



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

MODIFICACIÓN DE SOPORTES POLIMÉRICOS PARA LA DOSIFICACIÓN DE FÁRMACOS MEDIANTE NANOPARTÍCULAS

Autora: Marta del Val Armesto

Tutor/es: Francisco Javier Arias Vallejo

Purificación Cuadrado Curto

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Javier Arias y Purificación Cuadrado, por darme la oportunidad de realizar de este Trabajo de fin de Carrera.

A todos y cada uno de los compañeros del grupo BioForge, entre ellos Miguel, Juan, Marcos, Fernando y por supuesto Rocío y Merche.

A Tamara, compañera de Trabajo y Universidad.

Y finalmente, a Javier Gamazo.

Os agradezco a todos vuestro empeño y dedicación, pues no habría sido posible llevar a cabo este trabajo sin cada uno de vosotros.

ÍNDICE

Índice de abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract.....	3
1. Introducción y antecedentes bibliográficos	4
1.1 Elastina natural	4
1.2 Polímeros tipo elastina (ELRs)	4
1.3 Tecnología ADN recombinante	5
1.4 Transición inversa con la temperatura (ITT)	6
1.5 Polímero VKVx24	8
1.6 Química “click”	8
1.6.1 Contexto histórico.....	9
1.6.2 Reacciones 1,3-dipolar o cicloadiciones [3+2].....	9
1.7 Nanogeles.....	12
1.8 “Drug delivery”.....	13
1.9 Infecciones oculares.....	13
1.9.1 Vancomicina	15
1.10 Mucoadhesión entre nanopartículas y mucinas	16
1.10.1 Mucinas.....	16
2 Objetivos y plan de trabajo.....	18
3 Materiales y métodos.....	20
3.1 Materiales	20
3.2 Métodos	23
3.2.1 Bioproducción del polímero VKVx24.....	23
3.2.1.1 Selección de colonias	23
3.2.1.2 Fermentador, cultivo y control externo del inóculo	24
3.2.1.3 Control del crecimiento	27
3.2.1.4 Lavado de la biomasa	28
3.2.1.5 Ruptura de la bacteria y obtención del polímero	28
3.2.1.6 Purificación	28
3.2.1.7 Diálisis	30
3.2.1.8 Liofilización	30
3.2.2 Técnicas de caracterización	31

3.2.2.1	Electroforesis	31
3.2.2.2	Espectrometría UV-Vis	34
3.2.2.3	Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN- ¹ H)	34
3.2.2.4	Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)	35
3.2.2.5	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	35
3.2.2.6	Dynamic light scattering (DLS)	37
3.3	Modificación del polímero VKVx24	38
3.3.1	Modificación del polímero VKVx24 con un compuesto azida para la formación de VKV-azida.....	38
3.3.2	Modificación del polímero VKVx24 con un derivado de ciclooctino para la formación de VKV-ciclo.....	39
3.3.3	Química “click” entre los polímeros modificados VKV-azida y VKV-ciclo.....	40
4	Resultados y discusión	41
4.1	Bioproducción del polímero VKVx24	41
4.1.1	Caracterización del polímero VKVx24	47
4.2	Síntesis, caracterización y rendimiento de los polímeros modificados VKV-azida y VKV-ciclo	50
4.2.1	Síntesis del polímero VKV-azida	50
4.2.1.1	Caracterización del polímero VKV-azida	52
4.2.2	Síntesis del polímero VKV-ciclo.....	54
4.2.2.1	Caracterización del polímero VKV-ciclo.....	56
4.2.3	Rendimientos de los polímeros VKV-azida y VKV-ciclo	58
4.3	Entrecruzamiento de los polímeros modificados VKV-azida y VKV-ciclo....	60
4.4	Formación de las nanopartículas a 4°C y 37°C	62
4.4.1	Formación a 4°C tras 40min y 48h en la cámara fría.....	62
4.4.2	Formación a 37°C tras 40min y 48h en la estufa	63
4.5	Caracterización de las nanopartículas	64
4.6	Formación de las nanopartículas con el fármaco	66
4.6.1	Comprobación de su estabilidad.....	67
4.7	Ensayos de liberación	69
4.7.1	Medida de la absorbancia de las nanopartículas con el fármaco mediante Espectrometría UV-Vis	71

5	Conclusiones	76
6	Bibliografía.....	78
7	Listado de Imágenes y Tablas	82
	7.1 Imágenes	82
	7.2 Tablas.....	87

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CuAAC: Cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (I) o *Copper-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition*

DLS: Dispersión dinámica de luz o *Dynamic light scattering*

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

ELR: Recombinámico tipo elastina ó *Elastin like recombinamers*

Et₂O: Éter etílico, dietil éter

FT-IR: Infrarrojo con Transformada de Fourier

ITC: *Inverse Transition Cycling*

ITT: Transición inversa con la temperatura

MQ: miliQ

NPs: Nanopartículas

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: Tampón fosfato salino ó buffer fosfato salino

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PSA: Persulfato amónico

RF: Radiofrecuencia

RMN: Resonancia magnética nuclear

SDS: Dodecilsulfato sódico

TEMED: Tetrametiletiledi-amina

TRIS: TrishidroximetilaminoMETANO

Resumen

Los recombinámeros tipo elastina (ELRs) son biomateriales basados en biopolímeros proteicos recombinantes, es decir, producidos por tecnología de ADN recombinante, lo que permite el control completo de su estructura y secuencia de aminoácidos.

Presentan gran uso en biomedicina y biociencia, además de interés clínico. En la actualidad, tienen importancia en el ámbito de la nanotecnología, facilitando numerosas aplicaciones. Entre ellas se encuentran la liberación controlada de fármacos (como geles o nanopartículas) o Ingeniería de tejidos (intercambio de un biomaterial por otro modificado que cumpla la misma función), entre otras.

La denominada química “click” es una de las opciones utilizada para la formación de estos geles ya permite la preparación de estructuras complejas a partir de la unión de moléculas más pequeñas a través de reacciones rápidas y no reversibles.

Con esta química, las lisinas de los ELRs son transformadas en grupos funcionales azida y ciclooctino. Estos grupos reaccionan entre sí entrecruzándose, y formando estructuras a nivel macro, micro o nano, dependiendo de la cantidad de biopolímero utilizada.

Uno de los usos de los nanogeles, es la dosificación de fármacos en infecciones graves y localizadas. Sus características (biocompatibilidad, estructura tridimensional o lineal, en función de la temperatura, y el grado de “hinchamiento”) les hacen materiales óptimos para ello. El fármaco escogido para desarrollar este trabajo es la Vancomicina, antibiótico activo frente a enfermedades infecciosas como por ejemplo la endocarditis, osteomielitis y neumonía.

Abstract

The elastin like recombinamers (ELRs) are biomaterials based on recombinant protein biopolymers, that is, produced by recombinant DNA technology, which allows complete control of their structure and amino acid sequence.

They present great use in biomedicine and bioscience, as well as clinical interest. Currently, they are important in the field of nanotechnology, facilitating numerous applications. These include the controlled release of drugs (such as gels or nanoparticles) or tissue engineering (exchange of a biomaterial with a modified one that fulfills the same function), among others.

"Click" chemistry is one of the options used for the formation of these gels and allows the preparation of complex structures from the union of smaller molecules through rapid and non-reversible reactions.

With this chemistry, the lysines of the ELRs are transformed into azide and cyclooctin functional groups. These groups react with each other by cross-linking, and forming structures at the macro, micro or nano level, depending on the amount of biopolymer used.

One of the uses of nanogels is the dosage of drugs in serious and localized infections. Their characteristics (biocompatibility, three-dimensional or linear structure, depending on the temperature, and the degree of "swelling") make them optimal materials for this. The drug chosen to develop this work is Vancomycin, an active antibiotic against infectious diseases such as endocarditis, osteomyelitis and pneumonia.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.1 Elastina natural

La elastina es una proteína elástica del tejido conjuntivo cuyo precursor es la tropoelastina. Se puede encontrar allí donde el tejido sufre ciclos repetitivos de extensión-relajación, como arterias, tendones, ligamentos, pulmones, etc. Presenta propiedades elásticas, siendo la más característica la alta resistencia a la fatiga, lo que la hace extremadamente duradera (vida media de unos 70 años)^{1,2}.

El 90% de sus aminoácidos son de resto lateral apolar, entre ellos destacan la prolina (P), alanina (A), leucina (L), isoleucina (I), valina (V) y glicina (G), siendo estos dos últimos los más abundantes. Estas secuencias hidrofóbicas son repetitivas y pueden describirse como una colección de repeticiones más o menos superpuestas de di-, tri-, tetra-, penta-, hexa- y nona-péptidos. Entre estas secuencias se encuentran VPG, VPGG, IPGVG...siendo la más común VPGVG, la cual aparece en fragmentos que se repiten un total de 11 veces consecutivas, (VPGVG)₁₁³.

1.2 Polímeros tipo elastina (ELRs)

Las proteínas recombinantes tipo elastina o ELRs (Elastin Like Recombinamers) son una clase de biomateriales cuya estructura y secuencia de aminoácidos es conocida ya que están diseñados y producidos por tecnología de ADN recombinante combinada con la biotecnología para expresión.

Están contruidos a partir de las secuencias de la elastina natural (VPG, VPGG, GVGVP, IPGVG, VGGVG...), pero se han sintetizado con la fórmula general VPGXG, donde X representa cualquier aminoácido excepto la prolina³. Asimismo, su composición se puede modificar fácilmente para alterar sus propiedades físicas y utilizarlos como productos terapéuticos⁴.

A finales del siglo XX se detallaron las técnicas moleculares que sustentan estas tecnologías de 'polímeros de proteínas' por primera vez. Además, en comparación con los polímeros (convencionales) obtenidos a través de la química

tradicional, estos biomateriales pueden servir como alternativas viables a aplicaciones clínicas.

Últimamente presentan gran interés en el campo de la medicina y nanotecnología, ya que están dotados de propiedades como alta biocompatibilidad, comportamiento inteligente, capacidad de autoensamblaje, compleja bioactividad... que ofrecen un camino hacia una nueva vía de ingeniería de diseños poliméricos con un rendimiento potencial más allá del alcance de cualquier otra familia de polímeros^{5,6}.

Las propiedades de estos polímeros (y de la elastina de la que proceden) cambian según la temperatura. Su sensibilidad térmica se caracteriza por una temperatura de transición (T_t), a la cual las cadenas de polímero son solubles en agua por debajo de la T_t , y se autoensamblan por encima de ésta, haciéndose insolubles. Este proceso es completamente reversible⁷.

1.3 Tecnología ADN recombinante

La tecnología de ADN recombinante (combinada con la biotecnología para la expresión) es el conjunto de técnicas que permiten aislar un gen de un organismo, para su posterior manipulación e inserción en otro diferente, pudiéndose conseguir que un organismo (animal, vegetal, bacteria, hongo) o un virus produzca una proteína que le sea totalmente extraña.

El desarrollo de las técnicas de ADN recombinante ofrece ventajas en múltiples campos, entre ellos el campo de la investigación, industria biotecnológica, medicina⁸... siendo el caso más característico la bioproducción de insulina mediante una bacteria modificada genéticamente. Además, las tecnologías de ADN han permitido que estos materiales basados en proteínas sean sintetizados manteniendo un control preciso de la cadena, así como de su complejidad, longitud, estequiometría y monodispersidad⁹.

Para la producción de numerosos polímeros se utiliza esta tecnología y uno de los anfitriones más importantes y conocidos por sus características, la bacteria *Escherichia coli*. Es decir, partiendo de una cepa bacteriana de *E coli* a la que se le implanta el ADN recombinante (un plásmido con el gen de interés), siendo éste capaz de replicarse autónomamente dentro de ellas, se consigue obtener el polímero deseado.

Por otra parte, el plásmido de expresión contiene un gen que proporciona resistencia a un antibiótico (ampicilina entre otros), lo que permite seleccionar específicamente aquellas células que contienen el plásmido de interés.

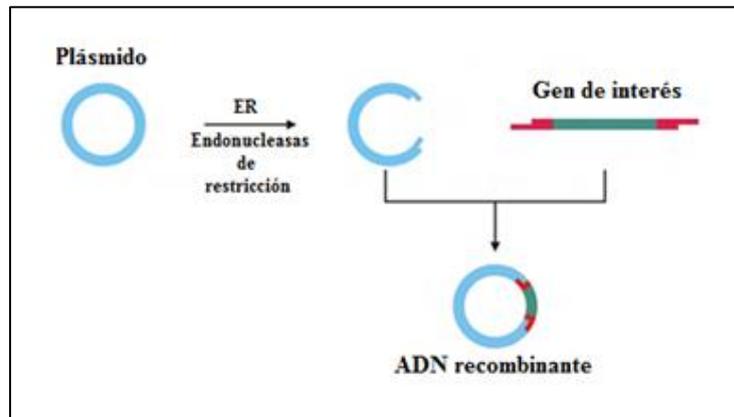


Imagen 1 Estructura del ADN recombinante¹⁰.

1.4 Transición inversa con la temperatura (ITT)

La característica más interesante de los ERLs es su comportamiento inteligente con la temperatura. Estos polímeros muestran una transición conformacional dependiente de la temperatura, pasando de un estado de desorden a otro más ordenado cuando se aumenta la temperatura. Esto es lo que se considera “transición inversa con la temperatura” (ITT)¹¹, un proceso completamente reversible que ocurre como consecuencia de una asociación apolar (o hidrófoba) que lleva asociado un aumento de orden, dando lugar a una estructura tipo espiral β (*Imagen 6*).

La ITT está caracterizada por un cambio de propiedades en torno a la denominada temperatura de transición (T_t). Es decir, mientras que las cadenas de polímero son solubles en agua por debajo de la T_t , se agregan en nano- y micropartículas por encima de ésta, haciéndose insolubles.

La temperatura de transición en el dominio elastomérico VPGVG (1.5) se ve afectada y/o modificada por factores intrínsecos tales como la concentración del propio polímero (VPGVG), el peso molecular, cambios en la composición aminoacídica del

polímero VPGVG, la propia longitud de la cadena polimérica...y extrínsecos como los efectos de sales en disolución, efectos de presión...¹²

La explicación termodinámica de la ITT se explica en función de la energía libre de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Al aumentar la temperatura (T), el polímero se pliega y se rompe la estructura tipo clatrato que formaban las moléculas de agua, lo que ocasiona un mayor desorden en el entorno y como consecuencia se produce un aumento del valor entrópico ($\uparrow\Delta S > 0$). Debido a esto, la Energía de Gibbs es negativa ($\Delta G < 0$) y el plegamiento del polímero es un proceso espontáneo.

Es decir, por un lado, en disolución acuosa y por debajo de su temperatura de transición (T_t), las cadenas peptídicas libres (formadas por múltiples repeticiones de la secuencia VPGVG) se encuentran desordenadas e hidratadas, formando las moléculas de agua alrededor de estos aminoácidos hidrofóbicos, una estructura tipo clatrato.

Por el contrario, por encima de su T_t , la cadena polimérica adquiere una estructura tipo espiral β (debido a que las horquillas β de la secuencia VPGVG se disponen unas encima de otras) debido a que los clatratos de agua pierden esta conformación como consecuencia de la agitación térmica, plegándose así la cadena hidrofóticamente, y autoensamblándose. En este caso la hidratación se reduce pero se mantiene en un 25% de agua.

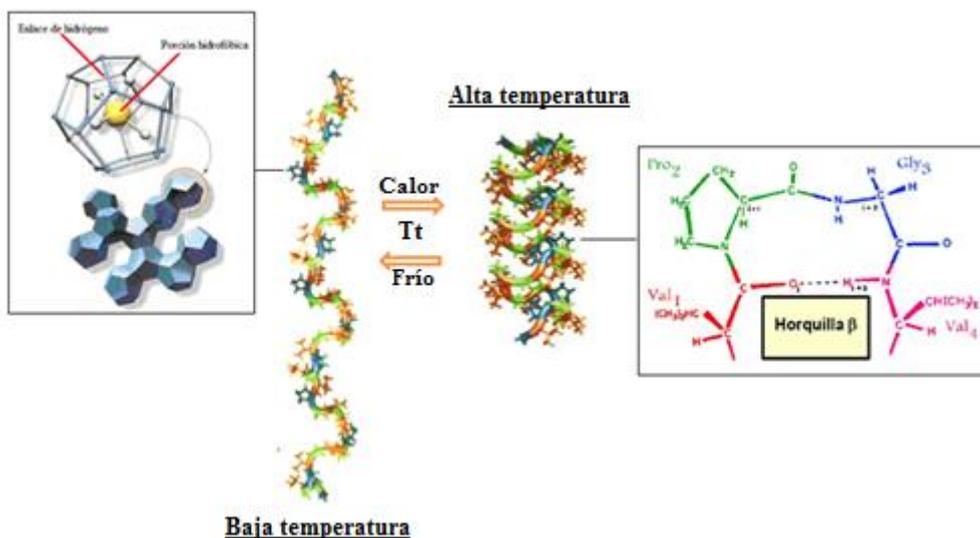


Imagen 2 Representación de la cadena polimérica extendida por encima de la T_t y plegada por debajo de la T_t ¹³.

1.5 Polímero VKV_{x24}

El polímero con el que se va a trabajar en este caso está formado por una secuencia de iniciación (MESLLP) que incide en la expresión del polipéptido, y otra de repetición que proporciona las características especiales del polímero. Ésta segunda contiene repeticiones de la secuencia de aminoácidos (VPGXG)_n siendo “X” el residuo huésped, que en este caso será lisina o valina. (Tabla 1).

La fórmula de la cadena peptídica es MESLLP VG VPGVG [VPGKG VPGVG VPGVG VPGVG VPGVG VPGVG VPGVG VPGVG]₂₄, y está formada por los aminoácidos metionina (M), ácido glutámico (E), serina (S), y lisina (K), que se encuentran en su forma L, excepto la lisina (los demás se encuentran citados en el punto 1.1).

En la cadena polipeptídica existen dos dominios: el dominio elastomérico y el dominio de entrecruzamiento. El primero (formado por la secuencia VPGVG) es responsable de las propiedades mecánicas, y el segundo (formado por la secuencia VPGKG) de los posibles entrecruzamientos de cadena mediante la participación del grupo amino de la cadena lateral del residuo lisina.

La temperatura de transición (T_t) y su carga neta dependen del pH, ya que a pHs neutro y ácido se protonan el grupo amino libre de las lisinas y del extremo de la cadena peptídica (dependiendo del pKa); y en cambio a pH básico, el carboxilato se encuentra cargado negativamente.

Secuencia de iniciación	Secuencia de repetición	Peso molecular teórico (Da)	Punto isoeléctrico teórico
MESLLP	[VPGKG VPGVG VPGVG VPGVG VPGVG] ₂₄	60462	11,04

Tabla 1 Fórmula de la cadena peptídica del polímero VKV_{x24}.

1.6 Química “click”

Se denomina química “click” al grupo de reacciones químicas cuya velocidad de reacción es favorable. Actualmente, esta química está proporcionando nuevos caminos en el ámbito de la ciencia biomédica, y la investigación de nanopartículas, donde mostró su prometedor potencial¹⁴.

1.6.1 Contexto histórico

En el año 2001, Sharpless introduce el concepto de química “click” inspirado en el hecho de que en la naturaleza se generan nuevas sustancias al unir pequeñas unidades moleculares. Esta química permite, vía enlaces C-heteroátomo, el ensamblaje de pequeñas unidades estructurales en moléculas complejas, a través de procesos sencillos que se ajustan a un número limitado de reacciones químicas¹⁵.

Estas reacciones son rápidas, no reversibles y transcurren con altos rendimientos, proporcionando productos prácticamente puros (o con pocas impurezas) y estables, que se podrán separar por procedimientos sencillos, sin recurrir a la cromatografía.

Algunas de las reacciones que se incluyen dentro de la química “click” son la reacción de Michael, algunas reacciones de formación de oximas e hidrazonas y las reacciones de cicloadición, destacando dentro de éstas las de cicloadición 1,3- dipolar de Huisgen (son las más representativas dentro de lo que se conoce como química “click”).

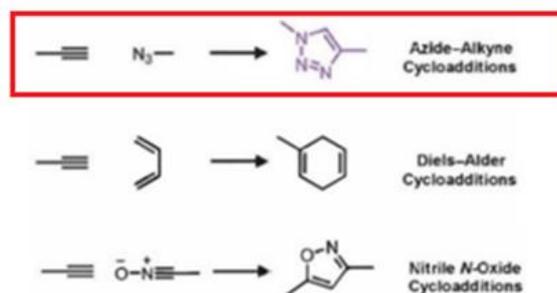
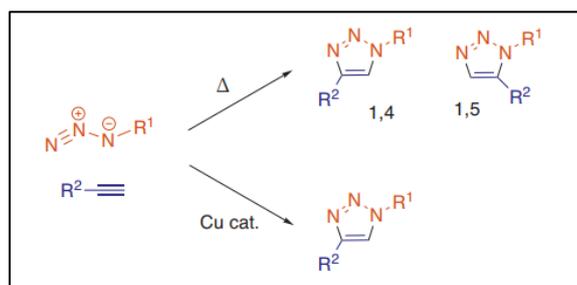


Imagen 3 Algunos ejemplos de química “click”. En rojo aquella reacción utilizada en este trabajo: 1,3-dipolar o cicloadiciones [3+2]¹⁶.

1.6.2 Reacciones 1,3-dipolar o cicloadiciones [3+2]

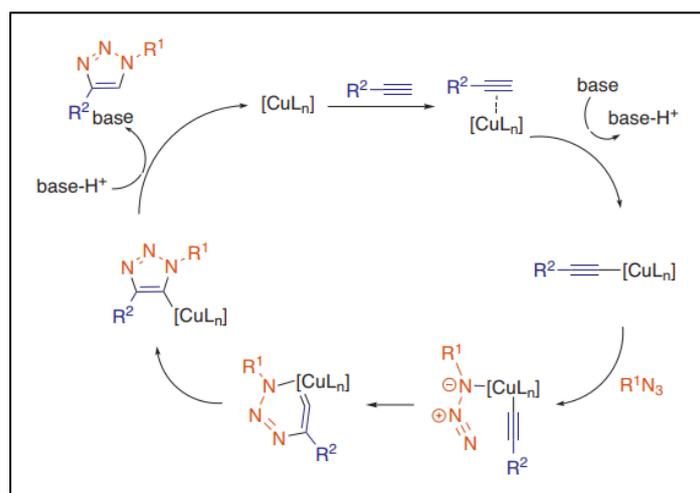
La inserción de una azida (1,3-dipolarófilo) y enlaces múltiples no activados, es un proceso de cicloadición 1,3-dipolar ampliamente estudiado para la preparación de sistemas heterocíclicos. Estas reacciones promueven, salvo en casos muy favorables, la formación de 1,2,3-triazoles de modo no regioselectivo¹⁷ (Imagen 4).

Esta inserción se puede llevar a cabo de dos maneras diferentes: en presencia de calor (versión no catalítica) donde las reacciones están térmicamente inducidas y la regioespecificidad es menor; o en presencia de sales de cobre (I) (versión catalítica). Esta segunda reacción fue descubierta en 2002 por Tornøe y Meldal, y también es conocida como reacción CuAAC (*Copper-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition*)¹⁸.



*Imagen 4 Versión no catalítica y catalítica de la química “click” entre grupos funcionales azida y octino*¹⁷.

La reacción CuAAC presenta eficacia y selectividad debido a la reactividad de los acetiluros de cobre (I) generados in situ. La coordinación de la azida con el centro de cobre del acetiluro aumenta la nucleofilia del triple enlace e inicia una secuencia de pasos que finalmente da como resultado la formación del nuevo enlace C-N entre el átomo de carbono β-nucleófilo del acetiluro y el átomo de nitrógeno electrófilo de la azida¹⁹ (*Imagen 5*).



*Imagen 5 Ciclo catalítico de la química “click” en presencia de la sal de Cu(I). Mecanismo de la cicloadición [3+2]*¹⁷.

Las sales de cobre pueden contaminar los productos finales, provocando efectos citotóxicos que afectarían a la síntesis y/o producción de los nanogeles, y por tanto sería incompatible con su aplicación a la biomedicina.

En 2004, Bertozzi y colaboradores desarrollaron una alternativa que emplea ciclooctinos como aceptores del 1,3-dipolarófilo. Este proceso, permite llevar a cabo el proceso a baja temperatura obviando el empleo de catalizadores gracias al empleo de un ciclo no tensionado. A esta reacción se la conoce por el nombre de SPAAC (Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition)²⁰.

En 2006 Agard y colaboradores, y en 2007 Baskin y colaboradores, siguiendo el precedente de Wittig y Krebs, diseñaron sistemas de ciclooctino con uno o dos átomos de flúor en el anillo que consiguen hacer del triple enlace un centro electrónicamente deficitario, y, por tanto mucho mejor aceptor. Además, la asimetrización del triple enlace aumenta la regioespecificidad del proceso²¹.

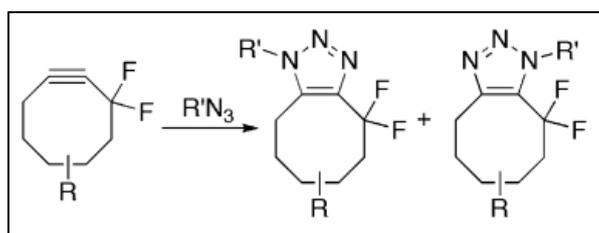


Imagen 6 Reacción 1,3-dipolar entre ciclooctinos difluorados con un compuesto azida para proporcionar mezclas regioisoméricas de triazoles²¹.

El uso de la química “click” ha sido clave para la formación de nanopartículas, facilitando así la dosificación de medicamentos, por ejemplo, para el tratamiento eficaz de tumores malignos haciendo que los agentes anticancerígenos se dirijan al tumor^{22,23}. No obstante, su empleo también se está extendiendo al tratamiento de enfermedades genéticas²⁴, aunque en un futuro próximo será aún más extenso.

1.7 Nanogeles

Un gel es una red polimérica tridimensional entrecruzada (en este caso entre grupos funcionales azida y ciclooctino) capaz de absorber una gran cantidad de solvente, hinchándose, y aumentando considerablemente su volumen pero conservando su forma sin disolverse. Cuando el solvente es agua, se habla de hidrogeles, y dependiendo de la cantidad de polímero que se utilice, se pueden obtener hidro-, micro- o nanogeles⁴.

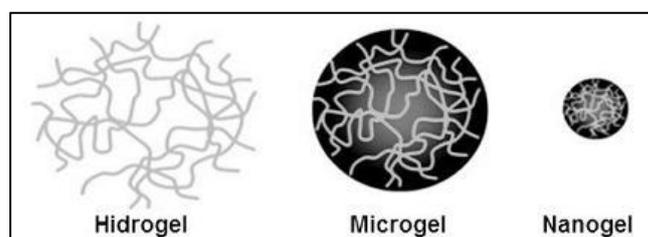


Imagen 7 Diferentes tamaños de geles elaborados mediante química “click”²⁵.

Como se ha mencionado anteriormente, su sensibilidad térmica se caracteriza por una temperatura de transición (T_t) por debajo de la cual las cadenas de polímero se solubilizan, agregándose como nano- o micropartículas, e insolubilizándose a temperaturas superiores a la T_t , siendo este un proceso completamente reversible.

Para disponer de un gel adecuado que actúe transportando y permitiendo la liberación controlada del fármaco, se requieren algunas características.

Los nanogeles, con su alto contenido en agua, su peculiar estructura tridimensional, su biocompatibilidad y las grandes fracciones de volumen libre que generan en su empaquetamiento, son los más adecuados para transportar el fármaco; además, son capaces de modificar dicho empaquetamiento cuando las condiciones ambientales (pH y temperatura) sean las adecuadas, liberándolo en el punto adecuado^{9,26}. Asimismo, su ámbito de aplicación es muy extenso.

1.8 “Drug delivery”

El “drug delivery” o la liberación controlada de fármacos a través de diferentes soportes (nanopartículas con características específicas en este caso) se utiliza para el tratamiento de enfermedades (en humanos o animales), suponiendo una alternativa frente la administración parenteral de dichos medicamentos.

La tecnología recombinante permite un grado de complejidad sin precedentes en el diseño y la síntesis de macromoléculas. Además, los materiales recombinantes incorporan fácilmente cualquier grupo funcional presente en las proteínas naturales. Por lo tanto, los sistemas de administración basados en ELR permiten aprovechar interacciones muy diversas tanto para la incorporación del fármaco (carga), como con los tejidos y células a los que se dirige específicamente²⁷.

Como se ha mencionado anteriormente, los ELRs van a ser modificados con el objetivo de formar nanopartículas que van a ser utilizadas para la dosificación de fármacos, por tanto, éstas deben tener unas características adecuadas tales como alta biocompatibilidad, facilitar la liberación del fármaco (Vancomicina en este caso) de una manera predeterminada y cuya degradación tiene que encontrarse en un periodo de tiempo aceptable⁴.

La liberación se quiere realizar para comprobar su efectividad en el ojo humano, enfocándose en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la edad y el estilo de vida: glaucoma, cataratas,... sin olvidar las alergias y las infecciones oculares. Por ello, sus estudios se han basado en el uso de modelos animales con tamaños de ojo comparables a los humanos, como el conejo, el perro o el mono²⁸.

1.9 Infecciones oculares

La gravedad de las infecciones oculares puede ser debida a diferentes causas, como la virulencia intrínseca del microorganismo, la respuesta natural del huésped y la estructura anatómica, fisiológica y bioquímica del ojo. A nivel ocular, la mucosa conjuntival (conjuntiva) puede hospedar frecuentemente microorganismos que generan infecciones como conjuntivitis, dacriocistitis y queratitis entre otras; además, dependiendo del tiempo de evolución de la infección y del tratamiento instaurado

inicialmente, se pueden generar complicaciones severas que conducirían a pérdida parcial o total de la visión o incluso a septicemia²⁹.

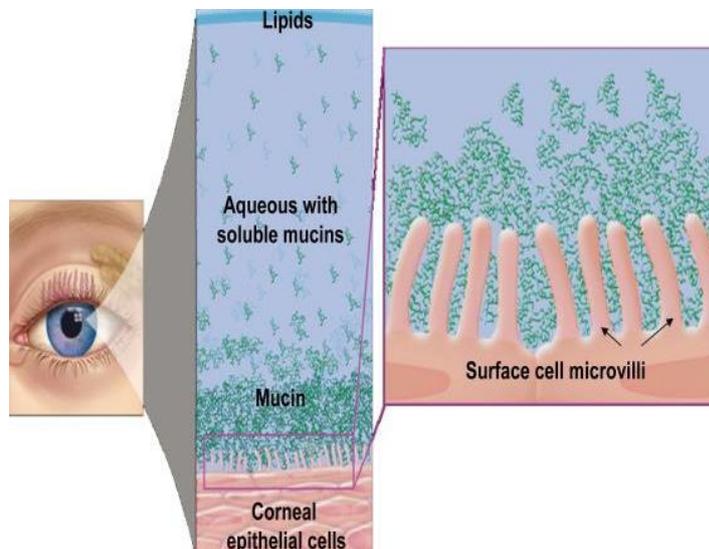


Imagen 8 Película lagrimal sana con capas lipídicas, acuosas y de mucina y una superficie ocular sana con microvellosidades intactas³⁰.

Los antibióticos más utilizados actualmente en disolución (como colirios) para tratar infecciones oculares bacterianas son, entre otros, aminoglucósidos (Tobramicina), Ácido fusídico, Trimetoprima³¹..., y otros no tan comunes pero que presentan gran relevancia en este trabajo, como es la Vancomicina.

El problema de la administración de estos colirios es su corta disponibilidad en el ojo ya que se eliminan rápidamente debido a que son arrastrados por las lágrimas.

1.9.1 Vancomicina

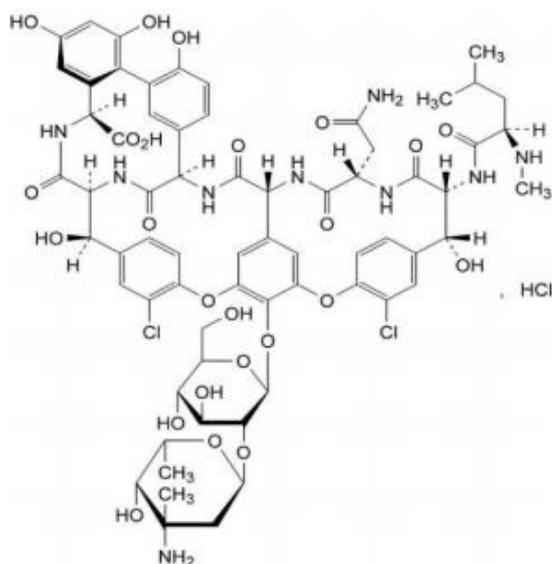


Imagen 9 Molécula de Vancomicina hidrociorhídrica³².

Es un glucopéptido de estructura compleja (7 cadenas peptídicas y 1 disacárido de vancosamina y glucosa) que ejerce su efecto bactericida inhibiendo la síntesis de la pared celular de las bacterias, la síntesis de ARN y dañando la membrana celular de bacterias Gram+.

Esta inhibición de la pared celular se debe a que la vancomicina se une con afinidad a los terminales D-alanil-D-alanina de las unidades precursoras de la pared celular. Dichas unidades son ácido N-acetilmurámico, N-acetilglucosamina y un pentapéptido, y juntos forman parte de la estructura del peptidoglucano de la pared.

La Vancomicina inhibe primero el proceso de transglucosilación de estos precursores impidiendo su unión a las capas de peptidoglucano (afectando a la estabilidad de la pared), y por consiguiente también inhibe la siguiente etapa de formación de la pared celular (transpeptidación) por un efecto estérico.

Las dosis pueden ser intravenosas (5mg/1mL ó 10mg/1mL -en el caso de pacientes que precisen restringir el volumen de líquido perfundido-)³³ u orales (cápsulas o polvos solubles).

Capsula	Oral	125 mg
Capsula	Oral	250 mg
Inyección, polvos, para disolución *	Intravenoso	100 mg/1mL
Inyección, disolución	Intravenoso	4.2 mg/mL
Inyección, disolución	Intravenoso	5 mg/mL

Tabla 2 Diferentes dosis de Vancomicina³⁴. En azul, aquella concentración utilizada en este trabajo.

1.10 Mucoadhesión entre nanopartículas y mucinas

La mucoadhesión se puede definir como la interacción entre un mucoadhesivo y la membrana mucosa, siendo un mucoadhesivo un material capaz de interactuar con la capa mucosa que se encuentra cubriendo el epitelio y que puede tener diferentes formas (pastillas, películas, parches, geles, etc).

Leung y Robinson describieron la mucoadhesión como la interacción entre una superficie de mucina y un polímero sintético o natural³⁵, de ahí que se puedan utilizar nanopartículas (formadas a través de un polímero sintético) como material mucoadhesivo de carga positiva (+26mV)⁷, y el gel mucoso de carga negativa (1.10.1) como sitio activo sobre el cual se produce la adhesión.

En las últimas décadas, la administración de fármacos a través de la mucosa ha recibido una gran atención, estableciéndose que la capacidad mucoadhesiva del material depende de una variedad de factores, tales como la naturaleza del tejido de la mucosa y las propiedades fisicoquímicas de la formulación del polímero³⁶.

1.10.1 Mucinas

Las células epiteliales que recubren la mucosa secretan en las superficies mucosas (y en la saliva) una clase de proteínas altamente glucosiladas de gran tamaño llamadas mucinas. Éstas componen la mayoría del moco y protegen los epitelios de las vías aéreas y digestivas³⁷.

Todas las ellas se caracterizan por poseer repeticiones de secuencias ricas en serina, treonina y prolina como cadenas laterales, además de cadenas laterales de glucósidos, dominios de cisteína (superior al 10%), y repeticiones en tándem. El peso molecular se extiende aproximadamente desde 200 kDa a 40 MDa y su carga neta es negativa (1.10) debido al elevado número de glucósidos con grupos carboxilos.

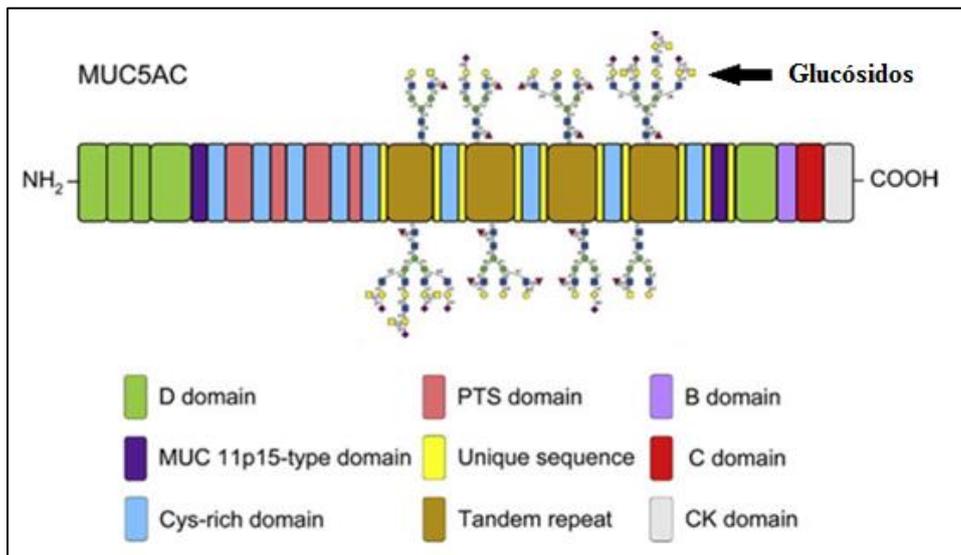


Imagen 10 Estructura de la mucina secretada más prevalente en el fluido lagrimal, MUC5AC³⁸.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo general del trabajo se basa en la creación de nanopartículas por el entrecruzamiento de diferentes biopolímeros tipo elastina (ELRs), y en la evaluación de su aplicación como soportes poliméricos para la dosificación de fármacos.

El plan de trabajo es el siguiente:

- 1) Producción del biopolímero (VKVx24) utilizando una cepa bacteriana de *E. coli* modificada genéticamente y comprobación de su grado de pureza con diferentes técnicas químicas.
- 2) Modificación del grupo amino de las lisinas del polímero, dando lugar a la formación dos estructuras diferentes: una con un grupo funcional azida y otra con un grupo funcional ciclooctino.

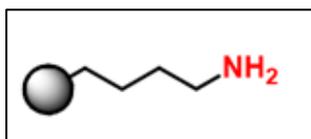


Imagen 11 Grupo amino terminal de una de las lisinas de la cadena peptídica del polímero VKVx24 sobre el cual se va a llevar a cabo la modificación.

- a) Estructura con el grupo funcional azida (VKV-azida)

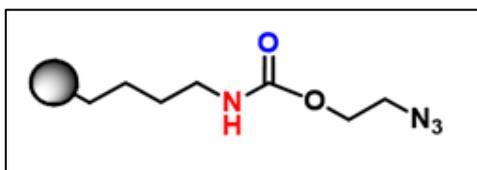


Imagen 12 VKV-azida.

- b) Estructura con el grupo funcional ciclooctino (VKV-ciclo)

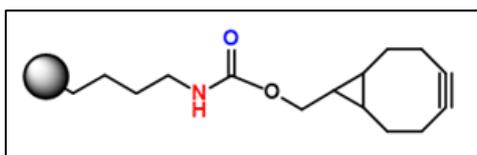


Imagen 13 VKV-ciclo.

- 3) Formación de las nanopartículas por entrecruzamiento de ambos polímeros modificados mediante química “click” y caracterización de las mismas.
- 4) Incorporación del fármaco (Vancomicina) y estudio de su eficacia en su liberación controlada a través las nanopartículas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Reactivos	Empresa Distribuidora
Acetona	Sigma-Aldrich
Ampicilina	Apollo
Anhídrido tríflico	Sigma-Aldrich
D(+)-Glucosa	Panreac
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sodio	Panreac
TrishidroximetilaminoMETANO (TRIS)	Sigma-Aldrich
(1R, 8S, 9S)- biciclo [6.1.0] non-4-yn-9-ilmetil succinimidil carbonato	Synaffix
2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato	Synaffix
Vancomicina	Apollo
PBS	Gibco Invitrogen
Glicerol	Merck

Tabla 3 Reactivos utilizados y proveedores.

Tampón	Composición
Tampón de lavado, TL	Tris pH 7,5 20mM NaCl 0,2M
Tampón de sonicación, TS	Tris pH 7.5 20mM EDTA 2,5mM

Tabla 4 Disoluciones tamponadas para la purificación del polímero VKVx24.

Medio de cultivo	Composición
LB (Luria Broth) agar (Utilizado para el cultivo de <i>E. coli</i>)	15g/L Agar 10g/L Triptona 5 g/L Extracto de levadura 5 g/L NaCl
TB (TerrificBroth) (Utilizado para incrementar la producción bacteriana)	Medio TB (50,8g/L) Na ₂ HPO ₄ 25Mm Na ₂ SO ₄ 5mM KH ₂ PO ₄ 25mM NH ₄ Cl 50mM Glucosa 0,05% p/v, α -lactosa 0,02% p/v Glicerol 0,8% p/v.

Tabla 5 Medios de cultivo utilizados para el crecimiento bacteriano.

Disolventes	Empresa Distribuidora
Acetona	Scharlau
Agua ultra pura, MQ	Mili-Q A-10 Synthesis Elix 10 Milipore
Dietiléter	Scharlau
Dimetilformamida, DMF	Sigma Aldrich
Dimetilsulfóxidodeuterado, DMSO	Sigma Aldrich
Metanol	Scharlau
Étanol	Panreac

Tabla 6 Disolventes utilizados y proveedores.

Equipo	Modelo	Fabricante
Autoclave	AES-28	RAYPA
Centrifuga ST 16R	ST 16R	Thermo- Scientific
Centrifuga	6K10	Sigma
Centrifuga	Avanti J-26 XP	Beckman
DSC	8822e	Mettler Toledo
RMN	400	Agilent Technologies
Infrarrojo	Tensor27	Bruker
NanoDrop	2000c	Thermo-Scientific
Disruptor	Panda Plus 2000	GEA
Zeta Sizer Nano	ZSP	Malvern
Biorreactor/Fermentador de	15L	Applikon
Equipamiento de electroforesis	EPS-301	Amersham pharmacia biotech
Balanza analítica	XP204	Mettler Toledo
Agitador orbital	Forma Orbital Shaker 420	Thermo-Scientific (MaxQ8000)
Liofilizador	Genesis	Virtis
pHmetro	pH-Meter BASIC 20+	Crison
Sistema de adquisición de imagen	Gel Logic Imagine System	KODAK

Tabla 7 Equipos utilizados, modelos y proveedores.

También, en relación con los equipos, se emplean equipos auxiliares como cronómetro, medidor de temperatura y humedad, estufa, congelador, frigorífico, máquina de hielo, etc.

3.2 Métodos

3.2.1 Bioproducción del polímero VKVx24

El siguiente esquema (*Imagen 14*) muestra las diferentes etapas que hay que seguir para llevar a cabo la producción del polímero VKVx24.

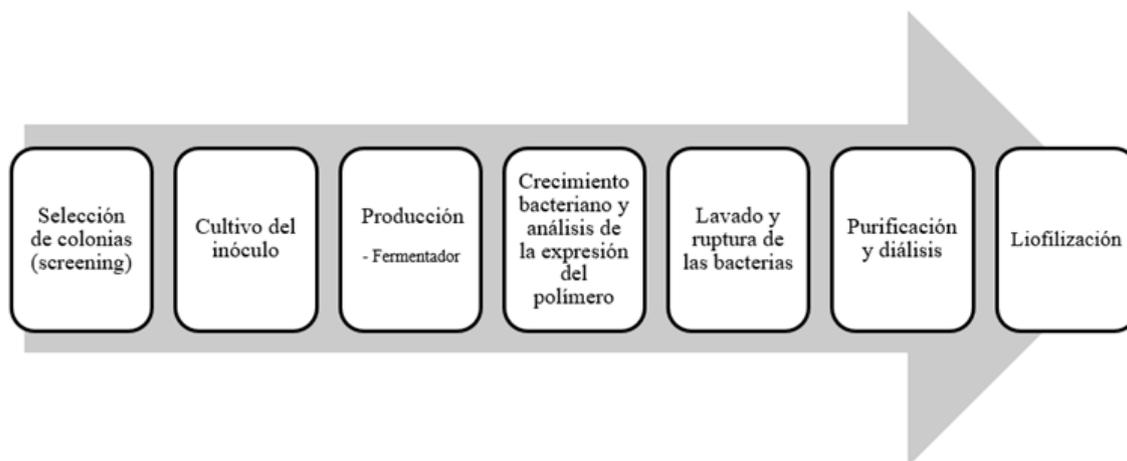


Imagen 14 Proceso de producción del polímero VKVx24.

3.2.1.1 Selección de colonias

Una vez se siembra la bacteria modificada, se realiza la selección de la colonia que más polímero produce (screening).

Para la siembra se parte de un “Glycerol-Stock”, es decir, de un envase que contiene la bacteria *Escherichia coli* (escogida de una cepa específica de *E. coli*) congelada junto con glicerol y medio LB. La bacteria, cuyo plásmido está modificado genéticamente (1.3) en el laboratorio de biología molecular del grupo BioForge, es capaz de producir el polímero deseado, VKVx24 en este caso.

Con un asa de siembra (metálica y estéril) se recoge un poco de muestra y se siembra la placa de Petri, que contiene medio de crecimiento LB agar, antibiótico (frente al que la cepa ha adquirido resistencia) -ampicilina (50 µg/mL)-, y 1% de glucosa (que inhibe la expresión del polímero). Se incuba toda la noche boca abajo a 37°C, y al día siguiente tras la incubación se observa el crecimiento bacteriano de aquellas colonias que poseen resistencia al antibiótico.



Imagen 15 Placa de Petri sembrada con la bacteria E. coli donde se observan todas las colonias que presentan resistencia al antibiótico y las seleccionadas para el estudio. Imagen realizada por la autora del trabajo.

Para la elección de la colonia que más produce, se escogen aquellas que estén mejor definidas en la siembra y tengan una morfología más adecuada. Se depositan en sendos tubos tipo Falcon (de 50mL) 5mL de medio TB (55,85g/L), 5 μ L de antibiótico -ampicilina (100 μ g/mL)- y la colonia seleccionada (con ayuda de un palillo de madera estéril), y se incuban toda la noche a 37°C y 250rpm. Para estudiar el perfil electroforético de los respectivos extractos crudos se realiza una electroforesis SDS-PAGE (3.2.2.1) con 1mL de la suspensión bacteriana del Falcon.

3.2.1.2 Fermentador, cultivo del inóculo y control externo del inóculo

Para mejorar la producción de la bacteria se utiliza un fermentador (condiciones controladas) y asimismo se prepara el inóculo que se va a introducir en él; a su vez se realiza un control externo del inóculo (condiciones no controladas) para controlar la expresión del polímero y posibles contaminaciones.

➤ Fermentador

Una vez seleccionada la colonia que más produce, la bacteria (inóculo) se introduce en el fermentador para que crezca y produzca el polímero deseado en el momento que deje de haber glucosa en el medio.



Imagen 16 Fermentador (de 15L). Imagen realizada por la autora del trabajo.

Para su preparación, se realiza un paso previo de esterilización del medio. Para ello, se preparan 14L de medio TB (55,85g/L), glicerol (8mL/L) y antiespumante (100 μ L/L) y se introducen en el autoclave, donde queda totalmente esterilizado. Esto se denomina “esterilización por vapor a presión” o “esterilización con calor húmedo” es decir, el equipo genera vapor de agua que destruye los microorganismos por coagulación de sus proteínas celulares (desnaturalización). Las condiciones de esterilización son 1 atmosfera, 120°C durante 20 minutos (el tiempo se eleva porque una vez caliente tiene que enfriarse a 80°C).

Una vez terminado el proceso, se trabaja en “condiciones controladas”, donde las variables: pH, nivel de O₂ y temperatura se ajustan para que permanezcan estables. Se ajusta el pH a 7 (utilizando los reactivos NH₄OH y H₃PO₄), el nivel de oxígeno al 100% y la temperatura a 37°C, y 500rpm.

➤ Inóculo

Antes de introducir el inóculo en el fermentador hay que llevar a cabo su preparación. Para ello, primero hay que tener en cuenta que cuando las bacterias se introducen en un medio fresco (en tubo de ensayo, tubo tipo Falcon, en un matraz Erlenmeyer como en este caso, etc), la población de células presenta una dinámica de crecimiento de la siguiente manera (*Imagen 17*).

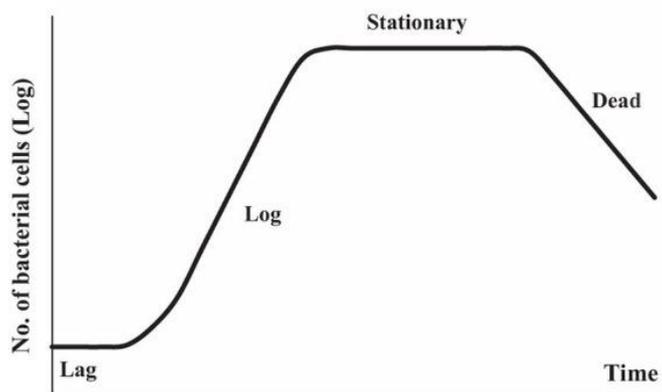


Imagen 17 Típica representación gráfica del Crecimiento bacteriano³⁹.

La fase de latencia o “lag” es un periodo de adaptación donde las células se aclimatan al nuevo medio, pero no se replican. Después tiene lugar el crecimiento exponencial o “log”, donde las células comienzan a dividirse regularmente por el proceso de fisión binaria hasta que el cultivo alcanza la tasa de crecimiento máxima, y persiste hasta que alguno de los nutrientes esenciales disminuye en el medio, o hasta que algún producto es acumulado e inhibe el crecimiento de los microorganismos. Posteriormente, las células entran en una fase donde ya no hay crecimiento (fase estacionaria), que es seguida por una fase de declinación o “muerte celular”, donde las bacterias pierden la capacidad de dividirse y la cantidad de células muertas excede la de las vivas³⁹.

Para su preparación, en un erlenmeyer se introducen 30mL de medio LB (30g/L), glucosa (1% m/v), antibiótico -ampicilina- (100µg/mL) y la colonia elegida (con ayuda de un asa metálica y estéril), incubándose a 37°C, 250rpm, durante 5-6h hasta observar turbidez.

Después se preparan dos erlenmeyers con 500mL de medio LB (30/g/L), glucosa (1% m/v) y antibiótico -ampicilina- (100µg/mL), y en cada uno de ellos se vierten 15mL de la disolución anterior. Se incuban a 37°C, a 250rpm, durante 2h.

Por último, se introduce el inóculo en el fermentador y se deja en él el tiempo necesario a 37°C, 500rpm y pH 7, hasta verificar que el cultivo ha entrado en fase estacionaria mediante su medida de absorbancia.

Es necesario apartar 3mL del inóculo para realizar un control externo de éste (1mL) y para el control de su crecimiento, midiendo su absorbancia (2mL).

➤ Control externo del inóculo

Para verificar que la fermentación ha ido correctamente, en paralelo se realiza un “mini cultivo” bajo condiciones no controladas, es decir, controlando la agitación a la que se lleva a cabo el proceso. Este control es útil en casos donde la bacteria no produce en el fermentador, y se utiliza para controlar la expresión del polímero así como para saber a qué se puede deber esta contaminación; es decir, si la muestra se ha contaminado el fermentador, si estaba contaminada desde el principio (inóculo), etc.

Para su preparación, en un tubo tipo Falcon se depositan 1mL de muestra (inóculo), 5mL de medio TB (55,85g/L), 5µL de antibiótico -ampicilina- (100µg/mL) y glicerol (8mL/L).

3.2.1.3 Control del crecimiento

Para analizar el crecimiento bacteriano se utiliza la técnica de espectroscopía de UV-Vis (3.2.2.2), midiendo así la densidad óptica o absorbancia del medio (turbidez) y obteniéndose cuantitativamente la cantidad de células presentes. Las condiciones de trabajo son 600nm como longitud de onda óptima y cubetas de plástico.

Las muestras medidas son aquellas obtenidas tras las últimas etapas de la fermentación, el inóculo, y del control externo del mismo (cada una con su blanco y su dilución) para determinar que el cultivo ha entrado en fase estacionaria (concepto explicado en el punto 3.2.1.2).

Después se realiza una electroforesis SDS.PAGE (3.2.2.1), normalizando la cantidad de bacteria para un gel de 15 pocillos, evaluando así el nivel de expresión del polímero.

3.2.1.4 Lavado de la biomasa

Una vez evaluada la correcta expresión del polímero, se saca la bacteria del fermentador y se deposita en 8 botes (de 2L) que se centrifugan a 4°C, a 5800g, durante 15 minutos.

Para tener menos cantidad de líquido, se tira el sobrenadante (la bacteria se encuentra en el *pellet*) y se echa tampón de lavado TRIS-NaCl (Tris-base 20mM y NaCl 140mM, pH 8), resuspendiendo la bacteria por agitación.

Finalmente se traspasa el sólido lavado a 4 botes, y se centrifugan 2 veces más (en las mismas condiciones) siguiendo el mismo procedimiento.

3.2.1.5 Ruptura de la bacteria y obtención del polímero

Se pasa el *pellet* de los 4 botes a uno solo, y se añade el volumen correspondiente de tampón de sonicación (Tris- base 20mM, EDTA 1mM) y de inhibidor de proteasa PMSF (pH 8; 0,1-1 mM), los cuales ejercen de medio en el que se lleva a cabo la ruptura celular.

La suspensión se somete tres veces a una ruptura celular, a 4°C y 1500bar, utilizando un *Disruptor de células*, un equipo que rompe las células mediante cambios de presión liberando su contenido.

Finalmente, se vuelve a centrifugar a 4°C, 29400g, durante 90 minutos para separar el sobrenadante de ultrasonidos del *pellet* en botes diferentes.

3.2.1.6 Purificación

Para esta etapa se utiliza un sistema de purificación denominado ITC (*Inverse Transition Cycling*) donde modificando las variables de pH y temperatura, el polímero pasa de un estado de transición a otro (*Imagen 18*).

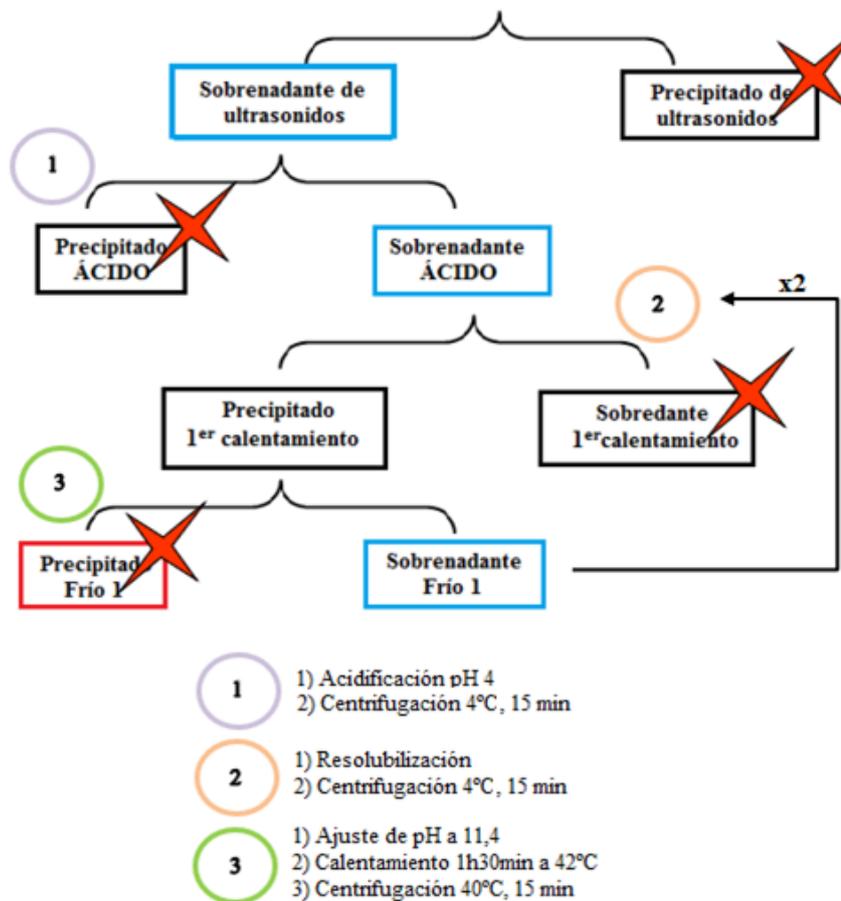


Imagen 18 Sistema de purificación ITC utilizado para el polímero VKVx24.

*Nota: Las condiciones de centrifugación son 29400g en frío y pH 4 (paso 1), y 7900g en caliente a pH 11,4 (pasos 2 y 3).

Por otro lado, antes de desechar o almacenar muestras, se conservan aquellas que sean necesarias (Imagen 18) para realizar la electroforesis posterior, tomando una pequeña cantidad cuando sea *pellet*, y 20µL cuando sea sobrenadante.

En el esquema se observa que primero se desecha el precipitado de ultrasonidos ($\downarrow Us$), y se recoge el sobrenadante (Sb Us) acidificándose hasta pH ácido (4). Después se centrifuga de nuevo, y se desecha el precipitado ácido ($\downarrow H^+$). El sobrenadante (Sb H^+) es basificado con NaOH 1M hasta pH básico (11,4) y se calienta en un baño a 42°C durante 1h y media. A continuación se desecha el sobrenadante (Sb $\Delta 1$) y se recoge el precipitado ($\downarrow \Delta 1$), el cual se mantiene congelado 24h. Al día siguiente con el sobrenadante alcalinizado (Sb 1f), se siguen los mismos pasos 2 veces más observados en la figura (Imagen 18).

3.2.1.7 Diálisis

En una tripa de diálisis se deposita la muestra (polímero) y éste a su vez en un bidón de agua MQ de 25L, a 4°C, con agitación.

Mediante ósmosis, se separan el polímero y las sales que hay contenidos en el sobrenadante (Sb 3f) a través de una membrana permeable de 10.000 Da de *cut off*, que deja pasar las sales al exterior (pero no el polímero) a la vez que se introduce el agua para compensar las presiones.

Para que se produzca el equilibrio entre las sales de la tripa y del medio, y la concentración de éstas sea prácticamente nula, se debe realizar un cambio de agua a las 3h y posteriormente 2 cambios más cada 24h.

3.2.1.8 Liofilización

Se saca la muestra de la tripa de diálisis y en pequeños botes se introduce en el congelador a -20°C para eliminar todo el agua posible.

El liofilizado es un proceso fundamental que se lleva a cabo a baja temperatura (realizando rampa desde -20°C hasta 10°C), y presión (10^{-2} mbar), pues en estas condiciones se conserva la calidad del producto durante la eliminación del agua (o del disolvente utilizado), garantizando la estabilidad de almacenamiento requerida para el producto deseado⁴⁰.

Una vez el polímero es liofilizado, debe ser conservado en frío y bien cerrado o de lo contrario podría rehidratarse y ser degradado, y por tanto no ser útil.

3.2.2 Técnicas de caracterización

3.2.2.1 Electroforesis

Fundamento teórico

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas (ARN, ADN, y proteínas) según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. Para visualizar bien estos fragmentos se utiliza una electroforesis en gel, que consiste en aplicar una corriente eléctrica través de un gel que contiene las moléculas de interés y que, en base a su tamaño y carga, las moléculas se desplazarán a distintas velocidades, con lo que se separarán unas de otras. Como medios de soporte se pueden utilizar papel, acetato de celulosa, geles de almidón, geles de agarosa o geles de poliacrilamida.

Como la *E. coli* contiene aproximadamente 2.000 tipos diferentes de proteínas solubles (además está modificada genéticamente para que proporcione el péptido -polímero- deseado), la electroforesis se hará preferentemente con geles de poliacrilamida en presencia de detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), siendo la separación de proteínas en función sólo de la masa molecular.

➤ Electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Este sistema fue ideado por Laemmli⁴¹, y se denomina discontinua porque utiliza dos geles: un gel separador (“resolving gel”) con grado de reticulación mayor, y un gel concentrador (“stacking gel”) con bajo grado de reticulación y pH 6,8. Estos geles son el resultado de la copolimerización de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida, pues controlando ambas concentraciones se obtienen geles de diferente grado de reticulación (diferente diámetro de poro) ya que la acrilamida produce cadenas lineales y la bisacrilamida da lugar a puntos de ramificación, lo que permite formar una matriz tridimensional.

Los componentes de del gel son agua MQ, tampón TRIS-HCl, SDS, PSA (agente iniciador de la polimerización) que al disolverse en agua genera radicales libres que transforman la acrilamida en radical libre, TEMED como catalizador (porque puede existir en forma de radical libre), y por último acrilamida.

Procedimiento experimental

- Preparación de la muestra

Dependiendo de si la electroforesis se lleva a cabo en la etapa de bioproducción o de caracterización, la muestra se prepara de una forma u otra (*Tablas 8 y 9*).

BIOPRODUCCIÓN		
Selección de colonia	Análisis del nivel de expresión del polímero	Análisis de las etapas de purificación
<ul style="list-style-type: none"> - Coger 1mL del Falcon que contiene la colonia - Centrifugar - Resuspender en 1mL de agua MQ - Centrifugar - Resuspender en 100µL de agua MQ - Coger 20µL de cada disolución - Añadir 5µL de tampón de carga - Hervir durante 5min (proceso de desnaturalización) - Pinchar 2,4µL para un gel de 15 pocillos 	<ul style="list-style-type: none"> - Centrifugar - Resuspender en 1mL de agua MQ - Centrifugar - Resuspender con el agua MQ en función de la absorbancia (<i>Tabla 9</i>) - Coger 20µL de cada disolución - Añadir 5µL de tampón de carga - Hervir durante 5min (proceso de desnaturalización) - Pinchar el volumen necesario para un gel de 15 pocillos 	<ul style="list-style-type: none"> - Resuspender en 1mL de agua MQ los precipitados - Centrifugar - Resuspender en 1mL de agua MQ - Coger 20µL de cada disolución - Añadir 5µL de tampón de carga - Pinchar 1µL de disolución donde no hay polímero, y 2µL de donde sí hay

Tabla 8 Procedimientos para llevar a cabo las diferentes electroforesis en el proceso de bioproducción. (Protocolo obtenido de BioForge).

CARACTERIZACIÓN
- Coger 0,5mg de polímero puro
- Resuspender en 500μL de agua MQ
- Coger 20μL de la disolución
- Añadir 5μL de tampón de carga
- Pinchar 4μL para un gel de 15 geles

Tabla 9 Procedimiento para llevar a cabo la electroforesis en el proceso de caracterización. (Protocolo obtenido de BioForge).

- Preparación del gel

Como el polímero VKVx24 tiene un peso molecular de 60642 Da, la cantidad de acrilamida que hay que utilizar es del 40% tanto en el “resolving gel” como en el “stacking gel” (Protocolo BioForge).

- Normalización para un gel de 15 pocillos:

Para llevar a cabo esta normalización es necesario conocer la absorbancia de la muestra (*Tabla 10*).

Rango de Absorbancia	Agua MQ para resuspender (μL)	Volumen que pinchar en el gel de 10 pocillos (μL)	Normalización para un gel de 15 pocillos (μL)
[0,1 – 0,5]	20	$\frac{5}{A}$	$\frac{5}{A} \times 0,6$
[0,5 – 2]	50	$\frac{12,5}{A}$	$\frac{12,5}{A} \times 0,6$
[2 – 5]	100	$\frac{25}{A}$	$\frac{25}{A} \times 0,6$
[>5]	200	$\frac{50}{A}$	$\frac{50}{A} \times 0,6$

Tabla 10 Cantidad de volumen que se debe pinchar en un gel de 10 pocillos, o el correspondiente normalizado para un gel de 15 en función de la absorbancia. Tabla recogida en el Laboratorio de Producción de BioForge.

3.2.2.2 Espectrometría UV-Vis

Fundamente teórico

Basándose en que cada compuesto químico absorbe, transmite o refleja la luz (radiación electromagnética) a lo largo de un cierto rango de longitud de onda, esta técnica mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra, y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra en disolución. La relación entre ellas se llama transmitancia (o luz no absorbida), y a la diferencia entre la luz original y la transmitida es lo que se denomina absorbancia.

La absorbancia se rige por la ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon c l$), que indica que existe una relación lineal entre ésta y la concentración de la muestra.

Procedimiento experimental

Se van a utilizar dos espectrofotómetros diferentes, siendo la diferencia entre ellos la cantidad de muestra que pueden medir.

Utilizando el primer equipo la preparación de muestra se lleva a cabo en 2 eppendorf, donde se coloca 1mL de ésta en cada uno, y uno de ellos se centrifuga a 13400rpm durante 45s (blanco); después en 2 cubetas de plástico con agua MQ se deposita la cantidad exacta de muestra y se mide su absorbancia.

En cambio, utilizando el segundo (*NanoDrop*), se cogen directamente 2 μ L de muestra y se mide directamente su absorbancia.

3.2.2.3 Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN-¹H)

Fundamento teórico

Es una técnica basada en la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo magnéticamente activo, que está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación. En este caso, el núcleo magnéticamente activo es el protón (¹H). A su vez, el polímero VKVx24 tiene protones dotados de ciertas propiedades magnéticas.

Procedimiento experimental

Se pesa una cantidad de 14-15mg de muestra (polímero) y se disuelve con 0,6mL de un disolvente deuterado (para que no interfiera con los protones a medir), normalmente DMSO-d₆ y se introduce en un tubo de RMN con ayuda de una jeringuilla estéril.

3.2.2.4 Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

Fundamento teórico

La técnica se basa en el uso de un interferómetro de Michelson (con el que se consigue acceder a la sección del IR lejano -10-400cm⁻¹-) para medir las frecuencias a las cuales rotan y vibran las moléculas en un amplio rango de longitudes de onda.

Procedimiento experimental

Se pesa una cantidad de 1-2mg de muestra (polímero) y directamente se deposita en el equipo con ayuda de unas pinzas estériles. Cuanto más compacta quede la muestra, más intensos se verán los picos.

3.2.2.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Fundamento teórico

Es una técnica que se utiliza para obtener una medida precisa de la temperatura de transición del polímero, es decir, aquella temperatura a la que el polímero cambia de fase. La muestra absorbe calor a medida que el equipo aumenta la temperatura, y comparando este resultado con el de la muestra de referencia (cuya capacidad calorífica está bien definida en el intervalo de temperaturas en que vaya a tener lugar el barrido), se determina el calor que hay que obtener para que se lleve a cabo este proceso. Las reacciones exotérmicas o endotérmicas se reflejan como picos positivos o negativos en las curvas DSC.

La calibración del equipo consiste en construir una rampa de temperatura eligiendo un protocolo adecuado, donde se representa la temperatura (eje x) frente al tiempo (eje y) para poder observar bien el intervalo de barrido.

Procedimiento experimental

- Preparación de la muestra (polímero)

Se prepara una muestra a una concentración de 50mg/mL en 200μL de agua MQ. Para ello se deposita en un eppendorf 10mg de muestra con 200μL y se deja toda la noche a 4°C para su completa disolución. Al día siguiente se mide su pH real (que debe ser constante y característico para cada lote de polímero) en frío con ayuda de un pH-metro cuya sonda de temperatura también tiene que estar introducida en el baño de hielo para que la medida sea correcta.

El análisis del polímero sin modificar se realiza a tres pHs diferentes (ácido, básico y neutro) ya que posee grupos funcionales (amino y carboxilo) protonables y deprotonables, pudiéndose estudiar así su comportamiento a medida que se pasa de un medio a otro. Para ello se añaden 60μL de la disolución en tres eppendorf diferentes, y se lleva cada alícuota al pH deseado. (El polímero modificado solo se estudia a pH neutro, por tanto las alícuotas no son necesarias.)

Una vez que se ha decidido el pH, se prepara el crisol. Primero se tara en una báscula el crisol con su tapa, y con ayuda de una pipeta se depositan 20μL de muestra. Después se tapa el crisol y se procede a su sellado. Para obtener la masa de disolución conocida se puede usar la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Masa del crisol (g)}}{\text{Densidad MQ } 1 \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right)} \times \text{Concentración de la muestra} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) [=] \text{mg}$$

- Preparación de la referencia

La referencia tiene que ser el mismo disolvente usado para disolver la muestra, (en este caso agua MQ), siguiendo el mismo procedimiento que para la muestra, es decir, depositar 20μL en el crisol tarado, taponarlo, sellarlo, y calcular la masa de disolución conocida.

3.2.2.6 Dynamic light scattering (DLS)

Fundamento teórico

Es una técnica utilizada para determinar la distribución de tamaños de partículas (desde el nanómetro hasta algunas micras) en suspensión, o macromoléculas en disolución tales como proteínas (o polímeros en este caso), con base en el análisis de las fluctuaciones de luz dispersas causadas por el movimiento browniano de las partículas.

Consiste en un láser que se dispara a través de un polarizador e incide en una muestra. Como la fuente es monocromática y coherente, la intensidad de dispersión fluctúa con el tiempo, debiéndose esta fluctuación a que las moléculas pequeñas en las disoluciones están sufriendo movimiento browniano, por lo que la distancia entre los dispersores en la solución está cambiando constantemente con el tiempo. A continuación, la luz es dispersada en todas las direcciones (siempre que las partículas sean pequeñas en comparación con la longitud de onda -por debajo de 250 nm-), pasa a través de un segundo polarizador donde es recogida por un fotomultiplicador y la imagen resultante se proyecta en la pantalla del ordenador (*Imagen 19*).

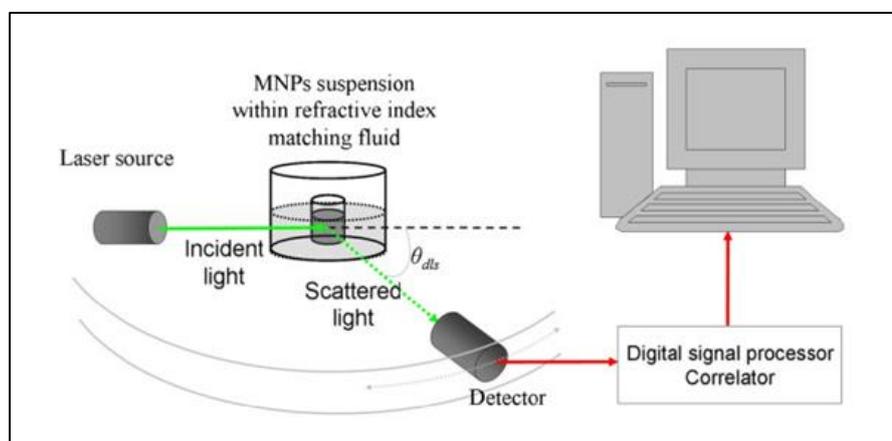


Imagen 19 Proceso de Dispersión de luz dinámica (DLS en inglés)⁴².

Procedimiento experimental

Se abre la tapa del equipo y se quita el tapón de dentro (cuya función es evitar la condensación de la muestra), se coloca la cubeta adecuada, se añade 1mL de muestra en la esquina para evitar la formación de burbujas, se tapa y por último se abre la válvula de gas inerte para evitar condensaciones.

3.3 Modificación del polímero VKVx24

La química “click” permite constituir nanopartículas a través del entrecruzamiento de grupos funcionales azida y ciclooctinos. Además es importante tener en cuenta la temperatura de trabajo, pues por encima de su temperatura crítica (o de transición) estos polímeros se encuentran como estructuras esféricas, y sin embargo por debajo de ésta se encuentran como cadenas lineales (1.4).

Para elaborar estas NPs, primero se modifican los ERLs haciéndoles reaccionar con un compuesto azida por un lado y con un derivado de ciclooctino por otro, y una vez formados estos dos productos, mediante química “click” reaccionan entre sí, entrecruzándose, proporcionando la estructura esférica deseada.

3.3.1 Modificación del polímero VKVx24 con un compuesto azida para la formación de VKV-azida

Se hace reaccionar el polímero VKVx24 con el reactivo 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (de Pm 228,17g/mol) para formar el polímero de interés, VKV-azida. Las condiciones de reacción son T^a ambiente, y dejarlo un periodo de 48h en campana.

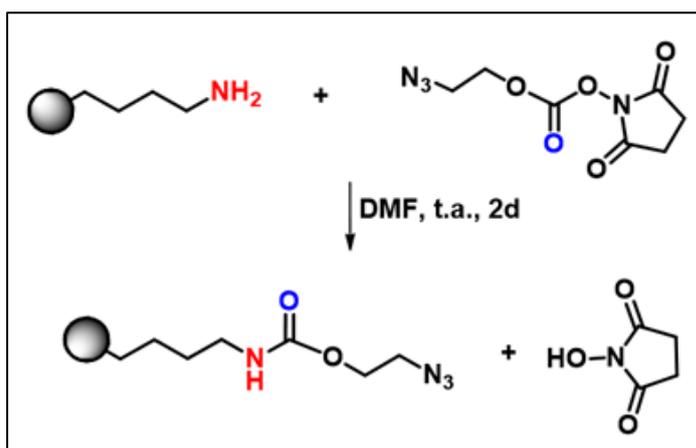


Imagen 20 Reacción “click” del polímero VKVx24 con 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato para la formación de VKV-azida.

El mecanismo de acción es el siguiente: la azida se incorpora como carbonato de la hidroxiprolina de la imagen, que es atacado nucleofílicamente por el grupo amino terminal de la lisina del extremo. De este modo se incorpora en la cadena polimérica, que queda lista para la reacción click.

3.3.2 Modificación del polímero VKVx24 con un derivado de ciclooctino para la formación de VKV-ciclo

Se hace reaccionar el polímero VKVx24 con el reactivo (1R, 8S, 9S)-biciclo (6.1.0) non-4-yn-9-ilmetil succinil carbonato (de Pm 291,30g/mol) para formar el polímero de interés, VKV-azida. Las condiciones de reacción son T^a ambiente, y dejarlo un periodo de 48h en campana.

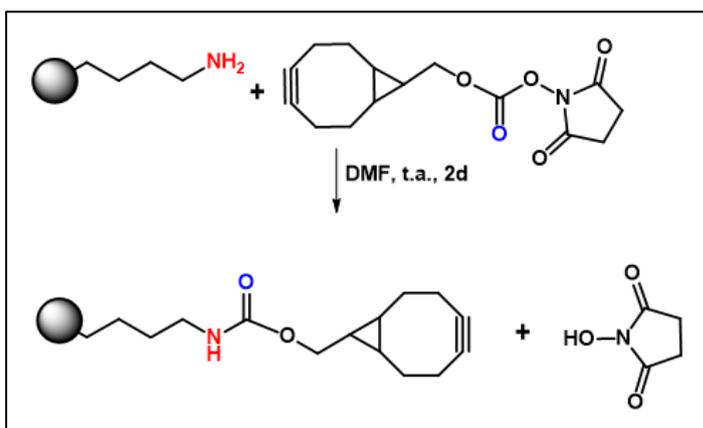


Imagen 21 Reacción “click” del polímero VKVx24 con (1R, 8S, 9S)-biciclo (6.1.0) non-4-yn-9-ilmetil succinil carbonato para la formación de VKV-ciclo.

El mecanismo de acción es el siguiente: el ciclooctino se incorpora como carbonato de la hidroxiprolina de la imagen, que es atacado nucleofílicamente por el grupo amino terminal de la lisina del extremo. De este modo se incorpora en la cadena polimérica, que queda lista para la reacción click.

3.3.3 Química “click” entre los polímeros modificados VKV-azida y VKV-ciclo

La reacción entre ambos compuestos da lugar a la formación de un anillo de triazol que actúa como punto de unión entre las cadenas de recombinámeros VKVx24 (*Imagen 22*).

Además, es importante y necesario mencionar de nuevo que el entrecruzamiento entre estas cadenas en función de la temperatura deseada da lugar a la formación de estructuras 3D esféricas (nanopartículas) o cadenas lineales.

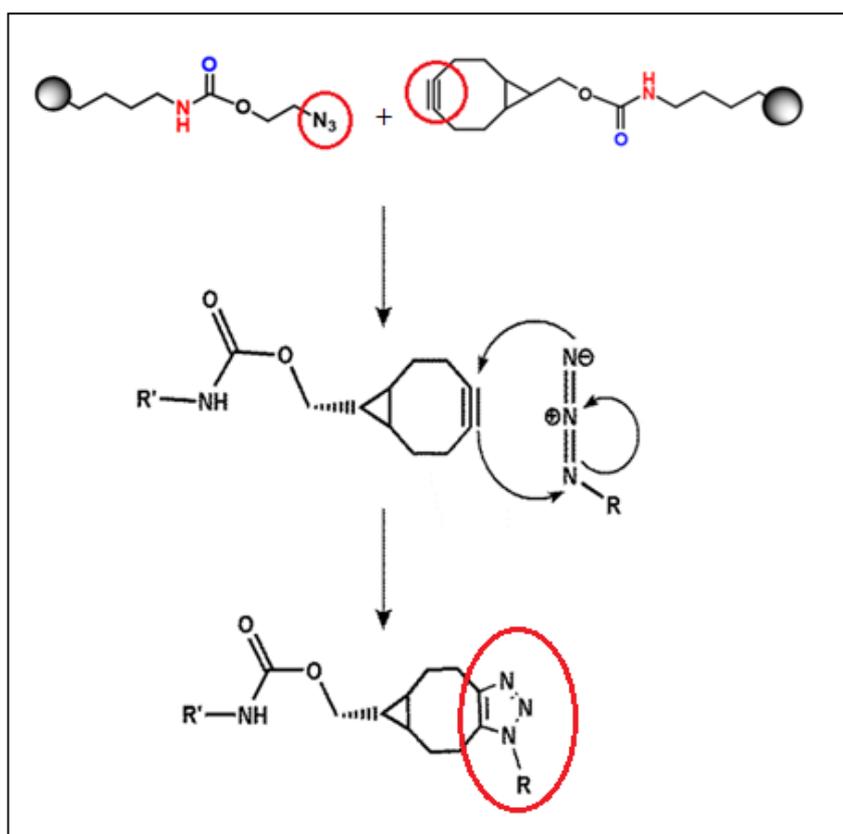


Imagen 22 Reacción “click” entre un compuesto azida y uno ciclo formando un anillo de triazol.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo es modificar el soporte polimérico VKVx24 y formar por entrecruzamiento de las dos estructuras modificadas (VKV-azida y VKV-ciclo) a través de la denominada química “click”, nanopartículas capaces de acoger al fármaco en su interior (Vancomicina) y estudiar su dosificación de forma controlada.

Como primer paso se tiene que producir el biopolímero y caracterizarlo para comprobar su utilidad. Posteriormente se realizará su modificación (realizando sus caracterizaciones correspondientes) y finalmente estudiará el proceso de liberación.

En este trabajo se realizaron dos bioproducciones del polímero VKVx24, pero a continuación sólo se desarrollará la primera, pues los resultados y rendimientos obtenidos fueron óptimos.

4.1 Bioproducción y purificación del polímero VKVx24

Para llevar a cabo la obtención del polímero VKVx24 se deben realizar todas las etapas comentadas en el apartado de Métodos (3.2), concretamente en el punto 3.2.1, pero se pueden resumir en cinco: selección de colonias, análisis de la expresión del polímero (control del crecimiento bacteriano), lavado de la bacteria, ruptura de la misma y purificación del polímero.

Primero se seleccionan 8 colonias al azar de *E. coli* (que se encuentran sembradas en la placa Petri) las cuales presentan resistencia al antibiótico y se induce su expresión en medio TB; esta selección es lo que se conoce como “screening”. Para el análisis de dicha expresión se realiza una electroforesis SDS-PAGE (3.2.1.1) donde cargamos los extractos crudos correspondientes a las colonias seleccionadas de bacteria.

En la siguiente figura (*Imagen 23*) se observan las bandas de intensidad correspondientes a las ocho calles de gel.

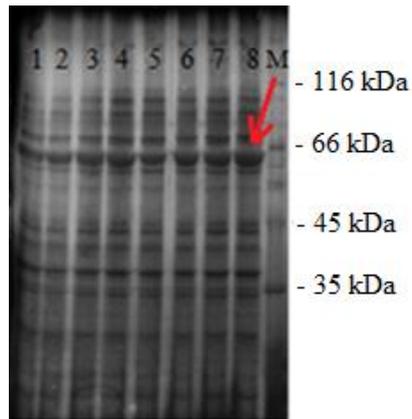


Imagen 23 Fotografía del gel de electroforesis resultante del screening donde observa como las proteínas se han separado en función de su peso molecular. La flecha roja indica la banda correspondiente donde se observa mayor cantidad de polímero al polímero VKVx24 (60KDa). La calle indicada con la letra M corresponde al marcador de proteínas patrón.

De las ocho colonias pinchadas, se intuye que la 8 tiene una banda más intensa, y por tanto su expresión es mayor.

Una vez seleccionada la colonia (8), esta suspensión bacteriana servirá de inóculo para el proceso de bioproducción. Su producción se lleva a cabo en el fermentador con unas ciertas condiciones (*Tabla 11*) a la vez que se realizó un pequeño control externo del inóculo para controlar la expresión del polímero (3.2.1.2).

11/12/17	BIOPRODUCCIÓN						
Fecha	Medidas	Hora temporal	pH	Temperatura	%O ₂	rpm	mL OH ⁻
14/12/17	Inóculo	16:00	7,00	34,9	93,0	499	4
15/12/17	Medida 1	8:00	6,46	35,0	24,9	499	4
15/12/17	Medida 2	8:30	6,32	35,0	24,6	499	4
15/12/17	Medida 3	9:00	6,35	35,0	25,0	499	4

Tabla 11 Condiciones en las que se realizó la fermentación.

De esta tabla vamos a comentar las horas de medida, el pH observado y el nivel de oxígeno; pues la temperatura apenas varía, y las rpm y los mL de OH⁻ son los establecidos para llevar a cabo la bioproducción.

En primer lugar, las horas a las que se han realizado estas medidas son las que he elegido yo, pero no tienen por qué ser estrictamente éstas; no obstante, es cierto que se tienen que cumplir dos condiciones:

- El inóculo tiene que permanecer en el fermentador el tiempo necesario para producir polímero (unas 16h).
- Una vez realizada la medida 1, entre las dos medidas siguientes tiene que haber un tiempo de espera de aproximadamente 30 minutos.

Por otra parte, se observa que el pH se va acidificando, lo que se debe al metabolismo versátil de la bacteria, liberando compuestos que acidifican el medio.

Y por último la disminución de oxígeno (que acaba siendo constante), debido a que el nivel de bacterias va aumentando, y por mucho aire que se introduzca, éste no sube más.

El siguiente paso su bioproducción es examinar el control del crecimiento bacteriano (*Tabla 12*) realizando un seguimiento de la fase final del mismo. Para ello se mide la densidad óptica de la suspensión de células, o dicho de otra forma, midiendo la absorbancia (3.2.1.3) de las muestras obtenidas tras las últimas etapas de la fermentación, el inóculo, y el control externo de éste.

Bioproducción	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Inóculo	Control
Absorbancia 600	11,268	11,808	12,000	0,006	5,064
Hora de fermentación (h)	16	16,5	17	-	-

Tabla 12 Datos obtenidos con el equipo de absorbancia (espectrofotómetro).

Para el análisis del nivel de expresión del polímero VKVx24 es necesario realizar una electroforesis (normalizando las muestras antes de ser pinchadas) con los blancos de las muestras observadas en la *Tabla 12* y comprobar así la existencia de polímero.

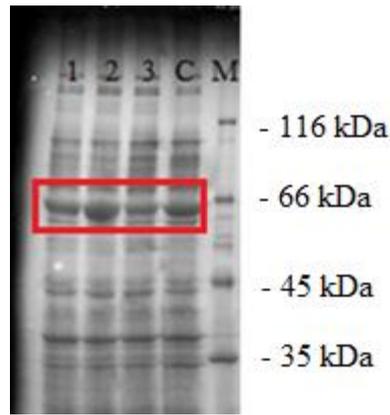


Imagen 24 Electroforesis correspondiente al análisis del nivel de expresión del polímero, realizada con los blancos de las tres muestras obtenidas tras la fermentación y el control tras la fermentación.. En el gel se observa la existencia de bacterias recuadrado en rojo.

Se observa que la cantidad de polímero es mayor en la medida 2, pero viendo que la cantidad de las demás proteínas de la bacteria son las mismas en las cuatro calles, esto puede deberse a un fallo a la hora de preparar la muestra.

Por el contrario, donde se observa menor cantidad de polímero es en la medida del control externo del inóculo, pasando la absorbancia de 12 a 5; esto se debe a que las condiciones del fermentador son mejores para producir mayor cantidad de biomasa; no obstante, hay que destacar que en el erlenmeyer se introduce aire debido a la agitación.

A continuación, la siguiente etapa es la del lavado de la bacteria, eliminando así el medio de cultivo y evitando la contaminación del polímero (3.2.1.4).

Después se procede a su ruptura mediante cambios de presión (3.2.1.5) utilizando 900mL de tampón de sonicación que contiene los inhibidores de proteasas EDTA y PMSF, evitando la acción de proteasas endógenas que podrían degradar al biopolímero producido. Como el EDTA es un quelante, las proteasas que contienen metales son desactivadas debido a la unión metal-AEDT.

Finalmente se procedió a su etapa de purificación (3.2.1.6) utilizando el sistema ITC (*Inverse Transition Cycling*), donde modificando las variables de pH y temperatura, el polímero pasa de un estado de transición a otro ya que posee una

transición inversa con la temperatura (ITT) que gira en torno a la denominada temperatura de transición (T_t).

Cuando se encuentra a 4°C (por debajo de su T_t) y a pH ácido (o neutro), el grupo amino terminal y las lisinas de la cadena lateral se encuentran protonadas, por lo que su solubilidad aumenta debido a la formación de clatratos alrededor de los residuos apolares de la cadena polimérica. Por el contrario, cuando el polímero se encuentra a 42°C (es decir, por encima de su T_t) y a pH básico (11), el grupo carboxilo terminal queda deprotonado, así como las lisinas y el grupo amino terminal, lo que supone una baja solubilidad en estas condiciones, ya que los clatratos pierden esta conformación como consecuencia de la agitación térmica, plegándose así la cadena hidrofóbicamente, y autoensamblándose.

Para observar el nivel de expresión de las proteínas se realiza una electroforesis con las muestras necesarias (*Imagen 25*), dando por terminada la etapa de purificación.

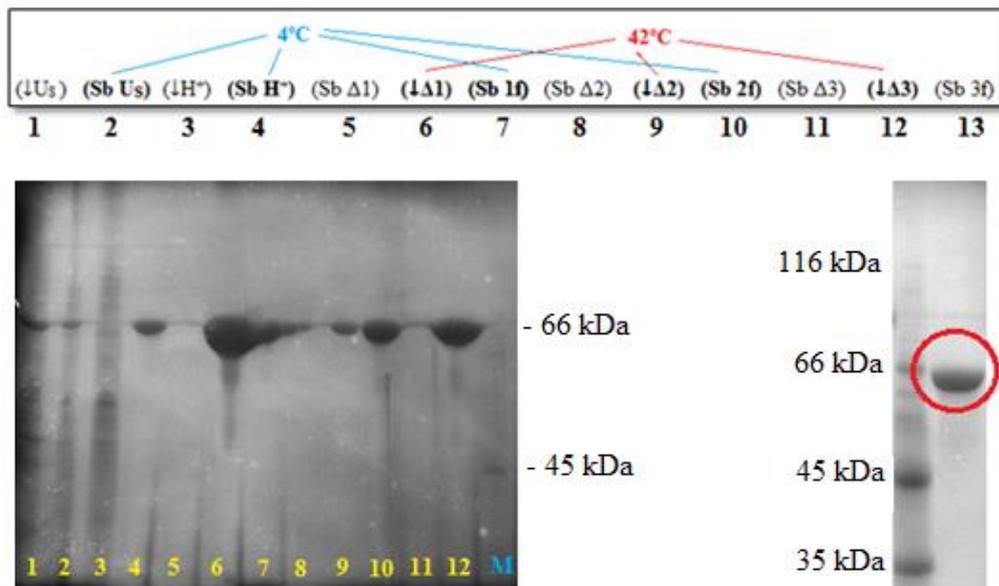


Imagen 25 Electroforesis correspondiente a las etapas del proceso de purificación.

En el gel de la izquierda, en azul (4°C), aquellas etapas donde el polímero se encuentra disuelto; y en rojo (37°C) aquellas donde se encuentra en estado sólido.

En el gel de la derecha se observa el polímero puro.

En el gel de la izquierda, el proceso de purificación concuerda con lo que se mencionó anteriormente, es decir, se observa polímero en las calles 2, 4, 6, 7, 9, 10 y 12. Por el contrario, en el gel de la derecha se observa el polímero VKVx24 prácticamente limpio y puro, con un peso molecular por debajo de 66 kDa, lo que se debe a que, a pesar de tener un tamaño casi idéntico al del marker (M), la movilidad electroforética es mayor.

Posteriormente el polímero se dializa (3.2.1.7), es decir, se introduce en una tripa de diálisis y esto a su vez dentro de un bidón de agua MQ de 25L con agitación (en frío, 4°C), separándose, mediante ósmosis, el polímero y las sales que hay contenidos en el sobrenadante, a través de una membrana permeable de 10.000 Da de *cut off* (que deja pasar las sales al exterior pero no el polímero).

Finalmente, el polímero se congela para eliminar todo el agua posible y se liofiliza (3.2.1.8) en condiciones de baja temperatura y presión. Una vez liofilizado, se pesa, se le otorga un número de identificación (NIP) y se calcula su rendimiento (partiendo un volumen inicial de 15L de medio TB en el fermentador) en mg/L.

Cantidad (mg)	NIP	Rendimiento (mg/L)
3619,7	1471	241,31

Tabla 13 Resultados de la cantidad obtenida de polímero en la bioproducción, su número de identificación (NIP) y su rendimiento (mg/L).

El rendimiento obtenido es muy bueno para este tipo de polímero, pues la media conseguida por el grupo BioForge suele ser de 200-266mg/mL.

4.1.1 Caracterización del polímero VKVx24

Para su caracterización se utilizaron las técnicas de RMN-¹H, FT-IR, y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

- RMN

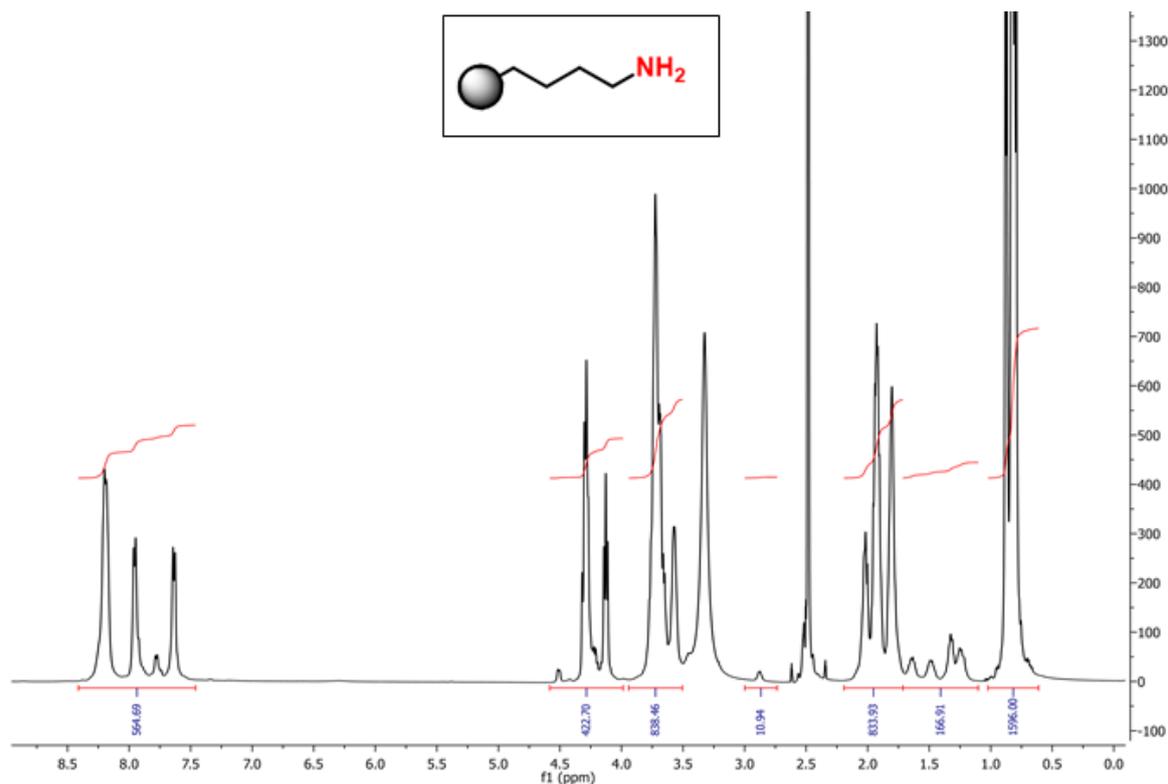


Imagen 26 RMN del polímero VKVx24 obtenido con el Equipo de Resonancia Magnética Nuclear. La imagen observada en la parte superior corresponde a una de las cadenas laterales del grupo amino de la lisina (de la cadena polimérica) sobre el que se llevará a cabo la modificación.

La integral es una medida proporcional al número de átomos de hidrógeno que originan la citada señal. En este espectro hay tres regiones importantes correspondientes a la cadena polimérica: los hidrógenos del CH_3 que dan señal a 1ppm; los del CH_2 que la dan en un rango de 1,7-1,8ppm (la secuencia de iniciación) y 2,0-4,5ppm (la de repetición); y los del NH del grupo amido que la dan a 8ppm.

- IR

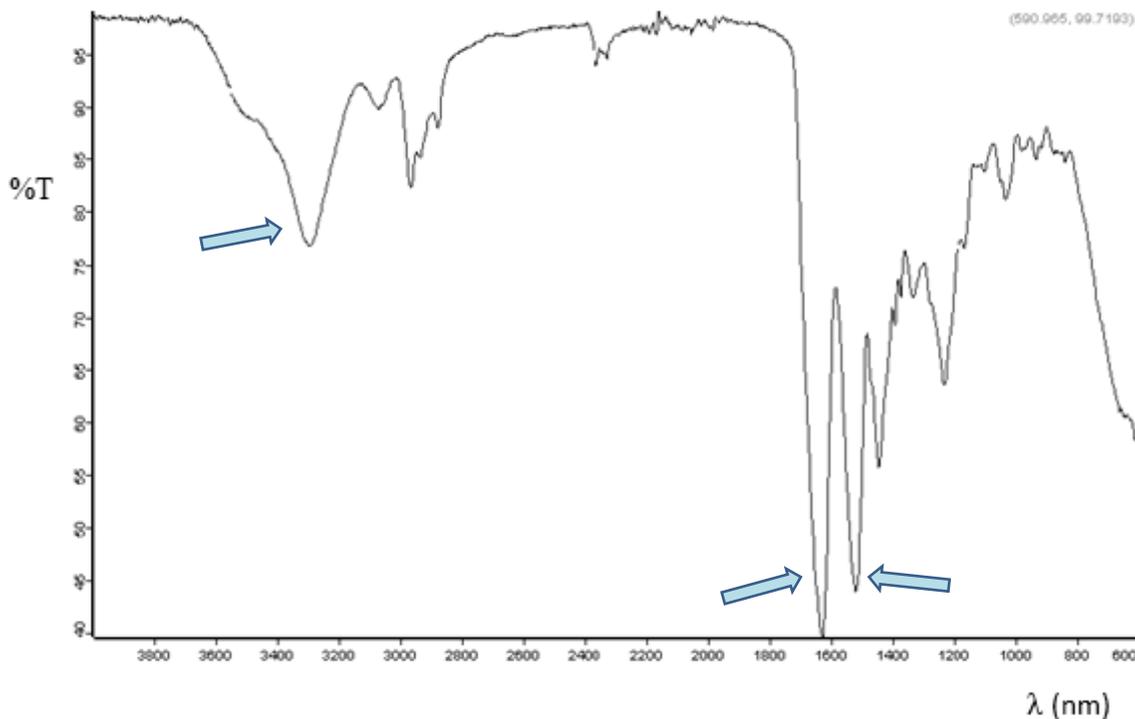


Imagen 27 IR del polímero VKVx24 obtenido con el Equipo de FT-IR. Las flechas indican las bandas más características.

La señal a 3400cm^{-1} corresponde con la banda de tensión (stretching) del enlace N-H de los grupos amido presentes en el polímero.

A 1600cm^{-1} existe una banda intensa de vibración del enlace C=O denominada banda de amida I correspondiente a un movimiento de tijereteo (scissoring).

En torno a 1550cm^{-1} se observa otra banda intensa denominada banda de amida II correspondiente al movimiento de tensión del enlace N-C=O.

-DSC

El protocolo optimizado para llevar a cabo el experimento fue el siguiente: **(0-10)10min (10-80)5°C/min**

- Parte dinámica: 80min, 5°C/min
- Parte isoterma: 10min, 0°C

Se preparó una disolución a una concentración de 50mg/mL. Se pesaron 10,9mg de polímero VKVx24 y se depositaron en un eppendorf junto con 200 μ L de agua MQ. A continuación se midió el pH de la disolución, el cual dio un resultado de 10,28; y por último se realizaron tres alícuotas a pH básico (12,26), ácido (1,70) y neutro (6,80).

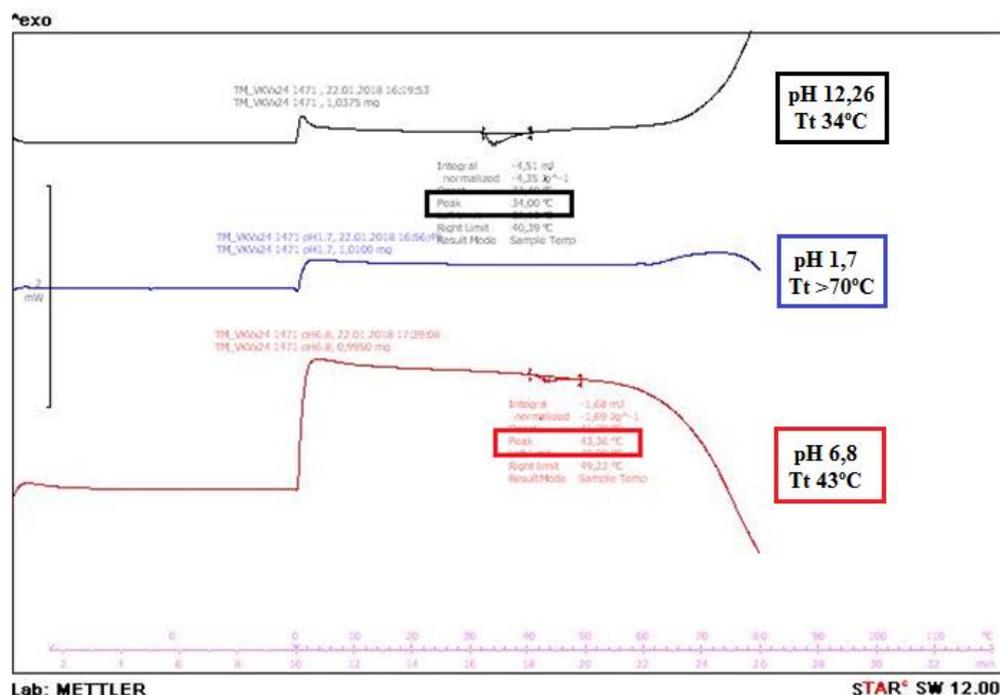


Imagen 28 DSC del polímero VKVx24 realizado a pH básico (12,26), ácido (1,7) y neutro (6,8) con el Equipo DSC 8822e. Se observa la T_i del polímero VKVx24 a dichos pHs.

A primera vista se observan los tres resultados correspondientes a los diferentes pHs, y la representación gráfica de la energía (mW) frente al tiempo (min) y la temperatura (°C). En esta gráfica se observa la temperatura a la que el polímero cambia de fase, es decir, que pasa de estar estirado a estar plegado.

A pH básico (12,26) se observa una temperatura de transición de 34°C, a pH ácido (1,7) 43°C, y a pH neutro (6,8) no se aprecia en la imagen pero tendría una temperatura superior a 70°C.

Esto se debe a que el polímero en un ambiente ácido y neutro tiene los grupos amino terminal y el amino de las lisinas protonados, por tanto al ser una estructura más hidrofílica necesita mucha energía para pasar de estar estirado a estar plegado.

A pH básico, estos grupos (los grupos amino y el N-terminal) se encuentran deprotonados, y como consecuencia la estructura es más hidrofóbica, por tanto necesita poca energía para pasar al otro estado de transición.

4.2 Síntesis, caracterización y rendimiento de los polímeros modificados VKV-azida y VKV-ciclo

Modificando el polímero VKVx24 con el compuesto azida y el derivado de ciclooctino correspondiente, se consiguen formar por entrecruzamiento las estructuras VKV-azida y VKV-ciclo capaces de reaccionar entre sí (a través de la química “click”), tanto a temperatura ambiente como en frío, dando lugar a nanopartículas o cadenas lineales.

En este caso, la modificación se llevó a cabo en DMF, y debido a que el polímero en este medio no se hidrata, no hace falta tener en cuenta la temperatura de transición.

Para la síntesis ambos compuestos se utilizó el biopolímero VKVx24 producido, y los cálculos se hicieron para una cantidad de 1,75g para cada síntesis y 0,6 equivalentes de lisina (grupos amino de éstas), con el objetivo de modificar el 60% de las 24 unidades de lisina que posee (14,4 lisinas).

4.2.1 Síntesis del polímero VKV-azida

Para modificar nuestro polímero VKVx24, es necesario saber la cantidad de compuesto 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato que se necesita. Partiendo de una masa conocida de polímero, podemos calcular los mmoles de los grupos amino de las 24 unidades de lisinas que posee (queriendo modificar el 60% de ellas), y mediante los pesos moleculares ambos compuestos (VKVx24 y el derivado de azida), sacamos la cantidad a pesar.

Los cálculos realizados fueron los siguientes:

$$1750 \text{ mg VKVx24} \times \left(\frac{1 \text{ mmol VKV}}{60642 \text{ mg}} \right) \times \left(\frac{24 \text{ mmol NH}_2}{1 \text{ mmol VKV}} \right) = 0,6925 \text{ mmol NH}_2$$

$$0,6925 \text{ mmol NH}_2 \times 0,6 \text{ eq} = 0,4155 \text{ mmol azida}$$

$$0,4155 \text{ mmol azida} \times 228,17 = \mathbf{94,81 \text{ mg azida}}$$

Polímero	Pm (Da)	mg VKV = mmolNH ₂	mmol azida	eq	NIP
VKVx24	60642	1750 = 0,6925	0,4155 = 94,81 mg	0,6	1471

Tabla 14 Resumen de datos correspondientes a la modificación del ELR VKVx24 con 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato.

Procedimiento experimental

Se disolvieron 1755,60 mg de VKVx24 en 40mL de DMF y se tapó con un septum. Se purgó el aire del matraz con nitrógeno por medio de un globo de N₂ y una aguja.

Se pesaron 94,00 mg de compuesto 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato y se depositaron en un eppendorf con un 1mL de DFM y la disolución se añadió con una jeringa estéril a la solución inicial a temperatura ambiente. La mezcla se dejó agitando 48h a temperatura ambiente para que se llevase a cabo completamente la reacción “click”.

Después de este tiempo se depositó la reacción en 3 tubos tipo Falcon (de 50mL) llenando hasta un máximo de 15mL en cada uno de muestra y hasta 45mL se añadió Et₂O, apareciendo un precipitado blanco.

Se centrifugaron a T^a ambiente durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sólido se lavó con acetona (3x30mL). Se secó a presión reducida y se redisolvió en agua MQ (4°C, 30mL). Se dializó frente agua MQ (3x25L) y se liofilizó, obteniéndose una masa final de 831,5mg.

El valor de la señal a 7 ppm es el que nos interesa para observar el % de unidades de lisinas modificadas; observando un total de 12,67 lisinas (13 redondeando) de las 24 que posee, por tanto el rendimiento de la reacción fue del 54,16 %.

- IR

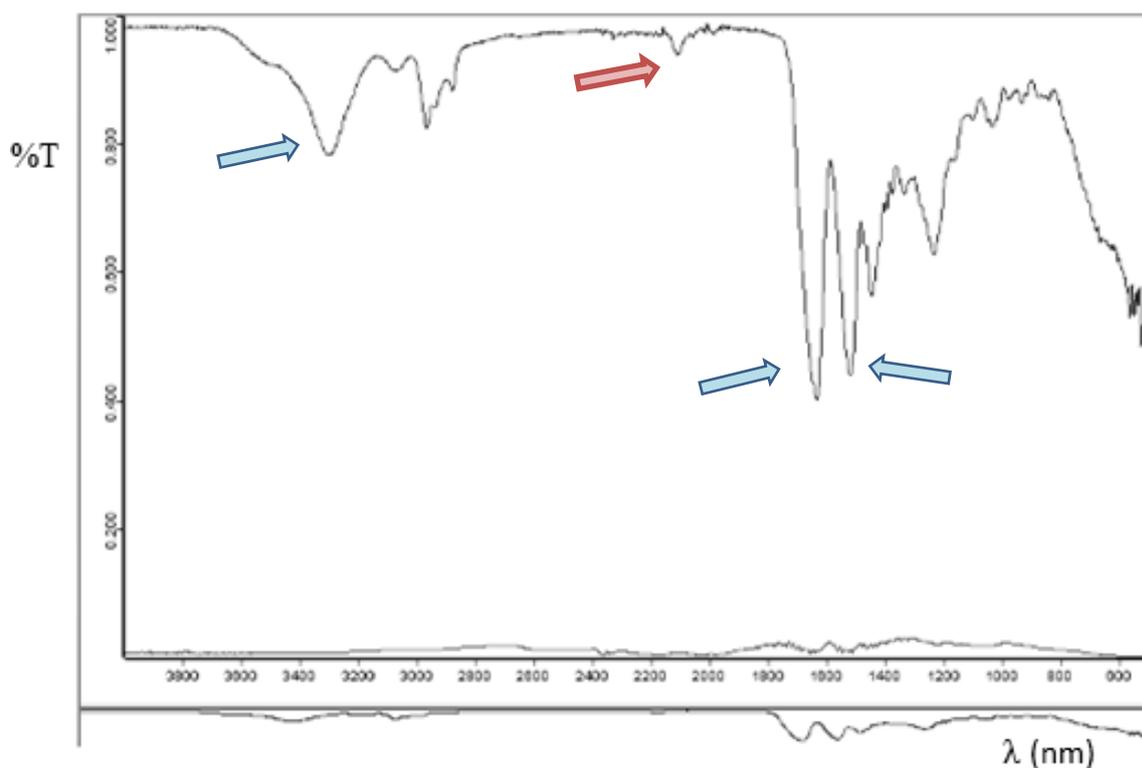


Imagen 30 FT-IR del polímero VKV-azida. Las flechas indican las bandas más características.

A 2100cm^{-1} se observa la banda característica del grupo azida (flecha roja), lo que verifica su presencia en el polímero.

- DSC

El protocolo optimizado para llevar a cabo el experimento fue el siguiente:

(0-10)10min (10-60)5°C/min

- Parte dinámica: 60min, 5°C/min
- Parte isoterma: 10min, 0°C

Se preparó una disolución a una concentración de 50mg/mL. Se pesaron 10,6mg de polímero VKV-azida y se depositaron en un eppendorf junto con 200µL de agua MQ. A continuación se midió el pH de la disolución, el cual dio un resultado de 10,56; y por último se ajustó la muestra a pH neutro (6,86).

Se esperaba obtener una temperatura de transición entre 15-20°C, pero el resultado conseguido fue 0,66°C, lo que nos indica que por causas de manipulación de la muestra, o un exceso de sales o un pH mal establecido, este dato no lo podemos validar.

4.2.2 Síntesis del polímero VKV-ciclo

Para modificar nuestro polímero VKVx24, es necesario saber la cantidad de compuesto (*1R, 8S, 9S*)-biciclo (6.1.0) non-4-yn-9-ilmetil succinil carbonato que se necesita. Partiendo de una masa conocida de polímero, podemos calcular los mmoles de los grupos amino de las 24 unidades de lisinas que posee (queriendo modificar el 60% de ellas), y mediante los pesos moleculares ambos compuestos (VKVx24 y el derivado de ciclooctino), sacamos la cantidad a pesar.

Los cálculos realizados fueron los siguientes:

$$1750 \text{ mg VKVx24} \times \left(\frac{1 \text{ mmol VKV}}{60642 \text{ mg}} \right) \times \left(\frac{24 \text{ mmol NH}_2}{1 \text{ mmol VKV}} \right) = 0,6925 \text{ mmol NH}_2$$

$$0,6925 \text{ mmol NH}_2 \times 0,6 \text{ eq} = 0,4155 \text{ mmol ciclo}$$

$$0,4155 \text{ mmol ciclo} \times 291,30 = \mathbf{121.05 \text{ mg ciclo}}$$

Polímero	Pm (Da)	mg VKV = mmolNH ₂	mmol AZIDA	eq	NIP
VKVx24	60642	1750 = 0,6925	0,4155 = 121,05 mg	0,6	1471

Tabla 15 Resumen de datos correspondientes a la modificación del ELR VKVx24 con (*1R, 8S, 9S*)-biciclo (6.1.0) non-4-yn-9-ilmetil succinil carbonato.

Procedimiento experimental

Se disolvieron 1754,4 mg de VKVx24 en 40mL de DMF y se tapó con un septum. Se purgó el aire del matraz con nitrógeno por medio de un globo de N₂ y una aguja.

Se pesaron 122,0 mg de compuesto (1R, 8S, 9S)-biciclo (6.1.0) non-4-yn-9-ilmetil succinil carbonato y se depositaron en un eppendorf con un 1mL de DFM y la disolución se añadió con una jeringa estéril a la solución inicial del polímero en DMF a temperatura ambiente. La mezcla se dejó agitando 48h a temperatura ambiente para que se llevase a cabo por completo la reacción “click”.

Después de este tiempo se depositó la reacción en 3 tubos tipo Falcon (de 50mL) llenando hasta un máximo de 15mL en cada uno de muestra y hasta 45mL se añadió Et₂O, apareciendo un precipitado blanco.

Se centrifugaron a T^a ambiente durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sólido se lavó con acetona (3x30mL). Se secó a presión reducida y se redisolvió en agua MQ (4°C, 30mL). Se dializó frente agua MQ (3x25L) y se liofilizó, obteniéndose una masa final de 973,8mg.

4.2.2.1 Caracterización del polímero VKV-ciclo

Para su caracterización se utilizaron las técnicas de RMN-¹H, FT-IR, y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

- RMN

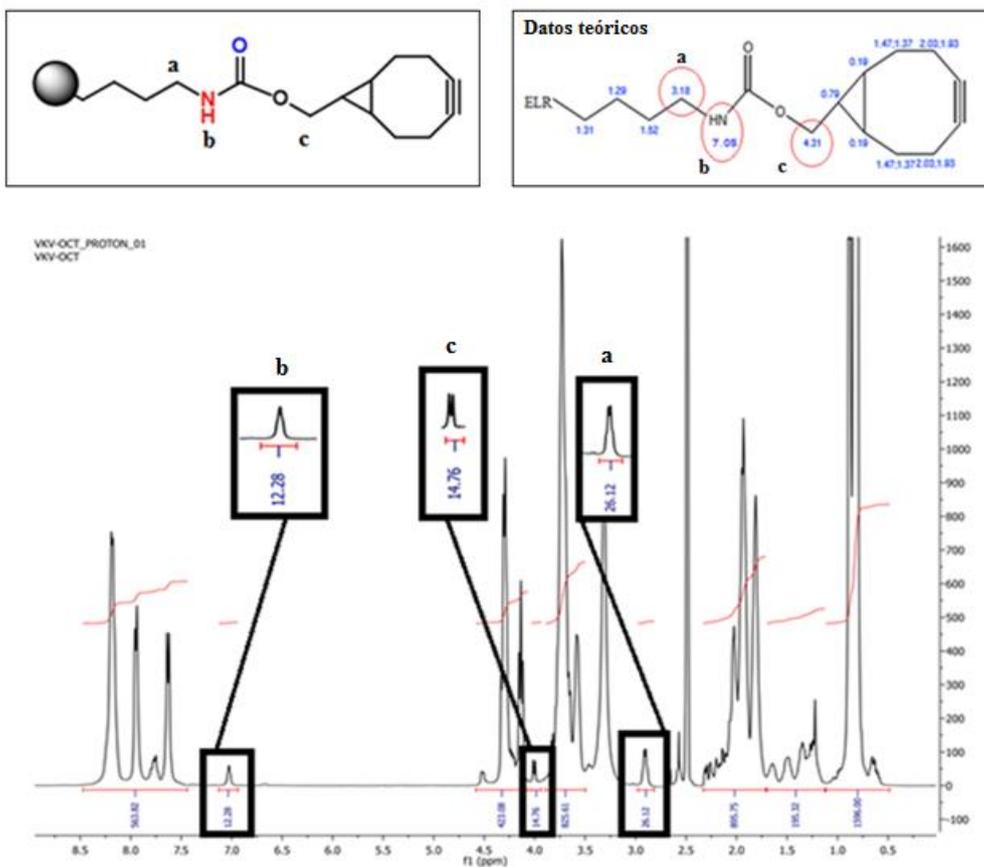


Imagen 31 RMN del polímero VKV-ciclo. Los desplazamientos son: 3,18 (2H, a); 7,05 (H, b); 4,31 (2H, c) ppm.

Misma interpretación que VKV-azida, observamos un total de 12,28 lisinas (13 redondeando) modificadas, y un rendimiento del 54,16 %.

- IR

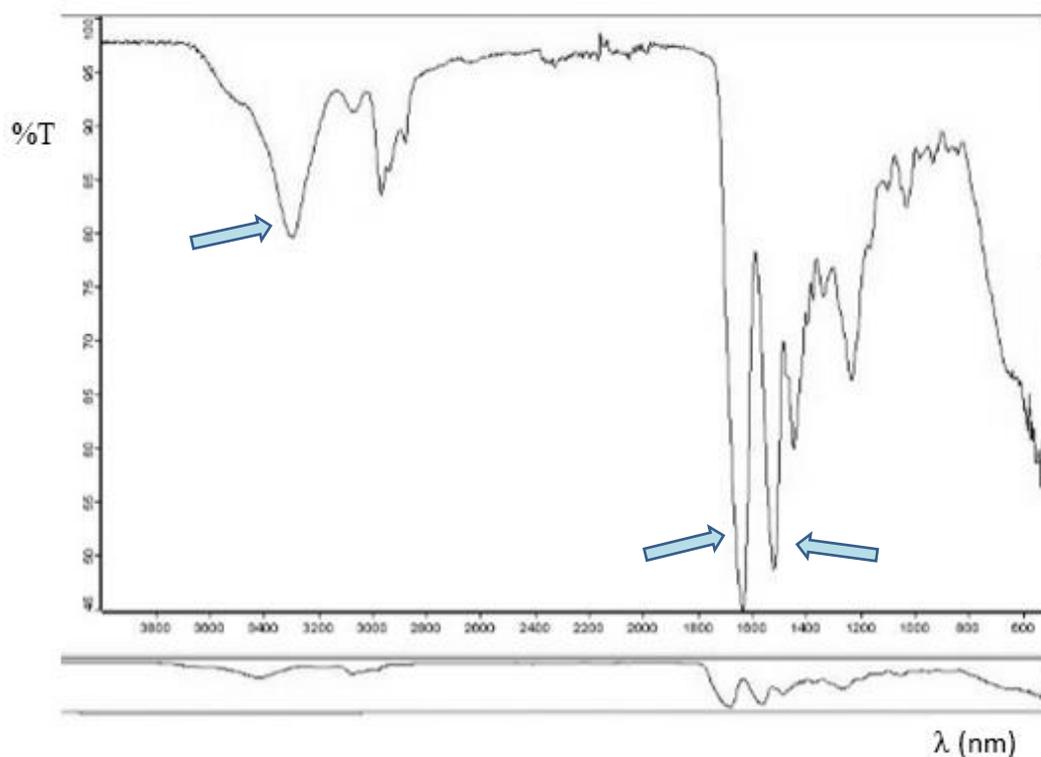


Imagen 32 FT-IR del polímero VKV-ciclo. Las flechas indican las bandas más características..

Se observa que no existen diferencias que posibiliten la identificación del derivado de ciclooctino con respecto al polímero VKVx24 sin modificar.

- DSC

El protocolo optimizado para llevar a cabo el experimento fue el siguiente:

(0-10)10min (10-60)5°C/min

- Parte dinámica: 60min, 5°C/min
- Parte isoterma: 10min, 0°C

Se preparó una disolución a una concentración de 50mg/mL. Se pesaron 10,7mg de polímero VKV-ciclo y se depositaron en un eppendorf junto con 200μL de agua MQ. A continuación se midió el pH de la disolución, el cual dio un resultado de 10,55; y por último se ajustó la muestra a pH neutro (5,99).

Se esperaba obtener una temperatura de transición entre 15-20°C, pero el resultado conseguido fue 0,66°C, lo que nos indica que por causas de manipulación de la muestra, o un exceso de sales o un pH mal establecido, este dato no lo podemos validar.

4.2.3 Rendimiento de los polímeros VKV-azida y VKV-ciclo

Para calcular los pesos moleculares de ambos compuestos, es importante tener en cuenta el grupo funcional que se introduce, pues es clave para el cálculo del peso molecular final.

En la siguiente imagen se ven ambas reacciones cuyos productos son los compuestos VKV-azida y VKV-ciclo con el grupo funcional introducido tras la reacción “click”.

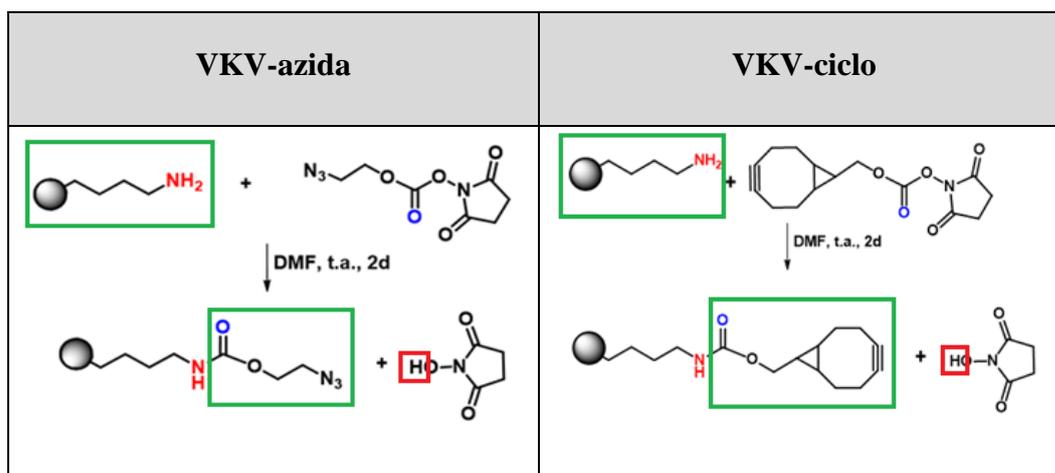


Tabla 16 Reacciones de modificación del polímero VKVx24 con los reactivos correspondientes para la formación de los compuestos VKV-azida y VKV-ciclo. Las estructuras recuadradas son las que tienen interés a la hora del cálculo del nuevo peso molecular.

Con la suma de las estructuras recuadradas en verde y la resta de las recuadradas en rojo y el número de lisinas modificadas (n) se halla el nuevo peso molecular.

Cálculo de Pesos moleculares de los grupos introducidos:

- Para el polímero VKV-N₃:

$Pm_{VKVx24} + Pm \text{ del grupo introducido } n*(C_3H_3N_3O_2)$

- Para el polímero VKV-ciclo:

$Pm_{VKVx24} + Pm \text{ del grupo introducido } n*(C_{11}H_{12}O_2)$

Donde “n” es el número de lisinas modificadas, **13** en este caso (4.2.1.1 y 4.2.2.1).

Polímero	VKVx24	VKV-N ₃	VKV-ciclo
Peso molecular final (Da)	60462	61931	62750

Tabla 17 Pesos moleculares (Da) de los tres polímeros usados en este trabajo:

VKVx24, VKV-azida y VKV-ciclo.

El cálculo del rendimiento se realizó en masa y en moles, para ello se necesitaron las masas obtenidas tras la síntesis de ambos compuestos (4.2.1 y 4.2.2).

VKV-N ₃			RENDIMIENTO (%)
MASA (mg)	M inicial	1755,60	47,36
	M final	831,5	
MOLES	mol iniciales	0,029	44,82
	mol finales	0,013	

Tabla 18 Rendimiento en masa y moles del polímero VKV-azida.

VKV-ciclo			RENDIMIENTO (%)
MASA (mg)	M inicial	1754,4	55,50
	M final	973,8	
MOLES	mol iniciales	0,029	51,72
	mol finales	0,015	

Tabla 19 Rendimiento en masa y moles del polímero VKV-ciclo.

Por otra parte, como se ha mencionado en los comentarios del RMN de ambos polímeros, hay un total de 13 lisinas modificadas (4.2.1.1 y 4.2.2.1), por lo que el grado de conversión de cada uno de éstos (teniendo en cuenta las 24 unidades de lisina que posee), es de un 54,16%. También es importante añadir el porcentaje de lisinas modificadas en ambos compuestos en relación a nuestro objetivo inicial de modificar el 60% de ellas (14,4 lisinas), obteniéndose un porcentaje de 90,27%.

Grado de conversión	Rendimiento químico de la modificación (60%)
54,16%	90,27%

Tabla 20 Grado de conversión y rendimiento químico de la modificación (60%) de los compuestos VKV-azida y VKV-ciclo.

El rendimiento químico de la modificación (90,27%) de ambos compuestos se aproxima al 100% de nuestro objetivo, lo cual supone que las dos reacciones son bastante específicas. Aun así podemos esa pérdida de rendimiento de aproximadamente un 10% puede deberse tanto a la hora de pesar las cantidades iniciales (de reactivos) como las finales (de los polímeros obtenidos).

4.3 Entrecruzamiento de los polímeros modificados VKV-azida y VKV-ciclo

Como se ha mencionado en el punto 3.3.3, el entrecruzamiento entre estas cadenas a través de la química “click” da lugar a la formación de nanopartículas o cadenas lineales, dependiendo de la temperatura de trabajo y el tiempo utilizado para llevar a cabo la reacción.

A su vez, es necesario tener en cuenta su temperatura de transición de los polímeros modificados, pues vamos a trabajar por encima y por debajo de ésta, en un medio acuoso. La T_t de los polímeros VKV-azida y VKV-ciclo se debería haber calculado mediante una calorimetría diferencial de barrido (DSC), pero tras intentarlo dos veces no se obtuvo ningún resultado correcto; por tanto, basándonos en estudios

anteriores realizados por el grupo BioForge, podemos determinar que es de unos 15-20°C a pH neutro.

Cuando se trabaje a 4°C (por debajo de la T_i) se formarán cadenas lineales unidimensionales; y a 37°C (por encima de la T_i), se observarán nanopartículas 3D, predominando las formas esféricas.

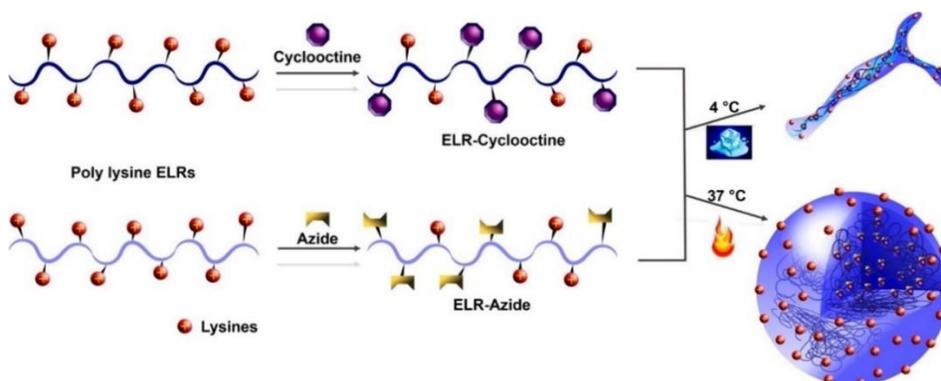


Imagen 33 Diferentes estructuras de los nanogeles formados a 4°C y 37°C⁷.

Para que se lleve a cabo esta reacción, se necesitan dos disoluciones a una concentración de 10mg/10mL en agua MQ.

Procedimiento experimental

Se pesaron 10,3mg de VKV-azida y 10,1 mg de VKV-ciclo, y se añadieron, junto con 10mL de agua MQ, en dos tubos tipo Falcon de 15mL. Ambas disoluciones se dejaron toda la noche en la cámara fría para asegurar que no se encuentran transicionadas. Se introdujeron también en la cámara fría dos poros de filtrado de tamaño 0,45 μ , agujas, y tubos tipo Falcon de 15mL para añadir en ellos la disolución filtrada.

Después se procedió a su filtrado en frío (4°C) para separar el polímero de posibles partículas que intercedan en la reacción “click”.

Finalmente, se llevó el entrecruzamiento entre ambos compuestos teniendo en cuenta las variables mencionadas: temperatura y tiempo.

4.4 Formación de las nanopartículas a 4°C y 37°C

La variable temperatura es muy importante, pues trabajando por encima de ésta (a 37°C) los polímeros estarán plegados formando estructuras esféricas (nanopartículas); y por el contrario, trabajando por debajo (4°C), los polímeros se encontrarán estirados formando cadenas lineales.

La otra variable es el tiempo, es decir, los minutos que transcurren desde el comienzo de la reacción “click” hasta la medida de los resultados. Trabajando a dos tiempos diferentes, (en este caso 40min y 48h), se puede determinar si la reacción ha finalizado (o no).

Para evaluar la estructura (y su tamaño) que se forma, utilizamos la técnica *Dynamic light scattering* (DLS).

A continuación, se desarrolla la formación de las nanopartículas a dos temperaturas y tiempos diferentes, pero es necesario conocer dos conceptos: condiciones de formación (de las NPs) y condiciones de medida (de las mismas). Lo primero se refiere a la temperatura a la que se lleva a cabo el proceso de formación y lo segundo a la temperatura a la que se miden las NPs formadas.

4.4.1 Formación a 4°C tras 40min y 48h en la cámara fría

De ambas disoluciones filtradas (10mg/mL), en frío, se cogieron 500µL y se juntaron en un eppendorf. La mezcla permaneció 40min en la cámara fría para llevar a cabo la reacción “click” y después se llevó al Equipo *Zeta Sizer Nano* para la medición de su tamaño, a 4°C y 37°C.

Una vez realizadas estas dos medidas, la muestra atemperada por el equipo se introdujo en la estufa durante 10min y se midió de nuevo su tamaño.

Se van a llevar a cabo, por tanto, tres mediciones: a 4°C (condición A), a 37°C (condición B) y a 37°C cuando permaneció en la estufa 10min más (condición C).

Una vez medida la muestra tras 40min, la misma disolución se guarda en la cámara fría durante 48h. Después se siguen los mismos pasos anteriores para su medición.

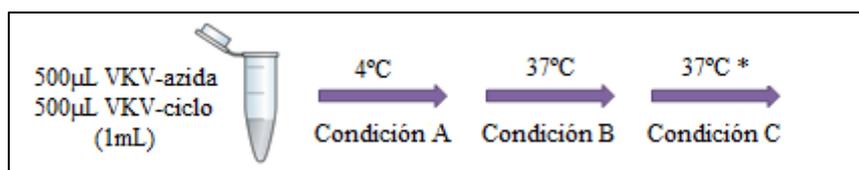


Imagen 34 Sucesión de distintas condiciones de medida de la muestra cuya formación se lleva a cabo a 4°C tras 40min y 48h.

Tras 40min, se espera observar un cambio de tamaño de tal manera que el observado a 37°C sea mayor que a 4°C, debido a la formación de macroagregados. Tras 48h el tamaño debe de ser mayor que en el caso anterior al formarse agregados.

4.4.2 Formación a 37°C tras 40min y 48h en la estufa

Una vez filtradas ambas disoluciones se cogieron 500µL de cada una y se depositaron en dos eppendorf diferentes, introduciéndose en la estufa durante 10min para que se atemperasen. Después se mezclan y se vuelven a introducir durante 40min para que se lleve a cabo la “click”. Pasado este tiempo se llevó al Equipo *Zeta Sizer Nano* y se midió su tamaño, a 37°C y 4°C, observándose el cambio de tamaño.

Una vez realizadas estas dos medidas, la muestra enfriada por el equipo se introdujo en hielo durante 10min y se midió de nuevo su tamaño.

En este caso también se van a llevar a cabo tres mediciones: a 37°C (condición D), a 4°C (condición E) y a 4°C cuando permaneció 10min en un baño de hielo (condición F).

Una vez medida la muestra tras 40min, la misma disolución se guarda en la estufa durante 48h. Después se siguen los mismos pasos anteriores para su medición.

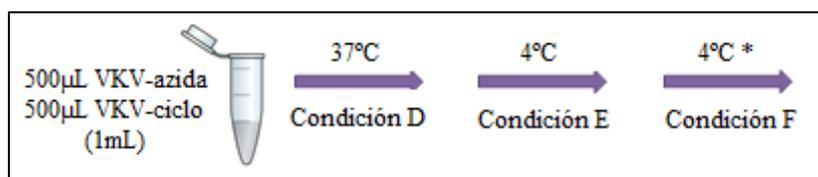


Imagen 35 Sucesión de distintas condiciones de medida de la muestra cuya formación se lleva a cabo a 37°C tras 40min y 48h.

Tras 40min el tamaño esperado observado a 37°C tiene que ser menor que a 4°C, debido a que a baja temperatura la molécula absorbe de agua, aumentando así su tamaño. Tras 48h el tamaño debe de ser mayor que en el caso anterior al formarse agregados.

4.5 Caracterización de las nanopartículas

La formación de nanopartículas se llevó a cabo a temperaturas de 4°C y 37°C y en tiempos de 40min y 48h; además, en cada proceso se llevaron a cabo diferentes condiciones de medida que fueron registradas por el Equipo *Zeta Sizer Nano*.

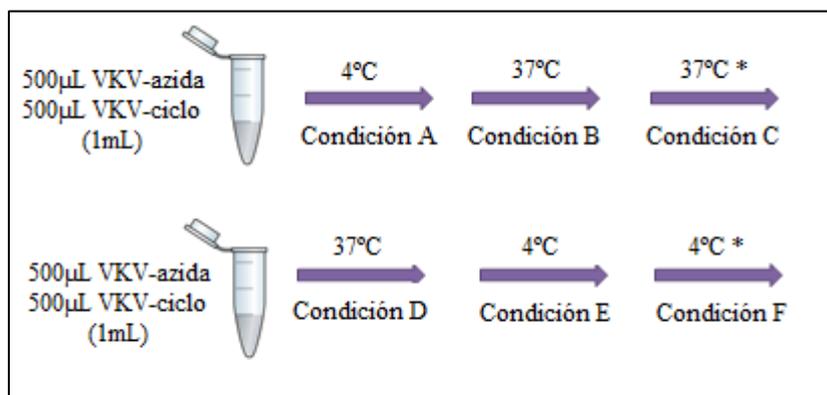


Imagen 36 Condiciones de formación (arriba a 4°C, abajo 37°C) y condiciones de medida (A, B, C, D, E, F) de las nanopartículas tras 40min y 48h.

Se espera observar que cuando las nanopartículas se forman a 4°C, el tamaño que presentan a 37°C sea mayor debido a la formación de macroagregados; así como cuando se forman a 37°C, que el tamaño que presentan a 4°C sea mayor debido a que a baja temperatura la molécula absorbe de agua.

Para medir su tamaño se utilizó la técnica DLS (3.2.2.6) y los resultados son los siguientes (*Tabla 21*)

TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS (SIN FÁRMACO)						
(26/3/18) - (28/3/18)						
Condiciones de formación	Condiciones de medida		40 minutos		48 horas	
			PdI	Tamaño medio	PdI	Tamaño medio
4°C	Condición A	4°C	0,561 0,694 0,653	10,08	0,191 0,178 0,159	180,5
	Condición B	37°C	0,127 0,127 0,103	152,4	0,167 0,162 0,161	155,7
	Condición C	37°C *	0,120 0,115 0,144	154,2	0,166 0,171 0,180	152,8
37°C	Condición D	37°C	0,183 0,188 0,199	329,2	0,278 0,268 0,281	443,5
	Condición F	4°C	0,287 0,252 0,304	433,0	0,263 0,263 0,275	374,1
	Condición E	4°C *	0,309 0,282 0,293	442,5	0,476 0,528 0,459	703,55

Tabla 21 Tamaño medio de las nanopartículas formadas a 4°C y 37°C, tras 40 minutos (recuadrado en amarillo) y 48h (recuadrado en rosa) obtenidas con el Equipo Zeta Sizer Nano.

En la tabla se observan las condiciones de formación de las NPs (4°C y 37°C) y las condiciones de medida de las mismas (A, B, C, D, E, F).

Las nanopartículas formadas a 4°C y medidas a esta temperatura no se puede tomar en consideración porque no están formadas, ya que el tamaño medio es de 10,08nm.

Por otra parte, las polidispersidades (PdI) son aceptables desde el punto de vista físico, pudiéndose considerar monodispersas; se encuentran en un rango de 0,10-0,20 para una temperatura de 37°C (independiente de la temperatura a la que se hayan formado), y de 0,20-0,70 para 4°C, y se cumple que éstas son mayores a menor temperatura.

Además se puede verificar que, tras 40min, las nanopartículas formadas a 4°C, tienen un tamaño a 37°C mayor (que el medido a 4°C), debido a la ausencia de agregación. Por otro lado, aquellas que se han formado a 37°C, tienen un tamaño a 4°C

mayor (que el medido a 37°C), lo que se debe a que a baja temperatura la molécula absorbe de agua y se estira.

Tras 40min la reacción se puede dar por finalizada porque cuando se realiza su estudio a 48h, se observa que el tamaño de aquellas NPs formadas a 37°C aumenta poco, y cuando se forman a 4°C, el tamaño permanece constante.

4.6 Formación de las nanopartículas con el fármaco

La liberación controlada del fármaco se llevó a cabo a través de las nanopartículas formadas gracias a su reticulación, es decir, son capaces de acoger al fármaco en su interior y desprenderlo por difusión en las condiciones adecuadas. Para ello, la temperatura de trabajo escogida fue 37°C (es decir, por encima de su T_i), y una vez que se ha comprobado su estabilidad (ser capaces de acogerlo), se mide su absorbancia para ver cómo lo liberan.

Se realizaron dos ensayos.

Procedimiento experimental

Para cada ensayo se preparó una disolución de Vancomicina a una concentración de 100mg/mL (como se mencionó en la *Tabla 2*) y se dividió en dos eppendorf para el primer caso (0,5mL en cada uno de ellos), y en dos tubos tipo Falcon de 15mL (con la misma cantidad) para el segundo.

Para cada ensayo también, se pesaron 10mg de VKV-azida y 10mg de VKV-ciclo y se añadieron, por separado, a los 0,5mL de Vancomicina.

Ambas disoluciones se dejaron en la cámara fría 24h para su completa disolución. Se introdujeron también en la cámara fría dos filtros de jeringa con un tamaño de poro 0,45 μ m, agujas, y tubos tipo Falcon de 15mL para añadir en ellos la disolución filtrada.

Se añadieron 9,5mL de agua-MQ para obtener una concentración de 1mg/mL y se filtraron. Mientras que para el primer ensayo se pasó la muestra del eppendorf a otro tubo tipo Falcon, en el segundo ensayo solo hubo que añadir la cantidad de agua correspondiente, evitando así pérdida de muestra.

Una vez filtradas, se cogió la cantidad necesaria para formar las nanopartículas y llevar a cabo los dos procedimientos mencionados anteriormente, que son la medida de su tamaño para comprobar su estabilidad, y la medida de su absorbancia para ver como dosifican el medicamento.

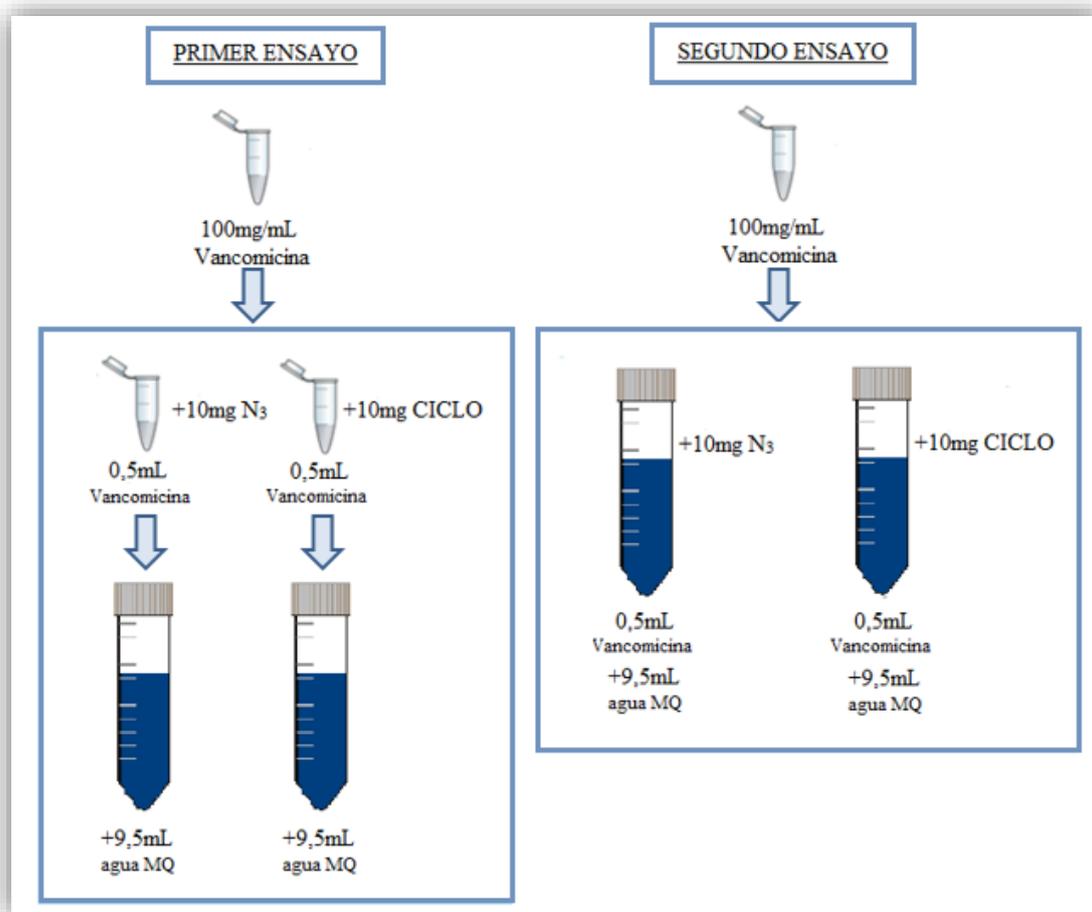


Imagen 37 Procedimientos esquematizados para llevar a cabo ambos ensayos.

4.6.1 Comprobación de su estabilidad

De ambos ensayos se extrajeron 500 μ L de VKV-azida+fármaco y 500 μ L de VKV-ciclo+fármaco para formar la nanopartícula a 37°C tras 40min en la estufa (procedimiento explicado en el punto 4.4.2), y medir su tamaño posteriormente con el Equipo *Zeta Sizer Nano* (llevando a cabo las mismas condiciones de medida D, E, y F descritas anteriormente).

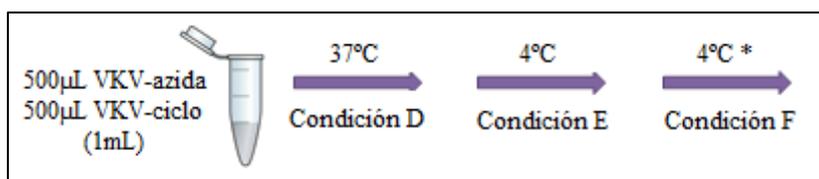


Imagen 38 Sucesión distintas condiciones de medida de la muestra cuya formación se lleva a cabo a 37°C tras permanecer 40min en la estufa.

Como se ha mencionado en el punto 4.6, se realizó un primer ensayo donde dicha cantidad de fármaco y polímero se encontraba en un eppendorf y se cambió a un Falcon para la adición de agua MQ; y un segundo ensayo donde la muestra y la adición se realizó en el mismo Falcon de partida, evitando así una posible pérdida de muestra (Tabla 22).

TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS CON LA VANCOMICINA				TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS CON LA VANCOMICINA			
PRIMER ENSAYO (11/4/18)				SEGUNDO ENSAYO (12/4/18)			
Condiciones de formación	Condiciones de medida	40 min		Condiciones de formación	Condiciones de medida	40 min	
		PdI	Tamaño medio con fármaco			PdI	Tamaño medio con fármaco
Formación a 37°C	37°C	0,294 0,247 0,222	127,3	Formación a 37°C	37°C	0,580 0,490 0,798	160,9
	4°C	0,729 1 1	206,8		4°C	0,898 0,897 0,928	190,0
	4°C *	0,724 0,662 0,711	212,5		4°C *	1 0,957 0,999	201,8

Tabla 22 Tamaño medio (recuadrado en amarillo) de las nanopartículas formadas con el fármaco a 37°C tras 40min en la estufa.

*Nota: Una forma de verificar que las nanopartículas están bien formadas, es medir su tamaño a 4°C y observar que es mayor que a 37°C; en esta prueba sólo se realiza esta medida con ese fin.

En primer lugar se observa que las monodispersidades cambian cuando está el fármaco presente, pues con valores por encima de 0,7-0,8 ya no son monodispersas si no polidispersas. En este caso, cuando las NPs se forman a 37°C y se miden a la misma temperatura, las PDI sólo se pueden considerar monodispersas en el primer ensayo; en cambio, cuando se miden a 4°C en ambos ensayos, la PDI aumenta en la mayoría de los casos hasta alcanzar el valor máximo, 1.

Las PDIs en torno a 1 nos proporcionan la información de que el tamaño obtenido en estas dos tablas es el tamaño medio del fármaco y las NPs, de ahí que se encuentre entre los 127,3 y 160,9nm (*Tabla 22*) frente a los 329,2nm sin medicamento (*Tabla 21*).

Además, cabe destacar que observando la primera tabla de resultados de las nanopartículas sin fármaco (*Tabla 21*), vemos que cuando se forman a 4°C y se miden a 37°C (Condición C), el tamaño se encuentra en torno a los 152-154, que es un tamaño medio al que tenemos con fármaco (*Tabla 22*). Este hecho puede deberse a diferentes causas, entre ellas:

- i) Que no haya nanopartículas como tal, sino macroagregados formados por impedimento estérico que ocasiona la Vancomicina.
- ii) Que exista una interacción entre el fármaco y la nanopartícula de tipo hidrofóbico o puentes de hidrógeno (ya que el fármaco posee grupos hidroxilo y las NPs grupos amino) que ocasiona que ésta se contraiga.
- iii) Que sea una simple casualidad.

4.7 Ensayos de liberación

Para determinar si las nanopartículas son capaces (o no) de liberar al fármaco, se realizan este tipo de ensayos que consisten en medir la absorbancia que presenta la muestra (NPs+fármaco) cada cierto tiempo.

Para ello, primero se preparan aquellas muestras que van a ser medidas, que en este caso serán las disoluciones utilizadas para el primer ensayo (4.6).

La longitud de onda seleccionada para la medición será 280nm pues es donde presentan un pico de absorción las proteínas, y que además coincide con el pico de

absorción de la Vancomicina y de las nanopartículas (por el hecho de no tener aminoácidos aromáticos).

Procedimiento experimental

Se cogieron 2mL de VKV-azida+fármaco y 2mL de VKV-ciclo+fármaco para formar la nanopartícula a 37°C tras 40min en la estufa. Se necesita un volumen mayor que en los casos anteriores porque se quiere observar su dosificación. A continuación, se introdujeron los 4mL de muestra en una tripa de diálisis y ésto en un tubo tipo Falcon de 45mL con 34mL de PBS 1M (cuya osmolaridad coincide con la del cuerpo humano).

Se repitió el procedimiento 2 veces para obtener un total de 3 ensayos, además también se realizaron por otra parte dos blancos de Vancomicina a la misma concentración que la que tenemos en el Falcon (5mg/mL), en el mismo medio, PBS, para observar cómo se dosificaba sin necesidad de usar las nanopartículas.

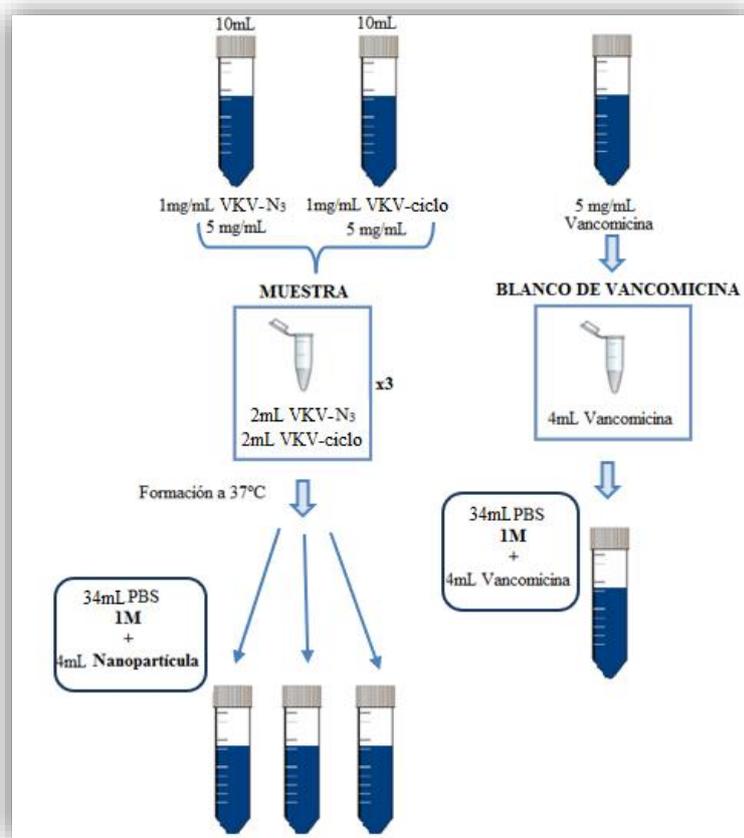


Imagen 39 Proceso de formación de la muestra (nanopartícula con el fármaco en su interior) y del blanco de Vancomicina.

Después se realizaron las medidas de absorbancia del blanco y de las muestras (A_{280}) con el Equipo *NanoDrop*.

- i) Para la medida del blanco se cogieron $2\mu\text{L}$ de PBS y se depositaron en el equipo, quedando esta medida registrada automáticamente.
- ii) Para la medida de la muestra, se introdujo el Falcon que la contenía en un agitador a temperatura ambiente con el objetivo de homogeneizarla, y se fueron cogiendo $2\mu\text{L}$ cada X tiempo midiéndose a su vez su absorbancia; primero cada 10min, luego cada hora, luego tras 2h, después tras 24h y 48h, y por último tras 5 días.

Finalmente, una vez obtenidos los valores de A_{280} , se realizó una curva de calibrado para obtener la concentración de Vancomicina dosificada. Para ello se preparó una disolución de 100mg/mL (como se mencionó en la *Tabla 2*) de fármaco y se fue diluyendo para conseguir distintas concentraciones (75, 50, 30, 20, 10 y 5mg/mL).

4.7.1 Medida de la absorbancia de las nanopartículas con el fármaco mediante espectrometría UV-Vis

La medida se realizará a 280nm , donde presentan el pico de absorción las nanopartículas y la molécula de vancomicina.

Se realizó 3 veces el mismo procedimiento con las disoluciones utilizadas para el primer ensayo de medición de las nanopartículas con el fármaco con su interior. Para las tres, se obtuvieron los resultados de la absorbancia (a 280nm) y mediante una curva de calibrado (A_{280} frente concentración de Vancomicina en mg/mL), se pudo obtener la cantidad de fármaco dosificado. Además, como también se ha mencionado anteriormente, se realizaron dos blancos de Vancomicina (5mg/mL) en el mismo medio, PBS, para ver cómo se dosificaba sin necesidad de usar las nanopartículas (*Imagen 40*).

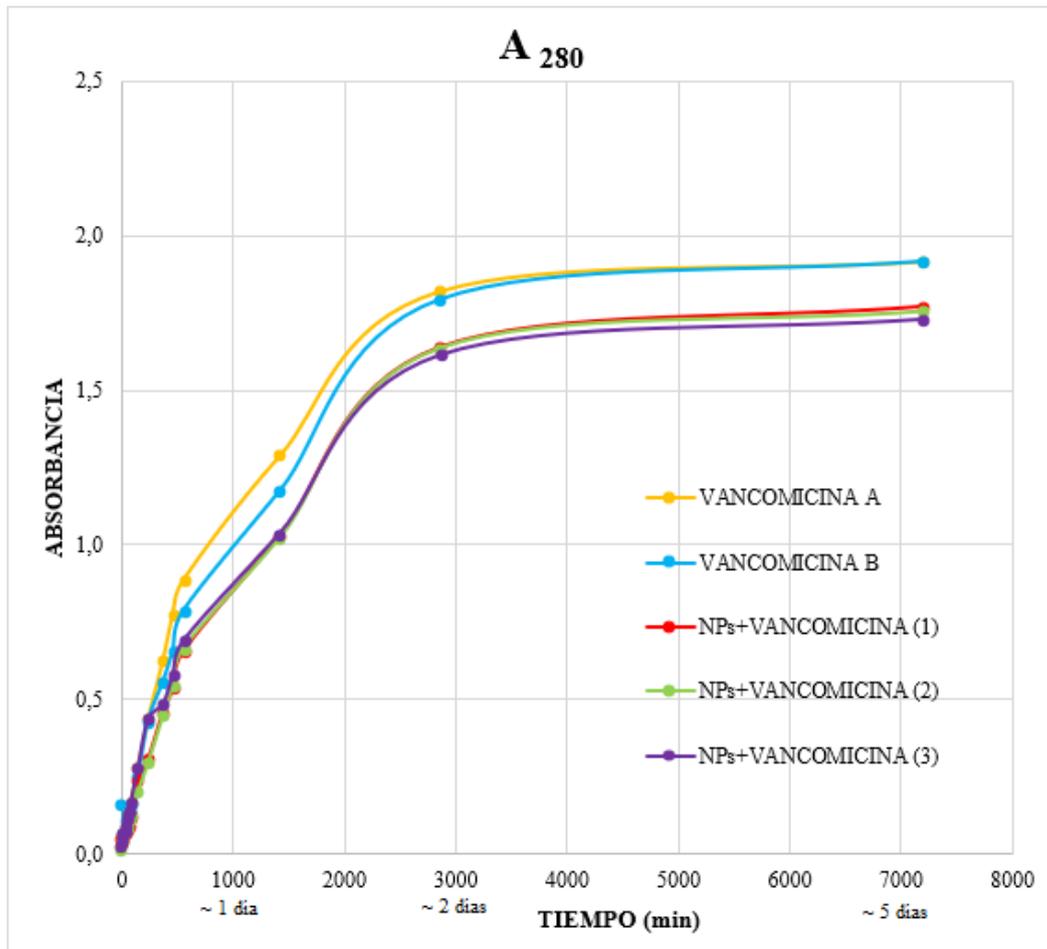


Imagen 40 Representación de la absorbancia a 280nm que presentan los blancos de vancomicina (en azul y amarillo) y las tres muestras de NPs con fármaco (en rojo, verde y morado), frente al tiempo transcurrido desde el minuto cero hasta pasados 5 días.

En las gráficas se observa que la Vancomicina (A y B) llega antes a la disolución. El hecho de que las NPs atrapan al fármaco hace que esta velocidad de liberación disminuya, empezando a notarse su efecto entre el primer y segundo día (1000-2000min).

Para determinar cuanta masa se libera, es necesario realizar una curva de calibración utilizando una disolución de Vancomicina (1mg/mL) en el mismo medio, PBS.

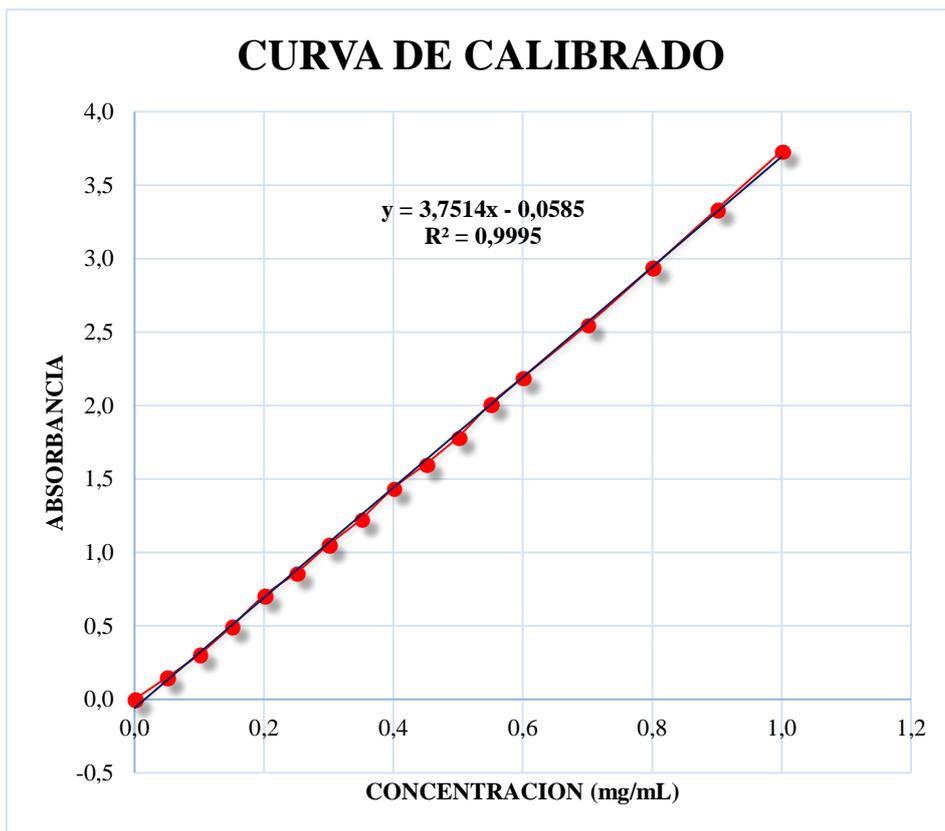


Imagen 41 Curva de calibración de Vancomicina (1mg/mL)

Una vez obtenida la curva, utilizando la ecuación de la recta y las absorbancias medidas a lo largo del proceso, obtenemos la concentración de Vancomicina dosificada desde el minuto 0 hasta pasados 5 días.

Como todos los ensayos se realizaron con una disolución a una concentración de 5mg/mL de NPs (con y sin fármaco) contenida en un volumen de 4mL y su vez esto contenido en un Falcom con volumen total de 38mL (34mL de PBS y 4mL de tripa de diálisis), se esperaba dosificar una cantidad de 0,526mg/mL de fármaco teórica.

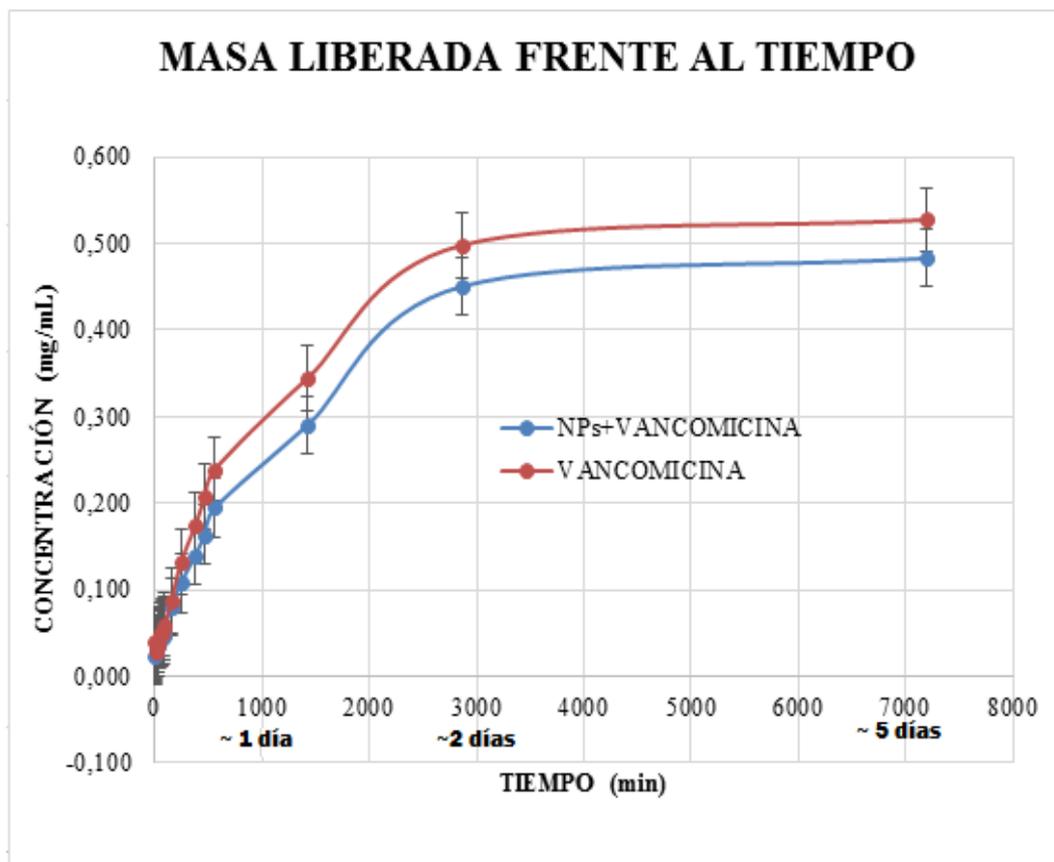


Imagen 42 Representación de la masa liberada (mg/mL) media de los blancos de Vancomicina (en rojo) y de la media de los tres ensayos (en azul), frente al tiempo, en un periodo de 5 días desde su primera medida. Los bigotes corresponden al error típico de cada medida.

Como se menciona en el punto 4.7, se utiliza una disolución de Vancomicina (a una concentración de 5mg/mL) en un volumen de 4mL de suspensión de nanopartículas (o agua MQ en el caso de los blancos) contenido en un volumen total de 38mL (34mL de PBS + 4mL NPs). Haciendo el cálculo, la cantidad máxima que se puede dosificar es 0,526mg/mL.

Considerando que el valor máximo de dosificación se corresponde al valor en torno al cual se han estabilizado ambas gráficas se puede observar el blanco de Vancomicina se libera lo máximo posible (0,526mg/mL). En cambio, utilizando las nanopartículas como soporte, se dosifican 0,483mg/mL, es decir, un 91,8%, con lo que se puede concluir que las nanopartículas cumplen la función de interaccionar con el fármaco para libelarlo después con buenos rendimientos.

Estas interacciones son de diversos tipos: hidrofóbicas (ya que a 37°C las NPs tienen un CORE hidrofóbico y la Vancomicina varios grupos fenilo), enlaces de hidrógeno (entre los grupos hidroxilo del fármaco y los grupos amino de las NPs), e interacciones electroestáticas (entre el grupo carboxilo del medicamento y los grupos amino del polímero cargados a pH neutro).

5. CONCLUSIONES

- El polímero VKVx24 se ha obtenido a través de tecnología ADN recombinante mediante la bacteria *E. coli* con un rendimiento de 241,31mg/L de medio de cultivo. También se ha observado que a lo largo del trabajo, este ELR no se ha degradado y sus propiedades físico-químicas no han cambiado.
- Los polímeros modificados VKV-azida y VKV-ciclo se obtuvieron con rendimientos en masa y moles de 47,36/44,82% y 55,50/51,72% respectivamente.
- El grado de conversión de la reacción (teniendo en cuenta todas las unidades de lisina que presenta el polímero VKVx24), en ambos polímeros (VKV-azida y VKV-ciclo), es de 54,16%.
- El rendimiento químico de la modificación (usando 0,6eq por lisina) en ambos polímeros, VKV-azida y VKV-ciclo, es de 90,12%.
- Las nanopartículas formadas a 4°C presentan un tamaño mayor cuando se miden a 37°C (152-154nm) que a 4°C (no formadas), debido a la ausencia de agregación. En cambio, las formadas a 37°C, presentan un tamaño mayor cuando se miden a 4°C (433-442nm) que a 37° (329nm) debido a que a baja temperatura la molécula absorbe agua y se estira.
- Las nanopartículas formadas en disolución acuosa se comportan según la ITT, es decir, por encima de su temperatura de transición se encuentran como estructuras esféricas y por debajo como cadenas lineales.
- Las nanopartículas formadas a 37°C acogen al fármaco en su interior posiblemente por interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, e interacciones electroestáticas (observándose un tamaño de 127-160nm (menor que cuando no hay medicamento).

- La velocidad de liberación de la Vancomicina es menor cuando se encuentra acogida dentro de la nanopartícula, lo que indica existencia de interacción, liberándose, en un rango de 5 días, un 91,8% de medicamento; por lo que se puede concluir que las NPs cumplen el objetivo de dosificar de forma controlada el fármaco.
- En un futuro, con ensayos de mucoadhesión se podría comprobar que las NPs se adhieren a las mucosas del ojo por fuerzas electroestáticas para tratar posibles infecciones ocasionadas por bacterias.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Rauscher, S. & Pomès, R. The liquid structure of elastin. *Elife* **6**, 1–21 (2017).
2. Mithieux, S. M. & Weiss, A. S. B. T.-A. in P. C. Elastin. in *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers* **70**, 437–461 (Academic Press, 2005).
3. Debelle, L. & Tamburro, A. M. Elastin: molecular description and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 261–272 (1999).
4. Kuna, M., Mahdi, F., Chade, A. R. & Bidwell, G. L. Molecular Size Modulates Pharmacokinetics, Biodistribution, and Renal Deposition of the Drug Delivery Biopolymer Elastin-like Polypeptide. *Sci. Rep.* **8**, 7923–7935 (2018).
5. García-Arévalo, C., Pierna, M., Girotti, A., Arias, F. J. & Rodríguez-Cabello, J. C. A comparative study of cell behavior on different energetic and bioactive polymeric surfaces made from elastin-like recombinamers. *Soft Matter* **8**, 3239–3249 (2012).
6. Rodríguez-Cabello, J. C., Piña, M. J., Ibáñez-Fonseca, A., Fernández-Colino, A. & Arias, F. J. Nanotechnological Approaches to Therapeutic Delivery Using Elastin-Like Recombinamers. *Bioconjug. Chem.* **26**, 1252–1265 (2015).
7. González De Torre, I., Quintanilla, L., Pinedo-Martín, G., Alonso, M. & Rodríguez-Cabello, J. C. Nanogel formation from dilute solutions of clickable elastin-like recombinamers and its dependence on temperature: Two fractal gelation modes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 14509–14515 (2014).
8. Rodríguez-Cabello, J. C. *et al.* Emerging applications of multifunctional elastin-like recombinamers. *Nanomedicine* **6**, 111–122 (2010).
9. Girotti, A., Fernández-Colino, A., López, I. M., Rodríguez-Cabello, J. C. & Arias, F. J. Elastin-like recombinamers: Biosynthetic strategies and biotechnological applications. *Biotechnol. J.* **6**, 1174–1186 (2011).
10. Cultex, S. Tecnología del ADN recombinante. *Tecnol. genética* **35**, 101–118 (2006).
11. Li, B., Alonso, D. O. V. & Daggett, V. The molecular basis for the inverse temperature transition of elastin. *J. Mol. Biol.* **305**, 581–592 (2001).

12. Gómez, J. R. Estudio de la transición inversa con la temperatura en polímeros tipo elastina con creciente funcionalidad. *Tesis Doctoral* (Universidad de Valladolid, 2004).
13. Fernández-Colino, A. , Girotti, A., Lopez, M.I., Arias, F. J., Rodriguez-Cabello, J.C. Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas. *Proteínas. Biomecánica* **19**, 8–16 (2011).
14. Yi, G., Son, J., Yoo, J., Park, C. & Koo, H. Application of click chemistry in nanoparticle modification and its targeted delivery. *Biomater. Res.* **22**, 13 (2018).
15. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40**, 2004–2021 (2001).
16. Ghazzali, I. Los dendrímeros y la química click Empleo en VIH. *Trabajo de Fin de Grado* (Universidad de Sevilla, 2016).
17. Suárez, A. Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares a alquinos catalizadas por cobre. *An. Quím* **108**, 306–313 (2012).
18. Meldal, M. & Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **108**, 2952–3015 (2008).
19. Hein, J. E., Tripp, J. C., Krasnova, L. B., Sharpless, K. B. & Fokin, V. V. Copper(I)-catalyzed cycloaddition of organic azides and 1- iodoalkynes. *Angew Chem Int Ed Engl.* **48**, 8018–8021 (2009).
20. Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15046–15047 (2004).
21. Codelli, J. A., Baskin, J. M., Agard, N. J. & Bertozzi, C. R. Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11486–11493 (2008).
22. Mei, L. *et al.* Enhanced Tumor Retention Effect by Click Chemistry for Improved Cancer Immunotherapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 17582–17593 (2018).

23. Meghani, N. M. *et al.* Design and evaluation of clickable gelatin-oleic nanoparticles using fattigation-platform for cancer therapy. *Int. J. Pharm.* **545**, 101–112 (2018).
24. Massaad-Massade, L. *et al.* New Formulation for the Delivery of Oligonucleotides Using “Clickable” siRNA-Polyisoprenoid-Conjugated Nanoparticles: Application to Cancers Harboring Fusion Oncogenes. *Bioconj. Chem.* (2018). doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00205
25. Oscar Escalona Rayo, D. Q. G. Nanogeles poliméricos: una nueva alternativa para la administración de fármacos. *Rev. Mex. ciencias Farm.* **45**, 17–38 (2014).
26. Jiang, Y., Chen, J., Deng, C., Suuronen, E. J. & Zhong, Z. Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* **35**, 4969–4985 (2014).
27. Rodríguez-Cabello, J. C., Arias, F. J., Rodrigo, M. A. & Girotti, A. Elastin-like polypeptides in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 85–100 (2016).
28. Ali, Y. *et al.* Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1**, 219–263 (2011).
29. Hernández, P. & Sc, R. M. Etiología bacteriana de infecciones oculares externas. *Indian J. Med. Res.* **1**, 57–64 (2003).
30. Gayton, J. L. Etiology, prevalence, and treatment of dry eye disease. *Clin. Ophthalmol.* **3**, 405–12 (2009).
31. Barberá Loustaunau, E. & Vázquez Castro, F. Tratamientos tópicos oculares: revisión. *Inf Ter Sist Nac Salud* **33**, 80–87 (2009).
32. *Clorohidrato de Vancomicina. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)* (2016). Available at: <http://www.farmacopea.org.mx/Repositorio/Documentos/330.pdf> (Última consulta 13/06/2018)
33. *Vademecum. Vancomicina.* (2016). Available at: <https://www.vademecum.es/principios-activos-vancomicina-j01xa01>. (Última consuta 13/06/2018)

34. DrugBank. Vancomycin. (2018). Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00512>. (Última consulta 13/06/2018)
35. Sau-Hung Spence Leung & Robinson, J. R. The contribution of anionic polymer structural features to mucoadhesion. *J. Control. Release* **5**, 223–231 (1988).
36. Shaikh, R., Raj Singh, T. R., Garland, M. J., Woolfson, A. D. & Donnelly, R. F. Mucoadhesive drug delivery systems. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **3**, 89–100 (2011).
37. Van Putten, J. P. M. & Strijbis, K. Transmembrane Mucins: Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer. *J. Innate Immun.* **9**, 281–299 (2017).
38. Lillehoj, E. P., Kato, K., Lu, W. & Kim, K. C. Cellular and Molecular Biology of Airway Mucins. **303**, 139–202 (2013).
39. Wang, L., Fan, D., Chen, W. & Terentjev, E. M. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Sci. Rep.* **5**, 1–11 (2015).
40. Barresi, A. A., Rasetto, V. & Marchisio, D. L. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Use of computational fluid dynamics for improving freeze-dryers design and process understanding . Part 1 : Modelling the lyophilisation chamber. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **129**, 30–44 (2018).
41. Joy, A. P. *et al.* Proteome profiling of extracellular vesicles captured with the affinity peptide Vn96: comparison of Laemmli and TRIzol© protein-extraction methods. *J. Extracell. Vesicles* **7**, 1–12 (2018).
42. Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X. & Low, S. C. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, 1–14 (2013).

7. LISTADO DE IMÁGENES Y TABLAS

7.1 Imágenes

Imagen	Título	Pág	Apartado
1	Estructura del ADN recombinante.	6	1.3
2	Representación de la cadena polimérica extendida por encima de la T_t y plegada por debajo de la T_t .	7	1.4
3	Algunos ejemplos de química "click". En rojo aquella reacción utilizada en este trabajo: 1,3-dipolar o cicloadiciones [3+2].	9	1.6.1
4	Versión no catalítica y catalítica de la química "click" entre grupos funcionales azida y octino.	10	1.6.2
5	Ciclo catalítico de la química "click" en presencia de la sal de Cu(I). Mecanismo de la cicloadición [3+2].	10	1.6.2
6	Reacción 1,3-dipolar entre ciclooctinos difluorados con un compuesto azida para proporcionar mezclas regioisoméricas de triazoles.	11	1.6.2
7	Diferentes tamaños de geles elaborados mediante química "click".	12	1.7
8	Película lagrimal sana con capas lipídicas, acuosas y de mucina y una superficie ocular sana con microvellosidades intactas.	14	1.9
9	Molécula de Vancomicina hidroclorehídrica.	15	1.9.1
10	Estructura de la mucina secretada más prevalente en el fluido lagrimal, MUC5AC.	17	1.10.1

11	Grupo amino terminal de una de las lisinas de la cadena peptídica del polímero VKVx24 sobre el cual se va a llevar a cabo la modificación.	18	2
12	VKV-azida.	18	2
13	VKV-ciclo.	18	2
14	Proceso de producción del polímero VKVx24.	23	3.2.1
15	Placa de Petri sembrada con la bacteria E. coli donde se observan todas las colonias que presentan resistencia al antibiótico y las seleccionadas para el estudio. Imagen realizada por la autora del trabajo.	24	3.2.1.1
16	Fermentador (de 15L). Imagen realizada por la autora del trabajo.	25	3.2.1.2
17	Típica representación gráfica del Crecimiento bacteriano.	26	3.2.1.2
18	Sistema de purificación ITC utilizado para el polímero VKVx24.	29	3.2.1.6
19	Proceso de Dispersión de luz dinámica (DLS en inglés).	37	3.2.2.6
20	Reacción “click” del polímero VKVx24 con 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato para la formación de VKV-azida.	38	3.3.1
21	Reacción “click” del polímero VKVx24 con (1R, 8S, 9S)-bicyclo (6.1.0) non-4-yn-9-ilmetil succinil carbonato para la formación de VKV-ciclo.	39	3.3.2
22	Reacción “click” entre un compuesto azida y uno ciclo formando un anillo de triazol.	40	3.3.3

23	Fotografía del gel de electroforesis resultante del screening donde observa como las proteínas se han separado en función de su peso molecular. La flecha roja indica la banda correspondiente donde se observa mayor cantidad de polímero al polímero VKVx24 (60KDa). La calle indicada con la letra M corresponde al marcador de proteínas patrón.	42	4.1
24	Electroforesis correspondiente al análisis del nivel de expresión del polímero, realizada con los blancos de las tres muestras obtenidas tras la fermentación y el control tras la fermentación.. En el gel se observa la existencia de bacterias recuadrado en rojo.	44	4.1
25	Electroforesis correspondiente a las etapas del proceso de purificación. En el gel de la izquierda, en azul (4°C), aquellas etapas donde el polímero se encuentra disuelto; y en rojo (37°C) aquellas donde se encuentra en estado sólido. En el gel de la derecha se observa el polímero puro.	45	4.1
26	RMN del polímero VKVx24 obtenido con el Equipo de Resonancia Magnética Nuclear. La imagen observada en la parte superior corresponde a una de las cadenas laterales del grupo amino de la lisina (de la cadena polimérica) sobre el que se llevará a cabo la modificación.	47	4.1.1
27	IR del polímero VKVx24 obtenido con el Equipo de FT-IR. Las flechas indican las bandas más características.	48	4.1.1
28	DSC del polímero VKVx24 realizado a pH básico (12,26), ácido (1,7) y neutro (6,8) con el Equipo DSC	49	4.1.1

	8822e. Se observa la T_g del polímero VKV _{x24} a dichos pHs.		
29	RMN del polímero VKV-azida. Los desplazamientos son: 3,18 (2H, a); 4,1 (2H, c); 6,76 (H, c) ppm.	52	4.2.1.1
30	FT-IR del polímero VKV-azida. Las flechas indican las bandas más características.	53	4.2.1.1
31	RMN del polímero VKV-ciclo. Los desplazamientos son: 3,18 (2H, a); 7,05 (H, b); 4,31 (2H, c) ppm.	56	4.2.2.1
32	FT-IR del polímero VKV-ciclo. Las flechas indican las bandas más características.	57	4.2.2.1
33	Diferentes estructuras de los nanogeles formados a 4°C y 37°C.	61	4.3
34	Sucesión de distintas condiciones de medida de la muestra cuya formación se lleva a cabo a 4°C tras 40min y 48h.	63	4.4.1
35	Sucesión de distintas condiciones de medida de la muestra cuya formación se lleva a cabo a 37°C tras 40min y 48h.	63	4.4.2
36	Condiciones de formación (arriba a 4°C, abajo 37°C) y condiciones de medida (A, B, C, D, E, F) de las nanopartículas tras 40min y 48h.	64	4.5
37	Procedimientos esquematizados para llevar a cabo ambos ensayos.	67	4.6
38	Sucesión distintas condiciones de medida de la muestra cuya formación se lleva a cabo a 37°C tras permanecer 40min en la estufa.	68	4.6.1

39	Proceso de formación de la muestra (nanopartícula con el fármaco en su interior) y del blanco de Vancomicina.	70	4.7
40	Representación de la absorbancia a 280nm que presentan los blancos de vancomicina (en azul y amarillo) y las tres muestras de NPs con fármaco (en rojo, verde y morado), frente al tiempo transcurrido desde el minuto cero hasta pasados 5 días.	72	4.7.1
41	Curva de calibración de Vancomicina (1mg/mL).	73	4.7.1
42	Representación de la masa liberada (mg/mL) media de los blancos de Vancomicina (en rojo) y de la media de los tres ensayos (en azul), frente al tiempo, en un periodo de 5 días desde su primera medida. Los bigotes corresponden al error típico de cada medida.	74	4.7.1

7.2 Tablas

Tabla	Título	Pág	Apartado
1	Fórmula de la cadena peptídica del polímero VKVx24.	8	1.5
2	Diferentes dosis de Vancomicina. En azul, aquella concentración utilizada en este trabajo.	16	1.9.1
3	Reactivos utilizados y proveedores.	20	3.1
4	Disoluciones tamponadas para la purificación del polímero VKVx24.	20	3.1
5	Medios de cultivo utilizados para el crecimiento bacteriano.	21	3.1
6	Disolventes utilizados y proveedores.	21	3.1
7	Equipos utilizados, modelos y proveedores.	22	3.1
8	Procedimientos para llevar a cabo las diferentes electroforesis en el proceso de bioproducción. (Protocolo obtenido de BioForge).	32	3.2.2.1
9	Procedimiento para llevar a cabo la electroforesis en el proceso de caracterización. (Protocolo obtenido de BioForge).	33	3.2.2.1
10	Cantidad de volumen que se debe pinchar en un gel de 10 pocillos, o el correspondiente normalizado para un gel de 15 en función de la absorbancia. Tabla recogida en el Laboratorio de Producción de BioForge.	33	3.2.2.1
11	Condiciones en las que se realizó la fermentación.	42	4.1
12	Datos obtenidos con el equipo de absorbancia (espectrofotómetro).	43	4.1

13	Resultados de la cantidad obtenida de polímero en la bioproducción, su número de identificación (NIP) y su rendimiento (mg/L).	46	4.1
14	Resumen de datos correspondientes a la modificación del ELR VKVx24 con 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato.	51	4.2.1
15	Resumen de datos correspondientes a la modificación del ELR VKVx24 con (1R, 8S, 9S)-biciclo (6.1.0) non-4-yn-9-ilmetil succinil carbonato.	54	4.2.2
16	Reacciones de modificación del polímero VKVx24 con los reactivos correspondientes para la formación de los compuestos VKV-azida y VKV-ciclo. Las estructuras recuadradas son las que tienen interés a la hora del cálculo del nuevo peso molecular.	58	4.2.3
17	Pesos moleculares (Da) de los tres polímeros usados en este trabajo: VKVx24, VKV-azida y VKV-ciclo.	59	4.2.3
18	Rendimiento en masa y moles del polímero VKV-azida.	59	4.2.3
19	Rendimiento en masa y moles del polímero VKV-ciclo.	59	4.2.3
20	Grado de conversión y rendimiento químico de la modificación (60%) de los compuestos VKV-azida y VKV-ciclo.	60	4.2.3
21	Tamaño medio de las nanopartículas formadas a 4°C y 37°C, tras 40 minutos (recuadrado en amarillo) y 48h (recuadrado en rosa) obtenidas con el Equipo Zeta Sizer Nano.	65	4.5
22	Tamaño medio (recuadrado en amarillo) de las nanopartículas formadas con el fármaco a 37°C tras 40min en la estufa.	68	4.6.1