



Universidad de Valladolid

Trabajo de fin de grado

Grado en Física

Curso 2018/2019

Determinación de tamaños de nanopartículas y su distribución mediante técnicas de dispersión dinámica de luz en micelas autoensambladas de recombinaómeros tipo elastina (ELRs)

Autor: Gonzalo López Caubilla

Tutor: José Carlos Rodríguez Cabello

Cotutor: Sergio Acosta Rodríguez

Índice

0. Abstract	pág 3
1. Resumen	pág 3
2. Introducción	pág 3
3. Materiales y métodos	pág 5
3.1 ELR y péptido	pág 5
3.2 Caracterización de material	pág 7
3.2.1 MALDI-TOF	pág 7
3.2.2 SDS-PAGE	pág 7
3.3 Nanoestructuración	pág 8
3.3.1 Preparación general de las muestras ..	pág 8
3.3.2 DLS	pág 9
3.3.3 TEM	pág 14
3.3.4 Potencial zeta	pág 17
4. Resultados	pág 21
4.1 MALDI-TOF	pág 21
4.2 SDS-PAGE	pág 23
4.3 DLS	pág 24
4.4 TEM	pág 28
4.5 Potencial zeta	pág 28
5. Discusión de los resultados	pág 29
6. Conclusión	pág 30

0. Abstract

Nanoscience and nanotechnology have been allowed development of advanced techniques in nanometric scale for their use in a lot of fields, specially in biomedicine. Specially, one of this problems are highly-antibiotic resistant bacteria.

This is why, on the last years, has been developed a lot of tools for fight them, specially, the antimicrobial peptyde (AMP) GL13K. These peptydes, coupled to an special polipeptyde, ELRs, with great self-assembly capacity; can give very useful structures for fight these new menaces. Although, for their characterization, is necessary use several techniques, like dynamic light scattering-based, like DLS and zeta potential mesasure.

In this project, will analyze viability of these formations, for their use in future nanodrugs, characterizing with these techniques.

1. Resumen

La nanociencia y la nanotecnología han permitido el desarrollo de dispositivos avanzados en escala nanométrica para su aplicación en una amplia variedad de campos, en que cabe destacar el de la biomedicina. En especial, uno de estos problemas es la de amenazas bacterianas altamente resistentes los antibióticos.

Por ello, en los últimos años se están desarrollando multitud de herramientas para combatirlos, en especial, los péptidos antimicrobianos (AMP) GL13K. Estos péptidos, acoplados a un tipo especial de polipéptido, los ELRs, con gran capacidad de autoensamblaje, pueden darnos estructuras muy útiles en la lucha contra estas nuevas amenazas. Aunque para su caracterización y control, es necesaria utilizar diversas técnicas especiales, como las basadas en la dispersión dinámica de luz, como son DLS, y la medida del potencial zeta.

En este proyecto se analizará la viabilidad de estas formaciones para su uso en futuros nanofármacos, caracterizándolas mediante dichas técnicas.

2. Introducción

La biomedicina es uno de los campos científicos clave donde la nanotecnología proporciona avances de vital importancia que han generado una revolución a nivel de aplicaciones clínicas a través de nuevos materiales nanoestructurados para aplicaciones terapéuticas y diagnósticas ¹. Entre ellos cabe destacar la creación y manipulación de nanoportadores o nanocarriers, la regeneración de tejidos ² o para combatir infecciones antimicrobianas ³. En este sentido, es primordial el desarrollo de nuevos materiales con alta actividad antimicrobiana, para combatir cepas resistentes a antibióticos actuales.

La caracterización física de estos nuevos materiales es fundamental para su mejora y fabricación.

En este sentido, la caracterización de nanoestructuras en solución mediante técnicas de dispersión dinámica de luz, permite la valoración del tamaño y estabilidad de las nanopartículas en solución, debido a que son capaces de darnos información sobre nanopartículas en suspensión en constante movimiento y cambio, cualidad que caracteriza a muchos de estos nuevos nanomateriales ⁴.

En especial, en este trabajo utilizaremos DLS para medir el tamaño y monodispersidad, y medida del potencial zeta para conocer la carga superficial, que suele estar relacionado con la estabilidad.

El DLS, la principal herramienta de este trabajo, es una técnica que permite conocer el tamaño de nanopartículas en una solución en constante movimiento, midiendo la dispersión de un láser difractado por ellas. Esta técnica nos permite medir tamaños del orden de los nanómetros, y comparando distintas señales a lo largo del tiempo otras muchas características, como la monodispersidad y estabilidad ⁵.

La medida del potencial zeta ⁶, utiliza una técnica parecida a la del DLS, por eso la englobamos dentro de las técnicas de dispersión dinámica. En este caso, se mide el movimiento electroforético (movimiento de las partículas cargadas) de las partículas en solución a las que se les ha sometido una diferencia de potencial, para conocer la carga superficial de las estructuras, y junto a los datos de DLS poder deducir la estabilidad en suspensión.

En este trabajo, el objetivo es caracterizar sistemas autoensamblables con capacidad antimicrobiana, basándonos en recombinámeros del tipo elastina (ELRs, de sus siglas en inglés) y péptidos antimicrobianos (AMPs).

Estos ELRs son polímeros recombinantes basados en la secuenciación de la elastina VPGXG (X es un aminoácido, excepto la L-prolina) ⁷, caracterizados por presentar un comportamiento de cambio de fase sensible a la temperatura, lo que le confiere la capacidad de autoensamblarse a escala nano.⁸

Esta propiedad les convierte en candidatos potenciales para su uso como *nanocarrriers* biocompatibles para la dosificación de fármacos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer ⁹ o nanovacunas ¹⁰.

El ELR que caracterizaremos en este trabajo es un ELR anfifílico basado en un diseño dibloque con la capacidad de autoensamblarse en nanopartículas esféricas en condiciones fisiológicas (37°C)¹¹. Este ELR será modificado con un péptido antimicrobiano (AMP). Trabajaremos con el enantiómero D del péptido GL13K, del cuál ya se ha estudiado su capacidad antimicrobiana, la cuál aumenta con su capacidad de ensamblación ⁴.

Mediante DLS y cuantificación del potencial zeta, estudiaremos la capacidad de nuestro ELR-AMP para formar nanoestructuras en disolución en condiciones fisiológicas para el desarrollo de futuros nanofármacos basados en AMP y ELR con capacidad bactericida frente a nuevas amenazas.

3. Materiales y métodos

En este apartado definiremos todos los materiales utilizados, así como los fundamentos físicos de las técnicas de caracterización utilizadas, y los procedimientos seguidos para realizar las medidas.

3.1 ELR y péptido

Cómo comentamos en la introducción, los ELRs son un grupo muy interesante por sus características debidas a la elastina. Esta estructura le confiere propiedades especiales, como la capacidad de autoensamblarse, y de asociarse en agregados más grandes a partir de cierta temperatura ⁸.

Los ELRs utilizados en este trabajo han sido producidos de manera recombinante, purificados y caracterizados previamente G.I.R. Bioforge. Dos ELRs diferentes, cuya secuencia se detalla en la **tabla 1**:

	Secuencia	Peso molecular (dalton)
SI	MESLLD-(VPGSG) ₅₀ -(VPIPG) ₆₀ -V	46070
3KSI	MGKKKP-(VPGSG) ₅₀ -(VPIPG) ₆₀ -V	46000
D-GL13K	Gkiiklkaslll-NH ₂	1500

El **ELR SI**, se caracteriza por autoensamblarse en nanopartículas esféricas a temperatura fisiológica (37°C), y encontrarse completamente disuelto a 4°C, que son las dos temperaturas a las que haremos todas las mediciones. Esto se debe a la capacidad de autoensamblación citada anteriormente. A esta capacidad se la conoce cómo **temperatura inversa de transición (ITT)** ¹², y la temperatura a la que empieza a verse el proceso se la conoce cómo **temperatura de transición (T_t)**.

Este proceso se debe a que en los polímeros en los que se observa esta reacción, encontramos una asociación de dos bloques (dibloque), uno hidrofílico, y otro hidrofóbico. Al alcanzar la temperatura de transición, la parte hidrofóbica colapsa, de forma que las partículas se agregan de tal manera que se forman micelas de nanopartículas con un núcleo conformado por la parte hidrofóbica, dejando en el exterior (en contacto con la disolución), la parte hidrofílica. A este fenómeno se le conoce como **deshidratación** ¹², y es completamente reversible.

Conticello et al. ¹³ fueron los primeros en observar esta reacción, los cuáles también demostraron que es un proceso completamente reversible, si se enfrían las micelas, se disuelven en las fibras que las conformaban (**figura 1**).

Esta temperatura de transición, se puede modificar a voluntad manipulando muchos factores, entre los que se encuentra el pH ¹⁴, la concentración ¹⁵, entre otros.

El segundo ELR empleado, **3K-SI**, comparte la secuencia del SI, pero a diferencia de éste, posee 3 lisinas en su extremo N-terminal. Las lisinas presentan un grupo amina en su cadena lateral, por lo que permiten su modificación de manera selectiva. En nuestro caso, lo modificaremos mediante la reacción *click*¹⁶ con el AMP D-GL13K, suministrado por Pepsam (Holanda). A la combinación del AMP y el 3K-SI, le llamaremos **DG-SI**.

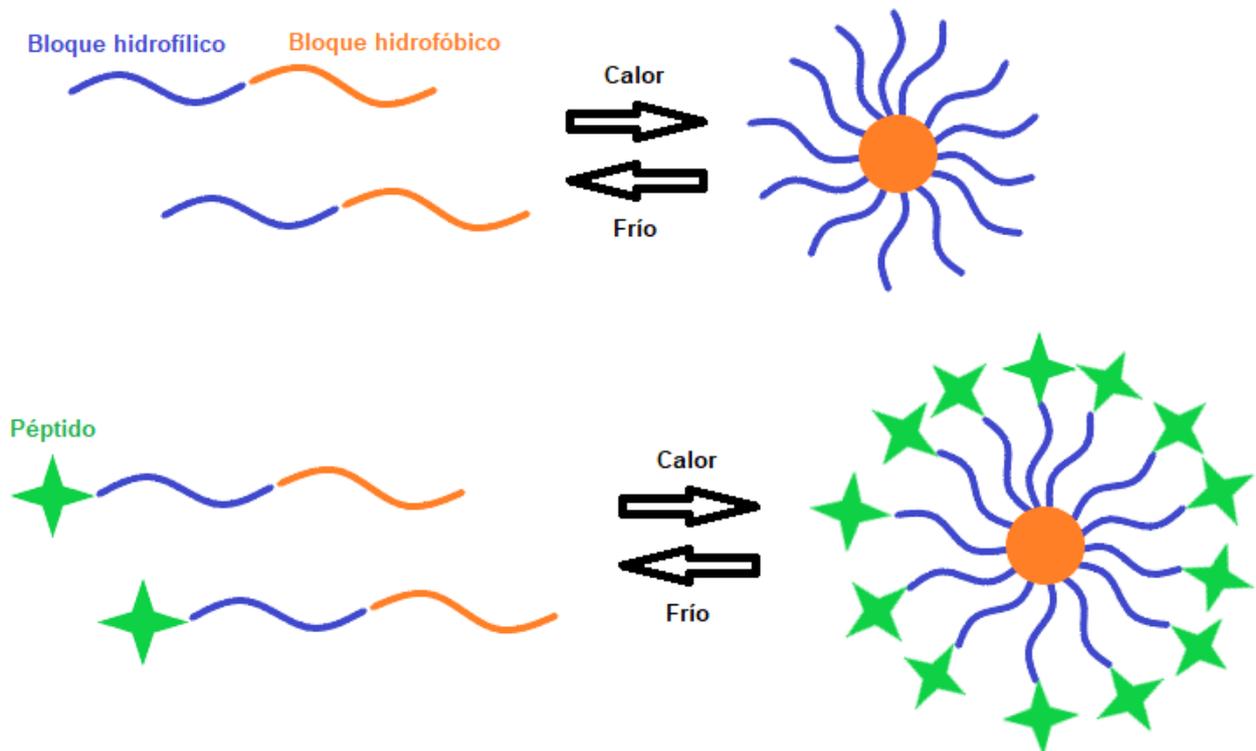


Figura 1 Modelo de la estructura formada por el SI (arriba), y de la esperada del DG-SI (abajo)

De esta manera, lo que se intenta con esta estructura, tal y como se explicó en la introducción, es aumentar la estabilidad y concentración local del péptido, ya que así, maximizar su acción antimicrobiana, cosa que será materia de otros trabajos.

3.2 Caracterización del material

Tras la modificación del 3K-SI, procedemos a su caracterización. Se prepararon dos lotes distintos, para su posterior caracterización mediante dos técnicas experimentales, MALDI-TOF y SDS-PAGE; y así, cuantificar la cantidad de polímero modificado en cada lote.

3.2.1 MALDI-TOF

Para medir el peso molecular del DG-SI se utiliza **MALDI-TOF**, que son las siglas en inglés de **desorción/ionización láser asistida por matriz en tiempo de vuelo**. Es una técnica de espectrometría de masas que se basa en construir matrices metálicas con muestras orgánicas (es el caso de nuestro péptido), en el que se observa la desorción (evaporación de la muestra desde la matriz metálica) debido a la excitación producida por un gas. A esta parte se la llama ionización por MALDI ¹⁷.

Ahora es cuándo se analiza en TOF (tiempo de vuelo), en el que se calcula la masa de las partículas evaporadas midiendo el tiempo que tarda en llegar al analizador una vez que son aceleradas desde la matriz (conservación del momento y de la energía, sabiendo la energía con la que se han excitado).

Esta técnica es muy útil para medir masas orgánicas, debido a que es un método de ionización suave, y por tanto, no se utilizan energías tales que destruyan la naturaleza de la proteína.

Este proceso se realizó en el Laboratorio de técnicas experimentales de Valladolid.

3.2.2 SDS-PAGE (*Polyacrilamide gel electrophoresis*)

La electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), nos permite valorar el peso molecular de proteínas según su movilidad en presencia de un campo eléctrico. Si se mezcla proteína con SDS (dodecilsulfato sódico, de sus siglas en inglés), ésta se carga negativamente, por lo que intentará desplazarse en la dirección del polo positivo del campo. Entonces si se pone un gel entre las muestras y el polo positivo, en este caso un gel de poliacrilamida, a lo largo de cierto tiempo, veremos que las partículas más pequeñas se habrán acercado más que las grandes a la fuente del campo, al ánodo ¹⁸.

Para medir los tamaños, se forman pozos en el gel, de forma que colocaremos todas las muestras que se quieren medir y un *marker*/marcador (en este caso, *Unstained Protein Marker*, MUNS), del que se conoce la masa exacta y proporciones (**figura 2**). Por lo que según la altura a la que se queden las proteínas que contiene cada muestra, podremos intentar deducir su masa y cantidad relativa, según la intensidad de la banda dejada

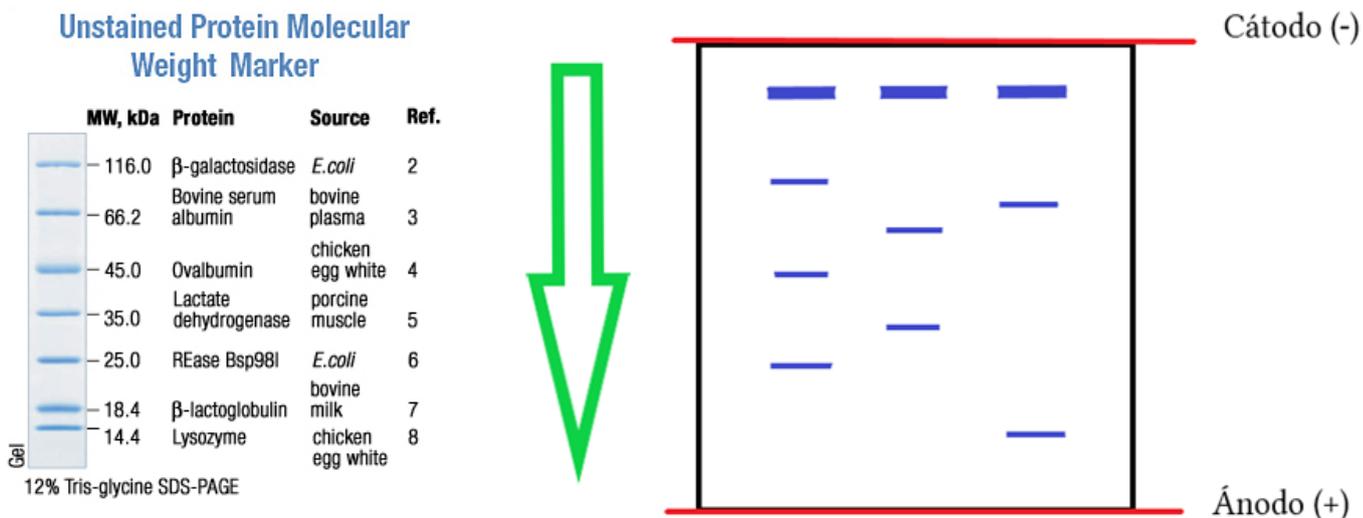


Figura 1 A la izquierda, esquema de la posición y peso de las bandas del marker utilizado. A la derecha, esquema del recorrido que siguen las muestras (bandas gruesas de arriba), y de como se van depositando cúmulos referentes a cada masa

3.3 Nanoestructuración

En este apartado definiremos las técnicas utilizadas para caracterizar el tamaño y estabilidad de las muestras de SI y DG-SI; así como los fundamentos físicos en que se basan, los procedimientos seguidos a la hora de tomar las muestras y los tipos de medidas que tomaremos.

3.3.1 Preparación general de las muestras

Los ELRs (SI y DG-SI) se almacenan liofilizados a -20°C para su conservación. Antes de cada medida, disolveremos los ELRs en el disolvente correspondiente, agua ultrapura (mQ) o PBS (solución salina con características similares a las del interior del cuerpo humano, a una concentración de $25\ \mu\text{M}$, que es la concentración óptima para su caracterización con DLS ¹⁹.

Como explicamos anteriormente, las medidas fueron realizadas a dos temperaturas diferentes, por encima (37°C) y por debajo (4°C) de la temperatura de transición a distintos tiempos para evaluar la nanoestructuración de los ELRs respecto al tiempo ¹¹. Así, se analizaron las muestras tras su incubación durante **10 minutos, 1 hora, 4 horas, 1 día, 3 días y 7 días**.

Lo que hace un total de 48 medidas.

Al saber los pesos moleculares (**tabla 1**), sabemos que una concentración 25 μM se puede expresar cómo:

$$P_m M = \frac{m}{V}$$

- P_m es el peso molecular de la muestra (46000 dalton)
- M es la molaridad (25 μM)
- m es la masa del polímero.
- V es el volumen del disolvente.

Entonces para así podemos sacar la proporción masa-volumen. Con estos datos vemos que es de 0.115 Kg/L = **1.15 mg/ml**, lo cual nos viene bien, ya que cómo veremos más adelante, solo necesitaremos 1 ml de mezcla máximo para las medidas, lo que no permite gastar entre 1 y 2 mg por muestra. Cada muestra la preparemos para un tiempo dado, excepto las medidas de 10 minutos y una hora, que, debido a lo corto de espacio entre ellas, se utilizará la misma muestra.

Para las medidas a tiempos más largos (1 día, 3 días y 7 días) habrá que tener más cuidado y prepararse en un ambiente y componentes estériles, debido a que a esos tiempos, sobre todo a 37°C, es muy fácil que si hubiera alguna bacteria, se propagase y creciese hasta un tamaño que interfiriera con las medidas.

Aplicando esta misma regla al peso de **47680 dalton** del DG-SI, (lo sabemos por la suma del AMP, el 3K-SI, y los conectores de la reacción *click*¹⁶) obtenemos una relación masa-volumen de **1.19 mg/ml**.

3.3.2 Dispersión de luz dinámica (*Dynamic Light Scattering*)

Primero describiremos los fundamentos físicos en los que se basa y su funcionamiento, y luego el desarrollo experimental seguido para tomar las muestras. Llamaremos por el resto del trabajo a esta técnica por sus siglas en inglés, **DLS**.

Esta técnica mide tamaños de partículas en el rango de los nanómetros (nanopartículas), basándose en el movimiento browniano (errático/aleatorio) de partículas suspendidas en una disolución acuosa, midiendo la dispersión de las partículas de un láser conocido (longitud de onda, ángulo de incidencia).

Nuestro equipo (*Zetasizer Nano ZS*, de Malvern; ver **figura 3.a**) mide las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada por las partículas en movimiento a lo largo del tiempo. En un momento puntual, las señales de dos ondas dispersadas por dos partículas, en un lugar del espacio determinado, darán una interferencia destructiva o constructiva, lo que llevará a una disminución o aumento de la intensidad percibida por los sensores del equipo. Al estar el sistema en continuo movimiento, estas fluctuaciones

de las fases de las ondas que dan las interferencias, estarán en continua evolución y cambio, lo que se traduce en variaciones positivas o negativas de la intensidad.

Cómo es lógico, los sistemas de partículas más grandes se moverán más despacio que los sistemas de partículas más pequeñas, lo que lleva a una evolución menor de las diferencias de fase, lo que se traduce en fluctuaciones de la intensidad mucho menores (ver **figura 3.b**, imagen adaptada de ²⁰):



Figura 3.a Zetasizer Nano ZS utilizado

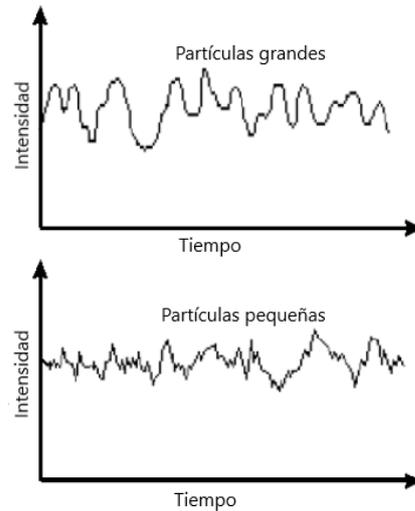


Figura 2.b Esquema en el que se ilustra las variaciones de intensidad citadas anteriormente

Cabe destacar, que el volumen medido, es el dado por el **diámetro hidrodinámico** ²⁰ de la partícula, que es el diámetro medido según cómo difunde la partícula en el líquido, y esto es el de una **esfera**. Esto nos inducirá a cierto error, pero sigue siendo una buena aproximación. Y aunque la superficie de las partículas no sea perfectamente esférica, el software del equipo hace una media y una distribución de tamaños para cada muestra. Este diámetro se mide con la expresión:

$$d = \frac{kT}{3\pi\mu D}$$

Donde:

- **d** es el diámetro hidrodinámico.
- **D** es el coeficiente de difusión traslacional.
- **k** es la constante de Boltzmann ($1,3806504 \cdot 10^{-23}$ J/K).
- **T** es la temperatura absoluta.
- **π** es el número *pi*.
- **μ** es la viscosidad del medio.

Todo son valores conocidos, menos el coeficiente de difusión traslacional, que es lo que hallaremos con las medidas.

Estos diagramas se sacan de un **correlador**, que es un comparador de señales. Se compara una misma señal consigo misma un tiempo diferencial (δt) después. El valor oscila entre 0 y 1 (desde que la señal sea completamente diferente o exactamente igual). Se hacen comparaciones sucesivas ($t, t+\delta t, t+2\delta t, \dots$), lo que reduce cada vez este valor de correlación, conformando una función decreciente conocida como **función de correlación** ²⁰.

Esta función nos da una información muy útil, ya que se puede relacionar la pendiente de la caída de la función de correlación con la dispersidad de la muestra (a mayor caída, más monodispersidad); y el tiempo que tarda en pasar del máximo de correlación con el comienzo de la disminución, con el tamaño de la partícula (ver **figura 4**):

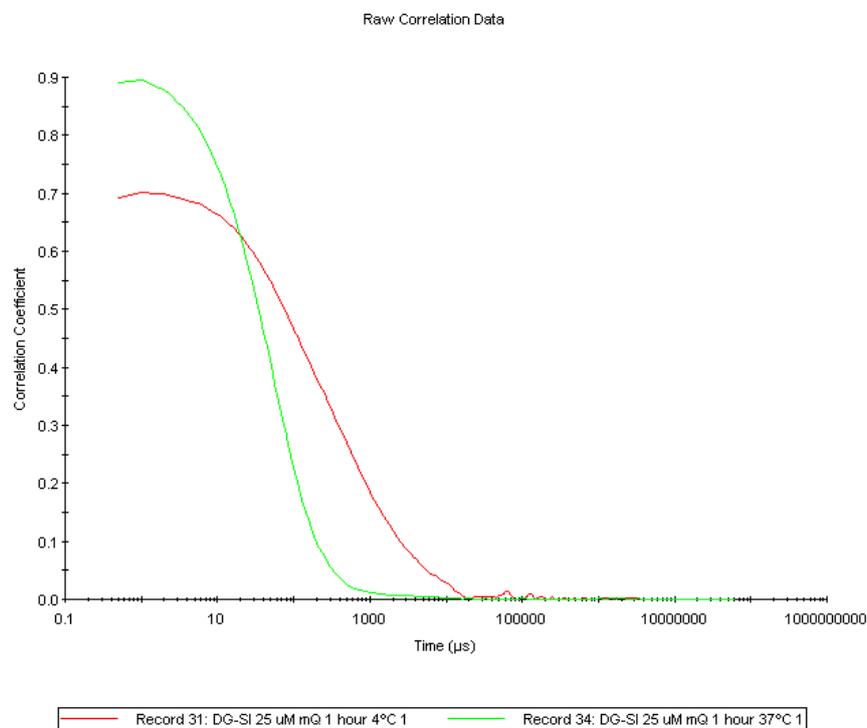


Figura 4 Correlogramas de dos muestras de distintas masas, en las que se observa la diferencia de pendiente, respecto la de más temperatura a la de menos, como ya veremos más adelante

Aproximando nuestra función de correlación $G(\delta t)$ a una exponencial inversa, obtenemos:

$$G(\delta t) = A[1 + B e^{-2Dq(\delta t)}]$$

Figura 3 Correlogramas de dos muestras de distintas masas, en las que se observa la diferencia de pendiente, respecto la de más temperatura a la de menos, como ya veremos más adelante

Donde:

- **A** es una constante del ajuste, propia a la parte inicial constante del correlograma.
- **B** es una constante del ajuste, propia de la intersección de la parte inicial y la recta descendente.
- **D** es el coeficiente de difusión traslacional.
- $q = (4n/\lambda_0) * \text{sen}(\theta/2)$, que es un valor propio de la onda dispersada, con **n** el índice de refracción del disolvente, λ_0 la longitud de onda del láser incidente, y θ el ángulo de dispersión.

De esta manera, cómo vimos al inicio, con el coeficiente **D** sacamos el diámetro hidrodinámico de las partículas, y con ello, su tamaño.

Así obtenemos una distribución de tamaños, según las intensidades relativas dispersadas por distintos tipos de tamaños en la muestra, con lo que obtenemos una **distribución del tamaño en intensidad**.

En el caso ideal de partículas monodispersas e idénticas obtendríamos una distribución delta en el valor del tamaño, pero en casos realistas en los que la forma de la distribución de tamaños es muy ancha o incluso aparece más de un pico, debemos hacer uso de la llamada **teoría Mie** de la dispersión de la luz ²¹, la cuál relaciona el tamaño de una partícula con la luz dispersada de una fuente, de la cuál sabemos su longitud de onda y el ángulo dispersado, consiguiendo así una distribución en volumen (**figura 5**).

Esta teoría se basa en la observación de una función compleja con máximos y mínimos para cada ángulo, cuándo el tamaño de la partícula es del tamaño de la longitud de onda.

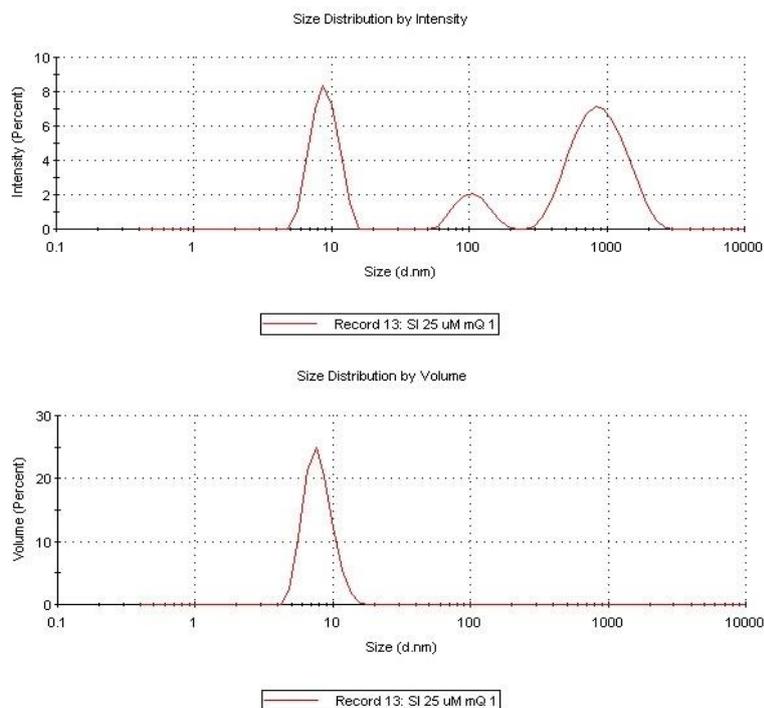


Figura 5 Distribuciones en intensidad y en volumen de una misma medida en DLS. Se observa como se pasa de varios picos en intensidad a uno solo en volumen

Una vez dejado claros los principios físicos que rigen esta técnica, pasamos a explicar cómo se han tomado las medidas.

Para cada medida de DLS utilizaremos cubetas en forma de prisma de poliestireno (ver **figura 6**), a las que añadiremos 0.9 ml de mezcla, reservando unos pocos microlitros (10-15 μ l, cómo explicaremos en el apartado 3.3.3) para las muestras de TEM, si es preciso:



Figura 6 Cubeta de plástico utilizada, con muestra en su interior

Se tendrá en cuenta la temperatura del proceso en todo momento, por lo que es muy importante transportar la muestra a la cubeta, y ésta al equipo lo más rápido posible, habiendo fijado alcanzado la temperatura requerida con anterioridad.

Una vez terminada la medida se puede guardar la cubeta utilizada con la muestra en un frigorífico a 4°C (o en una estufa a 37°C), para utilizarla posteriormente en medidas a tiempos más largos.

Para todos los tiempos hay una muestra específica, a la que añadiremos otra medida de la muestra del tiempo anterior, para determinar que la muestra los resultados solo dependan del tiempo en los que lo calculemos, desde que se mezcló hasta su medida. El equipo está programado para realizar 3 medidas consecutivas para cada tiempo una vez que hemos colocado la cubeta con la muestra.

La media aritmética de las gráficas de las medidas será la representada en el apartado de resultados, representando en una misma gráfica los resultados para un mismo producto (SI o DG-SI) a un disolvente (agua mQ o PBS) a una cierta temperatura (4°C o 37°C) de todos los tiempos (10 min, 1h, 4h, 1d, 3d 7d). Cada gráfica vendrá acompañada de su correlograma correspondiente.

3.3.3 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Al igual que para DLS, primero describiremos los principios físicos, y después el procedimiento experimental.

Denominaremos a esta técnica por sus siglas en inglés (TEM). Esta técnica se basa en la relación por la cuál para observar cualquier tamaño, es necesaria una luz de longitud de onda del mismo orden. La longitud de onda del espectro de luz visible es del orden de cientos de nanómetros, y las muestras que observaremos son del orden de unas decenas de nanómetros, por lo que no será suficiente con un microscopio óptico. Por eso en el TEM, se sustituye por un **haz de electrones**, el cuál sabemos que según la energía cinética que les demos, por la relación de *De Broglie*²², para energías del orden de 100 keV (es el orden usual con el que se trabaja en los TEM):

$$\lambda = \frac{hc}{\sqrt{T^2 + 2Tm_0c^2}}$$

Dónde:

- λ es la longitud de onda de *De Broglie*.
- **hc** es la constante de Planck por la velocidad de la luz (1239,84 eV nm).
- **T** es la energía cinética (la energía con la que son proyectados los electrones por el haz).
- **m₀c²** es la masa en reposo del electrón por la velocidad al cuadrado (511 keV).

Con estos datos para T = 100 keV, $\lambda = 3,7 \cdot 10^{-3}$ nm, para hacernos una idea de la potencia del equipo.

A grandes rasgos, el procedimiento que sigue el equipo, se basa en un cañón de electrones que dispara un haz que atraviesa la muestra, para formar su imagen a continuación de ella.

Por esto, el equipo está formado principalmente por un gran cilindro, en cuyas bases encontramos el cañón de electrones y la proyección de la imagen de la muestra, respectivamente (ver **figura 7**,^{23,24}):

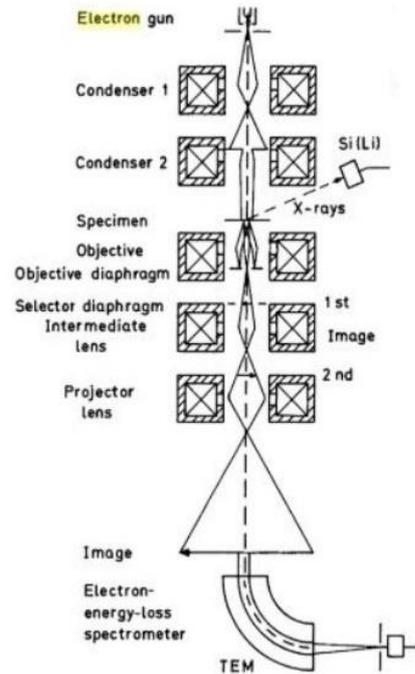


Figura 7 Foto de un TEM, junto a un esquema de su interior

El **cañón** consta de un filamento (principalmente de **tungsteno**), que funciona de fuente de emisión. Al conectar el filamento a un alto voltaje ($\approx 120\text{kV}$), este comenzará a emitir electrones hacia la siguiente parte del cilindro, **un sistema de vacío** plagado de lentes condensadoras que nos permite focalizar el haz a nuestro antojo. Debido a las grandes aberraciones que se forman, debemos trabajar con aperturas minúsculas, del orden de unos pocos microradianes ²⁴.

A continuación, se atraviesa la muestra. Para lograr que haya una eficiencia lo suficientemente grande de transferencia respecto a los fenómenos de reflexión, las muestras deben de ser muy finas, de **un grosor de media micra**, cómo son las rejillas en las que depositaremos las muestras (ver **figura 8**):

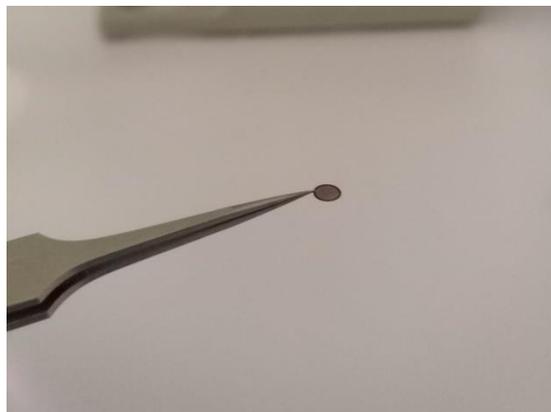


Figura 8 Rejilla con aro carbono utilizada

Debido a que el haz es de electrones, para modificar la trayectoria de éste y poder focalizar bien la muestra, se utilizan campos magnéticos producidos por corrientes que pasan por bobinas a lo largo del microscopio. Debido a la **fuerza de Lorentz**, modificando la corriente que pasa por las bobinas, podemos modificar la curvatura del haz, convirtiendo así estas bobinas en lentes magnéticas.

Finalmente se observa la imagen directamente en una pantalla de fósforo o a través de un equipo de grabación digital.

A continuación, explicaremos el procedimiento para tomar las muestras.

Para poder observar los polímeros sin las influencias de las sales, es decir, en su estado más “real”, **solo tomaremos muestras de TEM en agua ultrapura mQ** de DG-SI y SI.

Necesitaremos muy poca cantidad de polímero para preparar una muestra (10-15 µl), por lo que como dijimos en el apartado anterior, las recogeremos de las muestras respectivas que reservamos para DLS.

Por lo dicho anteriormente, que solo realizaríamos las medidas estrictamente necesarias para TEM, solo prepararemos una muestra por tiempo, la correspondiente a la muestra específica preparada para DLS.

Las rejillas en las que depositaremos las muestras son las mostradas en la figura 8

Para **hidrofilizar la superficie de la rejilla**, y que la muestra se acople mejor, se someterá la superficie de ésta a la acción de un plasma. Utilizando el *Plasma Cleaner* (ver **figura 9.a**), se introducirán las celdas a utilizar en ella, se hará el vacío y se activará la máquina a baja potencia durante 20 segundos, ya que la acción del plasma durante más tiempo puede destruir completamente las rejillas. El plasma cargará la superficie expuesta para hidrofilizarla, pero durante poco tiempo (unos **30 minutos**), por lo que solo podremos activar unas pocas celdas (usualmente 1 o 2) por uso de la máquina, ya que no nos dará tiempo a medir más en ese tiempo.

Una vez hidrofilizada la rejilla se procede a impregnarla con la muestra. Para ello, sobre superficies de vidrio preaclimatadas a 4°C o 37 °C, dependiendo de las muestras, situamos tres gotas de 10 y 15 µl para las medidas a 4°C y 37°C, respectivamente; una de la muestra, otra del solvente utilizado (agua mQ), y otra de **acetato de uranilo**, que utilizaremos como tinción negativa.

El procedimiento consiste en colocar la rejilla, por la cara activada, sobre la muestra durante 90 segundos. Después se secará con cuidado con papel de filtro el líquido sobrante, y se colocará durante 60 segundos sobre el disolvente. Se vuelve a secar y se deja otros 60 segundos sobre el tinte. Finalmente se seca por última vez y se deja con cuidado sobre un papel de filtro para que se seque.

Es muy importante que **el papel nunca toque directamente la cara activada**, y que alguna fibra de éste podría pegarse y dificultar la observación de la muestra. El papel es

suficientemente absorbente, por lo que secará el sobrante simplemente apoyando la rejilla por los lados.

Como consideración final, es muy importante que las **muestras estén a la temperatura indicada** (4°C o 37°C) **durante todo el proceso**, por tanto, las placas de Petri y los materiales utilizados han debido aclimatarse previamente. Para ello, para las medidas a 4°C todo el proceso se realizará en una cámara fría; y a 37°C encima de un calentador en una campana (ver **figura 9.b**), ya que el acetato de uranilo se evapora con rapidez y es tóxico (por ello a altas temperaturas utilizamos cantidades ligeramente mayores).



Figura 9.a Plasma cleaner (en medio), controlador de presión (encima) y bomba de vacío (debajo de la mesa)



Figura 9.b Distribución del procedimiento seguido para 37°C, donde se observa el calentador con la placa y el Parafilm (con las gotas), y la otra placa en la que dejamos secar la muestra

Finalmente guardamos las muestras ya secadas en una caja adaptada, en la que guardaremos todas las muestras, en vacío hasta su visualización.

3.3.4 Potencial zeta

Se le llama potencial zeta a la medida de la magnitud de la interacción electrostática (repulsión o atracción) entre partículas y de su carga superficial, cosa que podemos relacionar con la estabilidad de una muestra⁶.

Si estamos suponiendo que queremos observar partículas monodispersas debidas al fenómeno de *deshidratación* (ver apartado 3.1), si suponemos que todas las partículas son

de la misma naturaleza, entonces también poseerán la misma carga, por lo que relacionaremos un valor alto de este potencial con un estado de estabilidad, debido a la repulsión electrostática que predominará en la muestra y facilitará el estado de monodispersidad ²⁵.

El equipo que utilizaremos para realizar estas medidas (*Zetasizer Nano ZS*, de Malvern), utiliza la técnica de **microelectroforesis de láser Doppler**. Es el mismo equipo que para el DLS pero utilizando otra programación.

Esta técnica se basa, como bien dice el nombre, en medir la diferencia de frecuencia entre un láser difractado por una partícula cargada en movimiento en un campo eléctrico, que variará la frecuencia tras la refracción por el efecto Doppler (ver **figura 10**); y otro láser que se usará de referencia, de igual frecuencia y fase que el primero antes de verse refractado por la partícula.

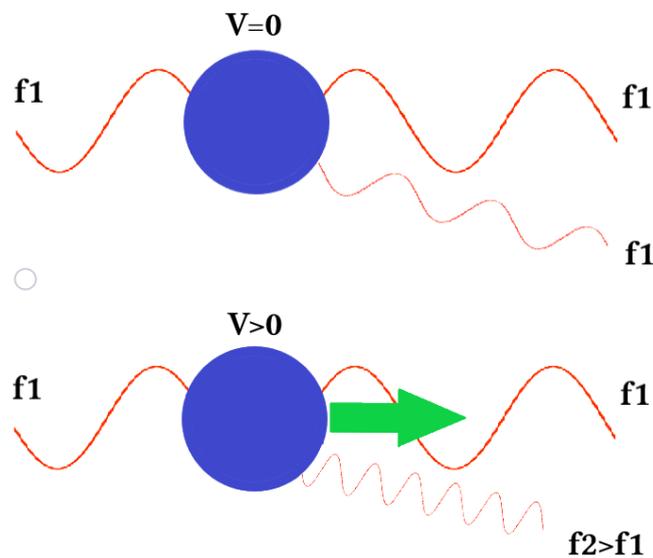


Figura 10 Manifestación del cambio de frecuencia debido a una partícula en movimiento que funciona como emisor de la nueva onda

Estos haces hacen coincidir al final del recorrido, combinándose y formando una señal $f_1 - f_2 = \Delta f$, debido a la alternancia entre zonas de interferencia constructiva y destructiva (ver **figura 11**):

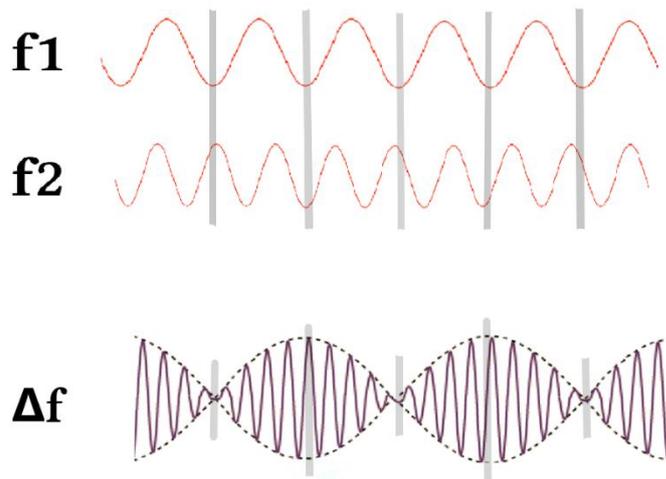


Figura 11 Patrón clásico en el que se observan mínimos de intensidad (amplitud) en los momentos en los que las fases son opuestas, y máximos en los que coinciden

Esta nueva onda que llamaremos **onda Doppler**, cómo vemos en la figura 11, tiene una frecuencia mucho menor que las ondas originales. Estas variaciones de intensidad (amplitud) de nuestra onda Doppler son detectadas por un detector al final del recorrido. Es necesario que el sensor detecte muchas oscilaciones de la intensidad durante el muestreo para que la medida resulte suficientemente fiable.

Cómo ya sabemos, la posición y movimiento de una partícula se puede detectar por la difracción de ésta en un haz láser. Aumentando el número de ondas Doppler que recojamos, más precisión obtendremos. Pero dependiendo de la movilidad de las partículas, si esta es muy baja la onda Doppler tendrá una frecuencia tan baja que se tardará mucho tiempo en observar una oscilación, y por tanto, no observaríamos demasiadas alternancias en las intensidades en el tiempo que dure la medida.

Por eso si observamos el cambio de fase, el movimiento de una partícula en media longitud de onda ya representa un gran cambio (y por tanto, medible) en términos de la fase. El cambio de fase medio nos dará información sobre la naturaleza del movimiento electroforético de las partículas, debido al acampo eléctrico a las que se ven sometidas. A esta técnica se la conoce cómo **dispersión de luz para análisis de fase**, que nos referiremos a ella por sus siglas en inglés, **PALS** ²⁶.

Finalmente sabiendo con estas técnicas cómo se mueven las partículas bajo la acción de un campo eléctrico conocido, el software del equipo puede calcular el potencial zeta de la muestra (ver **figura 12**):

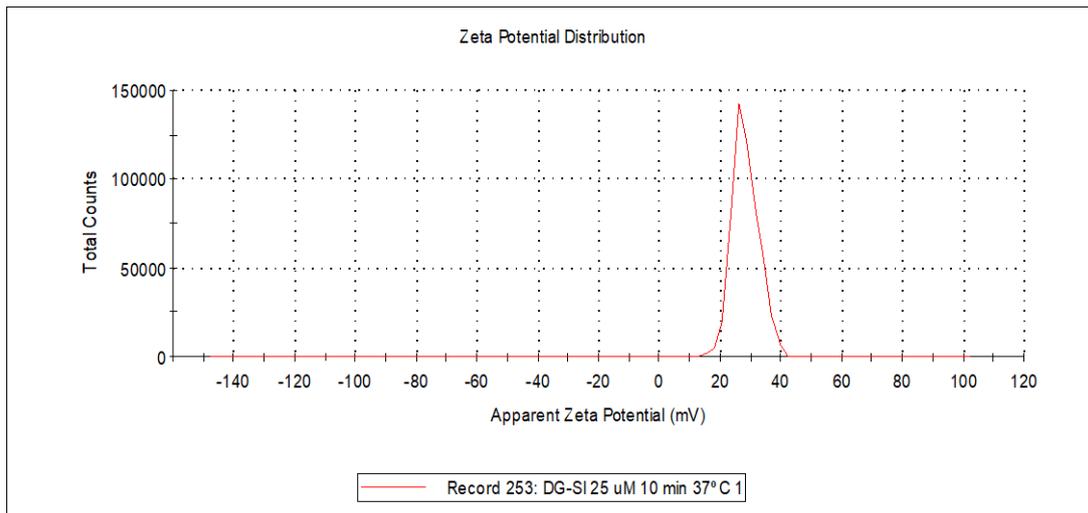


Figura 12 Gráfica de la medida del potencial zeta de una muestra

Como se observa en la gráfica del potencial zeta, lo que nos interesa es un valor concreto, no una gráfica de comportamiento, cómo pasa en el diagrama en intensidad y en el correlograma del DLS, por lo **que representaremos en una misma gráfica los valores concretos a cada tiempo.**

Para tomar las medidas, utilizaremos cubetas diferentes a las de DLS, ya que tienen electrodos por los que pasará la corriente, cómo ya hemos explicado. Las llamaremos cubetas zeta (ver **figura 13**):



Figura 13 Cubeta zeta utilizada, en la que se observan los electrodos

Excepto para tiempos muy cortos (10 minutos), el resto de medidas las haremos **inmediatamente después** de la correspondiente de DLS, por lo que moveremos rápidamente el contenido de la cubeta del DLS a la cubeta zeta.

Muy importante recalcar que tras una medida, debido a la **alta corriente** a la que se ve sometida la muestra, **ésta no es reutilizable después** para DLS o para zeta de un tiempo posterior, así que la repetición de las medidas se hará con muestras nuevas, y no de medidas de otros tiempos anteriores.

Al igual que para las medidas de DLS, haremos 3 medidas seguidas por tiempo, cuyo valor será la media de esas 3 medidas.

Debido a que el potencial zeta depende de la carga de las partículas, **solo realizaremos las medidas en agua ultrapura mQ** (completamente desionizada), ya que las sales del PBS pueden afectar a la muestra.

Al igual que en el DLS, representaremos los valores a todos los tiempos de cada producto (DG-SI o SI) a cada temperatura por separado.

4. Resultados

En este apartado representaremos todos las gráficas y valores obtenidos por las diversas técnicas, junto con una breve descripción; para en un apartado posterior (apartado 5) discutir el por qué de los datos obtenidos.

4.1 MALDI-TOF

En la **tabla 1**, encontraremos los resultados finales.

Cada medida de cada lote (DG-SI 1, DG-SI 2 y 3K-SI) se realizó 4 veces. Tomaremos los valores de los picos predominantes y haremos la media (ver **figura 14**):

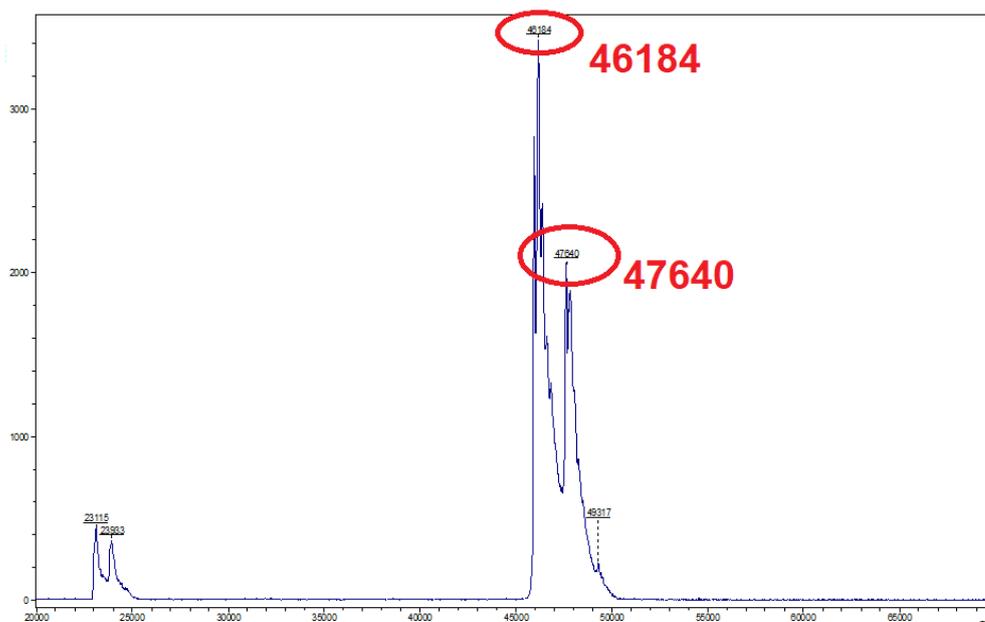


Figura 14 Una de las medidas de DG-SI 2. El primer pico representa el SI, en los que se han marcado los picos referentes al peso del SI y DG-SI

Como se observa en la figura 14, hay un pico mucho mayor a 46184, referente al SI, que a 47640, referente al DG-SI. Esto se debe a que la reacción no se efectuó al 100%, y todo el péptido no se acopló a todo el 3K-SI. Para ver el peso de la parte DG-SI tomaremos los valores de ese segundo pico.

Entonces los valores finales son:

Tabla 1 Resultados de MALDI-TOF comparados con valores teóricos de los ELRs utilizados

	Masa 1	Masa 2	Masa 3	Masa 4	Masa media	Masa teórica
3K-SI	45954	45953	45953	45944	45951	46000
DG-SI 1	47802	47651	47653	47650	47689	47680
DG-SI 2	47640	47639	47811	47637	47682	47680

4.2 SDS-PAGE

Se han realizado dos medidas simultáneas, es decir, en un mismo gel hemos formado 8 columnas (DG-SI 1, DG-SI 2, SI y *marker*) para maximizar la posibilidad de encontrar una buena visualización (ver **figura 15**):

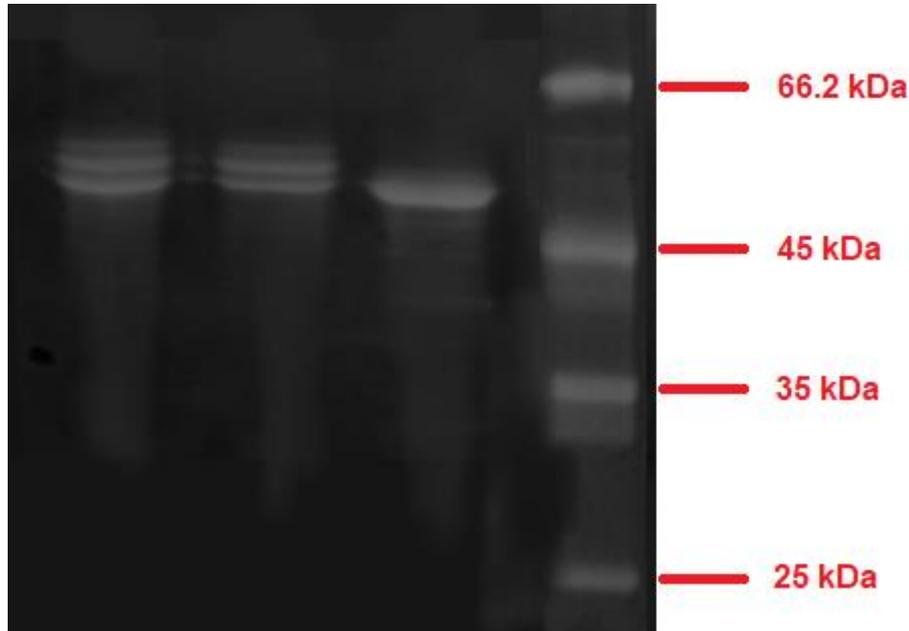


Figura 15 Gel de poliacrilamida teñido con una tinción negativa a bade de cloruro de cobre tras la electroforesis. De izquierda a derecha, DG-SI 1, DG-SI 2, SI y el *marker*

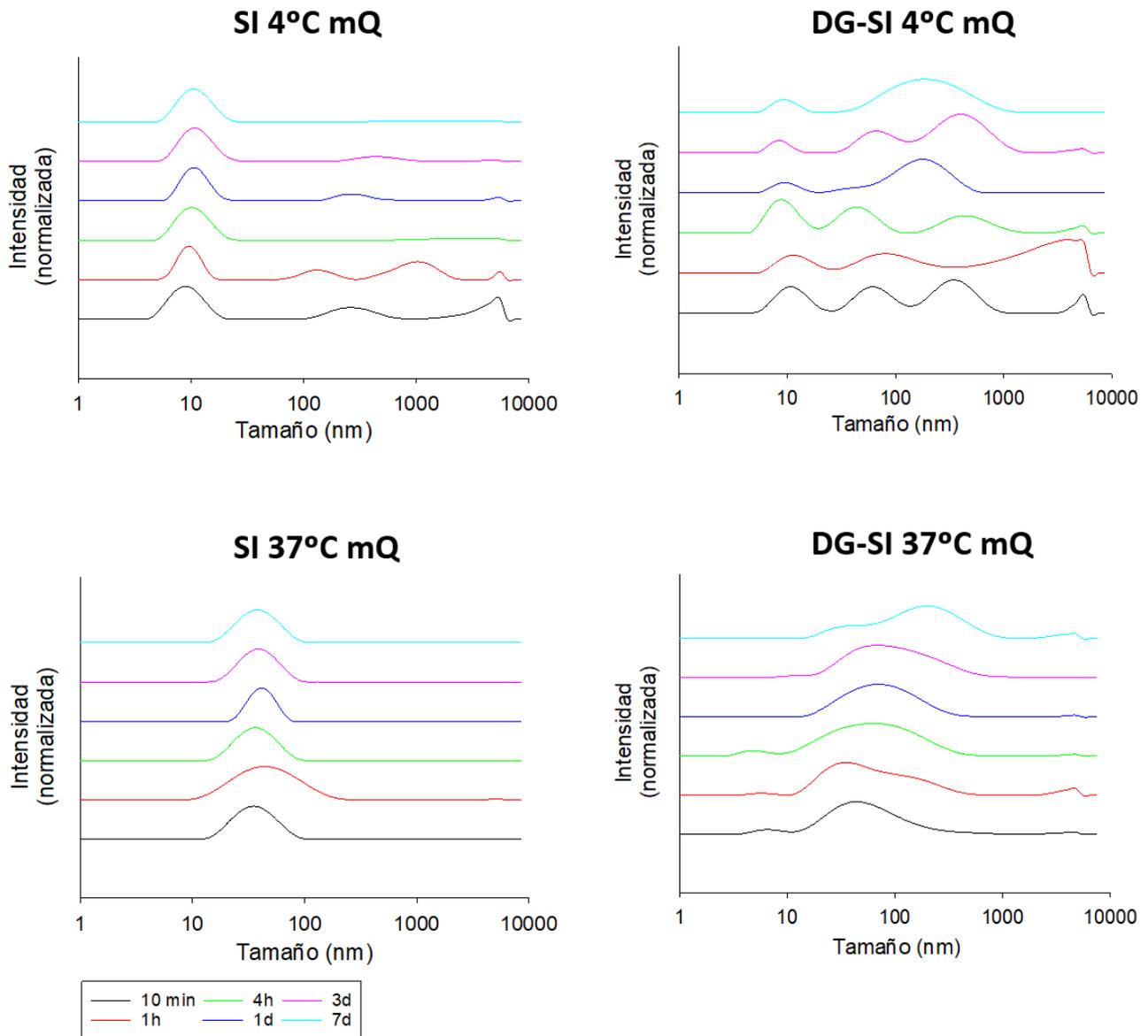
Cabe destacar primero, que este *marker* está diseñado para medir por electroforesis otro tipo de polímeros, que avanzan más rápido por el gel, de ahí que haya “corrido más”.

Es obvio ver que el SI solo tiene una gran banda entre las bandas referentes a 45000 y 66200, ya que es una muestra pura de 46000 dalton. En cambio, en los dos DG-SI, encontramos una primera banda a la altura de la del SI, esto quiere decir, la cantidad de ELR no modificado. Las bandas superiores que encontramos por encima de la referente al ELR, viendo la escala marcada por el *marker*, podemos deducir que se trata de la parte modificada. Así que, cualitativamente, podemos afirmar que ambos lotes estas igualmente modificados,

Cómo nota, señalar que lo que parece una tenue tercera banda en los DG-SI, se trata de la estela dejada por el polímero, de algún ELR-AMP al que se le ha acoplado algún péptido de más (los péptidos se pueden enlazar entre ellos, aunque muy raramente en estas condiciones ⁴.

4.3 DLS

Representaremos las gráficas de todas las medidas del mismo solvente juntas, con sus respectivos correlogramas.

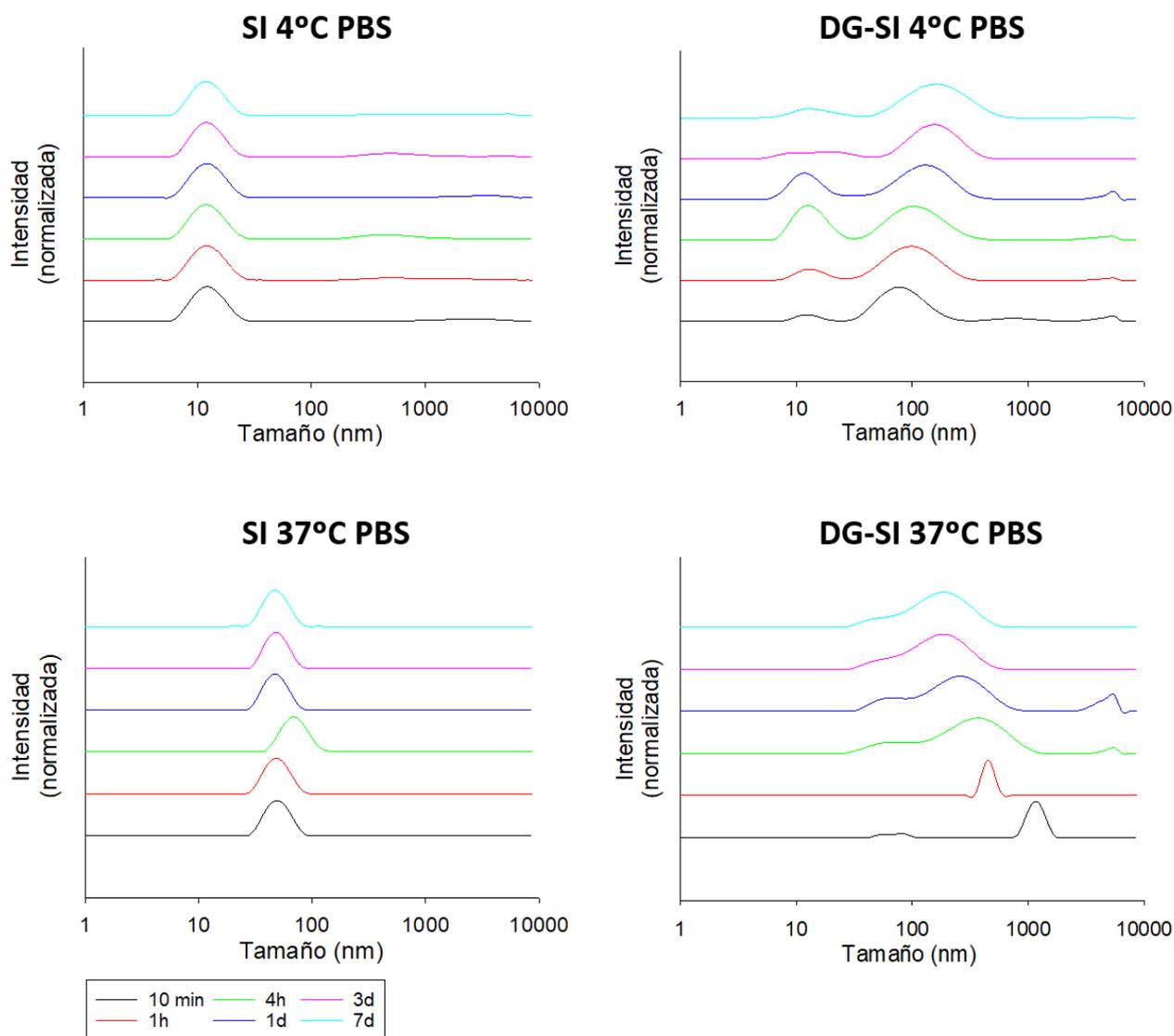


Gráfica 1 Datos de DLS, de ambos polímeros en agua mQ

Principalmente observamos en la **gráfica 1**, que el SI, por encima de la T_t , se autoensambla en nanopartículas de un diámetro de entre 20 y 30 nm, con una distribución monodispersa, la cuál se mantiene constante durante el tiempo. Por debajo de la T_t , en cambio, encontramos una distribución en torno a 10 nm, completamente disuelta. Los pequeños picos a grandes tamaños se refieren a agregaciones inespecíficas.

En cambio, en el **DG-SI**, vemos que hay una inestabilidad total a 4°C, ya que hay muchas distribuciones que no se mantienen con el tiempo. Pero a 37°C, sí que vemos una sola

distribución (mucho más difusa que en el SI), que en el que se suscita un ligero aumento de tamaño con el tiempo (desde 30 nm hasta 200 nm).



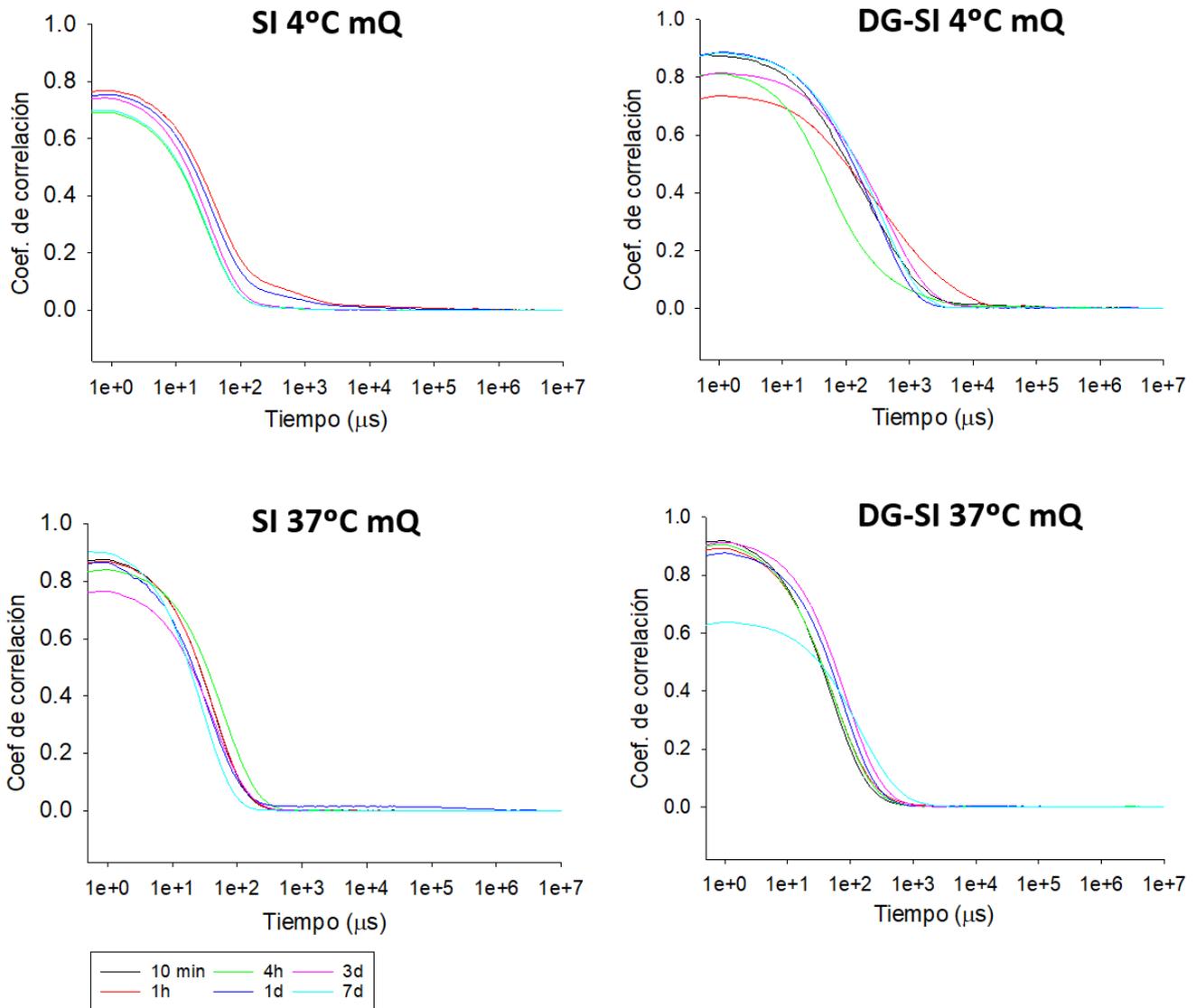
Gráfica 2 Datos de DLS de ambos polímeros, en PBS

Ahora vemos una mayor estabilidad en ambos polímeros, ya que, en el caso del SI, encontramos finalmente solo una distribución por tiempo, y en el caso del DG-SI, se han disminuido la cantidad de distribuciones por instante temporal enormemente (sobre todo a 4°C), y el ancho de éstos.

En SI no vemos más cambios que en agua, mas que a 37°C, un ligero aumento del tamaño (30 – 40 nm)

En DG-SI encontramos un cambio mucho mayor que en agua. A 4°C encontramos una distribución predominante (100 nm), que va aumentando de tamaño con el tiempo. También aparece una distribución más pequeña (10 nm) que aumenta entre 4h y 1d para

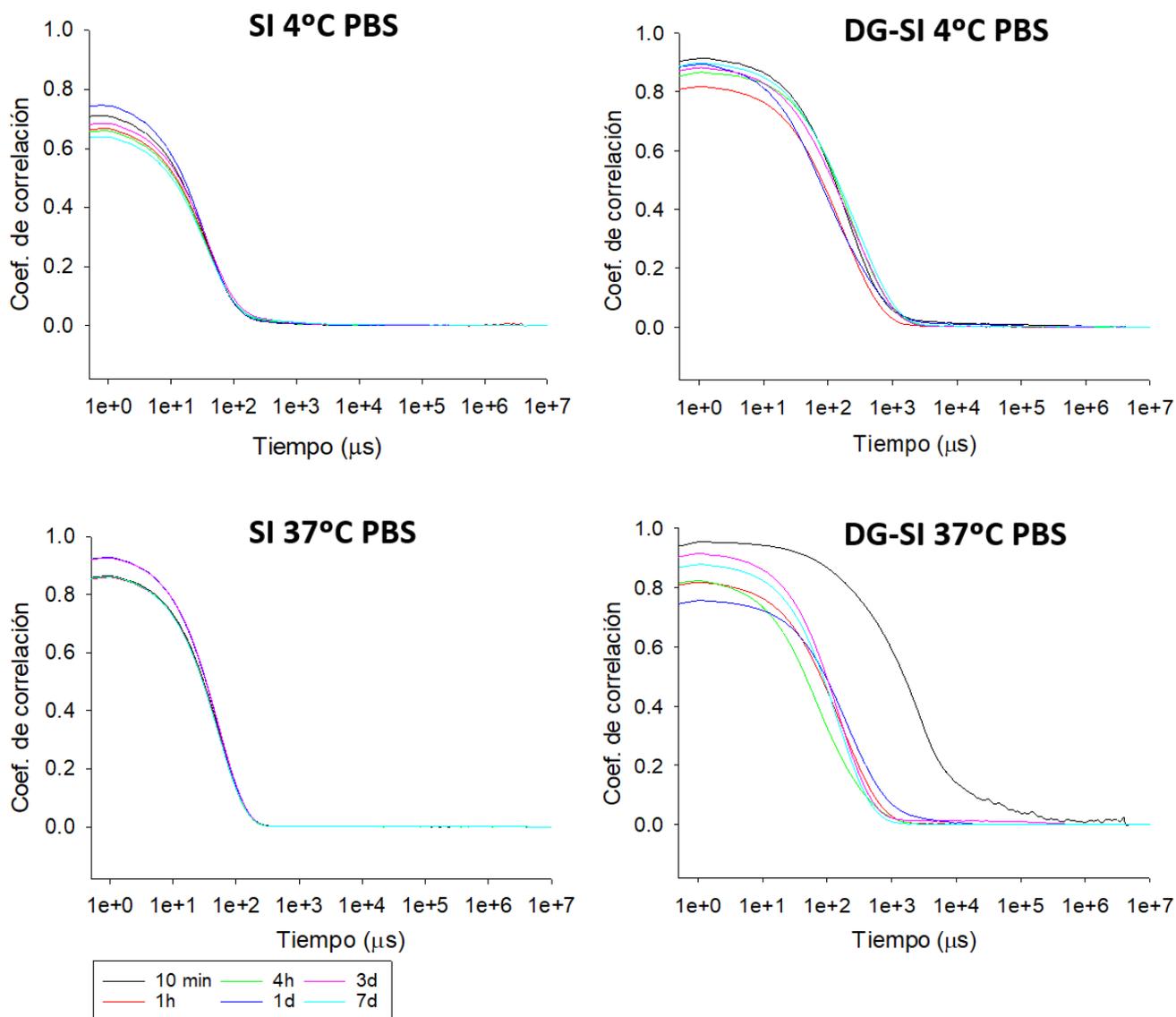
luego disminuir otra vez posteriormente. A 37°C vemos un aumento drástico del tamaño respecto en agua, con la diferencia de que hay una disminución del tamaño con el tiempo, en vez de aumento, aunque se acabe en ambos casos, en la misma distribución (de 1000 nm hasta 200 nm).



Gráfica 3 Correlogramas de ambos polímeros en agua mQ

Si recordamos lo visto en el **apartado 3.3.2** respecto a los correlogramas, podemos relacionar la estabilidad y monodispersidad de la muestra con el tiempo. Vemos que en el control, conserva una gran estabilidad a lo largo del tiempo a ambas temperaturas, debido a que la pendiente de todas las gráficas son iguales. A 4°C se ve que la caída no es tan brusca como a 37°C (con esto me refiero a que la pendiente no es constante en toda la bajada hasta 0, como sí pasa a 37°C), lo que da pie a la aparición de cúmulos a distintas intensidades, cosa que se vio en el diagrama en intensidad.

En el DG-SI, a 4°C vemos un desbarajuste total de los correlogramas, lo que da muestras del caos visto en los datos del DLS. En cambio, a 37°C, vemos una distribución constante con el tiempo.



Gráfica 4 Correlogramas de ambos polímeros, en PBS

En todos los casos de la **gráfica 4** (excepto a tiempos de 10 min), vemos que todos los correlogramas comparten pendiente en sus respectivas gráficas, lo que da indicios de la alta estabilidad de las muestras, cosa que concuerda con lo dicho para la **gráfica 2**.

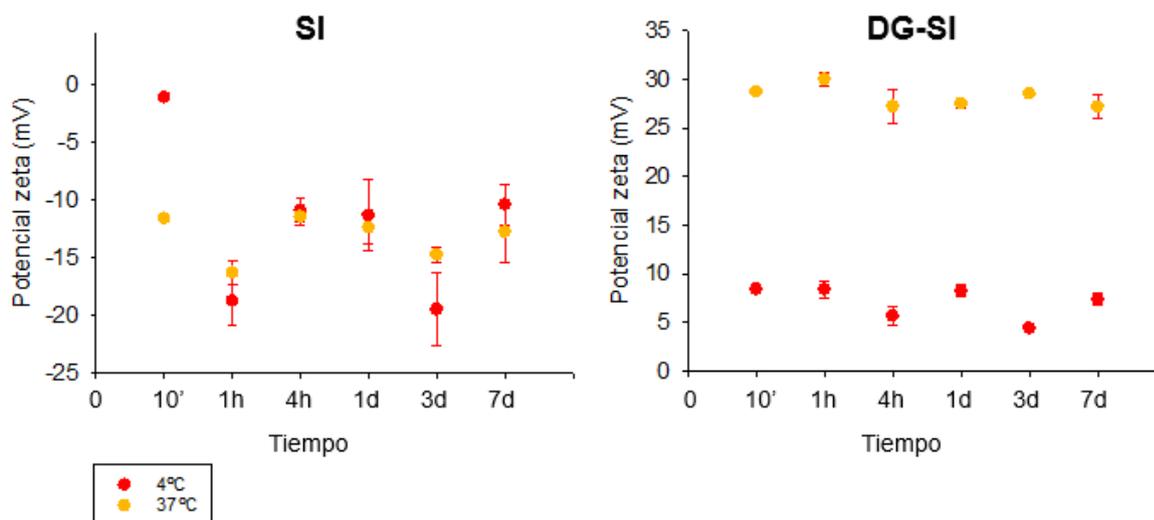
En cambio, la distorsión de los datos en DG-SI 37°C puede deberse a la polidispersidad de la muestra, sobre todo a tiempos muy cortos (10 min), cuya zona inicial constante tan grande es indicio de partículas de gran tamaño, pero evaluando la pendiente, (que no es “brusca”, como dijimos anteriormente en este apartado), lo que da indicios de presentar

una mayor polidispersidad. Además, las fluctuaciones de la línea base indican una posible sedimentación de las partículas.

4.4 TEM

Debidos a problemas internos de la unidad de microscopía de la Universidad de Valladolid, las muestras de TEM fueron enviadas a la Universidad de Zaragoza para su análisis.

4.5 Potencial zeta



Gráfica 5 Valores del potencial zeta de ambos polímeros, a ambas temperaturas. Se han separado los tiempos equiespaciadamente para una mayor claridad. Todas las medidas, al ser valores medios, llevan la desviación estándar representada.

En el SI, a 4°C no hay casi ninguna correlación entre punto, factor que sí se observa, en cierta medida, a altas temperaturas. Las desviaciones (sobre todo a 4°C), son muy grandes, lo que indica inestabilidad en las medidas.

En cambio, en el DG-SI, se observa unas distribuciones mucho más constantes a ambas temperaturas, además de que el potencial es mucho mayor a 37°C que a 4°C, haciéndose muy bajo a esta última (pasa de 27 mV a 37°C a 7 mV a 4°C).

5. Discusión de los resultados

En este apartado discutiremos conjuntamente el por qué de los resultados obtenidos.

Las medidas de DLS demostraron la capacidad de autoensamblado en nanopartículas del **ELR SI**. Esto es consistente con estudios previos ¹¹, los cuáles defienden que a temperaturas por debajo de la T_t (en nuestro caso, las medidas a 4°C), en **agua mQ**, las cadenas del polímero se encuentran completamente disueltas e hidratadas, y por tanto no hay nanoestructuras individuales (nanopartículas) presentes. Esto lo corroboran los correlogramas correspondientes (**gráfica 3**), los cuáles, a 4°C, lo indican con una pendiente menos brusca que a 37°C. Lo que sí se puede confirmar, viendo los datos de DLS a ambas temperaturas, es la estabilidad con el tiempo, tanto de la monodispersidad por encima de la T_t , como del tamaño de los agregados formados por debajo de dicha temperatura. De los datos de potencial zeta, sabemos que tenía que salir negativo, ya que la cadena polimérica acaba con un grupo carboxilo (COO^-). Además, como corrobora lo que hemos explicado para DLS, los datos tan dispersos a 4°C, indican la completa disolución de las cadenas, por lo que no hay ningún tipo de estructura nanométrica estable. En cambio, a 37°C que sí se han formado micelas autoensambladas, la carga superficial de las partículas es constante con el tiempo, lo que cuadra con la estabilidad de éstas ¹¹.

Esto cambia en la disolución en **PBS**, ya que debido a la acción iónica de las sales, como se ve en ¹⁹, ésta provoca una mayor cohesión entre partículas, lo que favorece la monodispersidad, incluso por debajo de la T_t , cosa que se observa en la conservación de un solo pico de las distribuciones (**gráfica 2**), y de la gran pronunciación de las pendientes en los respectivos correlogramas (**gráfica 4**).

Ahora, viendo el **DG-SI**, vemos que al acoplar el péptido, como se vio en ⁴, al no presentar ese comportamiento que presentaba el SI con la temperatura, por debajo de la T_t , encontramos una inestabilidad mucho mayor que con el control, con nanopartículas muy polidispersas (**gráfico 3**), y de muy diferentes tamaños (**gráfico 1**). Al acoplar el péptido al ELR, este desestabiliza completamente la molécula, ya que al encontrarse ésta en disolución con las cadenas completamente hidratadas, las moléculas se unen aleatoriamente por la parte del péptido, de ahí las formaciones tan irregulares. Esto también concuerda con los valores del potencial zeta, ya que obtenemos una carga superficial muy baja (menor que 10 mV), insuficiente para crear una repulsión electrostática tal que forme estructuras regulares estables. Además, el equipo mide el potencial zeta suponiendo partículas esféricas, cosa que no pasa en este caso, de ahí la gran irregularidad de las medidas a esa temperatura.

En cambio, por encima de la T_t , vemos una estabilidad frente a la distribución de tamaños, que va aumentando muy ligeramente con el tiempo, (siempre entre 30 y 100 nm). Esto se debe a que el ELR se autoensambla, predominando esta capacidad por encima de la del péptido, formando las estructuras predichas en la **figura 1**. Esto

concuenda con los datos del zeta, en los que vemos un valor bastante alto (alrededor de 30 mV), que al ser una repulsión mucho más alta que a 4°C, es posible que sea indicio de partículas estables esféricas.

En **PBS** vemos un comportamiento similar al que pasaba con el SI, en el que la acción de las sales parece que produce cierta estabilidad al principio, pero en verdad, a ambas temperaturas, podemos ver como tienden a formar distribuciones análogas, del mismo tamaño y dispersidad, por lo que podemos deducir, que debido a la acción de las sales, el DG-SI, se acopla de la forma descrita en agua, **ignorando la barrera de la T_t**. Esto produce una ensamblación mucha más rápida, como le pasaba al SI, pero en este caso, el péptido es mucho más afectado por las sales ^{19,4}; lo que provoca con el paso del tiempo, una predominación de su ensamblación, llegando a estructuras estables del mismo tamaño en todos los casos (alrededor de 200 nm) mucho mayores que las vistas para el SI. Viendo los correlogramas, vemos que una pendiente mediana y una línea base completamente horizontal para tiempos largos, lo que da pie a creer en formaciones estables y monodispersas.

6. Conclusión

Finalmente, con este proyecto hemos demostrado que el SI puede ser un buen nanocarrier del péptido D-GL13K, alcanzando en ambientes fisiológicos, grandes tamaños (200 nm) a tiempos muy largos, por lo que puede no ser tan útil para cierto tipo de medicamentos (de efecto en 1d a 3d). También se ha demostrado la eficacia de DLS para la caracterización del material, siendo indispensable para la caracterización de futuros materiales en biomedicina. Queda por ver en futuras investigaciones si esta formación aumenta la capacidad antimicrobiana del péptido.

7. Bibliografía y referencias

1. Coccia M, Margon D, Finardi U. CURRENT SCIENTIFIC TRAJECTORIES AND INTERACTIONS BETWEEN MAIN WORLD GEO-ECONOMIC PLAYERS IN NANOTECHNOLOGY RESEARCH. In: *New Technologies - Trends, Innovations and Research*. InTech; 2012. doi:10.5772/34312
2. MacEwan SR, Chilkoti A. Elastin-like polypeptides: Biomedical applications of tunable biopolymers. *Biopolymers*. 2010;94(1):60-77. doi:10.1002/bip.21327
3. Baptista P V, McCusker MP, Carvalho A, et al. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria-“A Battle of the Titans”;. *Front Microbiol*. 2018;9:1441. doi:10.3389/fmicb.2018.01441

4. Ye Z, Zhu X, Acosta S, Kumar D, Sang T, Aparicio C. Self-assembly dynamics and antimicrobial activity of all l - and d -amino acid enantiomers of a designer peptide. *Nanoscale*. 2019;11(1):266-275. doi:10.1039/C8NR07334A
5. Yin L. Dynamic Light Scattering. In: *Nanotechnology Research Methods for Foods and Bioproducts*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2012:145-161. doi:10.1002/9781118229347.ch8
6. Determinación del potencial zeta para mejorar la estabilidad de formulaciones. <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/measurement-type/zeta-potential>. Accessed June 6, 2019.
7. Urry DW. *What Sustains Life?: Consilient Mechanisms for Protein-Based Machines and Materials*. Springer; 2006. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=KNEmcjxANegC&oi=fnd&pg=PR7&ots=ibvr35YlFs&sig=rxCNGKKuTuuaDQo289RsBkF0Ke0&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. Accessed June 3, 2019.
8. Urry DW. Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers†. 1997. doi:10.1021/JP972167T
9. Dziawer Ł, Majkowska-Pilip A, Gawel D, et al. Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with 211At as a Prospective Tool for Local Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *Nanomater (Basel, Switzerland)*. 2019;9(4). doi:10.3390/nano9040632
10. García-Arévalo C, Bermejo-Martín JF, Rico L, et al. Immunomodulatory Nanoparticles from Elastin-Like Recombinamers: Single-Molecules for Tuberculosis Vaccine Development. *Mol Pharm*. 2013;10(2):586-597. doi:10.1021/mp300325v
11. Janib SM, Pastuszka MF, Aluri S, et al. A quantitative recipe for engineering protein polymer nanoparticles. *Polym Chem*. 2014;5(5):1614-1625. doi:10.1039/C3PY00537B
12. Rodríguez-Cabello JC, de Torre IG, Acosta S, Salinas S, Herrero M. Elastin-like proteins: Molecular design for self-assembling. *Self-assembling Biomater*. January 2018:49-78. doi:10.1016/B978-0-08-102015-9.00004-6
13. Lee TAT, Cooper A, Apkarian RP, Conticello VP. Thermo-Reversible Self-Assembly of Nanoparticles Derived from Elastin-Mimetic Polypeptides. *Adv Mater*. 2000;12(15):1105-1110. doi:10.1002/1521-4095(200008)12:15<1105::AID-ADMA1105>3.0.CO;2-1
14. Urry DW, Haynes B, Zhang H, Harris RD, Prasad KU. Mechanochemical coupling in synthetic polypeptides by modulation of an inverse temperature transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(10):3407-3411. doi:10.1073/pnas.85.10.3407
15. Nuhn H, Klok H-A. Secondary Structure Formation and LCST Behavior of Short Elastin-Like Peptides. *Biomacromolecules*. 2008;9(10):2755-2763. doi:10.1021/bm800784y
16. González de Torre I, Santos M, Quintanilla L, Testera A, Alonso M, Rodríguez Cabello JC. Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties. *Acta Biomater*.

2014;10(6):2495-2505. doi:10.1016/j.actbio.2014.02.006

17. *ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF*. http://www.cbm.uam.es/joomla-rl/images/Servicios/080.Proteomica/documentos/Espectrometria_de_masas_MALDI-TOF_enero_2015.pdf. Accessed June 10, 2019.
18. MathJax. Electroforesis. <http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>. Accessed June 11, 2019.
19. Pinedo-Martín G, Castro E, Martín L, Alonso M, Rodríguez-Cabello JC. Effect of Surfactants on the Self-Assembly of a Model Elastin-like Block Corecombinamer: From Micelles to an Aqueous Two-Phase System. *Langmuir*. 2014;30(12):3432-3440. doi:10.1021/la500464v
20. Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes. Technical Note Malvern. https://www.researchgate.net/publication/303174314_Dynamic_light_scattering_an_introduction_in_30_minutes_Technical_Note_Malvern. Accessed June 19, 2019.
21. Dr. Crolly G. La teoría de Mie – fritsch.de. <https://www.fritsch.es/medicion-de-particulas/conocimientos-de-fritsch/la-teoria-de-mie/>. Accessed June 2, 2019.
22. M Olmo RN. DeBroglie Wavelength. <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/quantum/debrog2.html#c2>. Accessed June 4, 2019.
23. TEM CM200UT - Instituto de Nanociencia y Nanotecnología. <http://www.cab.cnea.gov.ar/inn/index.php/equipamiento/microscopia/microscopia-electronica-de-transmision/item/57-tem-cm200ut>. Accessed June 18, 2019.
24. Reimer L. *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*. Springer-Verlag; 1984. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=CUfsCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=electron+transmission+microscopy&ots=DCIJtLLVaE&sig=-jRcQvtnekWXJGEsBLyXxXALFA#v=onepage&q=electron+transmission+microscopy&f=false>. Accessed June 4, 2019.
25. Zeta-Meter Inc. (Sin especificar autor). *Potencial Zeta: Un Curso Completo En 5 Minutos*. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/PotencialZeta_1246.pdf. Accessed June 6, 2019.
26. Zetasizer Nano ZS para tamaño, potencial zeta, movilidad de proteínas y microreología. <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs>. Accessed June 6, 2019.