



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Curso 2017/2018

Modificación química de sistemas poliméricos para dosificación de fármacos mediante hidrogeles

Autor: Tamara Duarte Dos Reis

Tutor/es: Francisco Javier Arias Vallejo, Purificación Cuadrado Curto

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar este espacio para agradecer a todas esas personas que de alguna manera han hecho posible que consiguiera realizar este trabajo.

En primer lugar, agradecer a mis tutores Javier Arias Vallejo y Purificación Cuadrado Curto por hacerme partícipe de este proyecto. Agradecerles su dedicación, su paciencia para resolver todas mis preguntas y la ayuda prestada en cualquier momento.

También me gustaría agradecer a todo el grupo de BIOFORGE porque cada uno ha aportado su granito de arena que ha sido fundamental en este trabajo.

Gracias a mi compañera Marta por acompañarme en este trabajo y estos últimos años, has sido fundamental y gracias por estar en los momentos de estudio, en nuestras esperas de notas, en los momentos risa y también en los de agobio.

Gracias a Elisa, Irene, Jimena y Ana por estar desde el primer año de carrera dándome momentos de alegría, de apoyo, de escucha, en definitivas por darme una verdadera amistad y de la que os estaré eternamente agradecida, sin vosotras este camino no habría sido lo mismo.

Gracias a los que en estos años de mi carrera estuvieron y me brindaron su apoyo, aunque se fueran, porque también me aportaron.

También me gustaría agradecer a mis hermanos por su ayuda, sus ánimos y el cariño que me han dado. Y finalmente agradecer a mis padres por animarme siempre a seguir estudiando, el cariño y el apoyo que me han dado y su lucha para que lo consiguiera.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. La elastina	4
2.1.1. Polimeros tipo elastina (ELP).....	5
2.1.2. Recombinámeros tipo elastina (ELRs)	5
2.1.3. Transición inversa con la temperatura (ITT).....	7
2.1.4. Factores que producen cambios en la Tt	8
2.2. Enfermedad del glaucoma.....	10
2.3. Hidrogeles	12
2.4. Reacción tipo Click.....	13
3. OBJETIVO	18
4. MATERIALES	19
4.1. Reactivos y disolventes.....	19
4.2. Medios de cultivo	19
4.3. Equipamiento instrumental para técnicas y métodos.....	20
4.4. Polímero VKVx24	20
5. MÉTODOS	22
5.1. Procedimiento experimental para la producción del ELR (VKVx24).....	22
5.1.1. Siembra de la bacteria	22
5.1.2. Selección de la colonia.	23
5.1.4. Producción de la bacteria.....	24
5.1.5. Purificación.....	25
5.2. Procedimiento experimental para la modificación del ELR (VKVx24).....	28
5.2.1. Síntesis del biopolímero VKVx24 - Azida	29
5.2.2. Síntesis del biopolímero VKV- ciclo.	30
5.3. Preparación de hidrogeles mediante la química click.....	31

5.4. Ensayos de liberación de fármaco acetazolamida de los hidrogeles obtenidos.	31
6. TÉCNICAS	33
6.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry) ...	33
6.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)	34
6.3. Electroforesis SDS-PAGE	34
6.4. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)	36
6.5. Reología	37
6.6. Espectroscopía de absorción UV-VIS	39
7. RESULTADOS Y DISCURSIÓN.....	40
7.1. Procedimiento experimental para la producción del ELR (VKVx24).....	40
7.2. Caracterización del polímero puro VKVx24	48
7.2.1. Análisis electroforético del VKVx24	48
7.2.2. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).....	49
7.2.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	50
7.2.4. Resonancia magnética nuclear (RMN)	51
7.3. Modificación del polímero puro con grupos azida y octino	54
7.3.1. Caracterización del polímero VKV-N3.....	55
7.3.3. Caracterización del polímero VKV-CICLO.....	58
7.4. Preparación de hidrogeles mediante “Reacción Click”	61
7.3. Ensayos de liberación de fármaco acetazolamida de los hidrogeles obtenidos a través de química “click”	67
8. CONCLUSIONES.....	71
9. BIBLIOGRAFÍA.....	72

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Fig 2.1. Estructura del polímero por encima y por debajo de la temperatura de transición.....	7
Fig 2.2. Dependencia de la Tt con la composición y contenido de distintos aminoácidos.....	8
Fig 2.3. Interacción del grupo carboxilo con las estructuras de agua que rodean los restos apolares. A) pH alto. B) pH bajo.....	10
Fig 2.4. Ciclo catalítico de Na ⁺ en el interior ocular.	11
Fig 2.5. Interacción entre la acetazolamida y anhidrasa carbónica.	12
Fig 2.6. Imagen macroscópica de hidrogeles. Detalle de su microestructura.	13
Fig 2.7. Química click: Reacciones de formación de enlaces carbono- heteroátomo altamente favorables energéticamente.	14
Fig 2.8. Cicloadición 1,3 dipolar de azida y alquino.	15
Fig 2.9. Esquema de la reacción de cicloadición [3+2] azida-alquino catalizada por cobre.....	16
Fig 2.10. Esquema de la reacción de cicloadición [3+2] SPAAC.....	17

MÉTODOS

Fig 5.1. Placa Petri con cultivo el cultivo de la bacteria. Los puntos marcados son las colonias que se han seleccionada para analizar.	22
Fig. 5.2. Curva de crecimiento.	25
Fig. 5.3. Reacción de modificación del ELR con azida.	29

Fig. 5.4.	Reacción de modificación del ELR con ciclooctino.	30
Fig. 5.5.	Vial con un hidrogel cargado de fármaco en medio PBS.	32

TÉCNICAS

Fig 6.1.	Espectro típico de DSC detallado con el comportamiento que presentaría un ejemplo de polímero por encima y por debajo de la temperatura de transición.....	34
Fig 6.2.	A la izquierda, cámara de electroforesis. A la derecha, gel de electroforesis después del proceso.....	35
Fig.6.3.	Fórmula de la tangente de perdida.	38
Fig. 6.4.	Reómetro con plato termostatado y tornillo para generar la deformación del gel.....	38
Fig. 6.5.	Espectrofotometro de microvolumen UV-Vis NanoDrop 2000c.....	39

RESULTADOS

Fig 7.1.	Representación de un gel de electroforesis que se divide en 9 calles, las 8 primeras pertenecen a las colonias seleccionadas y la última, clasificada como P, pertenece al patrón de proteínas (Unstained Protein Molecular weight market) indicadas en el lateral derecho con sus respectivos pesos moleculares.	41
Fig 7.2.	Gel de electroforesis dividida en 5 calles, las tres primeras corresponden a las muestras a las 12h, 12h y 30min y 13 h después de la inoculación, la siguiente al control y la última calle al patrón de proteínas.....	44
Fig. 7.3.	Esquema de purificación mediante la etapa de ciclo de transición inversa..	45

Fig. 7.4.	Gel de electroforesis dividida en 13 calles en las que se pincharon las muestras correspondientes a la etapa de purificación.....	46
Fig.7.5.	Polímero VKVx24 puro obtenido en el proceso de producción en las instalaciones del grupo BIOFORGE tras la etapa de liofilización.....	47
Fig. 7.6.	Gel de electroforesis con dos calles, una que contiene el polímero puro (M) y otra que contiene el patrón de proteínas (P).....	48
Fig.7.7.	Esquema de la reacción click entre los polímeros VKV-N3 y VKV-ciclo para formar un polímero entrecruzado y por tanto el correspondiente hidrogel.....	61
Fig. 7.8.	Medida de hidrogeles a distinta temperatura. La de la izquierda representa un hidrogel a 4°C y la de la derecha un mismo hidrogel a 37°C.....	63

INDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 2.1.	Escala de hidrofobicidad de los aminoácidos (X) basada en la Tt de polímeros tipo elastina con la forma poli(VPGXG). Los datos se han obtenido por la extrapolación de $f_x=1$ en polímeros con la fórmula general poli[$f_v(\text{GVGVP})$, $f_x(\text{GXGVP})$].....	9
-------------------	---	----------

MATERIALES

Tabla 4.1.	Reactivos empleados con información de la fórmula molecular, peso y proveedor.....	19
Tabla 4.2.	Disolventes empleados con información de la fórmula molecular y proveedor.	19
Tabla 4.3.	Equipos utilizados en las técnicas y métodos con información de la casa comercial.	20
Tabla 4.4.	Secuencia del polímero VKVx24 con información del peso molecular..	20

RESULTADOS

Tabla 7.1.	Datos, a distintas horas, correspondientes al proceso de seguimiento de producción de la bacteria de temperatura, oxígeno, pH, mL de OH, absorbancias a 600nm, volumen de MQ necesario para disolver la muestra y volumen necesario para añadir cada muestra en el pocillo de electroforesis.....	43
Tabla 7.2.	Datos obtenidos de rendimiento, masa molecular a partir de SDS-PAGE y pH en disolución acuosa.....	47
Tabla 7.3.	Comparación de valores teóricos con los obtenidos del espectro de FT-IR.....	49
Tabla 7.4.	Comparación de valores teóricos con los valores experimentales en la técnica de DSC.....	51
Tabla 7.5.	Datos correspondientes a los polímeros VKV-N3 y VKV-ciclo tras la modificación.....	54
Tabla 7.6.	Comparación de valores teóricos con los obtenidos del espectro de FT-IR.....	55
Tabla 7.7.	Datos de diámetro y peso obtenidos del hidrogel con concentración 100mg/ml.....	62
Tabla 7.8.	Datos de diámetro y peso obtenidos del hidrogel con concentración 50mg/ml.....	62
Tabla 7.9.	Valores del módulo de almacenamiento y pérdida en el punto máximo, para hidrogeles de 150 y 200 μ L en concentraciones de 50 y 100mg/L a las temperaturas de 4 y 37°C.	65
Tabla 7.10.	Valores obtenidos de la tangente de pérdida y el ángulo de desfase en hidrogeles de 200 μ L a temperaturas de 4 y 37°C.....	66
Tabla 7.11.	Valores de masa liberada de los hidrogeles a 50mg/mL y 100mg/mL...	70

INDICE DE GRÁFICOS

RESULTADOS

- Gráfico 7.1.** Curva de referencia para la estimación del peso molecular del polímero mediante SDS-PAGE.....**42**
- Gráfico 7.2.** Representación gráfica de la absorbancia frente al tiempo en función al crecimiento de la bacteria en la producción.....**43**
- Gráfico 7.3.** Representación gráfica del % Transmitancia frente a números de onda en el que se encuentran señalizados las bandas correspondientes a un grupo N-H (3300 cm^{-1}) C=O (1620cm^{-1}) y CO-NH- (1500 cm^{-1}) del polímero VKVx24.....**49**
- Gráfico. 7.4.** Espectro DSC del polímero VKVx24 a pH 12.3, 1,7 y 6,8. Se representa la potencia frente al tiempo y temperatura.....**50**
- Gráfico.7.5.** Espectro de RMN del polímero puro VKVx24. Se representa la integral de las señales frente al desplazamiento.**53**
- Gráfico 7.6.** Representación gráfica del % Transmitancia frente a número de ondas del polímero puro VKV-Azida.....**55**
- Gráfico 7.7.** Espectro de RMN del polímero puro VKV-azida Se representa la integral de las señales frente al desplazamiento.**57**
- Gráfico 7.8.** Representación gráfica del % Transmitancia frente a número de ondas del polímero puro VKV-ciclo.**58**
- Gráfico 7.9.** Espectro de RMN del polímero puro VKV-ciclo. Se representa la integral de las señales frente al desplazamiento.....**60**
- Gráfico7.10.** Representación gráfica de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') frente a la frecuencia. a) a 4°C y $150\mu\text{L}$ b) a 37°C y $150\mu\text{L}$ c) a 4°C y $200\mu\text{L}$ d) a 37°C y $200\mu\text{L}$**65**
- Gráfico 7.11.** Representación de absorbancia frente a longitud de onda de la AZM**68**
- Gráfico 7.12.** Concentración de AZM en mg/mL frente a la Absorbancia a 265nm .**68**

Gráfico 7.13.	Representación de la masa liberada de AZM frente al tiempo para hidrogeles duplicados en concentración 50 mg/mL en agua ultrapura.....	69
Gráfico 7.14.	Representación de la masa liberada de AZM frente al tiempo para hidrogeles duplicados en concentración 100 mg/mL en agua ultrapura.....	69

INDICE DE ESQUEMAS

MÉTODOS

Esquema 5.1.	Proceso detallado de la etapa de purificación. Los recuadros verdes del esquema resaltan la localización de nuestro polímero y, por tanto, lo que no hay que desechar. Los cuadros verdes de la derecha destacan el estado de carga de la lisina.....	27
---------------------	---	-----------

ABREVIATURAS

AAC	Azide-Alkyne Cycloaddition
AZM	Acetazolamida
BPB	Azul de bromofenol
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CuAAC	Cicloaddición azida-alquino catalizada con cobre
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
DMSO-d6	Dimetilsulfoxido deuterado
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
eq	Equivalente
FT-IR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
ELP	Polímero tipo elastina
ELR	Recombinámero tipo elastina
ITT	Transición inversa con la temperatura
ITC	Ciclo de transición inversa
KDa	Kilo Daltons
LB	Luria Broth
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PIO	Presión intraocular
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato amónico
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecilsulfato sódico

SPAAC	Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition
T.A	Temperatura ambiente
TB	Terri Broth
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Tt	Temperatura de transición

RESUMEN

El objetivo de este trabajo se basa en el estudio de la liberación controlada del fármaco acetazolamida (AZM) previamente incorporado en hidrogeles sintetizados a partir de “Elastin Like Recombinamers” (ELR) con la finalidad de tratar la enfermedad del glaucoma.

Partiendo de una cepa BLR de *Escherichia coli* previamente modificada genéticamente y llevando a cabo un proceso de producción riguroso, se sintetizó el polipéptido VKVx24 que posteriormente se modificó mediante una reacción de sustitución nucleófila con grupos azida y octino dando lugar a los polímeros VKV-N3 y VKV-ciclo. Tras la modificación ambos polímeros se acoplaron mediante la denominada *reacción click*, tras ello se formaron los hidrogeles a los que se les incorporó el fármaco acetazolamida.

Tanto el polímero inicial como los modificados se caracterizaron con las técnicas de FT-IR, RMN (grado de modificación) y DSC, así como las propiedades mecánicas de los hidrogeles por reología.

Finalmente, se determinó la cantidad de fármaco que es capaz de liberar el hidrogel en una simulación de solución lacrimal.

ABSTRACT

The purpose of this work is based on the study of controlled release of acetazolamide (AZM) which is present in synthesized hydrogels from elastin-like recombinants (ELR) in order to treat glaucoma's disease.

From an *Escherichia coli*'s BLR strain previously genetically modified and following a rigorous production process, the VKVx24 polypeptide was synthesized and then modified by a nucleophilic substitution reaction with azide and octine groups given place to VKV-N3 and VKV-cycle. After the modification both polymers were coupled by the called the click reaction, after the hydrogels were formed to which the drug acetazolamide was incorporated.

Both the initial polymer and the modified ones were characterized with the techniques of FT-IR, RMN (degree of modification) and DSC, as well as the mechanical properties of the hydrogels were measured by rheology.

Finally, the amount of drug that is capable of releasing the hydrogel was determined in a simulation of tear solution.

1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de todo tipo de enfermedades requiere de la administración de fármacos principalmente por vía oral e intravenosa. Este tipo de administración suele conllevar al poco control de niveles necesarios y, por tanto, a efectos adversos que se deriva al paso de estos fármacos por regiones ajenas al lugar donde se produce la afección.

El estudio de la liberación controlada de estos fármacos se presenta como una alternativa de solución a la anterior situación, lo que ha generado gran atención en las últimas dos décadas y ha sido abordado con especial interés desde las ciencias de nuevos materiales y ciencias farmacéuticas. [1]

Desde el punto de vista de los materiales, la tendencia es obtener sistemas inteligentes, cargados con el principio activo del medicamento, que respondan a estímulos del ambiente y puedan liberar su carga en el lugar, el tiempo y a la velocidad deseada. Es así como en las últimas décadas los polímeros han recibido mucha atención para su aplicación en esta área. Entre los polímeros, los hidrogeles han mostrado muy buenas propiedades para ser cargados con fármaco, por ser biocompatibles y presentar propiedades de hinchamiento en medio acuoso entre otras características de interés.

Actualmente, uno de los métodos para formar estos hidrogeles es mediante los denominados “Elastin Like Recombinamers” (*ELRs*) los cuales presentan un alto potencial para muchas aplicaciones biomédicas (ingeniería de tejidos, administración de fármacos...) debido a sus propiedades. [1]

La versatilidad de los *ELRs* en nanomedicina está impulsando el interés en su utilización en un amplio espectro de disciplinas. La primera de sus aplicaciones es en el campo de la oncología, pero también se utiliza en campos tan diversos como la Genética, la oftalmología, y las enfermedades cardiovasculares. [2]

En este trabajo nos centraremos en la versatilidad de estos *ELR* en el campo oftalmológico en especial en el estudio de la enfermedad del glaucoma, en el que el objetivo es investigar la eficacia terapéutica, que conllevaría cargar el hidrogel con un fármaco para bajar la presión intraocular en el ojo afectado por el glaucoma.

Para entender un poco mejor el proceso es importante tener en cuenta qué es la elastina y qué relación tiene con los ELR, la metodología que se emplea para generar los hidrogeles y como actúa el fármaco que se va a utilizar con el ojo afectado por glaucoma.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La elastina

La elastina es una proteína de gran importancia en la función estructural del tejido conjuntivo de la piel. Es importante en la capacidad de los cuerpos de los vertebrados para soportar esfuerzos, y aparece en mayores concentraciones donde se requiere almacenar energía elástica. Por tanto, sus propiedades son las de proporcionar elasticidad, resistencia y recuperación en procesos de extensión y relajación. Estas propiedades son únicas, sin pérdida energética, duran una vida y pueden tener miles de millones de ciclos de extensión y relajación sin perder eficacia.

Se trata de un monómero con un peso molecular de 70KDa formado mayoritariamente por una cadena de aminoácidos con una región hidrofóbica (valina, prolina y glicina) y otra región hidrofílica (lisina) [3]. La secuencia presenta además zonas gobernadas por aminoácidos repetidos como VPGG, VPGVG, APGVG, y VGVAPG denominados *dominios elastoméricos* que presentan propiedades mecánicas gracias a los cuales la elastina puede sufrir grandes deformaciones sin ruptura y recuperar su conformación original y una zona gobernada por repeticiones de secuencia VPGKG denominados *dominios de entrecruzamiento*, por donde se realizan las uniones intermoleculares covalentes catalizadas enzimáticamente. [4]

En especial la α elastina da idea del mecanismo de sus propiedades elásticas, ya que cuando está en disolución acuosa, presenta la capacidad de sufrir el cambio de un estado estirado (desordenado) a un estado enrollado (ordenado) como consecuencia de un aumento en la temperatura, comportamiento que está en contra de la tendencia normal

de los sistemas físicos ya que cabe esperar un aumento del orden a temperaturas decrecientes.

Las extraordinarias propiedades de la elastina natural han provocado el desarrollo de interpretaciones de polímeros con esta proteína, dando lugar a los llamados polímeros tipo elastina (ELP).

2.1.1. Polimeros tipo elastina (ELP)

Los polímeros tipo elastina más utilizados consisten en repeticiones de la secuencia (VPGXG)_n, donde el residuo invitado “X” puede ser cualquier aminoácido excepto prolina debido a que su estructura cíclica impide la formación de horquillas β, y donde “n” representa el número de repeticiones del pentapéptido.

Estos polímeros inicialmente se sintetizaban químicamente pero actualmente se utilizan técnicas recombinantes dando lugar a los *recombinámeros tipo elastina*.

2.1.2. Recombinámeros tipo elastina (ELRs)

Actualmente el único enfoque metodológico que permite fabricar polímeros proteínicos repetitivos implica la ingeniería genética. Mediante esta tecnología es posible aislar una pieza de ADN, eventualmente un gen de interés y clonarlo en un vector que le sirva para facilitar la expresión exclusiva de la proteína codificada por el gen. Se obtiene el polímero proteico recombinante a elección [5] y con un control absoluto de su secuencia. Así, los ELP producidos biosintéticamente se les denomina *recombinámeros o ELR (“Elastin Like Recombinamers”)* [6]. Las ventajas que presentan estos con respecto a los sintetizados por vías químicas son las siguientes:

- Presentan infinitas posibilidades de diseño molecular y control absoluto de la arquitectura molecular incluyendo ausencia de polidispersidad y azar en la síntesis.
- Capaces de mostrar cualquier función o propiedad simple o compleja presente en las proteínas naturales
- Posibilidad de construirse a un coste bajo.

- Se producen a partir de fuentes renovables (no requieren de productos petrolíferos).
- Medioambientalmente limpios desde la producción a la eliminación.

La igualdad a nivel de secuencia entre la elastina y los ELR se traduce en una similitud en otra serie de propiedades, como son las mecánicas [7], la biocompatibilidad [8-11], la naturaleza termosensible y el comportamiento autoensamblable [12], siendo quizás estas dos últimas las más llamativas.

Los ELR, al igual que la elastina natural, sufren una transición inversa con la temperatura (ITT) reversible entre dos estados conformacionales en respuesta a cambios en la temperatura. La temperatura a la que se produce este cambio se denomina **Temperatura de transición (T_t)** que es característica de cada polímero y las condiciones en las que se encuentra. Así, en solución acuosa cuando:

$T^a < T_t$ A esta temperatura el polímero se encuentra con la cadena extendida, está disuelto e hidratado mediante lo que se conoce como *hidratación hidrófoba*. Esta hidratación se caracteriza por la existencia de moléculas de agua colocadas en estructuras tipo clatrato rodeando los residuos apolares del polímero.

$T^a > T_t$ Las moléculas de agua pierden la estructura tipo clatrato por la agitación térmica y la cadena polipeptídica se pliega hidrofóticamente formando una fase separada, en la que el polímero adopta una estructura conocida como espiral β , constituida básicamente por una sucesión de horquillas β . [13] La disposición en espiral hace que los grupos apolares se sitúen hacia la zona exterior, quedando en el interior un canal hidrófilo formado por los enlaces peptídicos del esqueleto de la cadena. En el interior pueden quedar retenidas, y de hecho así ocurre, una gran cantidad de moléculas de agua cuando las cadenas extendidas sufren la transición de fase a espiral β .

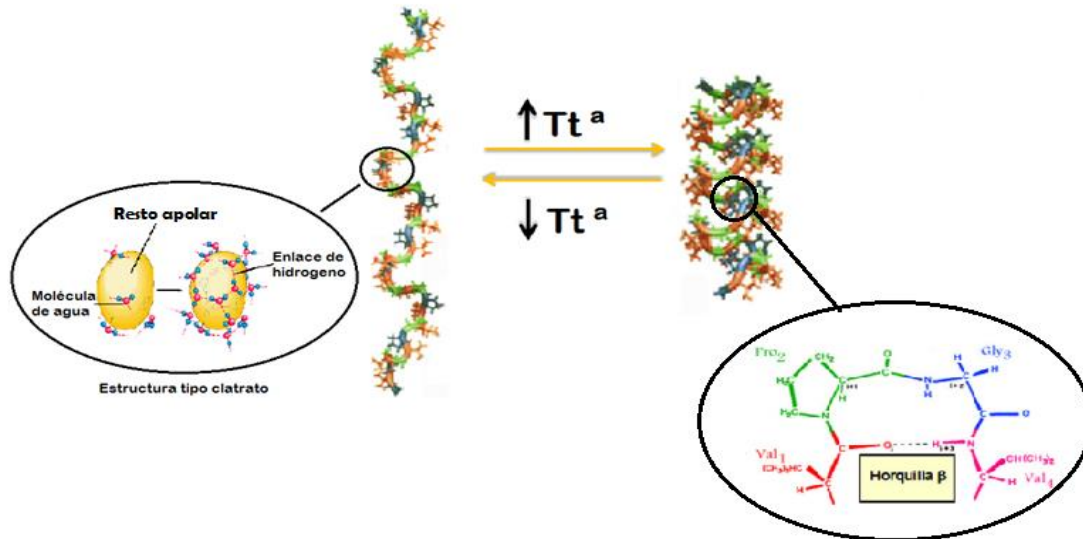


Fig 2.1. Estructura del polímero por encima y por debajo de la temperatura de transición.

2.1.3. Transición inversa con la temperatura (ITT)

Tanto la elastina natural como los ELR's presentan la transición inversa con la temperatura (ITT) con respecto a la tendencia normal de las proteínas ya que se produce un orden en la estructura por encima de la temperatura de transición. Puede parecer que contradice la segunda ley de la termodinámica, pero esto puede explicarse en función de la solubilidad en agua de estos compuestos apolares.

La solubilidad viene determinada por la energía libre de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$), de manera que para que se produzca la disolución $\Delta G_{\text{solubilidad}} < 0$. Estos polímeros serán solubles en agua por debajo de la T_t , donde los residuos hidrófobos están rodeados por agua de hidratación hidrófoba, en este momento predomina el término negativo de ΔH sobre el término $-T\Delta S$. Cuando el término $-T\Delta S$ se incrementa por encima del término negativo ΔH , debido al incremento de T , la solubilidad se pierde y el polímero se pliega.

Si se tiene en cuenta el sistema global, se puede observar que el aumento de desorden del agua es mayor que el aumento de orden de la cadena (la entropía total del sistema crece). Por tanto, este aumento de la entropía es la que provoca el plegamiento, facilitando que $\Delta G < 0$. [14]

Este comportamiento de fase tiene muchas aplicaciones posibles en la purificación, detección y activación de estos polímeros.

2.1.4. Factores que producen cambios en la Tt

Pueden ser varios los parámetros con los que se puede modificar, premeditadamente, el valor de la Tt. Podemos destacar entre ellos las modificaciones siguientes:

- Efecto de la concentración

Para concentraciones bajas del polímero, cuando dicha concentración aumenta, la temperatura de la transición disminuye [15]. Para concentraciones altas se ha observado, en experimentos de DSC, un aumento de Tt con la concentración tiene como posible explicación la competición por el agua de hidratación y la heterogeneidad de las estructuras de agua de hidratación hidrófoba [16].

- Cambios en la composición aminoacídica.

Se ha demostrado que la temperatura de transición depende de la polaridad media de la cadena, con lo que si esta polaridad puede ser modificada como respuesta a un cambio de un estímulo tendremos un cambio en la temperatura de transición.

La forma general del polipentapéptido sintetizado para acomodar los diversos aminoácidos es poli [fv(VPGVG), fx(VPGXG)]. Tal material es un copolímero al azar de los monómeros (VPGVG) y (VPGXG) donde X representa el residuo huésped, como vemos, sustituye a la segunda Val del pentapéptido original. fv y fx representan las fracciones molares de los respectivos co-monómeros ($fv+fx=1$).

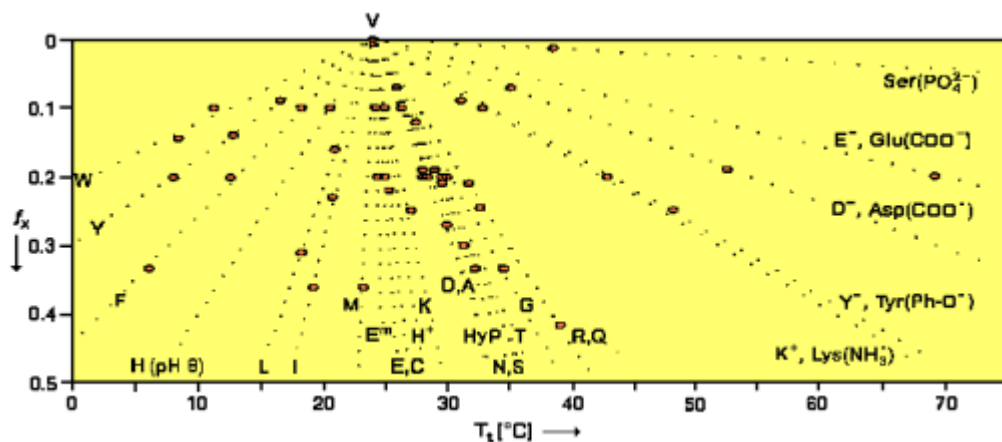


Fig 2.2. Dependencia de la Tt con la composición y contenido de distintos aminoácidos [17].

En la figura 1.2, se ve como tanto la presencia de un determinado aminoácido como el contenido de co-monómero (VPGXG) afectan al valor de la Tt [17]. La variación de Tt es lineal con el contenido del nuevo comonómero con lo que los valores de Tt para un determinado aminoácido (X) se obtienen por extrapolación $f_x=1$ (El resultado de la extrapolación de la figura 1.2 se puede ver en la tabla 1.1)

Amino acid X	T_t , [°C]
Lys(NMeN, red.) [a]	-130
Trp (W)	-90
Tyr (Y)	-55
Phe (F)	-30
His (pH 8) (H)	-10
Pro (P)	(-8)
Leu (L)	5
Ile (I)	10
Met (M)	20
Val (V)	24
Glu(COOCH ₃) (E ^m)	25
Glu(COOH) (E)	30
Cys (C)	30
His (pH 4) (H ⁺)	30
Lys(NH ₂) (K)	35
Asp(COOH) (D)	45
Ala (A)	45
HyP	50
Asn (N)	50
Ser (S)	50
Thr (T)	50
Gly (G)	55
Arg (R)	60
Gln (Q)	60
Lys(NH ₃ ⁺) (K ⁺)	120
Tyr(Ph-O ⁻) (Y ⁻)	120
Lys(NMeN, ox.) [a]	120
Asp(COO ⁻) (D ⁻)	170
Glu(COO ⁻) (E ⁻)	250
Ser(PO ₄ ²⁻)	1000

Tabla 2.1. Escala de hidrofobicidad de los aminoácidos (X) basada en la Tt de polímeros tipo elastina con la forma poli(VPGXG). Los datos se han obtenido por la extrapolación de $f_x=1$ en polímeros con la fórmula general poli[$f_v(\text{GVGVP})$, $f_x(\text{GXGVP})$] [18].

- Cambios en el grado de ionización de cadenas laterales funcionalizadas.

Un ejemplo puede ser el grupo carboxilo, mientras no está ionizado, no es capaz de romper la estructura tipo clatrato que rodea los restos apolares del polímero. Sin embargo, cuando está ionizado, rompe la estructura pentagonal del agua alrededor de los restos apolares, para construir su propia esfera de hidratación [19]. La disminución

de esta agua de hidratación hidrófoba, como se ha comentado anteriormente, hace que aumente la solubilidad y en definitiva que aumente la Tt.

Estos cambios hacen que la Tt pueda depender del pH del medio que controlan la ionización de ciertos aminoácidos.

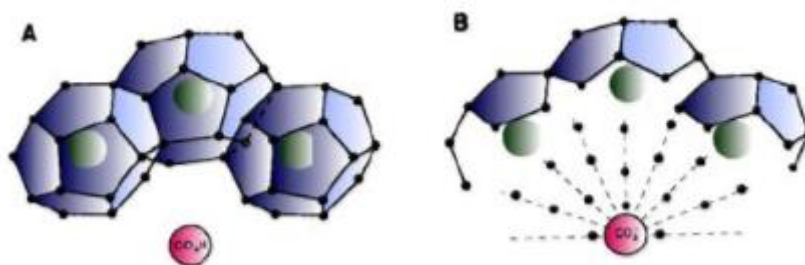


Fig 2.3. Interacción del grupo carboxilo con las estructuras de agua que rodean los restos apolares. A) pH alto. B) pH bajo [19].

Estas modificaciones servirán como explicación en los cambios en la temperatura de transición en algunas técnicas de caracterización del polímero que se está utilizando.

2.2. Enfermedad del glaucoma

El glaucoma es un problema de visión que afecta el nervio óptico, que es la parte del ojo que conduce las imágenes que vemos hacia el cerebro. El nervio óptico está formado por muchas fibras nerviosas, como un cable de electricidad que contiene muchos filamentos.

Cuando aumenta la presión intraocular (PIO) pueden dañarse algunas fibras del nervio óptico, provocando la aparición de puntos ciegos. Estos puntos borrosos habitualmente no se detectan hasta que el daño al nervio óptico es significativo. Si la destrucción del nervio óptico es completa, se produce ceguera. [20]

Por el interior del ojo circula constantemente un líquido denominado humor acuoso encargado de la nutrición de las estructuras internas del ojo. Se forma en los cuerpos ciliares (cámara posterior del ojo), circula por el cristalino y pasa a través de la pupila

hacia la cámara anterior del ojo. Posteriormente es reabsorbido por la red trabecular y se drena a través de un área llamada ángulo de drenaje. A medida que fluye nuevo humor acuoso en el ojo, debe drenarse la misma cantidad. Este proceso mantiene la presión en el ojo estable. Sin embargo, si el ángulo de drenaje no está funcionando correctamente, el fluido se acumula. La presión interior del ojo aumenta y esto daña el nervio óptico. [21]

La anhidrasa carbónica es una metaloenzima con Zn como centro activo presente en las células del cuerpo ciliar que tiene un papel importante en la formación y secreción del humor acuoso y en la regulación del pH. Se encarga de catalizar la reacción de hidratación del CO_2 para formar iones H^+ y HCO_3^- . Este último, es responsable del movimiento de iones Na^+ al ojo que, junto con agua, permite formar el humor acuoso. Fármacos como la AZM mantienen la presión intraocular baja y evitan el avance de la enfermedad inhibiendo esta metaloenzima cuando hay exceso de humor acuoso.

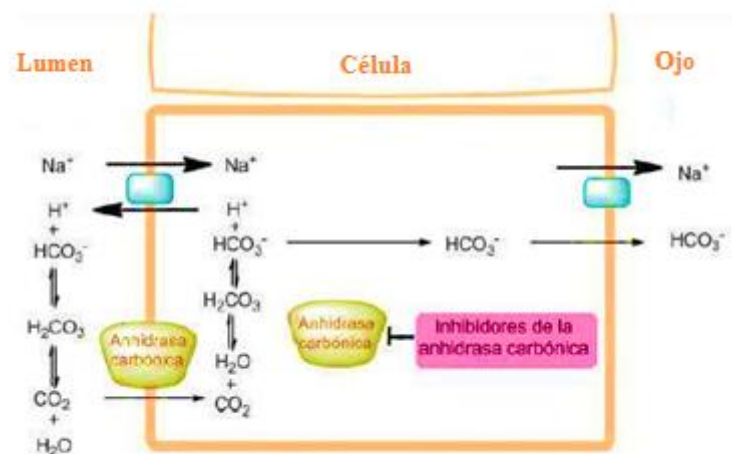


Fig 2.4. Ciclo catalítico de Na^+ en el interior ocular. [22]

La acetazolamida (AZM) actúa uniéndose al centro activo de la anhidrasa carbónica mediante fuerzas electrostáticas y puentes de hidrógeno con los aminoácidos que forman el bolsillo hidrofóbico de la enzima, bloqueando así su actividad enzimática. [23]

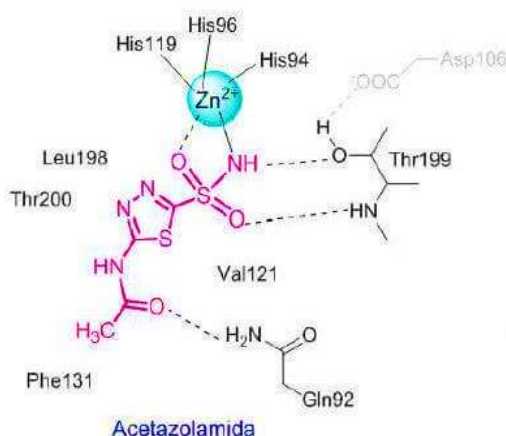


Fig 2.5. Interacción entre la acetazolamida y anhidrasa carbónica.

Actualmente la forma de administrar este fármaco es por vía oral, ya que presenta una baja solubilidad acuosa (0,7 mg/ml) y baja permeabilidad corneal ($17,4 \times 10^6$ cm/s) como para aplicarlo en gotas tradicionales. [24] Para asegurar su efecto, hoy se utilizan dosis elevadas, lo que genera efectos secundarios como diuresis, enfermedades en la sangre, decaimiento, calambres, etc. Estos efectos pueden disminuir si la administración se lleva a cabo vía tópica, colocando un film polimérico en la zona conjuntiva y dejándolo que vaya liberando AZM varios días.

Con el propósito de mejorar esta biodisponibilidad y prolongar el tiempo de residencia en la superficie ocular, se han desarrollado nuevos dispositivos tales como hidrogeles e insertos poliméricos [25-26].

2.3. Hidrogeles

Los hidrogeles están formados por cadenas poliméricas hidrófilas, que les confiere la capacidad de absorber grandes cantidades de agua, unidas por puntos de entrecruzamiento que evitan su disolución en agua, permitiendo su estabilidad en el entorno biológico.

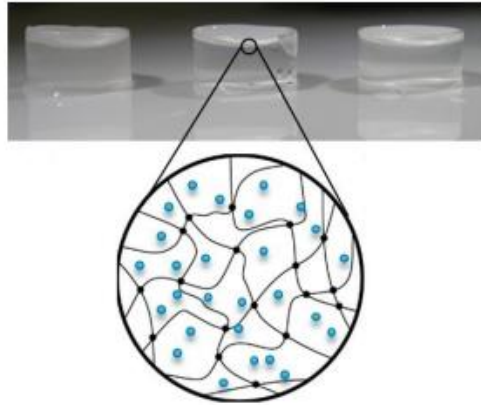


Fig 2.6. Imagen macroscópica de hidrogeles. Detalle de su microestructura

La preparación de los hidrogeles se puede realizar mediante diferentes mecanismos de entrecruzamiento que conlleven la formación de enlaces de diferente tipo (enlaces covalentes, enlaces por fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, u otras interacciones electrostáticas). En el presente trabajo se realizará por el denominado *método click*.

Entre las propiedades que hacen útiles a los hidrogeles se encuentran su capacidad de absorción, cinética de hinchamiento, su capacidad para disolver solutos, propiedades superficiales por ejemplo adhesividad, características mecánicas y propiedades ópticas. La propiedad más importante de los hidrogeles es el grado de hinchamiento que estos presentan ya que las otras propiedades están directamente influenciadas por ésta. [27]

El diseño y caracterización de un material inteligente como son estos hidrogeles (sensible a la temperatura) es útil para su utilización en medicina como sistema de liberación controlada.

2.4. Reacción tipo Click

El concepto de “química click” fue introducido en el campo del descubrimiento de fármacos, por los profesores Kolb, Finn y Sharpless en 2001 como una serie de procesos que permiten la obtención de nuevos compuestos de interés biológico a partir de reactivos altamente energéticos. Estas reacciones transcurren con rendimientos cuantitativos (o casi cuantitativos en la mayoría de los casos) y, por tanto, sólo se requieren purificaciones simples.

Existe una serie de condiciones que, por definición, toda reacción debe cumplir para que sea considerada como una reacción “click”:

- Debe ser de amplio alcance.
- Rendimiento químico muy alto.
- Generar subproductos y productos que puedan ser aislados por métodos no cromatográficos.
- Ser estereoespecífica (aunque no necesariamente enantioselectiva).
- Fácil de llevar a cabo desde el punto de vista experimental, con reactivos accesibles y disolventes fácilmente eliminables.

Existe una gama considerable de reacciones químicas que en un principio podrían reunir estos criterios, los ejemplos más destacados son:

- Reacciones de sustitución nucleófila (apertura de anillos de ciclos tensionados).
- Adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono (ej: epoxidación, dihidroxilación y adiciones de Michael).
- Cicloadiciones de especies insaturadas (ej: cicloadiciones 1,3-dipolares y reacciones Diels-Alder).
- Reacciones de adición nucleófila excluyendo las condensaciones aldólicas (ej: formación de ureas, tioureas, heterociclos aromáticos, éteres de oxima, hidrazonas y amidas). [28]

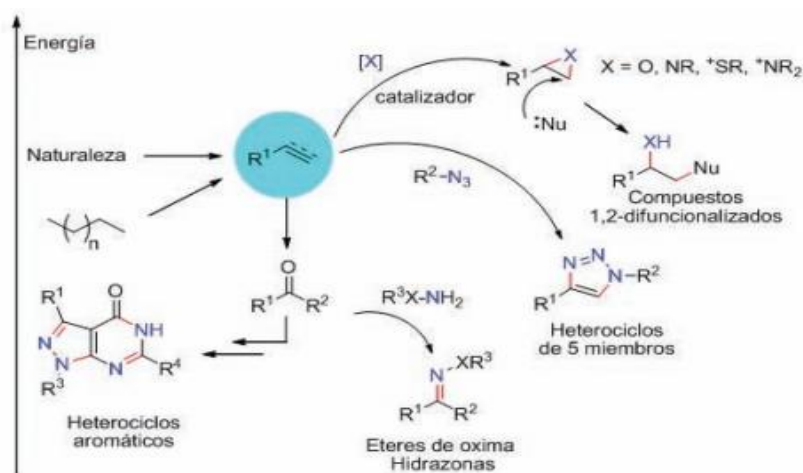


Fig. 2.7. Química click: Reacciones de formación de enlaces carbono- heteroátomo altamente favorables energéticamente.

De entre toda la colección de reacciones “click”, la reacción de cicloadición [3+2] de compuestos 1,3-dipolares de Huisgen ha sido reconocida como la más representativa en la química click. [29] La formación de los heterociclos resultantes de estas cicloadiciones suele encontrarse muy favorecida termodinámicamente, sin embargo, la elevada energía de activación de estos procesos hace que en muchas ocasiones tengan que llevarse a cabo mediante el empleo de calentamientos prolongados.

La reacción de cicloadición [3+2] azida-alquino (AAC), es una reacción que constituye la ruta más eficiente para sintetizar 1,2,3-triazoles de modo no regioselectivo.

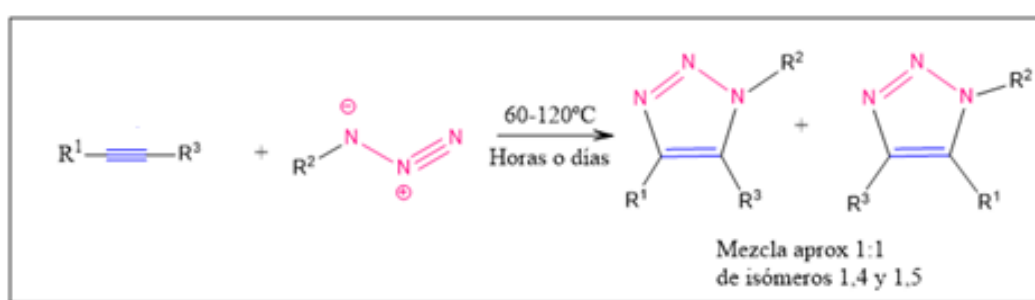


Fig 2.8. Cicloadición 1,3 dipolar de azida y alquino.

Sin embargo, en 2002 Sharpless y Meldal [30] describen la cicloadición entre azidas y alquinos catalizada por cobre (CuAAC). Descubrieron que la adición de cantidades catalíticas de una sal de cobre produce un aumento en la velocidad de reacción, que permite efectuar estas transformaciones a temperatura ambiente y en tiempos de reacción muy cortos. Esta adición se puede hacer de manera directa, mediante el uso de sales de Cu(I), o bien, mediante una reducción de sales de Cu(II) a Cu(I).

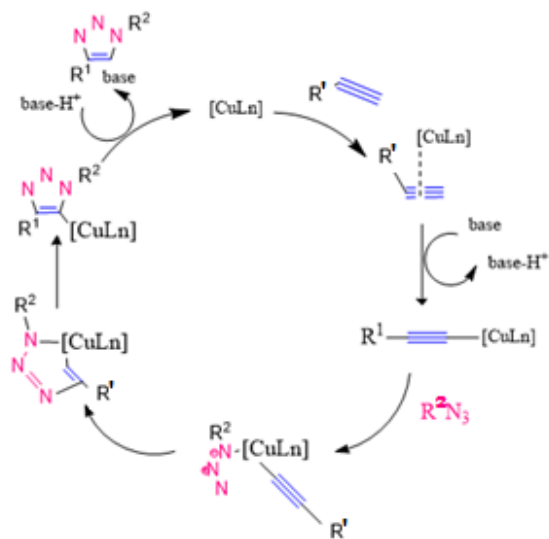
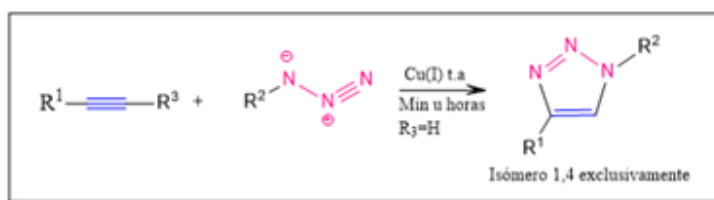


Fig. 2.9. Esquema de la reacción de cicloadición [3+2] azida-alquino catalizada por cobre.

La reacción catalizada por cobre es mucho más rápida, procediendo cuantitativamente en minutos u horas a temperatura ambiente frente a días a temperatura elevada necesarios en la térmica clásica.

Asimismo, en presencia de cobre se obtienen regioselectivamente los triazoles 1,4-disustituidos. Estas reacciones pueden llevarse a cabo también en disolventes apróticos y próticos, e incluso en agua, en un rango amplio de valores de pH. Además, la reacción es compatible con la presencia de grupos funcionales muy diversos. [30]

A pesar de la demostrada fiabilidad de la CuAAC, la presencia de cobre ha limitado el uso de esta reacción para aplicaciones en sistemas vivos por sus posibles efectos citotóxicos.

Con el objetivo de superar esta limitación, la profesora C. Bertozzi y colaboradores propuso el uso de cicloalquinos tensionados los cuales tienen mínima tensión y desaparecen como doble enlace (concretamente ciclooctinos) para disminuir la energía de activación del proceso (“strain-promoted azide-alkyne cycloaddition”, SPAAC). [31]

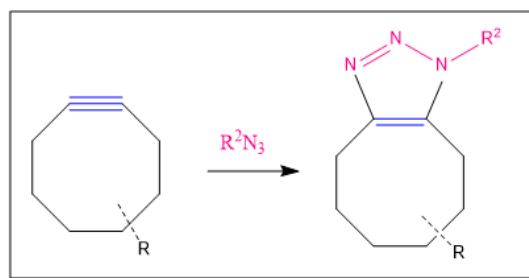


Fig 2.10. Esquema de la reacción de cicloadición [3+2] SPAAC.

Este tipo de reacción tiene la ventaja de no liberar reactivos o productos secundarios y sus componentes al no encontrarse en la naturaleza no generan reacciones secundarias.

Por lo tanto, las estrategias sintéticas que combinen un uso práctico y ventajas de la CuAAC sin la necesidad de un catalizador metálico serían de un gran valor en aplicaciones biológicas.

3. OBJETIVO

El propósito global de este trabajo es la producción de hidrogeles derivados de biopolímeros recombinantes con distinta concentración cargados de fármaco para poder estudiar la liberación del mismo con el tiempo. Estos hidrogeles mantendrán una carga superficial neta positiva gracias a las lisinas libres y a que el pH se mantiene neutro, de esta forma se podrá hacer que interaccionen fácilmente con las mucinas que tienen carga negativa. Para ello es necesario realizar el siguiente plan de estudio:

1. Bioproducir el polímero recombinámero tipo elastina VKVx24 y caracterizarlo.
2. Modificar el polipéptido VKVx24 con los grupos funcionales azida y ciclooctino para obtener VKV-azida y VKV-ciclo respectivamente y posteriormente caracterizarlos.
3. Realizar el entrecruzamiento de ambos polímeros modificados mediante la química click y una vez obtenido los hidrogeles, caracterizarlos.
4. Evaluar la masa liberada del fármaco en un medio lacrimal simulado (PBS) en función de la densidad del hidrogel.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos y disolventes

Reactivo	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Proveedor
Ácido clorhídrico	HCl	36,46	Sigma-Aldrich
Hidróxido sódico	NaOH	39,99	Panreac
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	92,09	Fisher Scientific
Dodecil sulfato sódico (SDS)	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	288,37	Apollo Scientific
TEMED	C ₆ H ₁₆ N ₂	116,21	Sigma-Aldrich
PSA	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	228,18	Sigma-Aldrich
Ampicilina	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	349,41	Panreac
Carbonato de (1R,8S,9S) biciclo [6.1.0]non-4in-9-ilmetil succinimidilo	C ₁₅ H ₁₇ NO ₅	291,30	Synaffix
Carbonato de 2-Azidoethyl (2,5-dioxopirrolidin-1-il)	C ₇ H ₈ N ₄ O ₅	228,17	GalChimia
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	121,14	Sigma-Aldrich
Acilamida	C ₃ H ₅ NO	71,08	Iberlabo
Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,156	Acros

Tabla 4.1. Reactivos empleados con información de la fórmula molecular, peso y proveedor.

Disolvente	Fórmula molecular	Proveedor
Acetona	C ₃ H ₆ O	Sigma-Aldrich
Dimetilformamida (DMF)	C ₃ H ₇ NO	Acros Organics
Dimetilsulfoxido (DMSO)	C ₂ H ₆ SO	Sigma-Aldrich
DMSO-d ₆ (deuterado)	C ₂ D ₆ SO	Sigma-Aldrich
Dietil éter	C ₄ H ₁₀ O	Scharlau

Tabla 4.2. Disolventes empleados con información de la fórmula molecular y proveedor.

4.2. Medios de cultivo

LB (Luria Broth): Medio de cultivo que se utiliza principalmente para el crecimiento de bacterias. Proveedor: Conda

TB (Terrific Broth): Medio de cultivo modificado para hacer autoinducción con el fin de bioproducir polímeros. Proveedor: Formedium

4.3. Equipamiento instrumental para técnicas y métodos

Casa comercial	Equipo (Instalaciones BIOFORGE)
Agilent Technologies	Espectrofotómetro UV-Vis Cary 50
Crison	pH meter GLP 21
Appilkon	Biorreactor P1000 (14L) (Fermentador)
Crumair	Campana 9005-FL
GEA	Disruptor Niro Soavi, Panda Plus
Beckman Coulter	Centrifuga SIGMA GK10
Thermo- Scientific	Centrifuga Sorvall legend XTR
Thermo-Scientific	Centrifuga Sorvall BP8/16
Thermo-Scientific	Centrifuga Sorvall ST16R
SP Scientific	Liofilizador VirTis
J.P. Selecta	Autoclave (esterilización del material)
Bruker	Espectrofotómetro FT-IR Tensor 27
Agilent Technologies	RMN 400 (Edificio I+D, Valladolid)
Mettler Toledo	DSC 822e
TA instruments	Reómetro AR 2000 ex
Thermo Scientific	Espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000

Tabla 4.3. Equipos utilizados en las técnicas y métodos con información de la casa comercial.

4.4. Polímero VKVx24

El recombinámero tipo elastina (ELR) que se va a producir en el presente trabajo es el denominado como VKVx24. Este biopolímero presenta una secuencia aminoacídica inicial que incide en la expresión del polipéptido (MESLLP) y otra que se repite 24 veces, [(VPGVG)₅ VPGKG] las cuales dotan las características especiales al polímero.

Secuencia	Abreviatura	MW (KDa)
MESLLP VG VPGVG [VPGKG (VPGVG) ₅] ₂₄	VKVx24	60.642

Tabla 4.4. Secuencia del polímero VKVx24 con información del peso molecular.

Cada letra de la secuencia representa un aminoácido. Estos aminoácidos se clasifican según su carácter polar o carga:

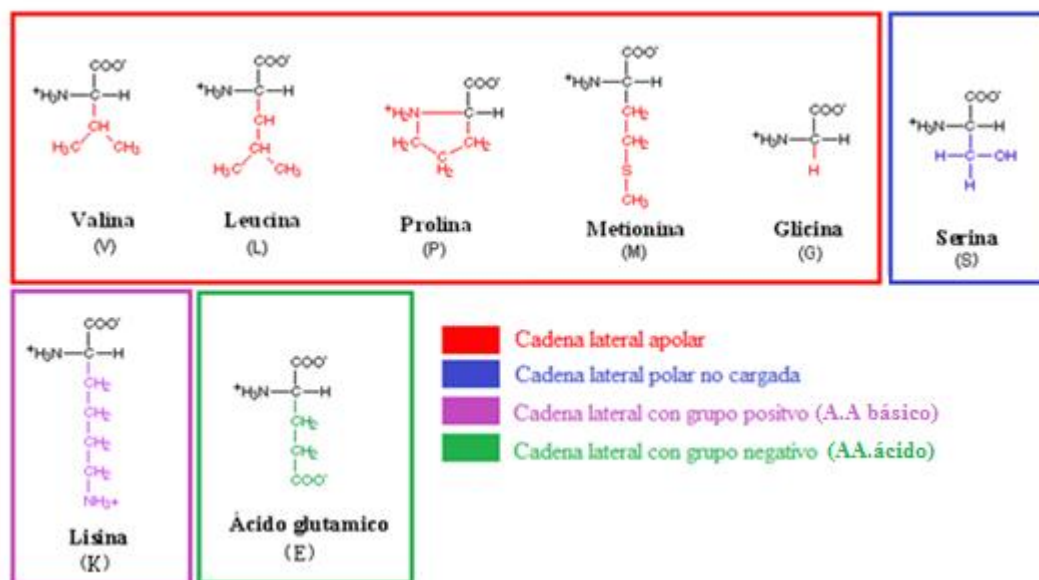


Fig. 4.1. Aminoácidos presentes en la secuencia del polímero VKVx24.

Como podemos observar, el bloque elastomérico VPGVG tiene carácter hidrofóbico que proporciona al polímero biocompatibilidad y el comportamiento inteligente termosensible mientras que el bloque de entrecruzamiento VPGKG presenta un carácter hidrofílico que tiene especial importancia puesto que en ella se encuentra el aminoácido lisina, portador de un grupo amino terminal que permite la modificación química posterior del polímero y le confiere un carácter sensible al pH del medio, además de pH básico y carga positiva en condiciones fisiológico.

5. MÉTODOS

5.1. Procedimiento experimental para la producción del ELR (VKVx24)

La síntesis del polímero se realizó mediante técnicas recombinantes en las instalaciones del grupo BIOFORGE. Para ello, se partió de una construcción génica previa donde el gen del VKVx24 se encuentra en un plásmido de expresión, introducido en una cepa BLR de *Escherichia coli*.

5.1.1. Siembra de la bacteria

La siembra de la bacteria se realiza sobre una placa LB (Luria-Bertani) agar, medio de cultivo encargado del crecimiento bacteriano, que contiene un 50µg/mL de antibiótico, que depende del plásmido usado y al que el mismo presenta resistencia (en este caso ampicilina), y 1% (w/v) de glucosa que actúa inhibidor de la expresión, siendo necesario para que se reproduzca la bacteria que contiene el plásmido.

Se realiza el cultivo de la bacteria con ayuda de un asa de siembra, en campana de flujo laminar para evitar la contaminación y se deja incubando durante 20h a 37°C.



Fig. 5.1. Placa Petri con cultivo el cultivo de la bacteria. Los puntos marcados son las colonias que se han seleccionada para analizar.

5.1.2. Selección de la colonia.

Una vez crecidas las colonias aisladas, se seleccionan bajo campana un determinado número de colonias y cada una se pinchará a un tubo tipo falcon con 5ml de medio TBm (Terrific Broth) que inducirá a la expresión, suplementado de 50µg/mL de antibiótico (ampicilina) (apartado 4.1) y se deja que se reproduzcan a 250 rpm y 37°C hasta turbidez, lo que indica crecimiento bacteriano (al tener una revolución baja, no es necesario añadir antiespumante y glicerol).

Las colonias seleccionadas se someterán a una electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) (apartado 6.3) con el fin de analizar su crecimiento celular y su capacidad de producción.

5.1.3. Cultivo del inóculo

Para cultivar células *E. coli* a altas densidades es necesario el diseño de un medio de cultivo balanceado, que contenga todos los componentes necesarios para el crecimiento celular y evite la inhibición por altas concentraciones de nutrientes. Para ello es necesario la preparación del denominado *inóculo*. Se introduce la colonia seleccionada como mayor productora en un volumen de 30mL de LB, medio que favorece el crecimiento bacteriano, con 1% (w/v) glucosa para inhibir la expresión y 50µg/mL antibiótico al que el plásmido presenta resistencia. Se coge una pequeña cantidad de muestra para controlar que no se produce contaminación en los procedimientos posteriores y a la que denominamos *control*. Así se incrementa lentamente el sustrato limitante, y con ello se evita la acumulación de nutrientes y obliga a crecer al microorganismo a una velocidad baja. Para que haya oxigenación se reparte esos 30mL de muestra en 2 erlenmeyer de 2L con 500mL de medio LB, glucosa y antibiótico. La turbidez indicará que la bacteria ha agotado los recursos de glucosa y antibiótico necesario para el crecimiento y por tanto se podrá inocular en el fermentador.

5.1.4. Producción de la bacteria

❖ Preparación del fermentador

La producción a gran escala se realiza en un fermentador. Para ello se prepara 14L de medio TBm para inducir a la expresión, con una concentración de 55,85g/L, con 8% (v/v) de glicerol y 0,1% (v/v) de antiespumante.

Después se procede a la esterilización del mismo por medio de autoclave, a continuación se le añade 50µg/ml de antibiótico (ampicilina) y finalmente se calibra el pH (neutro), la T^a (37°C), el O₂ (100%) y las revoluciones del sistema de agitación por palas (500rpm), ya que se necesita mantener el cultivo en dichas condiciones para lograr que la velocidad específica de crecimiento dependa solamente de la concentración de sustrato y de las variables de operación.

❖ Seguimiento de la producción de la bacteria

Se vierte el inóculo en el fermentador (al cambiar de medio se induce a la expresión de la bacteria) y al día siguiente en tres periodos de media hora se recoge en un tubo tipo Falcon aproximadamente 5 ml de muestra del fermentador, de esos 5 mL se recoge en 2 tubos tipo eppendorfs 1mL de la muestra. Una muestra se centrifuga para obtener el blanco. Se realiza una dilución 1:20 de ambos líquidos y se mide su absorbancia con un espectrofotómetro UV-Vis. También es necesario observar la absorbancia del inóculo y el control (dilución 1:10).

Con este método denominado turbidimetría se puede estudiar el crecimiento bacteriano a través de mediciones de densidad óptica en longitudes de onda de 600 nm, lo cual hace posible el seguimiento del crecimiento de la población bacteriana a tiempo real.

Si se representa la absorbancia por unidad de tiempo, se obtiene una curva con distintas fases de crecimiento.

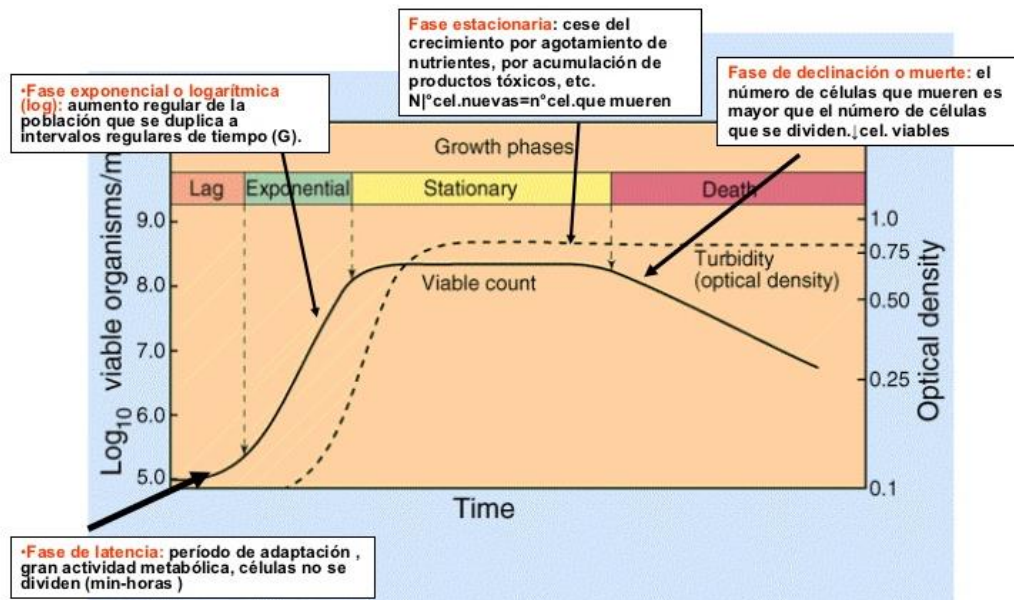


Fig. 5.2. Curva de crecimiento. [32]

La fase estacionaria marca el máximo valor de absorbancia, así cuando se realiza las tres medidas si se observa decrecimiento en la absorbancia indica que la producción ha llegado a la fase de muerte celular. En esta fase se debe para el proceso y comenzar la etapa de lavado.

La producción se puede seguir también mediante con electroforesis SDS-PAGE tras una etapa de normalización de las muestras.

5.1.5. Purificación

Después de la expresión el objetivo siguiente es aislar el polímero de los contaminantes celulares, para ello se necesita realizar varias etapas que se describen a continuación:

❖ Etapa de lavado

Se recoge la bacteria con el medio del fermentador en 8 botes, estos se compensan y se centrifugan a 4°C a 3500rpm (Sorvall BP8/16) en un intervalo de tiempo de 15 min, con el fin de separar la bacteria (pellet) del medio (sobrenadante). El pellet se despegar con ayuda de una espátula y agitando con una pequeña cantidad de tampón de lavado (Tris-base 20mM y NaCl 140mM, pH 8). A continuación, se resuspende en un volumen

mayor (2L) de dicho tampón y se centrifuga de nuevo. Este proceso se repite hasta que el sobrenadante quede transparente, reduciendo el número de botes.

Finalmente, el pellet se resuspende en un volumen de tampón de sonicación (Tris-base 20mM, EDTA 1mM y PMSF 1mM, pH 8), encargado de evitar la degradación del polímero, junto con el inhibidor de proteasas (PMSF100) que se encargará de inhibir la ruptura enzimática.

El volumen del tampón de sonicación se calcula en función de la siguiente fórmula $V = 5 \times \text{Absorbancia}_{600\text{nm}} \text{ en fase estacionaria} \times 14\text{L}$ lo que dé se verterá lo mismo de inhibidor de proteasas, pero en μL .

❖ Rotura celular

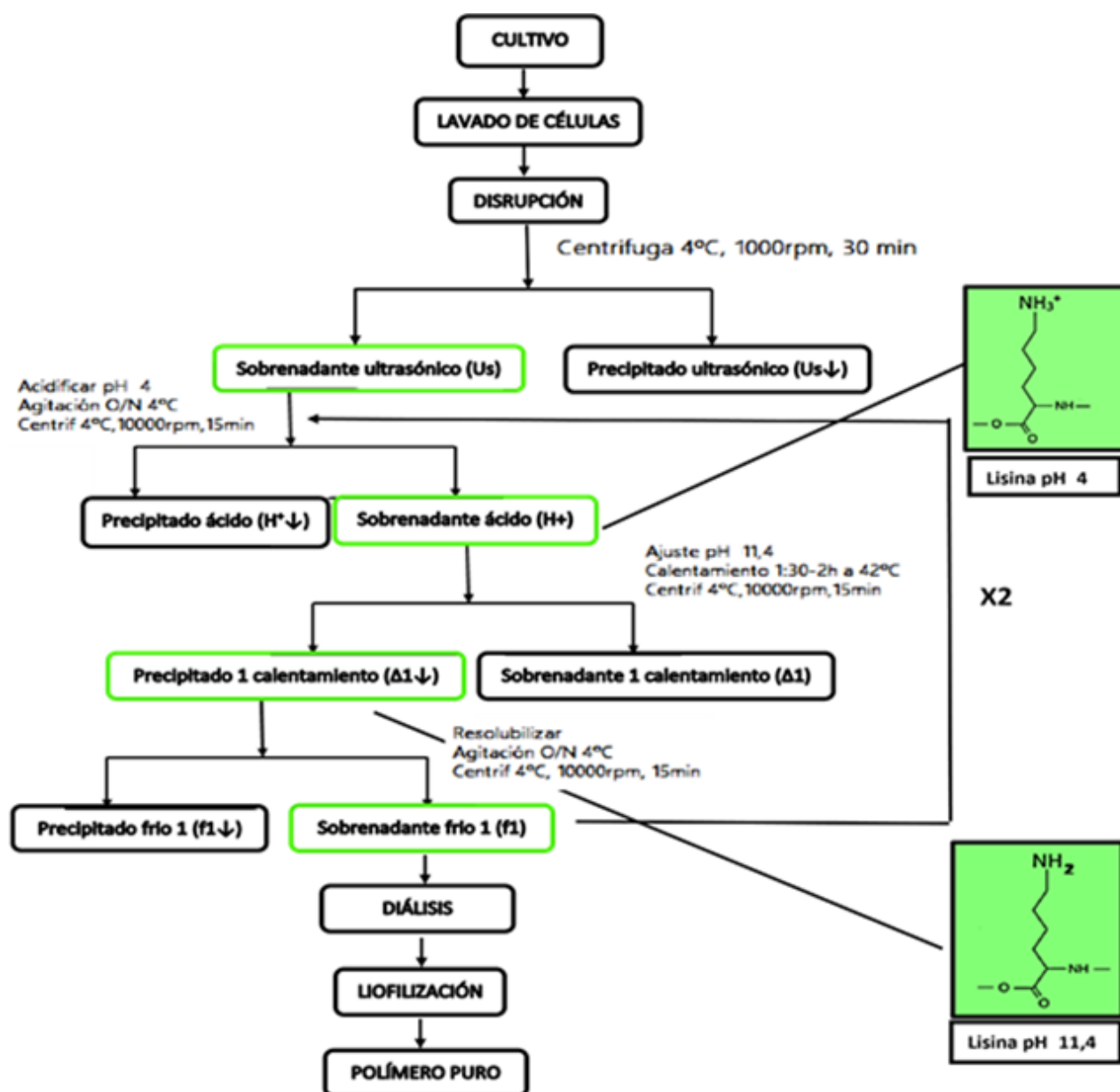
Las células obtenidas en el proceso de lavado se someten a una ruptura celular utilizando un equipo denominado *disruptor de células* que se encarga de fracturar la pared celular mediante el cambio de presión con el fin de extraer las proteínas. Este proceso se realiza a una temperatura de 4°C y con una presión aproximada de 1500 bares. Se pasa tres veces por el disruptor para garantizar la ruptura.

El producto obtenido se reparte en botes de centrifuga y se procede a su centrifugación, con el fin de eliminar los restos celulares, a 10000 rpm (Sorvall legend XTR), 4°C y con un periodo de tiempo de 1h 30min.

❖ Purificación del polímero mediante Ciclos de transición inversa ITC

Debido al comportamiento termosensible e inteligente de los ELR se ha realizado un avance científico en el campo de la purificación de estas proteínas con una nueva técnica denominada *ciclo de transición inversa (ITC)* que consta de varios pasos secuenciales y repetidos de calentamiento, centrifugación, enfriamiento y solubilización (Esquema 5.1) [33]. Esta técnica requiere un protocolo que depende de los parámetros del ELR en juego como la composición del residuo huésped, la longitud y su temperatura de transición.

El sobrenadante obtenido en la etapa anterior es el extracto crudo, y con el mismo se seguirá el proceso de purificación mediante el ciclo de transición inversa con cambios de pH y temperatura a los que será sensible el polímero posibilitando la separación de este y los contaminantes existentes.



Esquema 5.1. Proceso detallado de la etapa de purificación. Los recuadros verdes del esquema resaltan la localización de nuestro polímero y, por tanto, lo que no hay que desechar. Los cuadros verdes de la derecha destacan el estado de carga de la lisina.

Durante las fases de ITC se recoge en tubos eppendorf muestra para identificar si hay existencia de polímero. Después se preparan para pincharlos en geles de electroforesis.

❖ **Etapa de diálisis**

Realizadas las tres etapas de purificación y obtenido el tercer sobrenadante frío, se procede a la etapa de diálisis con 25L de agua ultra pura a 4°C, realizando cambios cada 24h (x3) para favorecer mediante presión osmótica la expulsión de sales que pueda contener la muestra polipeptídica.

La tripa de diálisis utilizada es una membrana de celulosa porosa que presenta un determinado peso molecular (cut-off) aproximado de 10,000KDa que garantizan la exclusión del permeado del polímero, puesto que presenta un peso molecular superior (60,642KDa)

❖ **Liofilización**

Pasada la etapa de diálisis, se congela a -20°C la muestra. Y finalmente se liofiliza, proceso que se encarga de la deshidratación de la muestra congelada reduciendo la presión circundante para permitir que el agua congelada en el material se sublime directamente desde la fase sólida a la fase gaseosa, sin pasar por el estado líquido. Este proceso se realiza en un liofilizador VirTis (apartado 4.3) y suele durar entre 3 o 4 días.

Tras esta etapa se pesa el polímero puro y posteriormente se caracteriza por las técnicas de Electroforesis, IR, DSC y RMN (apartados 6.1, 6.2, 6.3 y 6.4)

5.2. Procedimiento experimental para la modificación del ELR (VKVx24)

Una vez obtenido el polímero puro el objetivo siguiente fue modificar las lisinas presentes en la estructura del mismo mediante reacciones de sustitución con grupos los funcionales azida y octino.

5.2.1. Síntesis del biopolímero VKVx24 - Azida

Para la síntesis de los biopolímeros se siguió los siguientes protocolos [34]:

1. Una solución de carbonato de 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) (94,83 mg, 0,42 mmol, 0.6 eq, PM 228,17 mg/mmol) en DMF (1 mL) se añadió a T.A a una disolución de VKVx24 (1750 mg, 0,692 mmol_{NH₂}, 24lys, 0.6 eq, PM 60642 Da) en DMF (20 mL).
2. La mezcla se agitó a T.A. durante 48 horas. Transcurrido ese periodo de tiempo la disolución se distribuyó en 3 falcons 15 mL y se añadieron 45ml de Et₂O en cada uno obteniéndose un precipitado que se centrifugó a 15000 rpm durante 10 min (rotor Sorvall ST16R).
3. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con acetona (3x15 mL) y se secó a presión reducida. El sólido obtenido se disolvió en agua ultra-pura (20 mL) a baja temperatura (4°C) y se dializó inicialmente en agua destilada (2x25 L) y posteriormente en agua ultra-pura (1x25 L) y se liofilizó para obtener finalmente el ELR modificado (VKV-N3).

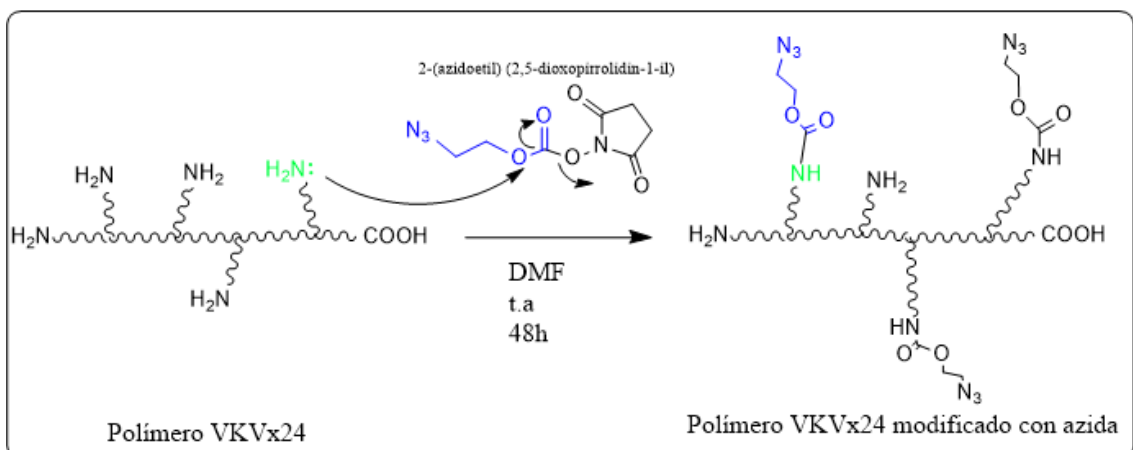


Fig. 5.3. Reacción de modificación del ELR con azida.

5.2.2. Síntesis del biopolímero VKV- ciclo.

1. Una solución de carbonato de (1R,8S,9S)-biciclo[6.1.0]non-4in-9-ilmetil succinimidilo (0.42 mmol, 121,05 mg, 0.6 eq, PM 291.30) en DMF (1 mL) se añadió a T.A a una disolución de VKVx24 (1750mg, 0,692 mmol_{NH2}, 24lys, 0.6 eq, PM 60642 Da) en DMF (40 mL).
2. La mezcla se agitó a T.A. durante 48 horas (figura 2.2). Transcurrido ese periodo de tiempo la disolución se distribuyó en 3 falcons 15 mL y se añadieron 45ml de Et₂O en cada uno de ellos obteniéndose un precipitado que se centrifugó a 15000 rpm durante 10 min (rotor Sorvall ST16R).
3. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con acetona (3x15 mL) y se secó a presión reducida. El sólido obtenido se disolvió en agua ultra-pura (20 mL) a baja temperatura (4°C) y se dializó en agua destilada (2x25 L) y en agua ultra-pura (1x25 L). Por último, se liofilizó para obtener finalmente el ELR modificado (VKV-ciclo)

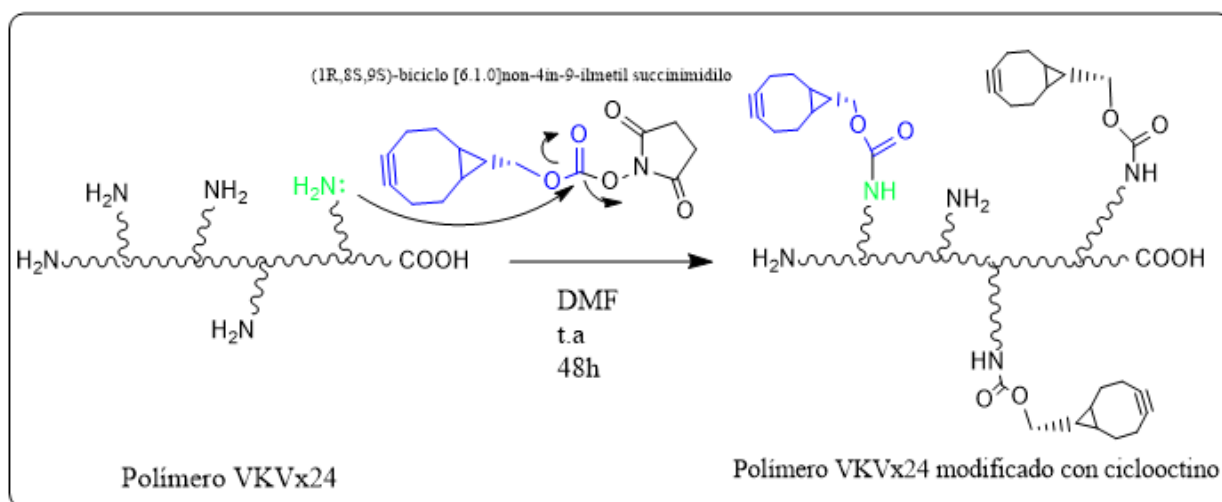


Fig. 5.4. Reacción de modificación del ELR con ciclooctino.

Ambos polímeros modificados se caracterizaron por las técnicas de IR, DSC y RMN. (apartados 6.1, 6.2, 6.3).

5.3. Preparación de hidrogeles mediante la química click

Se prepararon varios hidrogeles, con y sin fármaco variando su concentración, mediante la química click sin catalizador.

Protocolo correspondiente a la formación de hidrogeles. [34]

Se prepararon hidrogeles a pH aproximadamente de 11 en concentraciones de 100mg/ml y 50mg/ml de los biopolímeros de VKV-ciclo y VKV-N3 con 500 μ L de agua ultra pura por separado y se dejó disolviendo toda la noche a 4°C. Para los hidrogeles con fármaco se añadió a mayores en el mismo volumen de agua ultra pura 0,75 mg de AZM.

Al día siguiente ambas disoluciones se mezclaron a 4°C. A continuación, con la ayuda de una pipeta se dispensaron volúmenes de 150 μ L y 200 μ L en el caso de los hidrogeles sin fármaco y para los hidrogeles con fármaco solo volúmenes de 150 μ L (x3) de la disolución final en moldes de teflón de 1 cm de diámetro. Ambos tipos de hidrogeles se mantuvieron a 4°C durante 30 min y únicamente los hidrogeles sin fármaco se dejaron un día a 37°C. A cada temperatura en los hidrogeles sin fármaco se comprobó su peso y diámetro. Finalmente se caracterizó por la técnica de reología (apartado 6.5.).

Mientras, a los hidrogeles con fármaco se sometieron al proceso de liberación correspondiente (apartado 5.4.).

5.4. Ensayos de liberación de fármaco acetazolamida de los hidrogeles obtenidos.

Para realizar los ensayos de liberación se introdujeron cada uno de los hidrogeles obtenidos en viales de vidrio de 3mL utilizando como medio dispersante 2 mL de agua PBS.

Se realizó un primer lavado de cinco minutos, extrayendo todo el volumen de medio dispersante, y reponiéndolo de nuevo; a continuación, se tomaron medidas de las absorbancias por triplicado con un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000, Thermo

a los 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360, 480 y 1440 min, con el fin de hacer el seguimiento óptimo de la liberación.

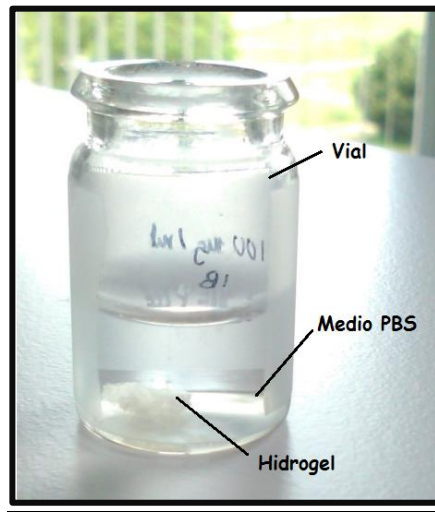


Fig. 5.5. Vial con un hidrogel cargado de fármaco en medio PBS.

6. TÉCNICAS

6.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry)

Es una técnica termoanalítica que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando varía la temperatura durante un tiempo determinado.

Esta técnica es ideal para caracterizar la estabilidad de nuestra proteína ya que puede medir el cambio de entalpía que se produce cuando ocurre la transición del polímero por calentamiento a un ritmo continuo. [35]

Los experimentos en el DSC se realizaron en un Mettler Toledo 8822 con un enfriador de nitrógeno líquido. Al poder trabajar en un intervalo de temperaturas que va desde la temperatura del nitrógeno líquido hasta unos 80 °C permite visualizar las transiciones térmicas de nuestra muestra.

Este equipo dispone de dos cápsulas de aluminio con una capacidad de unos 30 µl. Una de ellas contiene la muestra a analizar y en la otra agua ultra pura como referencia. El dispositivo está diseñado para mantener las dos celdas a la misma temperatura a medida que se calientan. Las muestras de polímero se preparan previamente a una concentración de 50 mg/mL en agua fría ultra pura.

En un experimento de DSC típico el programa de calentamiento incluye una descarga isotérmica inicial (5 min a 0 °C para estabilizar la temperatura y el estado del polímero puro o modificado), seguido de calentamiento dinámico de 5 °C/min para el rango de temperatura deseado. Se obtiene así la curva energía frente a temperatura o tiempo donde se puede observar el pico de la transición que corresponde a una variación de entalpía endotérmica que al representarse hacia abajo se le asigna el signo negativo.

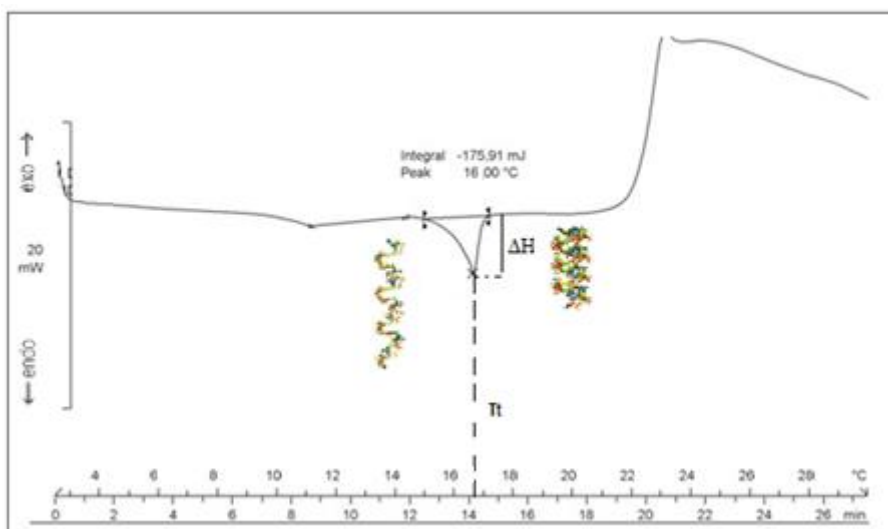


Fig 6.1. Espectro típico de DSC detallado con el comportamiento que presentaría un ejemplo de polímero por encima y por debajo de la temperatura de transición.

6.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Se analiza el espectro ^1H -RMN para calcular la proporción aproximada de aminoácidos que componen el polímero.

Tras la modificación el RMN compara el % de polímero modificado en función de las señales que caracterizan la modificación.

6.3. Electroforesis SDS-PAGE

Es técnica sirve para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética. Gracias al SDS las proteínas se desnaturalizan, perdiendo su conformación tridimensional. De este modo se obtiene un fraccionamiento que obedece a la diferencia de peso, longitud de la cadena (tamaño), y forma de la proteína. [36]

Para realizar la electroforesis se necesitaron los siguientes elementos: Cámara de electroforesis, peine para pocillos, gel, fuente de alimentación, loading buffer (TRIS-Glicina y SDS), marcador de peso molecular, tampón de carga y un transiluminador.

Se diferencian dos partes en el mismo gel; el stacking y el running. El primero se utiliza para generar los pocillos (con el peine) y concentrar la muestra mientras que el segundo servirá como separador de las proteínas. Ambos geles tienen las siguientes componentes de disolución, las cuales tienen una función especial, junto con agua ultra pura:

Tris: Es el agente que mantendrá el pH. Para el running se necesitará una concentración 1,5M y un de pH 6.8 y para el stacking una concentración 0,5M y un pH de 8.8.

Acrilamida: Crea la matriz del gel y determina el tamaño de poro. En presencia de un sistema generador de radicales libres, los monómeros de acrilamida se activan, quedando ellos mismos en estado de radical libre, y reaccionan rápidamente para formar polímeros de cadena larga. Este tipo de reacción se conoce como polimerización vinílica.

SDS: Se encarga de desnaturalizar las proteínas haciendo que su carga sea negativa y puedan migrar hacia el ánodo.

PSA: Genera radicales libres y es por ello un iniciador de la reacción de polimerización que finalmente forma el gel.

TEMED: Se trata de otro iniciador (propagador).

La tasa de polimerización y las propiedades del gel resultante dependen de la concentración de PSA y TEMED.

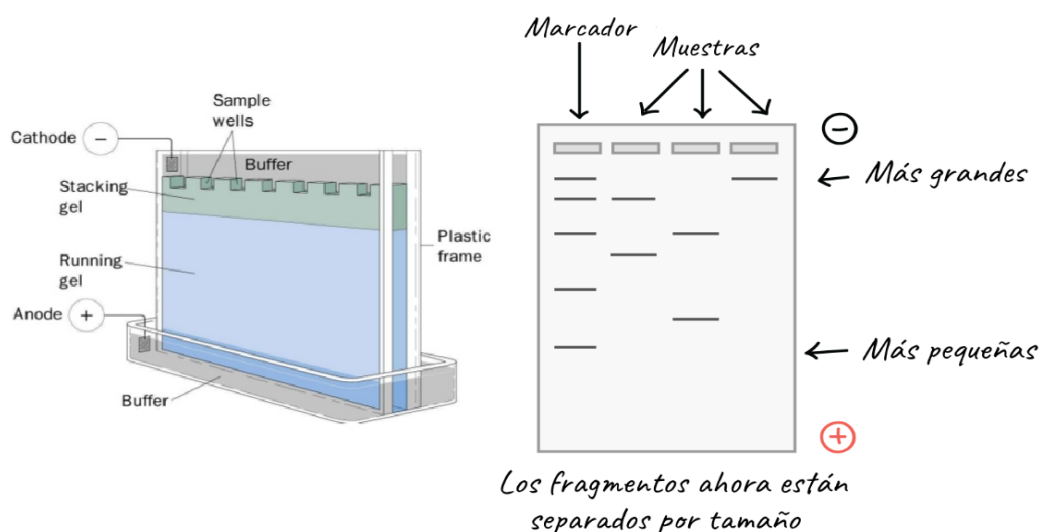


Fig 6.2. A la izquierda, cámara de electroforesis. A la derecha, gel de electroforesis después del proceso.

El gel se debe preparar en función del peso molecular del polímero, pues el porcentaje en separación depende del mismo, en este caso se realizó con un 12%.

La cámara de electroforesis permite la generación del campo eléctrico alrededor del gel donde se depositan las muestras. Este campo se genera dentro de una solución amortiguadora en la que se encuentra sumergido el gel que contiene las muestras; el alto contenido de electrolitos permite la transmisión de la corriente eléctrica, manteniendo el pH estable al paso de la corriente.

La muestra se prepara previamente a un volumen de 20 μ l y se añade en función de la concentración el tampón de carga 1:5 (Azul de bromofenol) para poder visualizar posteriormente el recorrido de las proteínas en un negatoscopio, después de haber teñido el gel en una disolución de azul de Coomassie, metanol y acético.

Con esta técnica se puede visualizar la pureza de la muestra proteica por lo que se utiliza para la caracterización de la misma.

6.4. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Es un tipo de espectrometría de absorción que se fundamenta en la interacción de la materia con la radiación utilizando la región infrarroja del espectro electromagnético.

Cuando una molécula absorbe la radiación a una longitud de onda específica su estado energético cambia manifestando una variación en la energía traslacional y en su estado energético vibracional o rotacional.

La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra es medida en cada número de onda, lo que permite que la cantidad de luz absorbida por la muestra sea calculada por la diferencia entre la intensidad de la luz antes y después de pasar por la celda de muestra. Así se obtiene el espectro infrarrojo de la muestra. [37]

En este caso se utilizó la espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) con el fin de obtener el espectro infrarrojo con mayor rapidez.

Para este experimento se utilizó un espectrómetro de Infrarrojo Bruker, TENSOR 27 y el programa para la computación de espectros fue el software OPUS, versión 6.5.

Una pequeña cantidad de muestra sólida se colocó en la celda infrarroja, donde se sometió a una fuente de luz infrarroja, la cual hizo un barrido desde las longitudes de onda de 4000 cm^{-1} hasta 600 cm^{-1} .

El objetivo para nuestra muestra es pues, obtener información de los grupos funcionales más característicos que presenta la secuencia aminoacídica como el grupo amino del enlace peptídico, el C=O perteneciente a las amidas o el grupo amino de las lisinas.

6.5. Reología

La reología es la ciencia que estudia la deformación y flujo de los materiales.

El comportamiento mecánico de un material es caracterizado por la deformación que resulta de la aplicación de una fuerza externa. Los materiales poliméricos, presentan un comportamiento denominado viscoelástico. Esto es, un comportamiento intermedio entre los sólidos elásticos o “Sólidos de Hooke” y los fluidos puramente viscosos o “Fluidos Newtonianos”.

En el límite puramente elástico de un sólido, la fuerza aplicada sobre el material es directamente proporcional a la deformación que éste presenta en respuesta a dicha fuerza. Al dejar de aplicar la fuerza, el material recupera la forma original. En el límite puramente viscoso de un líquido, la fuerza es directamente proporcional a la velocidad de deformación y al dejar de aplicar la fuerza, el material queda con la deformación lograda. Los materiales viscoelásticos al ser sometidos a una fuerza presentan una deformación que es función del tiempo y al retirar dicha fuerza, el material puede volver a su posición original si se le da el tiempo suficiente para que las moléculas se reacomoden, este tiempo dependerá del tipo de moléculas que constituyan al material ensayado. [38]

Uno de los parámetros de gran utilidad en la descripción de las propiedades reológicas de un material. Son el *Módulo Elástico* G' y el *Módulo Viscoso*. El módulo elástico G' o módulo de almacenamiento, puede usarse como un indicador de la porción elástica del material, alcanzando un máximo cuando la deformación es puramente elástica. El módulo viscoso G'' , o también llamado módulo de pérdida, está relacionado con la

disipación de energía dentro del material durante un ciclo de esfuerzo. Indica, por ejemplo, la energía convertida en calor y puede ser utilizada como una medida del componente viscoso o de la energía no recuperable disipada por ciclo. [38]

El ángulo de fase δ indica el desplazamiento de la tensión respecto de la fase de la deformación. La tangente de este ángulo denominada *tangente de pérdida*, se utiliza para definir la relación entre los módulos de pérdida y almacenamiento. Este valor adimensional permite medir la energía perdida en relación con la energía almacenada, un valor elevado de la tangente significa que el material presenta un comportamiento a la deformación altamente inelástico. Un valor pequeño caracteriza a los materiales que se comportan fundamentalmente como elásticos.

$$\tan \delta = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)}$$

Fig.6.3. Fórmula de la tangente de pérdida.

Se realizaron medidas reológicas de los hidrogeles formados en un Reómetro AR 2000 ex con volúmenes de 150ul y 200ul. Las muestras se colocaron sobre el plato termostataado a temperaturas de 4°C y 37°C y se sometieron a una deformación mediante un pistón.

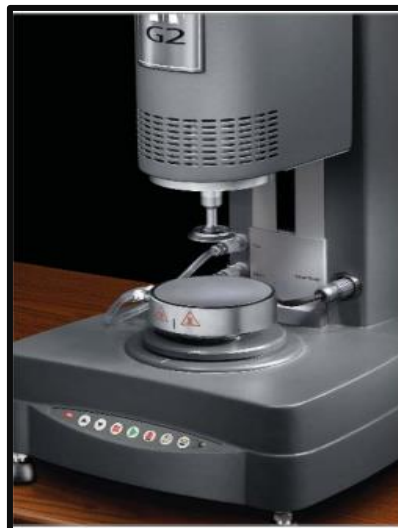


Fig. 6.4. Reómetro con plato termostataado y tornillo para generar la deformación del gel.

6.6. Espectroscopía de absorción UV-VIS

La espectrofotometría es un método que se utiliza para medir en un compuesto químico la cantidad de luz (radiación electromagnética) que absorbe, transmite o refleja a lo largo de un cierto rango de longitud de onda por lo que se medirá la diferencia entre la cantidad de luz que entra y la que sale de la muestra.

Se obtendrá un espectro de absorción, en el que se representa la longitud de onda frente la absorbancia.

En este caso se utiliza esta técnica para medir la absorción de una muestra de AZM con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c UV-Vis de THERMO SCIENTIFIC con un rango de medida de entre 190 a 840 nm. Este instrumento posee un pequeño pedestal donde se deposita una cantidad de muestra de 2 μ l la cual es capaz de medir la absorbancia de un compuesto con una longitud de ‘cubeta’ de 1mm y tiempo de 3”.



Fig. 6.5. Espectrofotómetro de microvolumen UV-Vis NanoDrop 2000c

7. RESULTADOS Y DISCURSIÓN

En el siguiente apartado se exponen los resultados obtenidos en cada uno de los métodos seguidos para la elaboración del presente trabajo de TFG. Se incluye los resultados de la bioproducción del polímero, la caracterización del mismo y de sus productos modificados con los grupos funcionales azida y ciclo, el entrecruzamiento para la obtención de hidrogeles y el ensayo de liberación del fármaco.

7.1. Procedimiento experimental para la producción del ELR (VKVx24)

En el proceso de producción del polímero se debe elegir inicialmente la colonia de *E.coli* que mayor expresión genere, por ello se inicia con un estudio de selección entre varios clones, posteriormente se hace un seguimiento de la producción de la bacteria una vez empezado el proceso de producción a gran escala y finalmente se estudia la localización del polímero en el proceso de purificación.

❖ Selección de la colonia

Partiendo de un stock de glicerol con la cepa de la bacteria que ya contiene el plásmido de expresión de nuestro polímero creado en los laboratorios del grupo BIOFORGE, se sembró la bacteria *E.coli* sobre la placa LB agar (apartado 5.1.1 y 5.1.2). Pasadas las horas de incubación, aparecen colonias aisladas entre las cuales fueron escogidas 8 colonias al azar y llevadas a inducción de expresión con el cambio de medio a TBm. Posteriormente, se realizó el proceso de selección de la colonia que más produce mediante la técnica de electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

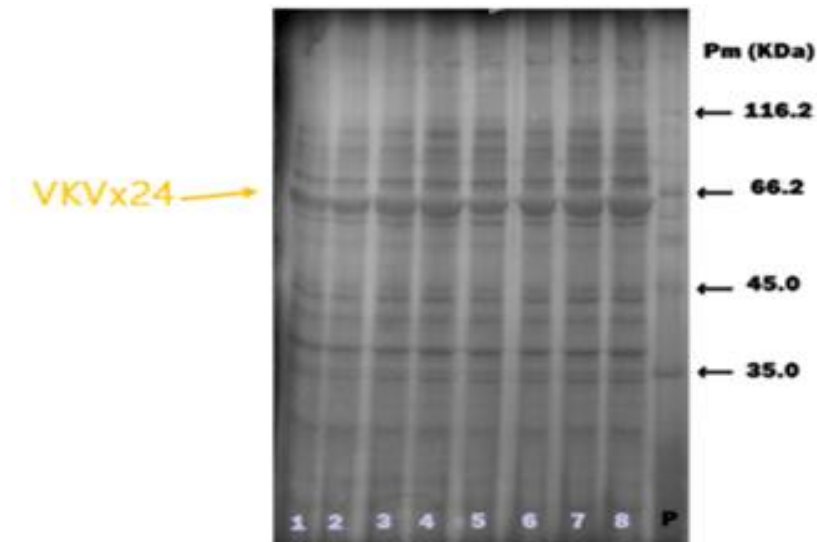


Fig 7.1. La imagen representa un gel de electroforesis que se divide en 9 calles, las 8 primeras pertenecen a las colonias seleccionadas y la última, clasificada como P, pertenece al patrón de proteínas (Unstained Protein Molecular weight market) indicadas en el lateral derecho con sus respectivos pesos moleculares.

La técnica desnatura las proteínas de cada colonia para separarlas de acuerdo a su movilidad electroforética, de este modo se obtiene un fraccionamiento que obedece a la diferencia de peso, la longitud de la cadena (tamaño) y la forma de la proteína.

En el screening de las 8 colonias se observa en cada una de las calles, además del patrón de bandas proteicas endógenas de la bacteria, una banda más ancha y de coloración intensa que se encuentra por debajo del peso molecular de 66,2 kDa del patrón de proteína, esa marca puede indicar que ese es el polipéptido debido a que por su secuencia debe tener un peso molecular de 60,64 KDa. Si bien la intensidad es similar en varias calles consideramos que la colonia 8 es la que más produce puesto que la banda presenta un tamaño ligeramente superior con respecto a las demás calles.

Para comprobar la movilidad electroforética de la banda se puede trazar un gráfico con estándares de PM conocido (las de las proteínas patrón), se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido (la banda que se sospecha que pertenece al polímero). El Rf se calcula dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrido por el colorante azul de bromofenol (u otro punto de referencia arbitrario). Así, se comprobó que la banda

supuesta de polímero tiene un PM de 61,15 KDa, peso aproximado al valor teórico del polipéptido.

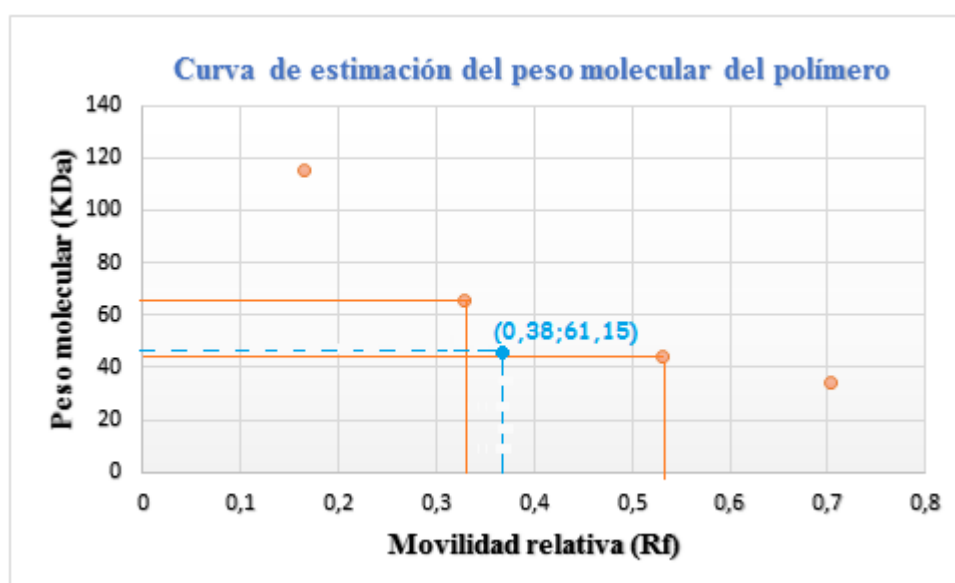


Grafico.7.1. Curva de referencia para la estimación del peso molecular del polímero mediante SDS-PAGE.

❖ Seguimiento de la producción de la bacteria

Una vez pasada la etapa de selección, se preparó el inóculo con la colonia 8 seleccionada (apartado 5.1.3) y posteriormente se introdujo en el fermentador con el fin de aumentar la biomasa del mismo. El seguimiento del crecimiento bacteriano se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE y medidas de densidad óptica.

Para calcular las absorbancias de las muestras con una longitud de onda de 600nm, el volumen necesario para disolver la muestra y el volumen necesario que se debe añadir de cada una de ellas en los pocillos del gel de electroforesis fue necesario realizar una etapa de normalización.

Las muestras a las que se realizaron la etapa de normalización fueron la pequeña cantidad de muestra que se tomó del inóculo para controlar que no se producía ninguna contaminación del mismo y que denominamos *control*, el inóculo que se vertió en el

fermentador, y muestras obtenidas del fermentador pasadas las 12h, 12h30min y 13h de ser vertido el inóculo.

El blanco de la muestra

- Se decanta
- Se añade 1mL MQ
- Se resuspende
- Se centrifuga
- Se vuelve a decantar
- Se resuspende en MQ según la absorbancia.
- Se recoge 20µl
- Se resuspende
- Se calcula el volumen para cada pocillo y se le añade 5µl de tampón de carga

Rango de absorbancia	Volumen para pocillo (µl)	Volumen de MQ (µl)
[0,1-0,5]	5/A	20
[0,5-2]	12,5/A	50
[2-5]	25/A	100
[5-10]	50/A	200

PRODUCCIÓN VKVx24

Muestra	Hora	pH	T ^a (°C)	% O ₂	rpm	mL OH ⁻	A ⁶⁰⁰	V MQ(µl)	V pocillo(µl)
1	8:00		37	0	499	7	11,26	200	2,5
2	8:30		37	0	499	7	11,86	200	2,5
3	9:00		37	0	499	7	12	200	2,5
Inóculo	20:30	-	-	-	-	-	0,06	20	5.0
Control	-	-	-	-	-	-	5,06	200	5,9

Tabla 7.1. Datos, a distintas horas, correspondientes al proceso de seguimiento de producción de la bacteria de temperatura, oxígeno, pH, mL de OH⁻, absorbancias a 600nm, volumen de MQ necesario para disolver la muestra y volumen necesario para añadir cada muestra en el pocillo de electroforesis.

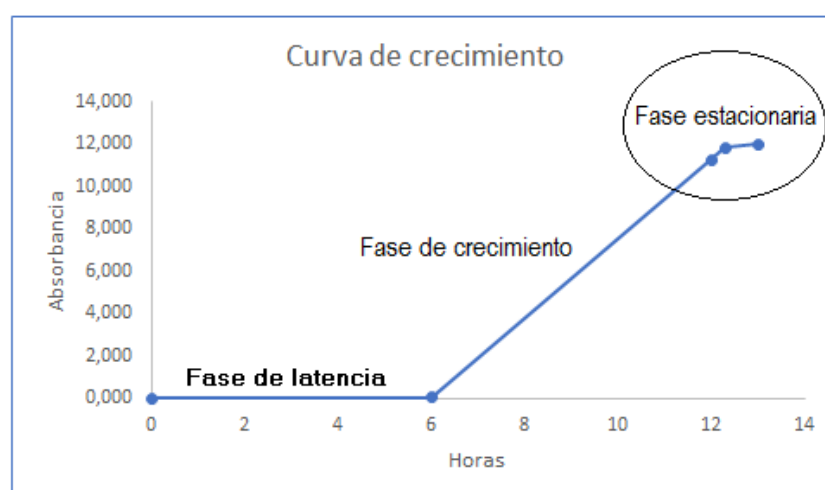


Gráfico 7.2. Representación gráfica de la absorbancia frente al tiempo en función al crecimiento de la bacteria en la producción.

En el gráfico podemos apreciar que la curva presenta la fase de latencia en la que se observa que no hay variación en la absorbancia, la de crecimiento microbiano donde se produce un crecimiento exponencial en la absorbancia y la fase estacionaria donde se mantiene el valor de la absorbancia e indica que ya no hay más producción. Esta última fase se alcanza en torno a una absorbancia de 12 a las 13 horas de añadir la bacteria en el fermentador.

Este sistema nos indica la máxima producción bacteriana pero no diferencia qué bacterias son las que contienen el plásmido, por lo que es necesario realizar un seguimiento de las muestras y el denominado control por electroforesis SDS-PAGE con el fin de observar la cantidad de polímero producido.

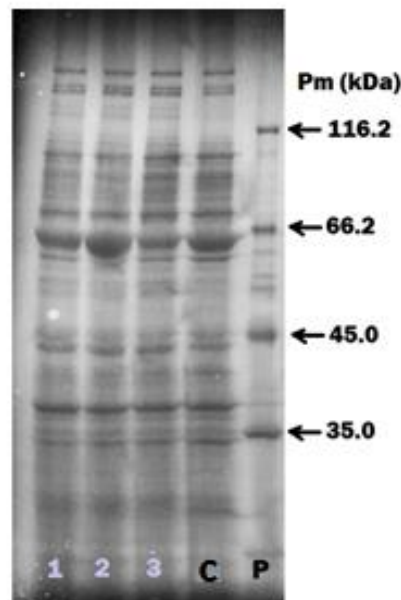


Fig 7.2. Gel de electroforesis dividida en 5 calles, las tres primeras corresponden a las muestras a las 12h, 12h y 30min y 13 h después de la inoculación, la siguiente al control y la última calle al patrón de proteínas.

Se puede observar bandas intensas en las muestras y el control a niveles de peso molecular del polímero por lo que, se puede afirmar que hay expresión del mismo. Entre las muestras de las 8:30 y 9:00 h se puede observar una disminución de la intensidad de la banda, lo que nos indica que se ha llegado entre esas horas a la fase estacionaria.

❖ Purificación

▪ Ciclos de transición inversa (ITC)

Como se explicó en el apartado de métodos (Apartado 5.1.5), debido al comportamiento termosensible e inteligente de los ELR se ha realizado un avance científico en el campo de la purificación de estas proteínas con una nueva técnica denominada *ciclos de transición inversa (ITC)* que consta de varios pasos secuenciales y repetidos de calentamiento, centrifugación, enfriamiento y solubilización (Esquema 5.1) [33]. Esta técnica depende de los parámetros del ELR en juego como la composición del residuo huésped, la longitud y su temperatura de transición.

Después de la recolección celular y su posterior lavado, las células fueron sometidas a una ruptura celular (apartado 5.1.5) donde por centrifugación se obtuvo el sobrenadante que contiene el extracto crudo con las proteínas de interés. Este sobrenadante se acidifica con el fin de protonar el grupo amino de la lisina quedando el polímero en la disolución. A continuación, se aumenta el pH del nuevo sobrenadante para volver a tener la amina desprotonada y se calienta a 42°C con el fin de superar la temperatura de transición del polímero haciendo que este cambie de conformación y quede como agregado en el precipitado. Este precipitado se resolubiliza a baja temperatura y se vuelve a cambiar a pH ácido con el fin de volver a tener el polímero desplegado, hidratado y en disolución. Se repite tres veces el proceso desde la acidificación. (Esquema 5.1 y Figura 7.3). Finalmente obtenemos el polímero puro a un pH de 11,8 necesario para su posterior manipulación.

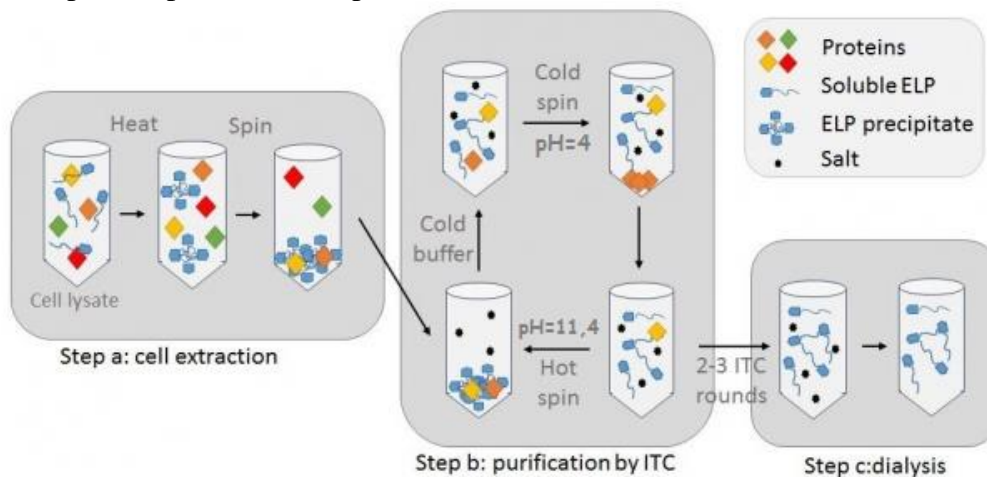


Fig. 7.3. Esquema de purificación mediante la etapa de ciclo de transición inversa. [39]

Para observar la existencia de nuestro polímero en las etapas de ITC se recogió una pequeña cantidad de sobrenadante y precipitado de cada fase en tubos tipo eppendorf.

Las muestras solidas ($\text{Sn}\downarrow$ y $\text{H}^+\downarrow$) se prepararon previamente añadiendo 1mL de agua ultra pura, se resuspendieron, se centrifugaron y se recogieron 20 μL en nuevos tubos eppendorf. Mientras, para las muestras líquidas se recogieron 20 μL en tubos eppendorf.

Se pipeteó 1 μL en los pocillos de gel de electroforesis para aquellas muestras que supuestamente contenían el polímero y 2 μL para las que se suponía que no lo presentaban.

Finalmente, se obtuvieron los siguientes resultados de la electroforesis:

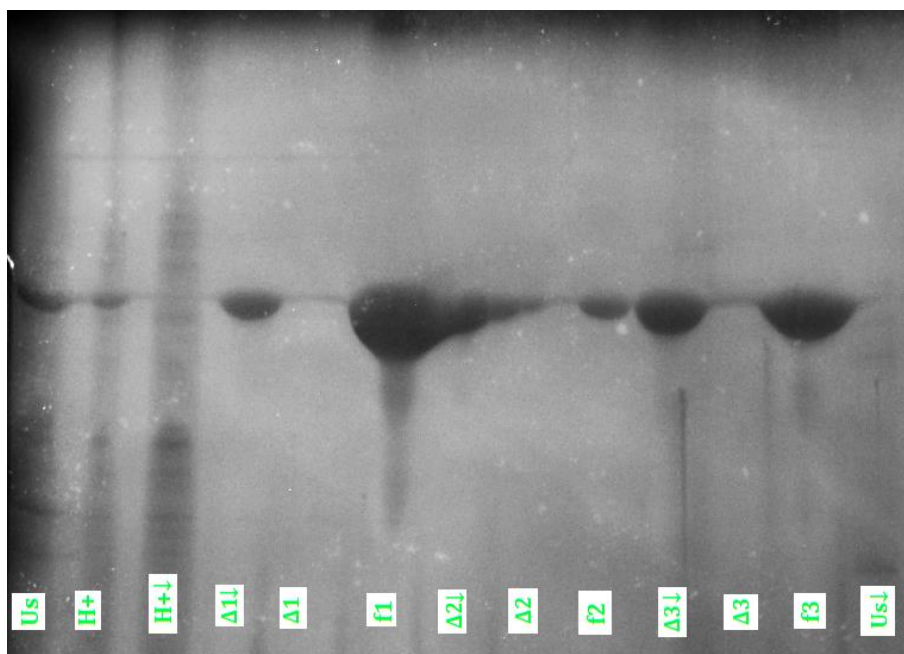


Fig. 7.4. Gel de electroforesis dividida en 13 calles en las que se pincharon las muestras correspondientes a la etapa de purificación.

Se puede observar en la imagen que en las calles correspondientes a Us, H+, $\Delta 1\downarrow$, f1, $\Delta 2\downarrow$, f2, $\Delta 3\downarrow$ y f3 hay existencia de polímero por lo que es importante no desechar las fases de las mismas. Una vez observado que la purificación se está dando correctamente podemos pasar a siguiente etapa, la de diálisis (apartado 5.1.5) para finalmente realizar la etapa de liofilización y obtención del polímero, el cual será pesado y caracterizado.

Las características que se obtuvieron del polímero puro fueron las siguientes:

VKVx24

<i>Volumen inicial</i>	14L
<i>Peso obtenido</i>	3620mg
<i>pH(en disolución)</i>	11,75
<i>Estado</i>	sólido
<i>Masa molecular</i>	61,15 kDa
<i>Rendimiento</i>	259mg/L

Tabla. 7.2. Datos obtenidos de rendimiento, masa molecular a partir de SDS-PAGE y pH en disolución acuosa.

El proceso realizado en un fermentador o biorreactor supone que los sustratos que componen el medio de cultivo sean transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. La fermentación es por tanto un proceso de oxidación incompleta, siendo el compuesto final un compuesto orgánico (polímero VKVx24).

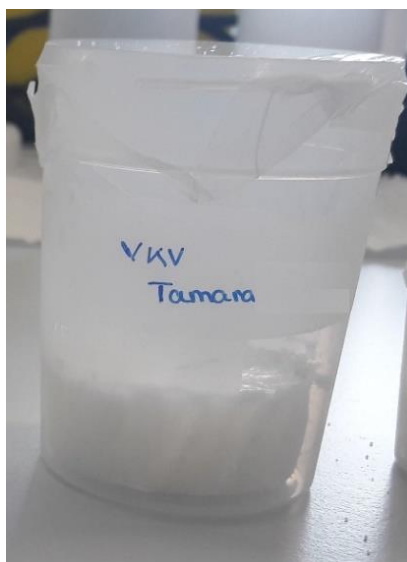


Fig.7.5. Polímero VKVx24 puro obtenido en el proceso de producción en las instalaciones del grupo BIOFORGE tras la etapa de liofilización.

7.2. Caracterización del polímero puro VKVx24

La caracterización del polímero puro se realizó mediante electroforesis, espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) (apartados 6.1, 6.2, 6.3 y 6.4)

7.2.1. Análisis electroforético del VKVx24

Para realizar la caracterización del polímero mediante esta técnica, se pesó 0,5 mg de la muestra y se disolvió en 500 μ l de agua ultra pura. Después de ser resuspendido, se cogió 20 μ L del mismo y se añadió 5 μ L de tampón de muestra. Finalmente se pinchó 4 μ L en el gel.

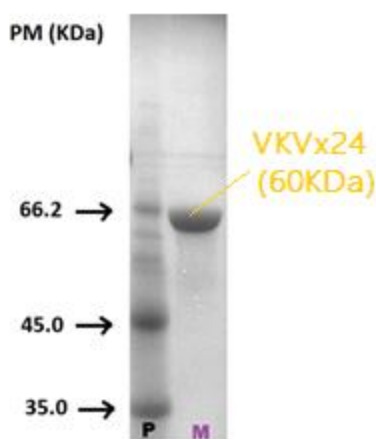


Fig. 7.6. Gel de electroforesis con dos calles, una que contiene el polímero puro (M) y otra que contiene el patrón de proteínas (P).

Se puede observar una única banda en el gel por debajo de la banda de 66,2 KDa del patrón de proteínas, debido a la secuencia del polímero este presenta un PM de 60,6 KDa, por interpolación entre PM conocido y movilidad electroforética podemos deducir que esa banda pertenece a nuestro polipéptido y que se encuentra totalmente puro puesto que no hay existencia de otras bandas en la calle donde se pinchó.

7.2.2. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Se colocó en la celda infrarroja una pequeña cantidad de muestra, donde se sometió a una fuente de luz infrarroja, la cual hizo un barrido desde las longitudes de onda de 4000 cm^{-1} hasta 600 cm^{-1} (apartado 6.4).

La estructura del polímero obtenido es compleja por lo que a la hora de analizar el espectro se tendrá en cuenta las señales más significativas haciendo uso de valores teóricos con el fin de identificar algunos de los grupos funcionales más característicos del polímero.

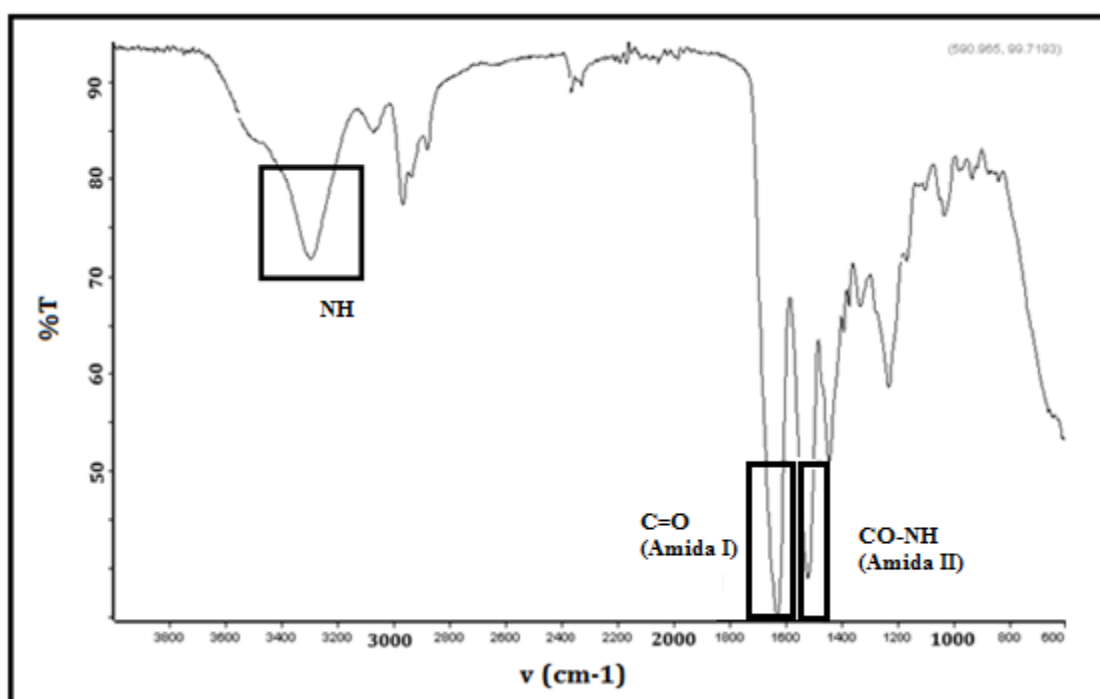


Gráfico 7.3. Representación gráfica del % Transmitancia frente a números de onda en el que se encuentran señalizados las bandas correspondientes a un grupo N-H (3300 cm^{-1}), C=O (1620 cm^{-1}) y CO-NH- (1500 cm^{-1}) del polímero VKVx24.

<i>Enlace</i>	<i>Valores teóricos (cm^{-1})</i>	<i>Valores obtenidos (cm^{-1})</i>
$\nu_{\text{N-H}}$	3500 - 3100	3300
$\nu_{\text{C=O (amida I)}}$	1900 - 1650	1620
$\nu_{\text{CO-NH- (amida II)}}$	1900 - 1650	1500

Tbla.7.3. Comparación de valores teóricos con los obtenidos del espectro de FT-IR.

Las aminas asociadas dan bandas en la región de 3500-3100 cm^{-1} más débiles que las de un OH asociado, pero más agudas. Por lo que se puede esperar que el pico que aparece por esa región sea tanto de los grupos carboxilamido como los amino de las lisinas.

Por otro lado, en regiones de 1900-1650 cm^{-1} podemos localizar las señales correspondientes a las denominadas amidas I y II.

7.2.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para esta técnica se preparó una disolución de 50mg/mL de polímero en agua ultra pura y se repartieron 60 μL en tres eppendorf para a continuación llevar cada uno a distintos pH (ácido, neutro y básico). Cada muestra se sometió a una descarga isotérmica inicial de 5 min a 0 $^{\circ}\text{C}$ para estabilizar la temperatura y el estado del polímero puro, seguido de calentamiento dinámico de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta una temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$. Se obtuvo finalmente el siguiente espectro:

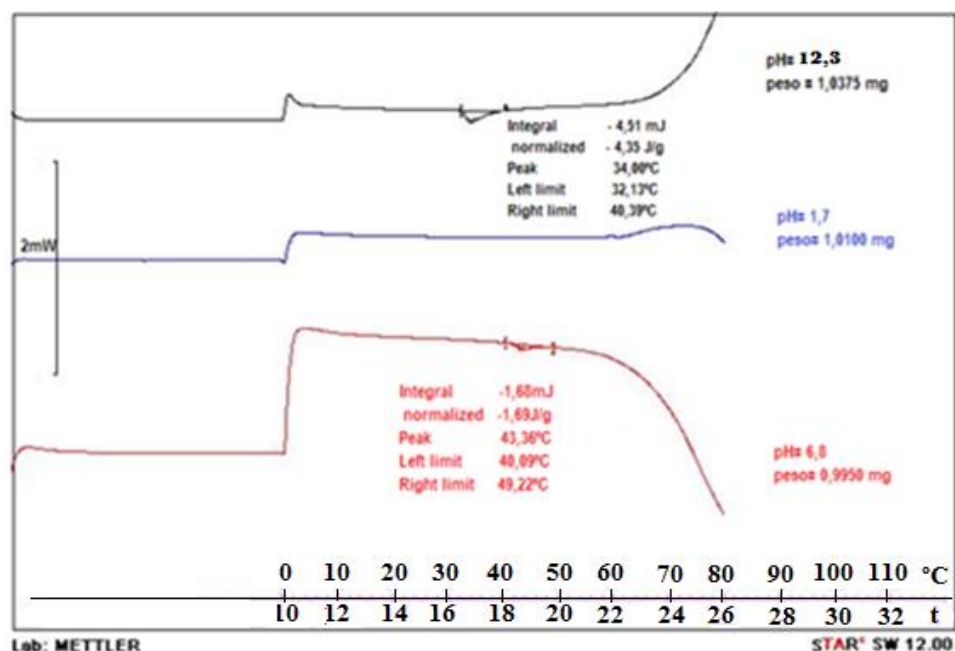


Gráfico. 7.4. Espectro DSC del polímero VKVx24 a pH 12.3, 1,7 y 6,8. Se representa la potencia frente al tiempo y temperatura.

Durante el barrido de calentamiento aparece la transición endotérmica causada por el proceso de plegamiento de la cadena acompañada por el proceso de destrucción de la capa externa de agua ordenada.

Se puede observar que la temperatura de transición para el polímero en medio básico es menor que para el medio a pH neutro, es decir, el proceso de plegamiento ocurre antes en el medio básico que en el neutro. Esto se puede explicar por la carga que presenta el polímero a distintos pH, así pues, a un pH por debajo de 9,74 las lisinas se encontrarán cargadas puesto que su pKa es de 10,52 y por encima del mismo se encontrarán con carga cero. Cuando está ionizado, rompe la estructura pentagonal del agua alrededor de los restos apolares, para construir su propia esfera de hidratación (apartado 1.1.4 cambios en el grado de ionización). La disminución de esta agua de hidratación hidrófoba hace que aumente la solubilidad y en definitiva que aumente la Tt.

Los valores obtenidos no difieren mucho de los valores esperados, las pequeñas diferencias pueden ser debidas al proceso realizado.

Valores teóricos			Valores obtenidos		
<i>pH</i>	Tt (°C)	ΔH (J/g)	pH	Tt (°C)	ΔH (J/g)
12.21	34.84	-5.64	12,3	34.00	- 4.35
7.48	60.43	-0.54	6.8	43.36	-1.69
2.81	>70	-	1.7	>70	-

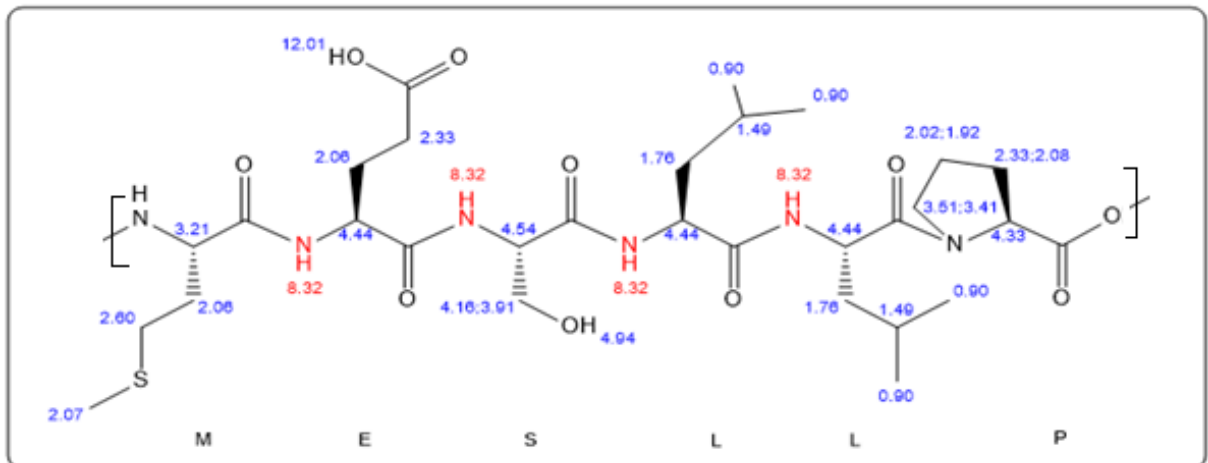
Tabla.7.4. Comparación de valores teóricos con los valores experimentales en la técnica de DSC.

7.2.4. Resonancia magnética nuclear (RMN)

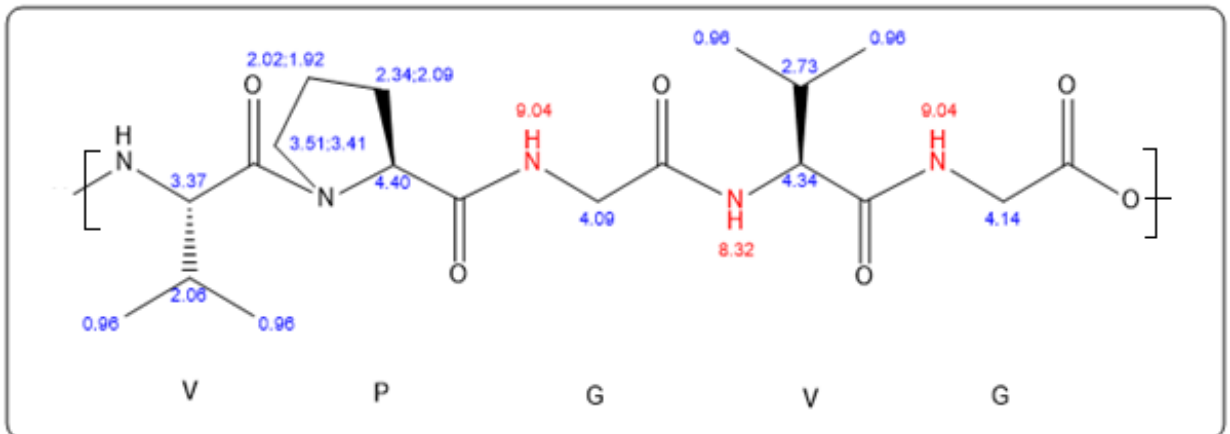
Para esta técnica se preparó una disolución de 25 mg/ml de polímero con un disolvente deuterado (DMSO-d6) y se llevó a un tubo de RMN para obtener el espectro de protón.

El espectro de protón nos sirve para hacernos una idea de la proporción aproximada de aminoácidos que componen el polímero, para ello se estimará previamente los desplazamientos de protón por bloques del polímero.

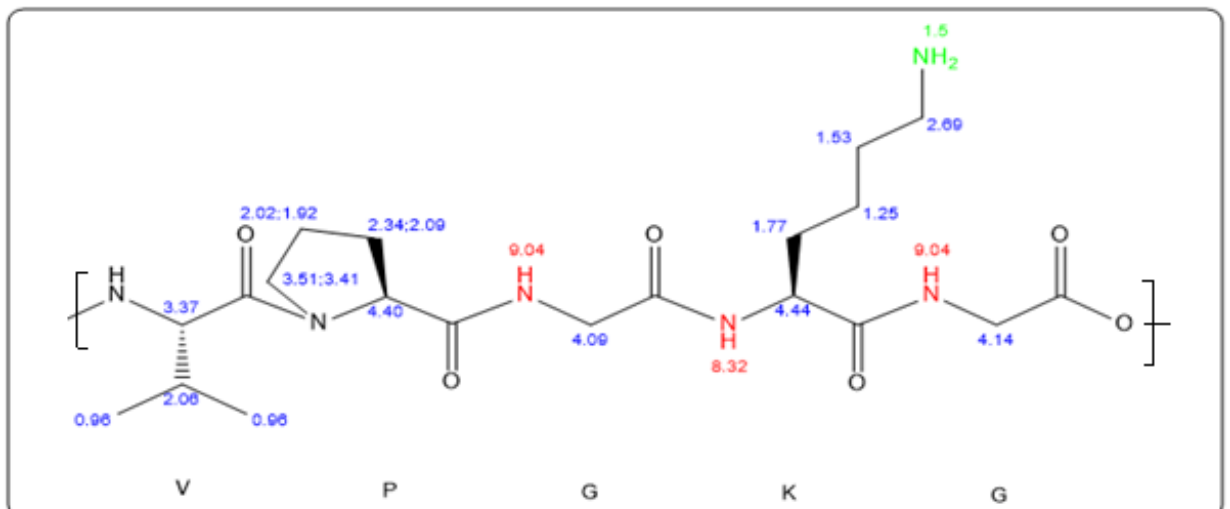
- Bloque 1 (MESLLP)

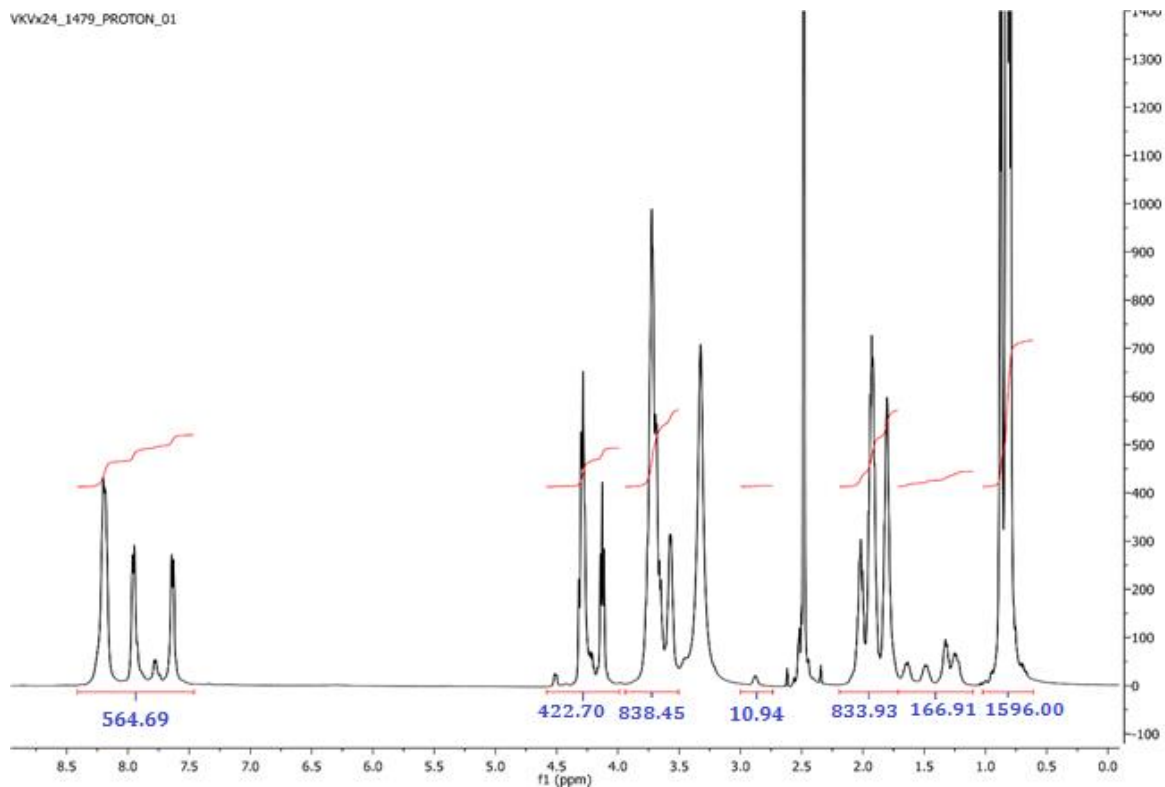


- Bloque 2 [(VPGVG)₅]



- Bloque 3 (VPGKG)





Gráfica.7.5. Espectro de RMN del polímero puro VKVx24. Se representa la integral de las señales frente al desplazamiento.

Se puede observar que a desplazamientos de en torno a 8.0 ppm se encuentran las señales de H^+ de los grupos amino que forman el enlace peptídico y que integra a un valor de 564,69.

Por otro lado, podemos distinguir tres tipos de señales correspondientes a grupos CH_2 , aquellos que se posicionan en intervalos de 1.7-1.8; 2.0-2.7; 3.5-4.5 e integran a 166,91; 833,93; (838,46 + 422,7).

La señal correspondiente a grupos CH_3 es la que corresponde a un desplazamiento de 1ppm e integra a 1596.

Debido a estas observaciones podemos concluir que tenemos el polímero deseado puesto que analizando su secuencia y los desplazamientos que correspondería a los protones que lo componen se ajusta al espectro RMN (H^+) que hemos obtenido.

7.3. Modificación del polímero puro con grupos azida y octino

Se utilizó 1750 mg de polímero puro para modificar las lisinas presentes en la cadena por grupos azida utilizando carbonato de 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) y grupos octino añadiendo (1R,8S,9S)-biciclo [6.1.0]non-4in-9-ilmetil succinimidilo por separado, siguiendo los protocolos de los puntos 5.2.1 y 5.2.2. Teniendo en cuenta la relación 0,6 de equivalencia, fue necesario añadir 94,83mg de carbonato y 121,05 mg de succinato en DMF y en un periodo de tiempo de 48h. Se produce una reacción SN2 (Fig. 5.3 y 5.4) para finalmente obtenerse los polímeros VKV-N₃ y VKV-ciclo que fueron caracterizados por las técnicas de espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las características que se obtuvieron de ambos polímeros tras esta metodología fueron las siguientes:

<i>Polímero</i>	VKV-N3	VKV-ciclo
<i>Peso de partida</i>	1750 mg	1750 mg
<i>Peso obtenido</i>	832 mg	974 mg
<i>Moles de partida</i>	0,692	0,692
<i>Moles obtenidos</i>	0,328	0,385
<i>Rendimiento</i>	47,5%	55,6%
<i>pH(disolución)</i>	10,56	10,55
<i>Estado</i>	sólido	sólido

Tabla. 7.5. Datos correspondientes a los polímeros VKV-N3 y VKV-ciclo tras la modificación.

En el proceso experimental se perdió 1/3 de las muestras de VKV-N3 y VKV-octino debido a que por error se desecharon, además de que fue necesario separar por destilación Et₂OH debido a una confusión con el Et₂O. Esto supone que el rendimiento sea entorno al 50% en ambos casos.

7.3.1. Caracterización del polímero VKV-N3

7.3.1.1. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Una pequeña cantidad de muestra se colocó en la celda infrarroja, donde se sometió a una fuente de luz infrarroja, la cual hizo un barrido desde las longitudes de onda de 4000 cm⁻¹ hasta 600 cm⁻¹.

Con la espectroscopia de IR se pretende observar algún cambio en la señal en comparación con el polímero puro para asegurar que se ha producido la modificación con éxito. En el siguiente espectro se observó una diferencia clara con respecto al espectro del polímero puro (gráfico 6.3):

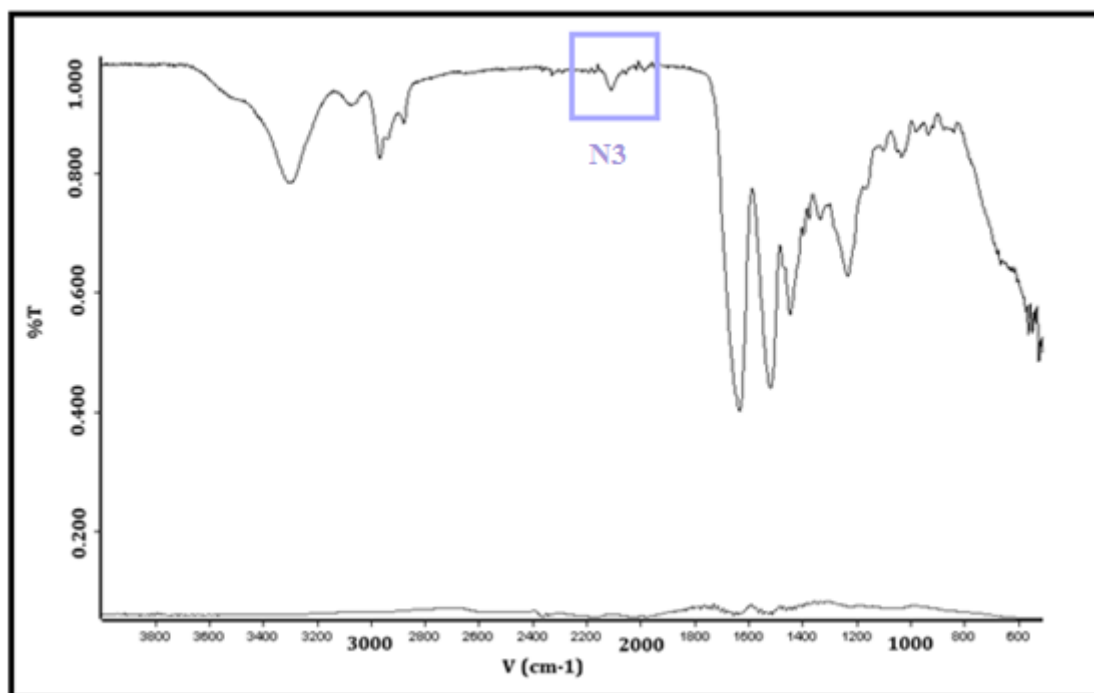


Gráfico 7.6. Representación gráfica del % Transmitancia frente a número de ondas del polímero puro VKV-Azida.

<i>Enlace</i>	Valores teóricos (cm-1)	Valores obtenidos (cm-1)
ν_{N3}	2160-2120	2100

Tabla.7.6. Comparación de valores teóricos con los obtenidos del espectro de FT-IR.

A unos 2100 cm^{-1} se observa un nuevo pico que si se compara con valores teóricos coincide con rangos que corresponden a grupos azida. Esto nos indica que la modificación del polímero puro con grupos azida se ha realizado con éxito.

7.3.1.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

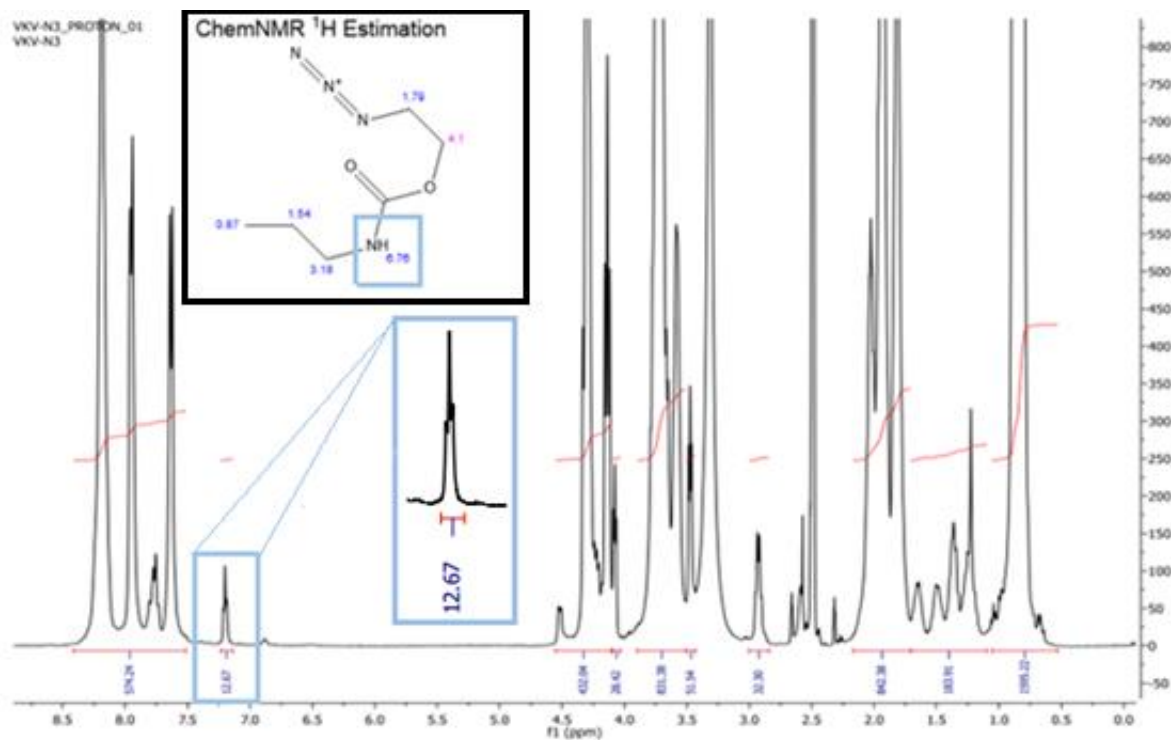
Para esta técnica se preparó una disolución de 50mg/ml de polímero en agua ultra pura. El polímero que inicialmente estaba a pH básico se llevó a pH neutro. La muestra se sometió a una descarga isotérmica inicial de 5 min a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ para estabilizar la temperatura y el estado del polímero puro, seguido de calentamiento dinámico de $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta una temperatura de 60°C .

Con esta técnica no fue posible observar el valor de la T_t del polímero que se esperaba (en torno a 20°C), aún después de repetirse en varias ocasiones. Se obtuvo un valor demasiado pequeño ($0,66^{\circ}\text{C}$) a pH neutro. Esto puede deberse a distintos factores tales como mala manipulación de muestra, exceso de sales, un pH mal establecido, etc.

7.3.1.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Se realizó un espectro de protón del polímero modificado con grupos azida. Para ello, se preparó una concentración de 25mg/ml de muestras y se llevó a un tubo RMN.

El espectro que se obtuvo fue el siguiente:



Gráfica.7.7. Espectro de RMN del polímero puro VKV-azida. Se representa la integral de las señales frente al desplazamiento.

Podemos observar un nuevo pico con respecto al espectro del polímero puro. Esto se puede explicar por la modificación realizada con grupos azida, y es que, la introducción de la misma hace que el protón que pertenece al grupo amino de la amina modificada se desplace a rangos de en torno a 7 ppm. Además, este nuevo pico integra aproximadamente a 13 protones, lo que nos indica que 13 de las aminas del polímero puro se han modificado.

El porcentaje de sustitución es por tanto de 54%, sabiendo que hemos utilizado una equivalencia de 0,6 solo se pueden modificar el 60% con el fin de mantener una carga positiva neta para la interacción con la mucosa, por lo que el rendimiento es del 90% y se puede considerar favorable para el proceso siguiente de formación del hidrogel mediante la *reacción click*.

7.3.3. Caracterización del polímero VKV-CICLO

7.3.3.1. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

El polímero con grupos octino dio lugar a un espectro similar al del polímero puro, no se pudo mediante esta técnica comprobar que se produce la modificación correspondiente ya que como el ciclooctino es simétrico por lo que hace que la absorción sea inactiva y no se vea el triple enlace a 2200 cm^{-1} .

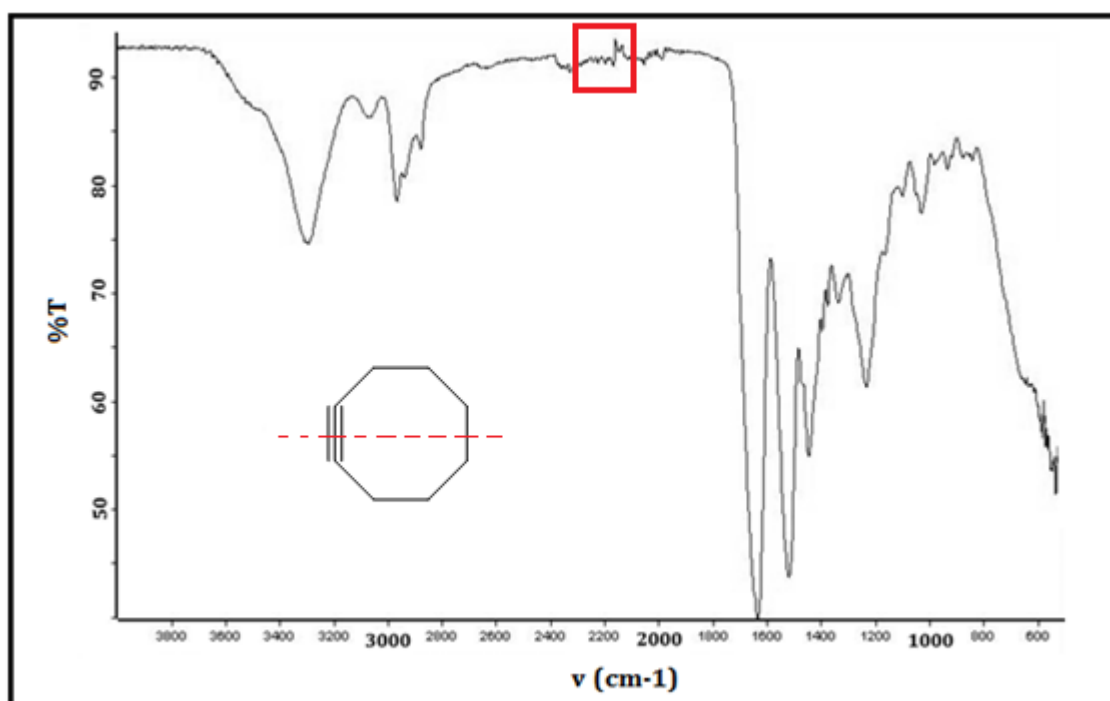


Gráfico 7.8. Representación gráfica del % Transmitancia frente a número de ondas del polímero puro VKV-ciclo.

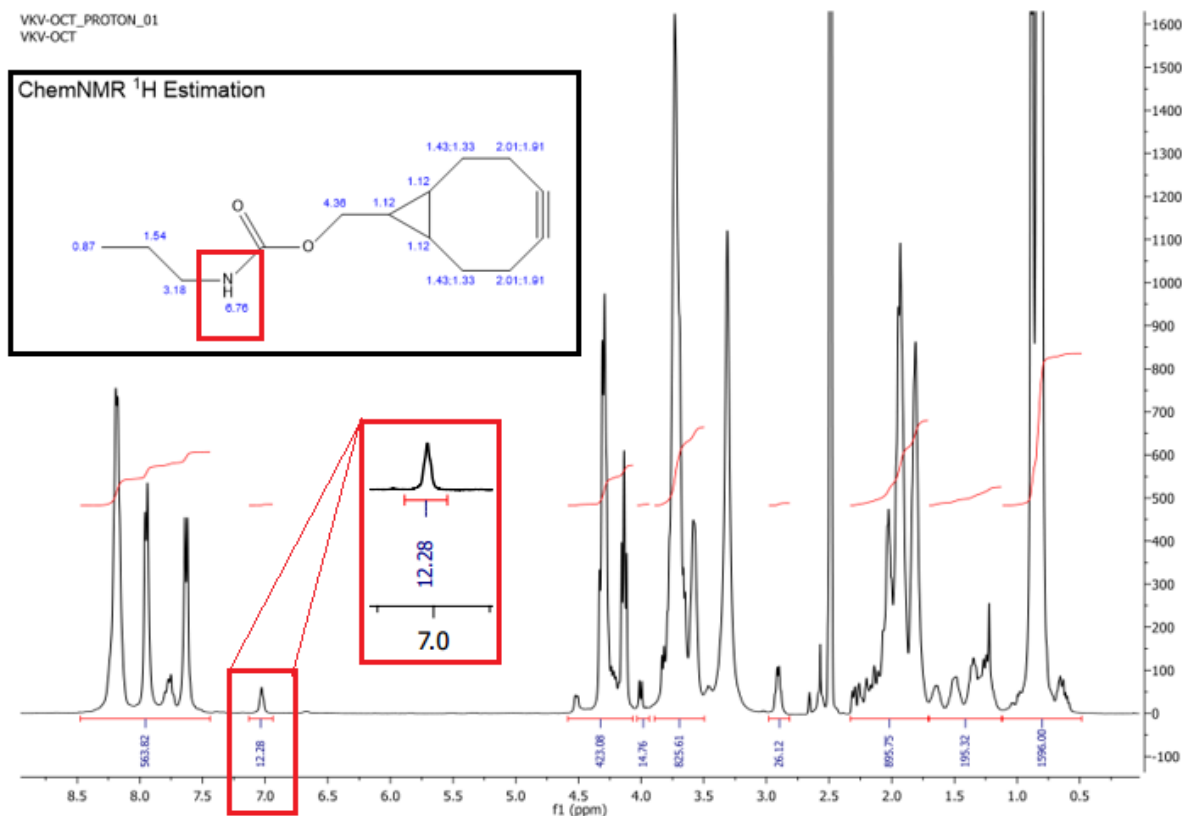
7.3.3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para esta técnica se preparó una disolución de 50mg/ml de polímero en agua ultra pura. El polímero que inicialmente estaba a pH básico se llevó a pH neutro. La muestra se sometió a una descarga isotérmica inicial de 5 min a 0 °C para estabilizar la temperatura y el estado del polímero puro, seguido de calentamiento dinámico de 5 °C/min hasta una temperatura de 60°C.

Al igual que con el polímero VKV-azida en esta técnica no fue posible observar el valor de la Tt del polímero que se esperaba (aproximadamente 10°C), aún después de repetirse en varias ocasiones. Se obtuvo un valor demasiado pequeño (0,66°C) a pH neutro. Esto puede deberse a distintos factores tales como mala manipulación de muestra, exceso de sales, un pH mal establecido, etc.

7.3.3.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Se realizó un espectro de protón del polímero modificado con grupos ciclo octino. Para ello, se preparó una concentración de 25mg/ml de muestras y se llevó a un tubo RMN. El espectro que se obtuvo fue el siguiente.:



Gráfica.7.9. Espectro de RMN del polímero puro VKV-ciclo. Se representa la integral de las señales frente al desplazamiento.

Se observa un nuevo pico en torno a 7 ppm con respecto al espectro de protón de polímero puro (Gráfico.6.4). Este nuevo pico, nos indica que la modificación se ha dado con éxito ya que al producirse la sustitución del grupo funcional en los grupos amina del VKVx24, ha generado que el protón que queda con la amina salga en torno a desplazamientos de dicha señal. Además, este pico integra a 12.28, lo que nos indica que de las 24 lisinas presentes en el polímero puro aproximadamente se han modificado 12.

El porcentaje de sustitución es por tanto de 50%, sabiendo que hemos utilizado una equivalencia de 0,6 solo se pueden modificar el 60% con el fin de mantener una carga positiva neta para la interacción con la mucosa, por lo que el rendimiento es del 83% y se puede considerar favorable para el proceso siguiente de formación del hidrogel mediante la *reacción click*.

7.4. Preparación de hidrogeles mediante “Reacción Click”

Se prepararon hidrogeles mediante *la reacción click* propuesta por la profesora C. Bertozzi y colaboradores [30] (apartado 1.4), es decir, sin uso de catalizador. A partir de los polímeros VKV-ciclo y VKV-N3 se obtuvo dichos hidrogeles por entrecruzamiento mediante cicloadición de Huisgen formándose un anillo de 1,2,3-triazol.

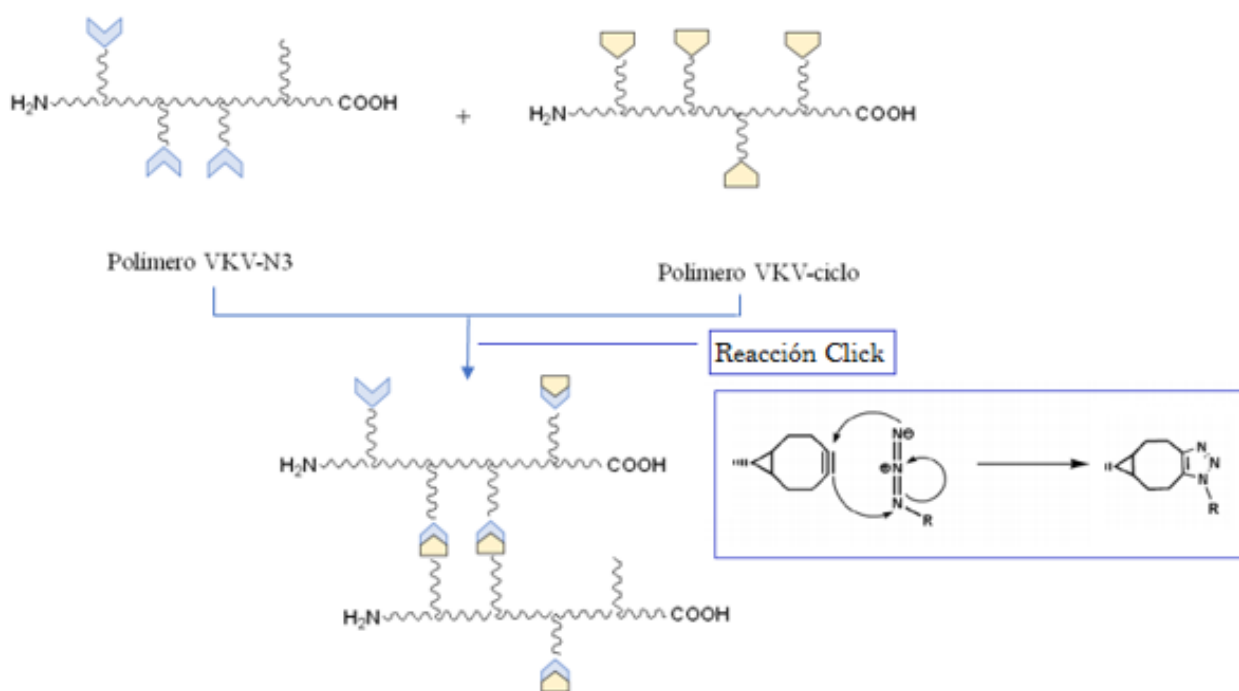


Fig.7.7. Esquema de la reacción click entre los polímeros VKV-N3 y VKV-ciclo para formar un polímero entrecruzado y por tanto el correspondiente hidrogel.

Siguiendo el protocolo del apartado 4.3. se prepararon 2 hidrogeles sin fármaco con concentraciones de 100mg/ml y 50 mg/ml con agua ultra pura, de los cuales uno tiene un volumen de 150 μ l y otro de 200 μ l con el fin de observar que, tras el entrecruzamiento de los polímeros y formación del hidrogel, las propiedades termosensibles de los polímeros se mantienen intactas.

Se midió su diámetro y su peso a 4°C y a 37° C, obteniéndose los siguientes resultados:

Hidrogel 1 (100mg/ml)

<i>Temperatura</i>	4°C		37°C	
<i>Hidrogel</i>	Diámetro	Peso	Diámetro	Peso
1 (150 μ l)	8,47mm	123,3mg	6,53mm	38,2mg
2 (200 μ l)	9,37mm	164,9mg	6,78mm	54,5mg

Tabla. 7.7. Datos de diámetro y peso obtenidos del hidrogel con concentración 100mg/ml.

Hidrogel 2 (50mg/ml)

<i>Temperatura</i>	4°C		37°C	
<i>Hidrogel</i>	Diámetro	Peso	Diámetro	Peso
1 (150 μ l)	8,40mm	142,3 mg	5,36 mm	46,5 mg
2 (200 μ l)	9,23mm	179,4 mg	6,53 mm	75,0 mg

Tabla. 7.8. Datos de diámetro y peso obtenidos del hidrogel con concentración 50mg/ml.

Se puede observar en ambas tablas que a temperaturas elevadas disminuye el grado de hinchamiento y por tanto el diámetro y peso del hidrogel, con respecto a temperaturas bajas. Esto se puede explicar por la temperatura de transición de los polímeros que forman el hidrogel que deberían estar en torno a 20°C por lo que la matriz se contrae sobre esas temperaturas, permitiendo una mayor salida de agua por difusión.

Además, si comparamos las concentraciones de los hidrogeles se puede observar que existe una pequeña diferencia en cuanto a la contracción, siendo menor a altas concentraciones puesto que presenta una ITT un poco superior con respecto a bajas concentraciones. (Apartado 1.1.4. Efecto de la concentración).



Fig. 7.8. Medida de hidrogeles a distinta temperatura. La de la izquierda representa un hidrogel a 4°C y la de la derecha un mismo hidrogel a 37°C.

❖ **Medidas Reológicas**

Se colocaron muestras de gel hinchado cilíndrico entre placas paralelas de acero inoxidable no poroso (diámetro = 12 mm) y se ajustó el espacio entre las placas para evitar el deslizamiento. Siempre se alcanzó un espacio de más de 1000 μm . Las mediciones se llevaron a cabo a 4 y 37 ° C.

A continuación, se midieron los hidrogeles para determinar las propiedades viscoelásticas, realizando ensayos dinamomecánicos de deformación y frecuencia para determinar los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') del sistema entrecruzado.

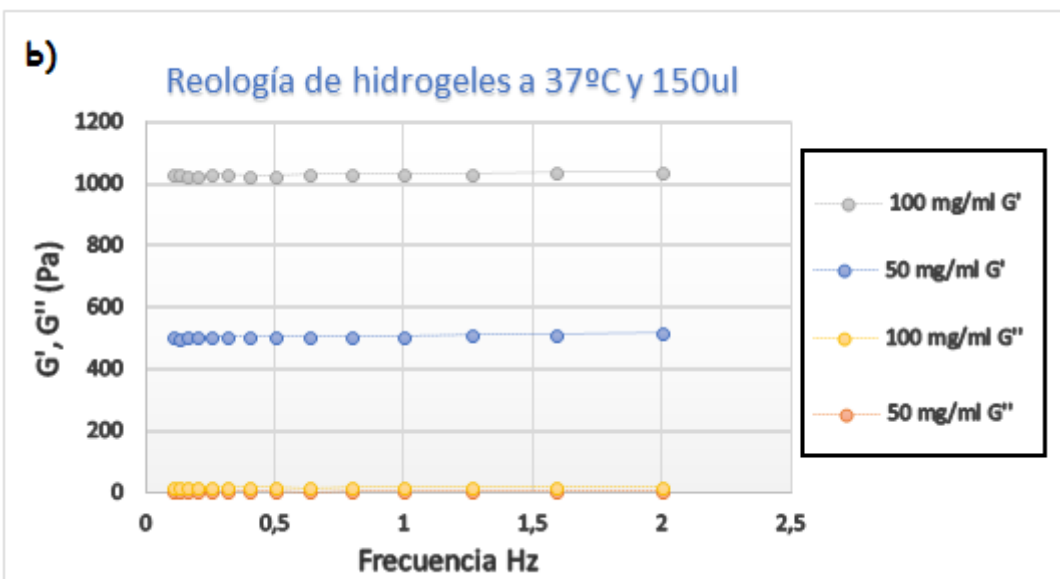
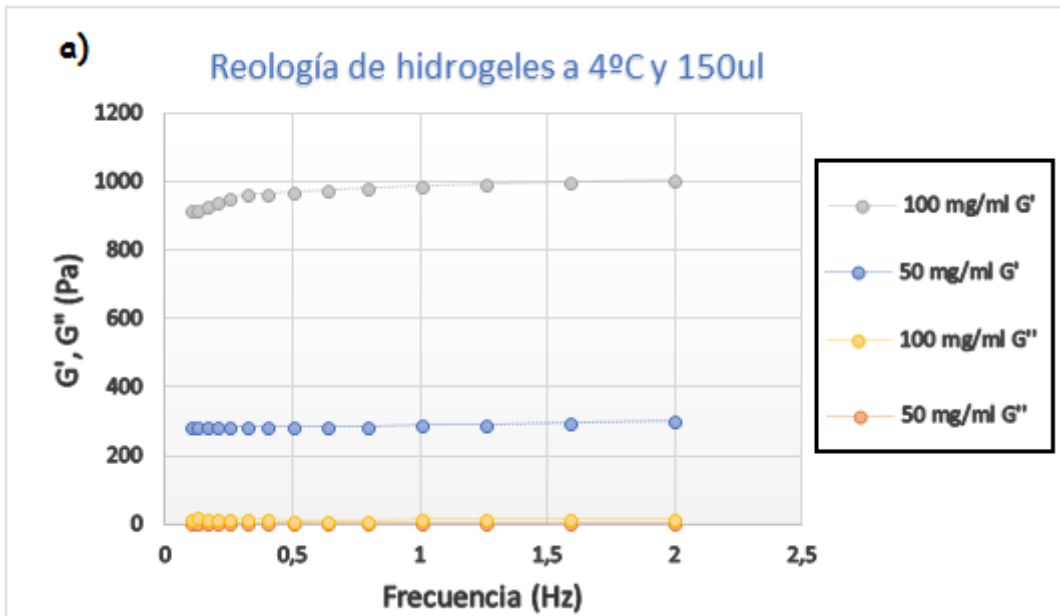
- Barridos de deformación

Los barridos de deformación se llevaron a cabo para determinar el rango de viscoelasticidad lineal, rango en el que el sistema presenta un comportamiento viscoelástico. El barrido de deformación se realizó variación la fuerza desde 0,01% hasta el 20%, a temperatura (37°C o 4°C) y frecuencia constante (1Hz).

- Barridos de frecuencia

Define las propiedades viscoelásticas del gel formado. El barrido de frecuencia se realizó con una fuerza del 1% y temperatura constante (37°C o 4°C), y una frecuencia entre 0,01-100Hz.

Se obtuvieron los siguientes gráficos en los que se representa los módulos G' y G'' (Pa) frente a frecuencia (Hz):



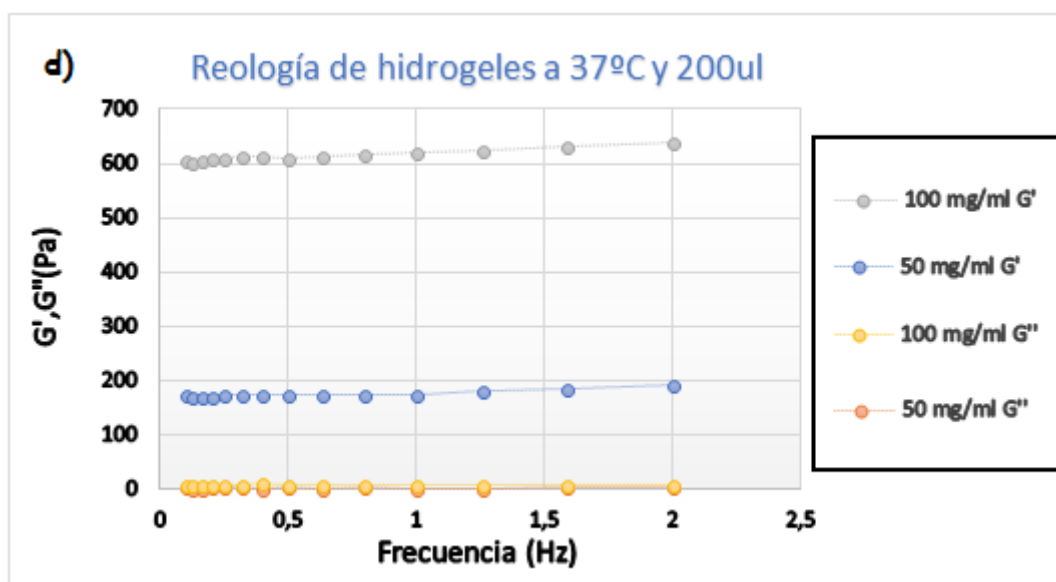
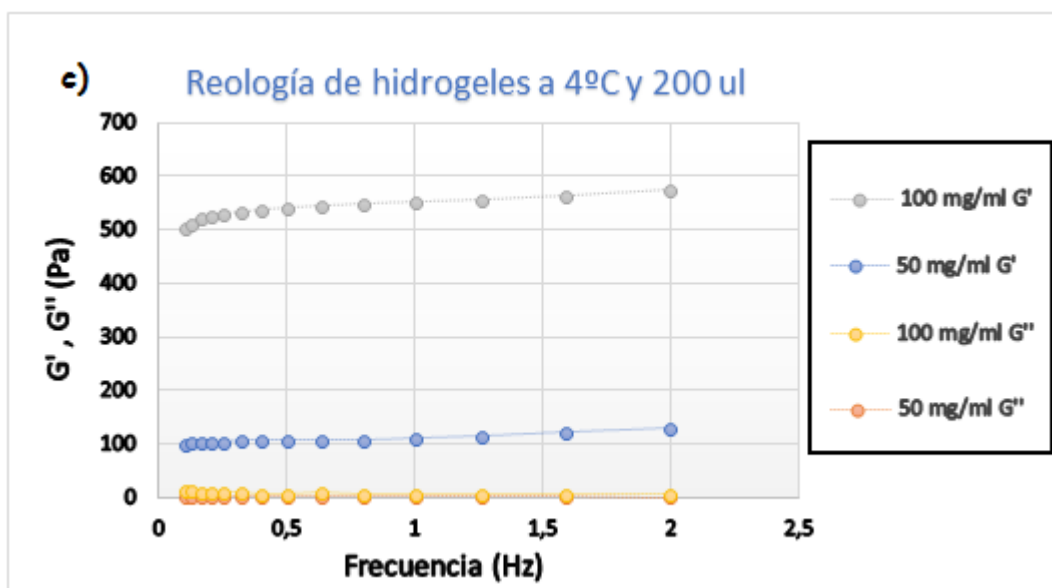


Gráfico. 7.10. Representación gráfica de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') frente a la frecuencia. a) a 4°C y 150 μ L b) a 37°C y 150 μ L c) a 4°C y 200 μ L d) a 37°C y 200 μ L.

<i>Temperatura (°C)</i>	4				37			
	150		200		150		200	
<i>Volumen de hidrogel (μL)</i>	50	100	50	100	50	100	50	100
<i>Concentración (mg/L)</i>	50	100	50	100	50	100	50	100
G'	301	1000	130	575	517	1042	192	637
G''	4	16	2	9	4	22	4	6

Tabla. 7.9. Valores del módulo de almacenamiento y pérdida en el punto máximo, para hidrogeles de 150 y 200 μ L en concentraciones de 50 y 100mg/L a las temperaturas de 4 y 37°C.

En reología es aconsejable tener un volumen de hidrogel en torno a los 400 μ L, por lo que el análisis será únicamente del hidrogel de 200 μ L puesto que se acerca más al límite de volumen.

Si se realiza un análisis general de las gráficas, podemos observar que el módulo de almacenamiento (G') es mayor que el módulo de pérdida (G''). Esto nos indica que el material es elástico. Además, a medida que aumenta la concentración del hidrogel hay un aumento en el módulo de almacenamiento y, por tanto, en la capacidad del material para restablecer la energía suministrada mecánicamente, haciéndolo más elástico.

Por otro lado, si se analiza los módulos con respecto a la temperatura se puede observar que a medida que aumenta la temperatura aumenta el módulo elástico, esto se debe a la estructura de los biopolímeros que contiene el hidrogel que pasan de una conformación estirada (desordenado) a una conformación enrollada (ordenado) lo que hace que el hidrogel tenga mayor capacidad para restablecer la energía suministrada y sea más elástico, disminuyendo el módulo de pérdida.

Si tenemos en cuenta la tangente de pérdida (apartado 6.5 reología) podemos medir la energía perdida en relación con la energía almacenada:

<i>Temperatura</i>	4°C		37°	
<i>Concentración</i>	50mg/ml	100mg/ml	50mg/ml	100mg/ml
<i>tg δ</i>	0,015	0,016	0,020	0,0094
<i>δ</i>	0,86	0,92	1,1	0,54

Tabla.7.10. Valores obtenidos de la tangente de pérdida y el ángulo de desfase en hidrogeles de 200 μ L a temperaturas de 4 y 37°C.

Podemos observar que a baja temperatura se pierde energía aproximadamente igual en ambos hidrogeles. A medida que aumenta la temperatura a concentraciones mayores el hidrogel tiene mayor capacidad de almacenar energía y pierde menos ya que es más elástico. Esto coincide con los análisis de concentración y temperatura analizados anteriormente y por tanto se puede concluir que cuanto mayor sea la concentración y se supere la temperatura de transición mayor será la elasticidad del hidrogel

7.3. Ensayos de liberación de fármaco acetazolamida de los hidrogeles obtenidos a través de química “click” .

Los hidrogeles para liberación controlada de fármacos tienen dos tipos importantes de sistemas: aquellos en los que el fármaco se encuentra disperso dentro de la matriz y aquellos en los que el principio activo está contenido en un reservorio o núcleo rodeado de una membrana polimérica que hace las funciones de pared controladora. En este caso, el fármaco se encuentra disperso en el seno de la matriz del hidrogel formado.

La difusión de la acetazolamida a través de la matriz ocurre como un movimiento molecular aleatorio debido a la existencia de un gradiente de concentración entre la fase polimérica (matriz) y la fase externa (medio), tendiendo a difundir hacia las zonas de menor concentración. Este proceso obedece la Primera Ley de Fick [40] que se describe de la siguiente manera:

$$J = -D \frac{dC_m}{dx}$$

Siendo J el flujo, C_m la concentración en la membrana, dC_m/dx el gradiente de concentración y D el coeficiente de difusión. El signo negativo indica la dirección del flujo hacia la zona de menores concentraciones del soluto.

Suponiendo que se ha liberado el fármaco de la matriz del hidrogel obedeciendo la ley de Fick se realizó varios ensayos a 35,5°C (con el fin de simular la temperatura de la superficie ocular y agitación orbital) y 60 rpm siguiendo el protocolo del apartado 5.4.

Antes de realizar la medición de absorbancia de la liberación de AZM se buscó la longitud de onda óptima para evaluar la acetazolamida y el resultado que este absorbía en un máximo de 1,46 a 264nm.

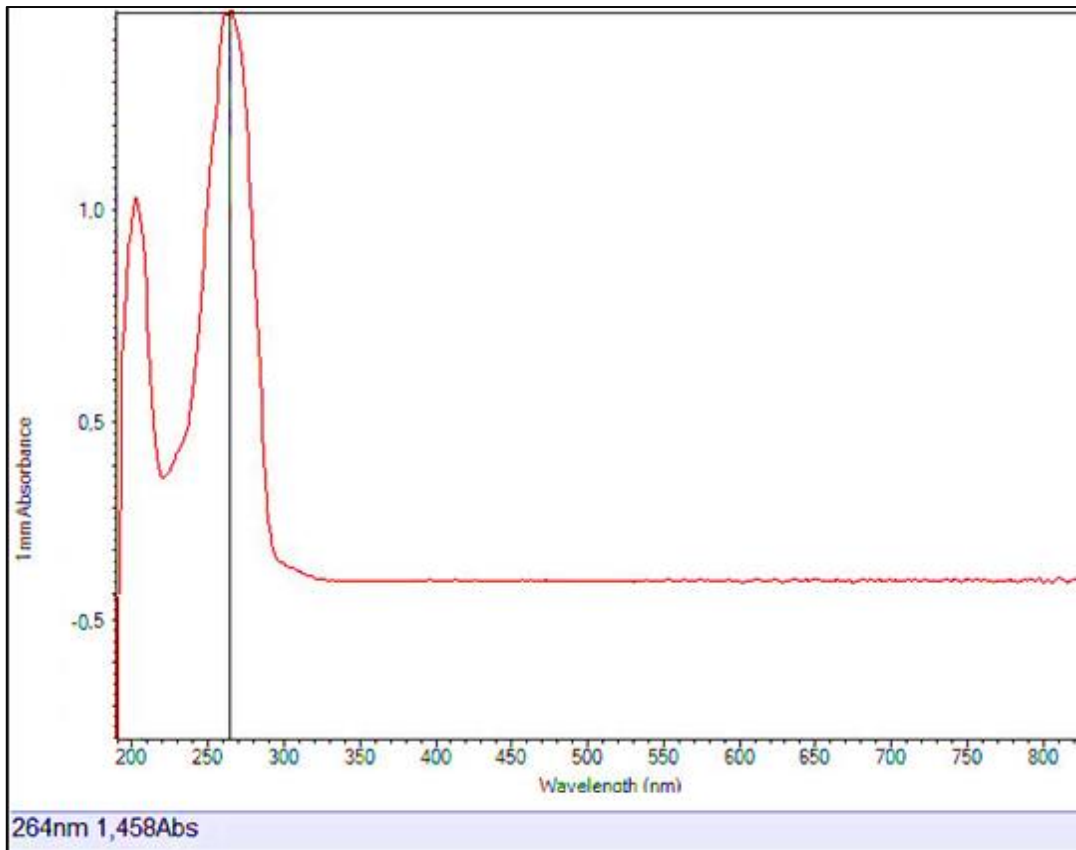


Gráfico 7.11. Representación de absorbancia frente a longitud de onda de la AZM.

Para realizar la conversión de absorbancia a masa liberada de fármaco fue necesario tener en cuenta los datos teóricos de la curva de calibrado de la acetazolamida.

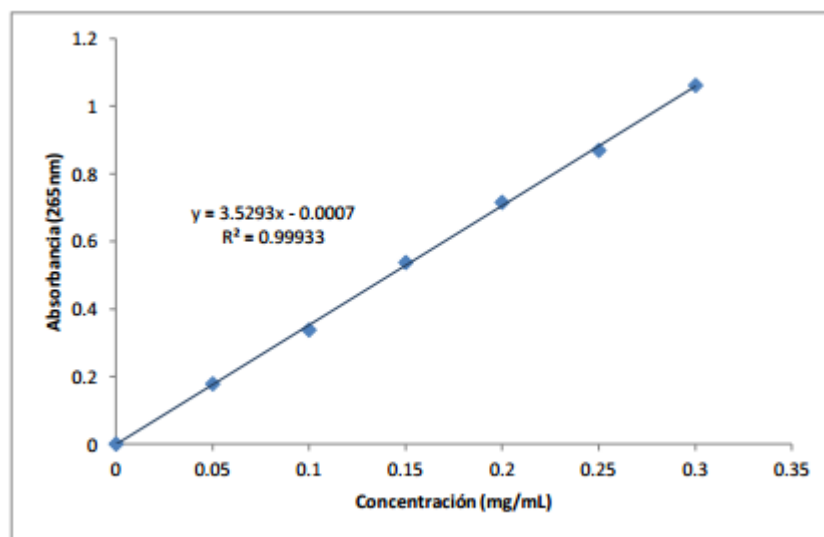


Gráfico.7.12 Concentración de AZM en mg/mL frente a la Absorbancia a 265nm. [41]

Como los hidrogeles poseen un volumen de 150 μL y la concentración de fármaco en dicho hidrogel es de 1,5mg/mL la máxima cantidad de AZM que se puede liberar es de 0,22mg/hidrogel.

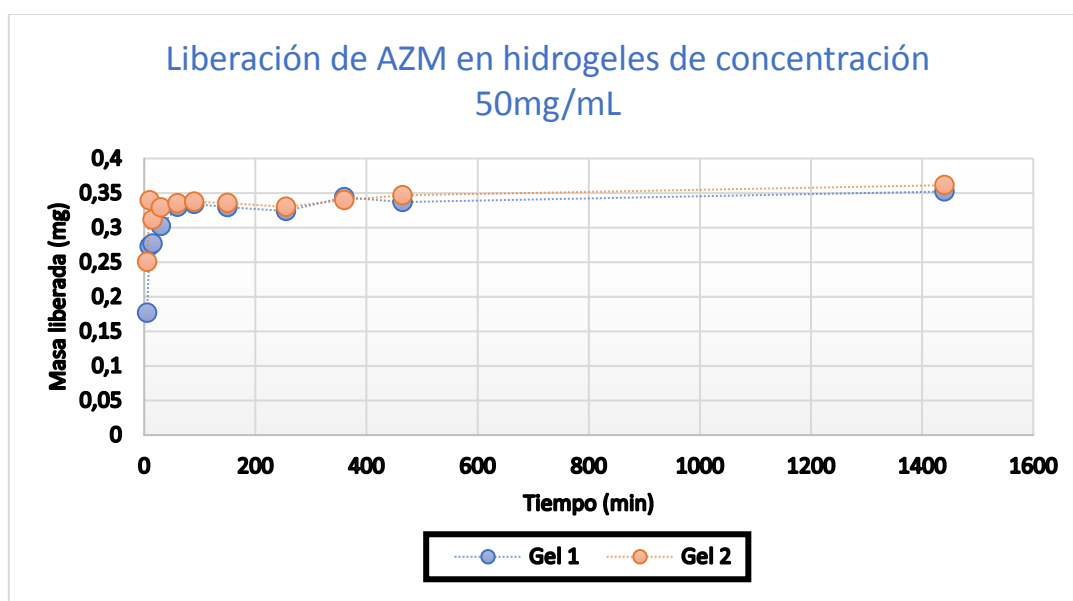


Gráfico 7.13. Representación de la masa liberada de AZM frente al tiempo para hidrogeles duplicados en concentración 50 mg/mL en agua ultrapura.

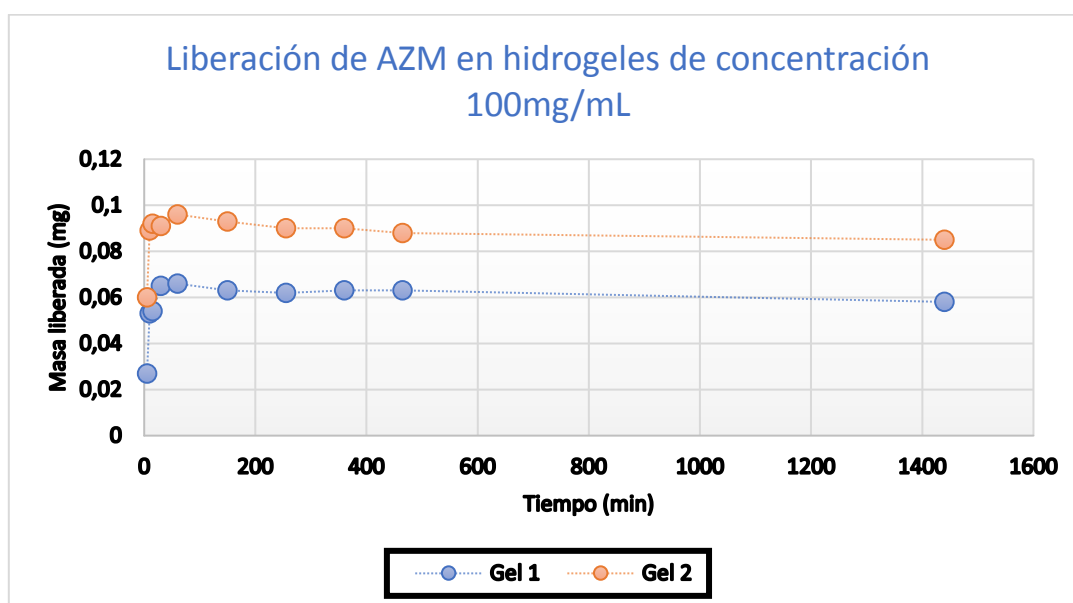


Gráfico 7.14. Representación de la masa liberada de AZM frente al tiempo para hidrogeles duplicados en concentración 100 mg/mL en agua ultrapura.

En 24 h la cantidad de fármaco liberado en los hidrogeles de concentración 50 mg/mL fue de 0,35 mg para el hidrogel 1 y 0,36 mg para el hidrogel 2. Sin embargo, se puede observar cómo para los hidrogeles de 100mg/mL, la liberación se ha producido de una manera menos homogénea, siendo la cantidad de acetazolamida liberada tras un período de 24h fue de 0,058 mg para el hidrogel 1 y de 0,085 mg para hidrogel 2, lo que nos indica que la liberación se da antes en los hidrogeles de 50mg/ml puesto que cuanto más diluido es el gel mayor cantidad de hidrogel libera.

<i>Masa liberada</i>	Hidrogel 1	Hidrogel 2	Masa media
<i>50 mg/mL</i>	0,35 mg	0,36 mg	0,36 mg
<i>10 mg/mL</i>	0,058 mg	0,085 mg	0,072 mg

Tabla 7.11. Valores de masa liberada de los hidrogeles a 50mg/mL y 100mg/mL

La conclusión que se obtiene en este estudio es que los hidrogeles de concentración menor, 50 mg/mL, ofrecen un perfil de liberación más rápido que los de mayor concentración, 100 mg/mL, durante las primeras horas de la liberación, por lo que un aumento en la concentración del hidrogel retarda la liberación del fármaco, lo que es de utilidad en este tratamiento, ya que favorecería un recambio de la lente en tiempo mayor.

Utilizando este dispositivo como sistema de encapsulamiento de acetazolamida, se obtendría una nueva vía de administración mucho más directa, ya que el fármaco actuaría directamente en la zona afectada, y menos dañina que la vía oral, que puede ocasionar graves efectos secundarios en órganos internos. Además, al actuar directamente en la zona dañada, las cantidades de fármaco necesarias durante el tratamiento serían menores.

8. CONCLUSIONES

Se logró bioproducir y purificar el polímero tipo elastina VKVx24 con un rendimiento de 260 mg/L.

La caracterización del polímero VKVx24 indicó que la producción y purificación de este se había realizado con éxito, además de que se pudo obtener datos de su PM aparente según la técnica de electroforesis SDS-PAGE (61,15KDa) y la temperatura de transición (34°C a pH básico).

Se modificó químicamente el polímero VKVx24 introduciendo grupos ciclooctino y azido mediante reacciones de sustitución a lo largo de la cadena polimérica obteniéndose los polímeros VKV-N3 y VKV-ciclo con rendimientos del 47,5% y 55,6% en relación a la masa inicial, respectivamente. Tras su caracterización, se demostró que para el polipéptido VKV-N3, 13 de las 24 lisinas fueron modificadas con un porcentaje de sustitución del 54% en relación a una equivalencia de 0,6 por lo que el rendimiento de sustitución fue del 90% en cambio para el polipéptido VKV-ciclo se modificaron 12 de las 24 lisinas obteniéndose un porcentaje de sustitución del 50% en relación a una equivalencia de 0,6 por lo que el rendimiento de sustitución fue del 83%.

Mediante la reacción de ciclo-adición 1,3 dipolar (química “click”) entre los polímeros VKV-ciclo y VKV-N3 se consiguió formar hidrogeles de los cuales se estudió sus propiedades físicas y mecánicas llegando a la conclusión que a medida que aumenta la concentración del hidrogel menor capacidad tiene de contraerse, por tanto, permitirá menor salida de agua y presenta mayor elasticidad. Con respecto a la temperatura, a mayor temperatura el hidrogel es más elástico, posee mayor capacidad de contracción y por tanto, permitirá mayor salida de agua al exterior.

También, mediante la química click se formaron hidrogeles encapsulados con fármaco acetazolamida con agua ultra pura como disolvente. Los ensayos de liberación mostraron que a 50 mg/mL y a 100 mg/mL se libera 0,36 mg y 0,072 mg de AZM respectivamente. Esto indica que un aumento en la concentración del hidrogel retarda la liberación del fármaco, lo que parece ser adecuado para la utilización de este dispositivo como sistema de liberación controlada de fármacos para tratamiento del glaucoma vía tópica.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. **Real D.** *Estudio del efecto de pH y la temperatura en la liberación controlada de teofilina a partir de hidrogeles de redes interpenetradas formadas por Poli(acrilamida) y Poli(ácido-γ-glutámico).* Tesis Doctoral. Universidad de Sonora México. 2010.
2. **Chilkoti A, MacEwan S.R.** *Applications of elastin-like polypeptides in drug delivery.* Journal of Controlled Release. 2014; 190:314-330.
3. **Gray WR, Sage EH.** *Evolution of elastin structure.* Adv Exp Med Biol. 1977; 79:291-312.
4. **Arias FJ, López I, Martín S, Rebotto V, Rodríguez-Cabello JC.** *Tailored recombinant elastin like polymers for advanced biomedical and nano(bio) technological applications.* Biotechnol Lett 2006; 28:687-695
5. **Alonso M, Arias FJ, Martín L, Rodríguez-Cabello JC, Testera AM.** *“Recombinamers” as advanced materials for the post-oil age.* Polymer 2009; 50:5159-5169.
6. **Urry DW.** *What sustains life? Consilient mechanisms for protein-based machines and materials.* Springer-Verlag, 2006.
7. **Gowda DC, Parker TM, Reid MC, Urry DW.** *Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(GVGVP) and Its Gamma-Irradiation CrossLinked Matrix - Summary of Generic Biological Test-Results.* Journal of Bioactive and Compatible Polymers 1991; 6:263-282.
8. **Betre H, Chilkoti A, Liu W, Zalutsky MR et al.** *A thermally responsive biopolymer for intra articular drug delivery.* Journal of Controlled Release 2006; 115:175-182.
9. **Mithieux SM, Rasko JE, Weiss AS.** *Synthetic elastin hydrogels derived from massive elastic assemblies of self-organized human protein monomers.* Biomaterials 2004; 25:4921-4927.
10. **Balderrama F, Cui W, Martinez AW, Sallach RE et al.** *Long-term biostability of self assembling protein polymers in the absence of covalent crosslinking.* Biomaterials 2010; 31:779-791.
11. **Bellingham CM, Keeley FW, Woodhouse KA.** *Elastin as a self-organizing biomaterial: use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin.* Philosophical

- Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 2002; 357:185-189.
12. **Prasad KU, Trapane TL, Urry DW.** *Phasestructure transitions of the elastin polypentapeptide-water system within the framework of composition-temperature studies.* Biopolymers 1985; 24:2345-2356.
 13. **Reguera J.** *Estudio de la transición inversa con la temperatura en polímeros tipo elastina con creciente funcionalidad.* Tesis doctoral. Universidad de Valladolid 2008
 14. **Li B, Alonso DO, Daggett V.** *The molecular basis for the inverse temperatura transition of elastin.* Journal of molecular biology 2001; 305(3):581 – 592.
 15. **Prasad KU, Trapane TL, Urry DW.** *Phase-structure transitions of the elastin polypentapeptide-water system within the framework of compositiontemperature studies.* Biopolymers 1985; 24:2345-2356.
 16. **Alonso M, Herguedas MM, Perez T, Rodríguez-Cabello JC.** *Differential scanning calorimetry study of the hydrophobic hydration of the elastin-based polypentapeptide, poly(VPGVG), from deficiency to excess of water.* Biopolymers 2000; 54:282-288.
 17. **Gowda DC, Harris CM, Harris RD, Luan CH, Parker TM, Pattanaik A, Reid MC, Urry DW.** *Hydrophobicity Scale for Proteins Based on Inverse Temperature Transitions.* Biopolymers 1992; 32:1243-1250
 18. **Urry DW.** *Molecular Machines - How Motion and Other Functions of Living Organisms Can Result from Reversible Chemical-Changes.* Angew Chem.-Int. 1993; 32:819-841.
 19. **Müller HR, Stackelberg MV.** *Zur Struktur der Gashydrate.* Naturwissenschaften 1951; 38:156-458.
 20. <http://drsoler.com/problema-de-vision/glaucoma> (Última consulta:11/6/18)
 21. **Verger E.** *¿Qué es el humor acuoso?* Ciencia today. 2017
 22. <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=1460> (Última consulta: 14/6/2018)
 23. **Lindskog S.** *Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase.* Pharmacol Thu 1997; 74:1-20.
 24. **Baños JE, March M.** *Farmacología ocular.*UPC 2002; 156-157
 25. **Chotai NP, Nagda CD, Patel UL.** *Design and evaluation of ocular drug delivery system for controlled delivery of gatifloxacin sesquehydrate: In vitro*

- and in vivo evaluation*. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2012; 17(1):15-22.
26. **Jarvinen T, Loftsson T**. *Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Review*. 1999; 36(1):59-79.
27. **Lee P, Stevin G, et al.**, *Manufacturing and Production Technology*, 333, (1990).
28. **Díaz D, Hawker CJ, Finn MG, Fokin VV, Sharples KB**. *Cicloaddición 1,3 - dipolar de azidas y alquinos. I: Principales aspectos sintéticos*. *An.Quím.* 2008; 104:173-180
29. **Huisgen, R**. *1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future*. *Angew Chem* 1963; 2:565-598.
30. **Christensen C, Meldal MJ, Tornøe CW**. *Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides*. *J. Org. Chem* 2002; 67:3057–3064
31. **Bertozzi CRJ, Gard NJ, Prescher JA.;** *A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems*. *J. Am. Chem. Soc* 2004; 126:15046–15047
32. <https://es.slideshare.net/pablolongonius/crecimiento-bacteriano-ilse-valderrama> (Última consulta:11/6/18)
33. **Chilkoti A, Meyer DE**. *Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides*. *Nat. Biotechnol.* 1999; 17:1112–1115
34. **Alonso M, González de la Torre I, Quintanilla L, Rodríguez Cabello JC, Santos M, Testera A**. *Elastin-like recombinarme catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties*. *Acta Biomaterials*. 2014; 10:2495-2505
35. **Pungor E**. *A Practical Guide to Instrumental Analysis*. Boca Raton. 1995; 181-191.
36. **Maizel JV, Shapiro AL, Viñuela E**. *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967; 28:815-820
37. <http://noria.mx/lublearn/espectrometria-infrarroja-por-transformadas-de-fourier/> (Última consulta:11/6/18)

38. **Soledad MM.** *Síntesis y caracterización de hidrogeles alginato y n-isopropilamina para aplicaciones biomédicas.* Tesis doctoral. Universidad nacional del Sur. 2013
39. http://parts.igem.org/Part:BBa_K1317003 (Última consulta:11/6/18)
40. **Matsui Y, Kawashima Y, Sugihara H, Takeuchi H, Thongborisute J, Yamamoto H.** *Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems.* Advanced Drug Delivery Reviews 2005; 57:1583 - 1594
41. **Hidalgo. A.** *Obtención de hidrogeles químicos mediante metodología "click" a partir de polímeros tipo elastina para el tratamiento del glaucoma.* TFM. Universidad de Valladolid. 2016