



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Curso 2018/1019

**Modificación química de biopolímeros tipo elastina
para recubrimiento de membranas porosas
de PVDF de aplicación biomédica**

Autor: Ana del Barrio Jubete

Tutor/es: F. Javier Arias, Mercedes Santos y Lucía Cítores

INDICE

1. RESUMEN Y ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Biomateriales y sociedad	2
2.2 Biomateriales: concepto, aplicaciones y propiedades	3
2.3 Biocompatibilización de implantes.....	3
2.4 La elastina y polímeros tipo elastina	4
2.5 Recombinómeros tipo elastina.....	5
2.6 Química click.....	7
2.7 Biofuncionalización de superficies	10
2.8 Biofuncionalización de superficies para cultivo y recolección celular.....	11
3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1 MATERIALES.....	14
4.1.1 Reactivos químicos y disolventes	14
4.1.2 Medios de cultivo	15
4.2 EQUIPAMIENTO INSTRUMENTAL EMPLEADO.....	16
4.3 TÉCNICAS UTILIZADAS	16
4.3.1 Espectroscopia de infrarrojo	16
4.3.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.....	17
4.3.3 MALDI-ToF	19
4.3.4 Microscopía electrónica de barrido: SEM	20
4.3.5 Ángulo de contacto.....	21
4.3.6 Plasma.....	22
4.3.7 Electroforesis SDS-PAGE.....	24
4.4 MÉTODOS	26
4.4.1 Bioproducción y purificación de ELRs.....	26
4.4.1.1 Siembra de la bacteria	26
4.4.1.2 Selección de la colonia.....	27
4.4.1.3 Cultivo de inóculo	28
4.4.1.4 Producción de la bacteria	29
4.4.1.5 Purificación	30
4.4.1.5.1 Purificación de VKVx24.....	31
4.4.1.5.2 Purificación de RGD	32
4.4.1.6 Diálisis y liofilización	33
4.4.2 Modificación química de ELRs	33
4.4.2.1 Modificación de VKVx24 con azida.....	34
4.4.2.2 Modificación de VKVx24 con ciclooctino	34
4.4.3 Biofuncionalización de superficies de vidrio con ELRs	35
4.4.3.1 Etapas de la biofuncionalización de superficies	36
4.4.3.1.1 Preparación del anhídrido pentoinoico.....	37
4.4.3.1.2 Activación de superficies	38
4.4.3.1.3 Aminación de superficies.....	38
4.4.3.1.4 Alquilinación de superficies.....	38
4.4.3.1.5 Reacción “Click”	39
4.4.3.1.6 Verificación de superficies.....	39

4.4.4	Recubrimiento LbL de superficies porosas de PVDF	39
4.4.4.1	Activación de las superficies con plasma cleaner	40
4.4.4.2	Recubrimiento LbL de la membrana	40
3.4.2.1	Preparación de las disoluciones de polímeros	40
3.4.2.2	Recubrimiento de superficies.....	40
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1	Modificación del polímero VKV con grupos azido y cicloctino	42
5.1.1	Caracterización del polímero VKV-N ₃	43
5.1.1.1	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier	43
5.1.1.2	Resonancia magnética nuclear	44
5.1.1.3	Espectroscopia de masas con tiempo de vuelo.....	45
5.1.2	Caracterización del polímero VKV-cicloctino	46
5.1.2.1	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier	46
5.1.2.2	Resonancia magnética nuclear	46
5.1.2.3	Espectroscopia de masas con tiempo de vuelo.....	47
5.2	Modificación del polímero RGD con grupos azido y cicloctino	48
5.3	Escalado del método de biofuncionalización de superficies	49
5.3.1	Síntesis del anhídrido pentinoico	50
5.3.2	Activación de superficies	53
5.3.3	Aminación de superficies.....	54
5.3.4	Alquilación de superficies.....	55
5.3.5	Reacción" Click"	57
5.3.6	Caracterización de las superficies funcionalizadas: medidas del ángulo de contacto	58
5.4	Recubrimiento de membranas piezoeléctricas porosas de PVDF....	61
5.4.1	Optimización del método de recubrimiento de membranas porosas de PVDF.....	62
5.4.1.1	Pruebas de marcado	62
5.4.1.2	Tiempo de tratamiento con plasma cleaner para activación de membranas	63
5.4.1.3	Tratamiento con alcoholes para aumentar la hidrofiliidad de membranas piezoeléctricas porosas de PVDF.....	63
5.4.1.4	Influencia de la concentración y el orden de las disoluciones de recubrimiento	64
5.4.2	Protocolo de recubrimiento de membranas.....	66
5.4.2.1	Caracterización de membranas piezoeléctricas porosas recubiertas	67
5.4.2.1.1	Variación de peso y medida del ángulo de contacto	67
5.4.2.1.2	Espectros de infrarrojo	68
5.4.2.1.3	Imágenes de microscopía electrónica de barrido	70
5.4.3	Recubrimiento de membranas porosas piezoeléctricas en condiciones óptimas.....	71

5.4.3.1 Nueva optimización del tiempo de tratamiento con plasma de Argón	72
5.4.4 Recubrimiento de las membranas porosas del segundo lote	72
5.4.4.1 Caracterización de membranas piezoeléctricas porosas recubiertas de biopolímero RGD	73
6. CONCLUSIONES.....	77
7. BIBLIOGRAFÍA	78
8. ANEXOS.....	83

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Fig 2.1. Estructura del polímero por encima y por debajo de la temperatura de transición	6
Fig 2.2. Química click: reacciones de formación de enlaces carbono-heteroátomo altamente favorables energéticamente	8
Fig 2.3. Cicloadición 1,3 dipolar entre una azida y un alquino	8
Fig 2.4. Esquema de cala reacción de cicloadición [3+2] azido-alquino catalizada por cobre	9
Fig 2.5. Esquema de la reacción de cicloadición [3+2] SPAAC.....	10
Fig 2.6. Esquema del cambio conformacional del polímero por la variación de temperatura	12

MATERIALES Y MÉTODOS

Fig 4.1. Espectrómetro de Infrarrojo Bruker TENSOR 27	17
Fig 4.2. Espectrómetro Agilent Technologies NMR 400	19
Fig 4.3. Espectrómetro MALDI TOF Bruker Autoflex	20
Fig 4.4. Goniómetro Dataphysics OCA 15 plus	22
Fig 4.5. Equipo Harrick Plasma Cleaner PDC-002 sobre la mesa, a la derecha las bombonas de oxígeno y argón y a la izquierda el compresor	24
Fig 4.6. Proceso de Electroforesis en gel	24
Fig 4.7. A la izquierda, cámara de electroforesis con el gel de electroforesis después del proceso. A la izquierda se puede observar el gel real de RGD y a la derecha el correspondiente a VKV	26
Fig 4.8. Esquema del proceso de bioproducción y purificación de polímero	26
Fig 4.9. Crecimiento colonial de bacteria en placa LB agar	27
Fig 4.10. Colonias seleccionadas para realizar screening	27
Fig 4.11. Curva del crecimiento bacteriano	30
Fig 4.12. Reacción de modificación con grupos azido	34
Fig 4.13. Reacción de modificación con grupos ciclooctino	35
Fig 4.14. Preparación de anhídrido pentinoico	37

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fig 5.1.	Reacción de modificación con grupos ciclooctinilo	41
Fig 5.2.	Reacción de modificación con grupos azido	42
Fig 5.3.	Espectro de infrarrojo del polímero VKV-N ₃	44
Fig 5.4.	Espectro de RMN del biopolímero VKV-N ₃	44
Fig 5.5.	Espectro de masas MALDI-ToF de VKV- N ₃	45
Fig 5.6.	Espectro de infrarrojo VKV-ciclo	46
Fig 5.7.	Espectro de RMN del biopolímero modificado VKV-ciclo.....	47
Fig 5.8.	Espectro de masas del polímero VKV-ciclo	48
Fig 5.9.	Esquema de las etapas de biofuncionalización de superficies	50
Fig 5.10.	Protones significativos en ¹ H-RMN	51
Fig 5.11.	Espectro de ¹ H-RMN del anhídrido pentoinico sintetizado	52
Fig 5.12.	Activación de las superficies	53
Fig 5.13.	Superficies recubiertas, preparadas para introducirlas en la estufa	54
Fig 5.14.	Reacción de aminación de superficies	55
Fig 5.15.	Reacción de alquilación de las superficies	55
Fig 5.16.	Reacción de amidación de las superficies.....	56
Fig 5.17.	Evolución de líquido de lavado	56
Fig 5.18.	Formación de 1, 2, 3-triazoles-1, 4-disustituidos mediante metodología "Click"	57
Fig 5.19.	Injerto del recombinámero a la superficie.....	57
Fig 5.20.	Botes con distintos ELRs.....	58
Fig 5.21.	Etapas de la biofuncionalización de superficies de vidrio.....	61
Fig 5.22.	Etapas del recubrimiento LbL de membranas porosas piezoeléctricas	61
Fig 5.23.	Membrana hidrofílica.....	64
Fig 5.24.	Cambio de aspecto con tratamiento de metanol y agua mQ: a la izquierda se observa la membrana 2 y a la derecha la membrana 1	64
Fig 5.25.	Espectros de IR de las distintas muestras de recubrimiento	69
Fig 5.26.	a) y b) Poro y sección de la muestra 1; c) y d) Poro y sección de la muestra 2; e) y f) Poro y sección de la muestra 5; g) y h) Poro y sección de la muestra 6.....	70
Fig 5.27.	a) y b) Poro y sección de la muestra 3; c) y d) Poro y sección de la muestra 4; e) y f) Poro y sección de la muestra 7; g) y h) Poro y sección de la muestra 8.....	70
Fig 5.28.	Espectros de IR de la membrana 1 sin recubrir (negro) y con recubrimiento (rojo).....	75
Fig 5.29.	Imágenes del SEM a)b)c) de la sección transversal; d)e)f) de la superficie porosa	76
ANEXOS		
Fig 8.1.	Espectro FT-IR del polímero RGD-N ₃	81
Fig 8.2.	Espectro de H-RMN del polímero RGD-N ₃	81
Fig 8.3.	Espectro de masas del polímero RGD-N ₃	82

Fig 8.4.	Espectro de infrarojo del polímero RGD-ciclo.....	82
Fig 8.5.	Espectro de RMN del polímero RGD-ciclo	83
Fig 8.6.	Espectro de masas del polímero RGD-ciclo.....	83

INDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 2.1.	Parámetros que influyen en la temperatura de transición	7
------------	---	---

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 4.1.	Reactivos empleados y sus proveedores	14
Tabla 4.2.	Disolventes utilizados y sus proveedores	15
Tabla 4.3.	Disoluciones tampón empleadas para la bioproducción y producción de ELRs	15
Tabla 4.4.	Equipos utilizados en las técnicas y métodos con su correspondiente casa comercial	16
Tabla 4.5.	ELRs utilizados en la biofuncionalización de superficies de vidrio de 30 mm de diámetro	36

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5.1.	Resultados obtenidos de la modificación de VKV-N ₃ y VKV-ciclo	42
Tabla 5.2.	Comparación de valores teóricos con los obtenidos del espectro FT-IR	44
Tabla 5.3.	Señales de los protones de interés	51
Tabla 5.4.	Resultados obtenidos de la caracterización de las superficies biofuncionalizadas	59
Tabla 5.5.	Pruebas de marcado en membrana porosa de PVDF	62
Tabla 5.6.	Esquema experimental del recubrimiento para evaluar la concentración del polímero y el orden de la capa de recubrimiento	65
Tabla 5.7.	Resultados de la variación de masa y medida del ángulo de contacto	68
Tabla 5.8.	Resultados de la variación de masa obtenidos en el recubrimiento del segundo lote.....	74
Tabla 5.9.	Medidas del ángulo de contacto tras el en ambas caras para evaluar el recubrimiento en función de la porosidad	74

ABREVIATURAS

AAC	Azide-Alkyne Cycloaddition
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CuAAC	Cicloadición azida-alquino catalizada con cobre
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELP	Polímero tipo elastina
ELR	Recombinámero tipo elastina
Eq	Equivalente
Et₂O	Éter dietílico
EtOH	Etanol
FT-IR	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier
ITT	Transición inversa con la temperatura
KDa	Kilo Daltons
LB	Luria Broth
MALDI-ToF	Acrónimo en inglés para "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight," desorción/ionización laser asistida por matriz-tiempo de vuelo
MeOH	Metanol
MiliQ o mQ	Agua ultrapura
MSC	Células madre mesenquimales
O/N	Over night
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PDMS	Polidimetilsiloxano
PM	Peso molecular
PMMA	Polimetilmetacrilato
PSA	Persulfato amónico
PVDF	Polivinilideno
RMN	Resonancia magnética nuclear
r.p.m	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico

SEM	Acrónimo inglés de “Scanning Electron Microscopy”, Microscopía electrónica de barrido
SPAAC	Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition
T.A	Temperatura ambiente
TB	Terrific Broth
TBm	Terrific Broth modificado
TEA	Trietilamina
TEMED	Tetrametiletilendiamina
THF	Tetrahidrofurano
TL	Tampón de lavado
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TS	Tampón de sonicación
Tt	Temperatura de transición

1. RESUMEN

En este trabajo fin de grado se han funcionalizado superficies de vidrio de 30mm de diámetro llevando a cabo el correspondiente escalado del método, el cual fue descrito previamente para superficies de menor tamaño. Para conseguir dicho recubrimiento se ha utilizado la tecnología de los silanos y la unión covalente de los ELRs por vía click a las superficies de vidrio. Tras las distintas etapas del proceso, se realizaron las correspondientes medidas del ángulo de contacto evaluando así el recubrimiento. El recubrimiento de dichas superficies tiene como objetivo su posterior uso como soportes en recolección celular.

Por otro lado, se ha llevado a cabo un recubrimiento LbL (Layer by Layer) de membranas porosas piezoeléctricas de PVDF con biopolímeros modificados químicamente. Dichas membranas se utilizarán en cultivos celulares con el objetivo de conseguir una diferenciación osteogénica de células madre. Para dicho recubrimiento polimérico fue necesario la optimización de las condiciones de reacción, la bioproducción de los polímeros VKVx24 y RGD, y la modificación química de dichos ELRs con grupos azido y ciclooctinilo.

Los polímeros modificados fueron caracterizados por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), por resonancia magnética nuclear (RMN) y por espectroscopia de masas. Así, las membranas porosas piezoeléctricas de PVDF recubiertas se han caracterizado mediante FT-IR, medida del ángulo de contacto, variación de masas y microscopía electrónica de barrido (SEM).

ABSTRACT

In this end-of-grade work, 30mm diameter glass surfaces have been functionalized, performing the corresponding scaling of the method, which was previously described for smaller surfaces. To achieve this coating, the technology of silanol and the covalent bonding of the ELRs by click to the glass surfaces have been used. After the various stages of the process, the corresponding measures of the contact angle were carried out, evaluating the coating. The coating of these surfaces is intended for later use as supports in cellular collection.

On the other hand, an LbL coating of piezoelectric porous membranes from PVDF with chemically modified biopolymers has been carried out. These membranes will be used in cultures in cell cultures with the aim of achieving an osteogenic differentiation of stem cells. For this polymer coating it was necessary to optimize the reaction conditions, the bioproduction of VKVx24 and RGD polymers, and the chemical modification of such ELRs with azido and cyclooctinyl groups.

Modified polymers were characterized by Fourier Transform infrared spectroscopy (FT-IR), magnetic resonance imaging (MRI) and mass spectroscopy. Thus, PVDF-coated piezoelectric porous membranes have been characterized by FT-IR, contact angle measurement, mass variation and scanning electron microscopy (SEM).

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Biomateriales y sociedad

Desde el comienzo de la civilización humana se han tratado de encontrar soluciones para reemplazar partes del cuerpo humano dañadas ya sea por guerras, enfermedades, accidentes o desastres naturales[1]. Así pues, se tiene constancia de la existencia de prótesis e implantes en civilizaciones tan antiguas como la egipcia o la fenicia. De hecho, hay historiadores que remontan la aparición de suturas a hace unos 30.000 años.

Metales como el oro o el bronce, y otros materiales como el cristal, la madera o el marfil, fueron los primeros en ser utilizados como solución permanente o temporal para reemplazar parcialmente extremidades, dientes u ojos [2].

Con el paso del tiempo, estos materiales fueron evolucionando y sustituyéndose por otros con mejores propiedades. Fue a finales del siglo XIX cuando se produjo un punto de inflexión debido al desarrollo de los primeros polímeros [3].

Estos nuevos materiales, con características biológicas claramente superiores a sus antecesores, pronto empezaron a usarse en tratamientos de salud. Por ejemplo, el polimetilmetacrilato, PMMA, fue empleado en odontología en los años treinta, mientras que en los años cuarenta, el acetato de celulosa se utilizó para fabricar tubos de diálisis. Posteriormente, Harold Ridley utilizó por primera vez PMMA para implantes oculares (1949); Charnley desarrolló prótesis de cadera combinando PMMA con acero inoxidable [2]; y Hufnagel investigó la creación de válvulas cardíacas y usó el polietilentereftalato para injertos vasculares [4].

A pesar de que los anteriores materiales habían supuesto una mejoría y avance en el tratamiento médico, seguían surgiendo problemas de biocompatibilidad, degradación y malas propiedades mecánicas.

A finales del siglo XX las necesidades de prótesis médicas se disparan debido al crecimiento de la población mundial, al aumento de la longevidad de la población y al incremento de la calidad de vida de las personas en países desarrollados. Además, aumentó la capacidad para abordar problemas médicos previamente intratables, como consecuencia de los avances en medicina. Todo esto ha propiciado la necesidad creciente de desarrollar nuevos materiales con mejores propiedades mecánicas, que no ocasionen problemas de rechazo; lo cual ha repercutido en la salvación de muchas vidas humanas y en la mejora de la calidad de vida de millones de personas.

Actualmente se ha desplazado casi totalmente el uso de biomateriales naturales hacia los sintéticos.

La ciencia de biomateriales está evolucionando hacia el estudio de materiales que contengan propiedades específicas, que permitan regenerar por completo órganos, tejidos o partes dañadas del organismo. Una propiedad muy importante de los nuevos materiales debe ser su biointeractividad, que consiste en una buena integración en el organismo y capacidad de respuesta a estímulos celulares a nivel molecular. Esta propiedad permite mejorar la biocompatibilidad, disminuyendo la toxicidad que estos biomateriales pudieran presentar [5].

2.2 Biomateriales: concepto, aplicaciones y propiedades.

Un biomaterial es un material sintético o natural capaz de interactuar con un sistema biológico con el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo [6].

Dado que el biomaterial se encontrará en todo momento en contacto con el organismo, deberá tener dos características principales:

- **Biocompatibilidad:** el sistema inmunitario considerará el material como propio, evitando de esta manera reacciones de rechazo tales como la agrupación de plaquetas, que podría dar lugar a coágulos o trombos. Es decir, el material no interactuará de forma perjudicial con el organismo.

- **Biodegradabilidad:** el material se degradará produciendo sustancias que serán absorbidas por el organismo. Además, esta degradación deberá ser tal que se garanticen las prestaciones del material exactamente el tiempo necesario, ya sea en un implante provisional o definitivo.

Las características finales de un material son función de su forma, estructura, composición y estabilidad a lo largo del tiempo; y de sus propiedades químicas, físicas, mecánicas y eléctricas. Además, algunas de estas características, como el grado de biocompatibilidad, dependerán de la localización en el organismo y del tipo de aplicaciones.

El concepto de “biomaterial” ha cambiado una vez que se han incorporado a la ciencia de materiales los avances en biología molecular, ingeniería tisular, nanotecnología e ingeniería de superficies [7]. El avance en las técnicas de diseño de biomateriales inteligentes ha dirigido la investigación en este campo hacia la búsqueda de materiales que biomimeten la funcionalidad celular y tisular, mediante la experimentación en sistemas nanoestructurados.

De este modo la nanotecnología provee la posibilidad de producir superficies estructuradas y materiales que en la nanoescala imitan el ambiente natural en el que se encuentran las células y promueven ciertas funciones.

Estos progresos permiten la aplicación de biomateriales en campos tan interesantes como la medicina regenerativa, ingeniería de tejidos y en aplicaciones biológicas de diagnóstico en laboratorios clínicos [8].

2.3 Biocompatibilización de implantes

El grado de conocimiento alcanzado en la determinación de la estructura y las propiedades de los ELRs junto con un aumento de la disponibilidad de formas recombinantes de la elastina, ha permitido la formación de una amplia gama de construcciones tales como agregados [9], películas [10], fibras [11], micelas [12] [13], nanopartículas [14] e hidrogeles [15]; permitiendo que nuevas aplicaciones hagan su aparición continuamente.

La biocompatibilidad de estos materiales hace del campo de la Biomedicina una de las áreas donde más aceptación están teniendo. Estos materiales se utilizan para aplicaciones biomédicas tales como Ingeniería de tejidos, dosificación controlada de fármacos o en sistemas de diagnóstico. Los polímeros para ingeniería de tejidos o medicina regenerativa, incluyen el uso de matrices elastómeras para prevenir la adherencia entre tejidos que aparecen en cirugía u otros traumas, o el desarrollo de matrices adecuadas para el crecimiento y proliferación celular. Respecto a la dosificación controlada de fármacos, se hace uso de distintos factores como el control de la temperatura de transición o la presencia de secuencias diana tejido-específicas que permitan liberar el fármaco de forma controlada en su cinética y dirigida a su blanco terapéutico; y respecto a los sistemas de diagnóstico se realizan en dispositivos miniaturizados conteniendo arrays de diferentes materiales, capaces de detectar distintas moléculas.

2.4 La elastina y polímeros tipo elastina

La elastina es una proteína estructural elástica presente en el tejido conjuntivo de los vertebrados y en aquellos tejidos que sufren repetidos ciclos de tensión-relajación.

Esta proteína se encarga de proporcionar elasticidad y resistencia a los tejidos y órganos, regula el comportamiento celular y promueve la reparación tisular [16]. Además, esta proteína tiene una vida media estimada de 70 años.

En cuanto a su composición se trata de un polímero de peso molecular 70 KDa, formado mayoritariamente por una secuencia de aminoácidos con una región hidrofóbica (valina(V), prolina(P) y glicina(G)) y otra región hidrofílica (lisina).

La secuencia presenta además zonas gobernadas por aminoácidos repetidos como VPGG, VPGVG, APGVG, y VGVAPG, denominados *dominios elastoméricos*, que presentan propiedades mecánicas gracias a las cuales la elastina puede sufrir grandes deformaciones sin ruptura y recuperar su conformación original [17]; y una zona gobernada por repeticiones de secuencia VPGKG denominados *dominios de entrecruzamiento*, por donde se realizan las uniones intermoleculares covalentes catalizadas enzimáticamente.

Los polímeros tipo elastina (ELP "Elastin Like Polymers") son polipéptidos artificiales cuya secuencia está inspirada en la propia elastina natural. Los más utilizados son los que contienen repeticiones de la secuencia de aminoácidos (VPGXG)_n, siendo el residuo "X" cualquier aminoácido excepto la prolina debido a que esta estructura cíclica impide la formación de la horquilla β, y "n" representaría el número de veces que se repite dicha secuencia pentapeptídica a lo largo de la cadena.

Estos polímeros inicialmente se sintetizaban químicamente; pero en la actualidad se utilizan técnicas recombinantes, dando lugar de esta manera a los recombinámeros tipo elastina (ELRs).

2.5 Recombinámeros tipo elastina

Actualmente la única metodología que permite fabricar polímeros proteicos repetitivos es la ingeniería genética. Mediante esta tecnología es posible aislar una porción de ADN correspondiente a un gen de interés y clonarlo en un vector que permita la expresión exclusiva de la proteína codificada por el gen. De esta manera se obtiene el polímero proteico recombinante a la carta [18], y con un control absoluto de su secuencia. Así, a los ELPs producidos biosintéticamente se les denomina recombinámeros o ELRs (“Elastin Like Recombinamers”) [19]. Las ventajas que presentan éstos, con respecto a los sintetizados por vía química, son las siguientes:

- ✓ Capaces de mostrar cualquier función o propiedad simple o compleja presente en las proteínas naturales.
- ✓ Posibilidad de construirse a un coste bajo.
- ✓ Presentan infinitas posibilidades de diseño molecular con un control absoluto de la arquitectura molecular, incluyendo ausencia de polidispersidad y azar en la síntesis.
- ✓ Se producen a partir de fuentes renovables (no requieren de productos petrolíferos).
- ✓ Medioambientalmente limpios desde la producción a la eliminación.

Además de todas estas ventajas, se ha de resaltar también que estos recombinámeros mantienen las propiedades inherentes a la elastina natural, tales como las propiedades mecánicas [20], la biocompatibilidad [21], la naturaleza inteligente y el comportamiento autoensamblable [25].

Al igual que la elastina natural, los ELRs sufren una transición inversa con la temperatura (ITT) reversible entre dos estados conformacionales, en respuesta a cambios de temperatura. Dicha temperatura a la que se produce el cambio conformacional se denomina temperatura de transición (T_t), siendo característica de cada polímero y dependiente de las condiciones en las que se encuentre éste. Así, en disolución acuosa pueden darse dos posibilidades:

- Si la temperatura de trabajo está por debajo de la temperatura de transición del polímero, las cadenas libres del polímero se encuentran desordenadas y completamente hidratadas, mediante hidratación hidrófoba, presentando moléculas de agua dispuestas en estructuras tipo clatrato rodeando los residuos polares del polímero.
- Si la temperatura de trabajo es superior a la temperatura de transición del polímero, las moléculas de agua pierden la estructura tipo clatrato por la agitación térmica y, en consecuencia, la cadena polipeptídica se pliega hidrofóticamente formando una fase separada, en la que el polímero adopta una estructura conocida como espiral β , constituida básicamente por una sucesión de horquillas β [26].

La disposición en espiral hace que los grupos apolares se sitúen hacia la zona exterior, quedando en el interior un canal hidrófilo formado por los enlaces peptídicos del esqueleto de la cadena. En el interior pueden quedar retenidas, y de hecho así ocurre, una gran cantidad de moléculas de agua cuando las cadenas extendidas sufren la transición de fase a espiral β (Figura 2.1).

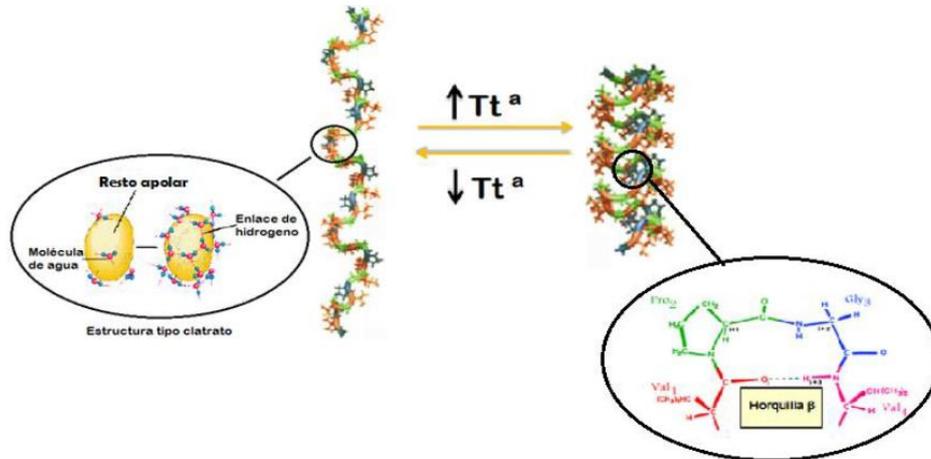


Fig 2.1. Estructura del polímero por encima y por debajo de la temperatura de transición

Tanto la elastina natural como los ELRs presentan transición inversa con la temperatura (ITT) ya que se produce un ordenamiento en la estructura por encima de la temperatura de transición.

Puede parecer que esto contradice la segunda ley de la termodinámica, pero puede explicarse en función de la solubilidad en agua de estos compuestos apolares. Para lo cual es necesario utilizar la ecuación de la energía libre de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) siendo:

ΔG = energía libre de reacción

ΔH = variación de la entalpía del sistema

T = temperatura

ΔS = variación de entropía del sistema

Así estos polímeros serán solubles en agua por debajo de la temperatura de transición, donde los residuos hidrófobos estarán rodeados de agua y el valor entálpico negativo predominará sobre el término entrópico, $-T\Delta S$. Mientras que durante el calentamiento, el polímero se plegará, rompiéndose la estructura tipo clatrato que formaban las moléculas de agua, provocando un mayor desorden en el medio. Como consecuencia habrá un aumento del valor entrópico ($\Delta S > 0$ \uparrow) en el entorno. Por lo tanto, el aumento de entropía provocará que la energía libre de Gibbs sea menor que cero y en consecuencia el plegamiento del polímero será un proceso espontáneo [27].

Por último, indicar que la temperatura de transición de este tipo de polímeros suele ser próxima a la temperatura ambiente o a la temperatura fisiológica, y vendrá determinada en función de multitud de parámetros físicos y químicos. Estos parámetros pueden ser clasificados como en la Tabla 2.1:

Extrínsecos	Intrínsecos
• Concentración del polímero en disolución	• Efecto de las sales en disolución
• Cambios en la secuencia aminoacídica	• Efecto de la presión
• Cambios en el grado de ionización de las cadenas laterales	
• Cambios en el pH	
• Longitud de la cadena	

Tabla 2.1. Parámetros que influyen en la temperatura de transición

2.6 Química “Click”

El concepto de química “Click” fue introducido por el profesor K. Barry Sharpless en el año 2001 para definir una nueva metodología sintética que utiliza una serie de procesos que permiten la obtención de nuevos compuestos de interés biológico a partir de reactivos altamente energéticos.

El uso de estas reacciones se ha extendido exponencialmente en los últimos años en numerosas aplicaciones dentro de los diversos campos científicos, incluyendo la síntesis orgánica, la biología molecular y la fabricación de nuevos materiales.

Estas reacciones presentan rendimientos cuantitativos en la mayoría de los casos y, por ende, sólo se requieren purificaciones simples.

Dentro de esta metodología se encuentran una serie de características que toda reacción debe cumplir para que sea considerada como “Click”:

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

Si bien existe una gran variedad de reacciones que cumplen estos requisitos, los ejemplos más destacados provienen a menudo de cuatro grandes clases de reacciones que encajan perfectamente dentro del marco de química "Click":

- ❖ *Reacciones de adición nucleófila*, excluyendo las condensaciones aldólicas, como por ejemplo la formación de ureas, tioureas, éteres, oximas, heterociclos aromáticos, hidrazonas y amidas [28]
- ❖ *Adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono*: como por ejemplo reacciones de epoxidación, dihidroxilación o adiciones de Michael.
- ❖ *Cicloadiciones de especie insaturadas* como las cicloadiciones 1,3-dipolares y las reacciones Diels-Alder.
- ❖ *Reacciones de sustitución nucleófila*, provocando la apertura de anillos muy tensionados como epóxidos o aziridinas.

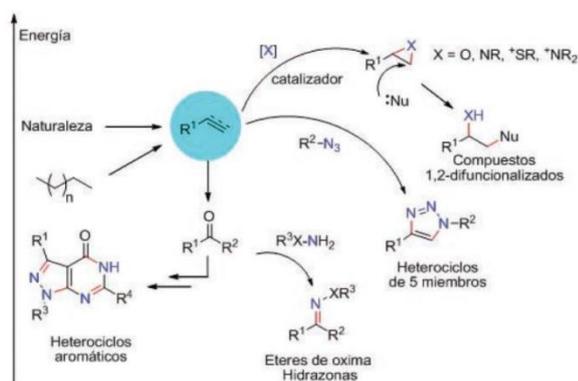


Fig.2.2 Química click: Reacciones de formación de enlaces carbono-heteroátomo altamente favorables energéticamente

Dentro de la química "Click", la reacción que ha sido reconocida como la más representativa es la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen [29](Figura 2.3). La formación de los heterociclos resultantes de estas cicloadiciones suele encontrarse muy favorecida termodinámicamente; sin embargo, la elevada energía de activación de estos procesos hace que en muchas ocasiones tengan que llevarse a cabo mediante el empleo de calentamientos prolongados.

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



Fig 2.3 Cicloadición 1,3 dipolar entre una azida y un alquino

Sin embargo, en 2002 Sharpless y Meldal [30] describen la cicloadición entre azidas y alquinos catalizada por cobre (CuAAC)(Figura 2.4). Descubrieron que la adición de cantidades catalíticas de una sal de cobre produce un aumento en la velocidad de reacción, que permite efectuar estas transformaciones a temperatura ambiente y en tiempos de reacción muy cortos. Esta adición se puede hacer de manera directa, mediante el uso de sales de Cu(I), o bien, mediante una reducción de sales de Cu(II) a Cu(I) en presencia de un reductor como el ascorbato de sodio.

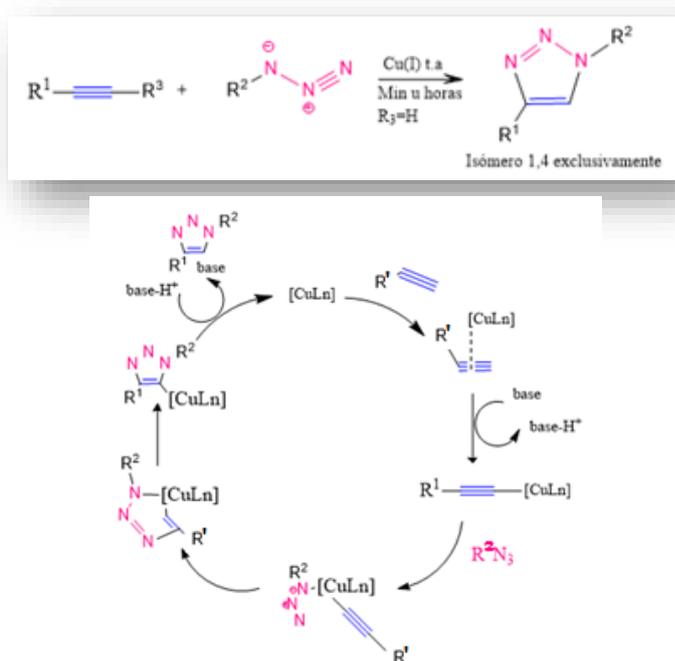


Fig. 2.4 Esquema de la reacción de cicloadición [3+2] azido-alquinilo catalizada por cobre

En presencia de cobre, dicha reacción es mucho más rápida y se obtienen los triazoles 1,4-disustituidos. Estas reacciones pueden llevarse a cabo tanto en disolventes apróticos como próticos, e incluso en agua, en un rango amplio de valores de pH. Además, la reacción es compatible con la presencia de grupos funcionales muy diversos. Sin embargo, la presencia de cobre ha limitado el uso de esta reacción para aplicaciones en sistemas vivos por sus posibles efectos citotóxicos [30].

Este problema se resolvió con el uso de alquinos activados, como los derivados de ciclooctino, ya que la tensión anular de estos compuestos cíclicos les hace reaccionar con el grupo azido sin necesidad de catalizador en el medio, lo que se traduce en una disminución de la energía de activación del proceso (SPAAC, "strain-promoted azide-alkyne cycloaddition") [31](Figura 2.5).

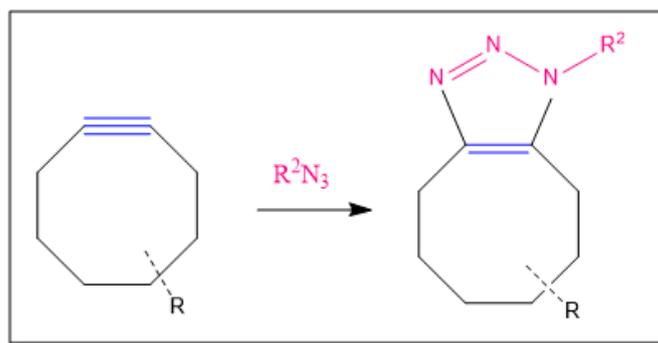


Fig. 2.5 Esquema de la reacción de cicloadición [3+2] SPAAC

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

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

2.7 Biofuncionalización de superficies

Uno de los problemas más difíciles de resolver en la ciencia de los biomateriales se basa en que la mayoría de materiales sintéticos son estáticos, sin embargo toda la biología es dinámica. Mientras que las prótesis sintéticas presentan un carácter no adaptativo, los biomateriales por el contrario evolucionan y consiguen adaptarse a su entorno [32].

Un concepto que parece muy atractivo como solución al problema expuesto anteriormente, se traduce en la “adaptación”, “inteligencia” y “auto curación” que poseen ciertos materiales. El objetivo es, por tanto, conseguir desarrollar nuevos materiales que de algún modo repliquen y mimeticen la habilidad de los tejidos y materiales biológicos para adaptarse y renovarse.

Por tanto se podría aprovechar el comportamiento inteligente de los ELRs para modificar las características innatas de las superficies recubriéndolas con biomateriales que repliquen y mimeticen la habilidad de los tejidos y materiales biológicos para adaptarse y renovarse. De esta forma las nuevas superficies biofuncionalizadas presentarán la capacidad de adaptarse a su entorno ya que al variar sus propiedades físico-químicas bajo ciertos estímulos externos como la luz, la temperatura, el pH, la fuerza iónica y el campo eléctrico, producirán variación en la configuración de las biomoléculas haciéndose posible dominar sus propiedades adherentes o antiadherentes [33].

Según la interacción de los materiales con las células se pueden clasificar a estos de tres maneras distintas:

1. Materiales no adherentes o inertes, cuyas superficies muy hidrofóbicas no permiten a las células interactuar con la superficie durante un determinado periodo de tiempo.

2. Materiales que consiguen una adhesión pasiva, es decir, la superficie de contacto proporciona interacciones físico-químicas que producen la adsorción entre el material y la célula. En este tipo de interacción las células adheridas pueden despegarse prácticamente intactas (soportes para formar laminas celulares), siendo por tanto un proceso reversible.

3. Materiales que proporcionan una adhesión activa, en otras palabras, las células pueblan la superficie espontáneamente activando los procesos de adhesión y propagación celular inducidos por el receptor. En estos casos se ponen en marcha modificaciones estructurales morfológicas y fenotípicas en la célula que imposibilitan su desprendimiento espontáneo sin que se observe un importante cambio superficial y morfológico.

2.8 Biofuncionalización de superficies para cultivo y recolección celular.

El cultivo de células requiere de la utilización de un soporte sobre el que se adhieran las células. Una vez que las células han crecido y proliferado, se hace necesaria su recolección, para lo cual debemos separarlas del soporte. Tradicionalmente, esta separación se lleva a cabo por métodos enzimáticos o mecánicos, que pueden comprometer la viabilidad celular, ya que pueden dañar a las proteínas de membrana [39]. El desarrollo de los nuevos biomateriales ha permitido diseñar nuevos sistemas de recolección celular que permiten la obtención de láminas celulares en perfecto estado mediante una simple variación de la temperatura, aprovechando las propiedades termosensibles de los recombinaómeros tipo elastina.

Así, el grupo BIOFORGE desarrolló hace unos años un nuevo modelo de recolección celular que utiliza superficies termosensibles de vidrio biofuncionalizadas con ELRs como soportes para el cultivo celular. Estos recombinaómeros portan dominios de adhesión celular y funcionalidades adecuadas que permiten su unión covalente a la superficie por un extremo de su cadena aminoacídica [40]. De esta manera se aprovecha el cambio conformacional de los polímeros con la temperatura para realizar una recolección celular segura, evitando por ende, el empleo de enzimas o métodos mecánicos.

La recolección es posible gracias a las propiedades que poseen los recombinámeros diseñados para la aplicación. En disolución acuosa y condiciones fisiológicas, el polímero se encuentra plegado exhibiendo su dominio de adhesión celular a través de la interfaz acuosa. Sin embargo a una temperatura por debajo de la temperatura de transición se produce la reorganización de las cadenas aminoacídicas, ocultándose los dominios de adhesión celular y exhibiendo los dominios antiadherentes del polímero [41].

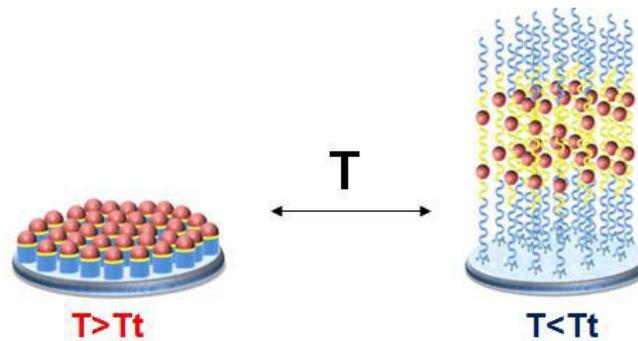


Fig. 2.6 Esquema del cambio conformacional del polímero por la variación de temperatura.

De esta manera, cuando las células se siembran en las superficies biofuncionalizadas a temperatura fisiológica (37°C) se produce su adhesión debido a la presencia de los dominios de adhesión celular que se encuentran expuestos, y comienzan a dividirse. Al disminuir la temperatura, se despliegan las cadenas del polímero escondiendo los dominios de adhesión y mostrando una superficie antiadherente que produce el desprendimiento celular. Este sistema permite la recolección de células aisladas o láminas celulares, dependiendo del tiempo de cultivo, con un simple cambio en la temperatura (Figura 2.6).

3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

El objetivo de este proyecto de investigación es, por un lado, la obtención de soportes para recolección celular, siendo necesario escalar el método de recubrimiento de superficies para *cell harvesting* y, por otro lado, el recubrimiento de membranas capaces de estimular diferenciación osteogénica.

Respecto a la obtención de superficies para *cell harvesting*, el grupo de investigación BIOFORGE desarrolló un método basado en el recubrimiento de superficies con polímeros recombinantes tipo elastina (ELRs) que actúan como soportes inteligentes para el cultivo celular.

Los ELRs utilizados son producidos “a la carta” utilizando diversas técnicas de ingeniería genética. Estos, se unen covalentemente a las superficies de vidrio mediante una metodología altamente eficaz como es la química “Click”.

Una vez biofuncionalizadas, estas superficies se convierten en termosensibles debido al comportamiento inteligente de los recombinámeros, los cuales son capaces de cambiar su carácter adherente o antiadherente a las células con un simple cambio en la temperatura. Este sistema permite cultivar y recolectar, posteriormente, células o capas de células intactas con un simple cambio de la temperatura del cultivo.

Por otro lado, el grupo BIOFORGE está llevando a cabo un proyecto de colaboración junto con la Universidad Politécnica de Valencia, en el que se estudia la acción conjunta del efecto de la estimulación electromecánica junto con la presencia de péptidos bioactivos presentes en los ELRs en la diferenciación de las células madre mesenquimales (MSC). En dicho proyecto, se utilizarán membranas porosas piezoeléctricas basadas en el compuesto fluoruro de polivinilideno (PVDF), donde las cadenas poliméricas de proteínas de los ELRs se injertarán, unirán o adsorberán para cubrir los poros con dominios bioactivos de adhesión celular, si bien, se estudiará el papel conjunto de factores de crecimiento. Una vez que los ELRs estén diseñados y bioproducidos, se procederá a llevar a cabo el recubrimiento de dichas membranas, las cuales están destinadas a estimular la diferenciación osteogénica de las células MSC.

Por tanto, la finalidad de esta investigación es preparar membranas piezoeléctricas recubiertas con ELRs portadores de dominios de bioadhesión tipo RGD mediante metodología Layer by Layer para el recubrimiento, reforzando la unión entre capas por entrecruzamiento covalente utilizando química “click”.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se mostrarán los materiales utilizados durante el desarrollo del trabajo, así como las técnicas empleadas, incluyendo el fundamento teórico de las mismas. Posteriormente se desarrollarán las distintas metodologías utilizadas desde la bioproducción de los polímeros, la modificación química de los ELRs y los diferentes recubrimientos poliméricos en las distintas superficies de estudio.

4.1 MATERIALES

4.1.1 Reactivos químicos y disolventes

Durante la realización y desarrollo de este estudio se han utilizado los reactivos, disolventes y tampones indicados en las siguientes tablas, mostrándose también en dicha tabla su correspondiente casa comercial.

Reactivo	Casa Comercial
Carbonato de 2-Azidoethyl (2,5-dioxopirrolidin-1-il)	Synaffix
Carbonato de (1R,8S,9S) biciclo [6.1.0]non-4in-9-ilmetil succinimidilo	Galchimia
Ácido clorhídrico	Sigma-Aldrich
Hidróxido sódico	Panreac
Ampicilina	Panreac
TEMED	Sigma-Aldrich
Glicerol	Fisher-Scientific
Ascorbato de sodio	Sigma Aldrich
(3-amino propil)-trimetoxisilano	Sigma Aldrich
Sulfato de cobre	Fluka
Diciclohexilcarbodiimida(DCC)	Sigma Aldrich
Glucosa	Acros
Persulfato de diamino	Sigma Aldrich
Dodecil sulfato sódico(SDS)	Apollo Scientific
Tris(hidroximetil)aminometano(TRIS)	Sigma-Aldrich
Acrilamida	Iberlabo
Trietilamina	Sigma Aldrich

Tabla 4.1 Reactivos empleados y sus proveedores

Disolvente	Casa Comercial
Dimetilformamida (DMF)	Acros Organics
Dietil éter	Scharlau
Acetona	Sigma-Aldrich
Metanol	Scharlau
Etanol	Panreac
Diclorometano(DCM)	Sigma-Aldrich
THF	Scharlau
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich
Cloroformo deuterado	

Tabla 4.2 Disolventes utilizados y sus proveedores

TAMPONES	CÓDIGO	BUFFER	SAL	OTROS
Tampón de lavado x20 (T ambiente)	TLx10	Tris pH 7,5 400Mm (242g)	NaCl 4M 1170g	-
Tampón de lavado 1 (4C)	TL1	Tris pH 7,5 40Mm	NaCl 0,4M	Tween 20 0,1%
Tampón de lavado 2 (4C)	TL2	Tris pH 7,5 20Mm	NaCl 0,2M	-
Tampón de sonicación	TS	Tris pH 7,5 20Mm	-	EDTA 2,5Mm
EDTA (Stock 0,5M pH 8)	EDTA	-	-	EDTA(dihidratado) 186g

Tabla 4.3 Disoluciones tampón empleadas para la bioproducción y purificación de ELRs.

4.1.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en bioproducción (crecimiento y transformación bacteriana) son los siguientes:

LB (Luria Broth): medio de cultivo que se utiliza principalmente para el crecimiento de bacterias. Presenta una concentración de 25g/L de agua destilada, previa esterilización en autoclave. Casa comercial Conda.

LB agar: compuesto por 500mL de medio LB con un 15% p/v de bacto-agar (agente de solidificación de elevada pureza).

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

TBm (TerrificBroth modificado): contiene medio TB a una concentración de 50,8g/L al que se le añade Na₂HPO₄ 25mM, Na₂SO₄ 5mM, KH₂PO₄ 25mM, NH₄Cl 50mM, Glucosa 0,05% p/v, α-lactosa 0,02% p/v y Glicerol 0,8% p/v. Se prepara en agua destilada y se esteriliza.

4.2 EQUIPAMIENTO INSTRUMENTAL EMPLEADO

A lo largo de este trabajo se han empleado diversos equipos los cuales se recogen en la siguiente tabla:

Equipo	Casa Comercial
Ángulo de contacto OCA 15 plus	Neuterk Dataphysics
Espectrómetro de masas BrukerAutoflex	Bruker
Espectrómetro FT-IR Tensor27	Bruker
RMN 400	Agilent Technologies
Rotavapor R-215	Büchi
Sonicador	J. P. Selecta
Centrifuga Sorvall legend XTR	Thermo- Scientific
Centrifuga Sorvall BP8/16	Thermo- Scientific
Centrífuga Sorvall ST16R	Thermo- Scientific
Disruptor Niro Soavi,Panda Plus	GEA
Biorreactor P1000 (14L) (Fermentador)	Appilkon
Autoclave	J.P. Selecta
Liofilizador VirTis	SP Scientific

Tabla 4.4 Equipos utilizados en las técnicas y métodos con su correspondiente casa comercial

4.3 TÉCNICAS UTILIZADAS

4.3.1 Espectroscopía de infrarrojo

La espectroscopia de infrarrojo se utiliza para la identificación de los grupos funcionales presentes en un compuesto. Cuando una molécula absorbe radiación infrarroja aumenta la intensidad de la vibración intramolecular que posee una frecuencia igual a la irradiada, lo que genera señales con frecuencias que se corresponden con la vibración de un enlace específico. La absorción de la radiación por parte de la muestra indica qué tipo de enlaces y grupos funcionales están presentes [42].

La espectroscopía de infrarrojo se caracteriza por ser una técnica espectroscópica muy versátil y con un amplio rango de aplicación en la caracterización e identificación de materiales, ya que permite el análisis no destructivo de muestras tanto sólidas como líquidas, con mínimos requerimientos en la cantidad de muestra y con elevada reproducibilidad de los resultados [42].

Dentro de la espectroscopía de infrarrojo se ha utilizado la técnica FTIR-ATR (Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada), realizada mediante un espectrómetro de Infrarrojo Bruker, TENSOR 27 con un dispositivo ATR(Figura 4.1), y el programa de computación de espectros fue el software OPUS, versión 6.5.



Fig. 4.1. Espectrómetro de Infrarrojo Bruker TENSOR 27

El ATR es una técnica de muestreo que se produce cuando una radiación infrarroja llega a un cristal ATR, transmisor de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente. Esta onda se extiende sobre la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose el espectro de infrarrojo del analito.

La técnica de la Transformada de Fourier consiste en aplicar una operación matemática que convierte el espectro obtenido en el dominio del tiempo en un espectro correspondiente al dominio de la frecuencia. De esta manera se obtienen espectros de forma rápida, precisa y con bajo nivel de ruido.

Los espectros FTIR adquiridos en este trabajo se realizaron mediante barridos de 64 escaneos en la región comprendida entre 600cm^{-1} - 4000cm^{-1} . Una vez registrados, se procede a la corrección de la línea base y a la normalización del espectro.

4.3.2 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear, NMR (“Nuclear Magnetic Resonance”), es una técnica de investigación que explota las propiedades magnéticas inherentes a ciertos núcleos atómicos.

Proporciona información detallada sobre la estructura, la dinámica, el estado de reacción y el ambiente químico de las moléculas [43].

Es una espectroscopía de absorción cuyo fundamento es 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.

La espectroscopía RMN es aplicable a cualquier tipo de muestra que contenga núcleos con un número impar de protones o neutrones, ya que éstos presentan un momento magnético y un momento angular intrínseco y, por consiguiente, tendrán un espín no nulo.

Una vez aplicado el campo magnético, se produce un desdoblamiento de los niveles generados de energía del espín nuclear, tal que pueden inducirse transiciones entre los distintos niveles de energía como consecuencia de la absorción de una radiación electromagnética adecuada. El orden presente en los niveles de energía es una propiedad tanto de los núcleos de una molécula, como de su entorno electrónico y de las interacciones entre ambos. Consecuentemente, tanto la intensidad como la forma y posición de las señales en el espectro de un núcleo determinado está relacionado con su estructura molecular, por lo que un análisis detallado del espectro proporciona información muy útil respecto a la estructura del compuesto que lo origina [44].

Generalmente esta técnica se utiliza para determinar la identidad de una sustancia ya que no sólo distingue grupos funcionales sino que los mismos grupos funcionales con sustituyentes contiguos distintos generan distintas señales.

Por otro lado la muestra a analizar ha de estar disuelta en un determinado disolvente. Un elevado porcentaje de átomos pertenecen al disolvente que, normalmente, presenta gran cantidad de protones sensibles al RMN, por lo que se hace imprescindible el uso de disolventes deuterados, de manera que más del 99% de los protones presentes se han sustituido por deuterio [44].

Durante el desarrollo de este estudio se empleó el espectrómetro automático "Agilent Technologies NMR 400", perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la UVa. El equipo está formado por el componente Agilent Technologies NMR 400, la sonda Agilent Technologies One NMR y el imán superconductor Agilent Technologies 400 MHz NMR (Figura4.2).



Fig 4.2. Espectrómetro Agilent Technologies NMR 400

Esta técnica se ha empleado para determinar el rendimiento en la reacción de síntesis de anhídrido pentinoico y para la caracterización de los polímeros modificados, como se indicará en posteriores apartados. Para analizar el espectro obtenido de los distintos compuestos de estudio se utilizó el software MestReNova.

4.3.3 MALDI-ToF

MALDI-ToF es el acrónimo de espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción láser asistida por matrices (MALDI, “Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization”, TOF, “Time Of Flight”) [45].

La Espectrometría de masas es una técnica analítica que permite estudiar compuestos de naturaleza diversa: orgánica, inorgánica o biológica (incluyendo biopolímeros y macromoléculas naturales o artificiales) y obtener información cualitativa o cuantitativa sobre su masa molecular, así como sobre la estructura del mismo o, simplemente, detectar su presencia y/o cuantificar su concentración.

Para la realización de esta técnica, será necesario ionizar las moléculas y, si fuese necesario, separar las moléculas con una fase previa de cromatografía, obteniéndose los iones formados en la fase gaseosa.

Una vez formados los iones, éstos se aceleran hacia un analizador y se separan en función de su relación masa/carga mediante el empleo de campos eléctricos o magnéticos, determinándose de esta manera el tiempo que tardan en llegar al detector. Allí los iones producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador, obteniéndose el espectro de masas en el cual se representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados.

En el caso del MALDI, el funcionamiento y proceso de ionización se inicia implantando la macromolécula en una matriz sólida que, normalmente, es un material orgánico; el objetivo de la matriz será el de preservar la molécula y facilitar la vaporización y la ionización.

Sin embargo, la composición de la matriz dependerá de la muestra a analizar, usándose generalmente, α -ciano-4-hidroxicinamínico para analizar péptidos, DHB para analizar moléculas grandes y, por último, ácido sinapínico para péptidos y proteínas grandes. La muestra se irradia con un láser pulsado, como puede ser un láser de nitrógeno, éste genera una energía que consigue expulsar iones de la matriz electrónicamente excitados, cationes y macromoléculas neutras, que crean una densa nube de gas por encima de la superficie de la muestra, consiguiéndose la ionización de la muestra debido a las colisiones de los cationes [46].

La técnica MALDI-ToF es especialmente útil en el análisis de biomoléculas (proteínas, péptidos, azúcares, lípidos) y moléculas orgánicas grandes (polímeros, dendrímeros y otras macromoléculas) que tienden a hacerse frágiles y a fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales [48].

En este trabajo se destinó esta técnica para caracterizar los ELRs y sus posteriores polímeros modificados, obteniéndose como resultado el valor de la masa molecular de éstos. Concretamente, se empleó un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción de láser asistida por matrices (MALDI-ToF) Bruker Autoflex, perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Uva(Figura4.3).

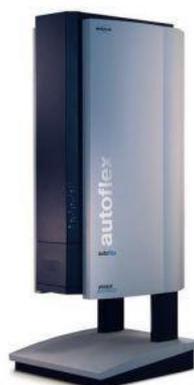


Fig 4.3. Espectrómetro MALDI TOF Bruker Autoflex

4.3.4 Microscopía electrónica de barrido: SEM

El microscopio electrónico de barrido (SEM) utiliza un haz enfocado de electrones de alta energía para generar una variedad de señales en la superficie de las muestras sólidas, las cuales revelan valiosa información acerca de la muestra, incluyendo su morfología externa (textura), composición química y estructura cristalina, así como la orientación de los materiales que la componen.

Los electrones acelerados en un SEM presentan elevada energía cinética, la cual se disipa cuando los electrones incidentes se frenan en la muestra sólida, dando lugar a señales de interacción electrón-muestra. Estas señales incluyen:

- Electrones secundarios y retrodispersados (BSE): se utilizan para obtener imágenes de las muestras. Así, los electrones secundarios muestran la morfología y topografía de las muestras, y los electrones de retrodispersión son más útiles para indicar contrastes en la composición de las muestras de múltiples fases.
- Electrones retrodispersados difractados (EBSD): se utilizan para determinar las estructuras cristalinas y orientaciones de los minerales.
- Fotones, radiación X característica, empleada para el análisis elemental y continuo de rayos X.
- Luz visible
- Calor

La generación de rayos X es producida por las colisiones inelásticas de los electrones incidentes con los electrones de los orbitales discretos de átomos de la muestra, los cuales, tras el choque, pasan a un estado excitado. Cuando estos electrones vuelven a su estado fundamental, el cual presenta menor energía, provoca una emisión de rayos X de una determinada y característica longitud de onda (energía cuantizada igual a la diferencia entre niveles de energía de un elemento dado). Así, en función de la radiación emitida, se pueden identificar los elementos presentes en la muestra.

El análisis SEM se considera como una técnica no destructiva en el sentido de que los rayos X generados por las interacciones de electrones no conducen a la pérdida de volumen de la muestra, por lo que es posible analizar los mismos materiales repetidamente.

En la mayoría de las aplicaciones, se recogen las señales de un área determinada de la muestra para generar una imagen de dos dimensiones que ilustre las propiedades de la misma.

Las áreas van desde aproximadamente 1 cm a 5 micras de ancho de forma que se consiguen ampliaciones desde 20X hasta aproximadamente 30.000X, alcanzando así resoluciones nanométricas [50].

En este proyecto esta técnica se ha utilizado para evaluar la morfología superficial y sección transversal de las muestras, así como el espesor y alcance interno de la capa del recubrimiento realizado.

4.3.5 Ángulo de contacto

El goniómetro es un semicírculo o círculo graduado en 180° o 360°, que se utiliza para medir o construir ángulos. El análisis del ángulo se realiza midiendo el ángulo que se forma entre una gota de líquido y la superficie sobre la que se deposita.

El valor que presente el ángulo de contacto depende de la reacción existente entre las distintas fuerzas atractivas entre el líquido y el sólido, y las fuerzas cohesivas del líquido. Si las fuerzas adhesivas son grandes en relación con las fuerzas cohesivas entonces el ángulo de contacto es menor de 90° , dando como resultado una expansión del líquido sobre la superficie proporcional a la diferencia entre dichas fuerzas.

Si se deposita una gota de agua milliQ sobre una superficie se puede realizar una distinción entre superficies hidrofóbicas (ángulos de contacto elevados) y superficies hidrofílicas (ángulos de contacto bajos).

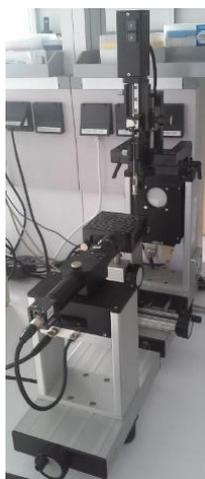


Fig 4.4. Goniómetro Dataphysics OCA 15 plus

La medida de ángulos de contacto nos permitió realizar un control de las superficies diferentemente funcionalizadas. Mediante medida del ángulo de contacto se puede determinar si las distintas superficies se encuentran activadas o no, así como si se encuentran recubiertas o no y la homogeneidad de dicho recubrimiento.

En nuestro caso se llevan a cabo medidas en las superficies funcionalizadas con grupos amino, alquínilo o las biofuncionalizadas con ELRs, observando variación en el ángulo de contacto medido, en función del cambio de hidrofobicidad inherente a los grupos funcionales introducidos. Por otro lado, esta técnica también se utilizó para evaluar la activación de las membranas y, tras el recubrimiento, la presencia de dicha nanocapa. Para ejecutar las medidas del ángulo de contacto, se empleó un goniómetro Dataphysics OCA 15 plus, Neurtek Instruments, que consta de una cámara de video CCD adaptada [53](Figura4.4).

4.3.6 Plasma

En la rama de la ciencia que nos ocupa se llama plasma al cuarto estado de agregación de la materia, el cual es obtenido de la ionización parcial de un gas.

Se trata de un estado fluido muy similar al estado gaseoso en el que hay una proporción de partículas cargadas eléctricamente sin poseer un equilibrio electromagnético.

El plasma está formado por partículas ionizadas y altamente reactivas como: iones, electrones, fotones, moléculas en estados electrónicos excitados, átomos y especies neutras.

Para obtener el plasma primero se introduce el gas en la cámara de tratamiento y se ioniza de manera controlada en condiciones de baja presión (1 - 0.1mbar) utilizando un generador de alta frecuencia, el cual está conectado a la energía eléctrica. En función de cómo se produzca la ionización del gas, éste puede generar un plasma con una luz brillante de diferentes colores fluorescentes como azul, rosa, violeta, etc.

A continuación, y una vez que las partículas se encuentren ionizadas, estas interactúan con las superficies sin dañarlas, activando y limpiando la capa superficial de las muestras.

Por tanto se puede concluir que la técnica del plasma es una técnica instrumental suave, sencilla y eficaz para realizar tanto la activación como la limpieza controlada en ciertas superficies.

Antes de realizar la activación con plasma se deben tener presentes las variables con las que se trabaja: la presión, la intensidad de la radiofrecuencia administrada, el tiempo de exposición al plasma y el caudal del gas utilizado.

La importancia de la presión estriba en que un valor de esta demasiado bajo o alto conducen a un plasma inestable, reduciéndose de este modo la eficacia del proceso. Del mismo modo, una activación de la superficie demasiado prolongada durante el tiempo puede ocasionar problemas de sobretratamientos como la fragmentación física de la muestra.

Por último, el flujo de gas depende principalmente del volumen de la cámara, del sistema de bombeo y de la presión de operación.



Fig 4.5 Equipo Harrick Plasma Cleaner PDC-002 sobre la mesa, a la derecha las bombonas de oxígeno y argón y a la izquierda el compresor

La técnica del plasma se aplicó en este estudio para realizar la limpieza y activación de los dos tipos de superficies, tanto las de vidrio como las membranas de PVDF.

4.3.7 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis SDS-PAGE (electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS) sirve para separar las proteínas de acuerdo con su movilidad electroforética, para lo cual las proteínas se desnaturalizan perdiendo su conformación tridimensional. De esta manera al hacerlas pasar por un gel de acrilamida con un tamaño de poro determinado, se obtiene un fraccionamiento que obedece a la diferencia de peso, longitud de la cadena y forma de la proteína [54].

Para la realización de esta técnica (Figura 4.6) se necesitó una cámara de electroforesis, el peine para formar los pocillos, el gel, la fuente de alimentación, loading buffer (TRIS-Glicina y SDS), el marcador de peso molecular, el tampón de carga y un transiluminador.

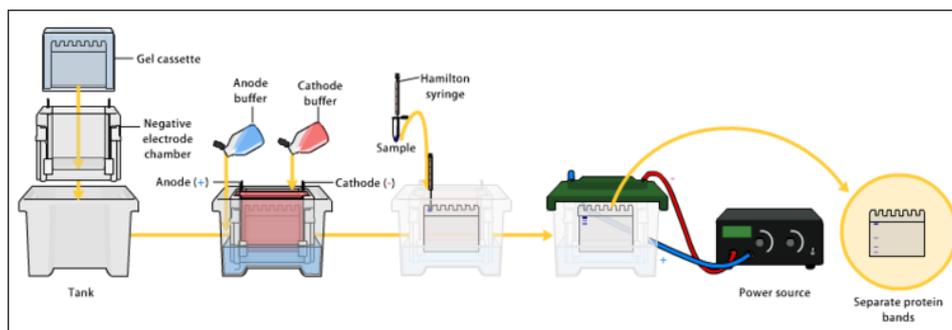


Fig 4.6. Proceso de Electroforesis en gel

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

También indicar que el gel se debe preparar en función del peso molecular del polímero, ya que el porcentaje en separación depende del mismo y que se diferencian dos partes (gel compactador y separador).

El primero se utiliza para concentrar la muestra y para generar los pocillos con la ayuda del peine correspondiente de acuerdo con el tamaño y número de pocillos que se busquen obtener. El segundo es el gel en el cual se produce la separación de proteínas.

Ambos geles están formados por los siguientes compuestos de disolución, los cuales tienen una función especial, junto con agua ultra-pura:

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

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

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

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

TEMED: Se trata de otro iniciador (propagador).

Con esta técnica se puede visualizar la pureza de la muestra proteica por lo que se utiliza para la caracterización de la misma (Figura 4.7).

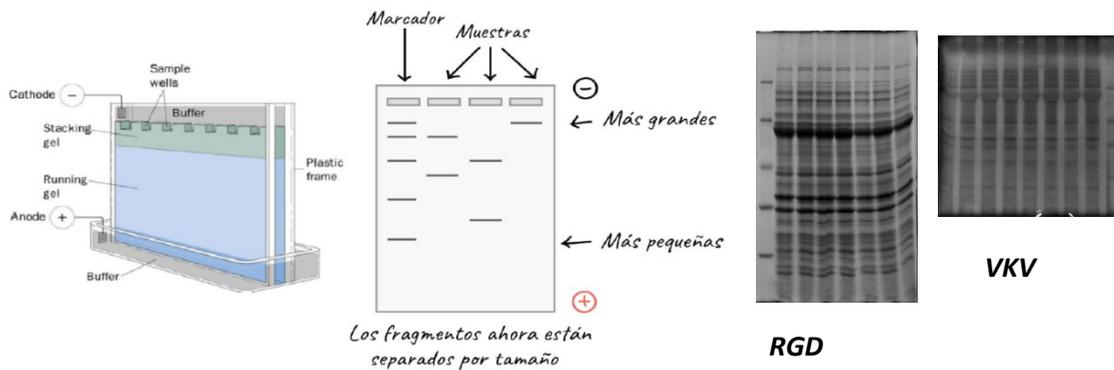


Fig 4.7. A la izquierda, cámara de electroforesis con el gel de electroforesis después del proceso. A la izquierda se puede observar el gel real de RGD y a la derecha el correspondiente a VKV

4.4 MÉTODOS

4.4.1 Bioproducción y purificación de los ELRs

La síntesis de los polímeros utilizados en este trabajo (VKVx24 y RGD) se realizaron siguiendo una serie de etapas indicadas en el siguiente esquema y desarrolladas más ampliamente en los sucesivos apartados.



Figura 4.8 Esquema del proceso de bioproducción y purificación de polímero

Cabe resaltar que el proceso de bioproducción es análogo para los dos polímeros de estudio y se diferencia en las etapas de purificación. Por tanto la bioproducción que a continuación se desarrolla es aplicable a cualquiera de los dos polímeros, mientras que en los apartados de purificación será específico para cada polímero.

4.4.1.1 Siembra de la bacteria

Se parte de una cepa de *Escherichia coli* previamente modificada genéticamente para que produzca el polímero proteico de interés. Esta cepa se encuentra en una disolución de glicerol estéril al 80% y a una temperatura de -80°C.

La siembra de la bacteria se realiza en placas Petri de 90mm de diámetro que contienen LB (Luria-Bertani) agar, (20 µL) antibiótico, y 1%(w/v) glucosa.

El medio LB agar está compuesto por 500ml de LB con un 15% p/v de bacto-agar (agente de solidificación de elevada pureza).

La adición del antibiótico correcto asegura el crecimiento únicamente de los clones que contengan el plásmido que codifica la proteína de interés.

En este caso la glucosa actúa de inhibidor de la expresión, siendo necesario para que se divida la bacteria buscada.

La siembra de la bacteria se ha de llevar a cabo en las condiciones más asépticas posibles para lo cual se realiza en una campana de flujo laminar, para evitar la contaminación, y con la ayuda de un asa de siembra esterilizada. La placa se deja incubando durante 20 h a 37°C.

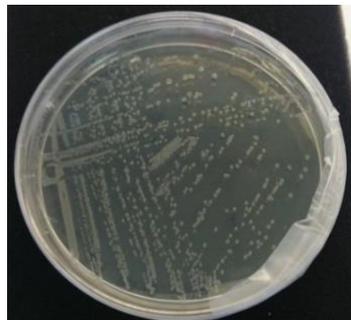


Fig 4.9. Crecimiento de colonias de bacteria en placa LB agar

4.4.1.2 Selección de colonia

Tras transcurrir el tiempo de cultivo, se seleccionan bajo campana las colonias que visiblemente hayan tenido un mayor crecimiento(Figura 4.10) y se toma una muestra con un palillo de madera estéril. Se añade el palillo a un tubo de 50 mL (falcon) que contiene 5ml de medio TB, ya que lo que se busca es que la bacteria produzca, y 5µL del antibiótico correspondiente, en este caso ampicilina.



Figura 4.10. Colonias seleccionadas para realizar screening

Esto se deja con agitación orbital termostata a 37°C y 250 rpm durante toda la noche (O/N) de tal manera que después de ese tiempo el tubo falcon presenta turbidez, lo que indica que ha habido crecimiento bacteriano.

Con el fin de seleccionar la colonia cuya producción de ELRs sea más elevada, se realiza un screening o cribado de las ocho colonias que se han dejado crecer durante toda la noche. Para ello se toman ocho tubos de 1,5mL (tubos eppendorf) que contienen 5 µL de tampón de carga (Loading Buffer) y se añade 1 mL de cada una de las suspensiones bacterianas. Se centrifugan durante 45s a 13400 rpm y se elimina el sobrenadante ya que no posee nutrientes.

Se añade 1mL de agua milliQ a cada eppendorf y para lavar las bacterias se repite el proceso de centrifugación con los mismos valores de velocidad/tiempo y la posterior eliminación del sobrenadante.

Se añaden 100µL de agua mQ para resuspender las muestras, se hierven durante 5 minutos a 100°C para desnaturalizar las proteínas y posteriormente se centrifugan 5 minutos a 13400 rpm para eliminar los restos menos solubles. Las muestras quedan así preparadas para ser pipeteadas en los pocillos del gel de poliacrilamida.

Por último, las colonias seleccionadas se someten a electroforesis de proteínas (SDS-PAGE). Para ello, se pipetea en tubos eppendorf de una capacidad de 1,5mL, 20µL de cada suspensión bacteriana, a los que se añaden 5µL de Loading Buffer (LB) que contiene 0.125M Tris-HCL pH 6.8, 4% SDS (dodecilsulfato de sodio), 20% glicerol, azul de bromofenol y +/-β mercaptoetanol. En este caso la electroforesis permitirá elucidar qué colonia ha crecido más y en consecuencia elegirla como óptima para llevar a cabo la producción del biopolímero buscado.

4.4.1.3 Cultivo de inóculo

Para cultivar células de Escherichia coli a altas densidades es necesario el diseño de un medio de cultivo balanceado, que contenga todos los componentes precisos para el crecimiento celular y evite la inhibición por altas concentraciones de nutrientes. Para ello se lleva a cabo la preparación del inóculo.

Previo a esta etapa se prepara el pre-inóculo, para lo cual en un tubo falcon de 50 mL se introducen 10 ml de medio LB, 500 µL de glucosa y 10 µL de ampicilina. Esta mezcla se reparte en dos tubos falcon y se introduce la colonia seleccionada con el palillo estéril, en campana de flujo laminar. Se deja durante toda la noche a 37°C.

Se toma una muestra de 100µL de la suspensión de la colonia seleccionada, se inocula en un erlenmeyer que contiene 30 mL de medio LB al que se le añade 1.5 mL de glucosa al 1% y 30 µL de antibiótico, al que el plásmido presenta resistencia.

Se incuba a una temperatura de 37°C con agitación orbital a 250 rpm durante aproximadamente 6 horas.

Después de ese tiempo, para que haya oxigenación, se reparten estos 30mL de muestra en dos erlenmeyers de 2 L con 500ml de medio LB, 25ml de glucosa y 500μL de antibiótico. La turbidez indicará que la bacteria ha agotado los recursos de glucosa y antibiótico necesario para el crecimiento y, por tanto, se podrá inocular en el fermentador.

4.4.1.4 Producción de bacteria

❖ Preparación del fermentador

La producción de la bacteria a gran escala se realiza en el fermentador. Para ello se realiza un lavado de todo el equipo con agua para eliminar cualquier resto de impureza o contaminante que pueda interferir en el proceso de producción de la bacteria.

Se preparan 14L de medio TBm para inducir la expresión, con una concentración de 55.85g/L, con 8% de glicerol(v/v) y 0,1 %(v/v) de antiespumante.

A continuación se esteriliza el fermentador mediante un proceso de autoclavado a 4 bar y 120°C durante 20 minutos. Una vez finalizado este proceso se procede a realizar todas las conexiones necesarias del fermentador y se calibra el pH (7), la temperatura (37°C), el O₂ (100%) y las revoluciones del sistema de agitación por palas (500 rpm), ya que necesita mantener el cultivo en dichas condiciones para lograr que la velocidad específica de crecimiento dependa solamente de la concentración de sustrato y de las variables de operación.

❖ Seguimiento de la producción de la bacteria

Una vez estilizado y calibrado el fermentador, y por otro lado preparado el inóculo, se procede a añadir el inóculo al fermentador y se deja durante toda la noche con los parámetros de calibración.

Al día siguiente se toman, con ayuda de una jeringa conectada al fermentador, 5mL de muestra que se recogen en un tubo falcon; de esta cantidad, se añade en dos tubos eppendorfs 1mL de muestra a cada uno. Una muestra se centrifuga para que sirva de blanco.

A continuación se hace una dilución 1:20 de ambas muestras y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis.

Este procedimiento se realiza en tres ocasiones espaciadas en 30min. Con este método denominado turbidimetría se puede estudiar el crecimiento de las bacterias, a través de mediciones de densidad óptica a longitudes de onda de 600nm, lo cual hace posible el seguimiento del crecimiento de la población bacteriana a tiempo real.

El crecimiento bacteriano se caracteriza por presentar varias etapas (Figura 4.11):

- **Fase de latencia o Fase lag:** en esta fase el crecimiento bacteriano es casi imperceptible.
- **Fase exponencial o Fase log:** en esta etapa el crecimiento de los organismos sigue un patrón exponencial. Cada célula se divide dando lugar a la formación de dos células hijas.
- **Fase estacionaria:** en esta fase no se producen cambios considerables en la cantidad total de microorganismos. A nivel del trabajo experimental, tras esta etapa se da por concluido el crecimiento bacteriano.
- **Fase de muerte:** en esta fase se reduce la población microbiana, debido a una pérdida irreversible de la capacidad de dividirse.

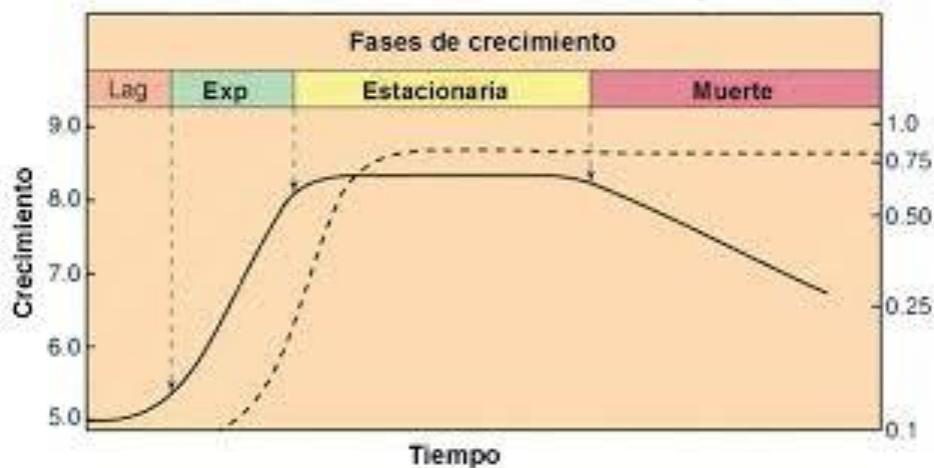


Fig 4.11.: Curva del crecimiento bacteriano

4.4.1.5 Purificación

❖ Etapa de Lavado

Se recoge la bacteria con el medio del fermentador en ocho botes, que se compensan y centrifugan a 4°C, 3500rpm durante 15 minutos, con el objetivo de separar la bacteria (pellet) del medio (sobrenadante). Por tanto, tras eliminar el medio, el pellet se despega del bote con ayuda de una espátula y una pequeña cantidad de tampón de lavado.

Esto se hace en los ocho botes y se unifican en dos que se compensan con la adición necesaria de tampón de lavado hasta conseguir un volumen final de 2L, y se centrifuga de nuevo. Este proceso de lavado se repite hasta que el sobrenadante quede transparente.

Por último, el pellet se resuspende en un volumen de tampón de sonicación, encargado de evitar la degradación del polímero, junto con el inhibidor de proteasas cuyo fin es inhibir la ruptura enzimática.

El volumen del tampón de sonicación depende de la absorbancia y de los litros de cultivo; de tal forma que se calcula con la siguiente fórmula: $V = 5 \times Abs \times 14L$ siendo el 5 un factor constante.

Por otro lado la cantidad del inhibidor de proteasas posee el mismo valor numérico que el tampón de sonicación pero en μL .

❖ Rotura Celular

Las células obtenidas en el proceso de lavado se someten a una ruptura celular utilizando un equipo denominado *disruptor de células* que se encarga de fracturar la pared celular mediante el cambio de presión con el fin de extraer las proteínas.

Este proceso se realiza a una temperatura de 4°C y con una presión aproximada de 1500 bares. Se pasa tres veces por el disruptor para garantizar la ruptura. Con el fin de eliminar los restos celulares, se procede a la centrifugación del producto obtenido, a 1000rpm, 4°C durante 90 minutos. Tras este tiempo en la fase líquida se encontrará el polímero bioproducido ya que dicha temperatura es inferior a la de transición de dicho polímero por lo que dicho polímero estará en la disolución.

4.4.1.5.1 Purificación de VKVx24

La purificación de este polímero consta de las siguientes etapas:

1. Se realiza una centrifugación a 4°C y 14000 rpm durante 30 minutos, tras la cual, se separa el precipitado y sobrenadante, estando presente el polímero buscado en la fase líquida ya que dicho polímero es soluble a esta temperatura.
2. A continuación, se lleva a cabo una acidificación hasta pH 4, y se deja con agitación durante toda la noche a 4°C. Transcurrido ese tiempo se centrifuga, a la misma temperatura, a una velocidad de 10000 rpm durante 15 minutos. De esta etapa se obtiene un precipitado ácido y un sobrenadante que contiene el polímero de interés.
3. Tras separar estas dos fases se somete a la fase líquida a un ajuste de pH a 11,4 con un posterior calentamiento de 90 minutos a 42°C, tras el cual se centrifuga a 10000 rpm, durante 15 minutos a 40°C obteniendo un precipitado y un

- sobrenadante. En este caso el polímero se encuentra en el precipitado, ya que a la temperatura de centrifugación se encuentra en estado agregado.
4. A dicho precipitado se le redisuelve en agua y se deja con agitación durante toda la noche a 4°C.
 5. Posteriormente se centrifuga a la misma temperatura a 10000 rpm durante 15 minutos, obteniendo un sobrenadante en el cual está presente el polímero buscado.
 6. Se repite dos veces más el procedimiento descrito en las etapas 3-5.
 7. Tras obtener el sobrenadante frío se procede a llevar a cabo la diálisis y la liofilización.

4.4.1.5.2 Purificación de RGD

Al igual que la purificación del polímero VKVx24 la purificación del RGD consiste un proceso que contiene varias etapas. Este proceso se puede separar en los siguientes pasos:

1. La muestra se centrifuga a 4°C durante 45 minutos a una velocidad de 14000 rpm. El polímero de interés, a dicha temperatura, está en disolución, por lo que la fase líquida posee dicho polímero.
2. Esta fase líquida se calienta a 42°C de 2 a 3 horas; tras este calentamiento se deja con agitación toda la noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo se procede a centrifugar la muestra a 10000 rpm durante 15 minutos a la misma temperatura, obteniendo el polímero en disolución.
3. Tras separar las dos fases de la centrifugación, a la fase líquida se la acidifica hasta pH 4 y se deja con agitación O/N a 4°C.
Transcurrido ese período de tiempo se centrifuga a dicha temperatura durante 15 minutos a 10000 rpm obteniendo en el sobrenadante, el polímero de interés.
4. A este sobrenadante ácido se le reajusta el pH hasta un valor superior a 11.1. A continuación, se procede a realizar un calentamiento a 42°C unos 90 minutos.
5. Después de este calentamiento se realiza una centrifugación a 40°C con una velocidad de 10000 rpm durante 15 minutos consiguiendo así que el polímero precipite.
6. Una vez separadas las dos fases de la centrifugación, se redisuelve el precipitado con agitación a 4°C O/N y se procede a realizar otra centrifugación a la misma temperatura durante 15 minutos a 10000 rpm.
7. De esta centrifugación se separa un precipitado y un sobrenadante, debido a la temperatura de la centrifugación el polímero de interés está en la fase líquida.

8. A continuación se repiten los pasos 4-7, obteniendo un sobrenadante frío el cual se somete a diálisis y liofilización.

4.4.1.6 Diálisis y liofilización

Tras realizar la completa purificación del polímero de interés y obtenido el sobrenadante frío, se procede a llevar a cabo la etapa de diálisis para purificar el polímero.

Para ello se introduce en una tripa de diálisis y se sumerge en un recipiente con 25L de agua destilada a 4°C, realizando cambios del agua cada 24h (x3) para favorecer mediante presión osmótica la expulsión de las sales que pueda contener la muestra polipeptídica.

La tripa de diálisis utilizada es una membrana de celulosa porosa que presenta un tamaño de poro de 10000 KDa que garantiza la exclusión del permeado del polímero, puesto éste que presenta un peso molecular muy superior.

Realizados los tres cambios de diálisis, la disolución acuosa del polímero ya purificado se congela a -20°C y se somete posteriormente a un proceso de liofilización.

Este proceso produce la deshidratación de la muestra congelada, por medio de una disminución de la presión circundante, lo que permite que el agua congelada sublime directamente desde la fase sólida a la fase gaseosa, sin pasar por el estado líquido. Este proceso se realiza en un liofilizador VirTis.

Finalmente, el polímero puro se pesa y se caracteriza por electroforesis, IR, DSC y RMN.

4.4.2. Modificación química de los ELRs

Una vez obtenido el biopolímero, mediante el proceso de bioproducción anteriormente descrito, se somete a una modificación química, en la cual se introducen grupos reactivos de diferente naturaleza para su posterior uso.

En este trabajo se han modificado químicamente los biopolímeros VKVx24 (1g) y RGD(2g). Cada uno de ellos ha sufrido una modificación química, para introducir en ellos grupos azido y ciclooctinilo.

A continuación se describirá el método utilizado para la modificación de VKVx24, siendo el procedimiento experimental análogo para la modificación del polímero RGD.

4.4.2.1 Modificación de VKVx24 con azida

En un matraz de 50mL se pesa 1g de polímero VKVx24 y se tapa con septum. Se realiza una purga con nitrógeno mediante aguja y globo; una vez purgado, se añade DMF (20mL) hasta disolución, a temperatura ambiente. De forma independiente se prepara una disolución de carbonato de 2-(Azidoetil)(2,5-dioxopirrolidin-1-il) (0.233 mmol, 53.16 mg, 0,6 eq., PM 228,17g/mol) en 1mL de DMF, y se añade vía jeringa, a temperatura ambiente, al matraz que contiene el polímero.

La mezcla se deja con agitación y a temperatura ambiente durante 48h. Pasado ese tiempo se reparte la masa de reacción en tres tubos falcon morados de 45 mL hasta un volumen máximo de 15 mL, y se añade 30 mL de éter a cada uno de ellos. Se forma un precipitado blanco del polímero, el cual se centrifuga a 15000 rpm, a 4°C y durante 10 min.

A continuación, se elimina el sobrenadante y se realizan tres lavados con acetona a cada precipitado de polímero (3x35mL), eliminando el disolvente por posterior centrifugación para purificar el polímero de los restos de compuestos orgánicos. El sólido se seca a presión reducida y se procede a su redisolución en 30mL de agua ultra-pura a 4°C. La muestra se dializa en agua mQ (3x25L) y finalmente se liofiliza en el liofilizador (VirTis) obteniendo el ELR modificado VKV-N₃ (Figura 4.12).

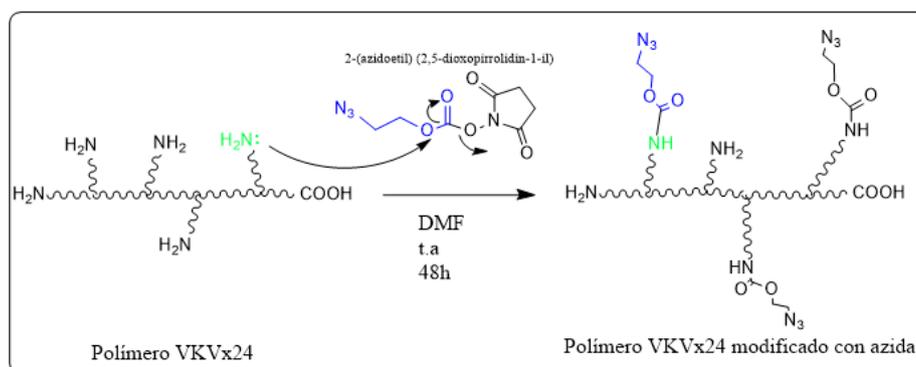


Fig 4.12 Reacción de modificación con grupos azido

4.4.2.2 Modificación de VKVx24 con ciclooctino

Se introduce 1g del biopolímero VKVx24 en un matraz de 50mL, se tapa con septum y se purga con nitrógeno mediante aguja y globo; una vez purgado, se añade DMF (20mL) hasta disolución, a temperatura ambiente. Por otro lado se prepara una disolución de (1R, 8S,9S)- biciclo [6.1.0] non-4-in-9-ilmetil N-succinimidil carbonato (0.233 mmol, 67.95 mg, 0.6 eq, PM 291.30 g/mol) en 1ml de DMF. Una vez disuelto, se añade vía jeringa a temperatura ambiente al matraz que contiene la disolución del polímero y se deja con agitación durante 48 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido ese tiempo, la masa de reacción se separa en tres tubos falcon de 50 mL, introduciendo unos 15mL aproximadamente del crudo de reacción en cada uno y añadiendo 30 mL de éter dietílico (Et₂O) en cada tubo falcon; apareciendo un precipitado blanco del polímero al añadir Et₂O. Se centrifugan a 15000 rpm a 4°C durante 10 minutos (Centrifuga Sorvall ST16R) y, a continuación, el sobrenadante se elimina. Se añaden 35mL de acetona para lavar la muestra y se vuelve a centrifugar; este procedimiento se repite para realizar tres lavados con 35mL de acetona en cada uno.

Finalizado el proceso de lavado se seca a presión reducida y el sólido obtenido se redissuelve en 30mL de agua ultra-pura a 4°C. Por último se dializa en agua mQ, realizando tres cambios de medio (25 L) cada 24 horas, y se liofiliza (VirTis), obteniendo el polímero puro ya modificado (Figura 4.13).

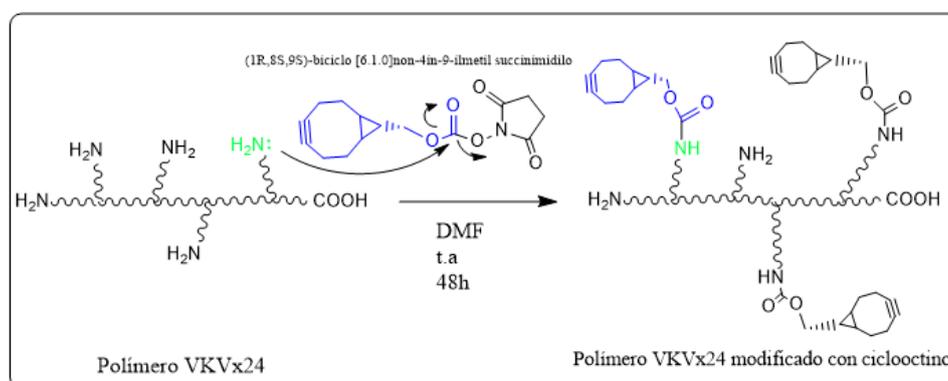


Fig 4.13 Reacción de modificación con grupos ciclooctino

Todos los polímeros modificados se caracterizan por las técnicas IR, DSC, RMN y masas.

4.4.3 Biofuncionalización de superficies de vidrio con ELRs

En este trabajo se lleva a cabo la biofuncionalización de superficies de vidrio por injerto covalente de recombinámeros, ELRs, que poseen un dominio terminal rico en aminoácidos lisina. Este es un proceso en varias etapas: en primer lugar es necesario modificar tanto las superficies como los recombinámeros tipo elastina, de forma que las superficies porten grupos alquínilo y los ELRs grupos azido en uno de sus extremos; de este modo, en una segunda etapa se produce la unión covalente entre ambos a través de una reacción tipo "Click", en concreto de la cicloadición 1,3-dipolar tipo Huisgen.

La biofuncionalización de las superficies de vidrio se ha realizado en este proyecto utilizando 4 recombinámeros ELRs distintos, lo que permite obtener 5 tipos de superficies con características finales distintas ya que una de ellas se biofuncionaliza con la mezcla de dos polímeros.

Una parte de ellas presentarán un dominio de adhesión RGD, como es el caso de las superficies funcionalizadas con 3KVRGDV, con RGD o con la mezcla de 3KV84 y 3KVRGDV; el resto de las superficies se funcionalizaron con los polímeros 3KV84 y VKVx24, los cuales no tienen dominio de adhesión RGD. El polímero con dominio de adhesión RGD permite la adhesión “activa” de células a la superficie, mientras que con el otro polímero sólo se produce adhesión pasiva. Además, en las primeras superficies, con un simple cambio de temperatura estas células adheridas pueden desprenderse sin comprometer su viabilidad.

A continuación se muestra una tabla que recoge los polímeros que se utilizarán en este TFG con su correspondiente secuencia amoniocídica y su peso molecular:

ELR	SECUENCIA	PM (Da)
3KVRGDV	MGKKKP(VPGVG) ₁₄ -[(VPGIG)10AVTGRGDSPASS(VPGIG)10] ₂ (VPGVG) 14 V	31731
RGD	[(VPGIG) ₂ VPGKG(VPGIG) ₂] ₂ AVTGRGDSPASS[(VPGIG) ₂ VPGKG(VPGIG) ₂] ₂	60611
3KV84	MGKKK(VPGVG) ₈₄	35269
VKV24	MESLLP[(VGVP GVGVP GKGVP GVGVP GVGVP GVGVP G) 24 V(VPGVG)5]VPGKG	60642

Tabla 4.5 ELRs utilizados en la biofuncionalización de superficies de vidrio de 30 mm de diámetro

Para la obtención de superficies biofuncionalizadas se han empleado placas de vidrio de 30 mm de diámetro, estas superficies (también llamadas cubreobjetos) se compran a la empresa Termo Scientific. A continuación, y gracias al empleo de una punta de diamante, se marcan las superficies con una R en el medio de la placa; de esta manera se posibilita la diferenciación de ambas caras de la superficie. Así, la cara en la que se observe una R invertida será la que se biofuncionalice. A fin de poder observar y corroborar los cambios que se van desarrollando en las superficies en cada etapa de la biofuncionalización, se utilizan algunas superficies como control, las cuales deberán seguir el mismo proceso que las placas de cultivo a biofuncionalizar.

4.4.3.1 Etapas de la biofuncionalización de superficies

La biofuncionalización de superficies de vidrio por medio de los recombinámeros tipo elastina requiere de las siguientes etapas:

1. Preparación del anhídrido pentinoico.
2. Activación de superficies.
3. Aminación de superficies.
4. Alquiniación de superficies.
5. Reacción "Click" para injerto de ELRs.

4.4.3.1.1 Preparación del anhídrido pentinoico

El anhídrido pentinoico debe prepararse *in situ* a la hora de biofuncionalizar las superficies. La reacción necesaria para su previa elaboración se recoge en la figura 4.14:

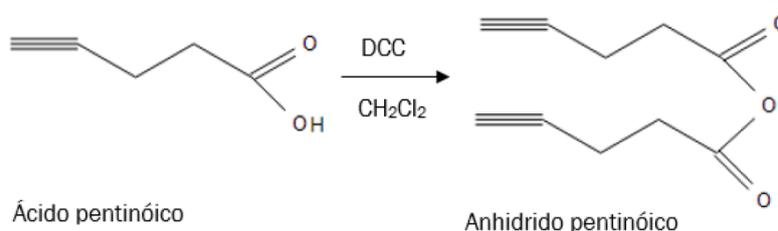


Fig 4.14 Preparación del anhídrido pentinoico.

Para obtener el anhídrido pentinoico se requiere de una disolución de 3 g de ácido pentinoico (PM=98,10; 1 eq) en 12,9 mL diclorometano bajo atmósfera inerte de nitrógeno. Posteriormente, se añade a 0°C, vía cánula, una disolución de 3,06 g de dicitohexilcarbodiimida (PM=206,3; 0.5 eq) en 12,9mL diclorometano. La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo puede aparecer un sólido presente en la mezcla de reacción (ureato); éste se filtra con un embudo de pliegues y se lava con diclorometano. El líquido resultante del filtrado se evapora parcialmente a presión reducida. A continuación se añade éter dietílico al crudo de reacción y se filtra el sólido obtenido. El líquido de filtrado se evapora parcialmente a presión reducida hasta obtener un crudo de reacción (como el punto de ebullición del éter y del anhídrido son similares, y con el fin de no eliminarlo a vacío junto al disolvente) en torno a los 7 g, el cual se analiza por ¹H-NMR para determinar su proporción. El anhídrido pentinoico se utiliza sin purificación posterior.

El análisis del espectro del RMN permite determinar la cantidad de anhídrido obtenido y la proporción presente de DCM y Et₂O restante. De esta manera se puede tomar la cantidad requerida para la realización de la modificación de los recombinámeros tipo elastina.

4.4.3.1.2 Activación de superficies

Se colocan las superficies de vidrio de 30 mm de diámetro, con la R invertida, en la cámara del “plasma cleaner”. Posteriormente se somete a las placas a un plasma de Argón durante 5 minutos, con un caudal de 30 mL/min y una presión de 600 mTorr, y, a continuación, se evacua el Argón durante 1 minuto. Después se emplea un plasma de Oxígeno durante 20 minutos con un caudal de 18,5 mL/min y a presión de 580 mTorr. Por último se evacua el oxígeno durante 2 minutos, y se purga con Argón.

4.4.3.1.3 Aminación de superficies

Una vez activadas las superficies, éstas presentan grupos hidroxilo libres en la superficie. La modificación de este grupo para crear un grupo amino se realiza por reacción con (3-aminopropil)-trimetoxisilanol generado *in situ* por hidrólisis del correspondiente derivado de siloxano.

El silanol se genera en una mezcla de etanol: agua: (3-aminopropil)-trimetoxisilano en relación 9:1:0.5 en peso. Así, se mezclan 72 mL de etanol, 6.32 mL de agua miliQ y 3076 µL siloxano y se deja evolucionar la disolución durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente con objeto de que evolucione al silanol.

Se sumergen las superficies en la disolución del silanol durante un minuto, se lavan con etanol y se introducen las muestras en una estufa previamente precalentada a 110°C durante el período de tiempo de una hora. Posteriormente se vuelven a lavar con etanol las muestras, y se vuelven a calentar las muestras a 110°C durante 5 minutos adicionales.

4.4.3.1.4 Alquilación de superficies

Con objeto de introducir grupos alquilo en las superficies previamente aminadas, se hace reaccionar a dichos grupos amino con anhídrido pentanoico, portador de grupos alquilo terminales. Tras reacción de amidación generan una superficie recubierta de grupos alquilo. Para ello, se prepara una disolución de 2,237 g de anhídrido pentanoico, 125 mL de THF (tetrahidrofurano) y 861 µL de TEA (triethylamina). Una vez preparada la disolución, se colocan en viales las superficies aminadas previamente obtenidas con la R invertida, es decir, con la cara expuesta a la reacción; posteriormente se añaden 2,5 mL de la disolución de anhídrido pentanoico, se cierran los viales y se deja reaccionar durante 48 horas a temperatura ambiente (18-20°C). Tras este tiempo, se lavan las muestras con 5 mL de THF y se procede a llevar a cabo la sonicación de los viales durante 5 minutos. Finalizado el sonicado, se elimina el THF de lavado y se añaden 5 mL de EtOH repitiendo los ultrasonidos. Por último, se repite el lavado con otros 5 mL de EtOH.

4.4.3.1.5 Reacción “Click”

Se preparan disoluciones de los correspondientes polímeros (3KV84; 3KVRGDV; VK; HRGD; 3K-VRGDV/3K-V84) en la proporción 60 mg en 9,6 mL de agua. Una vez disueltos los polímeros se añaden sobre las superficies, las cuales deberán mostrar la cara de R invertida. Se añaden 1,2 mL de cada disolución de polímero a cada vial, 150 μ L de una disolución de CuSO_4 pentahidratado de concentración 4.5 mg/mL. Posteriormente se añaden 150 μ L de una disolución de ascorbato de sodio de concentración 9.5 mg/mL. La mezcla permanece 2h a 4°C en agitación y 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual se lavan las superficies con agua mQ a 4°C varias veces para eliminar el polímero adsorbido. Por último, se deja lavando durante 2 días las muestras con agua mQ a 4°C en la cámara fría.

4.4.3.1.6 Verificación de las superficies

Las superficies que se obtienen en cada etapa del proceso de biofuncionalización, se analizan mediante la medida del ángulo de contacto de una gota de agua sobre su superficie, a través de un sistema OCA15 Plus con un adaptador CCD Video cámara. Esta caracterización es posible debido al cambio de hidrofobicidad producido en las superficies tras las diferentes modificaciones en cada etapa. A continuación se expresan los valores de los ángulos de cada fase de la modificación del vidrio.

- Vidrio con grupos amino: $50,5 \pm 2,2$
- Vidrio con grupos alquínilo: $63,8 \pm 0,9$
- Vidrio con polímero 3KV84: $71,3 \pm 2,6$
- Vidrio con polímero 3KV-RGDV: $79,4 \pm 1,9$
- Vidrio con polímero 3K-V84/3K-VRGDV: $88,3 \pm 2,3$
- Vidrio con polímero HRGDV: $69,9 \pm 2,1$
- Vidrio con polímero VKV: $68,3 \pm 2,1$

4.4.4 Recubrimiento LbL (*Layer by Layer*) de superficies porosas de PVDF

Para llevar a cabo el recubrimiento de las membranas porosas de PVDF se ha llevado a cabo en primer lugar un tratamiento con plasma cleaner para la limpieza y activación de las superficies y, finalizado este proceso, se lleva a cabo el recubrimiento de las membranas porosas.

4.4.4.1 Activación de las superficies con plasma-cleaner

Para realizar la activación y limpieza de las membranas que se van a recubrir, en primer lugar se cortan las superficies del tamaño deseado y se marca una R en la cara menos porosa, para tener un control de ambas caras de la membrana ya que visualmente son muy similares. Se produce la marca en dicha cara debido a que la otra presenta mayor porosidad siendo la de interés para llevar a cabo el recubrimiento polimérico y su posterior uso en un cultivo celular. A continuación estas muestras se colocan en la cámara del plasma con la R invertida para que la cara de interés presente una mayor superficie de contacto con el plasma de Argón.

Una vez colocada en la cámara del plasma se procede a hacer vacío en el sistema hasta conseguir unos 600mTorr y a esa presión se hace pasar una corriente de Argón de 20mL/min de flujo; cuando los parámetros permanecen constantes se enciende la radiofrecuencia HI (29,6 W) y se deja 20min.

Transcurrido ese tiempo se apaga la radiofrecuencia, se rompe el vacío y se apaga la bomba. Una vez apagados todos los equipos se extraen las muestras de la cámara del plasma y se realiza una comprobación de la activación de las superficies midiendo el ángulo de contacto.

4.4.4.2 Recubrimiento LbL de la membrana

4.4.4.2.1 Preparación de las disoluciones de polímeros

Se disuelven los polímeros con los cuales se va a llevar a cabo el recubrimiento (VKV-N₃, VKV-ciclo, RGD-N₃ y RGD-ciclo) O/N a 4°C a la concentración correspondiente. Cada membrana se cubre utilizando una determinada disolución de concentración conocida de cada uno de los polímeros, y se mantiene a 4°C durante todo el proceso.

4.4.4.2.2 Recubrimiento de las superficies

El procedimiento del recubrimiento consiste en sumergir la membrana en la disolución del polímero correspondiente durante 2 segundos; tras este tiempo, se saca la superficie, se escurre la gota de exceso de disolución de la superficie y se deja secar durante 5min. Pasado ese tiempo se sumerge en el otro polímero, durante otros dos segundos, se vuelve a sacar, escurrir y se vuelve a esperar 5 min, obteniendo así la primera bicapa del recubrimiento. Este procedimiento se repite dos veces para conseguir dos bicapas. Finalizado el recubrimiento se esperan 45 minutos, se colocan en placas Petri, se congelan y liofilizan.

En este trabajo se han llevado a cabo recubrimientos de varios tipos de membranas, modificando también el orden del polímero de recubrimiento y la concentración de dicho polímero, para evaluar la mejor viabilidad para un crecimiento celular.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se exponen los resultados obtenidos de los métodos aplicados en este TFG. Se incluyen los resultados de la optimización del método de recubrimiento de membranas piezoeléctricas porosas de PVDF, así como su caracterización, y la necesaria modificación química previa de los biopolímeros ELRs utilizados para la biofuncionalización de dichas superficies. Asimismo, se evaluará el resultado obtenido del escalado del método de biofuncionalización de superficies de vidrio llevado a cabo en este caso para cubres de 30mm de diámetro.

5.1 Modificación del polímero VKV con grupos azido y ciclooctinilo

Los biopolímeros se modifican químicamente con objeto de introducir en ellos grupos azido y grupos ciclooctinilo (Figuras 5.1 y 5.2), aprovechando la presencia de grupos amino en las lisinas presentes en la secuencia aminoacídica. Estos grupos funcionales se introducen mediante reacción de amidación, utilizando un derivado carboxílico especialmente reactivo debido a la presencia de un resto N-succinimidilo. Las modificaciones de los polímeros se realizan para 1000 mg de polímero puro, utilizando carbonato de 2-(Azidoetil)(2,5-dioxopirrolidin-1-il) y carbonato de (1R,8S,9S)-biciclo[6.1.0]non-4-in-9-ilmetil succinimidilo para introducir los grupos azido y ciclooctinilo, respectivamente. Según el protocolo seguido, descrito en los apartados 4.4.2.1 y 4.4.2.2, se utilizan 0,6 equivalentes, en ambos casos, por lo que fue necesario añadir 53,16 mg y 67,95mg del respectivo carbonato dejando que la reacción evolucione a temperatura ambiente durante 48h. Tras la reacción de modificación los polímeros modificados, nombrados como VKV-N₃ y VKV-ciclo, fueron caracterizados por las técnicas de espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-ToF).



Fig.5.1 Reacción de modificación con grupos ciclooctinilo

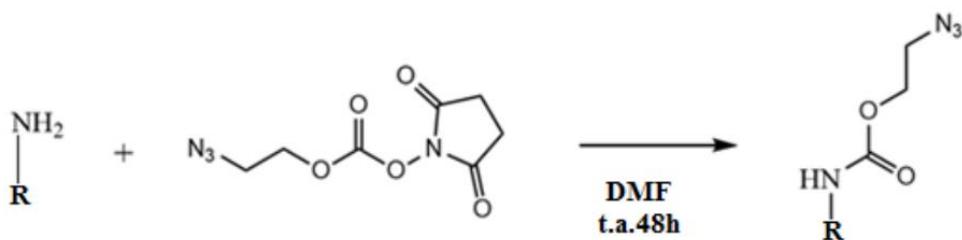


Fig.5.2 Reacción de modificación con grupos azido

Los resultados que se obtuvieron de ambos polímeros utilizando esta metodología fueron los siguientes:

Polímero	VKV-N ₃	VKV-ciclo
Peso de partida	1000 mg	1000 mg
Peso obtenido	898,7 mg	938,4 mg
mMoles de partida	0,016	0,016
Moles obtenidos	0,014	0,015
Rendimiento	87,5%	93,7%
Estado	Sólido	Sólido

Tabla 5.1 Resultados obtenidos de la modificación de VKV-N₃ y VKV-ciclo

5.1.1 Caracterización del polímero VKV-N₃

5.1.1.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Una pequeña cantidad de muestra se colocó en la celda infrarroja, donde se sometió a una fuente de luz infrarroja, la cual hizo un barrido desde longitudes de onda de 800cm⁻¹ hasta 4000 cm⁻¹.

En la caracterización de biopolímeros ELRs, la espectroscopía de IR nos permite comprobar si ha habido algún cambio en los grupos funcionales a través de sus señales de absorbancia, en comparación con las del polímero puro sin modificar, pudiendo comprobar si se ha producido la modificación de los grupos amino con éxito. En el espectro de la Figura 5.3 se observó la aparición de una nueva señal, característica del grupo azido, en el espectro del biopolímero modificado:

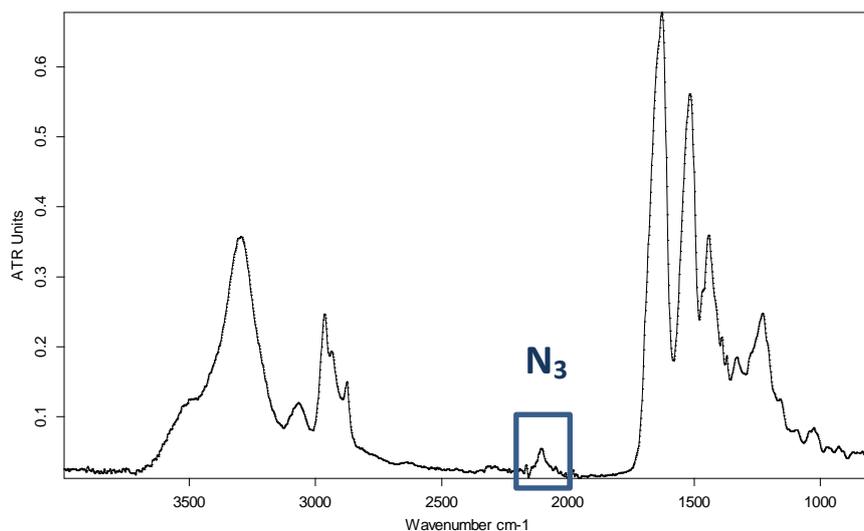


Fig 5.3 Espectro de infrarrojo del polímero VKV- N_3

Enlace	Valores teórico /cm^{-1}	Valores obtenidos/cm^{-1}
ν_{N_3}	2160-2120	2100

Tabla 5.2 Comparación de valores teóricos con los obtenidos del espectro FT-IR

A la vista del espectro obtenido y de los valores teóricos tabulados, se observa la presencia de un pico nuevo a unos 2100 cm^{-1} correspondiente al grupo N_3 , lo que nos indica que el polímero modificado presenta grupos azido.

5.1.1.2 Resonancia magnética nuclear

Se realizó un espectro de resonancia magnética de protón del polímero modificado con grupos azido. Para ello se preparó una disolución de 25mg/mL y se llevó a un capilar de RMN. El espectro que se obtuvo fue el siguiente:

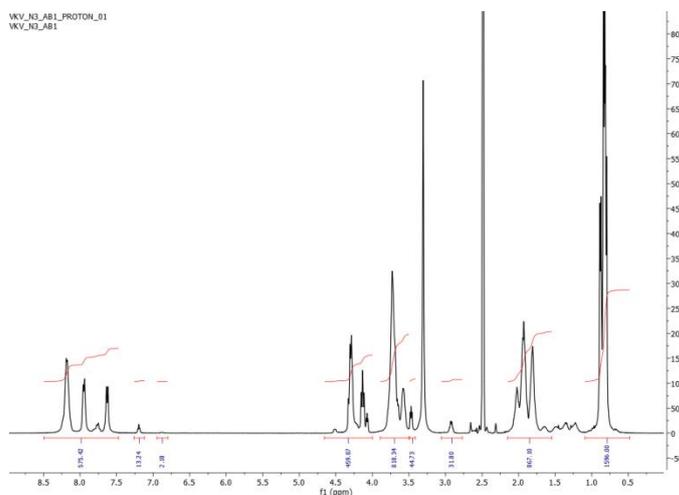


Fig 5.4 Espectro de RMN del biopolímero VKV- N_3

En el espectro de RMN se observa la aparición de 3 nuevos picos a 3, 4 y 7 ppm, La nueva señal en torno a 7 ppm corresponde al nuevo protón amídico resultante de la modificación de los protones del grupo amino de la lisina. Este nuevo pico integra como 14 protones, lo que nos indica que 14 de los grupos amino de las lisinas del polímero puro se han modificado.

El porcentaje de modificación es, por tanto, de 58,3%. Sabiendo que hemos utilizado una equivalencia de 0,6 sólo se pueden modificar el 60% de las lisinas, por lo que el rendimiento de la modificación es del 97,1%, conversión adecuada para su posterior uso en el recubrimiento LbL de membranas porosas de PVDF.

5.1.1.3 Espectroscopía de masas con tiempo de vuelo

Esta técnica permite conocer el peso molecular tanto del polímero de partida como del obtenido tras la modificación. Conociendo estos datos se puede calcular el porcentaje de conversión de las lisinas del polímero de partida.

El espectro de masas obtenido para el polímero VKV-N₃ es el que se muestra a continuación:

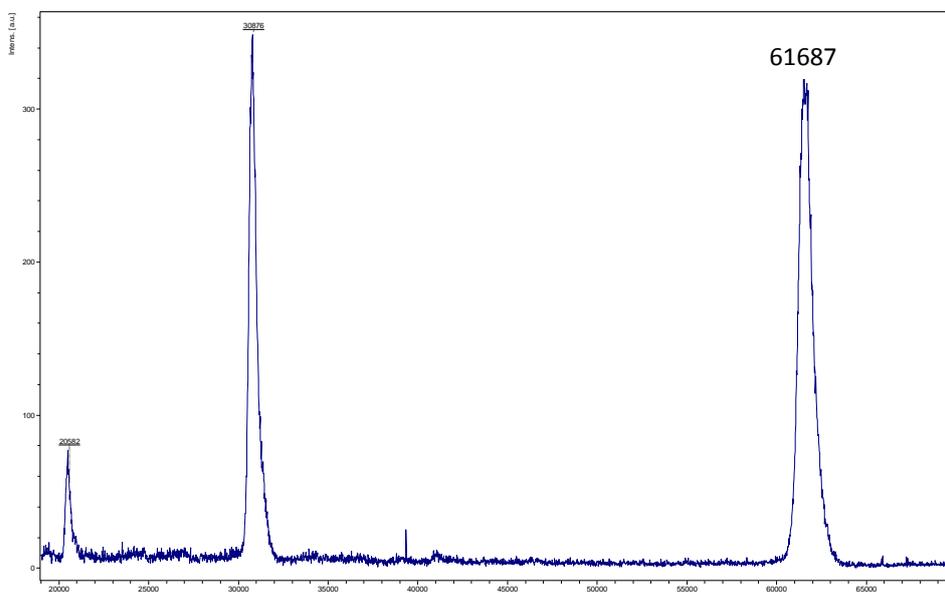


Fig 5.5 Espectro de masas MALDI-ToF de VKV-N₃

Una vez conocido el peso molecular del polímero de partida y el modificado, se puede aplicar la siguiente ecuación para obtener el número de lisinas modificadas:

$$\text{Número de lisinas modificadas} = \frac{PM \text{ final} - PM \text{ inicial}}{PM \text{ producto}}$$

Siendo:

PM final: 61687 Da

PM inicial: 60462 Da

PM producto: 113 Da mol

Se obtiene que se modificaron 10,84 lisinas y sabiendo que en dicho polímero hay 24 lisinas libres se calcula el porcentaje de conversión obteniendo un valor de 45,8 % de conversión.

5.1.2 Caracterización del polímero VKV-ciclooctino

5.1.2.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

El polímero modificado con grupos ciclooctino dio lugar a un espectro similar al del polímero puro (Figura 5.6), por lo que no se pudo comprobar mediante esta técnica la modificación correspondiente del polímero ya que, como el ciclooctino es un anillo simétrico, la absorción a 2200 cm^{-1} es inactiva y no se observa la señal del triple enlace.

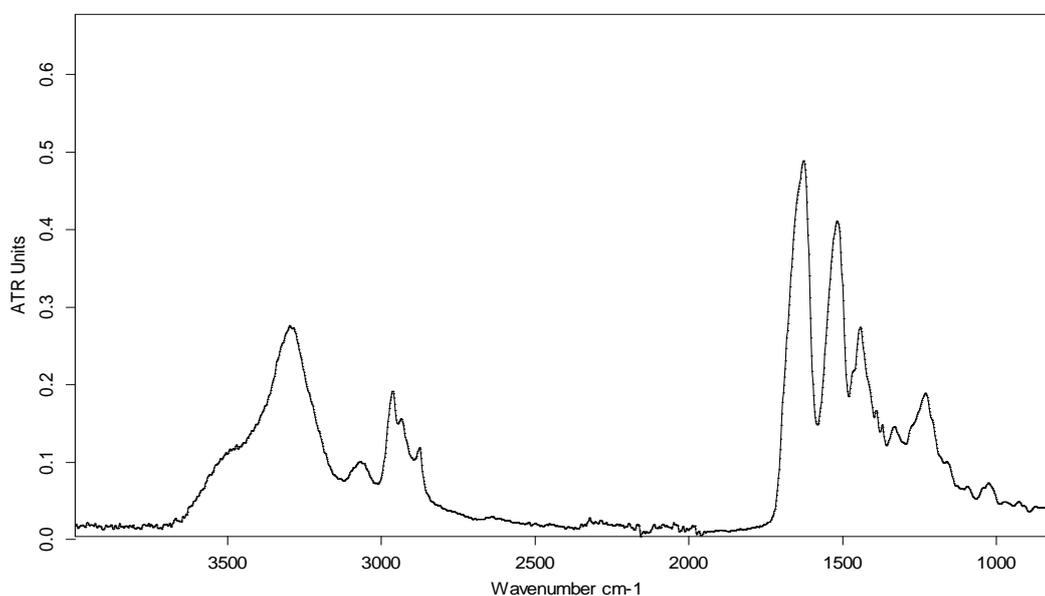


Fig. 5.6 Espectro de infrarrojo VKV-ciclo

5.1.2.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Se realizó un espectro de protón del polímero modificado con grupos ciclooctino. Para ello se preparó una disolución de concentración 25mg/mL de muestra y se llevó a un tubo de RMN. El espectro que se obtuvo fue el siguiente:

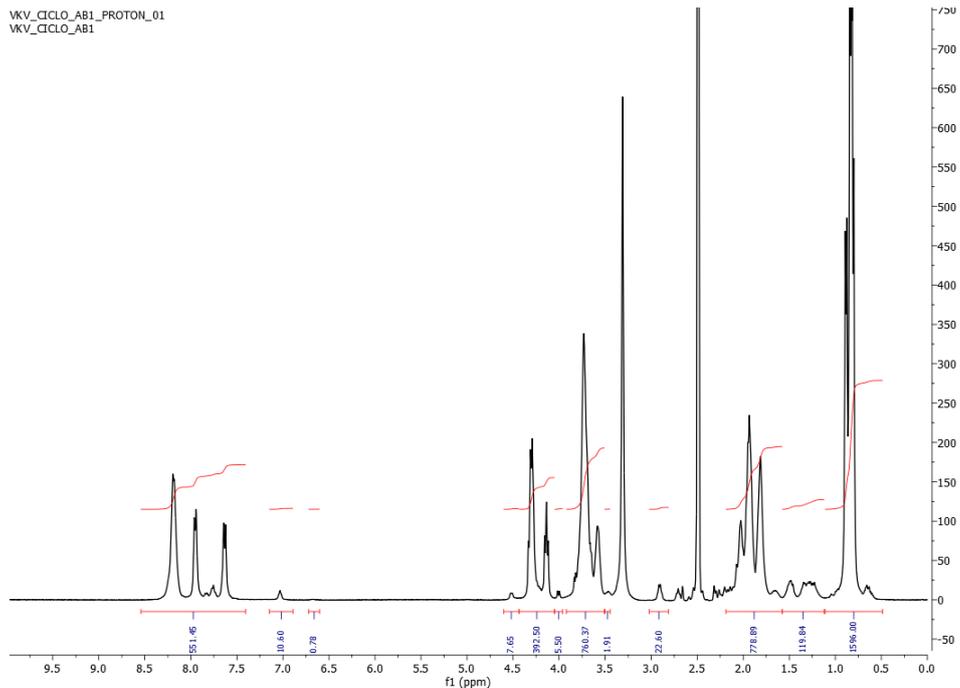


Fig.5.7 Espectro de RMN del biopolímero modificado VKV-ciclo

En dicho espectro se observa una señal nueva en torno a 7 ppm correspondiente al nuevo protón amídico resultante de la modificación de los protones del grupo amino de la lisina. Este pico integra como 10,60, lo que indica que de las 24 lisinas presentes en el polímero se han modificado aproximadamente 11.

El porcentaje de sustitución es por tanto del 45,8% sabiendo que se ha utilizado una equivalencia de 0,6 el rendimiento es del 76,3% obteniendo un valor bajo pero apto para el recubrimiento de membranas porosas de PVDF.

5.1.2.3 Espectroscopia de masas con tiempo de vuelo

En este caso se preparó la muestra y se realizó un espectro de masas de polímero modificado para conocer el peso molecular del biopolímero modificado ya que conociendo dicho valor y el peso molecular inicial se puede calcular el porcentaje de conversión del polímero. En este caso se obtuvo el siguiente espectro:

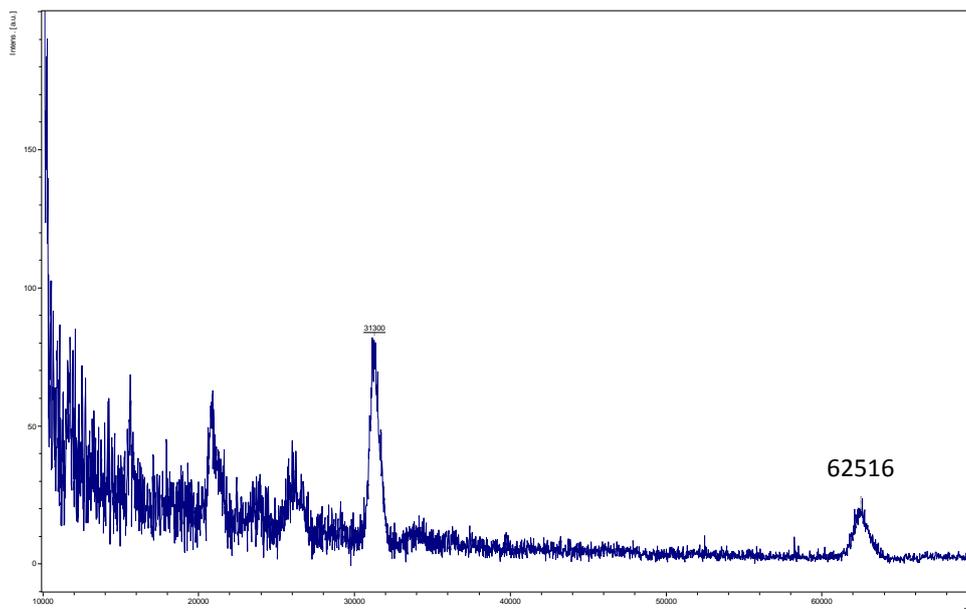


Fig 5.8 Espectro de masas del polímero VKV-ciclo

Utilizando la ecuación del apartado 4.1.1.3 y sabiendo el peso molecular del polímero inicial (60642 Da), el peso molecular del polímero modificado (62516 Da) y de los grupos funcionales de partida y final, se obtiene una conversión del 44,1% de polímero modificado.

5.2 Modificación del polímero RGD con grupos azido y ciclooctino

El procedimiento de modificación para este polímero es análogo al llevado a cabo para la modificación de polímero VKV-N₃ y VKV-ciclo. En esta modificación se utilizaron 2000 mg de RGD puro (1 eq, 0,47 mmol de NH₂, PM 60661 g/mol) siendo necesario en este caso añadir 108,3 mg del reactivo que aporta el grupo azido y 138,3 mg del correspondiente al grupo ciclooctino para que se diera correctamente la reacción.

Dicha modificación se caracteriza por las técnicas de espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-ToF) como se muestra en el Anexo 1. En base a los espectros obtenidos en cada una de las técnicas de caracterización se obtiene que para el RGD-N₃ se modificaron 14 lisinas de las 24 posibles, lo que se traduce en un 60 % de conversión, y para el RGD-ciclo la reacción modificó 12 lisinas lo que conlleva una conversión del 50%.

5.3 Escalado del método de biofuncionalización de superficies

La modificación de sustratos mediante la funcionalización con determinadas macromoléculas como las proteínas, permiten el diseño y el control de sus propiedades superficiales, las cuales son esenciales para aplicaciones específicas dentro de disciplinas como la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

Uno de los objetivos de este TFG es realizar un escalado del método previamente diseñado por el grupo de investigación BIOFORGE para la obtención de un sistema de recolección celular utilizando superficies de vidrio biofuncionalizadas con ELRs que actúen como soportes de cultivo y posterior recolección celular.

En este TFG se ha llevado a cabo el recubrimiento de superficies de vidrio de 30mm de diámetro, habiéndose aplicado esta metodología en trabajos anteriores para la obtención de superficies biofuncionalizadas para recolección celular de tamaño menor (12 y 16 mm) que el de interés de este TFG. Para efectuar el recubrimiento de los cubres deseados se lleva a cabo un escalado del método, utilizando recipientes de mayor tamaño para la reacción de unión covalente del ELR al cobre de 30mm, adecuando los volúmenes de disoluciones, reactivos y disolventes de lavado.

Para realizar la biofuncionalización es necesaria la modificación tanto de las superficies como de los ELRs utilizados, de manera que éstos adquieren ciertos grupos funcionales que permitan su unión a la superficie, adecuadamente funcionalizada, mediante una reacción "Click" de cicloadición 1,3-dipolar tipo Huisgen a modo de injerto.

En primer lugar se modifican los recombinámeros tipo elastina con el objetivo de introducir en ellos las funcionalidades azido necesarias y, a continuación, se funcionalizan las superficies a fin de implantar grupos alquínilo.

En el caso de las superficies, la funcionalización se lleva a cabo mediante activación de las mismas a través de tratamiento con plasma y la posterior introducción de los grupos alquínilo mediante un proceso en dos etapas que utiliza inicialmente la metodología del silanol para funcionalizar las superficies con grupos amino, y posterior amidación de los grupos amino introducidos con un derivado de ácido como el anhídrido pentinoico que porta un grupo alquínilo terminal en su estructura.

Cabe destacar que no se realizó la modificación de los recombinámeros utilizados para este recubrimiento debido a que el grupo BIOFORGE ya disponía de estos polímeros modificados. Es importante señalar que sí que se modificaron otros polímeros similares a los que se utilizan en este apartado, con reacciones químicas muy parecidas. Así se ha descrito previamente la modificación de los biopolímeros VKV y RGD con los grupos funcionales azido y cicloctínilo necesarios para el recubrimiento de membranas piezoeléctricas porosas de PVDF.

A continuación se detallarán cada una de las etapas necesarias para la biofuncionalización de dichas superficies, las cuales pueden resumirse en la siguiente figura:

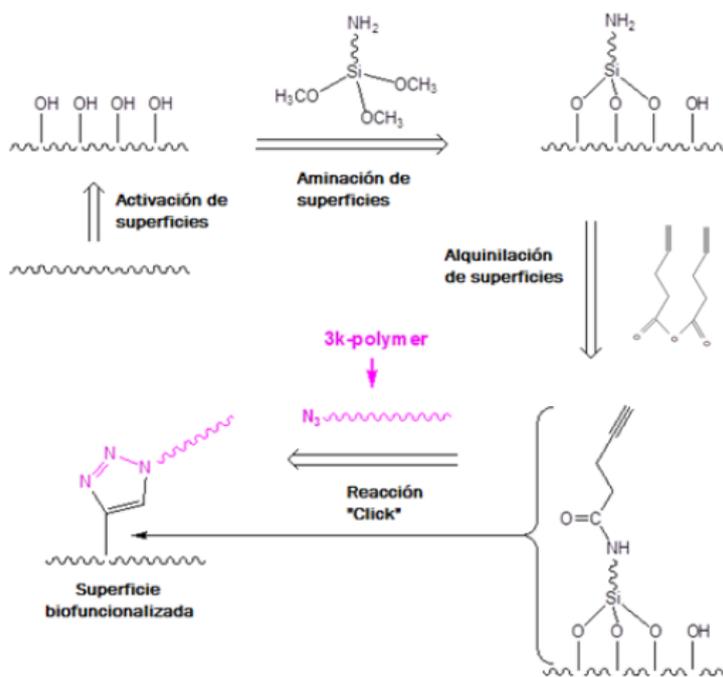


Fig 5.9 Esquema de las etapas de biofuncionalización de superficies

5.3.1 Síntesis del anhídrido pentinoico

El anhídrido pentinoico se sintetiza justo antes de su utilización, mediante reacción del ácido pentinoico en presencia de 0.5 equivalentes de dicitlohexilcarbodiimida (DCC). El crudo de reacción se analiza por $^1\text{H-NMR}$ para visualizar la proporción de anhídrido pentinoico presente junto con el resto de los disolventes Et_2O y diclorometano.

A la hora de analizar el espectro de $^1\text{H-NMR}$ obtenido se han de tener en cuenta los protones más significativos de cada molécula(Figura 5.10).

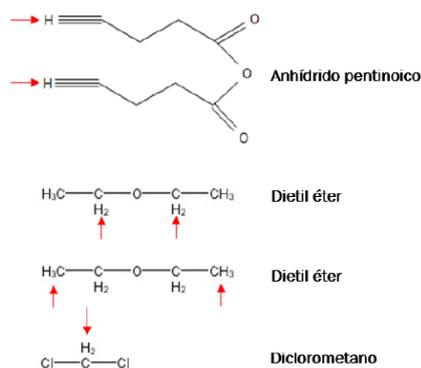


Fig 5.10 Protones significativos en $^1\text{H-RMN}$

Una vez conocidos los protones de interés, se han de conocer los desplazamientos a los que saldrá cada señal, para así poder asignar las distintas señales obtenidas.

Compuesto	Protones	Señal(ppm)
Anhídrido pentinoico	2	2,00
Dietil éter	4(unidos a C secundarios)	3,5
Dietil éter	6(unido a C primario del extremo)	1,25
Diclorometano	2	5,25

Tabla 5.3. Señales de los protones de interés

El espectro de $^1\text{H-NMR}$ obtenido del anhídrido pentinoico sintetizado es el que se muestra a continuación:

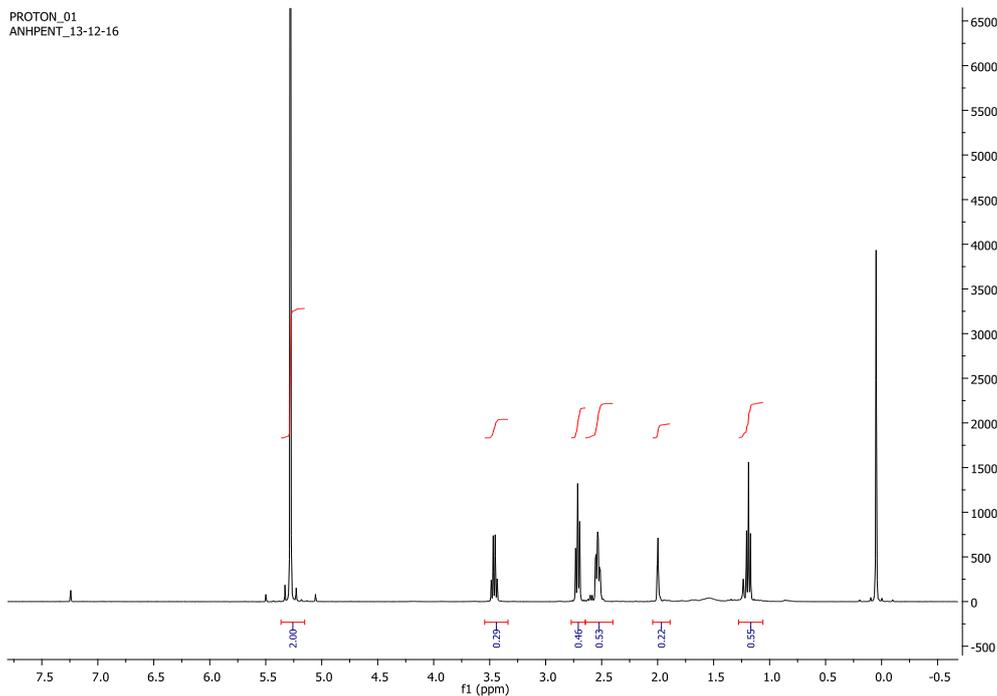


Fig 5.11 Espectro de 1H-RMN del anhídrido pentinoico sintetizado en cloroformo deuterado: cloroformo (CDCl_3): DCM (CH_2Cl_2): 5,30 ppm(s, CH_2 , 2,00) *Referencia; Dietil éter ($(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$): 3,30-3,60 ppm (c, CH_2 , 0.29); ,1,20-1,40 ppm (t, CH_3 , 0,55); Anhídrido pentinoico ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$): 2,65-2,80 ppm(t, CH_2 , 0,46); 2,45-2,65 ppm(td, CH_2 , 0,53); 1,90-2,10 ppm (t, CH, 0,22)

Para calcular la masa total de anhídrido pentinoico obtenido en base al espectro, se han de tener en cuenta los pesos moleculares de los distintos compuestos, tomar como referencia la integral de los protones de CH_2Cl_2 y el valor de la señal del protón correspondiente. De tal manera que aplicando la siguiente ecuación se obtendrá la cantidad de anhídrido presente en la mezcla:

$$\text{Masa total}_{\text{reacción}} = [(P_{\text{mDCM}} \cdot \text{Valor } 1H_{\text{DCM}}) + (P_{\text{mÉter}} \cdot \text{Valor } 1H_{\text{Éter}}) + (P_{\text{mAnh}} \cdot \text{Valor } 1H_{\text{Anh}})] \cdot X$$

$$9,676 \text{ g} = [(85\text{g} \cdot 1) + (74\text{g} \cdot 0,07) + (178\text{g} \cdot 0,11)] \cdot X$$

$$X = 88.1$$

$$\text{Masa Anh} = 0,11 \cdot 178 \cdot 88.1 = 1724 \text{ mg}$$

De esta manera pudimos averiguar la cantidad de mezcla necesaria para añadir una cantidad concreta de anhídrido pentinoico en la reacción posterior de amidación; así el factor que relaciona ambas cantidades es de 5.6 (9676/1724), por lo que se hace necesario multiplicar la cantidad necesaria de anhídrido pentinoico por este factor para conocer qué cantidad de mezcla debemos utilizar.

5.3.2 Activación de superficies

La activación de superficies se realiza por tratamiento con plasma de Argón y Oxígeno (Figura 5.12). El empleo de plasma de Argón genera un efecto mecánico grande parecido a un microchorro de arena que consigue eliminar continuamente átomos individuales de la superficie, dejando así sitios con radicales de alta reactividad. Cuando se añade oxígeno al proceso, la superficie adquiere funcionalidades hidroxilo que aumentan su polaridad. Para la correcta activación de superficies, el grupo BIOFORGE había ya realizado ensayos previos; por esta razón, el proceso estaba ya optimizado para los distintos parámetros que entran en juego, tiempo de activación, caudal de flujo y presión de la cámara.

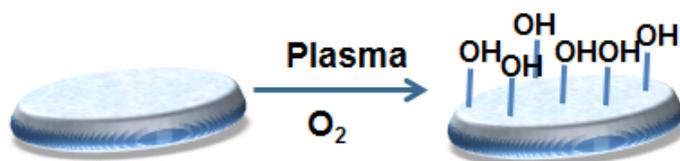


Fig.5.12 Activación de las superficies

Se colocan los cubres de vidrio con la R invertida en la cámara de plasma y se somete a un plasma de Argón de 5 minutos con un flujo de 30mL/min y una presión de unos 600mTorr; a continuación, se cierra el flujo de Argón dejando 1 minuto hasta que se evacúe el gas Argón presente en la cámara. Transcurrido este tiempo se somete a las superficies a plasma de Oxígeno durante 20 minutos, a una presión de 580 mTorr y un caudal de 18,5 mL/min. Pasado este tiempo se evacua el oxígeno durante dos minutos y se abre la cámara de plasma, extrayendo el soporte físico donde se colocaron las superficies.

5.3.3 Aminación de superficies

La conversión de grupos hidroxilo de las superficies en grupos amino se realiza a través de la química del silanol. Para ello se genera in situ 3-aminopropilsilanol por hidrólisis del correspondiente trimetoxisiloxano. En este caso en un vaso de precipitados de 250mL se añadieron 72mL de EtOH, 6,32mL de agua destilada y 3,076 μ L de (3-amino propil)-trimetoxisilano; se dejó tapado y con agitación durante 1h.

Transcurrido ese tiempo se para la agitación, se destapa y se comienza a realizar el recubrimiento de las superficies activadas para la aminación de las mismas. Para ello, con la ayuda de una pinza, se sumerge la superficie de vidrio en la disolución durante 1 minuto; se saca, se lava con etanol absoluto y se coloca en una placa Petri. Así se repite el proceso con los 60 cubres que se han de biofuncionalizar.

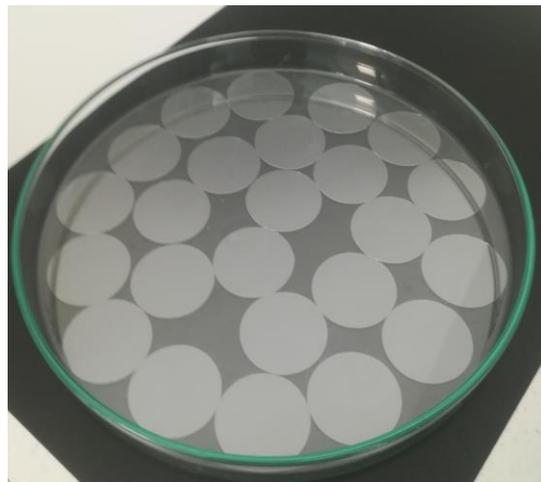


Fig. 5.13 Superficies recubiertas, preparadas para introducirlas en la estufa

Finalizado el recubrimiento se introducen en una estufa previamente calentada a 110°C para la deshidratación por tratamiento térmico y, transcurrida 1 hora, se obtienen superficies funcionalizadas con el grupo amino (Figura 5.14).

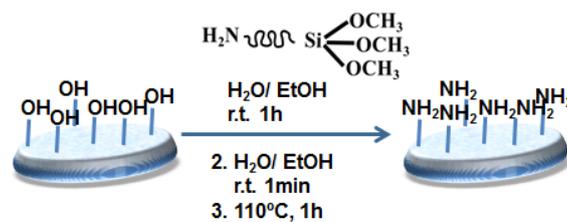


Fig 5.14 *Reacción de aminación de superficies*

5.3.4 Alquilación de superficies

En una siguiente etapa, se lleva a cabo la funcionalización de la superficie con grupos alquínico por reacción de amidación, catalizada por una base como la trietilamina, de los grupos amino presentes en la superficie con anhídrido pentinoico, derivado de ácido portador de un grupo alquínico terminal (Figura 5.15).

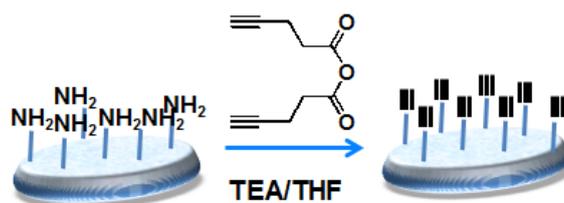


Fig 5.15 *Reacción de alquilación de las superficies*

Para llevar a cabo la reacción de amidación se prepara previamente una disolución de 125mL de THF, 861μL de trietilamina y por último se añade 2,2 g del anhídrido pentinoico previamente sintetizado.

A continuación se van añadiendo 2,5mL de esta disolución a los botes donde se va a llevar a cabo la reacción y en los que están colocadas las superficies a funcionalizar, se cierran herméticamente y se dejan 48 h a temperatura ambiente.



Fig 5.16 Reacción de amidación de las superficies

Transcurrido ese tiempo se abren los botes y se procede a hacer 3 lavados; el primero con 5mL de THF, el segundo y tercero con 5mL de EtOH en cada lavado; todos ellos con posterior sonicado de 5 minutos.

Tras realizar todos los lavados se observa que el líquido de lavado queda completamente limpio (incoloreo y transparente) mientras que el correspondiente al primer lavado presenta un color amarillento (Figura 5.17).

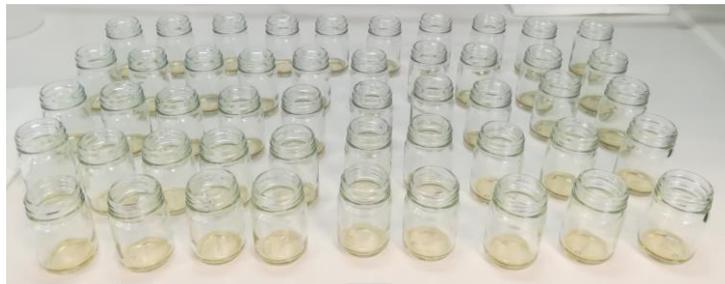


Fig 5.17 Evolución de líquido de lavado

5.3.5 Reacción Click

La última etapa es la unión covalente de los recombinaómeros a la superficie por reacción entre los grupos alquínilo de las superficies y los grupos azido de los ELRs. Los recombinaómeros modificados químicamente, portadores de grupos azido, se hacen reaccionar con los grupos alquínilo de la superficie de vidrio mediante una reacción tipo "Click" de cicloadición 1,3-dipolar tipo Huisgen. La reacción se lleva a cabo en medio acuoso y es catalizada por el ión Cu(I) generado *in situ* por reducción del ión Cu(II) en presencia de ascorbato.

De esta manera los recombinaómeros se unen covalentemente a las superficies por uno de sus extremos a través de estructuras cíclicas de 1,2,3-triazoles-1,4-disustituidos.

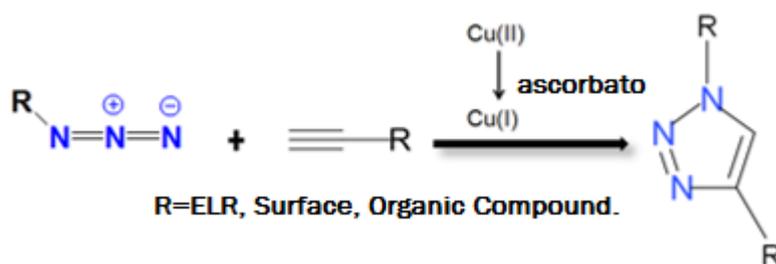


Figura 5.18 Formación de 1, 2, 3-triazoles-1,4-disustituidos mediante metodología "Click"

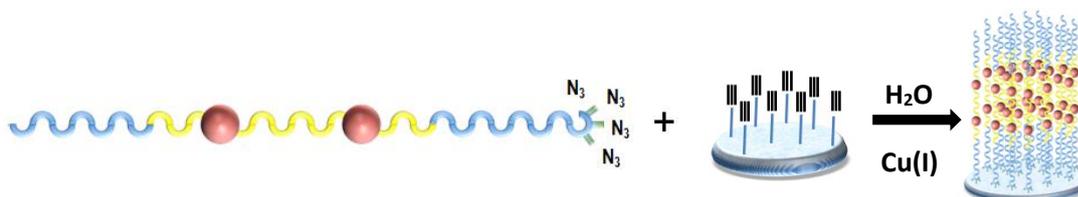


Fig. 5.19 Injerto del recombinaómero a la superficie

Para realizar experimentalmente la reacción click se prepararon dos disoluciones, una de sulfato de cobre pentahidratado y otra de ascorbato de sodio. Para la primera se pesaron 28mg de sulfato de cobre y se añadieron 6,2mL de agua mQ; por otro lado se pesaron 75mg de ascorbato de sodio y se adicionaron 7,8mL de agua mQ. Estas cantidades se calcularon en base al volumen necesario para el total recubrimiento de la superficie teniendo en cuenta la proporción ELR/agua indicada en el apartado 3.4.3.1.5.

Una vez preparadas las disoluciones, se procedió a realizar la reacción click en cámara fría, para lo cual se añadieron 1,2mL de la disolución del ELR correspondiente y 150µL de cada una de las disoluciones de ascorbato y Cu(II) previamente preparada.

Por tanto, la valoración de la humectabilidad de la superficie mediante la determinación del ángulo de contacto de una gota de agua sobre la superficie, tiene especial interés a la hora de caracterizar las propiedades del recubrimiento de las superficies.

Esta técnica permite estudiar los cambios de hidrofobicidad de las superficies de una manera rápida, sencilla y por tanto eficaz; sirviendo como primer método de control o seguimiento de las modificaciones realizadas en cada etapa de reacción.

Los ángulos de contacto se determinaron, según se citó en el apartado 4.3.5, empleando una gota desionizada expelida y depositada manualmente sobre la superficie.

En todas las superficies se aprecia el cambio de hidrofobicidad producido durante las diferentes etapas de funcionalización. En la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos para los ángulos de contacto de las superficies en las distintas etapas de funcionalización.

Etapa de la biofuncionalización	Medida del ángulo de contacto						Ángulo de contacto medio
Muestras aminadas	47,9	50,5	46,9	50,2	49,1	52,8	50,5 ± 2,2
	51,9	52,7	49,5	50,7	52,7	53,7	
	47,5	47,9	52,8	51,0			
Muestras alquiniolo	64,3	63,5	64,5	65,5	64,4	62,7	63,8 ± 0,9
	64,4	63,0	62,7	63,3	64,1	63,3	
Muestras 3KV84	69,8	68,8	70,0	73,6	71,4	68,3	71,3 ± 2,6
	74,9	73,7	74,6	67,3	70,0	73,5	
Muestras VKV	68,1	67,1	69,3	65,7	68,1	72,1	68,3 ± 2,1
	69,3	70,0	63,7	68,8	68,0	68,9	
Muestras 3KVRGDV	77,8	77,3	78,6	77,3	82,1	80,7	79,4 ± 1,9
	78,6	82,7	77,8	79,3	78,8	81,5	
Muestras RGD	70,1	70,8	69,7	69,4	66,3	73,7	69,9 ± 2,1
	71,0	71,3	67,7	68,4	68,0	72,1	
Muestras 3KV84/3KVRGDV	90,6	89,0	85,2	85,5	87,8	90,5	88,3 ± 2,3
	89,3	89,5	84,9	90,3			

Tabla 5.4 Resultados obtenidos de la caracterización de las superficies biofuncionalizadas

Cabe destacar que la medida del ángulo de contacto en las superficies activadas no se pudo cuantificar debido a que dichas superficies eran totalmente hidrofílicas por lo que el equipo no detectaba ángulo de contacto, lo que refleja que el tratamiento con plasma había activado correctamente las superficies. Esta activación hace que los grupos hidroxilo, grupos polares, queden expuestos en la superficie, haciéndola mucho más hidrofílica, disminuyendo en consecuencia la medida del ángulo de contacto.

Sin embargo, en el segundo paso de la funcionalización, es decir, la formación de una capa de grupos amino, la medida del ángulo de contacto aumentó hasta $50,5 \pm 2,2^\circ$ indicando la presencia de un recubrimiento más hidrofóbico que el correspondiente a los grupos hidroxilo libres, lo que demuestra la presencia de la capa de aminosilanizado.

La superficie funcionalizada con grupos alquínilo presenta un pequeño aumento en su hidrofobicidad respecto a la superficie con grupos amino, lo cual se observa en la medida del ángulo de contacto, ya que aumenta a $63,8^\circ \pm 0,9^\circ$.

Las medidas del ángulo de contacto sobre las superficies biofuncionalizadas nos permite comprobar la presencia del recombinámero. Como se observa en la tabla 5.4, las superficies más hidrofóbicas tras el recubrimiento, son las que presentan la mezcla del recombinámero 3K-VRGDV con 3K-V84 con un ángulo de contacto de $88,3 \pm 2,3$, frente a las superficies recubiertas con RGD que presenta un ángulo de contacto de $69,9 \pm 2,1^\circ$.

En resumen, esta técnica de caracterización demuestra la eficacia y eficiencia de la reacción "Click" que proporciona un recubrimiento polimérico homogéneo, efectivo y estable. Aquellos ELRs que se unen por su extremo amino terminal, una vez modificado el dominio terminal rico en lisinas con grupos azido, conservan el comportamiento termosensible, lo que les hace útiles para su uso potencial como dispositivos viables de recolección celular.

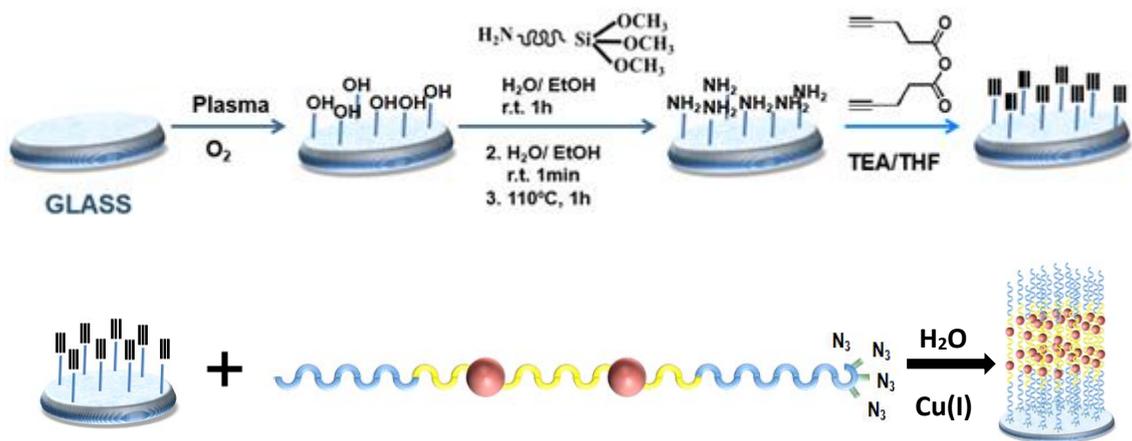


Fig.5.21 Etapas de la biofuncionalización de superficies de vidrio

5.4 Recubrimiento de membranas piezoeléctricas porosas de PVDF

En este apartado se desarrollarán detalladamente las etapas experimentales necesarias para el recubrimiento de membranas piezoeléctricas porosas de fluoruro de polivinilideno. En primer lugar, se optimizaron las diferentes condiciones de reacción; a continuación, se realizó el recubrimiento del primer lote de membranas recibidas de la Universidad Politécnica de Valencia con la que se está realizando este proyecto, y se analizaron diferentes parámetros para evaluar las condiciones óptimas obtenidas para dicho recubrimiento. Tras este recubrimiento, y elegidas las condiciones óptimas, se procedió a hacer el recubrimiento de un segundo lote de membranas.

En el siguiente esquema se muestra gráficamente el método de recubrimiento LbL utilizado, descrito previamente en el apartado 4.4.4:

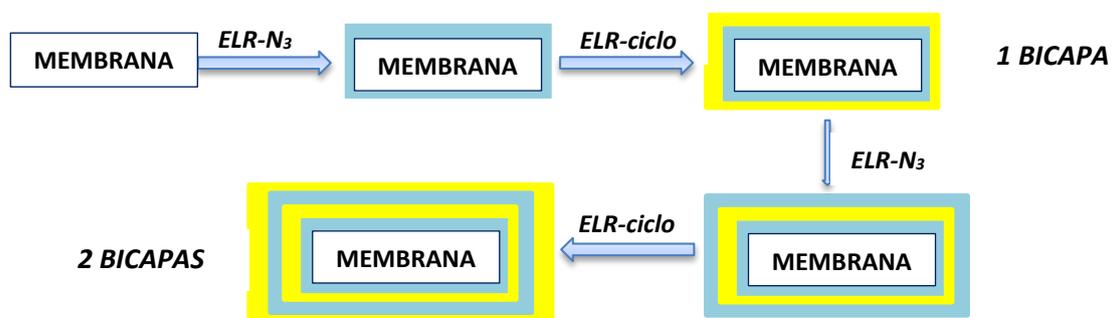


Fig 5.22 Etapas del recubrimiento LbL de membranas porosas piezoeléctricas

5.4.1 Optimización del método de recubrimiento de membranas porosas de PVDF

El primer paso en el objetivo del recubrimiento de las membranas por la técnica LbL, consistió en evaluar cuáles son las condiciones óptimas a utilizar. Las variables que se podían analizar fueron: el tiempo de activación de las membranas por tratamiento con plasma cleaner, las concentraciones de las disoluciones de ELRs utilizados para el recubrimiento y el orden de adición de las mismas en dicho recubrimiento. Asimismo, se estudiará la forma de marcado de las distintas caras de las membranas y se analizarán distintas técnicas que conduzcan al cambio de hidrofobicidad de las membranas.

Cabe resaltar que en la primera serie de membranas recibidas había dos tipos diferentes: una membrana preparada a 25°C, con carácter más endeble, más blanda y de menor espesor; y la otra membrana preparada a 50° C, mucho más resistente y fácilmente manipulable.

5.4.1.1 Pruebas de marcado de las caras de las membranas:

Se cortaron pequeñas porciones de los dos tipos de membrana con tijeras esterilizadas y, con la ayuda de un punzón, se realizaron pruebas de numeración, de cruz y de R en la cara no porosa (brillante) ya que la cara de interés para el recubrimiento es la porosa. En la siguiente tabla se recogen los resultados obtenidos:

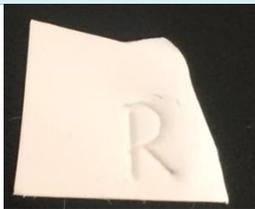
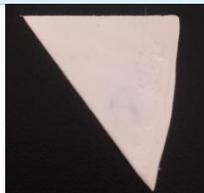
MEMBRANA 1 (25°C)		MEMBRANA 2 (50°C)	
CARA POROSA	CARA BRILLANTE	CARA POROSA	CARA BRILLANTE
			

Tabla 5.5 Pruebas de marcado en membrana porosa de PVDF

En ella se observa que, en la membrana 1, la cara porosa queda marcada ya que posee un espesor menor, mientras que en la membrana 2 no se observa lo marcado en la cara no porosa, lo que refleja que es más resistente.

Se puede concluir que, evaluando solamente esta condición, sería más favorable realizar el estudio utilizando la membrana 2.

5.4.1.2 Tiempo de tratamiento con plasma cleaner para activación de membranas

Para evaluar este parámetro se tomaron varias porciones de los dos tipos de membranas, se las colocó en la cámara de plasma con la R invertida para que la cara porosa sea la que tenga mayor superficie de contacto con el plasma. A continuación, se las sometió a dicho tratamiento de plasma de Argón a diferentes tiempos de exposición, utilizando en todos los experimentos un flujo de Argón de 20mL/min y una presión de 600mTorr en la cámara.

Se llevaron a cabo tres pruebas de activación a diferentes tiempos, es decir, durante 5 minutos, 20 minutos y 30 minutos de manera independiente. Posterior a cada uno de los tratamientos con plasma se evaluó si había habido aumento de la hidrofiliidad por medio de la medida del ángulo de contacto de una gota de agua sobre las superficies activadas. En todos los casos, los ángulos medidos son similares, por lo que la activación del plasma no parece aumentar con el tiempo. Así, tras el tratamiento de mayor tiempo de exposición al plasma de Argón (20 min), la membrana 1 (25°C) presentaba un ángulo de contacto de 120,7° y la membrana 2 (50°C) de 123,8°. Por tanto, el tiempo de exposición al plasma de Argón no parece ser una variable que mejore la hidrofiliidad de las superficies porosas, con independencia del tipo de membrana utilizada.

5.4.1.3 Tratamiento con alcoholes para aumentar la hidrofiliidad de membranas piezoeléctricas porosas de PVDF

Las membranas de PVDF poseen un carácter hidrofóbico tan elevado que las hace flotar en un volumen de agua, no siendo posible sumergirlas, condición necesaria para los posteriores tratamientos. Por este motivo se realizaron dos tratamientos independientes sumergiendo las superficies en un volumen de alcohol, de manera que, al entrar dicho alcohol en los poros y también permanecer en la superficie, aumente la hidrofiliidad de la membrana y puedan sumergirse posteriormente en agua.

Así, por un lado se las trata con MeOH/agua mQ y, por otro lado, con EtOH/agua mQ. Para realizar dichos ensayos se introdujo una pequeña porción de cada tipo de membrana, con la ayuda de una pinza, en un vaso con el alcohol respectivo, se sacó y se sumergió en un vaso con agua mQ. Se observó que aumenta la hidrofiliidad para los dos tipos de alcoholes utilizados y para los dos tipos de membrana, ya que queda sumergida como muestra la siguiente figura:



Fig. 5.23 Membrana hidrofílica

Sin embargo, el tratamiento con metanol y agua mQ afecta al aspecto de dicha membrana ya que al sacarla del vaso presenta un color amarillento y traslúcido en algunas partes, como se muestra a continuación:



Fig 5.24 Cambio de aspecto con tratamiento de metanol y agua mQ: a la izquierda se observa la membrana 2 y a la derecha la membrana 1

Se observa que si se dejan las membranas sumergidas un tiempo superior a 24h, dichas superficies empiezan a flotar; lo que refleja que, pasado este tiempo, la capa de alcohol que recubría la membrana se ha eliminado de la superficie y del interior de la membrana y la hidrofobicidad de la membrana comienza a aumentar.

5.4.1.4 Influencia de la concentración y el orden de las disoluciones en el recubrimiento

Otro parámetro a tener en cuenta es la concentración del polímero con el que se va a llevar a cabo el recubrimiento.

Para evaluar la influencia de esta condición, se prepararon disoluciones de concentración 10 mg/mL y 25 mg/mL tanto de VKV modificado con grupos azido como de VKV modificado con grupos ciclooctinilo, por lo que se utilizarán cuatro disoluciones diferentes para los distintos recubrimientos que describiremos más adelante.

Con objeto de evaluar la influencia del orden en el que se produce el recubrimiento de las capas, se llevaron a cabo recubrimientos en paralelo para las membranas de tipo 1 y de tipo 2, recubrimientos que difieren únicamente en el orden del polímero utilizado y en la concentración de dichos polímeros. Así, se prepararon 8 tipos de muestras diferentes, siguiendo el esquema experimental recogido en la siguiente tabla:

MEMBRANAS	MUESTRAS	1º BICAPA	2º BICAPA
Membrana 2 PVDF 50°C	Muestra 1	10mg/mL N ₃	10mg/mL N ₃
		10mg/mL ciclo	10mg/mL ciclo
	Muestra 2	25 mg/mL N ₃	25 mg/mL N ₃
		25 mg/mL ciclo	25 mg/mL ciclo
	Muestra 3	10mg/mL N ₃	10mg/mL N ₃
		10mg/mL ciclo	10mg/mL ciclo
	Muestra 4	25 mg/mL N ₃	25 mg/mL N ₃
		25 mg/mL ciclo	25 mg/mL ciclo
Membrana 1 PVDF 25°C	Muestra 5	10mg/mL ciclo	10mg/mL ciclo
		10mg/mL N ₃	10mg/mL N ₃
	Muestra 6	25 mg/mL ciclo	25 mg/mL ciclo
		25 mg/mL N ₃	25 mg/mL N ₃
	Muestra 7	10mg/mL ciclo	10mg/mL ciclo
		10mg/mL N ₃	10mg/mL N ₃
	Muestra 8	25 mg/mL ciclo	25 mg/mL ciclo
		25 mg/mL N ₃	25 mg/mL N ₃

Tabla 5.6 Esquema experimental del recubrimiento para evaluar la concentración del polímero y el orden de la capa de recubrimiento

5.4.2 Protocolo de recubrimiento de las membranas.

En una primera serie de experimentos, se lleva a cabo el recubrimiento de las membranas de tipo 1 y de tipo 2, por la técnica “layer by layer”, y depositando dos bicapas en cada una de ellas. Se preparan cuatro tipos de membranas, 1-4, las dos primeras de la membrana porosa tipo 1, difieren exclusivamente en la concentración de la disolución del polímero utilizado; y las dos últimas repiten este patrón para la membrana de tipo 2 en este caso. En esta primera serie de experimentos se efectúa la inmersión inicialmente en la disolución que contiene VKV modificado con grupos azido, terminando la segunda bicapa en el polímero VKV modificado con grupos ciclooctinilo.

La segunda serie de experimentos da lugar a las membranas 5-8, las dos primeras (5 y 6) por recubrimiento de la membrana de tipo 1 y las dos últimas (7 y 8) por recubrimiento de la membrana tipo 2. El protocolo utilizado es igual al de la primera serie (membranas 1-4) pero difiere en el orden en el que se adiciona la primera capa; en este caso la primera capa es de VKV modificado con grupos ciclooctinilo y la segunda bicapa termina con una capa de VKV modificado con grupos azido. Las capas, entre ellas, permanecen unidas a través de enlaces covalentes protagonizados por la reacción “Click” entre ambos grupos funcionales conducente a la formación de un heterociclo derivado de triazol.

Para realizar el recubrimiento de las membranas se tomaron 8 pinzas de punta roma, una para cada muestra, y tras preparar las disoluciones de los polímeros en la concentración buscada, se procedió a realizar el recubrimiento. Se toma la muestra con las pinzas, se sumerge en la disolución de polímero adecuada durante 5 segundos, elimina el exceso de disolución del polímero y se deja secar durante 5 minutos. Tras este tiempo, una vez formada la primera capa, se procede a sumergir en la disolución del polímero modificado con el otro grupo funcional, siguiendo el mismo procedimiento que en el caso anterior, obteniendo así la primera bicapa. Se repite este procedimiento para conseguir la segunda bicapa. El esquema experimental permanece indicado en el en la tabla 5.6 del apartado 5.4.1.4. Tras realizar las etapas necesarias para conseguir dos bicapas se dejaba secar durante 40 minutos, para asegurar la finalización de la reacción entre las capas que derive en el correcto

recubrimiento. De esta manera, también, se evita que dicha membrana quede adherida a la placa Petri en la que posteriormente sería colocada. Una vez secas y colocadas en las placas Petri se congelaron durante 48h.

5.4.2.1 Caracterización de membranas piezoeléctricas porosas recubiertas

Tras realizar estos recubrimientos se caracterizaron dichas muestras, con objeto de evaluar el recubrimiento y establecer cuáles son las condiciones óptimas de recubrimiento. Para ello, se evaluó la variación del peso de la membrana por unidad de superficie, lo que nos permite cuantificar la cantidad de polímero adherida; se realizaron espectros de infrarrojo, medidas del ángulo de contacto y se tomaron fotos al microscopio SEM. En base a estas técnicas se eligieron las condiciones de trabajo óptimas para el recubrimiento posterior de membranas.

5.4.2.1.1 Variación de peso y medida de ángulos de contacto

Un parámetro que puede cuantificar la cantidad de polímero que ha quedado adherido tras el recubrimiento, es la variación de masa de la membrana, antes y después de dicho recubrimiento. Dicha variación corresponderá a la cantidad neta de polímero que ha quedado fijada en la muestra. Así, se pesaron las muestras antes y después del recubrimiento para evaluar dicho parámetro. Los resultados se muestran en la tabla 5.7.

Por otro lado, la medida del ángulo de contacto es otro factor que se ha tenido en cuenta, ya que la variación de esta medida puede reflejar la presencia de la capa de recubrimiento, ya que se produce una variación de la hidrofobicidad de las superficies al recubrirlas; por ello, se realizaron medidas antes y después de llevar a cabo el procedimiento para evaluar dicho recubrimiento. Los datos obtenidos de las ocho muestras se recogen en la siguiente tabla:

MUESTRAS	P _o	P _f	ΔP (mg)	$\Delta P/S$ (mg/cm ²)	Ángulo de contacto (°)		
	(mg)	(mg)			Antes	Después	Variación
Muestra 1	13,30	13,59	0,29	0,51	102,56	77,15	25,41
Muestra 2	11,35	11,97	0,62	1,10	129,54	71,10	58,44
Muestra 5	14,07	14,11	0,04	0,06	95,42	68,16	27,26
Muestra 6	19,30	19,58	0,28	0,28	130,17	106,57	23,60
Muestra 3	6,67	6,75	0,08	0,19	102,85	73,00	29,85
Muestra 4	5,68	5,78	0,10	0,35	95,45	95,86	0,41
Muestra 7	18,40	18,45	0,05	0,05	105,63	92,33	13,30
Muestra 8	14,38	14,57	0,19	0,28	109,89	89,91	19,98

Tabla 5.7 Resultados de la variación de masa y medida del ángulo de contacto

A la vista de los datos obtenidos, se observa que sí que ha habido recubrimiento polimérico de todas las muestras, ya que se aprecia variación en los dos parámetros evaluados en dicha tabla.

Destaca la muestra 2, la cual posee un aumento de masa de 1,10 mg/cm², lo que refleja que el recubrimiento en dicha membrana ha sido mayor, es decir, la cantidad de polímero neta adherida es la más elevada. Por otro lado, analizando la medida del ángulo de contacto, también se observa que dicha muestra 2 presenta la variación más acusada, es decir, en esta muestra se ha producido el mayor cambio de hidrofobicidad de todas las membranas. Por tanto, se puede concluir que, teniendo en cuenta estos dos parámetros, la mejor opción de recubrimiento es la que se ha llevado a cabo en la muestra 2, es decir, utilizando como primera capa el polímero modificado con grupos azido y en una concentración de 25 mg/mL.

5.4.2.1.2 Espectros de infrarrojo

Otra técnica que se puede utilizar para determinar si se ha producido el recubrimiento es la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, técnica cualitativa con la que se podrá detectar si se ha producido recubrimiento debido a que recoge información de los grupos funcionales presentes en la superficie de la membrana.

La presencia de señales características de los polímeros modificados utilizados en el espectro de IR de las membranas recubiertas, que no estaban presentes en la membrana de partida, nos asegura que dichas membranas están recubiertas de polímero. Así, se realizaron los espectros de la membrana sin recubrir y de las membranas con los distintos recubrimientos llevados a cabo, obteniéndose los siguientes espectros:

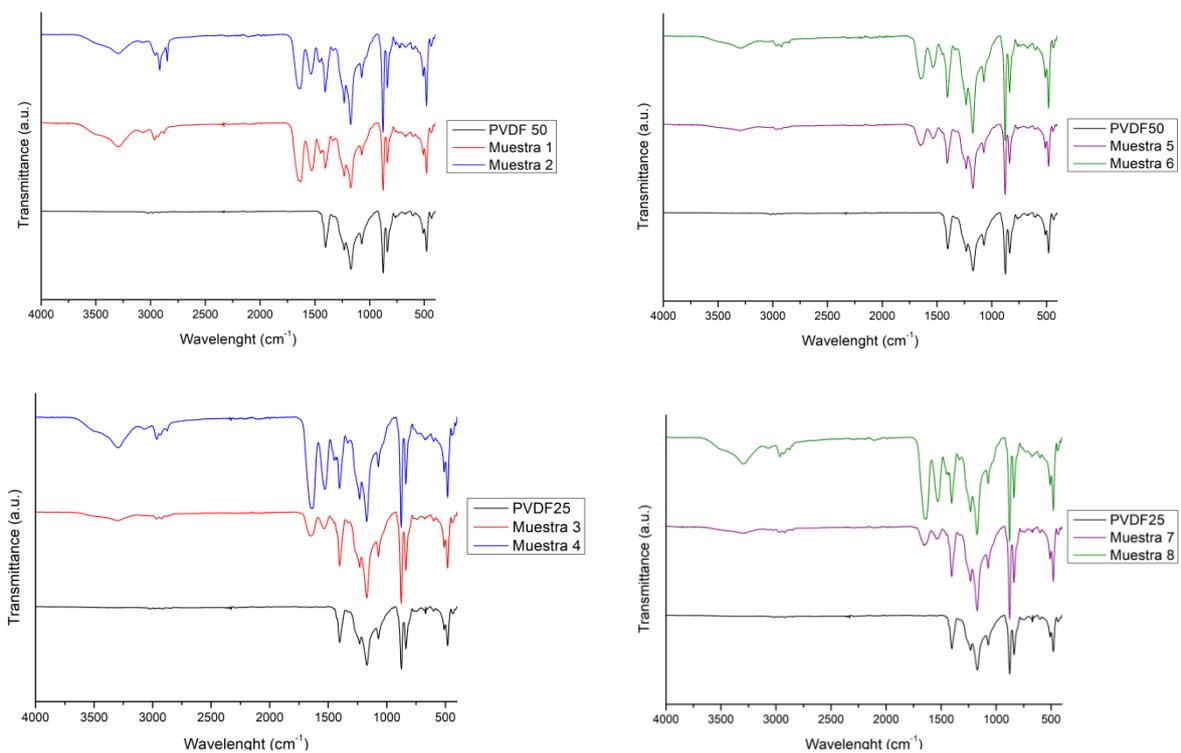


Fig.5.25 Espectros de IR de las distintas muestras de recubrimiento.

A la vista de estos espectros se observa que se ha producido el recubrimiento ya que aparecen señales nuevas respecto a la membrana sin recubrir que pertenecen a grupos funcionales característicos de los polímeros proteicos utilizados para dicho recubrimiento, como los grupos amido a 1800 y 1750 cm^{-1} , o los grupos N-H de la señal ancha por encima de 3000 cm^{-1} . Cabe destacar que las muestras 1, 2, 4 y 8 son las que presentan señales de mayor intensidad para el polímero, por lo que los recubrimientos de dichas muestras fueron los más favorables.

5.4.2.1.3 Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Estas membranas también fueron caracterizadas por microscopía electrónica SEM, tomando imágenes tanto de la cara porosa, cara de interés, como de la sección transversal. Las imágenes tomadas de la superficie porosa permiten evaluar el recubrimiento polimérico ya que se puede observar en la fotografía tomada si las capas de polímero han quedado ancladas a la membrana.

Por otro lado, las imágenes obtenidas de la sección transversal, realizando un corte a la membrana, permiten evaluar el alcance de dicho recubrimiento en profundidad. Así las imágenes más representativas de dicho recubrimiento se muestran a continuación:

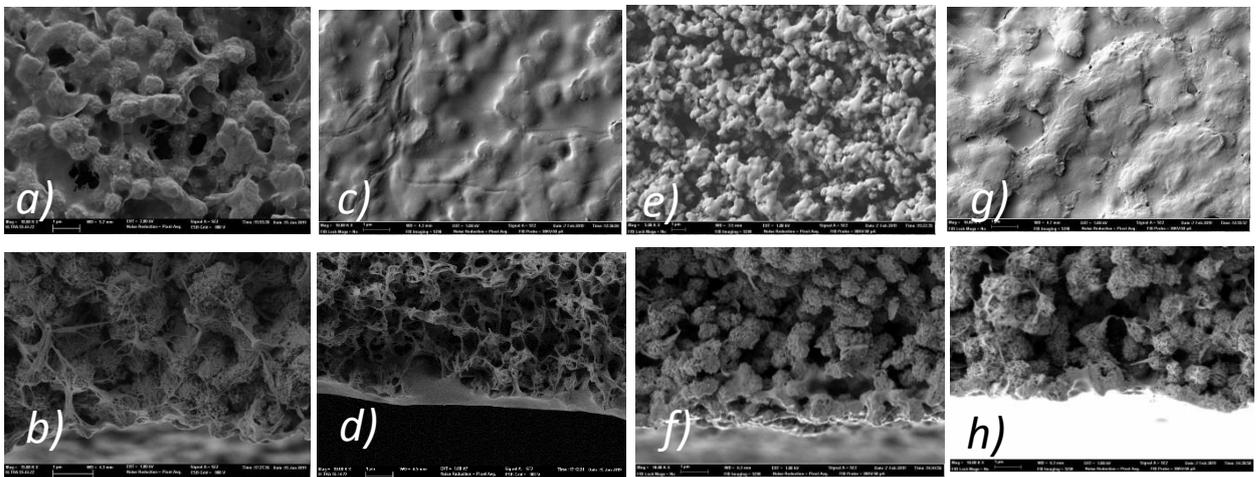


Fig 5.26 a) y b) Poro y sección de la muestra 1; c) y d) Poro y sección de la muestra 2; e) y f) Poro y sección de la muestra 5; g) y h) Poro y sección de la muestra 6

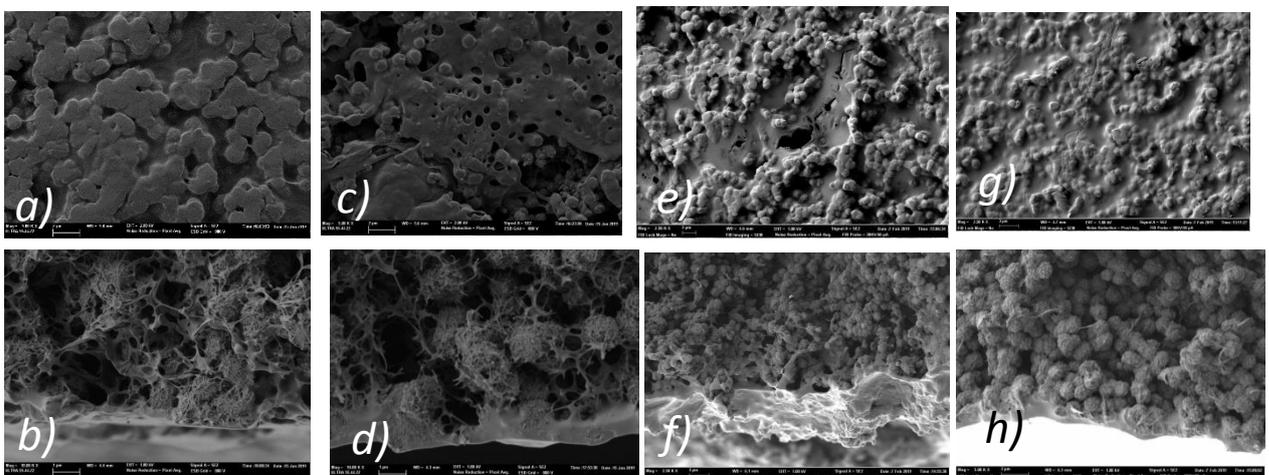


Fig 5.27 a) y b) Poro y sección de la muestra 3; c) y d) Poro y sección de la muestra 4; e) y f) Poro y sección de la muestra 7; g) y h) Poro y sección de la muestra 8

A la vista de las imágenes de SEM se puede observar que la capa polimérica de recubrimiento de mayor espesor corresponde a la membrana 2, como ya lo anunciaba la variación de masa de dicha muestra. En cuanto a la membrana 1 también se observa el recubrimiento en todas las fotografías tomadas, destacando que las imágenes muestran que dicha membrana 1 es mucho más porosa que la membrana 2.

5.4.3 Recubrimiento de membranas porosas piezoeléctricas en condiciones óptimas

Basándonos en los resultados obtenidos del recubrimiento en las membranas utilizadas en el apartado anterior, y en todas las técnicas de caracterización utilizadas, se llegaron a establecer una serie de condiciones como óptimas. Además, se buscó el consenso con el grupo de investigación con el que se está trabajando en este proyecto para establecer las condiciones en las que se va a realizar el recubrimiento de un nuevo lote de membranas porosas piezoeléctricas. En este caso el ELR que se va a utilizar es RGD modificado con grupos azido, RGD-N₃, y modificado con grupos ciclooctino, RGD-ciclo. Este polímero presenta un dominio de adhesión celular, RGD, en su secuencia aminoacídica. No es necesario optimizar el método para este nuevo polímero por su similitud de comportamiento con el anterior, y se llevará a cabo el recubrimiento de las membranas de manera análoga que para el recubrimiento realizado con el polímero VKV. Las condiciones de recubrimiento elegidas fueron las que se utilizaron en la muestra 2 del primer recubrimiento. Así, se utilizaría una concentración de polímero modificado de 25 mg/mL, un recubrimiento de dos bicapas y en el orden: N₃-ciclo. Se hizo necesaria la realización de una nueva optimización del tiempo del tratamiento al plasma debido a que las membranas tratadas, recibidas en el segundo lote, presentaban un menor espesor y resultaban frágiles una vez tratadas con plasma de Argón durante 20 minutos.

Cabe destacar que con este recubrimiento se recubrieron gran cantidad de membranas (25) ya que dichas superficies se utilizarían para llevar a cabo experimentos celulares encaminados a evaluar su citotoxicidad y viabilidad celular.

5.4.3.1. Nueva optimización del tiempo del tratamiento con plasma de Argón.

En este segundo lote de membranas, se recibieron 3 muestras de membranas sintetizadas en etanol, mucho más finas y sensibles a la manipulación. En este caso se cortaron superficies cuadradas de las membranas llamadas 2 y 3, de 1cm² de superficie, 1cm x 1 cm, con la ayuda de la cuchilla del microtomo y una regla. En este caso, se marcaron las Rs con un alfiler y en una esquina, para evitar su aplastamiento, y sabiendo que, posteriormente, se recortarán con un sacabocados de 8 mm de diámetro, para que quepan en la placa de cultivo celular de 96 pocillos.

Tras obtener las muestras, se colocaron con la R invertida en la cámara del plasma y se sometió a las mismas condiciones de caudal y presión que en la anterior optimización (20mL/min, 600mTorr), y se mantuvo el tratamiento con plasma de Argón durante 20 minutos.

Tras este tiempo, al sacar las muestras de la cámara del plasma, no se apreció cambio de aspecto pero, al realizar el recubrimiento, se fracturaron y perdieron la consistencia física. Tras comprobar que el tiempo del tratamiento con plasma de 20 minutos había sido muy elevado, y dañaba la integridad de las membranas, se realizó otro ensayo de 1 minuto de tratamiento con plasma de Argón en las mismas condiciones de presión y flujo de Argón. En este nuevo tratamiento, se comprueba que 1 minuto de plasma de Argón era suficiente para la activación de la cara porosa de dichas membranas, ya que tras este tratamiento, al sumergirlas en un vaso con agua mQ, la cara marcada con la R (cara no porosa) sale completamente seca, mientras que la otra cara (porosa) sí que se humedece y refleja el aumento de hidrofiliidad, lo que es un hecho muy favorable para llevar a cabo el recubrimiento buscado.

5.4.4 Recubrimiento de las membranas porosas del segundo lote

Una vez elegidas todas las condiciones de reacción óptimas, se procede a cortar 25 muestras de las membranas recibidas en el segundo lote con cuchilla de micrótopo, y se marcaron con el número de la muestra de membrana a la que correspondían.

A continuación, se las sometió a tratamiento de plasma de Argón durante 1 minuto con las mismas condiciones de flujo y presión que las utilizadas en esta última optimización, para la activación de la superficie porosa.

De forma independiente se prepararon las disoluciones del polímero RGD modificado a una concentración de 25 mg/mL. En este caso las disoluciones se prepararon en tubos falcon azules de 50 ml, pero se utilizaron tubos eppendorf de 5mL para realizar la inmersión de las membranas. Se utilizó la disolución del polímero depositada en el tubo eppendorf para cada serie de 4 muestras, excepto en la última serie que incluía a 5 muestras, ya que la 25 se tomaría de control para realizar los ensayos de caracterización. De esta forma, se utilizaron 6 eppendorfs para llevar a cabo el recubrimiento de las 25 muestras.

Así, una vez activadas las superficies y preparadas previamente las disoluciones de los polímeros, se colocaron 5mL de cada disolución en el tubo eppendorf correspondiente; se fijaron las muestras a las pinzas utilizadas en el recubrimiento y se procedieron a realizar las sumersiones sucesivas alternadas (N₃-ciclo) en las disoluciones adecuadas espaciadas 5 minutos hasta obtener las dos bicapas buscadas. Una vez acabado el recubrimiento se dejaron secar 40 minutos y, tras este tiempo, se colocaron en placas Petri, se taparon con parafilm, se metieron a congelar durante 24h y finalmente se liofilizaron.

5.4.4.1 Caracterización de membranas piezoeléctricas porosas recubiertas de biopolímero RGD.

Tras realizar los recubrimientos se caracterizaron dichas muestras utilizando las mismas técnicas que las utilizadas en el anterior recubrimiento. Los resultados obtenidos de las medidas de los ángulos de contacto y de la determinación de la variación de masa de las membranas, antes y después del recubrimiento, se recogen en las siguientes tablas.

MUESTRAS Membrana 2	P _o (mg)	P _f (mg)	ΔP/S (mg/cm ²)	MUESTRAS Membrana 1	P _o (mg)	P _f (mg)	ΔP/S (mg/cm ²)
1	10,62	10,77	0,15	13	17,55	17,84	0,29
2	11,66	12,02	0,36	14	13,07	13,29	0,22
3	12,93	13,18	0,25	15	19,65	19,95	0,30
4	12,24	12,50	0,26	16	15,54	15,86	0,32
5	12,36	12,48	0,12	17	11,67	11,84	0,17
6	14,28	14,66	0,38	18	12,32	12,75	0,43
7	11,15	11,36	0,21	19	12,05	12,42	0,37
8	11,84	12,05	0,21	20	12,54	12,74	0,20
9	11,56	11,74	0,18	21	13,34	13,79	0,45
10	10,62	10,85	0,23	22	16,93	17,11	0,18
11	9,35	9,62	0,27	23	13,63	13,80	0,17
12	11,31	11,52	0,21	24	14,31	14,62	0,31
				25	12,10	12,58	0,48

Tabla 5.8. Resultados de la variación de masa obtenidos en el recubrimiento del segundo lote

MEDIDA ÁNGULO DE CONTACTO			
MUESTRA 2		MUESTRA 4	
<i>Cara de la R</i>	<i>Cara porosa</i>	<i>Cara de la R</i>	<i>Cara porosa</i>
113,2	79,5	96,6	84,5
115,3	81,0	99,3	84,2
117,2	82,0	96,7	86,8
114,6	78,2	98,4	85,3
118,4	80,3	97,5	84,4
MUESTRA 17		MUESTRA 24	
<i>Cara de la R</i>	<i>Cara porosa</i>	<i>Cara de la R</i>	<i>Cara porosa</i>
104,5	71,7	106,6	93,2
103,8	73,2	107,3	92,9
105,2	70,9	106,8	90,4
101,6	71,6	106,4	94,1
104,9	72,4	107,1	92,8

Tabla 5.9 Medidas del ángulo de contacto en ambas caras para evaluar el recubrimiento en función de la porosidad

De dichos resultados se puede extraer que el aumento de peso ha sido mucho más notable y acusado en este segundo lote de membranas; lo que refleja que, cuantitativamente, se ha fijado una mayor cantidad de polímero a la membrana.

Respecto al ángulo de contacto, tras el recubrimiento se realizaron medidas en ambas caras de las distintas muestras, con objeto de evaluar la variación de dicho parámetro en cada una de las caras de las membranas y, por tanto, verificar el recubrimiento. De los resultados obtenidos se extrae que el recubrimiento ha sido efectivo ya que la medida del ángulo de contacto obtenido en ambas caras ha disminuido con respecto a la medida del ángulo de contacto de la membrana sin recubrir. Por último, destacar que los valores del ángulo correspondientes a la cara porosa son notablemente menores que los de la cara marcada, siendo en ambos casos inferiores tras el recubrimiento.

Por otro lado, se realizó un espectro de infrarrojo de la membrana 1 sin recubrir y tras el recubrimiento, para determinar cualitativamente si se había producido o no el recubrimiento. Como se observa en el siguiente espectro (Figura 5.28), comprobamos que sí se ha producido el recubrimiento polimérico ya que aparecen nuevas señales no presentes en el espectro de la membrana sin recubrir y que coinciden con las señales de los grupos amido (1800cm^{-1}) y amino (3200cm^{-1}) presentes en los biopolímeros tipo elastina tipo RGD.

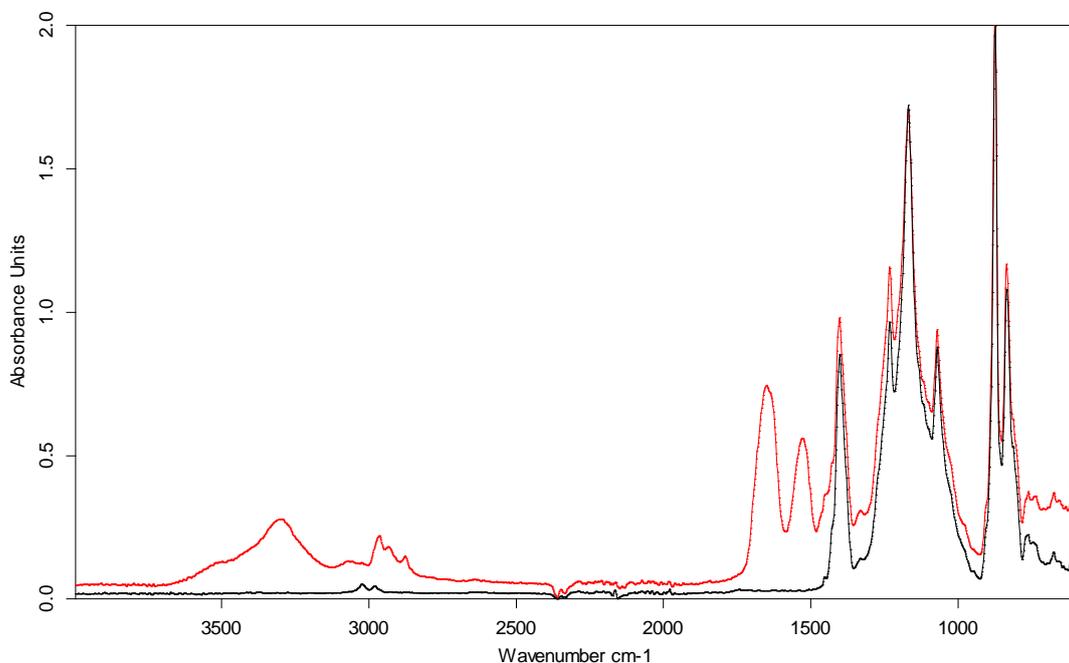


Fig 5.28 Espectros de IR de la membrana 1 sin recubrir (negro) y con recubrimiento (rojo)

Finalmente, se caracterizaron las distintas muestras tras el recubrimiento mediante microscopía electrónica de barrido SEM, pudiendo observar en las imágenes de la cara porosa, la uniformidad del recubrimiento y, por otro lado, en las imágenes de la sección transversal para evaluar la profundidad o alcance de dicho recubrimiento. Las imágenes más representativas de este recubrimiento se muestran a continuación:

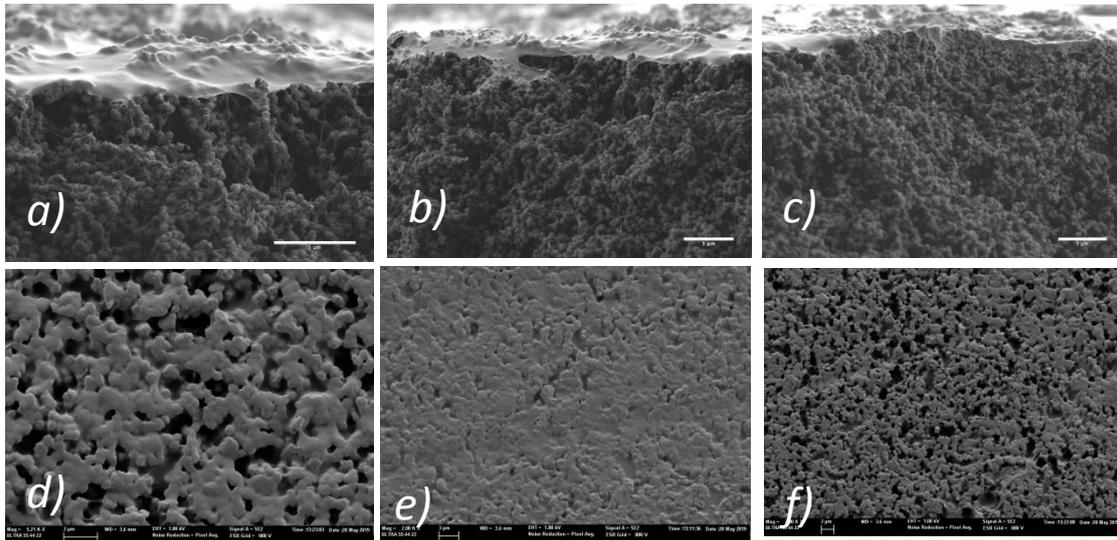


Fig5.29 Imágenes del SEM a)b)c) de la sección transversal; d)e)f) de la superficie porosa

6. CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo la biofuncionalización de superficies para aplicación en el área de la Biomedicina. Se ha obtenido el escalado de superficies para recolección celular y se han preparado membranas piezoeléctricas recubiertas de ELRs para aplicación en Ingeniería de Tejidos.

1. Se han bioproducido y purificado de manera exitosa los ELRs necesarios para su utilización en los diferentes recubrimientos poliméricos de superficies.
2. Se han modificado químicamente recombinaómeros tipo elastina de manera que se han introducido grupos azido y cicloctinilo.
3. La caracterización de los recombinaómeros tipo elastina bioproducidos y modificados químicamente se ha realizado utilizando las técnicas de caracterización: FTIR, RMN y MALDI-ToF.
4. Se ha escalado el método de biofuncionalización de superficies de vidrio previamente descrito, para su aplicación en cubres de vidrio de 30mm de diámetro.
5. Se han biofuncionalizado 40 superficies de vidrio utilizando la tecnología del silanol y logrando la unión covalente de recombinaómeros tipo elastina a dichas superficies utilizando la metodología "Click".
6. Se ha llevado a cabo el recubrimiento polimérico utilizando el método LbL de dos lotes de membranas porosas piezoléctricas de PVDF.
7. Se han determinado las condiciones óptimas de recubrimiento como: una concentración de RGD modificado con grupos azido y cicloctinilo de 25mg/mL y dos bicapas N₃-ciclo.
8. En ambos recubrimientos se caracterizaron las membranas mediante SEM, ángulo de contacto e infrarrojo, pudiendo evaluar mediante estas técnicas el recubrimiento polimérico.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ratner, B.D. and S.J. Bryant, *Biomaterials: where we have been and where we are going*. Annu Rev Biomed Eng, 2004. 6: p. 41-75.
- [2] Peppas, N.A. and R. Langer, *New Challenges in Biomaterials*. Science, 1994. 263(5154): p. 1715-1720.
- [3] Hancock, T. and C. Goodyear, *A Centennial volume of the writings of Charles Goodyear and Thomas Hancock*. 1939, [Boston, Mass.: Centennial Committee] American Chemical Society. 1 v. (various pagings).
- [4] Hufnagel, C.A., *Permanent intubation of the thoracic aorta*. Archives of Surgery, 1947. 54(4): p. 382-389
- [5] Langer, R. and D.A. Tirrell, *Designing materials for biology and medicine*. Nature, 2004. 428(6982): p. 487-92.
- [6] Helmus, M.N., D.F. Gibbons, and D. Cebon, *Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices*. Toxicol Pathol, 2008. 36(1): p. 70-80.
- [7] Park, J., Lakes, R. S., *Biomaterials: An introduction*. Springer, 2007..
- [8] Sarikaya, M., et al., *Molecular biomimetics: nanotechnology through biology*. Nature Materials, 2003. 2(9): p. 577-585.
- [9] Ribeiro, A., et al., *Influence of the amino-acid sequence on the inverse temperature transition of elastin-like polymers*. Biophys J, 2009. 97(1): p. 312-20.
- [10] Costa, R.R., et al., *Stimuli-Responsive Thin Coatings Using Elastin-Like Polymers for Biomedical Applications*. Advanced Functional Materials, 2009. 19(20): p. 3210-3218.
- [11] García-Arévalo, C., Pierna Alvarez, Maria, Girotti, Alessandra, Arias Vallejo, F. Javier, Rodríguez-Cabello, J.C., *A Comparative Study of Cell Behavior on Energetic and Bioactive Different Polymeric Surfaces Made from Elastin-Like Recombinamers*; Soft Matter; 2012. 8(11): p. 3239 – 3249
- [12] Martín, L., et al., *Temperature-Triggered Self-Assembly of Elastin-Like Block Co-Recombinamers: The Controlled Formation of Micelles and Vesicles in an Aqueous Medium*. Biomacromolecules, 2012. 13(2): p. 293-298.
- [13] Dreher, M.R., et al., *Temperature triggered self-assembly of polypeptides into multivalent spherical micelles*. J Am Chem Soc, 2008. 130(2): p. 687-94.
- [14] Andrew MacKay, J., et al., *Self-assembling chimeric polypeptide-doxorubicin conjugate nanoparticles that abolish tumours after a single injection*. Nat Mater, 2009. 8(12): p. 993-999.
- [15] Martin, L., et al., *3D microstructuring of smart bioactive hydrogels based on recombinant elastin-like polymers*. Soft Matter, 2009. 5(8): p. 1591-1593.

- [16] Rodgers, U.R. and A.S. Weiss, *Cellular interactions with elastin*. Pathologie Biologie, 2005. 53(7): p. 390-398.
- [17] Miao, M., et al., *Sequence and structure determinants for the self-aggregation of recombinant polypeptides modeled after human elastin*. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(49): p. 48553-48562.
- [18] Alonso M, Arias FJ, Martín L, Rodríguez-Cabello JC, Testera AM. "Recombinamers" as advanced materials for the post-oil age. Polymer 2009; 50:5159-5169.
- [19] Urry DW. *What sustains life? Consilient mechanisms for protein-based machines and materials*. Springer-Verlag, 2006.
- [20] Gowda DC, Parker TM, Reid MC, Urry DW. *Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(GVGVP) and Its Gamma-Irradiation CrossLinked Matrix - Summary of Generic Biological Test-Results*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 1991; 6:263-282.
- [21] Betre H, Chilkoti A, Liu W, Zalutsky MR et al. *A thermally responsive biopolymer for intra articular drug delivery*. Journal of Controlled Release 2006; 115:175-182.
- [22] Mithieux SM, Rasko JE, Weiss AS. *Synthetic elastin hydrogels derived from massive elastic assemblies of self-organized human protein monomers*. Biomaterials 2004; 25:4921-4927.
- [23] Balderrama F, Cui W, Martinez AW, Sallach RE et al. *Long-term biostability of self assembling protein polymers in the absence of covalent crosslinking*. Biomaterials 2010; 31:779-791.
- [24] Bellingham CM, Keeley FW, Woodhouse KA. *Elastin as a self-organizing biomaterial: use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 2002; 357:185-189.
- [25] Prasad KU, Trapane TL, Urry DW. *Phasestructure transitions of the elastin polypentapeptide-water system within the framework of composition-temperature studies*. Biopolymers 1985; 24:2345-2356.
- [26] Reguera J. *Estudio de la transición inversa con la temperatura en polímeros tipo elastina con creciente funcionalidad*. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid 2008.
- [27] Li B, Alonso DO, Daggett V. *The molecular basis for the inverse temperatura transition of elastin*. Journal of molecular biology 2001; 305(3):581 – 592.
- [28] Díaz D, Hawker CJ, Finn MG, Fokin VV, Sharples KB. *Cicloadición 1,3 -dipolar de azidas y alquinos. I: Principales aspectos sintéticos*. An.Quím. 2008; 104:173-180.

- [29] Huisgen, R. *1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future*. Angew Chem 1963; 2:565-598.
- [30] Christensen C, Meldal MJ, Tornøe CW. *Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides*. J. Org. Chem 2002; 67:3057–3064.
- [31] Bertozzi CRJ, Gard NJ, Prescher JA.; *A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems*. J. Am. Chem. Soc 2004; 126:15046–15047.
- [32] Michelle Grandin, H. and M. Textor, *Intelligent Surfaces in Biotechnology: Scientific and Engineering Concepts, Enabling Technologies, and Translation to Bio-Oriented Applications*. Wiley. 2012.
- [33] Edahiro, J., et al., *In situ control of cell adhesion using photoresponsive culture surface*. Biomacromolecules, 2005. 6(2): p. 970-4.
- [34] Wang, J., M. Jiang, and B. Mukherjee, *On-demand electrochemical release of DNA from gold surfaces*. Bioelectrochemistry, 2000. 52(1): p. 111-114.
- [35] Zhu, X., et al., *Tuning the interfacial properties of grafted chains with a pH switch*. Langmuir, 2004. 20(4): p. 1459-65.
- [36] Hyun, J., et al., *Capture and release of proteins on the nanoscale by stimuli-responsive elastin-like polypeptide "switches"*. Journal of the American Chemical Society, 2004. 126(23): p. 7330-7335.
- [37] Panayiotou, M. and R. Freitag, *Influence of the synthesis conditions and ionic additives on the swelling behaviour of thermo-responsive polyalkylacrylamide hydrogels*. Polymer, 2005. 46(18): p. 6777-6785.
- [38] Cole, M.A., et al., *Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein-surface and cell-surface interactions*. Biomaterials, 2009. 30(9): p. 1827-50.
- [39] Canavan, H.E., et al., *Cell sheet detachment affects the extracellular matrix: A surface science study comparing thermal liftoff, enzymatic, and mechanical methods*. J. Biomed. Mater. Res. Part A, 2005. 75A(1): p. 1-13.
- [40] Pierna, M., et al., *Efficient cell and cell-sheet harvesting based on smart surfaces coated with a multifunctional and self-organizing Elastin-Like Recombinamer*. Biomacromolecules, 2013.
- [41] Kumar, S. and D. Yang, *Optical implementation of orthogonal frequency-division multiplexing using time lenses*. Optics Letters, 2008. 33(17): p. 2002-2004.
- [42] Pimentel, G.C., *Infrared spectroscopy: A chemist's tool*. Journal of Chemical Education, 1960. 37(12): p. 651.
- [43] Keeler, J., *Understanding NMR Spectroscopy*. 2013.
- [44] *Background and Theory Page of Nuclear Magnetic Resonance Facility*. Mark Wainwright Analytical Centre. University of Southern Wales Sydney., 2011.

- [45] Laiko, V.V., M.A. Baldwin, and A.L. Burlingame, *Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2000. 72(4): p. 652-657.
- [46] Knochenmuss, R., *Ion formation mechanisms in UV-MALDI*. Analyst, 2006. 131(9): p. 966-86.
- [47] Zenobi, R. and R. Knochenmuss, *Ion formation in MALDI mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 1998. 17(5): p. 337-366.
- [48] Lattova, E., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization on-target method for the investigation of oligosaccharides and glycosylation sites in glycopeptides and glycoproteins*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007. 21(10): p. 1644-50.
- [49] Tanaka, K., et al., *Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1988. 2(8): p. 151-153.
- [50] Goldstein, J., Newbury, D.E., Joy, D.C., Lyman, C.E., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L., Michael, J.R., *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, ed. 3. 2003: Springer US.
- [51] Reimer, L., *Scanning Electron Microscopy. Physics of Image Formation and Microanalysis*, ed. 2. 1998: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [52] Egerton, R., *Physical Principles of Electron Microscopy. An Introduction to TEM, SEM, and AEM*, ed. 1. 2005: Springer US.
- [53] Langer, N. and G. Maier, *DataPhysics: Products for surface chemistry*. DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, 2007.
- [54] Maizel JV, Shapiro AL, Viñuela E. *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. Biochem Biophys Res Commun. 1967; 28:815-820

8.ANEXOS

8.1 ANEXO 1: Espectros de las modificaciones químicas de los recombinámeros de tipo elastina

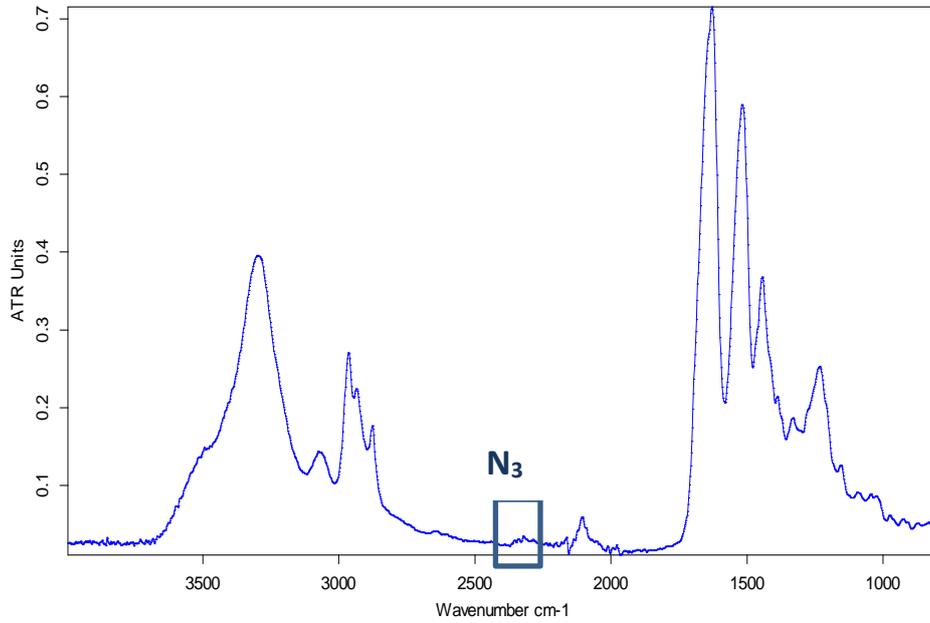


Fig. 8.1 Espectro FT-IR del polímero RGD-N₃

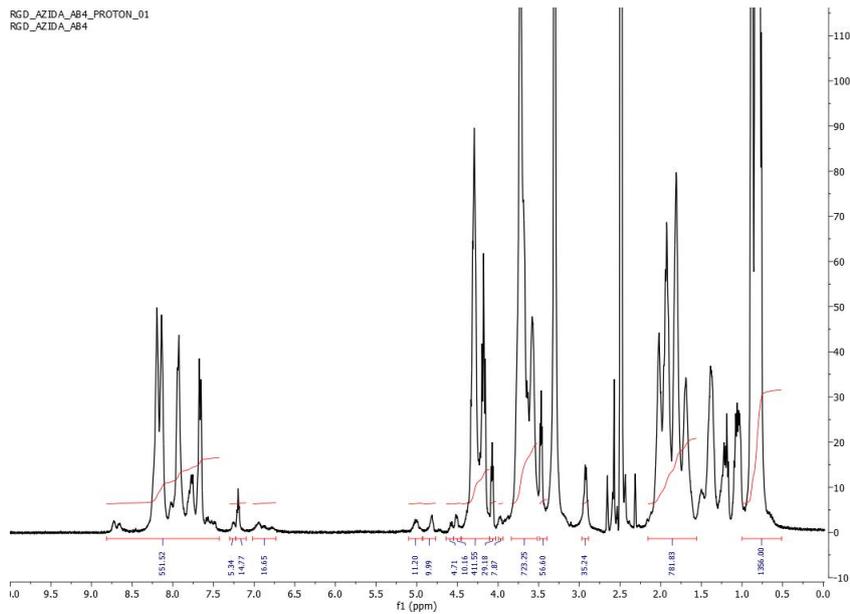


Fig 8.2 Espectro de H-RMN del polímero RGD-N₃

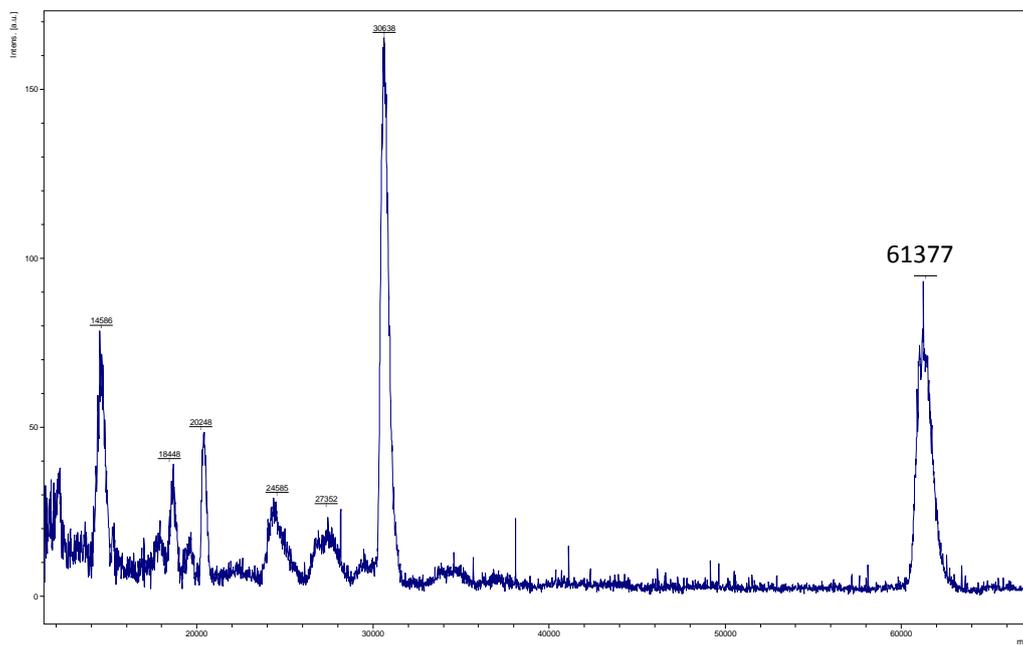


Fig.8.3 Espectro de masas del polímero RGD-N₃

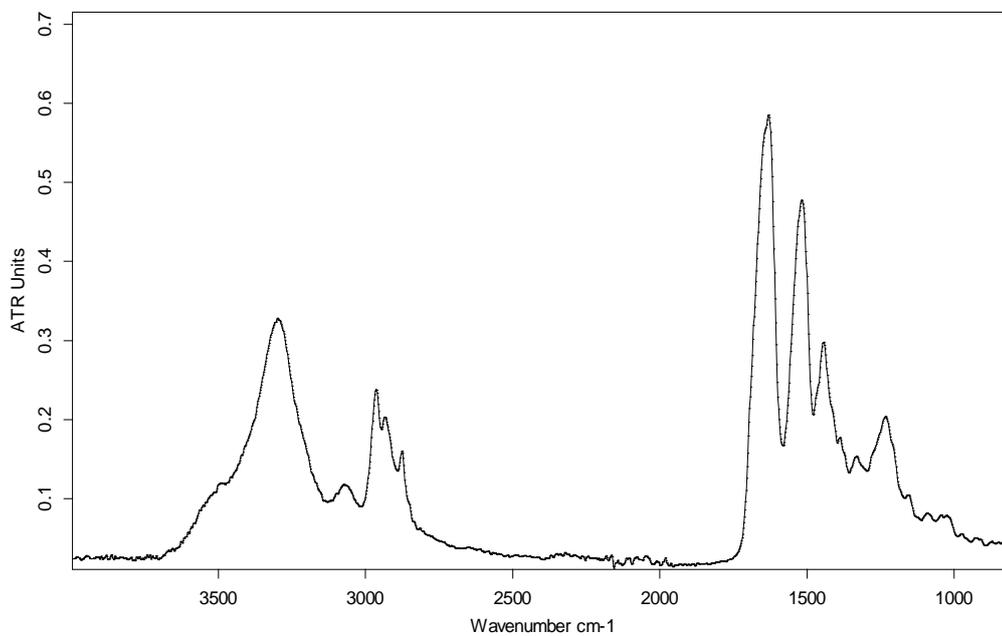


Fig 8.4 Espectro de infrarrojo del polímero RGD-ciclo

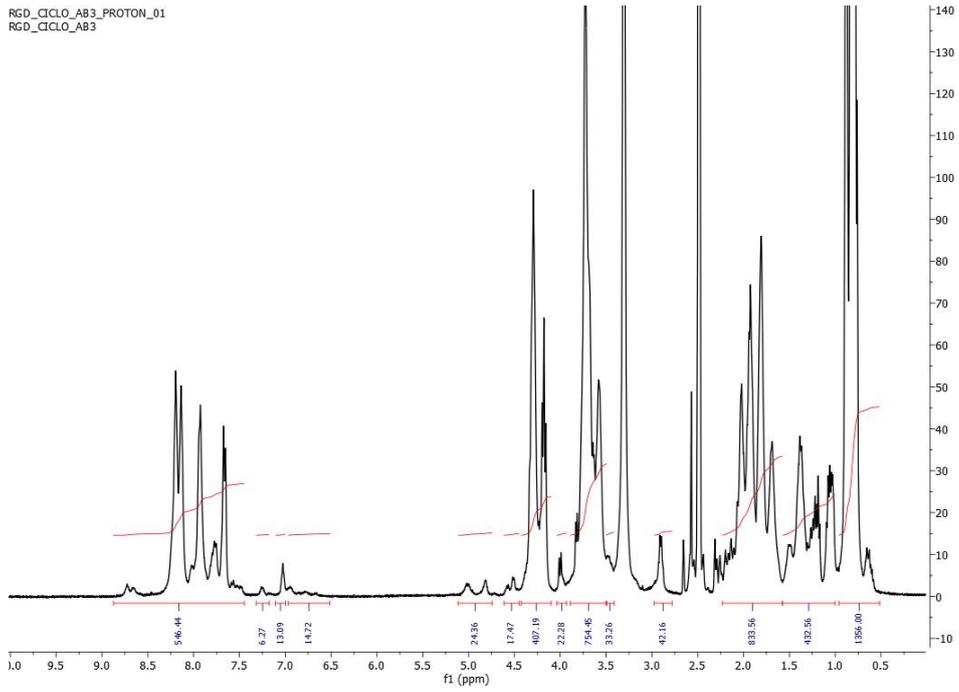


Fig 8.5 Espectro de RMN del polímero RGD-ciclo

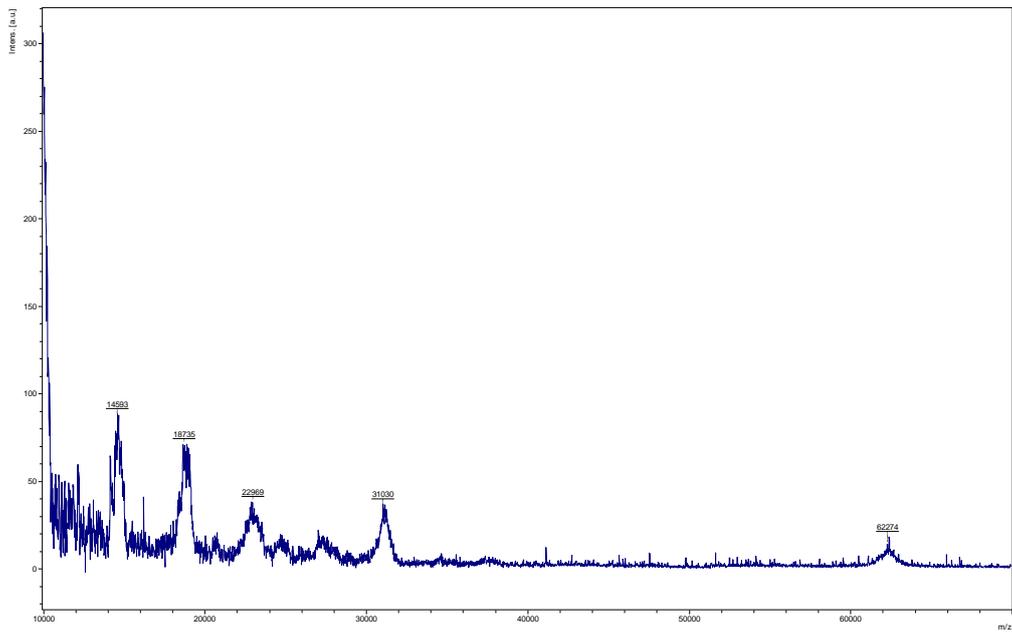


Fig 8.6 Espectro de masas del polímero RGD-ciclo

