

# Floculación con quitosano: una alternativa simple y económica para el clarificado durante la producción de toxoide tetánico

Lucía Avila<sup>1</sup>, Ignacio Etchehoury<sup>2</sup>, Osvaldo Cascone<sup>1,3</sup>, Mirtha Biscoglio<sup>1,4</sup>, Matías Fingermann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", C.P.: 1281, C.A.B.A., Argentina, <sup>2</sup>Application Specialist, Sartorius Argentina S.A., C.P.: 1605, Intendente Ávalos 4251, Vicente López, Argentina, <sup>3</sup>NANOBIOTEC - Facultad de Farmacia y Bioquímica, C.P.: 1113, Junín 956, C.A.B.A., Argentina, <sup>4</sup>IQUIFIB - Facultad de Farmacia y Bioquímica, C.P.: 1113, Junín 956, C.A.B.A., Argentina  
mfingermann@anlis.gov.ar

## I. INTRODUCCIÓN:

El tétanos es una enfermedad mortal causada por la toxina tetánica, la cual es producida por el patógeno *Clostridium tetani*. El toxoide tetánico (TT) es el ingrediente farmacéutico activo (IFA) de las vacunas contra esta enfermedad (Roper, 2012). La producción de TT se realiza a partir de cultivos de *C. tetani* inactivados químicamente (formaldehído y calor). La forma detoxificada de la toxina tetánica (el TT) es recuperado del cultivo inactivado mediante operaciones unitarias de clarificado, filtrado y acondicionado para una etapa posterior de purificación (precipitación diferencial con sulfato de amonio). El clarificado de los cultivos inactivados se realiza habitualmente por microfiltración tangencial o, alternativamente, por filtración en profundidad con medios mixtos bio-compatibles. En términos de costo productivo, es crítico maximizar el rendimiento de la etapa de clarificación. Una estrategia comúnmente empleada con este fin en procesos biotecnológicos es el pre-tratamiento con agentes floculantes. Los floculantes son polielectrolitos que, al ser adicionados a una suspensión, inducen la agregación de partículas favoreciendo la separación sólido-líquido. Entre ellos, el quitosano se caracteriza por su no-toxicidad, bajo costo y bio-degradabilidad, por lo que es un excelente candidato para su uso en producción bio-farmacéutica (Jana et al., 2013). En el presente trabajo se evaluaron tres variantes de quitosano como agentes floculantes para un paso de pre-tratamiento de cultivos inactivados de *C. tetani*. A continuación, el sobrenadante proveniente de la sedimentación del material floculado se sometió a un ensayo de dimensionamiento de filtración absoluta. Los ensayos realizados tienen por fin reducir el costo de producción de uno de los IFA más empleados en la elaboración de vacunas.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS:

**Floculación:** se siguió esencialmente la metodología descrita por Ågerkvist y colaboradores (1990). Se ensayaron tres variantes de quitosano, dos de la firma Sigma Aldrich, designados LQ y MQ (nombre comercial "low viscosity" y "medium molecular weight", respectivamente) y uno de la firma Federal Laboratories Corporation, designado HQ.

**Determinaciones analíticas:** la cantidad de partículas en suspensión se estimó por absorbancia de luz de longitud de onda de 600 nm. El contenido específico de TT se determinó por Inmunodifusión Radial Simple (SRD), siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial para la Salud (O.M.S., 2013).

**Dimensionamiento de filtración:** se realizó la floculación de 800 ml de cultivo inactivado en base a los resultados a escala de laboratorio. Luego de 12 horas de sedimentación se recuperó el 80 % del volumen de sobrenadante. Los ensayos de escalado de un paso de filtración absoluta del sobrenadante, a presión constante, fueron efectuados en el Laboratorio de Aplicaciones de Sartorius Argentina, empleando filtros Sartobran P® (acetato de celulosa, 0,45+0,2 µm de tamaño de poro). Los datos experimentales fueron obtenidos mediante el software Zero-T (Sartorius Stedim Biotech)

## III. RESULTADOS:

Las tres variantes de quitosano evaluadas tuvieron un desempeño similar en los ensayos de floculación. La inducción de la floculación fue significativa para concentraciones de quitosano superiores a 0,008 mg/ml. En el rango 0,008-0,25 mg/ml la magnitud de la sedimentación permaneció aproximadamente constante. No obstante, dentro de este último rango, el sedimento fue más compacto y con menos depósito sobre las paredes para concentraciones cercanas a 0,008 mg/ml (datos no mostrados). Por su parte, no se observaron diferencias en la concentración de TT en los sobrenadantes de sedimentación para concentraciones de quitosano inferiores a los 0,25 mg/ml. Por encima de 0,25 mg/ml se observó una sedimentación de partículas menor, con un incremento paralelo en la precipitación de TT. Sobre la base de los resultados anteriores, se realizaron ensayos preliminares para la optimización y posterior dimensionamiento para un paso de filtración absoluta con sobrenadantes obtenidos por tratamiento con quitosano en el rango 0,008-0,25 mg/ml. El comportamiento dinámico observado durante el filtrado del sobrenadante de sedimentación, a presión constante, pudo ser modelado acorde a un modelo de bloqueo gradual de poros. Aplicando un ajuste lineal de las observaciones experimentales para las variables del modelo pudo estimarse un requerimiento de un área de filtración compatible con un cartucho standard de 0,6 m<sup>2</sup> de área y 0,45+0,2 µm de tamaño de poro, para una escala final de 100 l.

Figura 1: Ensayo de floculación con quitosano sobre cultivos inactivados de *C. tetani*

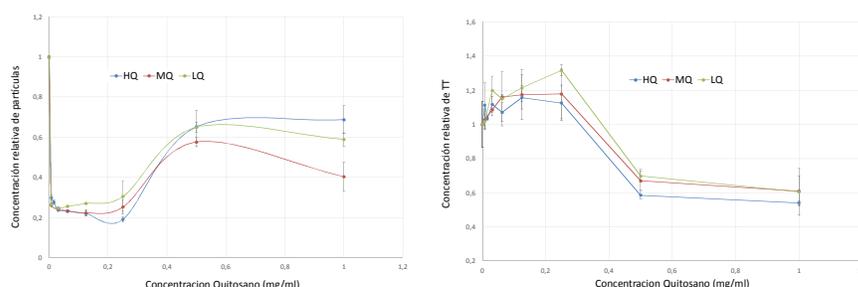


Figura 1: Se presentan los efectos de la adición de quitosano sobre la concentración de partículas en suspensión (panel izquierdo) y sobre la concentración de TT en los sobrenadantes de sedimentación (panel derecho). Las siguientes representaciones gráficas muestran los valores medios observados para cada variedad de quitosano ensayado (HQ, MQ y LQ), junto con sus errores estándares (barras verticales).

Figura 2: Modelado y dimensionamiento de filtración final de sobrenadantes de sedimentación

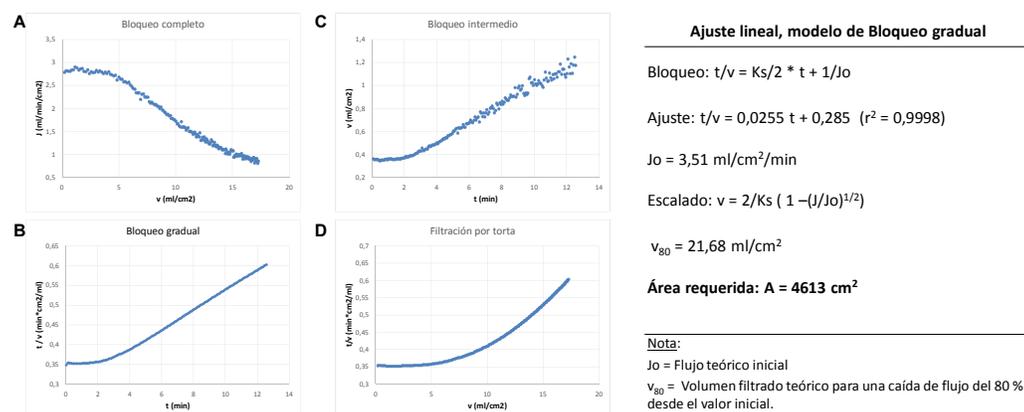


Figura 2: Se representan las observaciones realizadas en un ensayo preliminar de dimensionamiento de un paso de filtración absoluta. Los paneles A, B, C y D muestran una representación gráfica de las relaciones de variables empleadas para el modelado mediante un ajuste lineal del bloqueo de poros (modelo de Bloqueo total gradual, intermedio o de filtración por torta, respectivamente). Como se señala en el texto, el modelo seleccionado a partir de los datos experimentales ha sido el de bloqueo gradual. La tabla presentada en el panel derecho de la figura, muestra los resultados del ajuste lineal de los datos experimentales y los requerimientos calculados de área de medio filtrante, para una caída proyectada de flujo del 80%, a una escala final de 100 l de filtrado.

## IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

El tratamiento con quitosano de los cultivos inactivados de *C. tetani* permite obtener un sobrenadante apto para ser filtrado por filtros absolutos a escala industrial. De acuerdo con los resultados presentados en el presente trabajo, para una escala productiva de 100 l, se necesitarían entre 0,8 y 10,0 g de quitosano y un cartucho comercial Sartobran P® (acetato de celulosa) de 0,6 m<sup>2</sup> de área y 0,45+0,2 µm de tamaño de poro. Siguiendo la metodología actual, la realización de este paso por microfiltración tangencial demandaría aproximadamente dos cassettes de 0,6 m<sup>2</sup> de área y 0,2 µm de poro (Meyeroltmanns y Schmidt, 2008) o, alternativamente, tres cápsulas de filtración en profundidad de 0,11 m<sup>2</sup> de área de filtración cada una y un cartucho de filtración de 0,2 µm de tamaño de poro (Sartorius, 2008).

Los resultados alcanzados, realizados a escala de laboratorio, son promisorios, tanto para su empleo como paso de pre-tratamiento para el clarificado de cultivos como para facilitar un paso de filtración absoluta. Se están llevando adelante ensayos para su evaluación a una escala productiva piloto. Además, se estudiará en paralelo su potencial aplicación industrial considerando aspectos regulatorios referentes a toxicidad y seguridad en la producción de un IFA vacunal.