operacionales en sistemas con membranas.....	113
5.2.6 El mercado de los procesos de separación con membranas.....	114
5.3 PROCESOS CUYA FUERZA MOTRIZ ES LA DIFERENCIA DE PRESIÓN.....	115
5.3.1 Microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa.....	115
5.3.1.1 Microfiltración.....	116
5.3.1.2 Ultrafiltración.....	117
5.3.1.3 Nanofiltración.....	117
5.3.1.4 Ósmosis inversa.....	117
5.3.2 Diafiltración.....	119
5.3.3 Flujo permeado (Modelo de las resistencias).....	120
5.3.4 Polarización de concentración e incrustaciones (<i>fouling</i>).....	122
5.3.5 Flujo permeado (Modelo osmótico).....	126
5.3.6 Limpieza de la membrana.....	128
5.4 PROCESOS CUYA FUERZA MOTRIZ ES LA DIFERENCIA DE CONCENTRACIÓN.....	129
5.4.1 Pervaporación y permeación de gases.....	129
5.4.2 Permeación de gases.....	129
5.4.3 Pervaporación.....	130
5.4.4 Contactores con membranas.....	132
5.5 PROCESO CUYA FUERZA MOTRIZ ES LA DIFERENCIA DE POTENCIAL ELÉCTRICO.....	133
5.6 EJEMPLOS DE PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS UTILIZANDO PROCESOS DE SEPARACIÓN CON MEMBRANAS.....	134
5.6.1 Separación de ácidos orgánicos a partir de medios de cultivo.....	134
5.6.2 Membranas en la industria cervecera.....	136
5.6.3 Purificación y concentración de proteínas recombinantes por ultrafiltración.....	138
5.6.3.1 Diafiltración del medio de cultivo.....	139
5.6.3.2 Purificación y concentración de la proteína de interés.....	140
5.6.4 Producción y purificación de biocombustibles.....	140
5.6.4.1 Etanol.....	141
5.6.4.2 Biodiésel y derivados.....	142
5.6.4.3 Biogás.....	143
EJERCICIOS.....	144
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146
6. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS	149
6.1 INTRODUCCIÓN.....	151
6.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PROTEÍNAS.....	151
6.2.1 Composición de las proteínas.....	151
6.2.2 Cadenas laterales de los aminoácidos.....	152

6.2.3	Estructura de las proteínas	152
6.2.4	Solubilidad de proteínas	153
6.2.5	Desnaturalización de proteínas	155
6.2.6	Conformación de proteínas	155
6.3	PRECIPITACIÓN	155
6.3.1	Precipitación con sales	156
6.3.2	Precipitación con solventes orgánicos	158
6.3.2.1	Mecanismo de la precipitación con solventes orgánicos	159
6.3.2.2	Tipos de solvente	160
6.3.2.3	Variables que afectan el proceso de precipitación de proteínas por solventes	161
6.3.3	Precipitación fraccionada	162
6.3.4	Precipitación con polímeros	165
6.3.4.1	Polietilenglicol	165
6.3.4.2	Polielectrolitos	165
6.3.5	Precipitación por temperatura	166
6.3.6	Precipitación isoelectrica	166
6.3.7	Precipitación de afinidad	167
6.3.8	Precipitación por iones metálicos	167
6.3.9	Mecanismo físico de la precipitación	167
6.3.10	Crecimiento del precipitado	167
6.3.11	Ruptura del precipitado por cizallamiento	168
6.3.12	Envejecimiento del precipitado	168
6.3.13	Ampliación de escala	168
	EJERCICIOS	172
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178

7. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO EN SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS 179

7.1	INTRODUCCIÓN	181
7.2	FUNDAMENTOS	181
7.2.1	Tipos de sistemas de dos fases acuosas	181
7.2.2	Curva de equilibrio	182
7.2.3	Coefficiente de reparto	184
7.2.4	Tiempo para establecer el equilibrio	185
7.2.5	Práctica de extracción	186
7.2.6	Extracciones sucesivas	186
7.2.7	Clarificado de suspensiones microbianas	187
7.2.8	Evaluación de la extracción	188
7.2.9	Reciclaje de los polímeros y sales	188
7.3	EXTRACCIONES BASADAS EN AFINIDAD	189
7.3.1	Elección de un ligando	191
7.3.2	Reciclaje de los polímeros de afinidad	191
7.3.3	Síntesis de los polímeros de afinidad	192
7.3.4	Material inicial a ser purificado	193
7.3.5	Metalo-afinidad (metales acoplados al polímero)	194
7.3.6	Afinidad por colorantes	195
7.3.7	Otros ligandos	197
7.4	EQUIPAMIENTO EMPLEADO PARA LA EXTRACCIÓN CON SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS	198
7.4.1	Equipo de extracción por etapas, operado en régimen discontinuo	198
7.4.2	Equipo de extracción por etapas, operado en régimen continuo	199

7.4.3	Equipamiento de extracción por contacto diferencial	200
7.4.4	Equipamientos centrifugos, operados en régimen continuo	200
7.5	CONSIDERACIONES FINALES	201
	EJERCICIOS	202
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	204

8. INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA..... 205

8.1	INTRODUCCIÓN	207
8.2	DESEMPEÑO DEL PROCESO CROMATOGRÁFICO	209
8.3	EQUILIBRIO Y CINÉTICA DE LA ADSORCIÓN	211
8.4	CONSIDERACIONES FINALES	216
	EJERCICIOS	218
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	222

9. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR..... 223

9.1	INTRODUCCIÓN	225
9.1.1	Instrumental	227
9.1.2	Selección de la fase estacionaria	227
9.1.3	Curvas de selectividad y rangos de separación de las matrices de exclusión molecular	231
9.2	VOLUMEN, COMPOSICIÓN Y APLICACIÓN DE LA MUESTRA EN LA COLUMNA	233
9.2.1	Ampliación de escala de columnas de exclusión molecular	236
9.3	SELECCIÓN DEL ELUYENTE	236
9.4	APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	237
9.4.1	Desalinización	237
9.4.2	Fraccionamiento de mezclas de proteínas	238
9.4.3	Determinación de masas molares	238
9.4.4	Determinación del tamaño de poros	239
9.4.5	Formación de agregados moleculares	239
9.4.6	Separaciones empleando principios mixtos	240
9.4.7	Problemas comunes y soluciones sugeridas	240
9.5	TENDENCIAS EN LA CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	241
	EJERCICIOS	242
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	244

10. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO..... 247

10.1	INTRODUCCIÓN	249
10.2	TEORÍA DEL INTERCAMBIO IÓNICO	249
10.3	SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE PURIFICACIÓN POR INTERCAMBIO IÓNICO	251
10.3.1	Selección de la matriz	251
10.3.1.1	Celulosa	252
10.3.1.2	Agarosa	252
10.3.1.3	Dextrano	253
10.3.1.4	Poliacrilamida	253
10.3.2	Selección de los grupos funcionales	253
10.3.3	Condiciones del proceso	254
10.3.3.1	Selección de la fase móvil	254
10.3.3.2	pH de adsorción y elución	255
10.3.3.3	Fuerza iónica de adsorción y elución	256

10.4	PROCEDIMIENTOS EN LAS SEPARACIONES POR INTERCAMBIO IÓNICO.....	257
10.4.1	Pre-tratamiento de la matriz	257
10.4.2	Proceso de elución.....	257
10.4.3	Regeneración y almacenamiento	258
10.5	EJEMPLO DE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	259
10.6	APLICACIÓN INDUSTRIAL.....	261
10.7	CONSIDERACIONES FINALES.....	262
	EJERCICIOS.....	262
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	262

11. CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA..... 265

11.1	INTRODUCCIÓN.....	267
11.2	FUNDAMENTOS DE LA INTERACCIÓN HIDROFÓBICA.....	267
11.3	CONDICIONES DE OPERACIÓN	269
11.4	FACTORES QUE AFECTAN A LA CIH	270
11.4.1	Tipo de ligando	270
11.4.2	Grado de sustitución.....	272
11.4.3	Tipo de matriz.....	273
11.4.4	Tipo y concentración de sal.....	274
11.4.5	Efecto del pH.....	276
11.4.6	Efecto de la temperatura	277
11.4.7	Aditivos.....	278
11.5	APLICACIONES.....	278
11.5.1	Aplicaciones industriales	278
	EJERCICIOS.....	282
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	296

12. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD..... 299

12.1	FUNDAMENTOS.....	301
12.1.1	Selección del soporte o matriz	303
12.1.2	Selección del ligando	306
12.1.3	Preparación de fase estacionaria selectiva.....	306
12.2	ELUCIÓN	310
12.3	CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A METALES INMOVILIZADOS (IMAC).....	311
12.4	CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD	313
12.5	INTERACCIÓN ANTÍGENO-ANTÍGENO	314
12.6	ESTRATEGIAS DE ELUCIÓN.....	314
12.7	INMUNOADSORBENTE	317
12.8	SOPORTES DE INMUNOAFINIDAD	317
12.9	MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DEL ANTICUERPO	317
12.10	EJEMPLO PRÁCTICO DE APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	320
12.11	CONSIDERACIONES FINALES	324
	EJERCICIOS.....	325
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	326

13. CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN COLUMNA MONOLÍTICA..... 329

13.1	INTRODUCCIÓN.....	331
13.2	COLUMNA MONOLÍTICA.....	331
13.3	TIPOS DE MATRIZ.....	332

13.3.1	Flujo axial.....	333
13.3.2	Flujo radial.....	334
13.4	APLICACIONES	335
13.4.1	Virus.....	335
13.4.2	ADN plasmídico.....	335
13.4.3	Tecnología analítica de proceso (PAT).....	337
13.5	APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA.....	339
	EJERCICIOS.....	340
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	342

14. CROMATOGRAFÍA: ADSORCIÓN EN LECHO EXPANDIDO (ALE) 343

14.1	INTRODUCCIÓN	345
14.2	FUNDAMENTOS DE LA ADSORCIÓN EN ALE.....	345
14.2.1	Caracterización del lecho expandido	346
14.2.2	Grado de expansión del lecho	346
14.2.3	Distribución del tiempo de residencia (DTR).....	349
14.2.4	Características del medio con la molécula blanco	350
14.2.5	Etapas en la operación ALE.....	351
14.2.6	Reactores para ALE	352
14.2.7	Metodología experimental.....	353
14.2.8	Matrices y ligandos de los adsorbentes	353
14.2.9	Ampliación de escala	354
14.3	APLICACIONES DE LA ALE.....	354
	EJERCICIOS	356
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	359

15. CROMATOGRAFÍA CONTINUA EN LECHO MÓVIL SIMULADO 361

15.1	COMPARACIÓN ENTRE ASPECTOS DE LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DISCONTINUA CON LECHO MÓVIL SIMULADO (LMS).....	363
15.2	SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS CON LMS.....	365
15.2.1	Lecho móvil verdadero (LMV).....	366
15.2.2	Lecho móvil simulado (LMS).....	367
15.2.2.1	<i>Modelaje simplificado para LMS.....</i>	367
15.2.2.2	<i>Resultados obtenidos con la simulación del modelo presentado para la separación de alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina.....</i>	374
15.2.2.3	<i>Cálculo simplificado de la cantidad de adsorbente en la columna para el caso de curva de ruptura (breakthrough) vertical.....</i>	375
15.3	SEPARACIÓN DE MOLÉCULAS QUIRALES CON LMS	377
15.3.1	Separación del anestésico cetamina con LMS	378
15.4	SEPARACIÓN DE AZÚCARES CON LMS	382
15.4.1	La técnica de los volúmenes de separación	382
15.4.2	Datos de separación de fructosa-glucosa en LMS	384
15.5	CONSIDERACIONES FINALES	389
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	389

16. CROMATOGRAFÍA: AMPLIACIÓN DE ESCALA 391

16.1	INTRODUCCIÓN	393
16.2	FLUJO DE ELUYENTE POR LA COLUMNA	395

16.3 SISTEMA DE ALIMENTACIÓN DE ELUYENTE	395
16.4 EMPAQUETAMIENTO DE LA COLUMNA.....	396
16.5 COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS EMPLEADAS A GRAN ESCALA.....	398
16.6 EJEMPLO DE CÁLCULO DE AMPLIACIÓN DE ESCALA EN CROMATOGRAFÍA.....	399
16.7 CONSIDERACIONES FINALES.....	401
EJERCICIOS.....	401
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	403

17. CRISTALIZACIÓN..... 405

17.1 INTRODUCCIÓN.....	407
17.2 SOBRESATURACIÓN.....	408
17.3 MECANISMOS Y CINÉTICA DE CRISTALIZACIÓN.....	411
17.3.1 Nucleación.....	411
17.3.2 Nucleación primaria.....	412
17.3.3 Nucleación secundaria.....	414
17.3.4 Tiempo de inducción.....	415
17.3.5 Crecimiento de cristales.....	415
17.3.6 Interacciones entre crecimiento y nucleación.....	416
17.3.7 Efectos de aditivos e impurezas.....	416
17.3.8 Inclusiones en cristales.....	416
17.3.9 Aglomeración de cristales.....	417
17.4 TRANSFORMACIONES DE FASES Y POLIMORFISMO.....	417
17.4.1 Polimorfismo y pseudopolimorfismo.....	417
17.4.2 Estabilidad de polimorfos.....	418
17.4.3 Estructura y transiciones de fase.....	419
17.4.4 Cinética de transformaciones polimórficas.....	419
17.4.5 Importancia del polimorfismo para biomoléculas.....	420
17.5 SISTEMAS INDUSTRIALES DE CRISTALIZACIÓN.....	420
17.5.1 Cristalización por enfriamiento.....	421
17.5.2 Cristalización por evaporación.....	422
17.5.3 Precipitación.....	422
17.5.4 Cristalización de mezclas fundidas (<i>melt</i>).....	423
17.5.5 Otros métodos de cristalización.....	425
17.6 GUÍA PARA PROYECTO DE SISTEMAS INDUSTRIALES DE CRISTALIZACIÓN.....	426
17.7 CRISTALIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS.....	427
EJERCICIO.....	430
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	431

18. DESTILACIÓN..... 433

18.1 INTRODUCCIÓN.....	436
18.2 NOCIONES DE EQUILIBRIO DE FASES.....	436
18.3 COEFICIENTES DE FUGACIDAD Y DE ACTIVIDAD.....	437
18.4 MODELOS SIMPLIFICADOS DEL EQUILIBRIO LÍQUIDO-VAPOR.....	438
18.4.1 Ley de Raoult.....	439
18.4.2 Ley de Henry.....	439
18.5 CONSTRUCCIÓN DE DIAGRAMAS DE FASES T, X E Y A PRESIÓN CONSTANTE.....	440
18.6 DESTILACIÓN AZEOTRÓPICA HETEROGÉNEA.....	443
18.7 CONSTANTE DE EQUILIBRIO.....	444
18.8 VOLATILIDAD RELATIVA.....	445

18.9 DESTILACIÓN EN LOTE.....	446
18.10 ETAPA DE EQUILIBRIO EN TAMBOR DE FLASH.....	449
18.11 ECUACIONES DE LA SEPARACIÓN FLASH.....	450
18.11.1 Mezclas binarias ideales.....	450
18.12 MEZCLAS DE MULTICOMPONENTES IDEALES.....	451
18.13 GUÍA DE CÁLCULO.....	452
18.13.1 Presión y temperatura especificadas.....	452
18.13.2 Presión y entalpía de los productos especificadas.....	453
18.14 DISPOSITIVOS DE CONTACTO LÍQUIDO-VAPOR.....	453
18.14.1 Tipos de dispositivos.....	454
18.14.1.1 Columnas con platos.....	454
18.14.1.2 Platos con burbujeadores.....	455
18.14.1.3 Platos perforados.....	455
18.14.1.4 Platos valvulados.....	455
18.14.1.5 Columnas de relleno.....	456
18.14.1.6 Columnas de destilación.....	456
18.15 MEZCLAS BINARIAS.....	456
18.15.1 Etapa de equilibrio.....	456
18.15.2 Secciones de rectificación y de agotamiento.....	457
18.16 DESTILACIÓN DE MEZCLAS DE MULTICOMPONENTES.....	467
18.17 COMPONENTES-LLAVE.....	467
18.18 ESTIMACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS COMPONENTES EN LOS PRODUCTOS SEPARADOS.....	468
18.18.1 Verificación de la distribución.....	468
18.19 MÉTODOS APROXIMADOS (<i>SHORTCUT</i>) PARA EL CÁLCULO DEL NÚMERO DE ETAPAS IDEALES.....	469
18.19.1 Método de Fenske-Underwood-Gilliland.....	469
EJERCICIOS.....	473
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	474

19. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS..... 475

19.1 INTRODUCCIÓN.....	477
19.2 PROPIEDADES MOLECULARES, ESPECIFICACIONES Y CONTROL DE CALIDAD.....	478
19.3 AISLAMIENTO PRIMARIO.....	480
19.3.1 Separación de células.....	480
19.3.2 Rompimiento/Ruptura celular.....	481
19.3.2.1 Lisis alcalina.....	481
19.3.2.2 Lisis térmica.....	483
19.3.2.3 Lisis mecánica.....	484
19.4 PURIFICACIÓN DE BAJA RESOLUCIÓN.....	484
19.4.1 Filtración tangencial.....	485
19.4.2 Precipitación.....	485
19.4.3 Sistemas de dos fases acuosas.....	486
19.4.4 Adsorción.....	486
19.5 PURIFICACIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN.....	488
19.5.1 Cromatografía.....	488
19.5.1.1 Cromatografía de intercambio aniónico.....	488
19.5.1.2 Cromatografía de interacción hidrofóbica.....	489
19.5.1.3 Cromatografía de afinidad.....	490

19.5.1.4 Cromatografía de exclusión	490
19.5.2 Cambio de tampón, concentración y esterilización	491
19.5.2.1 Ultrafiltración	491
19.5.2.2 Precipitación con alcohol	491
19.5.2.3 Filtración estéril	491
19.6 SÍNTESIS DE PROCESOS DE PURIFICACIÓN	492
19.6.1 Proceso I	492
19.6.2 Proceso II	493
19.6.3 Proceso III	494
19.6.4 Proceso IV	494
EJERCICIOS	494
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	495
20. PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	497
20.1 INTRODUCCIÓN	499
20.2 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LOS ANTICUERPOS	499
20.3 TECNOLOGÍAS DE PURIFICACIÓN	501
20.3.1 Perspectiva histórica	501
20.3.2 Proceso de purificación convencional	501
20.3.3 Cromatografía de afinidad por PROTEÍNA A	505
20.4 OPERACIONES ALTERNATIVAS PARA PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	507
20.4.1 Alternativas cromatográficas	507
20.4.2 Cromatografía multimodal	509
20.4.3 Cromatografía de interacción hidrofóbica	511
20.4.4 Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados	511
20.5 ESTRATEGIAS NO CROMATOGRÁFICAS	512
20.5.1 Extracción líquido-líquido en sistemas acuosos bifásicos	512
20.5.2 Separaciones magnéticas	513
EJERCICIOS	514
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	516
21. FUNDAMENTOS PARA PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO	519
21.1 PÉPTIDOS	521
21.1.1 Definición, estructura general y funciones	521
21.1.2 Importancia académica y práctica	521
21.1.3 Producción y purificación	522
21.2 EJEMPLOS DE PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO	525
21.2.1 Aspartamo	525
21.2.2 Oxitocina	526
21.2.3 Insulina	527
21.3 ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS	529
21.3.1 Electroforesis capilar	529
21.3.2 Espectrometría de masas	530
21.3.3 Hidrólisis total seguida de análisis de aminoácidos del hidrolizado	533
21.3.3.1 Hidrólisis total de la secuencia de aminoácidos	533
21.3.3.2 Separación y detección de los aminoácidos con derivatizaciones pre o pos-columna)	534

21.3.3.3 Separación y detección de los aminoácidos sin derivatización	535
21.3.4 Secuenciación vía degradación de Edman	535
21.3.5 Secuenciación vía espectrometría de masas	537
21.3.6 Comentarios adicionales	537
EJERCICIOS	537
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	538

22. INTEGRACIÓN DE ETAPAS EN LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS.. 541

22.1 INTRODUCCIÓN	543
22.2 ALTERNATIVAS DE INTEGRACIÓN	545
22.2.1 Modificaciones en la estructura de la molécula blanco	545
22.2.2 Selección de huéspedes para la síntesis de moléculas de interés	546
22.2.3 Integración del cultivo microbiano a la purificación	548
22.3 INTEGRACIÓN DE LAS OPERACIONES DE CLARIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN	550
22.3.1 Integración de la clarificación y la adsorción en lecho expandido	550
22.4 INTEGRACIÓN DE LA CLARIFICACIÓN Y LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	551
22.5 SECUENCIA ÓPTIMA DE LAS ETAPAS DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	554
22.6 EJEMPLO DE SÍNTESIS DE PROCESOS ÓPTIMA: PURIFICACIÓN DE ALBÚMINA DE SUERO BOVINO (BSA)	555
22.7 CONSIDERACIONES FINALES	557
EJERCICIOS	558
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	560

ÍNDICE ALFABÉTICO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS