

Universidad de Valladolid

DEPARTAMENTO DE FÍSICA DE LA MATERIA
CONDENSADA CRISTALOGRAFÍA Y MINERALOGÍA



Tesis Doctoral

*Estudio de la transición inversa con la temperatura en
polímeros tipo elastina con creciente funcionalidad.*



Autor: Javier Reguera Gómez.

Director de tesis: José Carlos Rodríguez Cabello.

Agradecimientos

Ete es el momento del final de mi tesis. Un viaje que, como diría Lao Tzu, *empezó con un simple paso* hace algunos años, en una etapa que me ha permitido contribuir una pizca a la ciencia y de la que he obtenido toneladas de experiencias

Ha habido mucha gente que me ha acompañado durante este periplo y a la que me gustaría agradecer su apoyo.

Mi principal agradecimiento va a mi director de tesis José Carlos Rodríguez Cabello, que ha dirigido hábilmente mi trabajo y del que he aprendido enormemente durante toda mi tesis.

La tesis ha sido realizada gracias al trabajo de todos los miembros de mi grupo de investigación y a todos ellos quiero agradecerle su colaboración, empezando por los que han estado haciendo la tesis a la vez que yo, Susana Prieto, Artur Ribeiro y Alessandra Girotti por los que siento una gran empatía; a Javier Arias y Ana Testera que merecen sin duda muchas y muy buenas palabras; y por último a todos los demás miembros de Bioforge, cuyo trabajo ha sido sin duda imprescindible para la realización de esta tesis.

Quiero agradecer también la colaboración de la gente de los grupos donde he realizado estancias. Al grupo de espectroscopia del IMC de Praga (Republica Checa), al grupo de Philip Moriarty en la universidad de Nottingham (Reino Unido) y al grupo de Günter Reiter del ICSI-CNRS en Mulhouse (Francia). Y gracias al profesor Dan W. Urry que ha colaborado con nuestro grupo y nos ha permitido usar sus materiales.

Mi agradecimiento por su apoyo a todos los miembros del departamento de Física de la Materia Condensada Cristalografía y Mineralogía quienes me han ayudado tanto en la investigación como en la docencia.

En el plano personal mi primer agradecimiento va por supuesto para mi familia que sirve de soporte en toda mi vida. A mis amigos Jorge, Álvaro, Alberto y Nicolás con los que se que siempre puedo contar esté donde esté; y al resto de amigos y conocidos que en algún momento me han dado su apoyo.

Agradezco su apoyo a todos esos otros que no aparecen aquí y que han colaborado en la realización de esta tesis.

A todos, gracias.

If you cannot - in the long run - tell everyone what you have been doing, your doing has been worthless. (Erwin Schrödinger)

Índice

1	PRESENTACIÓN.....	1
2	INTRODUCCIÓN	7
2.1	La elastina natural	7
2.2	Polímeros sintéticos tipo elastina.....	8
2.3	Estructura del poli (VPGVG).....	9
2.4	La transición inversa con la temperatura (ITT).....	12
2.4.1	Contracción inducida por cambios en la temperatura.....	15
2.4.2	Las propiedades termodinámicas de la hidratación hidrófoba.....	18
2.4.3	Factores que producen cambios en la T_t	23
2.5	El mecanismo ΔT_t y las conversiones de energía debido al acoplamiento entre grupos funcionales.....	37
2.5.1	Acoplamiento entre grupos funcionales.....	38
2.5.2	Resumen de conversiones energéticas.....	42
2.5.3	Axiomas de Urry sobre el comportamiento de polímeros basados en polipéptidos.....	44
2.6	Diseño de polímeros tipo elastina por tecnología de DNA recombinante.....	46
2.7	Aplicaciones de los polímeros tipo elastina.....	47
2.7.1	Aplicaciones biomédicas.....	49
2.7.2	Aplicaciones no biomédicas.....	58
2.8	Métodos termodinámicos de caracterización físico-química	61
2.8.1	Cinéticas de reacción.....	61
2.8.2	DSC con modulación en temperatura.....	72
2.9	Nanotecnología basada en ELPs.....	81
2.9.1	Arquitectura anfifílica en bloque.....	83

3	MATERIALES Y MÉTODOS	87
3.1	Materiales	87
3.1.1	poli(VPGVG)	87
3.1.2	Poli(VPAVG)	87
3.1.3	(GVGVP) ₂₅₁	89
3.1.4	(GVGIP) ₃₂₀	89
3.1.5	[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] _n	89
3.1.6	(GVGVP) ₄₈	91
3.1.7	Copolímeros en bloque:	91
3.2	Técnicas experimentales	93
3.2.1	Medida de turbidez	93
3.2.2	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	93
3.2.3	DSC con modulación en temperatura (TMDSC)	94
3.2.4	Cinéticas de transición	95
3.2.5	Scattering de rayos X a ángulos bajos (SAXS)	96
3.2.6	AFM	97
3.2.7	Preparación de muestras para AFM	97
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
4.1	Polímeros tipo elastina termosensibles	99
4.1.1	Cinéticas en la Transición Inversa con la temperatura	99
4.1.2	Modulación en Temperatura (TMDSC). Separación de componentes de la ITT en los ELPs modelo	110
4.1.3	Influencia de la adición de sales en las componentes endotérmicas y exotérmicas de la ITT	120
4.1.4	Orden en la mesoescala en polímeros tipo elastina modelo, determinado mediante experimentos de SAXS de sincrotrón	133
4.2	Polímeros tipo elastina sensibles a la temperatura y al pH	139
4.2.1	Influencia del peso molecular en polímeros tipo elastina sensibles al pH	139
4.2.2	Autoensamblado: Formación de nanoporos del ELP recombinante [(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₅	147

4.3 Copolímeros en bloque. Influencia de la arquitectura molecular en las características de la ITT.....	151
4.3.1 Desacoplamiento entre bloques mediante una unión con glicinas.	156
4.3.2 Escenario General de la influencia de la estructura molecular en los parámetros de la ITT	159
4.3.3 Comparativa entre los diferentes dibloques.....	162
4.3.4 Comparativa entre los diferentes tribloques	164
4.3.5 Influencia de la distribución de los bloques (di, tri y tetrabloques).....	166
4.3.6 Análisis de la variación de las temperaturas de transición y de la histéresis.....	168
4.3.7 Entalpías de transición, reflejo de la interacción mutua.	170
4.3.8 Influencia de NaCl sobre la ITT de los copolímeros en bloque	173
4.3.9 Consideraciones finales:	176
5 CONCLUSIONES	177
6 REFERENCIAS.....	181
7 ANEXOS	193
Anexo1: Lista de abreviaturas y acrónimos.	193
Anexo 2: Código del programa de cinéticas	195
Anexo 3 Publicaciones	221

1 Presentación

Los polímeros *inteligentes* (también llamados *adaptables*, *estímulo-respuesta* o, utilizando un término anglosajón “*smart*”), son macromoléculas capaces de experimentar una transición de fase reversible rápida como consecuencia de pequeños cambios en su entorno como por ejemplo temperatura, pH, fuerza iónica o luz [1,2]. Estos cambios resultan en una separación de fases en una disolución acuosa, cambios acusados en el tamaño de un hidrogel, o cambios en la humectabilidad de una superficie. Los polímeros inteligentes pueden encontrarse en una extensiva variedad de aplicaciones lo que hace de su estudio un campo muy activo dentro de la ciencia de materiales. La aplicación de estos polímeros puede encontrarse en el sectores de ámbito nanotecnológico como pueden ser sistemas microfluídicos o de dispositivos miniaturizados (*lab-on-a-chip*), en sectores biomédicos como los de dosificación controlada de fármacos, sistemas de biocatálisis, actuadores biomiméticos, o en ámbitos medioambientales o puramente tecnológicos.

Los polímeros *inteligentes* tienen una base de inspiración en macromoléculas naturales. En la naturaleza muchas macromoléculas funcionales que forman parte de la complicada maquinaria celular exhiben una característica notable como es su todo-o-nada (o al menos altamente no lineal) respuesta a un estímulo. En estas biomacromoléculas se diferencian tres regiones ante una condición cambiante del entorno: en la primera los cambios ante esta condición cambiante son muy pequeños (primera región) y se mantendrá hasta que se alcance un determinado punto crítico a partir del cual la transición ocurre abruptamente, y esto lo hace dentro de un intervalo muy pequeño del parámetro cambiante (segunda región), cuando la transición se completa vuelve a dejar de existir una variación significativa del sistema (tercera región). Las fuerzas causantes de estos procesos son en general del tipo repulsión polar-apolar y asociación apolar (o hidrófoba), en la que los estímulos causan variaciones de

polaridad como consecuencia de, por ejemplo, neutralización de cargas o cambios conformacionales entre otros [3].

La comunidad científica, guiada por un mayor conocimiento de las interacciones de los biopolímeros en los sistemas naturales, ha intentado imitar ese tipo de comportamientos cooperativos en sistemas sintéticos. Durante las pasadas décadas, la investigación ha identificado una gran variedad de polímeros sintéticos funcionales que responden en una forma deseada a cambios en temperatura, pH, ondas electromagnéticas u otros parámetros, en definitiva polímeros inteligentes. Uno de los polímeros inteligentes que más aparece en la bibliografía es el polímero termosensible PNIPAAm (poli[N-isopropil-acrilamida]), este polímero exhibe una transición aguda en medio acuoso entorno a 32°C y su funcionamiento ha sido extensivamente estudiado no sólo para entender el mecanismo de la transición en si mismo si no también para el desarrollo de aplicaciones tecnológicas [4,5]. Junto con este polímero se pueden destacar también, entre otros, el poli(metil vinil eter), la poli(*N*-vinil caprolactama), las poli(*N*-etil oxazolinas) u otras poli(*N*-alquilacrilamidas) [5,6].

Dentro de los polímeros inteligentes, los polímeros tipo elastina (ELPs) están emergiendo gracias a un conjunto de propiedades que les hacen óptimos para muchas aplicaciones de las consideradas de más interés dentro de la ciencia de materiales actual, a la vez que ha ayudado a la comprensión de efectos de plegamiento en proteínas y del funcionamiento de muchas biomoléculas naturales. El poli(VPGVG) (V=L-Valina, P=L-Prolina, G=Glicina), es sin duda el cabeza de grupo de los polímeros tipo elastina, y fue obtenido por primera vez a finales de los años 80 por el grupo del profesor D. W. Urry [7]. Sin embargo, hasta el momento, estos polímeros no han sido suficientemente estudiados dejando incógnitas sobre su funcionamiento real y su compleja transición. Quizá la causa resida en su relativamente corta historia, junto con la dificultad de su obtención, pues estos polímeros no están disponibles comercialmente y deben ser sintetizados por el propio grupo investigador. De los grupos existentes con la

capacidad de obtención de este polímero la mayor contribución al conocimiento de funcionamiento y estructura de los polímeros tipo elastina viene de grupo del profesor Urry, aunque, cabe destacar, la importancia de las contribuciones de otros grupos como son por ejemplo los grupos de A.M. Tamburro, A. Chilkoti, D. A. Tirrell, V. P. Conticello, y el propio nuestro entre los más activos dentro del campo. Estas aportaciones, aunque importantes, son todavía insuficientes para poder comprender en su totalidad, la relación existente entre las propiedades macroscópicas y las características microscópicas y moleculares de estos materiales.

Entre las características más importantes de estos polímeros están sus propiedades mecánicas como son su elasticidad entrópica con una extraordinaria resistencia a la fatiga, su extrema biocompatibilidad, la capacidad de autoensamblado, o la posibilidad de obtención mediante biosíntesis que permite obtener polímeros a medida de la aplicación (*ad hoc*), enormemente complejos y con un control absoluto de su arquitectura molecular [8]. Aunque quizás, la característica más llamativa de esta familia de polímeros es su comportamiento inteligente que ocurre mediante una transición de fase que viene caracterizada por un cambio acusado de propiedades en torno a una temperatura denominada temperatura de transición (T_t). En disolución acuosa el polímero sufre una transición entre un estado totalmente disuelto a un estado insoluble, que conlleva una segregación de fases, al elevar su temperatura por encima de la T_t . Esta transición es completamente reversible y se produce en un proceso complejo que ocurre como consecuencia de una asociación hidrófoba y que lleva asociado un incremento de orden en el que las cadenas poliméricas pasan de un estado de desorden conformacional a una disposición ordenada denominada *espiral β* . Este incremento en el orden le diferencia de otros polímeros inteligentes que poseen una transición, mediante asociación hidrófoba, del tipo LCST (*Lower Critical Solution Temperatura*) y que ha hecho que al fenómeno de la transición en los

polímeros tipo elastina se les denomine de forma diferente como transición inversa con la temperatura (ITT del inglés *inverse temperature transition*) [9,10].

La temperatura de transición de este tipo de polímeros ocurre con una disminución de la distancia media entre extremos de cadena y suele tener lugar a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente o fisiológica lo que lo hace un buen candidato para muchas aplicaciones actuales que utilicen una transformación de energía térmica en energía mecánica o transducción termomecánica. Con una modificación adecuada del polímero modelo es posible conseguir una variación de la temperatura de transición con otro tipo de estímulos, en un mecanismo denominado ΔT_b , con lo cual se puede encontrar polímeros inteligentes que responden a otro tipo de estímulos como el cambio en el pH, potencial químico, presión, etc., consiguiendo diferentes tipos de transducciones energéticas. Este tipo de conversiones es de gran importancia tanto en aplicaciones a nivel monomolecular como en aplicaciones a nivel macroscópico con matrices entrecruzadas de estos polímeros.

En este trabajo se intenta profundizar en el conocimiento de la ITT en diferentes polímeros tipo elastina con creciente funcionalidad. Para ello se han realizado diferentes experiencias con diferentes hipótesis de funcionamiento sobre polímeros termosensibles modelo que permiten caracterizar dicha transición. Comienza el análisis con la caracterización de la dependencia temporal de la transición mediante cálculos de cinética de transición (también denominadas cinéticas de reacción) mediante métodos avanzados libres de modelo (métodos *model-free*), que son los únicos apropiados para sistemas complejos. Así mismo se han aplicado técnicas de calorimetría novedosas como son la calorimetría diferencial de barrido con modulación en temperatura (TMDSC) que permite el desdoblamiento de fenómenos solapados que ocurren en el proceso de la transición. También se han realizado sobre polímeros termosensibles caracterización de parámetros tan importantes como son la influencia de la concentración de polímero o la concentración de sales sobre los

parámetros de la ITT. Termina el estudio de los polímeros termosensibles con una caracterización mediante difracción de rayos X a ángulos bajos (SAXS).

En este trabajo se realiza un estudio sobre polímeros sensibles al pH, obtenidos mediante ingeniería genética, lo que ha permitido el estudio de la influencia del peso molecular sobre diferentes parámetros de la ITT así como en los equilibrios de los grupos funcionales de estos polímeros. A la vez, el hecho de la producción de estos polímeros en forma monodispersa y con un control absoluto en su secuencia, ha dado lugar a la formación de procesos de autoensamblado que han sido caracterizados mediante microscopía de fuerza atómica. Por último se dan los primeros pasos hacia el estudio de sistemas más complejos de varias cadenas poliméricas unidas covalentemente formando copolímeros en bloque y se ha estudiado el efecto de la estructura molecular sobre diferentes parámetros de la ITT.

La organización de este trabajo comienza con una introducción bibliográfica en el punto de partida e inspiración de estos polímeros, la elastina natural, dando paso luego a la obtención de los polímeros tipo elastina. Continuará esta revisión bibliográfica con el estudio de la estructura y funcionamiento de estos polímeros y las bases del funcionamiento de la ITT. En el apartado introducción se hace referencia a la revolución de la ingeniería genética como sistema predominante para la producción de estos polímeros y a algunas de las técnicas termodinámicas utilizadas en este trabajo para la caracterización de los polímeros y se termina la introducción con un apartado dedicado a la importancia nanotecnológica de la utilización de copolímeros anfífilicos en bloque. Después de la introducción bibliográfica se pasa a la descripción de materiales y métodos utilizados para llevar a cabo este trabajo, los resultados y discusión, para terminar con un apartado de conclusiones. Finalmente se recogen varios apartados como el de referencias y de anexos.

2 Introducción

2.1 *La elastina natural*

La elastina es una proteína estructural elástica del tejido conjuntivo. En los mamíferos (en los vertebrados en general), se puede encontrar predominantemente allí donde el tejido sufre repetidos ciclos de extensión-relajación. Ejemplos típicos son las arterias, ligamentos, tendones, pulmones, piel y cartílago elástico. Presenta unas sorprendentes cualidades elásticas, quizá la más llamativa sea su alta resistencia a la fatiga convirtiéndola en extremadamente duradera, con una vida media estimada en unos 70 años [11,12].

Esta proteína tiene tanto una composición aminoacídica como una estructura primaria peculiar. Aproximadamente el 90% de sus aminoácidos son de resto lateral apolar, contiene aminoácidos muy exóticos, como la desmosina, la isodesmosina, o la alodesmosina [13], que le sirven para establecer entrecruzamientos entre varias cadenas de elastina, y finalmente, se encuentran muchas secuencias que se repiten a lo largo de su cadena, como las VPG, VPGG, GVGVP, IPGVG, VAPGVG [7,14-16]. La más común es la secuencia GVGVP, la cual aparece en fragmentos que contienen hasta 11 pentapéptidos consecutivos (VPGVG)₁₁ [16].

La elastina madura, es una matriz con entrecruzamientos tridimensionales e insoluble, pero se origina a partir de un precursor soluble, la tropoelastina de unos 60-70 KDa, mediante la formación postransduccional de los entrecruzamientos.

El comportamiento quizá más sorprendente de esta proteína, y el que a la postre va a darnos idea del mecanismo de sus peculiares propiedades elásticas, ha sido descubierto en un fragmento de esta proteína natural, la α -elastina. Según las investigaciones originales del grupo de D.W. Urry, la α -elastina, cuando está en disolución acuosa, experimenta una transición desde un estado desordenado a un estado ordenado en el que las moléculas son capaces de agregarse, formando

una fase densa y pegajosa [17]. Lo que resulta más llamativo de esta transición desorden \rightarrow orden, es que se da cuando la temperatura de la disolución aumenta (en estas muestras naturales, al pasar de 15°C a 25°C). Este comportamiento está en contra de la tendencia normal de los sistemas físicos, para los cuales cabe esperar un aumento del orden a temperaturas decrecientes, cuando la menor agitación térmica no vence las fuerzas inter e intramoleculares que llevan al material a una disposición regular.

2.2 Polímeros sintéticos tipo elastina.

Los polímeros tipo elastina son polipéptidos artificiales constituidos a partir de la repetición de secuencias que se encuentran identificadas en la elastina natural como pueden ser el poli(VPG), poli(VPGG), poli(GVGVP), poli(IPGVG), poli(VAPGVG) poli(VGGVG) entre otros [7,12,18-23] o alguna modificación a posteriori de ellas. Algunos de estos polipéptidos sintéticos presentan las características físico-químicas de la elastina natural, especialmente la transición desorden \rightarrow orden que se da al aumentar la temperatura de sus disoluciones. De entre todas estas combinaciones muchos polímeros artificiales se han sintetizado con la fórmula general poli(VPGXG) donde X representa cualquier aminoácido excepto la prolina. La característica común de todos estos poli-pentapéptidos es que presentan la transición del tipo desorden \rightarrow orden que presentaba la α -elastina. Y de todos ellos el más estudiado, sin ninguna duda, es el poli(VPGVG).

En las dos últimas décadas se han realizado importantes esfuerzos en el estudio de la estructura de las fases ordenada y desordenada de la cadena polipeptídica de estos polímeros con la esperanza de que la comprensión de las estructuras formadas pueda relevar los orígenes del extraordinario comportamiento de este material, así como las causas que producen esta singular transición de fase (búsqueda de la relación estructura-propiedades).

2.3 Estructura del poli (VPGVG).

La estructura secundaria de este polipéptido fue estudiada inicialmente con la técnica del Dicroísmo Circular (CD). Mediante esta técnica, se puede observar la presencia en la cadena de abundantes disposiciones denominadas horquillas β (beta-hairpins).

Las horquillas β , según la orientación de la amida central en la horquilla, pueden ser de cuatro tipos, los denominados tipo I y tipo II y sus correspondientes imágenes especulares (I' y II'), pudiéndose descartar los tipos I, I' y II' para este polímero en disolución acuosa, existiendo sólo horquillas β II a lo largo de la cadena (Figura 2.1) [7,14,18,19]. Esta horquilla β se ha obtenido de la estructura cristalina de la molécula cíclica compuesta de 3 pentapéptidos (VPGVG)₃ [24]. La estructura molecular del poli(VPGVG) es por tanto una serie de horquillas β , una por cada pentámero tal y como se muestra en la figura 2.2A. Estudios de Raman indican la presencia de horquilla β por debajo y por encima de la temperatura de transición siendo esta la única estructura secundaria del polímero [25].

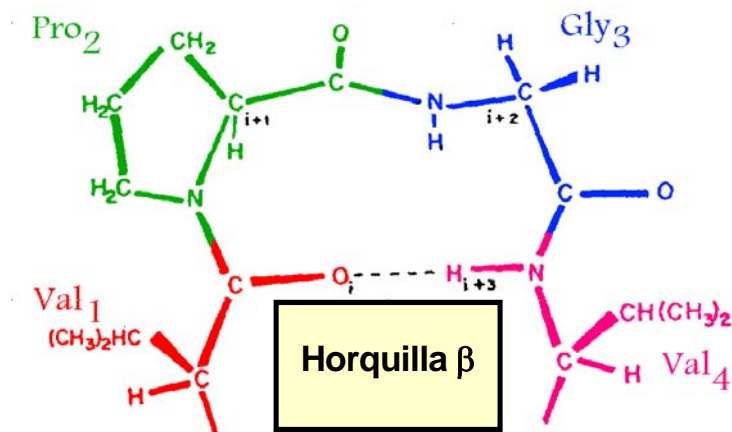


Figura 2.1: Horquilla β tipo II en el pentapéptido VPGVG.

Se ha propuesto que en el polímero, cuando se encuentra en la forma ordenada (altas temperaturas), se da una asociación hidrófoba y una concatenación de horquillas β II que obliga al polímero a adoptar una disposición

helicoidal, la denominada espiral β (que se trata en realidad de una hélice, pero se ha propuesto la utilización de este termino para diferenciarlas de las hélices estabilizadas por puentes de hidrógeno). En esta espiral β las pequeñas secciones de hoja β que quedan entre horquillas (a veces llamadas en esta disposición espaciadores), pueden disponerse unas encima de otras, y conferir al polímero dicha disposición en espiral (Figura 2.2B,C). 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 . En esta distribución las cadenas tienen una disposición adecuada para que se den abundantes contactos hidrófobos inter e intra cadena. La asociación hidrófoba entre cadenas resulta en una estructura fibrilar de tres espirales β como se muestra en la figura 2.2D como se ha demostrado por microscopía electrónica en agregados incipientes formados por calentamiento [26], por último estos filamentos se juntan para dar lugar a nano y microagregados del polímero los cuales contienen hasta un 60% de su peso en agua [27].

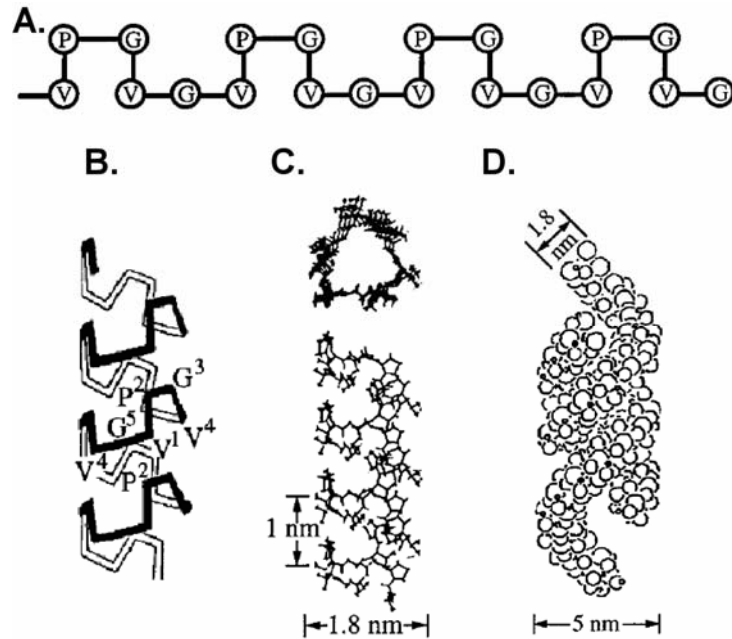


Figura 2.2: Descripción de la estructura molecular de la proteína tipo elastina poli(VPGVG). A) Series de horquillas β . B,C) Representación esquemática de la espiral β mostrando las horquillas β y los espaciadores. D) Filamento superhelicoidal de tres espirales β .

Otras técnicas que han sido utilizadas en la determinación de la estructura secundaria de estos polímeros, como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) tanto de protón (RMN- ^1H) como de carbono 13 (RMN- ^{13}C), han constatado la existencia de horquillas β regularmente espaciadas y repetidas a lo largo de la cadena. Más concretamente, la Dinámica Molecular (MD) ha confirmado una disposición estable de la horquilla β en los fragmentos (VPGVG) y otros relacionados. Así, desde el punto de vista de la MD, la espiral β , derivada de la repetición secuencial de horquillas β y que presenta una vuelta completa cada 2.7 pentapéptidos, se estima como una disposición estable posible. Otras técnicas aplicadas a la determinación de la estructura, como la Relajación Dieléctrica [28,29] o la Espectroscopía Raman [30-33] han corroborado esta estructura.

Para otros polímeros tipo elastina con la forma poli(VPGXG) donde X es cualquier aminoácido, se cree que el cambio en estructura es similar al mostrado por el poli(VPGVG), sin embargo este no es el caso para todos los polímeros tipo

elastina que presentan transición de fase. Por ejemplo, el polímero poli(VPAVG) presenta una transición de fase a una temperatura similar al del poli(VPGVG), sin embargo, se ha determinado por estudios espectroscópicos que el cambio de conformación da lugar una hoja plegada β en lugar de la espiral β . [34]. En trabajos recientes de espectroscopia (Raman e infrarroja) se ha encontrado que por debajo de T_t , rodeando las cadenas de poli(VPAVG) existe una capa de hidratación más perfectamente estructurada que para el poli(VPGVG); sin embargo al sobrepasar T_t la interacción con el agua se invierte siendo mayor para el poli(VPGVG) [33], esto está en concordancia con otros resultados en los que se ve que por encima de T_t la mayoría de los grupos amida de este polímero en agua están mutuamente enlazados mientras que para el poli(VPGVG) están enlazados mucho más débilmente [35]. Poli(VPAVG) por encima de T_t es más compacto y la posibilidad de interacción polímero-agua más débil.

A pesar de que la estructura del poli(VPGVG) parece estar bien determinada, algunos otros grupos tales como el grupo de V. Daggett, haciendo uso de simulaciones de dinámica molecular [36,37] o el trabajo de Gross sobre el oligómero de (GVGVP)₆ [38] apuntan en contra de la existencia de estas estructuras regulares en el estado plegado del polímero.

2.4 La transición inversa con la temperatura (ITT).

Ya se ha indicado que, en contra del comportamiento observado en la mayoría de los sistemas físicos, en las disoluciones de poli(VPGVG), sus derivados y la elastina natural, se observa una transición de fase termodinámica de primer orden (discontinuidad en las derivadas de la energía libre de Gibbs) en la que existe un cambio desorden \rightarrow orden al aumentar la temperatura por encima de su temperatura de transición (T_t).

Mediante análisis de RMN y MD, se ha encontrado que el péptido cíclico ciclo (VPGVG)₃, tiene una conformación casi idéntica a la del poli

(VPGVG)[39] , y también se agrega cuando aumenta la temperatura formando una fase cristalina. Las moléculas de agua se sitúan en el interior de los ciclos que se apilan unos encima de los otros formando columnas en cuyo exterior quedan expuestos los restos hidrófobos (Figura 2.3).

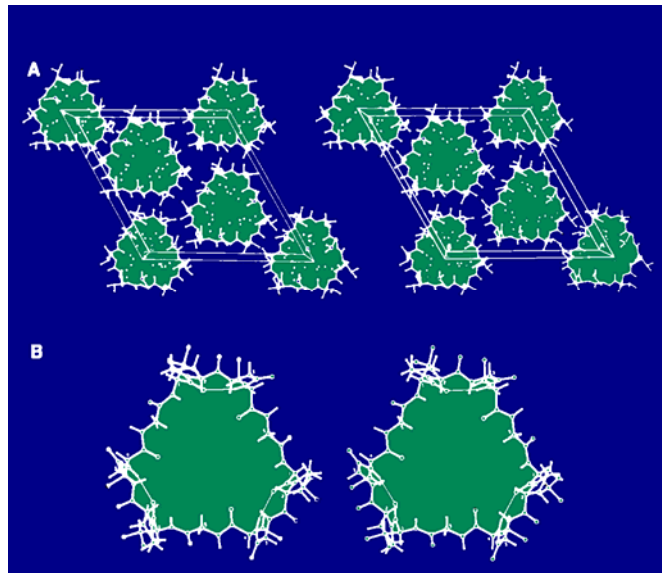


Figura 2.3: Vista estereoscópica de la fase cristalina del ciclo (VPGVG)₃. Los puntos blancos del interior representan moléculas de H₂O.

En el exterior de los ciclos no existen moléculas de agua, y las interacciones intermoleculares son predominantemente del tipo de contactos entre las cadenas laterales hidrófobas (asociación hidrófoba).

Antes de la asociación, las cadenas laterales hidrófobas están rodeadas por moléculas de agua, denominado actualmente hidratación hidrófoba. La disposición de las moléculas de agua que recubren estos elementos apolares es una estructura ordenada en la que las moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno entre sí pero con una débil interacción con el grupo apolar, creando una serie de estructuras, pentagonales en la situación ideal, con las que recubre el resto apolar; esta disposición se denomina de tipo *clatrato* (Figura 2.4). Por ejemplo, el hidrato del metano está recubierto por doce de estos pentágonos formando un dodecaedro pentagonal. Esta disposición del agua ayuda a mantener el polímero en una conformación extendida: el plegamiento requeriría romper estos enlaces de hidrógeno del H₂O.



Figura 2.4: Representación de la estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de restos apolares.

Así, a bajas temperaturas, las moléculas de agua en las disoluciones de poli(VPGVG) se disponen recubriendo los restos apolares en una disposición paralela, mientras que los grupos polares (principalmente el grupo peptídico – CONH-) se hidratan formando puentes de hidrógeno y con una disposición radial de los dipolos de las moléculas de agua. El hecho de que estos diferentes grupos, que están obligados a convivir juntos a lo largo de la cadena, se hidraten de forma distinta produce una competición por el agua de hidratación y por tanto una repulsión polar-apolar (Figura 2.5). El hecho de que los grupos apolares se encuentren totalmente hidratados y separados de las partes polares hace que la cadena se encuentre en un estado extendido.

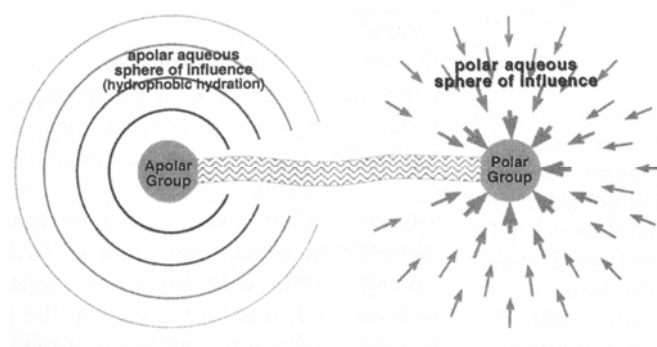


Figura 2.5: Dibujo esquemático de la repulsión polar-apolar [40].

Al aumentar la temperatura, las moléculas de agua ordenadas en torno al resto apolar pierden este orden por la agitación térmica. El estado ordenado del agua formando clatratos deja de ser posible, y las interacciones hidrófobas entre

restos apolares se optimizan llevando la cadena a su estado conformacional ordenado de espiral β (Figura 2.6).

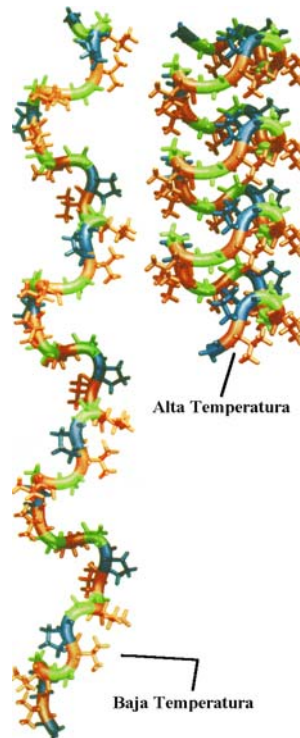


Figura 2.6: Represtación esquemático de la transición entre el estado extendido y el estado plegado.

A pesar de la peculiaridad de observar un aumento de orden al aumentar la temperatura, no contradice la segunda ley de la termodinámica, dado que el aumento de desorden del agua es mayor que el aumento de orden de la cadena: la entropía total del sistema crece.

Con vista a posibles modificaciones y aplicaciones prácticas, cualquier perturbación que interfiera o ayude a la estructuración del agua alrededor de los restos hidrófobos, actuará introduciendo términos de energía libre que facilitarán el plegamiento o desplegamiento de la cadena.

2.4.1 Contracción inducida por cambios en la temperatura.

El estado plegado en espiral β se denomina también estado II y el estado extendido, estado I. El comportamiento descrito en el punto anterior, desde el

punto de vista microscópico, tendrá importantes consecuencias a escala macroscópica. Mediante irradiación γ de una disolución de poli(VPGVG), se puede conseguir formar entrecruzamientos de los que se deriva una matriz insoluble con propiedades elastoméricas [9,41]. La matriz se denomina en la bibliografía X²⁰-poli (VPGVG), en referencia a la dosis de radiación usada (20 Mrad procedentes de una fuente de ⁶⁰Co) (Figura 2.7A).

La matriz polimérica así formada tiene el siguiente comportamiento: se hincha en agua a una temperatura por debajo de 20°C, y se contrae a menos de la mitad de su longitud anterior cuando la temperatura alcanza los 40°C. Evidentemente, esto debe ser el reflejo macroscópico del plegamiento inducido térmicamente de la cadena de poli(VPGVG). Si cuando está a 20°C a la matriz elastomérica se le cuelga un peso, cuando la temperatura se eleva a 40°C, se contrae y levanta el peso, y además al ser un proceso reversible se puede realizar en sucesivos ciclos de calentamiento enfriamiento como se muestra en la figura 2.7B. Este procedimiento, una contracción inducida térmicamente, lo podemos considerar como la conversión de energía térmica en trabajo mecánico útil - transducción termomecánica (Energía térmica \Leftrightarrow Trabajo mecánico). Este comportamiento de la matriz es el resultado del comportamiento individual de las cadenas del polímero. Por esta razón, una molécula de poli(VPGVG) puede considerarse como una *máquina molecular gobernada por calor* [9]. En cuanto a la eficiencia de esa máquina térmica es difícil determinar ya, por ejemplo para una banda elástica de este polímero, una transición endotérmica absorberá una cantidad de energía ΔH_1 y levantará un peso produciendo un determinado trabajo mecánico ΔW . Este trabajo es fácilmente cuantificable, pero la entalpía del proceso ΔH_1 no coincidirá con la que se pueda medir, por ejemplo mediante calorimetría diferencial de barrido ΔH_t , ya que el estiramiento de la banda elástica es un proceso exotérmico por la exposición de los restos apolares que tienden a hidratarse. Existen, de todas formas, algún otro tipo de cálculo para la eficiencia de la transducción químico-mecánica para estos polímeros [3].

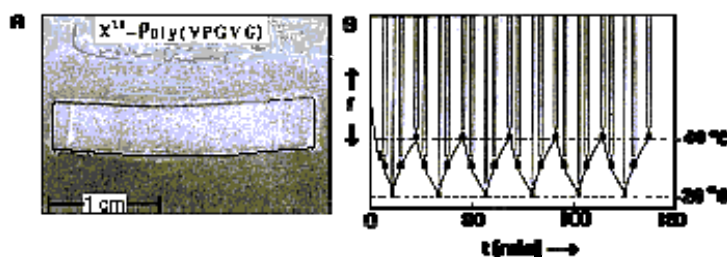


Figura 2.7: A) Banda elástica de X20-poli(VPGVG). B) Comportamiento de dicha banda con la temperatura [9].

En la figura 2.8 se muestra esquemáticamente alguna de las posibilidades de sistemas inteligentes basados en estos polímeros, que como hemos visto pueden tratarse de polímeros en disolución o formando un hidrogel, pero que también pueden encontrarse en otros sistemas como el de polímeros anclados a superficies o en capas sobre estas.

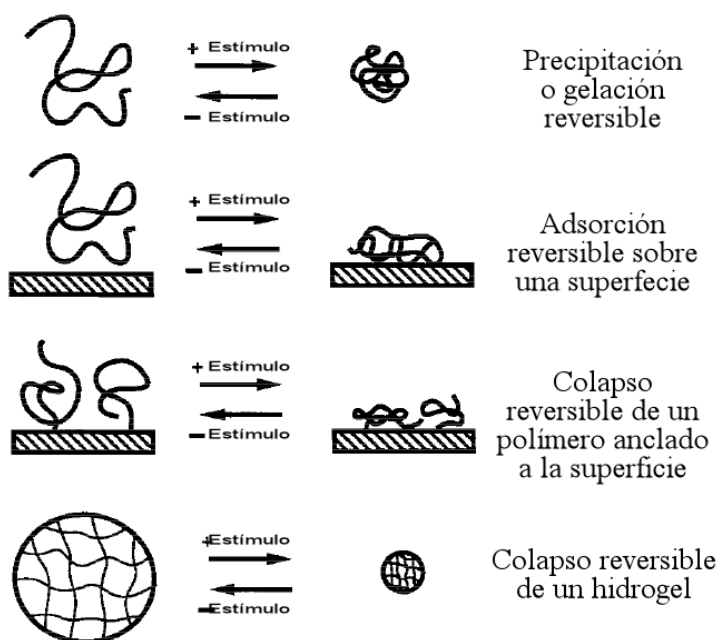


Figura 2.8: Diferentes sistemas inteligentes basados en polímeros tipo elastina [42].

La siguiente cuestión lógica en este momento, basándonos en este principio, ¿es posible diseñar máquinas moleculares de tipo químico-mecánico? La razón de hacernos esta pregunta, es que en el ser vivo se producen procesos de conversión energética como la aquí planteada; es decir, cierta forma de energía,

normalmente energía química, se transforma en trabajo mecánico útil. La respuesta a la anterior pregunta es afirmativa, y está fundamentada en la determinación de los factores químicos, mediante los cuales la temperatura del plegamiento y ordenación de la cadena de poli(VPGVG) pueda ser cambiada o controlada. Por ejemplo, si la temperatura de plegamiento de uno de estos materiales se sitúa por encima de la temperatura ambiente, las cadenas del material estarán desplegadas. Pero, si mediante modificación química de la cadena, la temperatura de plegamiento se desplaza a valores inferiores a la temperatura ambiente, entonces este material modelo se contraería sin haber sufrido cambios en la temperatura. En principio y basándonos en este tipo de materiales, es posible plantear el diseño de una máquina molecular gobernada químicamente.

Se ha demostrado que la temperatura de transición depende de la polaridad media de la cadena, con lo que si esta polaridad puede ser modificada como respuesta a un cambio de un estímulo tendremos un cambio en la temperatura de transición. Por tanto, una transducción entre la energía de ese estímulo y energía mecánica. Por ejemplo si el polímero tipo elastina contiene restos como por ejemplo la lisina o el glutamato que puedan estar en dos estados de polaridad distinta dependiendo del pH, es decir de la cantidad de protones del medio, tendremos una posible transducción químico-mecánica.

2.4.2 Las propiedades termodinámicas de la hidratación hidrófoba.

Un aumento en el agua de hidratación hidrófoba (o apolar) lleva a un plegamiento por asociación hidrófoba. Esto hecho se ha explicado utilizando los experimentos de J.A.V. Buttler de 1937 sobre la entalpía y entropía de series de compuestos orgánicos [43].

Los compuestos hidrófobos (apolares), como el aceite, están compuestos principalmente por grupos $-\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$. Cuando uno de estos grupos hidrófobos

está unido a un OH, como en el metanol $\text{CH}_3\text{-OH}$, este compuesto es totalmente soluble en agua. Al ir añadiendo más grupos hidrófobos en la serie $\text{CH}_3\text{-[CH}_2\text{]}_n\text{-OH}$ la cantidad de alcohol soluble en agua disminuye, de hecho el 1-octanol es totalmente insoluble en agua. Hasta que la insolubilidad ocurre existe agua alrededor de los grupos hidrófobos, llamada, de una forma que puede aparentar contradictoria, hidratación hidrófoba. Significativamente, la formación de la hidratación hidrófoba (disolución) ocurre con una entalpía ΔH negativa con lo que el proceso es exotérmico y una entropía ΔS negativa, con lo que hay un ordenamiento de las moléculas de agua. La forma en la que ΔH y ΔS entran en juego determina la solubilidad o insolubilidad de los grupos hidrófobos. La solubilidad en agua de estos compuestos apolares viene determinada por la energía libre de Gibbs ($G[\text{T,P,n...}]$) que es el potencial termodinámico que gobierna el proceso de disolución en sistemas a temperatura y presión constante. De esta manera para que se produzca la disolución el término $\Delta G_{\text{solubilidad}} = \Delta H - T\Delta S$ debe ser menor que cero. Para el caso de los alcoholes el término ΔH es negativo, con lo que contribuye a un aumento de solubilidad, pero el término $-T\Delta S$ es positivo contribuyendo de forma contraria, es decir, a una clara pérdida de solubilidad. Por lo tanto existirá un cierto valor de la temperatura (T_1) por encima del cual el compuesto se volverá insoluble. Basándose en los experimentos de Buttler [43] la adición de un CH_2 es un proceso favorable con una ΔH de unas -5.9 KJ/mol-CH_2 y un proceso desfavorable con un $-T\Delta S$ de $+7.1 \text{ KJ/mol-CH}_2$. De esta manera, insolubilidad se alcanza cuando son añadidas suficientes unidades de CH_2 debido al término mayor y positivo de $-T\Delta S$.

De igual forma, para los polímeros tipo elastina, éstos serán solubles en agua por debajo de la línea de coexistencia (línea T_1), donde los residuos hidrófobos están rodeados por agua de hidratación hidrófoba. Cuando el término positivo ($-T\Delta S$) se incrementa por encima del término negativo ΔH , simplemente debido a un incremento de T , la solubilidad se pierde y el polímero se pliega hidrofóbicamente y ensambla. El equilibrio o coexistencia se producirá para $\Delta G=0$,

es decir para $T_t = \Delta H / \Delta S$. Este T_t dependerá de la concentración y su representación se conoce como línea binodal, o línea- T_t (Figura 2.9).

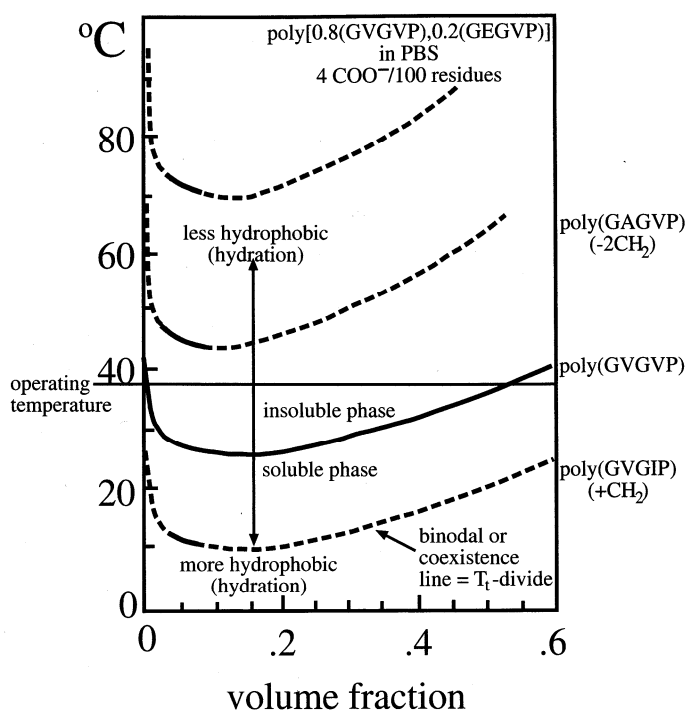


Figura 2.9: Diagrama de fases para varios polímeros tipo elastina, mostrando una curvatura invertida para la línea binodal o de coexistencia (línea $-T_t$). La solubilidad es por debajo y la insolubilidad por encima de la línea. Note que la adición de grupos CH_2 baja la curva T_t y la sustracción la sube [44].

La adición o eliminación de grupos CH_2 en el polímero, es decir el aumento o disminución de apolaridad, producirá una disminución o aumento en la curva T_t respectivamente, esto puede verse en el paso del polímero poli(GVGVP) al poli(GVGIP) o al poli(GAGVP) como puede verse en la figura 2.9. Este efecto de aumentar la T_t aumentando la hidratación hidrófoba puede ser conseguido no sólo por la adición de grupos CH_2 si no por otros muchos diferentes medios como protonaciones o desprotonaciones de los grupos laterales de los aminoácidos o posibles oxidaciones. En concreto, como se verá más adelante, esto ha permitido producir una escala de hidrofobicidad de aminoácidos basada en la T_t de polímeros con la forma poli(GXGVP) siendo X el aminoácido huésped (Tabla 2.1)

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

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

Se ha establecido otra escala de hidrofobicidad adicional no en función de la T_t si no de otra cantidad fundamental y más fiable, como es la energía libre de Gibbs de asociación hidrófoba ΔG_{HA} , que es el cambio de la energía libre por la sustitución de un aminoácido de referencia por otro aminoácido [45].

Por ejemplo, el paso de la adición de un CH₂ en la valina del pentapéptido (GVGVP) lo convierte en el pentapéptido (GVGIP), entonces a la temperatura de transición tendremos que

$$\Delta H_t(\text{GVGVP}) = T_t(\text{GVGVP}) \Delta S_t(\text{GVGVP}) \quad (2.1)$$

$$\Delta H_t(\text{GVGIP}) = T_t(\text{GVGIP}) \Delta S_t(\text{GVGIP}) \quad (2.2)$$

En las componentes de ΔH y de ΔS se pueden separar los efectos de la adición de CH_2 como

$$\Delta H_t(\text{GVGIP}) = \Delta H_t(\text{GVGVVP}) + \Delta H_t(\text{CH}_2) \quad (2.3)$$

$$T_t(\text{GVGIP}) \Delta S_t(\text{GVGIP}) = T_t(\text{GVGIP}) [\Delta S_t(\text{GVGVVP}) + \Delta S_t(\text{CH}_2)] \quad (2.4)$$

Y operando con estas ecuaciones

$$\Delta H_t(\text{CH}_2) - T_t(\text{GVGIP}) \Delta S_t(\text{CH}_2) = [T_t(\text{GVGIP}) - T_t(\text{GVGVVP})] \Delta S_t(\text{GVGVVP}) \quad (2.5)$$

Ya que, según los resultados de Butler, el primer término es negativo se tendrá que $T_t(\text{GVGIP}) < T_t(\text{GVGVVP})$, relación simple que como se menciona anteriormente puede ayudar a construir una escala de hidrofobicidad basada en T_t .

Partiendo de la ecuación (2.5) si se define $-\Delta G_{\text{HA}}(\text{CH}_2) = \Delta H_t(\text{CH}_2) - T_t(\text{GVGIP}) \Delta S_t(\text{CH}_2)$, (el signo menos se pone para hacer referencia a que se trata del proceso de asociación hidrófoba y no al de disolución) se puede escribir

$$\Delta G_{\text{HA}}(\text{CH}_2) = [T_t(\text{GVGVVP}) - T_t(\text{GVGIP})] \Delta S_t(\text{GVGVVP}) \quad (2.6)$$

Y en general para cualquier variación en el polímero,

$$\Delta G_{\text{HA}}(\chi) = [T_t(\text{ref}) - T_t(\chi)] \Delta S_t(\text{ref}) \quad (2.7)$$

Donde χ es una variable que desplaza T_t desde el estado de referencia (ref) del polímero modelo. $\Delta G_{\text{HA}}(\chi)$ es el cambio en la energía libre de Gibbs por la formación del estado hidrófobamente asociado del polímero modelo resultante de esa variable. Esta ecuación se puede poner también para $T = T_t(\text{GXGVVP})$ como $\Delta G_{\text{HA}}(\chi) = [\Delta H_t(\text{ref}) - \Delta H_t(\chi)]$, y por lo tanto, si se toma un estado de referencia como por ejemplo el del polímero poli(VPGGG); el cambio de energía libre de Gibbs de hidratación hidrófoba debido al paso al polímero poli(VPGXG), nos dará un valor de la hidrofobicidad del aminoácido X con respecto a la glicina, que es un aminoácido que solo contiene un hidrógeno en su resto lateral y por tanto no es considerado ni polar ni apolar. La escala de hidrofobicidad de los aminoácidos puede verse en la tabla 2.2

Tabla 2.2: Escala de hidrofobicidad en términos de ΔG_{HA} , para el aminoácido (X) para el polímero poli[fv(GVGVP), fx(GXGVP)] en 0.15N NaCl, 0.01 fosfato, extrapolando a $f_x=1$. T_b es la temperatura del onset de la transición [45].

Residue X	T_b (°C)	ΔG_{HA} (GXGVP) kcal/mol-pentamer
Trp	-105	-7.00
Phe	-45	-6.15
Tyr	-75	-5.85
His ⁰	-10 (T_t)	-4.80 (from graph)
Leu	5	-4.05
Ile	10	-3.65
Val	26	-2.50
Met	15	-1.50
His ⁺	30 (T_t)	-1.90 (from graph)
Cys	30 (T_t)	-1.90 (from graph)
Glu(COOH)	20 (2)	-1.30 (1.50)
Pro	40	-1.10
Ala	50	-0.75
Thr	60	-0.60
Asp(COOH)	40	-0.40
Lys(NH ₂)	40 (38)	-0.05 (-0.60)
Asn	50	-0.05
Gly	55	-0.00
Ser	60	+0.55
Arg	60 (T_t)	0.80 (from graph)
Gln	70	+0.75
Tyr(ϕ -O ⁻)	140	+1.95
Asp(COO ⁻)	170 (T_t)	\approx +3.4 (from graph)
Lys(NH ₃ ⁺)	(104)	(+2.94)
Glu(COO ⁻)	(218)	(+3.72)
Ser(PO ₄ ⁻)	860 (T_t)	\approx +8.0 (from graph)

2.4.3 Factores que producen cambios en la T_t .

Como se ha visto anteriormente pueden ser varios los parámetros con los que se puede modificar, premeditadamente, el valor de la T_t . Los parámetros químicos que puede modificar el valor de la T_t se pueden clasificar en extrínsecos e intrínsecos.

Dentro de los intrínsecos, están:

- La concentración del propio poli(VPGVG).
- El peso molecular.
- Cambios en la composición aminoacídica del poli(VPGVG).

- Cambios en el grado de ionización de cadenas laterales funcionalizadas. Los cambios en el estado de ionización estarían gobernados por cambios en el pH y otros factores.
- La fosforilación de cadenas laterales (como las de la serina) por quinasas.
- La oxidación o reducción de un grupo prostético que se ha pegado a la proteína sintética. Tal reacción puede llevarse a cabo por medios eléctricos, químicos o enzimáticos.
- Reacciones fotoquímicas en los cromóforos enlazados a la cadena.
- La propia longitud de la cadena polimérica.

Respecto a los cambios extrínsecos a la propia cadena podemos señalar:

- Los efectos de sales en disolución.
- Los efectos de solutos de tipo orgánico, incluidos detergentes iónicos o neutros.
- Los efectos de la presión.

2.4.3.1 Cambios químicos intrínsecos.

• *Efecto de la concentración.* Para concentraciones bajas del polímero, cuando la concentración del poli(VPGVG) aumenta, la temperatura de la transición disminuye [9,46]. Tal disminución alcanza un límite en aproximadamente 40 mg/mL. De forma general, la temperatura de transición se observa mediante la aparición de turbidez en la muestra. Tal turbidez está asociada a la presencia de cadenas en estado II que coalescen y se segregan de la disolución, y la T_t se define (dependiendo del autor) como la temperatura de comienzo de la turbidez (5%), o la del 50% del total de turbidez que mostrará la muestra. Los efectos de la concentración no se cifran sólo en un cambio en la T_t sino que también modifican el aspecto general de la transición. Ésta se produce de forma más rápida y en un intervalo más pequeño de temperaturas (Figura 2.10). Aparentemente, el plegamiento de cadenas es un fenómeno cooperativo.

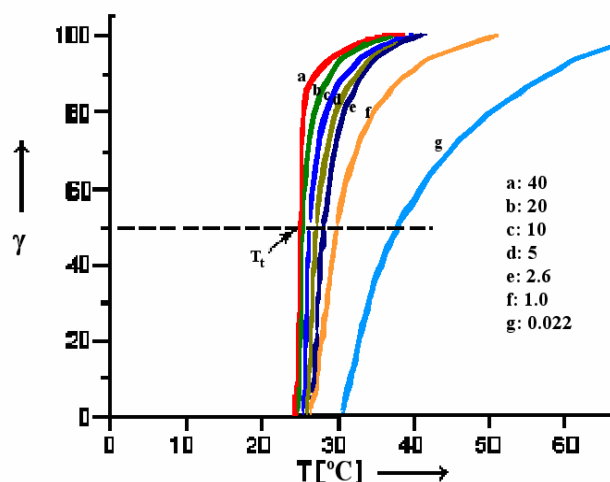


Figura 2.10: Ensayos de turbidez en los que se muestra la dependencia de la T_t con la concentración. En el eje vertical se muestra la absorción en % y las letras (a-g) indican la concentración de poli(VPGVG) en mg/mL [46].

Para concentraciones altas de polímero, superiores a 125 mg/mL, se ha observado, en experimentos de DSC, un aumento de T_t con la concentración (Figura 2.11) que tiene como posible explicación la competición por el agua de hidratación y la heterogeneidad de las estructuras de agua de hidratación hidrófoba [47].

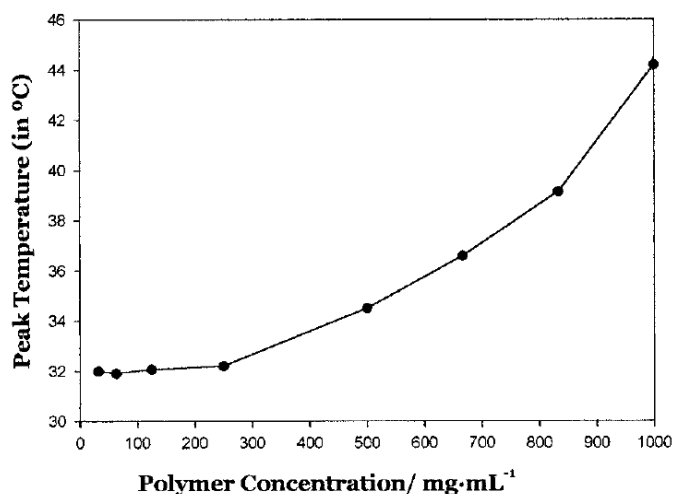


Figura 2.11: T_t en función de la concentración, obtenida como la temperatura de pico en ensayos de DSC sobre disoluciones de poli(VPGVG) con una velocidad de calentamiento de 5 °C/min [47].

- *Efecto del peso molecular.* No se han realizado muchos trabajos sobre la influencia de la longitud de la cadena en la temperatura de transición, en parte debido a la dificultad de obtener polímeros con un peso molecular bien determinado. Sin embargo, es de esperar que este parámetro tenga una influencia considerable en la T_t .
- *Efecto de la composición.* El efecto de cambiar la composición aminoacídica sobre la T_t , ha sido determinado para un gran número de aminoácidos como se ha mostrado en la tabla 2.1 dando lugar a una clasificación de los aminoácidos con su efecto sobre la T_t . La forma general del polipentapéptido sintetizado para acomodar los diversos aminoácidos es poli[$f_v(\text{VPGVG})$, $f_x(\text{VPGXG})$].

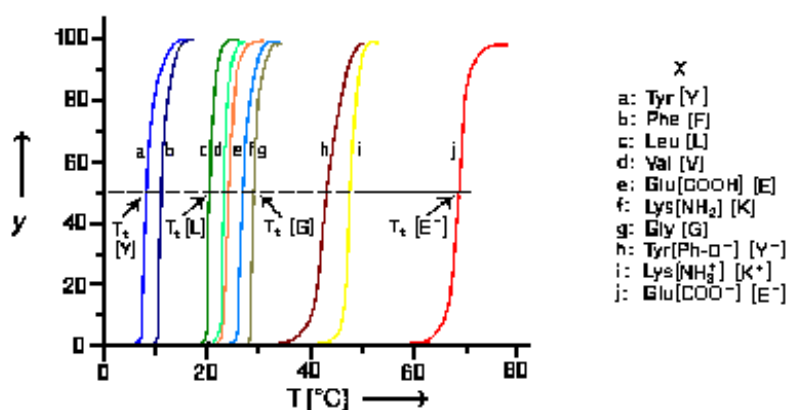


Figura 2.12: Experimentos de turbidez mostrando la dependencia de la T_t con la composición [48].

Tal material es un copolímero al azar de los monómeros (VPGVG) y (VPGXG) donde X representa cualquier aminoácido de los estudiados que, como vemos, sustituye a la segunda Val del pentapéptido original. f_v y f_x representan las fracciones molares de los respectivos co-monómeros ($f_v+f_x=1$). En la figura 2.12 se ha representado la situación de $f_x=0.2$; con una fracción de ese orden la influencia del correspondiente aminoácido es enormemente apreciable sin que la cantidad excesiva del monómero (VPGXG) impida la formación de la espiral β [49].

En la figura 2.13, se ve como tanto la presencia de un determinado aminoácido como el contenido de co-monómero (VPGXG) afectan al valor de la T_t [49]. La variación de T_t es lineal con el contenido del nuevo comonómero con lo que los valores de T_t para un determinado aminoácido (X) se obtienen por extrapolación $f_x=1$ (El resultado de la extrapolación de la figura 2.13 se puede ver en la tabla 2.1)

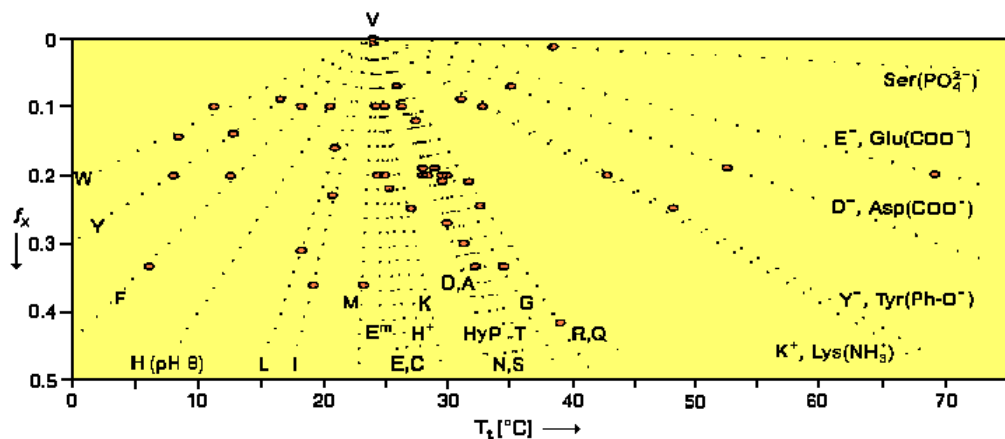


Figura 2.13: Dependencia de la T_t con la composición y contenido de distintos aminoácidos [49].

- *Efecto del cambio del grado de ionización por cambios de pH.* Una manera muy eficaz de elevar el valor de la T_t es aumentando el grado de ionización (α) de un resto aminoacídico como el de la $\text{Asp}(\text{COO}^-)$, $\text{Lys}(\text{NH}_3^+)$ o $\text{Glu}(\text{COO}^-)$. El más potente ha demostrado ser el $\text{Glu}(\text{E})$ (Figura 2.14) pues con una $f_x=0.2$ la transición se da a temperaturas tan altas que no se puede medir adecuadamente ($>80^\circ\text{C}$). Como se representa en la figura 2.14, el grupo carboxilo, mientras no está ionizado, no es capaz de romper la estructura tipo clatrato que rodea los restos apolares del polímero. Sin embargo, cuando el resto carboxilato está ionizado, rompe la estructura pentagonal del agua alrededor de los restos apolares, para construir su propia esfera de hidratación [50]. La disminución de esta agua de hidratación hidrófoba, como se ha comentado anteriormente, hace que aumente la solubilidad y en definitiva que aumente la T_t .

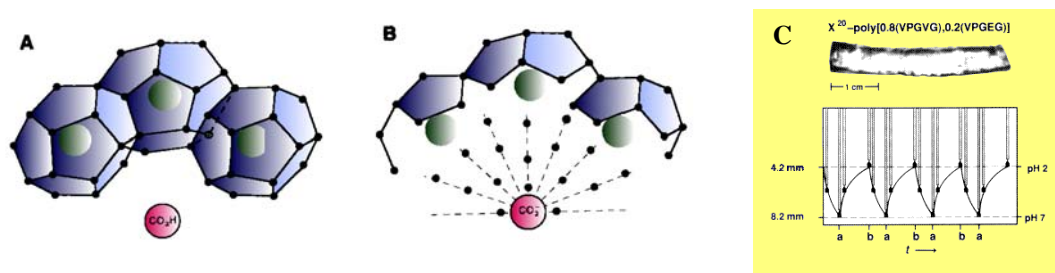


Figura 2.14: Interacción del grupo carboxilo con las estructuras de agua que rodean los restos apolares. **A)** pH alto. **B)** pH bajo [50]. **C)** Banda elástica de X20-poli[0.8 (VPGVG), 0.2(VPGEG)] y su comportamiento mecánico al cambiar el pH [9].

- *Efecto de la fosforilación de un resto de Serina.* Éste es el medio más potente que se ha encontrado para modificar el valor de la T_t . Es del orden de cuatro veces más potente que el observado para el $\text{Glu}(\text{COO}^-)$ si atendemos al valor de T_t extrapolado a $f_x=1$ que es del orden de 1000°C , mientras que para el $\text{Glu}(\text{COO}^-)$ es del orden de 250°C (Tabla 2.1). Desde el punto de vista de la biología, este hecho también aporta una interesante reflexión. Es sabido que muchos de los cambios en la forma de muchas proteínas para pasar de una forma inactiva a una forma activa, están producidos por la fosforilación de restos de serina. Habitualmente se asocia a las interacciones electrostáticas dicho cambio estructural pero, a la vista de estos resultados, la destrucción de la esfera de hidratación de restos apolares facilitando su interacción hidrófoba, se ha mostrado aquí como un principio muy poderoso en sistemas proteicos en medios acuosos.

- *Efecto de la reducción electroquímica o química de un grupo prostético.* A la vista de los resultados anteriores, cabe también esperar que la reducción de un fragmento químico, cambie los valores de la T_t en el polímero de este tipo al que está unido. Efectivamente, así ocurre con la reducción electroquímica de la N-metilnicotinamida (NMeN) unida a un resto de lisina, la cual disminuye significativamente el valor de la T_t . En la figura 2.15 vemos que el poli[0.73(GVGVP), 0.27(GK(NMeN⁺)GVP)] tiene una T_t a 48°C y, después de una reducción suave y parcial pasa a ser de 31°C . Cuando se extrapola a $f_x=1$ se

obtendría una T_t de 120°C para el estado oxidado y, asumiendo una reducción electroquímica completa (el resultado sería la 6-hidroxi N-metil-1,4,5,6-tetrahidronicotinamida), se obtendría una T_t de 37°C. Si la reducción no es completa, el resultado sería una T_t algo más baja, del orden de 0°C [51].

Una reducción con ditionito (que llevó el 60% de la $NMeN^+$ inicial a N-Metil-1,6-dihidronicotinamide) redujo la T_t de 49°C a 9°C [51]. Esta posibilidad es también muy potente; la variación en la T_t (ΔT_t) para la pareja redox del $NmeN$, es ligeramente mayor que el ΔT_t encontrado para la pareja ácido-base $Glu(COOH)/Glu(COO^-)$.

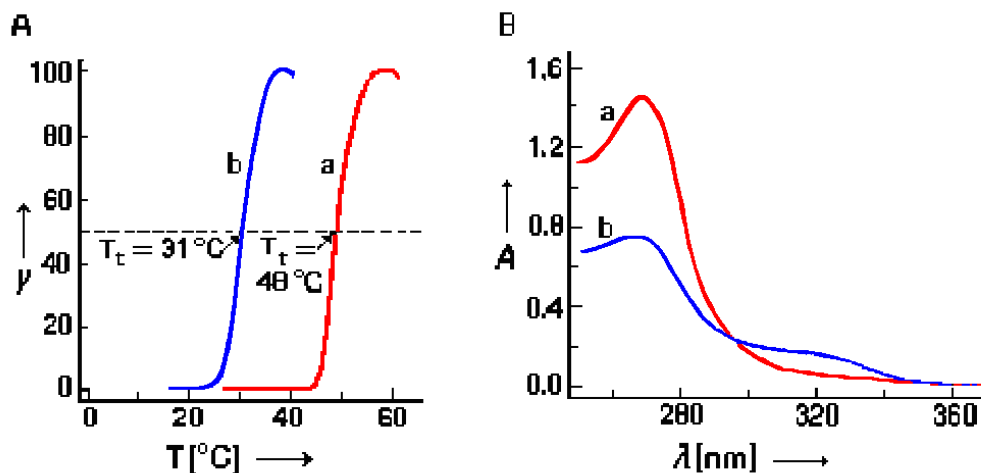


Figura 2.15: A) Dependencia de la T_t en el poli [0.73(VPGVG), 0.27(GKGVP)] con el estado de oxidación de los grupos K (NMeN). B) Espectro UV que permite calcular el grado de oxidación-reducción de los grupos NMeN (a; sin reducir, b; parcialmente reducido) [51].

Para producirse una oxidación o una reducción tiene que haber una liberación o una captación de electrones respectivamente, con lo cual estamos ante una transducción electro-mecánica.

- *Efecto de reacciones fotoquímicas.* No se han creado muchos polímeros basados en modificación fotoquímica, sin embargo la modulación fotoquímica puede dar lugar a muy diversas aplicaciones que usen sistemas que requieren ser

accionados de una manera externa tan simple como la iluminación con una determinada longitud de onda.

Estos sistemas se basan en los cambios que experimentan ciertos compuestos denominados fotocromáticos cuando son expuestos a una iluminación con una frecuencia determinada. Estos cambios pueden ser de diferentes tipos, como por ejemplo cambios de conformación o la formación o ruptura de ciertos enlaces químicos. Estas reacciones fotoquímicas pueden modificar la polaridad o hidrofobicidad de cadenas laterales fotoreactivas, o de cromóforos unidos a restos aminoacídicos en la cadena. Debido a que existen una gran variedad de estas sustancias se pueden producir efectos muy diferentes sobre la T_t . Entre las moléculas que se han utilizado hasta el momento para convertir al polímero tipo elastina en fotosensible se encuentran los grupos, azobenceno [52,53], el grupo cianamida ($H_5C_6-CH=CH-CO-NH-$) [54] o el grupo espiropirano [55]. El grupo azobenceno se puede utilizar para modificar un polímero tipo elastina de tal forma que este se convierta en la cadena lateral de ciertos aminoácidos específicos del polímero. Este grupo (ver figura 2.16A) puede estar un estado *cis*, más polar, o en estado *trans*, más apolar, dependiendo de las condiciones de iluminación utilizadas [52,53]. Otro ejemplo de modificación de la polaridad de un grupo fotoreactivo por motivo de una iluminación es el que utiliza el grupo espiropirano. Este grupo varía entre su forma espiro y su forma meriocianina (más polar) dependiendo de si se ilumina con luz ultravioleta o con luz visible [55].

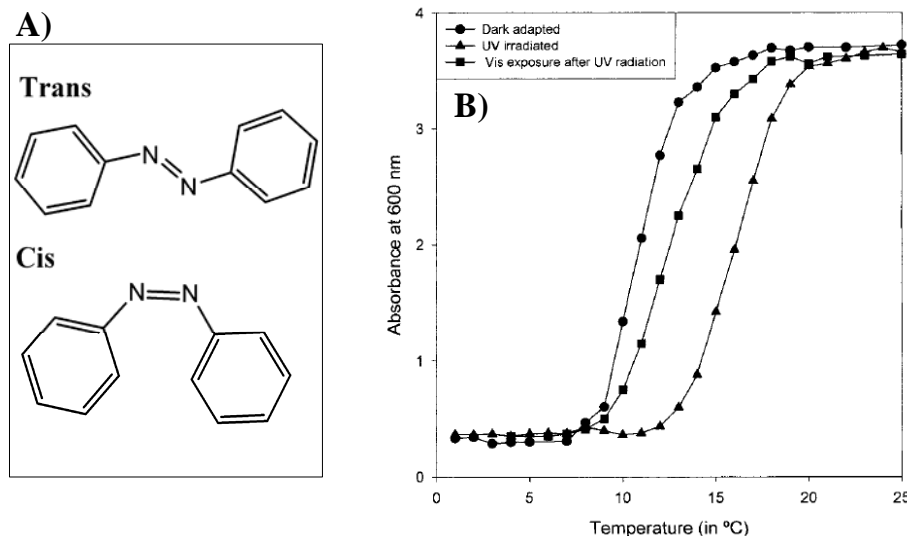


Figura 2.16: **A)** Estructura de los fotoisomero del grupo azobenceno. **B)** Perfil de turbidez, en diferentes estados de iluminación, del polímero poli[0.75(VPGVG), 0.15(VPGXG)] donde X es L-p-(fenilazo)fenilalanina [52,53].

En una utilización más avanzada de estos polímeros fotosensibles, se incrementa el efecto de los grupos fotocromicos haciendo uso de un mecanismo denominado ΔT_t -amplificado [56]. Con este mecanismo se puede aumentar el control y conseguir una mayor variación de la temperatura de transición sin la necesidad de aumentar el número de grupos sensibles. Este mecanismo ha sido probado con el polímero poli(0.8[VPGVG], 0.2[VPGXG]) donde X denota el grupo L-p-(fenilazo)-fenilalanina en presencia de α -ciclodextrina. La ciclodextrina es un oligosacárido cíclico que es capaz de formar complejos de inclusión con el isómero *trans* del grupo p-fenilazobenceno, pero no con el isómero *cis* debido a impedimentos estéricos (Figura 2.17A). Como consecuencia de la polaridad relativamente alta de la superficie exterior de la ciclodextrina, la cual es más alta que la del p-fenilazobenceno en ambas formas *trans* o *cis*, el cambio en polaridad entre el estado adaptado a la oscuridad (isómero *trans* introducido dentro de la ciclodextrina) y el iluminado con ultravioleta lleva a un amplificado ΔT_t (Figura 2.17B).

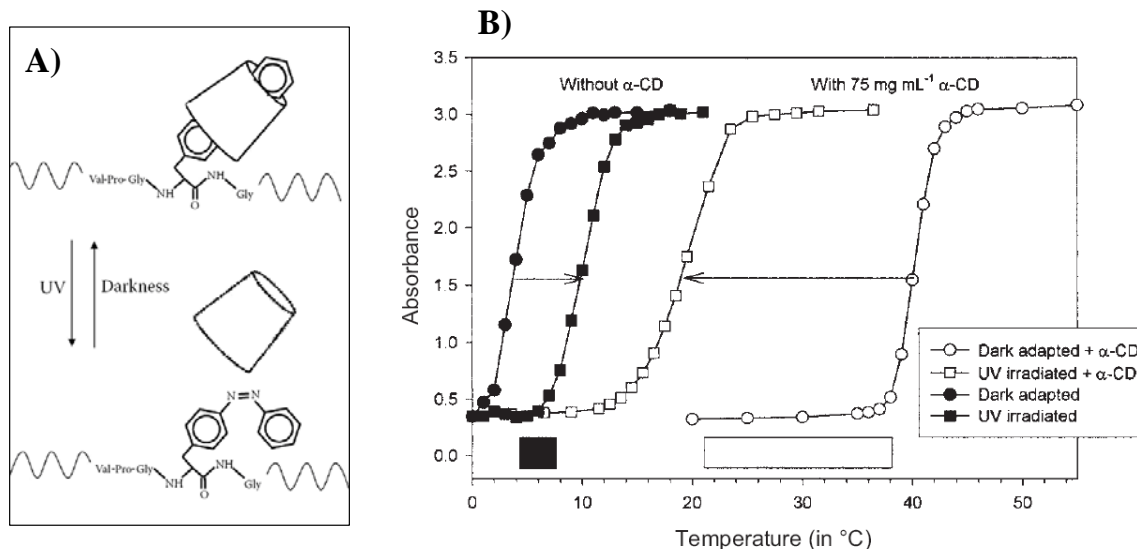


Figura 2.17: Mecanismo ΔT_t -amplificado. **A)** Diagrama esquemático entre el grupo azobenceno y la α -ciclodextrina. **B)** Perfiles de turbidez del polímero fotocromático que contiene grupos azobenceno en presencia y ausencia de α -ciclodextrina.

En todos estos casos, el estímulo que actúa es una radiación electromagnética, y el resultado es una contracción del polímero. Tenemos por lo tanto una transformación entre dos energías, o lo que es lo mismo, se trata de una transducción foto-mecánica.

2.4.3.2 Cambios químicos extrínsecos.

- *Efecto de las sales añadidas.* La transición inversa con la temperatura puede ser también isotérmicamente accionada por la adición de sales, y la respuesta de los polímeros tipo elastina a diferentes sales sigue las series de Hofmeister, la cual clasifica las sales de acuerdo a su habilidad para precipitar proteínas en disolución acuosa [9,57,58].

La sal más utilizada para disminuir la T_t es el NaCl, el cual hace disminuir el valor de la T_t a razón de aproximadamente 14 °C/N para el polímero poli(VPGVG). Este efecto fué el primero en probarse para los polímeros tipo elastina y es de gran importancia debido a la presencia de esta sal en los medios fisiológicos. Otras sales como el NaBr son menos eficaces, mientras que otras como el NaI y el NaSCN causan pequeños incrementos (Figura 2.18). Las sales

con mayores efectos son, normalmente, las poliiónicas como los carbonatos, sulfatos y fosfatos (Komostropos de las series de Hofmeister) [9]. La mayoría de estas sales tienen aplicación inmediata para conseguir plegamientos (agregación) a temperatura ambiente, aunque otras, como el NaI, podrían usarse para provocar desplegamientos (Figura 2.18). Sin embargo a pesar de que el efecto es conocido, no existe un entendimiento claro que explique su funcionamiento y es necesario un esfuerzo adicional para elucidar el mecanismo que causa esos efectos.

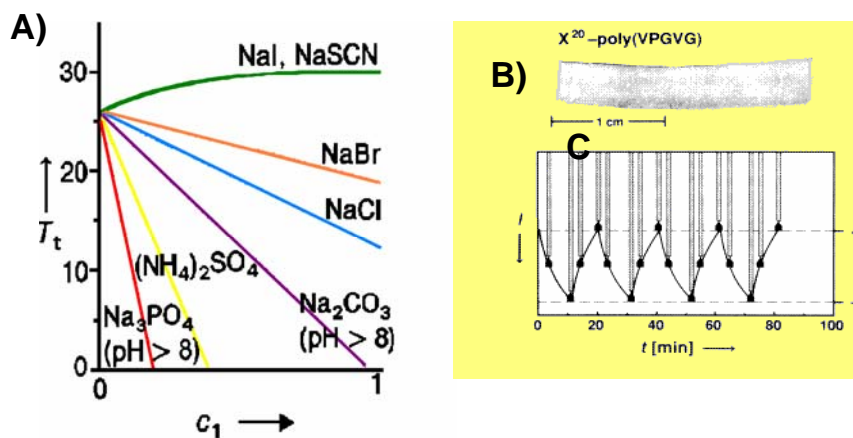


Figura 2.18: A) Dependencia de la T_t con la concentración de sales para diferentes sales. B) Banda elástica de X20-poli (VPGVG). C) Comportamiento mecánico de la banda con la concentración de sales en ciclos repetidos: + con sal presente y – con ausencia de sal [9].

Quando el polímero tipo elastina presenta grupos funcionales cargados (Lys, Glu...) el efecto de la sal es mucho mayor debido probablemente al apareamiento iónico entre estos iones y los grupos cargados, con lo que aumenta la apolaridad del polímero y por tanto disminuye la T_t . Este efecto es mucho mayor para concentraciones de iones bajas, por ejemplo para el polímero poli[0.2(GE⁻GVP), 0.8(GVGVP)] a bajas concentración de iones, la variación de T_t con la concentración de Na⁺ es entorno a 30 veces más pronunciada que para el poli(VPGVG) y más de 90 veces para el Ca²⁺ (Figura 2.19A). Si además se incluye un CH₂ adicional por pentámero el efecto del apareamiento iónico se incrementa produciendose una pendientes 50 veces mayor que para el

poli(VPGVG) con Na^+ y hasta cerca de 1000 veces para el Ca^{2+} (Figura 2.19B) [3].

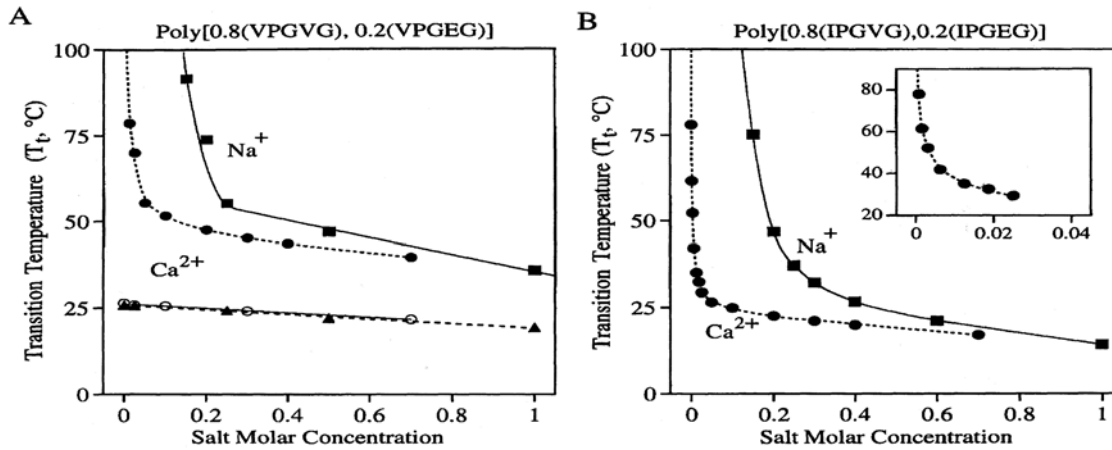


Figura 2.19: Dependencia de T_t con la variación de ión de sodio e ión de calcio para distintos polímeros tipo elastina conteniendo E. **A)** Gráficas superiores a pH 7 (E^-); líneas rectas pH 2 (E^0). **B)** Polímero conteniendo un CH_2 más por cada pentapéptido (pH=7) [3].

- *Efecto de solutos orgánicos.* La acción de los solutos orgánicos sobre el poli(VPGVG) tiene un espectro más amplio que la de las sales. Su correspondiente comportamiento puede verse en la figura 2.20A. Entre los que aumentan la T_t se encuentra el *dodecil sulfato sódico* (SDS), que es el soluto que mayor aumento produce en T_t con una variación de 600 °C/mol a 0.1M . Otros solutos que incrementan T_t son *cloruro de guanidino* (12 °C/mol a 0.3 M) o *urea* (5.5 °C/mol a 0.3M). Entre los que disminuyen el valor de T_t se encuentran el *trifluoroetanol* (-11°C , a 0.4M), *ácido trifluoro acético* y la *glicerina* (-2.2 °C/mol a 0.4M) [9].

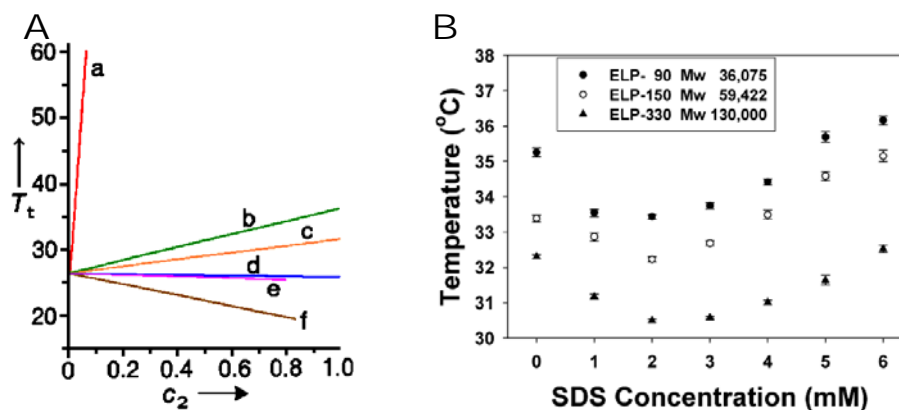


Figura 2.20: **A)** Dependencia de la T_t con la concentración de solutos orgánicos: a) Dodecil sulfato sódico, b) Cloruro de Guanidino, c) Urea, d) Etilén Glicol, e) Glicerina, f) Trifluoroetanol [9]. **B)** Dependencia con el dodecil sulfato sódico (SDS) a concentraciones muy bajas para tres polímeros tipo elastina de la forma $(GXGCP)_n$ donde X esta en la proporción $V_{0.5}A_{0.2}G_{0.3}$ y n toma el valor 90, 150 o 330 [59].

Algunos tienen incluso un comportamiento bifásico. Así, el *dimetil sulfóxido* y el *etilén glicol* a muy bajas concentraciones hacen aumentar el valor de la T_t y de forma progresiva lo disminuyen al aumentar su concentración. Incluso el SDS, que es el que mayor variación presenta, para concentraciones muy bajas (menores de 2mM) presenta una disminución de T_t como puede verse en la figura 2.20B.

2.4.3.3 Cambios de presión como factor extrínseco no químico.

Normalmente, los aumentos de presión elevarán el valor de la T_t (para presiones no muy altas), especialmente si en la cadena polimérica se han introducido aminoácidos aromáticos tales como Phe(F), Tyr(Y) y Trp(W) (Figura 2.21). Este efecto tiene su explicación en que el volumen ocupado por las moléculas de agua es menor cuando las moléculas están ordenadas alrededor de los restos aromáticos que cuando están desordenadas en la disolución. Entonces, de esta forma, la aplicación de presión favorecería la hidratación hidrófoba en vez del agua libre y por tanto llevaría a desplegamiento y la relajación de presión produciría contracción [60].

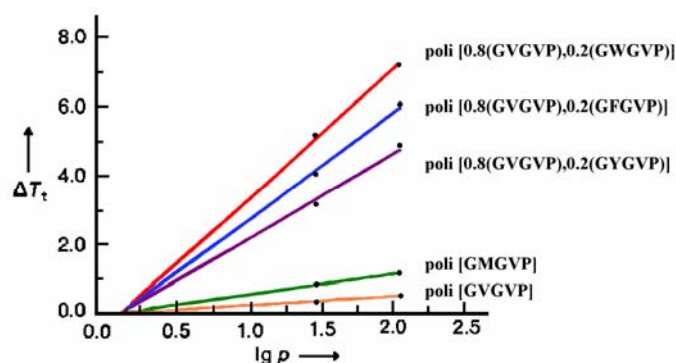


Figura 2.21: Dependencia de la T_t con la presión para el poli(GVGVP) y otros polímeros relacionados conteniendo restos aromáticos [60]. Los experimentos fueron hechos a 1.29, 29.7 y 115 atm. Las rectas indican un comportamiento lineal con $\log(p)$.

En unos experimentos posteriores, con el polímero $(VPGIG)_{40}$, se ha observado que para presiones mucho más altas, de hasta 400 MPa (3948 Atm), existe una inversión en la variación de T_t [61].

Como se puede ver en el diagrama de fase P-T (Figura 2.22A), desde presión atmosférica hasta 100 MPa, T_t aumenta con la presión. Sin embargo por encima de 200 MPa T_t disminuye con el aumento de presión, existiendo por lo tanto un máximo de T_t entre 100 y 200 MPa y un máximo en P_t (Presión a la que se produce transición) entre -10 y 0°C . Este comportamiento de T_t con la variación en presión para presiones altas es debido a la mayor compresibilidad del agua libre con respecto a la hidratación hidrófoba por lo que un aumento suficientemente grande de presión puede invertir el comportamiento inicial.

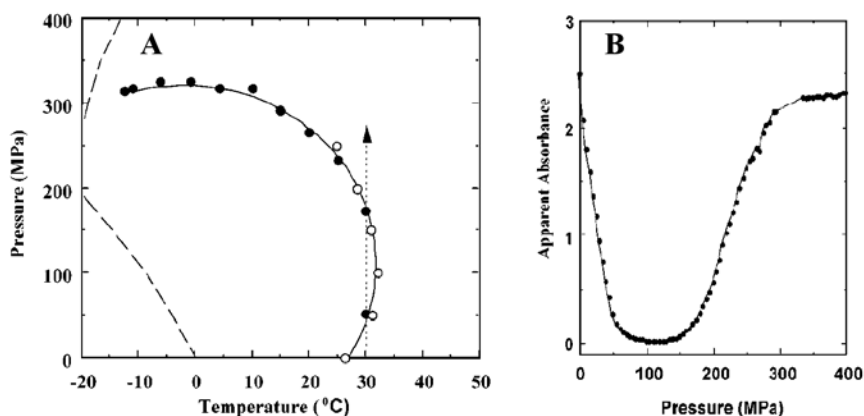


Figura 2.22: **A)** Diagrama T-P de cambio de fase, medido por turbidez (cloud point) para el $(VPGIG)_{40}$ (0.05w/v %). Símbolos abiertos, barrido en temperatura; símbolos cerrados, barrido en presión; línea discontinua, congelación del agua. **B)** Barrido en presión en la que se muestran dos transiciones para la disolución a 30 °C correspondiente a la línea punteada de la figura A [61].

Este caso de variación de T_t con la presión corresponde con una nueva transducción de energías denominándose en este caso transducción baro-mecánica.

2.5 El mecanismo ΔT_t y las conversiones de energía debido al acoplamiento entre grupos funcionales.

Hasta este momento, se ha visto como es posible la creación de trabajo mecánico como resultado del incremento de la temperatura por encima de una temperatura de transición, como puede ser por ejemplo el caso de la curva (a) de la figura 2.23 en la que, al movernos a la derecha de T_t , las moléculas pasan de un estado extendido en disolución a un estado ordenado y agregado, o si se trata de una matriz entrecruzada del polímero entre un estado hinchado (extendido) a un estado colapsado, con la consecuente realización de un trabajo mecánico. Estamos por tanto ante una transducción termo-mecánica.

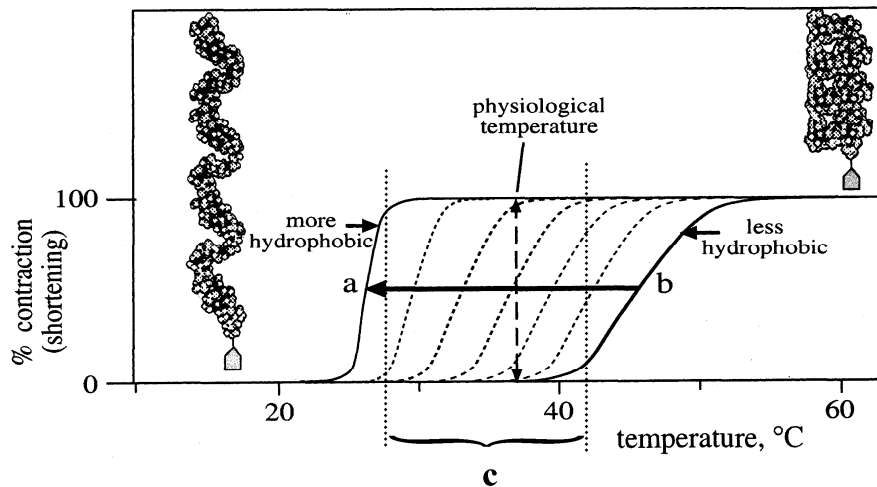


Figura 2.23: Realización de trabajo mecánico debido al mecanismo ΔT_t [62].

También hemos visto como existen diferentes métodos de modificar esta T_t , la mayoría de ellos tienen su base en la modificación de la polaridad de ciertos grupos funcionales, grupos que pueden existir en dos estados dependiendo de una cierta señal externa. Esta variación en T_t (ΔT_t) hace que la transición se desplace de la curva la (a) a la curva (b) en la figura 2.23, y dejando un intervalo (c), en el que existe una transición completa entre el estado extendido colapsado como consecuencia de un estímulo. Dependiendo de que tipo de estímulo sea tendremos una transducción entre un tipo de energía y la energía mecánica: transducción químico-mecánica, electro-mecánica, foto-mecánica, o baro-mecánica. En general podremos decir que estamos en el caso de motores moleculares alimentados por diferentes energías.

2.5.1 Acoplamiento entre grupos funcionales.

Para una misma molécula pueden existir varios tipos de grupos funcionales que presenten dos o más estados interconvertibles cada uno de ellos con diferentes hidrofobicidades. Esto abre la puerta a encontrar diferentes fenómenos acoplados entre estos grupos, es decir, que el estado en el que se encuentra uno de ellos dependa del estado en el que se encuentra otro de los grupos funcionales.

En la figura 2.24A se muestra una contracción accionada por protonación en la que la adición de protones (H^+) transforma los carboxilatos en carboxilos y produce transición con una forma similar a la contracción accionada térmicamente de la figura 2.23. Esta transición puede ser desplazada dependiendo de la polaridad del polímero como se ha podido demostrar en una serie de experimentos con los polímeros tipo elastina modelo conteniendo un ácido glutámico (E) cada 30 amino ácidos y con una cantidad variable, de fenilalaninas (F) (ver tabla 2.3 i-v). Se ha observado como el pKa del E aumenta con el número de fenilalaninas, es decir con la disminución de la polaridad del polímero [62,63]. Esto puede verse en la figura 2.24A, en la que el aumento de hidrofobicidad desplaza la curva de transición desde la curva (b) a la curva (a). El hecho de aumentar la cantidad de agua de hidratación hidrófoba alrededor de los carboxilatos del ácido glutámico (COO^-), el cual posee una hidratación hidrófila, hace que este tienda a protonarse y convertirse en carboxilo ($COOH$) para poder hidratarse de la misma forma y así disminuir su energía de repulsión polar-apolar, con lo que conlleva un aumento en el pKa. Una serie de experimentos similar ha sido realizada con polímeros que contienen lisinas en las que la adición de iones OH^- es la que lleva a contracción y en la que existe un desplazamiento de la región de transición con la polaridad del polímero [62].

Tabla 2.3: Polímeros tipo elastina con una cantidad variable de fenilalaninas, conteniendo ácido glutámico (i-v) y lisina-N-Metil-Nicotinamida, K[NMeN] (ii'-v').

Model elastic protein-based polymers			
Model Protein	i:	(GVGVP GVGVP GEGVP GVGVP GVGVP GVGVP) ₃₆ (GVGVP)	E/0F
Model Protein	ii:	(GVGVP GVGFP GEGFP GVGVP GVGVP GVGVP) ₄₀ (GVGVP)	E/2F
Model Protein	iii:	(GVGVP GVGVP GEGVP GVGVP GVGFP GFGFP) ₃₉ (GVGVP)	E/3F
Model Protein	iv:	(GVGVP GVGFP GEGFP GVGVP GVGFP GVGFP) ₁₅ (GVGVP)	E/4F
Model Protein	v:	(GVGVP GVGFP GEGFP GVGVP GVGFP GFGFP) ₄₂ (GVGVP)	E/5F
Model Protein	ii':	(GVGVP GVGFP GK[NMeN]GFP GVGVP GVGVP GVGVP) ₂₂ (GVGVP)	K/2F
Model Protein	iii':	(GVGVP GVGVP GK[NMeN]GVP GVGVP GVGFP GFGFP) ₂₂ (GVGVP)	K/3F
Model Protein	iv':	(GVGVP GVGFP GK[NMeN]GFP GVGVP GVGFP GVGFP) ₂₁ (GVGVP)	K/4F
Model Protein	v':	(GVGVP GVGFP GK[NMeN]GFP GVGVP GVGFP GFGFP) ₂₁ (GVGVP)	K/5F

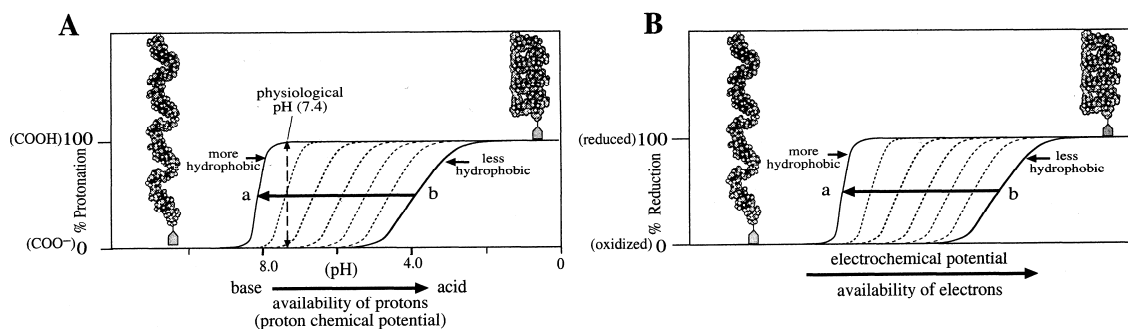


Figura 2.24: Dependencia de la hidrofobicidad en la transición en dos casos: **A)** Contracción accionada por protonación, y **B)** Contracción accionada por reducción. [3]

De forma similar en la figura 2.24B se muestra una contracción accionada por la reducción, y tiene una forma análoga a las anteriores. En este caso el aumento de electrones hace que la especie oxidada se reduzca y, como se ha explicado anteriormente lleva a una contracción del polímero. De nuevo el aumento de la hidrofobicidad, por ejemplo el aumento de fenilalaninas (ver tabla 2.3 ii'-v') en polímeros que contienen N-metil nicotinamida ($\text{NMeN}^+/\text{NMeN}$), desplaza la curva a zonas de menor potencial electroquímico, es decir que hace falta una concentración de electrones menor para llevar a la contracción.

En vez de aumentar la hidrofobicidad del polímero mediante la sustitución de sus aminoácidos por otros más apolares, es posible realizar un cambio de hidrofobicidad provocado por cualquier otra entrada de energía (χ) que mueva la zona de transición, y que por lo tanto puede usarse para cambiar la energía de un grupo funcional (a su vez capaz de cambiar el carácter de hidrofobicidad del polímero). Estas entradas de energía pueden ser cualquiera de las vistas anteriormente y que producen un cambio en la T_t , como por ejemplo la electromagnética (luz), la de presión-volumen actuando sobre los grupos aromáticos etc. En general, una entrada de energía en un primer grupo funcional (que conlleva un cambio en la energía libre del estado hidrófobamente asociado, ΔG_{HA}) causa un cambio en la energía de un segundo grupo funcional (que tendrá asociado otro $\Delta G'_{\text{HA}}$).

El polímero poli(GDGFP (GVGVP)₂ GFGVP GVGVP GVGK[NMeN]P) presenta dos grupos funcionales: el ácido aspártico (D) que puede encontrarse en dos estados, cargado o no dependiendo de la concentración de protones del medio, y el grupo nicotinamida [64]. Como consecuencia de la reducción de la nicotinamida por el incremento de electrones existe un aumento del pKa del carboxilo del ácido aspártico (Figura 2.25A). Si nos encontramos en un punto entre ambos pKa podremos captar o ceder protones. Se trata por tanto de una máquina molecular que produce una transducción electro-química.

Con un funcionamiento similar, el polímero (GVGVP GVGFP GEGFP (GVGVP)₂ GK[CnAm]GVP)₂₂, presenta dos grupos funcionales, el ácido glutámico (E⁻/E⁰) y el ácido cinámico [CnAm] anclado a la lisina. El cambio de conformación Cis/Trans del ácido cinámico conlleva un cambio de protonación del ácido glutámico (Figura 2.25B). Estamos por tanto ante una transducción foto-química.

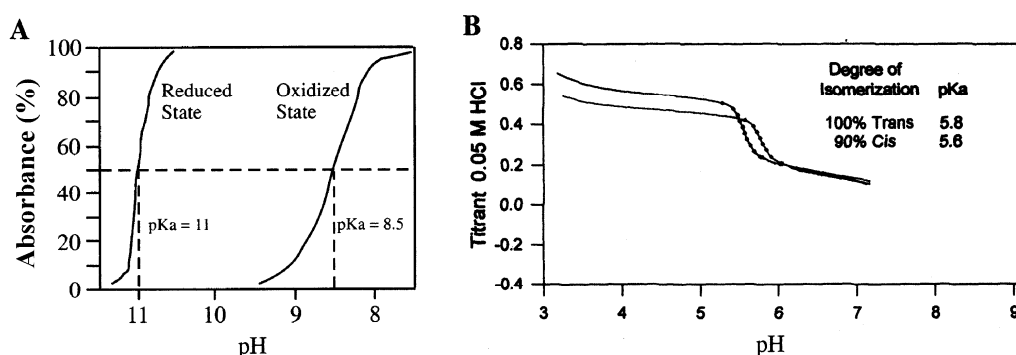


Figura 2.25: Diferentes conversiones energéticas. **A)** Conversión de energía eléctrica a energía química cuando el polímero presenta un par redox (NMeN⁺/NMeN) y un par químicamente protonable (D⁻/D⁰) [64]. **B)** Conversión de energía electromagnética a energía química para un polímero modelo que contiene ácido cinámico y ácido glutámico [54].

Cabe reseñar, también que el proceso es más eficiente cuando se encuentra en un estado más hidrófobo, ya que como se ha visto en las figuras anteriores la transición se produce en un intervalo más pequeño. Esto es debido a una cooperatividad positiva en la que la formación de hidratación hidrófoba favorece la aparición de más hidratación de ese mismo tipo y este mecanismo será, por

tanto, más evidente cuanto mayor capacidad tenga el polímero de hidratarse de esa forma.

2.5.2 Resumen de conversiones energéticas

La Figura 2.26 condensa el conjunto de diferentes formas de energía que pueden ser interconvertidas con los polímeros tipo elastina mediante el mecanismo ΔT_t , o lo que es lo mismo, mediante cambios en la energía libre de Gibbs de asociación hidrófoba. En esta figura se representa los pares de interconversiones de seis energías diferentes dando lugar a 15 pares de conversiones a las que habría que añadir las interconversiones entre los mismos tipos de energías. La interconversión energética debida a los pares desfosforilado/fosforilado y carboxilo/carboxilato daría lugar a una transducción químico-química, si incluyese dos pares redox se trataría de una transducción electro-electroquímica, o si fuese diseñado para responder a dos frecuencias distintas de radiación electromagnética, la absorción de una cambiaría la capacidad de absorción de la otra. En resumen, esto hace 18 clases de conversiones en pares posibles.

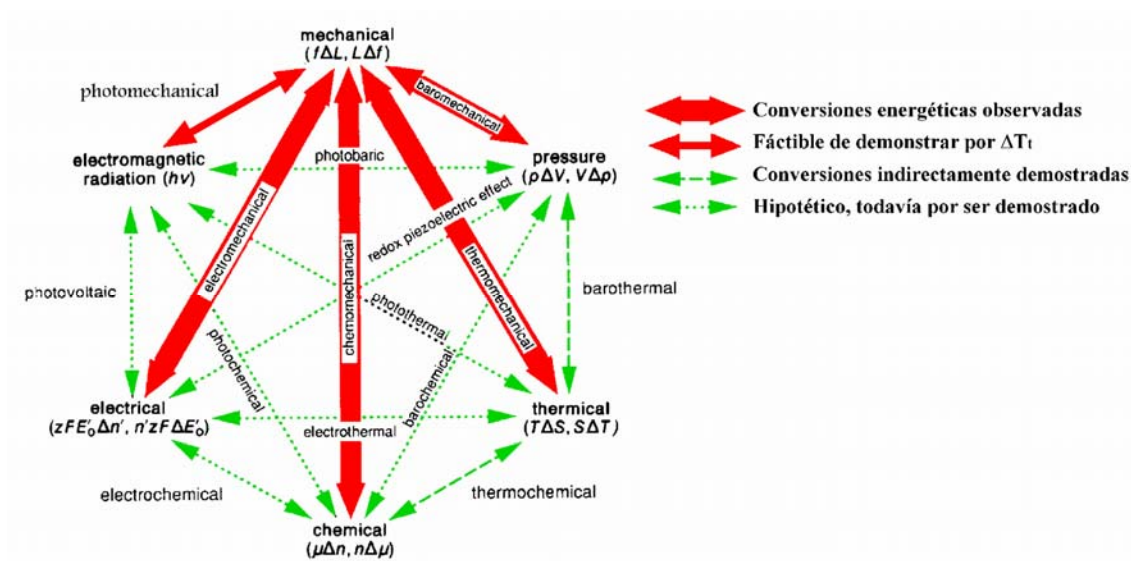


Figura 2.26: Diagrama de interconversiones energéticas para polímeros tipo elastina a partir del mecanismo ΔT_t [62].

Las conversiones que han sido demostradas hasta ahora aparecen representadas con flechas gruesas, y las demás quedarían por demostrar o podrían ser producidas indirectamente a través de una energía intermedia, como por ejemplo trabajo mecánico. Las transformaciones que aparecen aquí que no han sido comentadas hasta ahora son la mecano-térmica, en la que un estiramiento del polímero produce un efecto exotérmico por la hidratación de los grupos hidrófobos como fue explicado por Buttler [43]; la mecano-química en la que un estiramiento produce por ejemplo un desplazamiento en el pKa de un grupo carboxilo y por lo tanto la captación o liberación de protones (Figura 2.27) [65,66]; Mecáno-electroquímica, que todavía no se ha realizado pero es de esperar teniendo en cuenta la figura 2.24B; y la mecano-bárica en la que el estiramiento prevé una disminución en volumen debido a un aumento en el agua de hidratación hidrófoba que lleva a un estado de menor volumen.

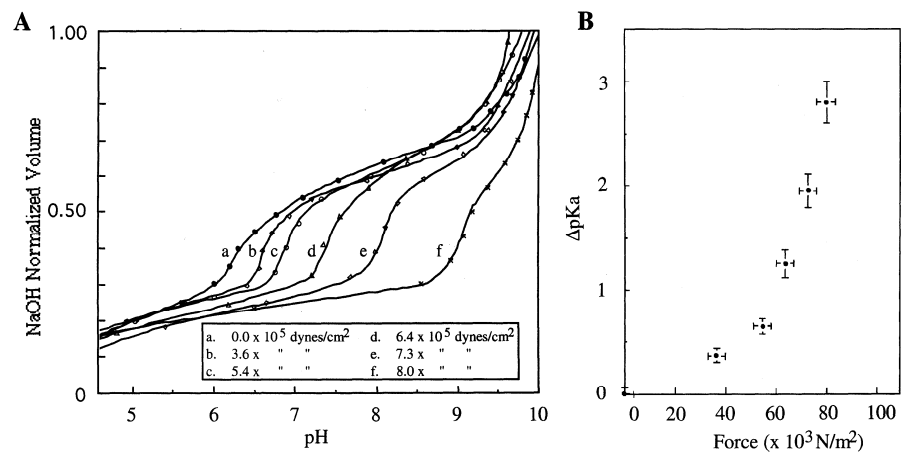


Figura 2.27: Transducción mecano-química. **A)** Valoración del polímero poli[0.82(GVGIP), 0.18(GEGIP)] a diferentes fuerzas de extensión. **B)** Estiramiento produce un aumento no lineal del pKa [66].

Estas transducciones energéticas son de gran importancia en multitud de sistemas biológicos en los que se producen transformaciones energéticas como por ejemplo en la de formación de ATP con la ATP-sintetasa en la que existe una transducción de energía electro-química a través de una asociación hidrófoba[67], o la utilización de este ATP en las distintas partes del organismo [3].

2.5.3 Axiomas de Urry sobre el comportamiento de polímeros basados en polipéptidos.

Como se ha visto anteriormente, la capacidad que presentan estos polímeros para realizar trabajo útil reside en la transformación que sufren en su estructura física. Esta transformación está caracterizada por un parámetro, la T_t , que a su vez está controlada por multitud de distintos parámetros físicos como acabamos de comprobar y que son la base de lo que hemos denominado, el mecanismo ΔT_t . La conclusión más importante es que se puede obtener trabajo útil a partir de múltiples formas o incluso realizar otras diferentes interconversiones energéticas. Este hecho es realmente útil ya que podemos diseñar un gran número de distintos tipos de polímeros, los cuales van a funcionar como máquinas moleculares, y que pueden además ser diseñados específicamente según las necesidades concretas de la aplicación deseada. El que la T_t dependa de tantos factores, y tan diversos, amplía el número de posibles aplicaciones y nos da, además, una gran flexibilidad a la hora de su diseño.

Todas las causas que producen una variación en la T_t tienen un importante punto en común, que es que actúan sobre la hidratación hidrófoba del polímero y la repulsión polar-apolar que se trata sin duda de la interacción predominante en medios acuosos. Entonces prácticamente todos los procesos que cambian la T_t lo que hacen es cambiar su hidrofobicidad. Por lo tanto, y debido a este punto en común, es posible formalizar en un conjunto de postulados todos aquellos sucesos relacionados con la variación en la T_t del polímero. El comportamiento de los polímeros tipo elastina y sus diferentes interacciones e interconversiones energéticas ha sido condensado en la bibliografía en una serie de postulados o axiomas que resumen de forma concisa gran parte del conocimiento adquirido hasta hoy en día [40]. Estos axiomas son de carácter general y válidos para la familia de polímeros basados en estructuras peptídicas en medios acuosos. Esta formalización ha sido realizada por Urry [40] en un conjunto de cinco postulados o axiomas:

Axioma 1: La forma en la que un residuo aminoacídico, o una modificación química de cualquier tipo, altera la temperatura de transición del plegamiento o asociación hidrófoba T_t es una medida funcional de su hidrofobicidad. Un descenso en la T_t representa un incremento en la hidrofobicidad y un incremento en la T_t representa un descenso en la hidrofobicidad.

Axioma 2: Cuando la temperatura excede la T_t se obtiene el estado de asociación hidrófoba o ensamblado, lo que puede ser usado para realizar trabajo mecánico útil (por ejemplo, elevar pesos). Esta transformación se puede denominar “termomecánica”.

Axioma 3: Sí existe la posibilidad de incrementar o disminuir la T_t por encima o por debajo de una determinada temperatura de trabajo; por ejemplo, cambiando la hidrofobicidad del material por cualquiera de las variables listadas anteriormente, esto también originará plegamientos y/o ensamblajes hidrófobos que pueden ser usados para obtener trabajo mecánico útil en condiciones isothermas.

Axioma 4: Cualquier pareja de grupos funcionales distintos, sensibles a las diferentes variables como la temperatura, la presión, los cambios en las concentraciones químicas, cambios en el estado redox de un grupo o el estado de iluminación, y que pueden ser usados para alterar la T_t con el fin de obtener trabajo útil como se recoge en el Axioma 3, pueden actuar conjuntamente y acoplarse para formar parte del mismo plegamiento hidrófobo o de ensamblado.

Axioma 5: Las conversiones de energía que establece el Axioma 4, se ha demostrado que son más efectivas cuando son realizadas bajo la influencia de dominios más hidrófobos.

Estos axiomas, de carácter empírico, regulan el comportamiento de los polímeros tipo elastina por medio de la ITT y pueden ser usados como modelos para el estudio del plegamiento y función de proteínas naturales. Además, son

también la base para el diseño de materiales inteligentes y biomiméticos, y de máquinas moleculares de interés en campos como el de la nanotecnología o el de la biomedicina.

2.6 Diseño de polímeros tipo elastina por tecnología de DNA recombinante.

Aunque inicialmente todos estos polímeros se han obtenido por síntesis química, las elevadas prestaciones requeridas hoy en día para las nuevas aplicaciones tecnológicas hacen inevitable que se requiera cada vez más una mayor precisión en la obtención del material a la par de un menor coste. Este requisito ha sido resuelto recientemente con la utilización de técnicas de ingeniería genética y biología molecular a la síntesis de polímeros [8]. Con estas técnicas, y gracias a la naturaleza polipeptídica de estos materiales, es posible la obtención de estos polímeros como “proteínas recombinantes” en organismos modificados genéticamente que pueden ir desde pequeños microorganismos como bacterias o levaduras [68] a macroorganismos como pueden ser las plantas [69].

La utilización de tecnología de DNA-recombinante permite la obtención de moléculas estrictamente monodispersas con un peso molecular definido que puede ir desde unos pocos cientos de daltons hasta más de 200KDa, y este límite está continuamente incrementándose. Esto abre la posibilidad de, por ejemplo y como se va a ver en este trabajo, estudiar de una forma simple y precisa la influencia del peso molecular en las diferentes propiedades del material. Además, existe un control absoluto en la arquitectura y secuencia molecular, de forma que permite la obtención de polímeros extremadamente complejos con, por ejemplo, la distribución de grupos funcionales en posiciones nanométricas precisas dentro de la cadena, o la obtención de polímeros con varias funcionalidades que se encuentran incluidas en monómeros complejos que no están limitados en tamaño [70]. Como ha planteado J. Bronowski “El problema moderno ya no es el diseño

de una estructura utilizando un material, si no el diseño de un material para una determinada estructura” [71]. De esta forma la no limitación en complejidad en estos polímeros permite el diseño *ad hoc* dependiendo de la necesidad planteada, cumpliendo con una de las grandes necesidades actuales.

Esta mejora en el control es de gran importancia tanto desde el punto de vista de las aplicaciones, como desde el punto de vista de su caracterización y conocimiento de su complejo funcionamiento. Adicionalmente, el aumento de complejidad, viene acompañado por una disminución en costes con respecto a la obtención mediante síntesis química, obteniéndose altos rendimientos de hasta 1.6 gramos por litro de medio de cultivo con un coste, a nivel de laboratorio estimado en 5 dólares por gramo [72], precio que se espera que disminuya notablemente en un futuro próximo [68]. Además estos materiales no utilizan petróleo para su síntesis, se utiliza únicamente agua como disolvente y son completamente biodegradables lo que les hace muy interesantes teniendo en cuenta consideraciones medioambientales.

La realización de esta tesis se encuentra precisamente en esta época de cambio en que las dos tecnologías de síntesis conviven. Esto ha permitido la observación de los cambios en las propiedades sufridas cuando se cambian parámetros como la polidispersidad, la aleatoriedad en las cadenas o el aumento de la aplicabilidad de estos materiales dentro de la ciencia de materiales.

2.7 Aplicaciones de los polímeros tipo elastina.

El grado de conocimiento alcanzado en la determinación de la estructura y las propiedades de estos materiales hace que nuevas aplicaciones estén apareciendo continuamente. De entre las propiedades más interesantes, es quizás la transición inversa con la temperatura la que conlleva una mayor dificultad de entendimiento, pero a su vez es la que más perspectivas de aplicación tiene. El conocimiento de los mecanismos ΔT_t descritos hasta este momento hace que los

sistemas diseñados puedan variar entre dos estados a través de sistemas estímulo-respuesta que produzcan diferentes interconversiones energéticas, mientras que el avance en biosíntesis hace que se puedan obtener, independientemente de la complejidad, casi cualquier polímero deseado. Podremos entonces diseñar esta nueva clase de materiales para que puedan ser útiles en una extraordinaria variedad de aplicaciones tanto biomédicas como no biomédicas, que han dado lugar ya unas cuantas patentes, a más de una empresa y a un buen número de aplicaciones contrastadas en el laboratorio, que parecen tener un futuro muy prometedor.

La buena biocompatibilidad de estos materiales hace del campo de la biomedicina una de las áreas donde más aceptación están teniendo. Entre las aplicaciones de biomedicina se encuentran la de materiales para ingeniería de tejidos, la dosificación controlada de fármacos, o la de sistemas de diagnóstico entre otras. Los polímeros para ingeniería de tejidos o medicina regenerativa, incluyen el uso de matrices elastoméricas como barreras para la prevención de las adherencias entre tejidos que aparecen en cirugía u otros traumas, o el desarrollo de matrices adecuadas para el crecimiento y proliferación celular. La segunda aplicación más importante es la dosificación controlada de fármacos en el interior del organismo. Esta aplicación, en general, hace uso de distintos medios para controlar la T_t y así poder liberar el fármaco de la forma prevista. Además, a parte de poder controlar la velocidad de degradación siguiendo el procedimiento convencional para estos sistemas, se pueden implicar en la liberación de estas sustancias muchas de las conversiones de energía libre que hemos estudiado. Por último los sistemas de diagnóstico se realizan en dispositivos miniaturizados conteniendo arrays de diferentes materiales, capaces de detectar distintas moléculas.

En las aplicaciones no biomédicas que se están desarrollando, el concepto de liberación de sustancias desde reservorios realizados con estos materiales se expande a la dosificación controlada de pesticidas. En el área de la robótica, estos

materiales se pueden comportar simultáneamente como sensores y como actuadores.

También presentan importantes propiedades como elementos nanotecnológicos, gracias a su autoorganización espontánea en nanopartículas inteligentes cuando la temperatura excede el valor de T_t . Además, la matriz elástica, siendo predominantemente de naturaleza elástica entrópica, tiene una durabilidad extraordinaria. Ya hemos mencionado que la elastina natural tiene una vida media en el organismo de 70 años soportando miles de millones de ciclos de extensión-relajación.

2.7.1 Aplicaciones biomédicas.

Para el uso de este tipo de materiales en aplicaciones biomédicas, la característica de más importancia es su biocompatibilidad. En general, los polímeros tipo elastina presentan una extraordinaria biocompatibilidad; por ejemplo el poli(VPGVG) ha sido expuesto a la batería completa de pruebas recomendadas por el ASTM (American Society for Testing Materials) para materiales y dispositivos en contacto con tejidos, fluidos de los tejidos y sangre [73]. El grado de biocompatibilidad es excepcional, y supera al que presentan biomateriales ya clásicos como la silicona y los poliuretanos. También supera aquellos implantes realizados con proteínas naturales tratadas, pues todos ellos presentan algún grado de sensibilización y respuesta alérgica del que carece el poli(VPGVG) y sus derivados. Pruebas en otros polímeros que surgen por la sustitución de alguno de los aminoácidos del poli(VPGVG) han demostrado también una extraordinaria biocompatibilidad [74]. El hecho de que para estos materiales no se hayan encontrado anticuerpos monoclonales ha sido explicado en términos de la transición inversa con la temperatura. Para el estado en espiral β más del 90% de su relajación mecánica se da a una única frecuencia de relajación ($\sim 3\text{KHz}$) Esta baja frecuencia realiza grandes contribuciones a la

disminución de la energía libre de la estructura y una interacción que interfiera con o que detenga tal movimiento, por ejemplo para identificarlo como epítipo, requeriría aumentar la energía libre. La necesidad de aumentar la energía para poder identificar este polímero elástico como extraño constituye un escudo entrópico que daría la impresión que este polímero es ignorado por el organismo [74].

2.7.1.1 Matrices para prevención de adherencias post-quirúrgicas.

Una complicación postoperatoria potencial a cualquier intervención es la formación de adherencias. Téngase en cuenta que sólo entre E.E.U.U. y Europa estamos hablando de $60 \cdot 10^6$ operaciones/año. El postoperatorio y las complicaciones derivadas de adherencias en muchas de estas intervenciones, complican el estado del paciente que se repondría mejor si se pudiera evitar el fenómeno de adherencia. Estamos hablando de encontrar un material que, interponiéndose entre los distintos tejidos, evitara o redujera drásticamente la adherencia. Las matrices elásticas de poli(VPGVG) y sus derivados se están ensayando con éxito en diferentes ensayos con animales:

El uso de X^{20} -poli(VPGVG) esterilizado con gas de óxido de etileno en un grupo de control grande, proco que el 80% no mostraran adherencias o mostraran adherencias mínimas. El buen comportamiento del material se pone de manifiesto por la ausencia de cápsulas fibrosas rodeando el material foráneo como reacción del organismo, no hay inflamación de la pared abdominal en contacto con el material, y la ligera adherencia que se puede formar se despega con una tracción muy suave [75].

2.7.1.2 Matrices de adhesión celular y reconstrucción tisular.

Mientras que las matrices de X^{20} -poli(VPGVG) presenta una adhesión celular prácticamente inexistente, es posible la obtención de matrices que tengan

un comportamiento totalmente opuesto mediante la incorporación de grupos funcionales intercalados que promuevan una clara adhesión. El primer diseño de estos materiales para ingeniería de tejidos es el que incluye la secuencia de adhesión celular RGD (Asp-Gly-Asp). Experimentos en la matriz polimérica X²⁰-poli[n(VPGVG), (GRGDSP)] han mostrado una gran eficiencia de este material para promover la adhesión y la proliferación celular [76]. Desde este material inicial estos polímeros han ido evolucionando con la incorporación de más funcionalidades que tienen como propósito la imitación de la matriz extracelular. Por ejemplo, la figura 2.28 muestra la secuencia de un polímero tipo elastina que incluye varias funcionalidades como son la de adhesión celular con la secuencia REDV (ArgGluAspVal) que es específica para células endoteliales (representada en verde en la figura), una secuencia para entrecruzamiento químico (en rojo), una base de pentapéptidos tipo elastina (azul), y un hexapéptido diana de proteasas (rosa) y que sirve para dirigir la reabsorción del polímero cuando este ya no es necesario [70].

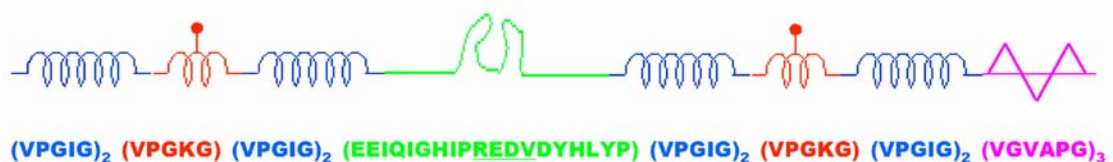


Figura 2.28: Secuencia monomérica de un polímero tipo elastina para ingeniería de tejidos.

La idea de los materiales para ingeniería de tejidos, ya no es sólo la creación de un material biocompatible y con unas ciertas propiedades mecánicas que remplace enteramente el tejido dañado del organismo, si no la de un material que interactúe con el organismo, por ejemplo promoviendo la proliferación celular, y que se encuentre en éste sólo durante un cierto tiempo, a modo de andamiaje, para ir siendo reemplazado paulatinamente por tejido natural que crece dentro del andamiaje a la vez que el material sintético se reabsorbe y se elimina.

2.7.1.3 Sistemas para la dosificación controlada de fármacos.

Los primeros polímeros tipo elastina diseñados para dosificación de fármacos eran simples dispositivos en los cuales un hidrogel de poli(VPGVG) con diferentes formas era cargado con un fármaco soluble en agua, y este fármaco era liberado por difusión [77]. Desde este sistema simple, que usa sólo la propiedad de la elevada biocompatibilidad, han sido desarrollados otros sistemas basados en el conocimiento de la transición inversa con la temperatura. La posibilidad de controlar la T_t en matrices bioelásticas, ofrece una oportunidad de utilizar un medio más eficaz para conseguir un determinado régimen de dosificación de medicamentos [77]. Con este objetivo se pueden introducir en la cadena polimérica relojes químicos con una determinada vida media, los cuales al hidrolizarse iniciarían la contracción o el hinchamiento por desplegamiento para producir la liberación de medicamentos. Por ejemplo, al funcionalizar el pentapéptido básico VPGVG con algunos ácidos glutámicos para entrecruzamiento del polímero los entrecruzantes forman carboxilamidas las cuales son capaces de hidrolizarse a una velocidad determinada liberando entonces las cadenas y por tanto el polímero [78]. Este sistema aparentemente simple de liberación basada en degradación es un poco más complejo y eficiente. Mientras los entrecruzantes estaban intactos el polímero se encuentra contraído por debajo de su T_t ; a medida que la hidrólisis tenía lugar en la superficie exterior del hidrogel, aparecen carboxilatos cargados lo que aumenta enormemente la T_t en esa zona (Figura 2.29) y por tanto la capa exterior del dispositivo se hincha y el fármaco de esa capa es liberado. Adicionalmente puesto que las cadenas del polímero liberadas son completamente solubles, rápidamente se diluyen y son reabsorbidas, asegurando siempre la presencia de una superficie siempre fresca del hidrogel, preparada para liberar más fármaco. Con este sistema se han conseguido cinéticas de liberación de aproximadamente orden cero y por tanto el funcionamiento del sistema es superior al de otros que carecen del mecanismo ΔT_t .

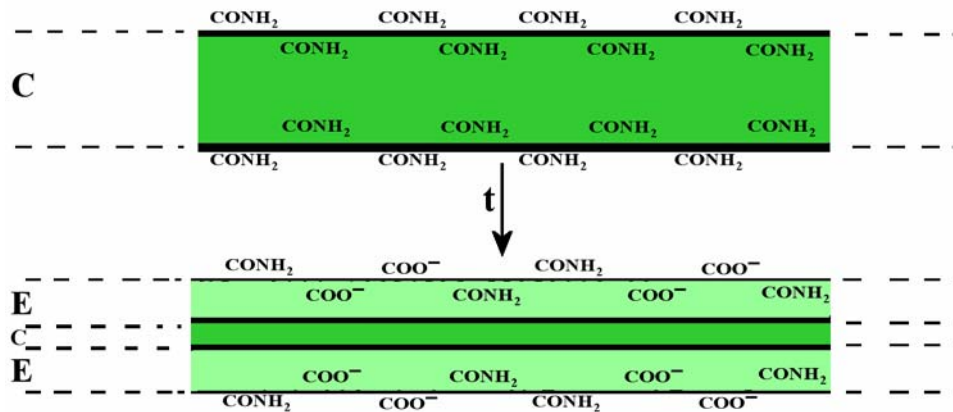


Figura 2.29: Matriz bioelástica (conteniendo carboxamidas) usada como vehículo en la dosificación de fármacos [78].

En un ejemplo diferente, se ha aprovechado la tendencia a formar nano- y micropartículas estables de algunos polímeros tipo elastina, en concreto los basados en el pentapéptido VPAVG (ver Figura 2.30). Estos sistemas, gracias a su ciclo de histéresis, pueden ser cargados de fármaco partiendo de una disolución a temperatura ambiente y elevando su temperatura por encima de la T_t . Una vez formadas las nano- y micropartículas están son fácilmente manipulables e inyectables debido a que no se desensamblan a no ser que se produzca un fuerte sobreenfriamiento [79].

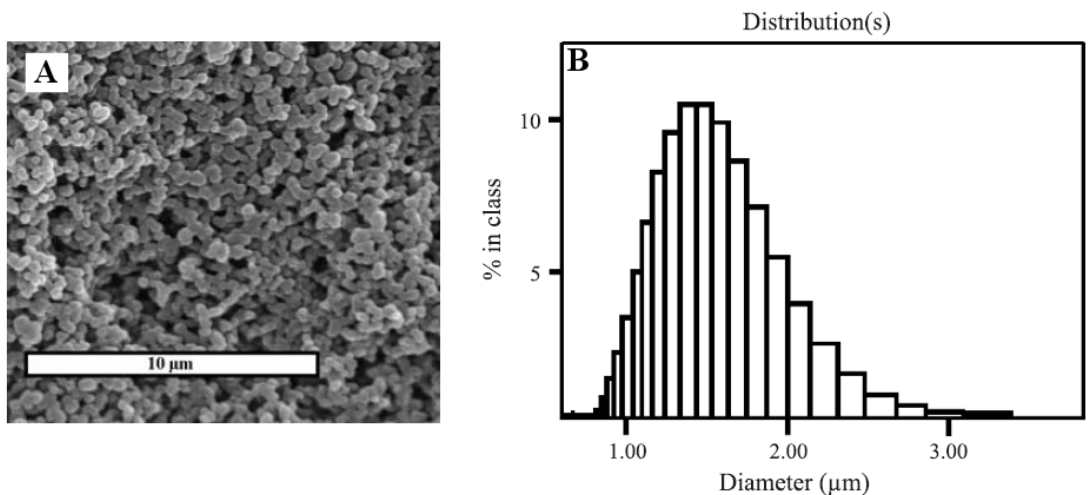


Figura 2.30: Formación de agregados del polímero poli(VPAVG) [79]. **A)** Imagen de SEM mostrando la forma y los tamaños de las partículas. **B)** Distribución de diámetros a 40°C.

Estos ejemplos están basados en simples formulaciones de polímeros que están aún lejos del potencial total de los polímeros tipo elastina para sistemas de dosificación de fármacos. Sus propiedades inteligentes y autoensamblado, tanto como un conocimiento más profundo de las bases moleculares de la ITT, han sido sólo marginalmente explotadas. Sin embargo nuevos sistemas están apareciendo en la bibliografía que muestran una tendencia decidida hacia el aprovechamiento de las características realmente especiales de estos materiales y la forma potente en la que ellos pueden ser producidos. Por ejemplo el grupo de Chilkoti [80,81] ha obtenido varios polímeros para dosificación de fármacos dirigida, en la que las dianas son los tumores sólidos en los que se produce una hipertermia local, y en su versión más sofisticada, una respuesta adicional ante cambios en el pH es usada para imitar las propiedades destructivas de virus y toxinas y así causar una dosificación intracelular del fármaco anticancerígeno o de un vector para terapia génica. Por otro lado, el progreso reciente en la comprensión de las características moleculares de la ITT ha permitido el desarrollo de sistemas avanzados para liberación más general de fármacos que ha conseguido una cinética de liberación de orden cero sin las preocupaciones causada por los diseños previos. Los materiales diseñados han sido polímeros tipo elastina conteniendo ácido glutámico como los mencionados previamente, en los cuales el microentorno altamente hidrófobo del grupo γ -carboxilo es mantenido mediante el correcto posicionamiento de fenilalaninas en la secuencia del polímero [74]. En condiciones neutras o básicas (incluyendo el pH fisiológico), los carboxilatos presentan una alta predisposición a neutralizar su carga por contactos de acoplamiento iónico con fármacos cargados positivamente de forma que disminuyan la polaridad del microentorno del carboxilo. Como resultado, este polímero puede formar agregados insolubles en condiciones neutras o básicas en presencia de fármacos de signo opuesto. Estos materiales se caracterizan por una gran índice de carga y tras implementación, la liberación del fármaco se produce lentamente según algunas moléculas se van escapando del

polímero en la superficie exterior del polímero. Esta velocidad de liberación puede ser ajustada mediante la modificación del entorno hidrófobo del grupo carboxilo con una elección adecuada de la secuencia del polímero. Una vez que el fármaco es liberado y la interacción es perdida, los grupos carboxilatos cargados aumentarán la T_t y el polímero se desplegará y se volverá soluble. Al mismo tiempo, la interfase entre el restante insoluble, aún cargado de fármaco, y el fluido del cuerpo, está continuamente renovándose sin cambiar las propiedades químico-físicas del sistema durante prácticamente todo el periodo funcional del sistema y resultando en una liberación casi ideal de orden cero. Otras versiones del sistema han sido realizadas con polímeros que contienen lisina en los cuales el grupo γ -amino tiene tendencia a neutralizarse con fármacos cargados negativamente [74].

A pesar de todos los casos que han aparecido en la bibliografía, existe aún un elevado número de posibilidades de diseño de sistemas para dosificación controlada de fármacos debido a todas las posibilidades que existen para la modificación de la T_t . Por ejemplo, el vehículo podría diseñarse para liberar su fármaco en respuesta a una anomalía química del tejido enfermo que estamos tratando. La capacidad para detectar la química alterada del tejido enfermo y responder con la liberación de un fármaco, se ha denominado el par diagnóstico-terapéutico. Las máquinas biomoleculares de 1^{er} orden (estímulo-respuesta) podrían actuar aprovechando la energía química que existiría por la diferencia en la concentración de una determinada sustancia en el estado enfermo, la cual podría disparar la respuesta mecánica del material y liberar el fármaco que corrija el desequilibrio. Así, como un cambio en el estado de oxidación puede usarse para producir una contracción o un hinchamiento, un sistema acoplado a un enzima redox como la glucosa oxidasa o la glucosa reductasa, podría detectar los cambios en la concentración de glucosa para liberar insulina en un diabético. La consecución de tal sistema sería el objetivo último de la dosificación de medicamentos, pues tal sistema sería capaz de actuar como lo hace el organismo,

el cual ejerce un férreo control sobre la liberación y distribución de sus propios agentes biológicos endógenos.

2.7.1.4 Purificación de proteínas recombinantes

Aunque esta no es una aplicación puramente biomédica, muchas de las proteínas que se purifican actualmente están relacionadas con algún tipo de terapia biomédica, ya sea como proteínas de soporte para ingeniería de tejidos, ya sea como proteínas (o enzimas) que tengan alguna actividad sobre el organismo. Los polímeros tipo elastina (ELPs) son un vehículo adecuado para la difícil tarea de la purificación de proteínas recombinantes. Esta purificación pasa por la ligación del gen que produce el polímero con el gen que produce la proteína deseada añadiendo entre los dos una secuencia que codifique una diana de corte de enzimas, la expresión de ese gen producirá una proteína de fusión que se podrá purificar por repetidos ciclos de centrifugación en frío y en caliente (ver figura 2.31). Posteriormente la proteína es separada del polímero mediante la acción de proteasas, y en la última centrifugación se extrae el polímero nuevamente por centrifugación.

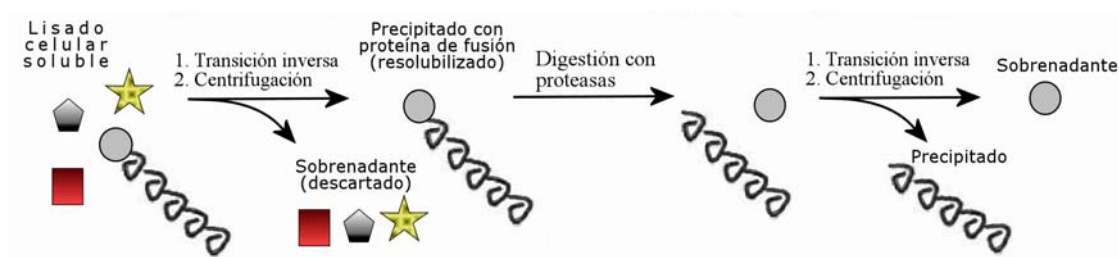


Figura 2.31: Esquema de la purificación de proteínas recombinantes mediante fusión con ELPs [82].

La utilización de este mecanismo conocido como “ciclos de transición inversa”, permite la purificación de proteínas recombinantes con mucha mayor pureza y rendimiento que otros métodos como pueden ser la separación por cromatografía. Hasta ahora se han obtenido por este método proteínas como cloramfenicol acetiltransferasa, proteína fluorescente azul, tioredoxina o calmodulina [82-84].

2.7.1.5 Dispositivos reversibles de diagnóstico bioanalítico

La inmovilización de proteínas en arrays de alta densidad es importante para el desarrollo de ensayos masivos de proteína para descubrimiento de fármacos, diagnóstico clínico y proteómica.

En una serie de superficies modificadas con polímeros tipo elastina (ELPs), se han descrito lo que se conoce como TRAP (*thermodynamically reversible addressing of proteins*) [85-87]. En estos sistemas el polímero es microestampado covalentemente en una superficie de vidrio con una superficie inerte. La superficie con ELP microestampado es incubado con una disolución de un polímero de fusión ELP- Thx, donde Thx es tiorredoxina y el ELP es exactamente el mismo que se encuentra microestampado en la superficie. La transición es activada por un estímulo externo como puede ser por incremento de temperatura o por adición de NaCl, implicando la captura el polímero de fusión. Si sobre la superficie se incubada con un anticuerpo monoclonal específico de la tiorredoxina (Thx-mAb) entonces este Thx-mAb se une específicamente a las regiones que fueron estampadas con el ELP (Figura 2.32). Un lavado con agua o tampón fosfato salino invierte la transición liberando el complejo ELP-Thx/Thx-mAb. Este sistema podría aplicarse a diferentes sistemas para aplicaciones bioanalíticas incorporado en sistemas de microfluidos o en chips de diagnóstico (lab-on-a-chip).

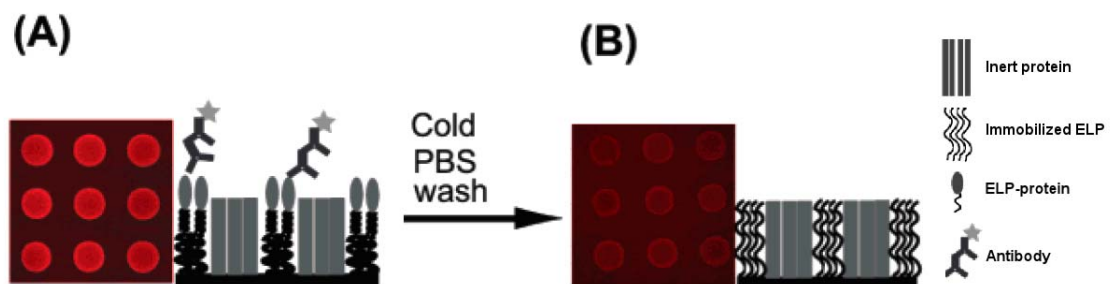


Figura 2.32: Sistema TRAP. Imágenes de fluorescencia confocal sobre puntos de $\sim 40\mu\text{m}$ de radio. **A)** Mostrando la captura de un anticuerpo específico de la tiorredoxina. **B)** Eliminación del complejo tras un lavado [85].

2.7.1.6 Cosecha de células

Como última aplicación de las citadas aquí de entre todas las posibles, cabe destacar la utilización de estos materiales como soporte para el crecimiento celular y una separación rápida conocida como cosecha celular (*cell harvesting*). Por ejemplo, el polímero $[(\text{GVGVP})_{10} \text{GVGVPGRGDSP} (\text{GVGVP})_{10}]_{18}$ ha sido utilizado para recubrir una superficie sobre la que se realiza el cultivo celular. Este polímero contiene secuencias de adhesión celular y se mantiene en estado colapsado a temperatura fisiológica [88]. Tras ser sembrado con células e incubado, éstas células comienzan a proliferar y terminan uniéndose para formar capas. Estas capas pueden ser separadas, para recuperar esas células, mediante la disminución de la temperatura por debajo de la temperatura de transición, lo que produce el hinchamiento del polímero y la liberación de las células. En la figura se puede ver la separación de una de estas capas de polímero mediante el procedimiento de cosecha celular.

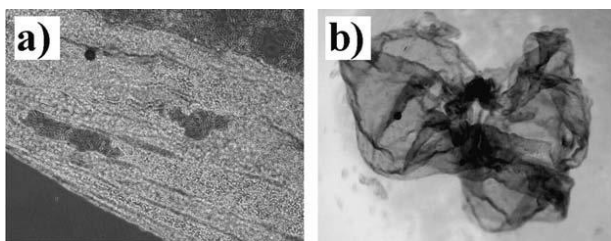


Figura 2.33: Imagen de una capa de células tras el enfriamiento por debajo de T_t . **a)** Al principio del separación. **b)** Capa totalmente despegada [88].

2.7.2 Aplicaciones no biomédicas.

2.7.2.1 Biomimetismo.

El biomimetismo se puede considerar como la técnica de imitar los procesos y materiales biológicos. Entre los propósitos de esta técnica estarían, por ejemplo, el conseguir un material de resistencia comparable a la de la seda de araña, o la durabilidad de un elastómero biológico, o la dureza del composite

cerámico de una concha marina, o la adherencia en agua de la proteína pegamento del biso de moluscos. Podría emplearse para diseñar andamios moleculares sobre los que construir tejidos, como ya se ha discutido, o para obtener máquinas moleculares con la miniaturización del motor rotativo flagelar, con su eficacia en la conversión energética como transductor químico-mecánico, con especificidad en su estímulo como se consigue al asociar enzimas o materiales fotosensibles, etc., con durabilidad al poder soportar muchos ciclos de uso y con la peculiaridad de utilizar nuevas fuentes energéticas [9].

2.7.2.2 Motores mecanoquímicos reversibles.

Un motor se puede definir como una máquina diseñada para la conversión de energía en movimiento mecánico útil. Cuando el movimiento o trabajo útil se consigue mediante el mecanismo del tipo ΔT_t de una máquina molecular de 1^{er} tipo, esta máquina sería, entonces, un motor mecanoquímico reversible. Esta máquina podría usar cualquiera de los factores extrínsecos o intrínsecos que son capaces de alterar la T_t y que ya hemos discutido. Por ejemplo, tal motor podría aprovechar la diferencia de concentración de sales entre el agua de un río y el mar para activar una turbina. Dado que el mecanismo de ΔT_t es reversible, podríamos actuar al revés y suministrar trabajo mecánico para conseguir separaciones químicas (por ejemplo, desalinización) [9]. Estos motores mecanoquímicos serían tan diversos como las distintas entradas químicas que podrían modificar la T_t .

2.7.2.3 Transductores.

En términos generales, un transductor es un dispositivo que es actuado por una fuente de energía (de potencia, en realidad) presente en un sistema, y suministra una cantidad proporcional de energía (de potencia, en realidad) del mismo o de otro tipo a un segundo sistema. Una máquina molecular del tipo que aquí se describe, sería un transductor y, de hecho, ya hemos empleado el término transducción de energía libre.

Cuando un dispositivo opera como lo hacen las bandas elásticas, estaríamos hablando de un transductor actuando a baja potencia debido al tiempo relativamente grande de su periodo de contracción, aunque se deberían estudiar qué procedimientos podrían acelerar este proceso.

De forma similar a la que en las aplicaciones médicas hablábamos del par diagnóstico-terapéutico, el mismo concepto aquí podría aplicarse a sistemas de control en robótica.

2.7.2.4 Superabsorbentes

Las bandas elastoméricas contienen normalmente un 60% de agua en peso en su estado colapsado, y pueden ser liofilizados para alcanzar un estado seco. Cuando pasan a su estado hinchado, sin embargo, pueden contener más del 90% de agua en peso. Por consiguiente, estos materiales son potenciales superabsorbentes los cuales pueden ser accionados por cualquiera de los medios que existen para controlar la temperatura de transición, es decir, estos instrumentos superabsorbentes presentan un control inusual sobre la transición del estado superabsorbente. Esta tecnología podría ser utilizada desde pañales superabsorbentes a recubrimientos para telas para prendas, en las que la humedad tiende a ir hacia las zonas más frías, el exterior [9].

2.7.2.5 Dispositivos en nanotecnología.

Diferentes aplicaciones entran dentro del campo de la nanotecnología, por ejemplo el hecho de que estos polímeros se puedan autoensamblar en diferentes estructuras puede abrir el paso para la realización de procesos litográficos en los que el polímero sirve como plantilla para la deposición de otros materiales. En otro ejemplo se podría modificar una superficie de forma controlada depositando el polímero con técnicas de micro-estampado (*microcontact printing*), de impresión de nanodibujado con AFM (*dip pen nanolithography*), para tener un control sobre parámetros como la hidrofobicidad, la altura o la actividad de

regiones determinadas de tamaño nanométrico donde se encuentra el polímero depositado.

A parte de la modificación de superficies, están teniendo una gran importancia los micro- y nanodispositivos como pueden ser los sistemas microfluídicos, los sistemas microelectromecánicos (MEM) o los dispositivos integrados en chip (lab-on-a-chip) [89]. Todos los instrumentos necesitan hacer uso de una gran cantidad de dispositivos para los cuales los polímeros inteligentes son muy apropiados, como son las nanoválvulas o los nanoactuadores que se accionan controlados por algún tipo de estímulo (eléctrico, luz, composición química...) o la necesidad de modificación de superficies con hidrofobicidad controlada para dirigir los líquidos o reactivos a través de sus conductos.

Por último el empleo de membranas con micro o nanoporos controlados externamente puede ser una aplicación donde estos materiales tengan un éxito asegurado.

2.8 Métodos termodinámicos de caracterización físico-química

En esta tesis se han utilizado diferentes técnicas de caracterización termodinámica de las más novedosas de las utilizadas actualmente. Daremos aquí una pequeña descripción de dos de estas técnicas, como son los cálculos de cinéticas de reacción, que se aplican en este caso a una transición de fase reversible, y la calorimetría diferencial de barrido con modulación de temperatura.

2.8.1 Cinéticas de reacción

Las cinéticas de reacción química (equivalentes a las cinéticas de cristalización, de degradación, de cambio de fase o de transformación en general) son el estudio de las velocidades a las que tienen lugar esos procesos [90,91].

Aunque existen muchas razones para cuantificar la velocidad de una reacción química o transformación, dos sobresalen como particularmente importantes. La primera razón es la de parametrizar la velocidad de reacción como una función de variables de estado tales como la temperatura, presión y concentración. De este modo, la velocidad de reacción puede ser predicha para cualquier conjunto de condiciones, independientemente de si la velocidad ha sido realmente medida bajo esas condiciones. La exactitud de la predicción depende de la forma funcional usada para la parametrización y de lo cerca que estén el conjunto de condiciones de las usadas para determinar los parámetros. La segunda razón para llevar a cabo los estudios de cinéticas es la de obtener información sobre cual es el mecanismo de reacción o transformación que tiene lugar. Desde este punto de vista, uno de los principales inconvenientes de las cinéticas de reacción es que ningún mecanismo de reacción puede ser probado a partir exclusivamente de datos cinéticos [92], sin embargo este estudio es muy útil para trazar unas conclusiones razonables sobre el mecanismo [93]. Es esta segunda importante razón, la de intentar elucidar un mecanismo de reacción, la que ha motivado en este trabajo la utilización del estudio de cinéticas a la transición inversa con la temperatura en los polímeros tipo elastina.

Por propósitos prácticos, todas las reacciones que se estudian con métodos de cinéticas de reacción deben estar activadas por un estímulo externo. La activación térmica es con mucho el método más común, pero otros medios tal como la fotoactivación, aplicación de presión, campo magnético y potencial electromecánico también han sido aplicados. Las técnicas más comunes empleadas en estudio de cinéticas de reacciones activadas térmicamente son termogravimetría (TG) que mide cambio en masa, calorimetría diferencial de barrido (DSC) que mide la entalpía, y análisis térmico diferencial (DTA) que mide un cambio en temperatura. Estas técnicas son ampliamente aplicadas a muchos tipos de reacciones pero no son químicamente específicas en términos de detección en sistemas complejos o multi-paso, por esta razón estas técnicas

suelen estar combinadas con detecciones químicamente específicas tales como espectroscopia de infrarrojo, espectroscopia de masa, cromatografía de gases, difracción de rayos X (XRD) entre muchas otras. Estas cinéticas de reacciones estimuladas térmicamente son estudiadas normalmente bajo dos tipos de condiciones, las isotérmicas o las no isoterms (con calentamiento usualmente lineal). El mayor problema de los experimentos isotermos es que la muestra requiere un cierto tiempo para alcanzar la medida experimental, y durante este periodo de calentamiento, la muestra experimenta parte de la transformación que es probable que afecte al resultado total del análisis cinético. La situación es especialmente grave por el hecho de que bajo condiciones isotermas, un proceso típico de estado sólido tiene un máximo de velocidad de reacción al principio de la transformación. El calentamiento no isotermo, como puede ser el de un programa lineal de temperaturas, resuelve estos problemas y esto ha hecho que los estudios de cinéticas que se realizan hoy en día tiendan a ser de este tipo. Por este motivo, el cálculo de las cinéticas de transición en los polímeros tipo elastina se van a llevar a cabo utilizando un calentamiento no isotermo.

El cálculo de las cinéticas no-isotermas proviene de una extensión del formalismo de cinéticas isotermas. Si usamos α como la variable que denota el grado de conversión (que puede tratarse de grado de reacción, de transformación o de transición dependiendo de que tipo de cinéticas estemos observando), con $\alpha = 0$ antes de producirse la reacción y $\alpha = 1$ cuando la reacción o la transición este completa, entonces la ecuación general de cinéticas puede escribirse en la forma:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha) \quad (2.8)$$

Donde t el tiempo, T la temperatura, $k(T)$ es la constante de Arrhenius (es constante para una temperatura dada) y $f(\alpha)$ es una función llamada el modelo de reacción [90], el cual describe la dependencia de la velocidad de conversión con el grado conversión. En reacciones o transiciones de fluidos $f(\alpha)$ suele describir

la dependencia de la velocidad con la concentración de reactivos o productos. Sin embargo, en medios más complejos como sólidos o geles, donde el movimiento molecular está más restringido y las reacciones dependen de la estructura y actividad local, el concepto de dependencia con la concentración es mucho menos útil. Por lo tanto el modelo de reacción $f(\alpha)$ usualmente juega el papel de función empírica, apareciendo en muy diversas formas como puede verse en la tabla 2.4 y donde $g(\alpha)$ se utiliza en algunos casos cuando la ecuación (2.8) es escrita de la forma

$$g(\alpha) = \int_0^{\alpha} [f(\alpha)]^{-1} d\alpha = k(T)t \quad (2.9)$$

Tabla 2.4: Conjunto de modelos de reacción utilizados para describir la cinética de reacción en sistemas de fase condensada [90,91].

	Reaction model	$f(\alpha)$	$g(\alpha)$
1	Power law	$4\alpha^{3/4}$	$\alpha^{1/4}$
2	Power law	$3\alpha^{2/3}$	$\alpha^{1/3}$
3	Power law	$2\alpha^{1/2}$	$\alpha^{1/2}$
4	Power law	$2/3\alpha^{-1/2}$	$\alpha^{3/2}$
5	One-dimensional diffusion	$1/2\alpha^{-1}$	α^2
6	Mampel (first order)	$1 - \alpha$	$-\ln(1 - \alpha)$
7	Avrami-Erofeev	$4(1 - \alpha)[- \ln(1 - \alpha)]^{3/4}$	$[- \ln(1 - \alpha)]^{1/4}$
8	Avrami-Erofeev	$3(1 - \alpha)[- \ln(1 - \alpha)]^{2/3}$	$[- \ln(1 - \alpha)]^{1/3}$
9	Avrami-Erofeev	$2(1 - \alpha)[- \ln(1 - \alpha)]^{1/2}$	$[- \ln(1 - \alpha)]^{1/2}$
10	Three-dimensional diffusion	$2(1 - \alpha)^{2/3} (1 - (1 - \alpha)^{1/3})^{-1}$	$[1 - (1 - \alpha)^{1/3}]^2$
11	Contracting sphere	$3(1 - \alpha)^{2/3}$	$1 - (1 - \alpha)^{1/3}$
12	Contracting cylinder	$2(1 - \alpha)^{1/2}$	$1 - (1 - \alpha)^{1/2}$
13	Second order	$(1 - \alpha)^2$	$(1 - \alpha)^{-1} - 1$

Para la mayoría de reacciones la ley de Arrhenius provee una buena descripción de la dependencia con la temperatura, siendo $k(T)$

$$k(T) = A \cdot \exp\left(\frac{-E}{R \cdot T}\right) \quad (2.10)$$

donde R es la constante de los gases y A y E son los parámetros de Arrhenius, el factor preexponencial y la energía de activación, respectivamente [94,95]. Para condiciones no-isotermas se puede eliminar la dependencia con el

tiempo de la ecuación de cinéticas utilizando el parámetro velocidad de calentamiento $\beta = dT/dt$, con lo que la ecuación (2.8) queda de la forma

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{A}{\beta} f(\alpha) \cdot \exp\left(\frac{-E}{R \cdot T}\right) \quad (2.11)$$

La utilización de la ecuación de Arrhenius ha sido criticada en la bibliografía para el caso de sistemas no homogéneos [96] sin embargo su utilización ha sido muy exitosa en la descripción de la dependencia con la temperatura de muchos procesos físicos no homogéneos activados térmicamente, como por ejemplo nucleación y crecimiento o difusión [97], esto es debido probablemente a que, en los casos utilizados, el sistema debe superar una barrera de energía potencial, y a que la distribución de energías esta gobernada por una estadística de Maxwell-Boltzmann lo que permite la utilización de una teoría clásica. También se ha demostrado que, incluso para algunos casos con estadísticas de Bose-Einstein o de Fermi-Dirac, la dependencia con la temperatura también da una expresión tipo Arrhenius [98]. Utilizando este formalismo, la cinética queda completamente especificada por tres porciones de información llamadas habitualmente el triplete cinético: el modelo de reacción y los dos parámetros de Arrhenius. Las técnicas antes mencionadas no proveen un aislamiento completo de un paso elemental (nucleación, crecimiento, enlace químico...) sino que miden el proceso completo que usualmente incluye varios pasos (multipaso) con diferentes energías de activación, por ello los parámetros A y E son difíciles de interpretar en términos de la teoría de transición de estados y por ello deben de ser tratadas sólo como parámetros efectivos. De hecho existe un problema práctico de inconsistencia entre los parámetros de Arrhenius para diferentes experimentos tanto isotérmicos como no isotérmicos.

Existen dos razones principales para tal inconsistencia. La razón experimental es que los experimentos isotermos y los no isotermos son necesariamente llevados a cabo en diferentes regiones de temperatura. Los no isotermos son generalmente realizados sobre un rango más amplio de

temperaturas. Para procesos multi-paso comprendiendo varios pasos elementales que tienen diferentes energías de activación, la contribución relativa de estas reacciones a la velocidad total variará con la temperatura. Esto significa que la energía de activación efectiva evaluada para la reacción total será diferente en las diferentes regiones de temperatura y por tanto valores consistentes de los parámetros de Arrhenius pueden ser obtenidos sólo cuando los experimentos son realizados en la misma región de temperatura.

La segunda razón de inconsistencia deriva del procedimiento normalmente usado de ajustar forzosamente los datos experimentales a un modelo de reacción. Hay dos problemas fundamentales para los métodos de ajuste de modelo. El primero es que cada aplicación de un método de ajuste de modelo resulta en sólo un par de parámetros de Arrhenius para todo el proceso de la transformación térmica. Este tipo de análisis no contempla entonces la posibilidad de transformaciones complejas (multipaso) con diferentes subprocesos que puedan ocurrir en serie o en paralelo, o con cambios en el paso limitante, que resultarían en una energía de activación que cambia durante el curso de la conversión. El segundo problema es que estos métodos pueden dar lugar a valores de los parámetros de Arrhenius ambiguos, incluso en el caso bastante artificial de un proceso de un solo paso. Esta ambigüedad reside en que los datos deben ajustarse a un modelo de reacción y por tanto los parámetros están ligados inevitablemente con este modelo. Para un conjunto de datos dado existen varios modelos muy diferentes que ajustan igualmente bien (desde un punto de vista estadístico) mientras que los valores de A y E muestran grandes variaciones. Un ejemplo de este hecho se da en la tabla 2.5, la cual muestra el resultado del ajuste de 13 modelos de reacción al mismo conjunto de datos experimentales para la descomposición de dinitramida de amonio [91]. Como se puede ver en esta tabla los diferentes parámetros de Arrhenius varían en más de un orden de magnitud de un modelo a otro, y que incluso para los tres que mejor ajustan, que son estadísticamente equivalentes, la diferencia es notable.

Tabla 2.5: Parámetros de Arrhenius calculados para la descomposición de dinitramida de amonio a 5°C/min [91].

	$E/\text{KJ mol}^{-1}$	$\log (A/\text{min}^{-1})$	$-r^a$
1	28.2 ± 0.9	2.1 ± 0.1	0.9478
2	40.0 ± 1.1	3.6 ± 0.1	0.9539
3	63.7 ± 1.7	6.4 ± 0.2	0.9590
4	205.8 ± 5.1	22.7 ± 0.6	0.9647
5	276.9 ± 6.8	30.7 ± 0.8	0.9653
6 ^b	167.8 ± 2.2	18.8 ± 0.3	0.9894
7	36.4 ± 0.6	3.2 ± 0.1	0.9858
8 ^b	51.0 ± 0.7	5.0 ± 0.1	0.9872
9 ^b	80.2 ± 1.1	8.5 ± 0.1	0.9884
10	313.7 ± 5.3	34.4 ± 0.6	0.9832
11	153.2 ± 2.6	16.4 ± 0.3	0.9824
12	147.5 ± 2.9	15.9 ± 0.3	0.9776
13	237.3 ± 6.9	27.5 ± 0.8	0.9523

^a r^2 coeficiente de correlación.
^bModelos estadísticamente equivalentes.

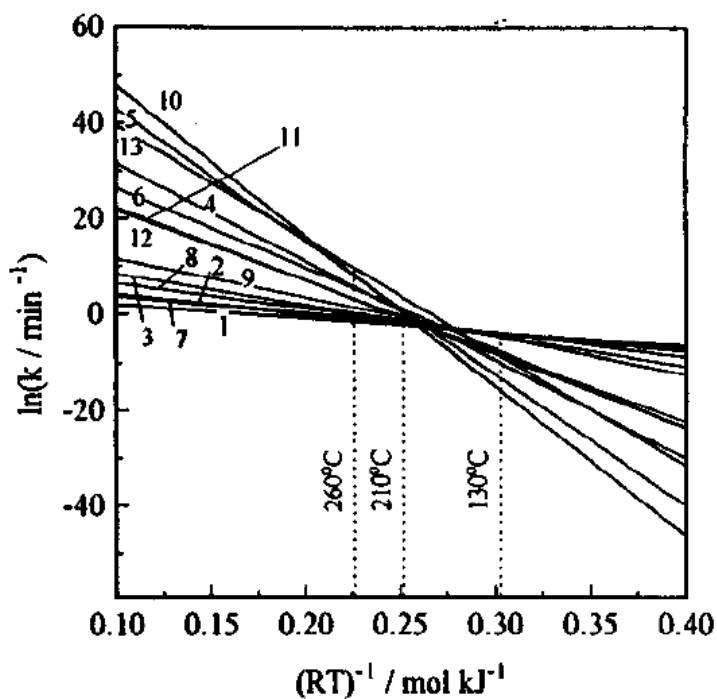


Figura 2.34: Gráficos de Arrhenius de los datos de las tabla 2.5. El intervalo de temperatura de descomposición de dinitramida de amonio a 5°C/min es 130-210°C [91].

La ambigüedad en el triplete cinético implica no sólo que el significado físico es oscuro, si no que también su uso práctico para resolver problemas de cinética aplicada, es decir para predecir el comportamiento de la sustancia fuera

del rango de temperaturas experimentales, es muy dudosa. Los valores del triplete cinético sólo pueden predecir la dependencia de α con t para una temperatura T_0 dada, o de α con T para una velocidad de calentamiento β_0 dada cuando estamos dentro del intervalo de temperaturas o de velocidades que se han usado para calcular esos parámetros como se puede ver en la figura 2.34. Para el caso de predicciones fuera de esas zonas, la ambigüedad de los parámetros conlleva soluciones tan imprecisas que no poseen valor práctico [99]. Hay que concluir que estrategia cinética estándar basada en el método de ajuste de modelo no permite alcanzar ninguno de los dos objetivos principales del análisis cinético.

Método isoconversional

Parámetros cinéticos fidedignos pueden ser extraídos solamente en una forma en la que sean independientes del modelo de reacción. Los métodos isoconversionales son una estrategia alternativa para la resolución de problemas cinéticos. Para la realización de los métodos isoconversionales, es necesaria la realización de una serie de experimentos a diferentes velocidades de calentamiento. Si escribimos la ecuación (2.11) en forma logarítmica para diferentes velocidades de calentamiento β_i y considerando un grado de conversión constante queda:

$$\ln\left(\frac{d\alpha}{dT}\beta_i\right) = \ln(A \cdot f(\alpha)) - \frac{E_\alpha}{R \cdot T} \quad (2.12)$$

Este método isoconversional, que usa la forma diferencial de la ecuación de velocidad de conversión, fue propuesto por Friedman [100], aunque existen otros métodos isoconversionales como el de Ozawa [101] y Flynn & Wall [102] que usan aproximaciones de la ecuación integral (2.9) que llevan a ecuaciones lineales simples para evaluar la energía de activación.

Estos métodos isoconversionales cumplen el principio isoconversional de acuerdo con el cual la velocidad de conversión a un grado de conversión dado es sólo función de la temperatura.

$$\left[\frac{d \ln(d\alpha / dt)}{dT^{-1}} \right]_{\alpha} = -E_{\alpha} / R \quad (2.13)$$

Estos métodos no necesitan de la existencia de ningún modelo de reacción denominándose habitualmente métodos libres de modelo. En la ecuación (2.12) es posible obtener el valor de E_{α} para un grado de conversión dado, como pendiente de la recta del primer término en función de $-1/T$ en la que cada punto se obtiene de una velocidad de calentamiento distinta, y puede ser obtenido de las curvas de conversión como se muestra en la figura 2.35. Con esto se obtiene un valor de la energía de activación dependiente del grado de conversión. El conocimiento de E_a sirve tanto para la resolución de problemas cinéticos aplicados, como para obtener cierta información sobre el mecanismo de conversión.

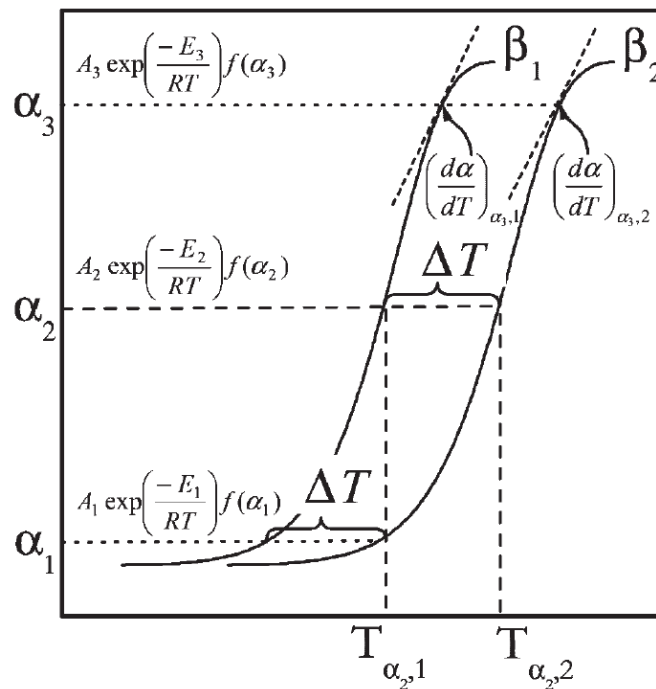


Figura 2.35: Variación del grado de conversión para dos velocidades de calentamiento distintas. El método isoconversional utiliza la ecuación de Arrhenius a un intervalo estrecho de temperaturas ΔT relacionado a un grado de conversión dado. La región de temperaturas cambia con el grado de conversión lo que permite la variación de E_{α} a lo largo de ésta [103].

Resolución de problemas cinéticos aplicados

Si se asume que el triplete cinético parcial, es decir, el asociado a una conversión dada, permanece constante cuando se cambia la temperatura, sustituyendo $f(\alpha)$ y $k(T)$ en la ecuación (2.9) se puede llegar a

$$g(\alpha) = t_\alpha A_\alpha \exp(-E_\alpha / RT_0) \quad (2.14)$$

$$g(\alpha) = \int_0^\alpha [f(\alpha)]^{-1} d\alpha = \frac{1}{\beta} \int_0^{T_\alpha} k(T) dT = \frac{A_\alpha}{\beta} \int_0^{T_\alpha} \exp(-E_\alpha / RT) dT \quad (2.15)$$

Que son completamente ciertas bajo condiciones isotermas ($T_0 = \text{const}$) y no isotermas ($\beta = \text{const}$) respectivamente. La solución simultánea de (2.14) y (2.15) para t_α produce

$$t_\alpha = [\beta \exp(-E_\alpha / RT_0)]^{-1} \int_0^{T_\alpha} \exp(-E_\alpha / RT) dT \quad (2.16)$$

Donde T_α es el valor experimental de la temperatura correspondiente a una conversión dada con una velocidad de calentamiento β . Esta ecuación hace posible el cálculo del tiempo al cual una conversión es alcanzada a una temperatura arbitraria T_0 . La asunción de la conservación del triplete cinético parcial permite la evaluación de $[\alpha(T)]_t$, $[\alpha(T)]_\beta$, $[t(T)]_\alpha$, $[T(b)]_\alpha$, y $[\alpha(\beta)]_T$ sin el conocimiento del modelo de reacción ni el factor preexponencial [104]. Aunque como hemos visto el valor de factor preexponencial no es del todo necesario existen métodos como por ejemplo el de las relaciones isocinéticas que permiten evaluar el valor de A_α utilizando relaciones isocinéticas artificiales en las que los parámetros de Arrhenius están relacionados por la correlación lineal $\ln A_j = c + dE_j$ donde el índice j indica diferentes modelos de reacción [105]. Obviamente el $\ln(A_\alpha)$ resultante dependerá linealmente de E_α como ha sido observado en diversas ocasiones [106].

Mecanismo de reacción

A parte de la utilización del conocimiento E_α para la resolución de problemas prácticos, es posible su utilización para averiguar el mecanismo de reacción o conversión. La dependencia de E_α con el grado de conversión ha de ser considerada como una fuente de información cinética más que una dificultad que superar. El profesor Vyazovkin ha demostrado que esta dependencia ayuda no sólo a relevar la complejidad del proceso sino también a identificar el esquema cinético [95]. Las formas de la dependencia de E_α con α han sido identificadas para diferentes modelos en reacciones en competencia, independientes consecutivas o reversibles, al igual que para reacciones complicadas con difusión [91]. Algunas de las curvas características se muestran en la figura 2.36. Aunque la forma de la dependencia de E_α con α no necesariamente identifica de forma unívoca el esquema cinético de un proceso, en todos los casos arroja luz sobre este.

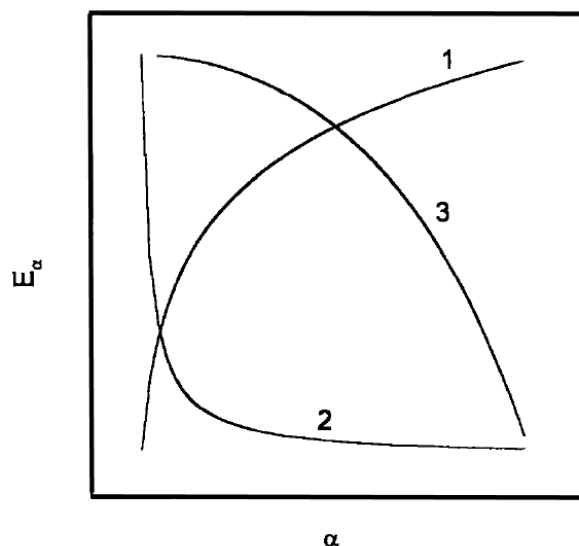


Figura 2.36: Dependencia de E_α con α característica de procesos multi paso para reacciones (1) competitivas, (2) reversibles, y (3) complicadas por difusión [91].

Se ha encontrado un aumento de E_α con α (1 en la figura 2.36) para reacciones en competencia [95], aunque algunas reacciones independientes [107] y consecutivas [108] pueden también exhibir esa dependencia. Se ha encontrado

esta forma, por ejemplo, en el la descomposición de diferentes polímeros [95]. Para casos de reacciones reversibles complejas, como la de un proceso reversible seguido por uno irreversible, E_α muestra una disminución con α (2 en la figura 2.36). Para estos procesos E_α a conversiones bajas está limitado por la suma de la energía de activación de la parte irreversible y la entalpía o suma de entalpías de la parte reversible apareciendo sólo la energía de activación de la parte irreversible para altas conversiones [109]. Para el caso de esquemas cinéticos que involucren reacciones consecutivas, o para el caso de procesos que cambian de un régimen cinético a uno de difusión, se ha observado una cierta dependencia característica de E_α con α (3 en la figura 2.36) [108]. Este esquema ha sido observado en la descomposición de algunos sólidos, como por ejemplo el de la madera, donde el papel crucial de la difusión es bien conocido [91]. Este efecto también ha sido observado en el caso de curado de resinas epoxy, donde la difusión controla el curado de estas [110].

Como se ha visto hasta ahora, el conocimiento de E_α no sólo sirve para hacer predicciones de cálculos de la velocidad de conversión fuera del rango de temperaturas experimental sino que también sirve para arrojar luz sobre el esquema cinético.

2.8.2 DSC con modulación en temperatura.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es uno de los métodos de análisis térmico más ampliamente utilizado y aplicado a una gran variedad de materiales incluyendo polímeros, productos farmacéuticos, alimentos o productos inorgánicos. Las medidas de DSC dan información cualitativa y cuantitativa en función del tiempo y la temperatura con respecto a transiciones en materiales o cambios en la capacidad calorífica. Algunas de las ventajas que ha permitido su difusión son la facilidad de preparación de muestras, la aplicabilidad a sólidos y líquidos, el tiempo de análisis rápido y un amplio intervalo de temperatura. Por

otro lado el DSC tiene algunas limitaciones importantes. Es difícil la interpretación del flujo de calor si están involucrados múltiples procesos sobre el mismo intervalo de temperatura. En un material de un único componente, se pueden solapar diferentes tipos de transición, como por ejemplo procesos de fusión y la recristalización en materiales semicristalinos o cambios en la capacidad calorífica. En materiales multicomponentes, las transiciones de los diferentes componentes se pueden solapar. Además no siempre se puede identificar la transición de forma directa. Por ejemplo, un pico entálpico de relajación superpuesto al cambio de capacidad calorífica puede ser tan grande que se confunda con una fusión.

Para aumentar la sensibilidad (relación señal a ruido) en la detección de transiciones débiles se puede o aumentar la masa o la velocidad de barrido, mientras que para obtener una mejor resolución en la separación de transiciones muy cercanas en temperatura hay que o disminuir la masa o la velocidad de barrido, por lo tanto un aumento de sensibilidad es siempre a expensas de una disminución de la resolución y vice-versa. Por otro lado la determinación de transiciones débiles esta influenciada por la curvatura y estabilidad de la línea base, debido por ejemplo a evaporaciones de la humedad de la muestra, lo que hace mucho más difícil su medida. Por último, algunas variables como el valor absoluto de la capacidad térmica y la conductividad térmica no pueden ser medidas directamente con un equipo DSC y requiere múltiples experimentos, además esta capacidad calorífica no puede ser determinada en un experimento isoterma.

La calorimetría diferencial de barrido con modulación en temperatura (TMDSC) es una técnica relativamente nueva basada en DSC que fue propuesta por Reading en 1993 [111] y que presenta ciertas ventajas frente al DSC convencional. Esta técnica, también conocida como alternante (ADSC), modulada (MDSC) o dinámica (DDSC) dependiendo de la casa que la comercialice, se diferencia del DSC en que una perturbación periódica es

superpuesta a la línea base del perfil de temperatura. Esta perturbación periódica, es una perturbación de baja frecuencia del orden de hertzios (típicamente con un periodo entre 5 y 200s), y puede tratarse de una función sinusoidal (Figura 2.37) o no sinusoidal como por ejemplo una función en diente de sierra. El uso de, por ejemplo, dientes de sierra u otras modulaciones complejas permite la medición de la respuesta a varias frecuencias simultáneamente, sin embargo su análisis es ciertamente complicado y no es muy utilizada [112]. La modulación con funciones sinusoidales, en cambio, está siendo más activamente utilizada y ya ha sido aplicada a muchos sistemas diferentes [111-119].

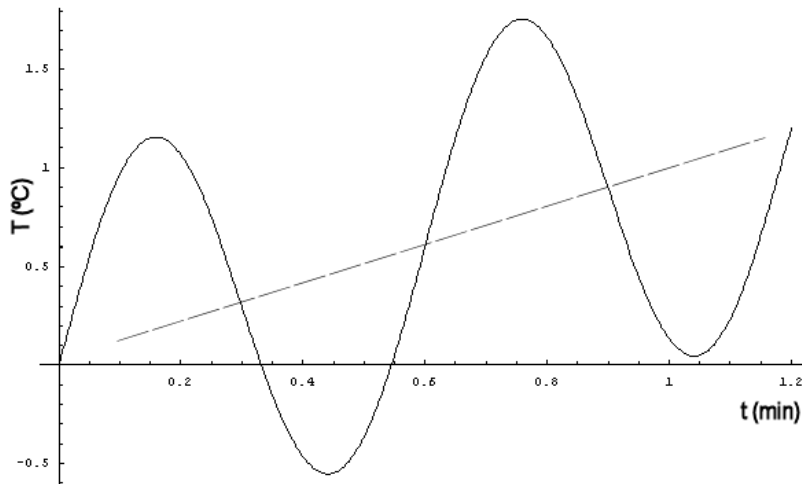


Figura 2.37: Programa de temperaturas típico en un experimento de TMDSC con una función sinusoidal.

De esta forma, para una modulación sinusoidal, la temperatura T es programada con una amplitud A_T y frecuencia angular $\omega=2\pi/p$ (rad s^{-1}) a lo largo de una velocidad constante de variación de temperatura, β , desde una temperatura inicial T_0 , así que puede ser descrita de la forma.

$$T = T_0 + \beta t + A_T \sin(\omega t) \quad (2.18)$$

La velocidad de calentamiento es entonces

$$q = dT/dt = \beta + A_T \omega \cos(\omega t) = \beta + A_q \cos(\omega t) \quad (2.19)$$

Una de las técnicas de análisis de TMDSC es la que divide el flujo de calor en dos componentes, una denominada *reversing* (en inglés se utiliza el término

reversing en vez de *reversible*, ya que esta componente obtenida del análisis de TMDSC no siempre corresponde con los fenómenos reversibles. En la bibliografía en español de igual modo se suele usar el término anglosajón *reversing* por el mismo motivo) y otra denominada *non-reversing* (de nuevo para diferenciarse del término no reversible), según puedan seguir el programa de temperaturas o no respectivamente, es decir, esas componentes son la componente en fase (*reversing*) y fuera de fase (*non-reversing*). La componente *reversing* del flujo de calor se obtiene de la amplitud del primer armónico A_{p1} usando la transformada de Fourier de los datos (o una aproximación de esta). Dividiendo por la amplitud de la velocidad de calentamiento, A_q , da lugar a la componente *reversing* de la capacidad calorífica aparente.

$$C_{p,rev} = \frac{A_{p1}}{A_q} \quad (2.20)$$

donde el subíndice p hace referencia a que es a presión constante. El flujo de calor total se define como el coeficiente de Fourier de orden cero del flujo de calor medido $\langle P \rangle$, es decir, el valor medio del flujo de calor en un ciclo. Este flujo de calor representa, en muchos casos, un resultado similar al obtenido por el flujo de calor de un DSC estándar. La otra componente del flujo de calor, la *non-reversing*, se obtiene restando el flujo de calor *reversing* al flujo de calor total [111],

$$A_{non-rev} = \langle P \rangle - A_{p1} \quad (2.21)$$

o si tratamos con capacidades caloríficas

$$C_{P,non-rev} = C_{P,tot} - C_{P,rev} = \frac{\langle P \rangle}{\beta} - \frac{A_{p1}}{A_q} \quad (2.22)$$

En ausencia de eventos térmicos, la capacidad calorífica *reversing* es simplemente la capacidad calorífica total (independientemente de la frecuencia) y la capacidad *non-reversing* es simplemente cero. En presencia de eventos térmicos, se consideró inicialmente, que el flujo de calor *reversing* reflejaba los efectos del calor sensible reversible (es decir, los cambios en la capacidad

calorífica) mientras que el *non-reversing* reflejaba los efectos cinéticos irreversibles. Esta consideración inicial justifica los nombres dados a ambos componentes, pero se ha demostrado que no es cierta y que ambos efectos pueden reflejarse en ambas componentes, en muchos casos diferentes, y debe entonces considerarse que un proceso es *reversing* cuando, para cualquier momento y temperatura, este proceso proporciona una contribución al flujo de calor que es proporcional a la velocidad de calentamiento. Esta respuesta es, por tanto, rápida, dada la escala de tiempos de la medida. Consecuentemente la componente *non-reversing* representa la contribución al flujo de calor que, a la temperatura y el tiempo que la medida es hecha, es o bien irreversible o de alguna forma impedido cinéticamente [120].

Otra estrategia para analizar los datos de TMDSC es la que utiliza la formulación de Schawe [121], en cierta disputa científica con Reading [122], y que implica análisis de una capacidad calorífica dinámica compuesta de una parte real (almacenamiento) y otra imaginaria (pérdidas) (C_p^* , C_p' y C_p'')

$$C_p^*(\omega) = C_p'(\omega) - iC_p''(\omega) \quad (2.21)$$

$$C_p'(\omega) = \frac{A_p}{A_q} \cos \delta \quad (2.22)$$

$$C_p''(\omega) = \frac{A_p}{A_q} \sin \delta \quad (2.23)$$

donde δ es el ángulo de fase entre el flujo de calor sinusoidal y la velocidad de calentamiento sinusoidal (A_p es la amplitud de la modulación del flujo de calor). La justificación para la existencia de una capacidad calorífica compleja ha sido basada en la teoría de fluctuación-disipación [123] y es objeto de considerable trabajo actualmente.

En la figura 2.39 puede verse un ejemplo de aplicación de TMDSC. La muestra tratada es el polímero semicristalino, PET, tras un templado, mostrando varias transiciones distintas que ocurren durante su calentamiento. La señal de DSC convencional (equivalente al total de TMDSC) muestra varias transiciones

que van a aparecer posteriormente en una u otra componente. En la región entre la cristalización y la fusión, el flujo de calor parece volver a su línea base, sin embargo observando las componentes *reversing* y *non-reversing* se puede observar que existe una competición entre una fusión endotérmica (en la componente reversible) y una (re)cristalización (mostrada en la no reversible) que resultan en un efecto neto nulo de la componente total.

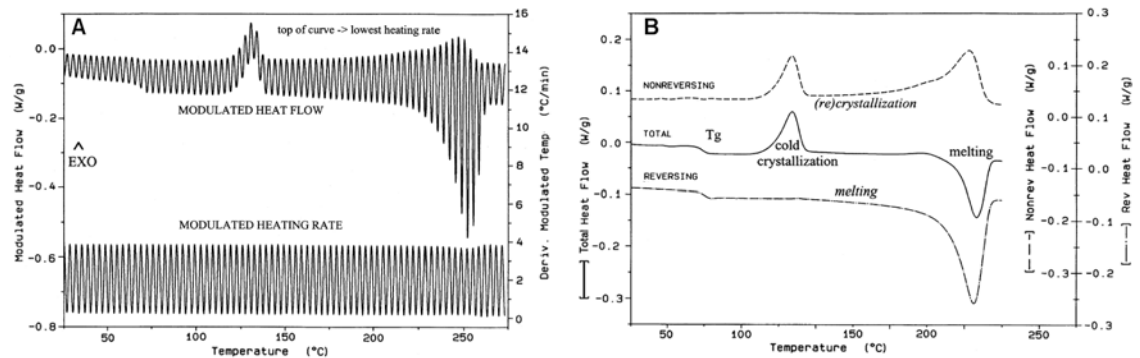


Figura 2.38: TMDSC del polietileno tereftalato templado (PET). **A)** Velocidad de calentamiento modulada (señal de entrada) y flujo de calor modulado (señal de salida). **B)** Señal deconvolucionada (componentes reversible, total y no reversible) [117].

Una de las aplicaciones del TMDSC es la de la mejor estimación de la T_g ya que puede separar el cambio en C_p de la entalpía de relajación. Como puede verse en la figura 2.39.A, durante el calentamiento de un polímero partiendo de un estado vítreo no-envejecido (es decir que no ha sufrido ninguna relajación isoterma en este estado vítreo) existe simplemente un aumento en la capacidad calorífica en torno a la T_g . Para un polímero envejecido sin embargo se observa un pico de endotérmico que hace difícil la determinación de la T_g , y lo cual puede evitarse utilizando TMDSC (Figura 2.39.B). La entalpía de envejecimiento isoterma, ΔH_a , es la diferencia de las áreas entre la curva del vidrio envejecido y la del no envejecido. En DSC tradicional, ΔH_a es obtenido tras varios barridos: un barrido para el polímero en estado vítreo envejecido, después un templado (a una determinada velocidad) y realización de otro barrido sin el envejecimiento del material. Una ventaja propuesta inicialmente del TMDSC fue la habilidad de obtener en un solo barrido la entalpía de relajación (componente *non-reversing*)

de la capacidad calorífica (componente *reversing*) (Figura 2.39.B). Los últimos trabajos, sin embargo, indican que la obtención de ΔH_a por este método presenta variaciones considerables para valores altos de ΔH_a y de velocidad de calentamiento alta [124]. Se han propuesto varias posibilidades para interpretar este error, como por ejemplo la existencia de contribuciones del restablecimiento estructural al primer armónico y/o contribuciones del escalón en la T_g a armónicos superiores [125].

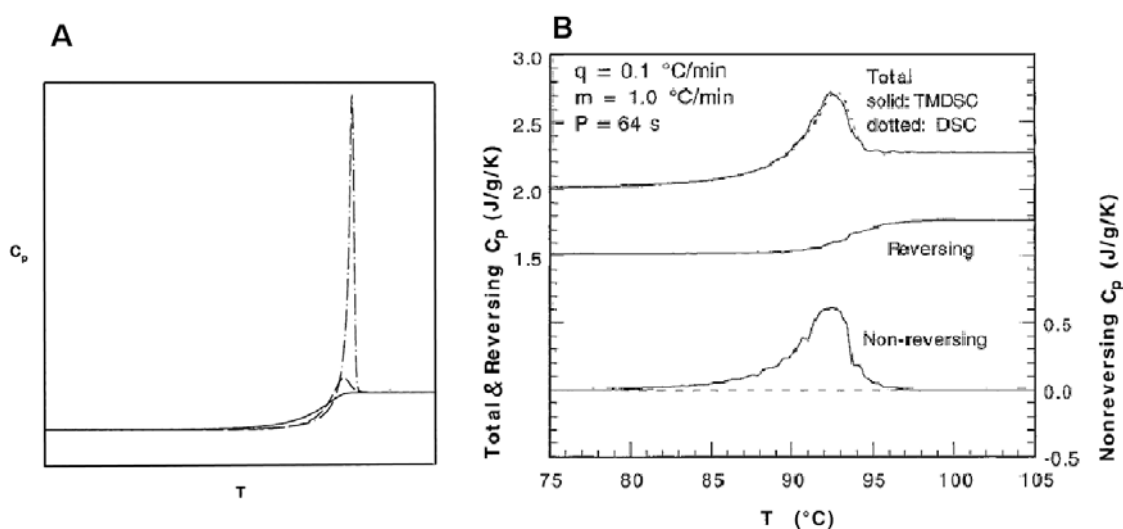


Figura 2.39: A) Esquema de la capacidad calorífica en función de la temperatura para enfriamiento (línea continua) en calentamiento para partiendo de estado vítreo no-envejecido (línea discontinua) y envejecido (línea discontinua y punteada). B) TMDSC simulado para la componente total, reversing y non-reversing para poliestireno envejecido (la componente total está desplazada 0.5 J/gK por claridad) [124]

Otra ventaja de la utilización de TMDSC es la de separar transiciones en sistemas multicomponentes. En la figura 2.40 se muestra un experimento de TMDSC de una mezcla de polietileno (PE), policarbonato (PC) y PET. La curva fusión de PE (comp. *reversing*) puede ser distinguida de la cristalización fría del PET (comp. *non-reversing*). Además realizando medidas en la componente reversible. La T_g del PET y PE pueden ser determinadas más fácilmente.

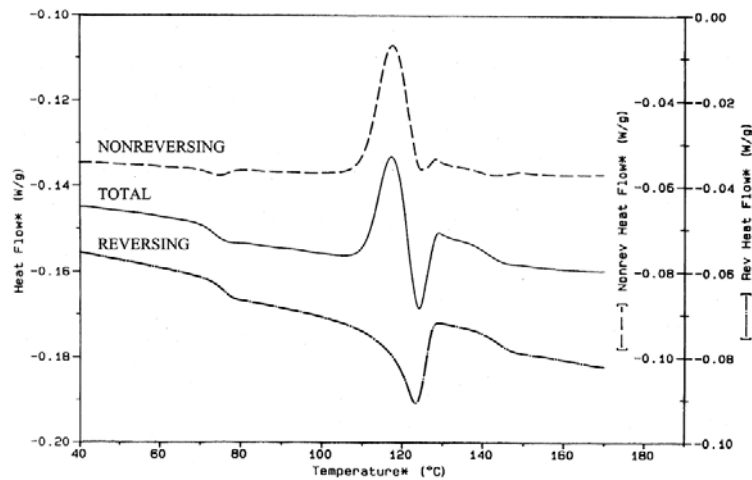


Figura 2.40: Curvas de TMDSC de una mezcla PE/PC/PET [117].

Tal y como se ha comentado, la determinación de transiciones vítreas débiles por DSC puede ser ocultada sustancialmente por efectos en la línea base y otras transiciones en el mismo intervalo de temperatura. Por ejemplo, en muchos casos la evaporación de la humedad de la muestra causa una variación en la línea base que dificulta la medida, la utilización de TMDSC hace que esa evaporación aparezca en la componente *non-reversing*, y la T_g puede ser observada de forma inequívoca en la componente *reversing*. Además para el caso de transiciones muy sutiles que se presentan cercanas a otras transiciones, la resolución puede ser aumentada ya que la velocidad de calentamiento (β) puede ser tan pequeña como cero, mientras que la sensibilidad puede ser maximizada ya que la velocidad de calentamiento puede ser mayor de 20°C/min. El resultado es el aumento de resolución y sensibilidad simultáneamente [117].

La utilización de TMDSC en experimentos cuasi-isotermos ($\beta=0$), es también una herramienta importante para la determinación de parámetros termodinámicos. En experimentos cuasi-isotermos, la muestra es calentada y enfriada en torno a una temperatura media constante. En la figura 2.41 se puede observar la medida de la capacidad calorífica absoluta en un experimento cuasi-isotermo “paso a paso” de PET templado mostrando una transición vítrea

(incremento en C_p) y una cristalización fría (disminución en C_p). En este experimento se puede ver que, en la región de cristalización fría, la C_p no es estable si no que disminuye con el tiempo, mostrando de esta manera una información extra que no puede ser obtenida mediante DSC. La utilización de experimentos cuasi-isotermos ha sido aplicada también a procesos de curado de termoestables en los cuales la vitrificación se muestra en la componente *reversing* como un escalón en la capacidad calorífica al pasar del estado tipo líquido al estado vítreo, mientras que la componente *non-reversing* muestra el calor de reacción [126].

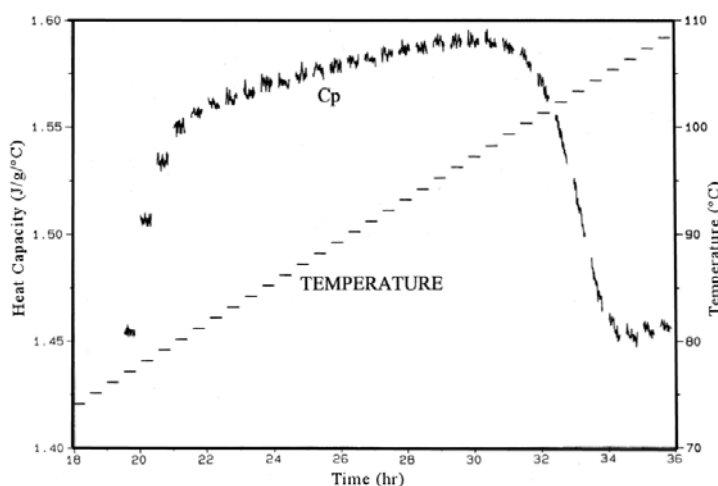


Figura 2.41: Experimento de TMDSC cuasi-isotermo paso a paso de PET templado [117].

La difusividad térmica (y por tanto la conductividad) de materiales aislantes a diferentes temperaturas también puede ser determinada mediante TMDSC midiendo la capacidad aparente del material en muestras delgadas (décimas de mm) y de muestras gruesas (de varios mm) con determinada geometría. El método se basa en la disminución de la capacidad calorífica aparente para muestras gruesas debido a la difusividad térmica finita de la muestra, y utilizando diversos modelos para su aplicación [127].

Como se ha visto hasta ahora, la técnica de TMDSC es un añadido potente al DSC, que a menudo ofrece información adicional de interés para obtener las

propiedades térmicas de los materiales. El TMDSC puede separar transiciones solapadas, puede ayudar en la interpretación de resultados de transiciones complejas, puede ser una herramienta útil para detectar transiciones sutiles sin pérdida de resolución, y además permite realizar medidas en condiciones cuasi-isotermas y realizar una cuantificación de la conductividad térmica de materiales aislantes.

Existen también desventajas como la necesidad de mucho más tiempo para realizar la medida. Además, es necesario tener mucho cuidado con la elección de los parámetros elegidos para la modulación, así como la interpretación de sus efectos en los resultados. Por lo tanto el TMDSC no debe ser usado como sustitución del DSC convencional si no como complemento tras haber realizado el estudio inicial de DSC.

2.9 Nanotecnología basada en ELPs

Uno de los caminos por los que más está avanzando la ciencia actual es el de la nanotecnología, en la que existe una necesidad imperativa por la producción de sistemas que exhiban funcionalidades específicas a una escala nanométrica. Estos sistemas en muchos casos tienen una inspiración en la naturaleza. Es bien sabido que en la naturaleza las macromoléculas, como por ejemplo las proteínas, se organizan para dar lugar a estructuras nanométricas dentro de los tejidos que posteriormente conforman los organismos vivos. Además, la mayoría de los sistemas biológicos también exhiben jerarquía y al menos una característica estructural distinta en cada escala de longitudes en los regimenes molecular, nanoscópico, microscópico y macroscópico [128].

Las técnicas emergentes en nanotecnología hacen uso del conocimiento de los procesos biológicos para la obtención de sistemas mediante los mismos mecanismos de los sistemas vivos como son los de auto-organización o auto-ensamblado. El autoensamblado molecular de nanoestructuras funcionales se

caracteriza por una asociación particular de moléculas determinada por interacciones débiles no-covalentes. Esas interacciones incluyen enlaces electrostáticos, puentes de hidrogeno, o enlaces gobernados por el agua e interacciones hidrófobas o de Van der Waals. Aunque esas interacciones son débiles, al actuar de forma cooperativa, pueden gobernar la conformación estructural de las macromoléculas dando lugar a funcionalidades y estructuras tridimensionales únicas. Es bien conocido, por ejemplo, el extraordinario ejemplo las interacciones biológicas específicas como son las de la avidina y straptavidina con moléculas de biotina [129-131], o el reconocimiento específico de anticuerpos [132,133]. Los péptidos y las proteínas son piezas fundamentales útiles para obtener nanoestructuras vía autoensamblado debido a su plegamiento característico, estabilidad e interacciones específicas proteína-proteína [134]. Por ejemplo, filamentos autoensamblados y estructuras fibrilares han sido formadas utilizando estructuras β . Los motivos con secuencias simples permiten obtener, por ejemplo, fibras amiloides [135,136] y fibras de sedas [137,138]. Tirrell *et al*, por ejemplo, han realizado un trabajo interesante en geles inteligentes con *zippers* de leucina, que muestra de forma excepcional las posibilidades de autoensamblado de proteínas [139].

La elastina natural también exhibe propiedades de autoensamblado. Por ejemplo, la tropoelastina, precursor soluble de la elastina, se agrega espontáneamente en estructuras poliméricas fibrilares las cuales se unirán covalentemente para dar lugar a la matriz de elastina [140]. Como ha demostrado Yang *et al*, la habilidad de autoensamblado en fibrillas de la elastina reside en ciertos péptidos de esta [141]. La tendencia de autoensamblarse en nanofibras de la tropoelastina se ha observado también en polímeros tipo-elastina en las primeras fases de agregación [26]. Sin embargo el diseño específico que se puede hacer sobre los polímeros tipo elastina hace que estos polímeros también se puedan autoensamblar en otras topologías. Por ejemplo el grupo de Conticello ha mostrado la formación de nanoparticulas autoensambladas de tipo esfera y de

tipo gusano mediante la coalescencia de las de tipo esfera [142]. En otro de sus trabajos Conticello muestra la formación de un hidrogel mediante la unión de estructuras micelares autoensambladas [143]. A pesar del enorme potencial de los polímeros tipo elastina para producir autoensamblado, no aparecen muchos trabajos más en la bibliografía. A pesar de esto, si que se están siendo utilizados en nanotecnología mediante estrategias de deposición nanométricas denominadas *top-down*, principalmente de la mano del grupo de Chilkoti en dispositivos de diagnóstico, como ha sido mencionado anteriormente, a la vez que existe una tendencia a la producción de copolímeros en bloque utilizando polímeros tipo elastina [142,143].

2.9.1 Arquitectura anfifílica en bloque.

Los polímeros tipo elastina presentan, como hemos visto anteriormente, grandes ventajas en cuanto a su diseño y síntesis, así como el gran conocimiento teórico sobre su funcionamiento. Todo esto hace que uno de los ámbitos donde se espera que estos materiales tengan un gran éxito es la obtención de copolímeros en bloque funcionales.

Los copolímeros en bloque han recibido una gran atención desde los últimos cuarenta años, pero sólo durante la última década han sido considerados seriamente para las aplicaciones nanotecnológicas donde hoy en día están teniendo un éxito extraordinario. Su aplicabilidad para la nanotecnología viene dada por la escala nanométrica de los dominios que pueden formar, así como por el conveniente ajuste de su tamaño, forma, y periodicidad proporcionada mediante el cambio de los parámetros moleculares (básicamente pesos moleculares y composiciones) [144].

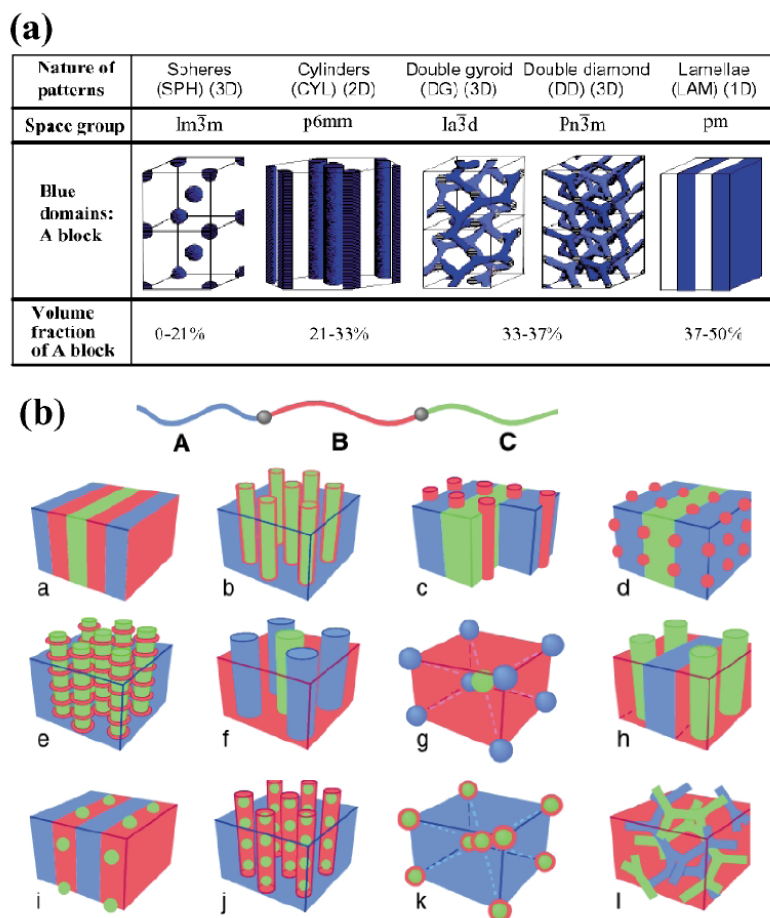


Figura 2.42: Diagrama esquemático de las morfologías alcanzadas por copolímeros en bloque no cristalinos, para dos casos. **a)** dibloque lineal AB. **b)** un tribloque lineal ABC. [145]

Los copolímeros en bloque permiten la obtención de patrones nanométricos para nanotecnología mediante el autoensamblado en lo que se conocen como métodos *bottom-up*. Los copolímeros en bloque consisten en cadenas de polímeros distintas químicamente y unidas por un enlace covalente, es decir formando una única molécula. Debido a su repulsión mutua, los distintos bloques tienden a segregarse en diferentes dominios, dominios que están restringidos espacialmente por la unión química entre los bloques. Como resultado entre la repulsión entre los grupos para disminuir la energía interfacial y el aumento entrópico pequeño, se forman unas microestructuras periódicas que emergen de longitudes de escala nanoscópicas. Dependiendo de la relación de volumen entre bloques, y de la composición de estos a través de su parámetro de interacción (χ)

se pueden formar diferentes microdominios. Para que el orden de estos dominios se mantenga, los polímeros deben ser monodispersos, y en algunos casos es necesaria la presencia de un campo externo [144]. En la figura 2.42 se presentan las morfologías posibles para copolímeros lineales no cristalinos para dos casos concretos, el caso de dibloques y de tribloques cuando se encuentran en el grueso del material (en el *bulk*). La obtención de diferentes morfologías puede dar lugar a diferentes sistemas para nanotecnología, bien sea por extracción de una de las dos fases mediante eliminación selectiva de la otra, o mediante deposición y actuación como plantilla para un grabado o una deposición posterior. En la figura 2.43 se muestra esquemáticamente algunas de las diferentes aplicaciones que surgen de la utilización de los copolímeros en bloque.

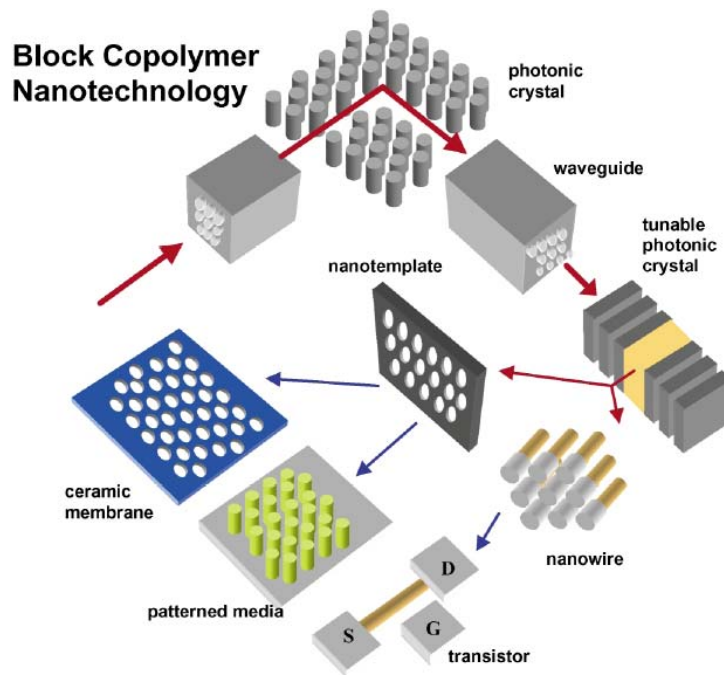


Figura 2.43: Esquema de varias aplicaciones nanotecnológicas de los copolímeros en bloque [144].

En el caso de películas delgadas, obtenidas por ejemplo por deposición, hay que sumar la interacción con el sustrato y la energía superficial a los parámetros que gobiernan la interacción. Por ejemplo, cuando uno de los bloques presenta una interacción preferente con el sustrato, y el otro bloque presenta una energía

superficial menor esta fuerza a segregarse al primer bloque hacia la interfase, entonces por ejemplo la estructura lamelar o en cilindros tiende a alinearse paralela al sustrato en vez de la dirección normal [146]. De igual forma para copolímeros en disolución los parámetros importantes son los de interacción de cada bloque con el disolvente, de manera que para obtener segregación debemos tener un polímero anfifílico, con uno de los bloques hidrófobo (afinidad por los disolventes apolares) y otro hidrófilo (afinidad por disolventes polares). De esta manera, un bloque tenderá a permanecer en el disolvente mientras el otro se segregara, o se agregará en otro disolvente en el caso de mezclas de estos. Cuando los polímeros se encuentran en disolución estos se pueden autoensamblar en muy diferentes formas como pueden ser micelas, bastones, discos, vesículas (también llamados polimersomas), nanotubos u otros agregados mayores [147]. Además las estructuras de copolímeros en bloque anfifílicos pueden experimentar múltiples transiciones que provoquen cambios en las morfologías o produzcan el desensamblado.

En este trabajo, se ha realizado el estudio del autoensamblado de ciertos polímeros tipo elastina anfifílicos constituidos por bloques polares alternados dentro de un sistema predominantemente apolar. A su vez se dan los primeros pasos para el conocimiento del funcionamiento de copolímeros en bloque lineales de dos y tres bloques los cuales son homopolímeros tipo elastina con hidrofobicidad variable dependiendo del pH y en el cual presentan diferentes transiciones lo que puede dar lugar a diferentes estructuraciones y autoensamblados. Estos estudios son de gran importancia para la comprensión de las interacciones de diferentes bloques tipo elastina cuando estos están obligados a convivir en la misma cadena, y pueden llegar a ser de gran importancia en el futuro para la utilización en sistemas nanobiotecnológicos mediante un autoensamblado en estructuras nanométricas.

3 Materiales y Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Poli(VPGVG)

En las primeras fases de este trabajo se utilizaron ELPs que habían sido obtenidos mediante síntesis química en trabajos previos del grupo de investigación. El polímero poli(VPGVG) fue obtenido siguiendo los métodos descritos en ref [7,148]. La caracterización final del polímero se puede encontrar en refs: [47,149]. Este polímero posee un peso molecular aparente de $M_n = 96155$ g/mol y una polidispersidad $n = 1.18$ deducido por cromatografía de exclusión por tamaños.

3.1.2 Poli(VPAVG)

El polímero Poli(VPAVG) fue obtenido siguiendo, mediante síntesis química, los métodos descritos en ref [7]. Su estequiometría y pureza fueron controlados por RMN ^{13}C y ^1H , análisis de aminoácidos y por cromatografía. La verificación del producto final fue hecha por resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis de aminoácidos. RMN de protón y ^{13}C se pueden ver en la figura 3.1. La asignación de picos y la ausencia de picos extraños verifican la síntesis y la pureza del producto. Además, el análisis de aminoácidos mostró la composición esperada dentro el error experimental. El peso molecular medio aparente y su distribución han sido estimados por HPLC con exclusión por tamaños (figura 3.2).

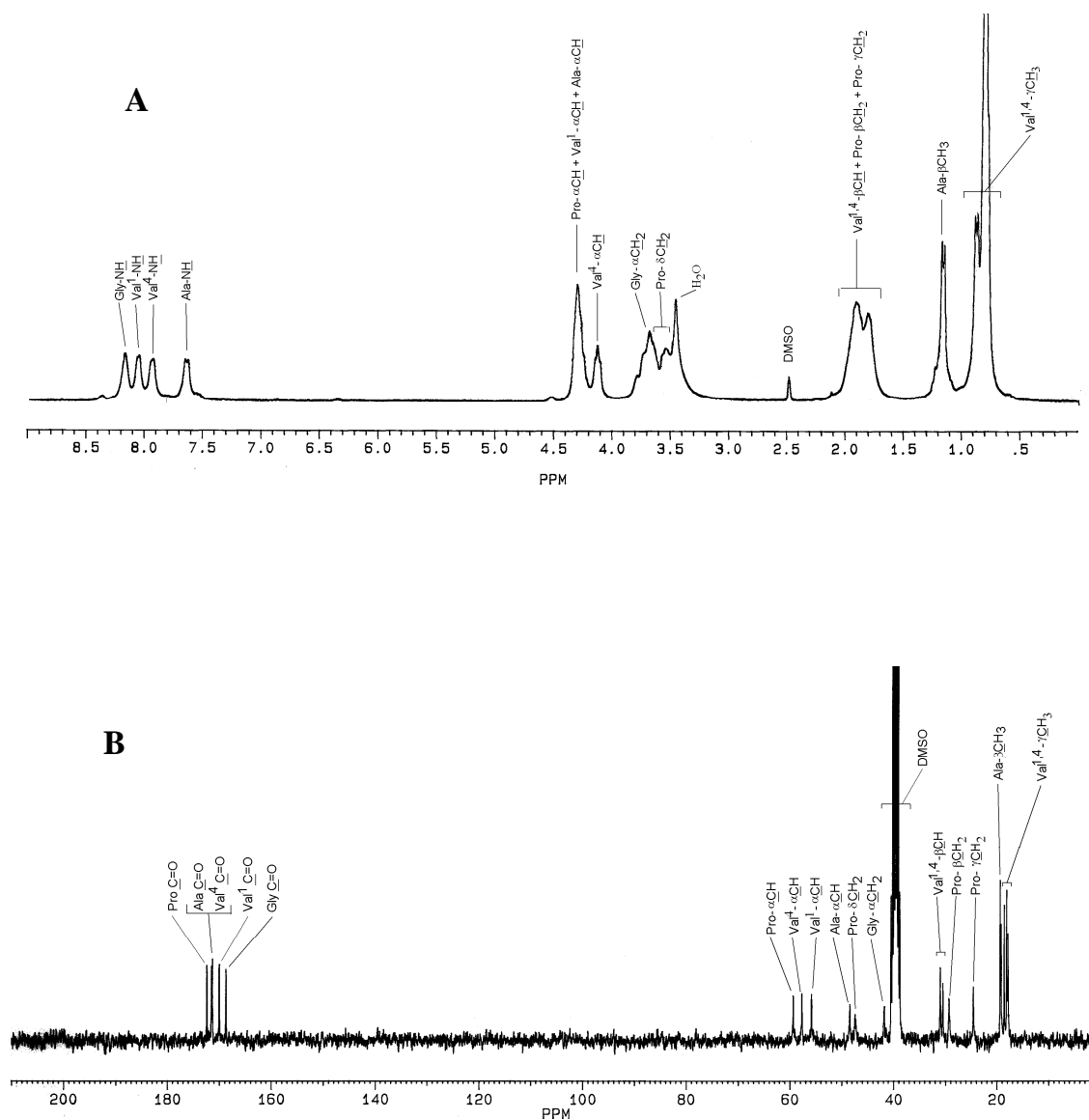


Figura 3.1: Espectro de RMN del poli(VPAVG) en DMSO-d₆: (A) 1H RMN; (B) 13C RMN.

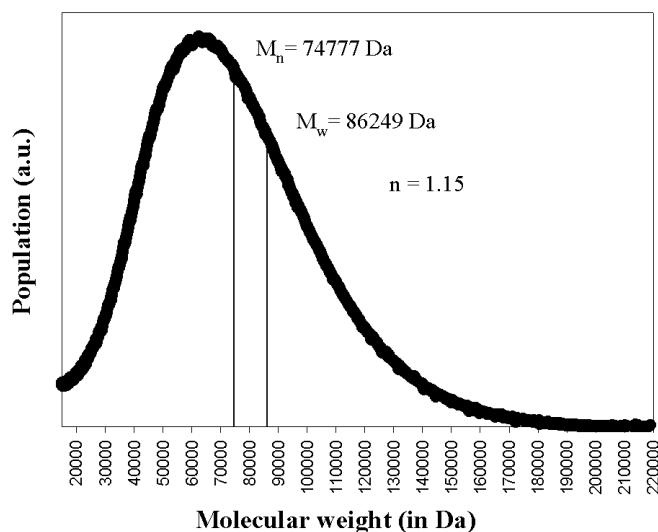


Figura 3.2: Distribución de peso molecular aparente del poli(VPAVG).

3.1.3 (GVGVP)₂₅₁

El (GVGVP)₂₅₁ fue suministrado por Bioelastics Research Ltd. Este polímero fue preparado por tecnología de DNA recombinante y expresado en una fermentación de *Escherichia coli*. Una descripción completa de este procedimiento y la caracterización esencial del gen ha sido publicada en ref. [150].

3.1.4 (GVGIP)₃₂₀

(GVGIP)₃₂₀ fue suministrado por Bioelastics Research Ltd. Este polímero fue preparado por tecnología de DNA recombinante y expresado en una fermentación de *Escherichia coli*.

3.1.5 [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]_n

El polímero con la formula general [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]_n (abreviadamente V/E5) han sido sintetizados en nuestro laboratorio mediante

tecnología de DNA recombinante y producido en una fermentación de *Escherichia coli* [151,152]. Este polímero ha sido sintetizado en diferentes versiones con diferentes pesos moleculares, siendo n el número de monómeros con valores $n = 5, 9, 15, 30, 45$, lo que equivale a pesos moleculares de 11176, 19174, 32215, 63123 y 94272 g/mol respectivamente.

Aunque su obtención no forma parte de este trabajo se indican brevemente los procedimientos y resultados de las caracterizaciones. Para su biosíntesis se generó una doble cadena sintética de DNA que codificaba la secuencia VPGVG VPGVG VPGEV VPGVG VPGVG V partiendo de oligonucleótidos sintéticos amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El gen fue posteriormente aislado y sometido a la reacción de concatenación. Las secuencias de todos los genes multimericos obtenidos y posteriormente expresados se han verificado por secuenciación automática de DNA. Los genes seleccionados fueron subclonados en el vector de expresión p7, (pET-25(+)) Novagen modificado mediante mutación en nuestro laboratorio) con el cual se han transformado las cepas de expresión: BL21 y BLR(DE3).

Tras el cultivo de las bacterias y la inducción de la expresión del polímero las células fueron recolectadas por centrifugación y lisadas mediante destrucción ultrasónica. La purificación de los polímeros acumulados en la fracción de las proteínas solubles totales se ha realizado mediante ciclos de segregación reversible termodependiente, se ha efectuado una primera precipitación ácida inespecífica tras la que se realizaron varios ciclos de precipitación y caliente (50°C) y resuspensión en frío (4°C).

Los rendimientos de los 5 polímeros seleccionados fueron 32 mg/L ($n = 5$), 85 mg/L ($n = 9$), 92 mg/L ($n = 15$), 78 mg/L ($n = 30$), and 35 mg/L ($n = 45$).

El producto final fue caracterizado por electroforesis sobre geles SDS-PAGE, espectrometría de masas MALDI-TOF, NMR, y análisis de aminoácidos. Todos los análisis confirman la exactitud del proceso en términos de secuencia y peso molecular.

3.1.6 (GVGVP)₄₈

Este polímero fue preparado por tecnología de DNA recombinante y expresado en una fermentación de *Escherichia coli*. Los pasos de la síntesis han sido los mismos que para el V/5E y pueden verse en la referencia [152].

3.1.7 Copolímeros en bloque:

Diferentes copolímeros en bloque en versión dibloque y tribloque basados en los polímeros [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]_n y (VPAVG)_m han sido diseñados en nuestro laboratorio. La metodología de obtención y caracterización es similar a la descrita para el polímero V/5E. Se dará a continuación una breve descripción de los procedimientos ya que su obtención no forma parte de este trabajo. En cualquier caso, se puede encontrar en la referencia [153] una descripción más detallada. La lista completa de estos polímeros puede verse en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Diferentes secuencias de los copolímeros en bloque ensayado. La abreviatura indica el tipo de bloque y el número de pentapéptidos.

Secuencia	Abreviatura	MW (KDa)
[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₀ -(VPAVG) ₂₀	E50A20	29.2
[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₀ -(VPAVG) ₄₀	E50A40	37.7
[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₀ -(VPAVG) ₆₀	E50A60	46.1
[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₀ -(VPAVG) ₂₀ -[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₀	E50A20E50	50.0
[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₀ -(VPAVG) ₄₀ -[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₀	E50A40E50	58.5
[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₀ -(VPAVG) ₆₀ -[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₀	E50A60E50	66.9
[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₂₀ -(VPAVG) ₄₀	E100A40	58.5
[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₀ -(VPAVG) ₂₀ -[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₀ -(VPAVG) ₂₀	E50A20 E50A20	58.5
[(VPGVG) ₂ (VPGEG)(VPGVG) ₂] ₁₀ -G ₁₀ -(VPAVG) ₄₀	E50 G _L A40	38.3

La síntesis de estos polímeros fue llevada a cabo en varios pasos. Primero se realizó la construcción de los genes monoméricos que codificaban cada uno de los bloques. El gen del bloque $[(VPGVG)_2 VPGEG (VPGVG)_2]_{10}$ había sido sintetizado previamente tal y como se describe en la sección 3.1.5. Para el otro bloque, el duplex sintético de DNA que codificaba la secuencia elegida como monómero fue sintetizado partiendo de oligonucleótidos sintéticos amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como secuencia monomérica fue elegida la de 20 repeticiones del bloque VPAVG y flanqueado por sitios de reconocimiento *EamI* 104I. El diseño del gen que codifica el monómero de la secuencia monomérica de DNA fue realizada utilizando los codones preferentes para *Escherichia coli*. Todos los productos fueron clonados en un vector de clonaje, y transformados en una cepa de *Escherichia coli*. Los productos fueron verificados por digestión enzimática diagnóstica y secuenciación. Para la construcción de los di y tribloques se seleccionaron los genes de 20, 40 y 60 repeticiones del pentámero VPAVG.

La unión de los distintos dibloques se ha realizado clonando en el vector de clonaje que contenía los genes del bloque $(VPAVG)_n$ el bloque $[(VPGVG)_2 VPGEG (VPGVG)_2]_{10}$ mediante una modificación del método reiterativo recursivo y el empleo del sistema de clonaje sin costura “seamless”. Los dibloques seleccionados fueron subclonados en un vector de expresión pET25b(+) modificado. Los productos resultantes fueron confirmados por secuenciación y restricción con endonucleasas. Los plásmidos recombinantes fueron transformados en una cepa de expresión de *Escherichia coli* BLR y subsiguientemente se realizó la producción.

Una vez obtenidos los genes que codifican los dibloques se utilizaron para obtener tribloques mediante la clonación en el vector que contenía el gen de la secuencia $[(VPGVG)_2 VPGEG (VPGVG)_2]_{10}$ de los dibloques $[(VPAVG)_n - [(VPGVG)_2 VPGEG (VPGVG)_2]_{10}]$ (con $n = 20, 40, 60$). Los tribloques seleccionados fueron subclonados en el vector de expresión pET25b(+)

modificado. De igual forma se procedió para la síntesis del tetrabloque y para el dibloques con unión de glicinas. Los plásmidos recombinates fueron transformados en una cepa de expresión *Escherichia coli* BL21(DE3) y posteriormente se paso a la producción.

3.2 Técnicas experimentales

3.2.1 Medida de turbidez.

Los experimentos de turbidez se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible, modelo Varian Cary 50 con lámpara de xenón. Equipado con una cámara portamuestras termostalizada modelo 00-10072-00, que permitirá controlar la temperatura entre 0 y 80°C con una precisión de $\pm 0.1^\circ\text{C}$. La muestra es continuamente agitada mediante un agitador magnético incluido en el propio accesorio de la cámara portamuestras termostalizada. De esta forma se consigue una temperatura y una turbidez homogénea en toda la muestra.

La temperatura de transición (T_i) se considera como la temperatura a la que la muestra alcanza el 50% de la turbidez máxima.

3.2.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

El equipo utilizado es un calorímetro de flujo de calor Mettler Toledo 822° con enfriamiento por nitrógeno líquido. El equipo ha sido calibrado en temperatura y entalpía con muestras de indio y n-octano. Entre 20 y 30 μL de la disolución del polímero de 125 mg/mL (a no ser que se indique expresamente algo diferente) fueron depositadas en un crisol estándar de aluminio de 40 μL herméticamente sellado. La misma cantidad de agua fue depositada en el crisol de referencia. Antes del calentamiento, las muestras fueron mantenidas durante 10 minutos a la temperatura de inicio dentro de la cámara del DSC. Ambas,

muestra y referencia, son calentadas a una velocidad constante (de 10°C/min cuando no se indique de otra forma) entre 5 y 70°C.

Para los cálculos de cinéticas de reacción se han utilizado velocidades de calentamiento 30, 24, 20, 16, 12, 8, 4 y 2 °C/min; y para enfriamiento -24, -20, -16, -12, -8, -4 y -2 °C/min.

Para los experimentos de caracterización de los copolímeros en bloque se ha usado una concentración de 50mg/mL y el siguiente programa de temperaturas: 5min a 5°C, posteriormente una velocidad de calentamiento entre 5 y 65 °C a 5°C/min, 1 min a 65 °C, y una velocidad de enfriamiento entre 65 y -10°C a -5°C/min.

Los valores de entalpía en los procesos endotérmicos han sido tomados como negativos y los exotérmicos como positivos.

3.2.3 DSC con modulación en temperatura (TMDSC)

Los experimentos de TMDSC fueron realizados en el equipo Mettler Toledo 822° con enfriamiento por nitrógeno líquido. Los ensayos de TMDSC se realizaron mediante programas de temperatura sinusoidales (superposición de una onda sinusoidal a una función lineal de temperatura) con la forma $T = T_0 + \beta t + A_T \sin(\omega t)$. La velocidad de calentamiento fue $\beta = 0.5$ °C/min y 1 °C/min, el periodo de la señal entre 0.1 min y 1.4 min y la amplitud fue de 0.1 °C.

La componente reversible en el análisis se obtiene de la amplitud del primer armónico del flujo de calor (A_p) usando una transformada de Fourier de los datos (o una aproximación de ella). La componente total es la media del flujo de calor, y la componente no reversible se obtiene de la substracción de la componente reversible a la componente total. El software de control y cálculo ha sido el suministrado por Mettler Toledo.

Para los estudios de la influencia de NaCl en las componentes de la ITT se han realizado cuatro experimentos y las barras de error corresponden al 95% de confinamiento.

3.2.4 Cinéticas de transición.

La cinética de reacciones estimuladas térmicamente en fase condensada se ha estudiado utilizando el método isoconvensional de Friedman en forma logarítmica:

$$\ln\left(\frac{d\alpha}{dt}\right) = \ln(A \cdot f(\alpha)) - \frac{E_a}{R \cdot T} \quad (3.1)$$

Representando el primer miembro de la ecuación (3.1) en función de $1/T$ para diferentes velocidades de calentamiento para un grado de conversión dado hace posible obtener la energía de activación en función del grado de conversión ($E_a(\alpha)$) el cual puede contener información útil sobre el mecanismo de reacción.

Para medidas de DSC, la velocidad de reacción está dada por $d\alpha/dt = \Phi/H_0$ donde Φ (W/g) es el flujo de calor y H_0 (J/g) es la entalpía de todo el proceso. Φ se obtiene directamente de la medida de DSC y H_0 se obtiene por la integración del pico completo en la transición. El grado de conversión se obtiene dividiendo la entalpía en un punto del proceso por la entalpía total $\alpha = H/H_0$.

Para realizar estos cálculos se ha elaborado, como parte de este trabajo, un programa en Visual Basic. Este programa importa en una base de datos propia los ficheros ASCII que contienen los datos experimentales exportados por el programa de DSC. El programa calcula la entalpía total H_0 y para cada registro (tiempo, temperatura, flujo) calcula la entalpía parcial H , de aquí se pueden obtener las curvas de conversión $\alpha(T)$ o $\alpha(t)$.

En el programa se puede seleccionar un número de valores del grado de conversión (entre 0 y 1), y para cada uno de estos grados de conversión el programa halla los valores de flujo de calor, de temperatura y de tiempo de todas

las curvas. El procedimiento consiste en un primer bucle que selecciona la curva i , un segundo bucle que selecciona el grado de conversión j , para cada uno de estos grados de conversión se busca entre que valores de los experimentales se encuentra y, después, por interpolación, se calcula el valor de tiempo, y de velocidad de reacción (Φ/H_0). Se tienen de estas formas cuartetos de datos ($\alpha_{i,j}$, $(d\alpha/dt)_{i,j}$, $t_{i,j}$, $T_{i,j}$) con i indicando el número de fila y j el número de grado de conversión. Posteriormente el programa realiza para cada j una regresión lineal entre $\ln[(d\alpha/dt)_j]$ y T_j^{-1} de la que se obtiene $\ln(A \cdot f(\alpha))$ y E_α . Todos estos datos que va calculando los almacena en su base de datos interna y los resultados finales los entrega en una hoja de Excel. Con una columna para el grado de conversión, otra para el término independiente $\ln(A \cdot f(\alpha))$, otra para E_α y después una columna de temperaturas para cada una de las curvas.

Durante la utilización de este programa se observaron varias dificultades. Por ejemplo, si el número de puntos de las curvas es muy pequeño el resultado puede mostrar cierto ruido con algún zigzag, esto se ha solventado ampliando el número de puntos iniciales de las curvas mediante una interpolación cuadrática. Otro problema puede aparecer cuando, para crear la línea base de integración, se toma el primer y último punto de la curva de transición. Estos puntos podrían ser erróneos debido, por ejemplo, a algún ruido en la medida. Para solucionar esto se ha recurrido a tomar unos pocos (seleccionables desde el programa) y tomando una media de ellos como valor inicial o final de la transición.

El código del programa utilizado, en Visual Basic, conjuntamente con el diseño de los formularios se encuentra en el apéndice 2.

3.2.5 Scattering de rayos X a ángulos bajos (SAXS)

La dispersión de rayos X a ángulos bajos (SAXS) y altos (WAXS) simultáneos se realizaron en experimentos a temperatura variable con una fuente de radiación de sincrotrón en el haz para polímeros A2 en el Hasylab (DESY) en

Hamburgo (Alemania). Los patrones de scattering fueron obtenidos usando un detector unidimensional y una radiación incidente con una longitud de onda $\lambda=0.15$ nm. Los experimentos se realizaron con disoluciones de polímeros de 100mg/mL en células de líquidos como las descritas en la referencia [154]. Las muestras se sometieron a ciclos de calentamiento enfriamiento dentro de la cámara de medida con control de temperatura. Empezando en 10°C, la muestra fue calentada a 2.5°C/min hasta 45°C e inmediatamente enfriada hasta 10°C a -2.5°C/min. Para los experimentos isotermos, la muestra fue calentada a cada temperatura y mantenida a esa temperatura durante 10 min antes de la medida. Los valores del vector de scattering pueden ser calculados como $q = 4\pi/\lambda \sin \theta$, donde θ es la mitad del ángulo de scattering.

3.2.6 AFM

Todos los análisis de AFM fueron llevados a cabo trabajando en modo dinámico (Tapping Mode) en aire. El equipo y modelo de AFM usado fue Multimode, Digital Instruments (Santa Barbara, CA, USA). Se usaron cantilivers de silicio (constante elástica 40N/m, frecuencia de resonancia de 150-190KHz).

3.2.7 Preparación de muestras para AFM

El sustrato para la deposición de los polímeros ha sido una oblea de silicio con dos posibles superficies: 1- con una capa de óxido de silicio nativa, o 2- con un tratamiento químico que elimina esa capa de óxido creando una superficie más hidrófoba terminada en hidruros de silicio (-H). El tratamiento se realizó mediante una inmersión de la oblea de silicio en un baño con $\text{NH}_4\text{F}:\text{HF}$ en proporción 7:1 durante 5 minutos seguido de otra inmersión en un baño con agua [155].

El sustrato de mica, fue preparado mediante una pieza de mica de 1cm^2 en la que se le separó una capa justo antes de la deposición para que estuviese lo más limpia posible.

Las concentraciones de las disoluciones de los polímeros depositados fueron de 10 mg mL^{-1} en agua con una concentración de 0.02M HCl (disolución ácida) y de 0.02 M NaOH (disolución básica). La deposición fue realizada por spin-coating a temperatura ambiente ($T < T_t$) a 4000rpm durante 30s y con purga de N_2 .

4 Resultados y Discusión

4.1 *Polímeros tipo elastina termosensibles.*

4.1.1 **Cinéticas en la Transición Inversa con la temperatura**

La utilización de técnicas de DSC sobre polímeros tipo elastina ha sido una herramienta clave para obtener información sobre la solvatación no polar (SNP) o también llamada hidratación hidrófoba. Por ejemplo, experimentos de DSC han puesto de relieve que las estructuras de SNP exhiben poblaciones heterogéneas, es decir, de estructuras bien ordenadas a pobremente ordenadas, variando a lo largo de la capa de SNP [47]. A pesar de esto, existe todavía una gran carencia de estudios sobre este tema; la escasez, por ejemplo, de estudios directos en el despegamiento y la formación concomitante de estructuras de SNP ha sido indicada recientemente en la bibliografía [156]. Este estudio intenta esclarecer este fenómeno aún no bien caracterizado. En particular, las cinéticas de formación de la capa de SNP no han sido nunca estudiadas ni para estos polipéptidos modelo ni para otros compuestos naturales o no naturales relevantes. Este trabajo pretende rellenar esta carencia aplicando un método de análisis cinético isoconversional de modelo-libre, es decir, el método isoconversional de Friedman, para el estudio de la cinética tanto en la formación y desarrollo de la SNP como en la destrucción de la SNP. Los métodos isoconversionales y multi-velocidad han demostrado ser adecuados para producir una información fiable de la cinética de procesos complejos en fases condensadas [91,157]. Estas técnicas han sido aplicadas en una gran cantidad de estudios de cinéticas de reacciones estimuladas térmicamente tales como descomposición, oxidación, reducción o cristalización de sólidos. La hipótesis de trabajo es, por tanto, que la utilización de estos métodos cinéticos es adecuada para el estudio de la ITT en polímeros tipo elastina, y aportará información interesante sobre esta transición y la formación y destrucción de la SNP.

Para realizar este estudio se han elegido de entre las diferentes posibilidades dos polímeros tipo elastina a los que se hace referencia ampliamente en la bibliografía, el poli(VPGVG) y el poli(VPAVG). El poli(VPGVG) está considerado como el polímero más representativo dentro de la familia de polímeros tipo elastina y por tanto puede tomarse como modelo general en el que el resultado probablemente se puede generalizar a muchos otros polímeros de esta familia especialmente a los polímeros con la fórmula general $(VPGXG)_n$ (con X cualquier aminoácido excepto prolina) [9]. Por otro lado, el poli(VPAVG) ha sido también incluido en este estudio por tratarse de un material, como se menciona en la introducción, con ciertas características particulares interesantes que lo hacen atípico dentro de la familia de polímeros tipo elastina.

El comportamiento térmico de disoluciones de los polímeros poli(VPGVG) y poli(VPAVG) en agua ha sido estudiado primeramente mediante un ensayo de DSC cíclico en tres pasos, calentamiento-enfriamiento-calentamiento. Los resultados de dicho ensayo pueden verse en la figura 4.1.

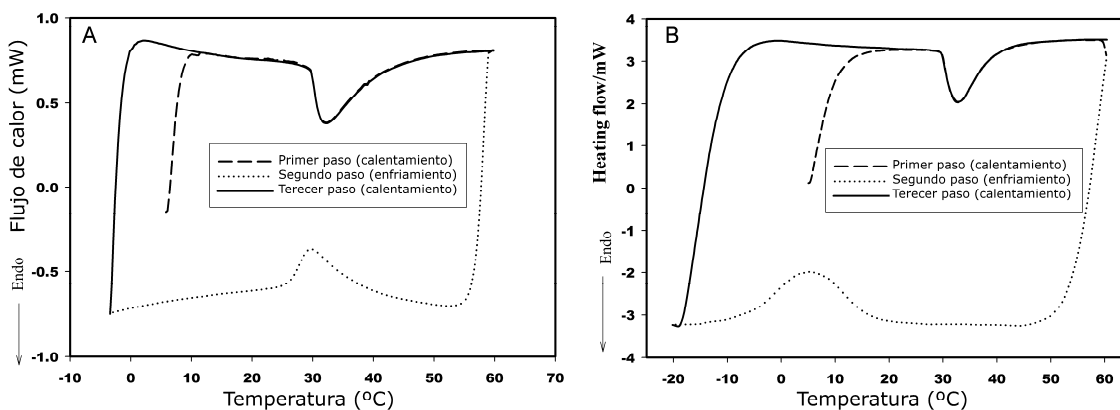


Figura 4.1: Ensayo de DSC típico sobre muestras de 125mg/mL en agua en programas de temperatura cíclicos calentamiento-enfriamiento-calentamiento. A) poli(VPGVG). B) poli(VPAVG). Velocidad de calentamiento 8 y -8 °C/min en enfriamiento, fueron usados en este ejemplo.

En ambos polímeros se puede observar un patrón de comportamiento con características comunes. Durante el primer barrido de calentamiento aparece en ambos la transición endotérmica característica de los polímeros tipo elastina. Esta endoterma está causada, como se ha mencionado en la introducción, por el

proceso característico de plegamiento de cadena acompañado por la destrucción de la capa externa de agua ordenada de SNP. Obviamente, y dado que la observación revela un pico endotérmico, esta última contribución domina el ensayo calorimétrico [9,47]. La T_t puede ser identificada como la temperatura de pico de esta endoterma. Por otro lado, el subsiguiente barrido de enfriamiento muestra una exoterma clara para ambos polímeros. Esto refleja el proceso inverso, es decir el desplegado de las cadenas poliméricas y la concurrente formación de la capa de hidratación. Sin embargo, aunque las características principales son comunes para ambos polímeros, hay diferencias significativas que apuntan a un mecanismo diferente. Para el poli(VPGVG), la T_t de calentamiento (“ T_{tH} ”) y la T_t de enfriamiento (“ T_{tC} ”) muestran sólo diferencias marginales que puede ser atribuidas al retraso térmico inherente de los experimentos de DSC (figura 4.1A). Sin embargo para el poli(VPAVG) $T_{tH} - T_{tC} = 25.6$ °C para este ensayo cíclico (a 8 °C min^{-1} $T_{tH} = 30.7$ °C y $T_{tC} = 6.1$ °C) (Figura 4.1B) lo que indica la existencia de una histéresis clara en este polímero; la cadena polimérica se pliega a 30.7°C pero no se despliega hasta que se produce un sobreenfriamiento a una temperatura de 6.1°C . Adicionalmente, se ha encontrado que la diferencia $T_{tH} - T_{tC}$, es decir, el grado de sobreenfriamiento, para el poli(VPAVG) es dependiente de la velocidad de calentamiento/enfriamiento, dependiendo esencialmente de la variación de la T_{tC} , como puede verse en la figura 4.2, en la que el pico exotérmico se desplaza a temperaturas más bajas cuando incrementamos la velocidad de enfriamiento. Por tanto la diferencia $T_{tH} - T_{tC}$ disminuye al disminuir la velocidad de calentamiento/enfriamiento, pero aún así esta diferencia es de más de 15°C para las velocidades de calentamiento más bajas ensayadas en este experimento.

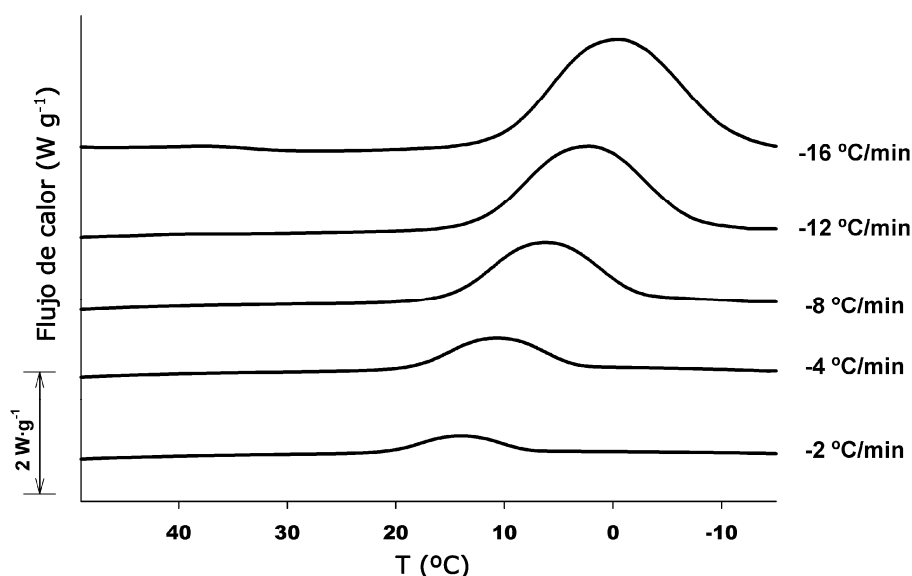


Figura 4.2: Termogramas de DSC en enfriamiento obtenidos para una disolución de 125 mg mL^{-1} de poli(VPAVG) en agua a diferentes velocidades de enfriamiento como está indicado en el gráfico.

Para estimar las diferencias reales y confirmar los resultados de DSC, se han obtenido también los valores de T_{tH} y T_{tC} bajo condiciones estáticas, realizando medidas de turbidez paso a paso. En este método experimental, la T_{t} se ha considerado como la temperatura a la que la turbidez es el 50% de la turbidez final. Mientras que para el polímero poli(VPGVG) ambas temperaturas coinciden (figura 4.3.A), para el polímero poli(VPAVG) se puede observar una gran variación en las temperaturas de transición en calentamiento y en enfriamiento (figura 4.3.B). Los valores de turbidez encontrados en este polímero fueron $T_{\text{tC}} = 17.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $T_{\text{tH}} = 30.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Por lo tanto, incluso bajo medidas estáticas, se observa una histéresis de $12.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$, lo cual apunta claramente a que las diferencias encontradas por DSC están en gran medida causados por las características moleculares peculiares del poli(VPAVG) y no debe atribuirse a artefactos, efectos cinéticos o condiciones experimentales.

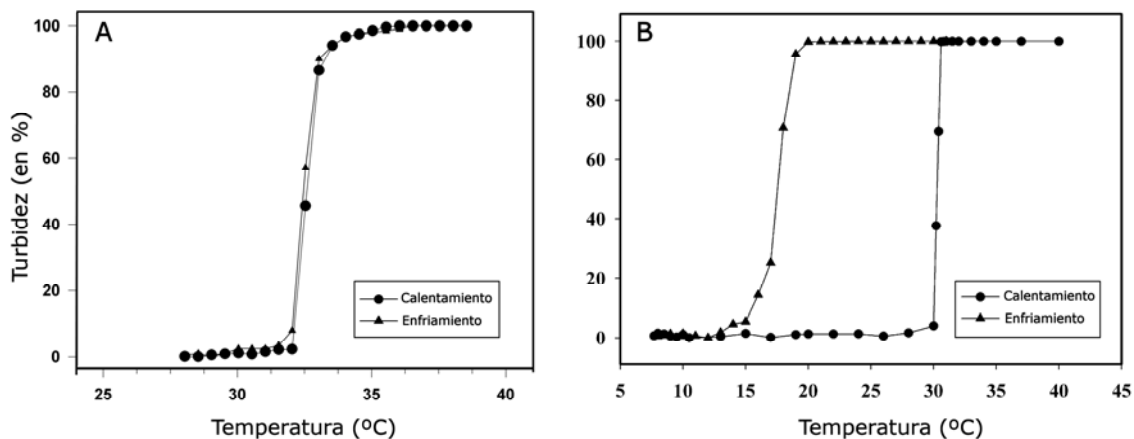


Figura 4.3: Perfiles de turbidez para una disolución en agua de 32mg/mL de: **A)** poli(VPGVG), y **B)** poli(VPAVG).

En cuanto a los valores de entalpía (“ ΔH ”) asociados con las transiciones calorimétricas anteriores, éstos también muestran diferencias remarcables entre ambos polímeros. El poli(VGVG) muestra una entalpía $\Delta H = 10 \text{ J g}^{-1}$; este valor es el mismo, dentro del error experimental independientemente de si es calentamiento o enfriamiento o de la velocidad de variación de la temperatura. Sin embargo, el poli(VPAVG) muestra valores de ΔH claramente diferentes para calentamiento (“ ΔH_H ”) que para enfriamiento (“ ΔH_C ”). Para todas las velocidades de calentamiento usadas en este estudio el ΔH_H muestra un valor prácticamente constante $\Delta H_H = 34 \text{ J g}^{-1}$. Por el contrario, ΔH_C es fuertemente dependiente de la velocidad de enfriamiento, siendo más alta para velocidades mayores, como puede verse cualitativamente en la figura 4.2 o cuantitativamente en la tabla 4.1. Como se ve en esta tabla los valores de ΔH_C son de alrededor de 2-3 veces mayores que los de ΔH_H .

Tabla 4.1: ΔH_C y T_t para poli(VPAVG) a diferentes velocidades de enfriamiento.

Velocidad de enfriamiento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	T_t ($^{\circ}\text{C}$)	$-\Delta H_C$ (J g^{-1})
-2	14.30	66.15
-4	10.80	72.52
-8	6.14	82.98
-12	2.05	85.76
-16	0.47	91.21

Contrariamente a lo que se puede pensar a priori, el exceso de entalpía encontrado en el enfriamiento no parece reproducirse durante un subsiguiente barrido de calentamiento. De esta manera, durante el tercer barrido (segundo barrido de calentamiento) mostrado en la figura 4.1B, el ΔH_H se corresponde al del primer barrido de 34 J g^{-1} , mientras que el ΔH_C fue de -83 J g^{-1} . De hecho, los picos endotérmicos encontrados durante el primer y tercer estado son prácticamente iguales en todos los aspectos, tanto en forma como en posición, superponiéndose casi perfectamente. El mismo resultado se ha encontrado para cualquiera de las velocidades de calentamiento y enfriamiento usadas en este trabajo. El exceso de entalpía medido durante el enfriamiento puede ser atribuido a la formación de algunas estructuras de SNP que posteriormente durante el siguiente ciclo de calentamiento mostrarán una dependencia cinética fuerte. En este sentido, debido a la parte cinética de la agregación (plegamiento del polímero y deshidratación de la SNP), parte de la componente endotérmica se distribuye a lo largo de la línea base y sin contribuir propiamente al pico endotérmico.

El hecho de que este sobreenfriamiento ocurra con un aumento de entalpía es un fenómeno interesante y guarda cierta similitud con el efecto producido por la disminución de la polaridad del polímero en la que la disminución de la temperatura viene acompañada de un aumento en la entalpía como se ha mostrado en la introducción y quedará también reflejado a lo largo de esta tesis. En la introducción se mostró (capítulo 2.4.2) que al aumentar la hidrofobicidad añadiendo por ejemplo un grupo $-\text{CH}_2$ la contribución en la entropía era mayor que en la entalpía, con lo cual al aumentar la hidrofobicidad aumentaba la

entalpía y también disminuía la temperatura. En nuestro caso, ocurre algo similar, con un aumento de entalpía debido al aumentar la capa de SNP, que se producirá con un incremento en la variación entropía que presenta una contribución mayor y por lo tanto la temperatura de transición ($T_t = \Delta H / \Delta S$) disminuirá.

El comportamiento atípico del polímero poli(VPAVG) puede tener su origen a nivel molecular en la substitución de la primera glicina de poli(VPGVG) por L-Alanina. Como ha sido mencionado anteriormente, según el modelo de Urry [9], el par Prolina-Glicina está directamente involucrado en la formación de la horquilla β . Estas horquillas β son puntos clave en el proceso de plegamiento-desplegamiento puesto que el plegamiento de la cadena ocurre vía formación de una de estas horquillas β por pentámero, y el desplegamiento completo involucra la destrucción de todas las horquillas β en la cadena. La estereosecuencia óptima para una horquilla β tipo II es la formada por dos aminoácidos de diferente quiralidad, es decir, L-D. Un residuo de glicina, siendo aquiral, puede fácilmente reemplazar un residuo D lo que hace que se forme la horquilla β tipo II para el par de aminoácidos P-G. La substitución de la glicina por L-Alanina puede causar diferencias significativas en el estado de plegamiento de ambos polímeros. La estructura y dinámica de los mismos polímeros usados en este trabajo han sido estudiadas en un trabajo reciente a varias temperaturas [35] usando una batería de técnicas experimentales de RMN como son COSY, NOESY, HXCORR, HSQC, HMBC, y SSLR INEPT. Los cambios de conformación inducidos térmicamente fueron estudiados usando acoplamiento $^3J_{\text{NHCH}}$, conectividad NOESY, cambios químicos, e intensidades de señal. En particular se observó una estructura caracterizada por una horquilla β estabilizada por puentes de hidrógeno entre el carboxilo de la alanina y el grupo NH de la primera valina del poli(VPAVG) a temperaturas superiores a la T_t . [35]. Por consiguiente, a pesar de la quiralidad L de la alanina, el grupo metilo no es tan voluminoso como para impedir la formación de la horquilla β . Conjuntamente, por encima de la T_t , aparecen un

mayor número de contactos alanina-alanina haciendo que este polímero sea más compacto y con menos agua en su interior [35]. Acorde al comportamiento observado en este trabajo, podríamos decir que el grupo metilo no impide la transición pero parece entorpecer, hasta cierto punto, el proceso de plegamiento y desplegamiento. En este sentido, en relación con estos datos, la influencia negativa de este grupo metilo parece ser más evidente durante el proceso de desplegamiento. La presencia de L-Alanina retrasa el desplegamiento en enfriamiento, así que el desplegamiento de la cadena no ocurre hasta que es alcanzado un fuerte sobreenfriamiento. Este fenómeno da lugar a una situación de sobreenfriamiento lejos del equilibrio que finalmente lleva a la formación de un exceso de hidratación que en el subsiguiente ciclo de calentamiento no tiene una naturaleza propiamente termodinámica.

El comportamiento inesperado encontrado en los experimentos anteriores apunta a la necesidad de elucidar los aspectos cinéticos de este fenómeno. Sin embargo, debido a la naturaleza compleja del proceso de hidratación-deshidratación, el cual se produce en una fase condensada y con la concurrencia del plegamiento-desplegamiento y la segregación de fases, el uso de modelos simples para estudiar estas cinéticas es totalmente inadecuado. Por lo tanto ha sido usado, un análisis cinético libre de modelo, el método isoconversional de Friedman, para tratar estos fenómenos. Con el uso de un método de libre de modelo, la interpretación de los resultados no resulta tan simple aunque el análisis resultará definitivamente más fiable (sección 2.8.1). Como se ha descrito en la sección de materiales y métodos, el método provee valores de $E_a(\alpha)$. Por la forma y valores de $E_a(\alpha)$, se puede obtener cierta información que permita especular sobre el proceso involucrado.

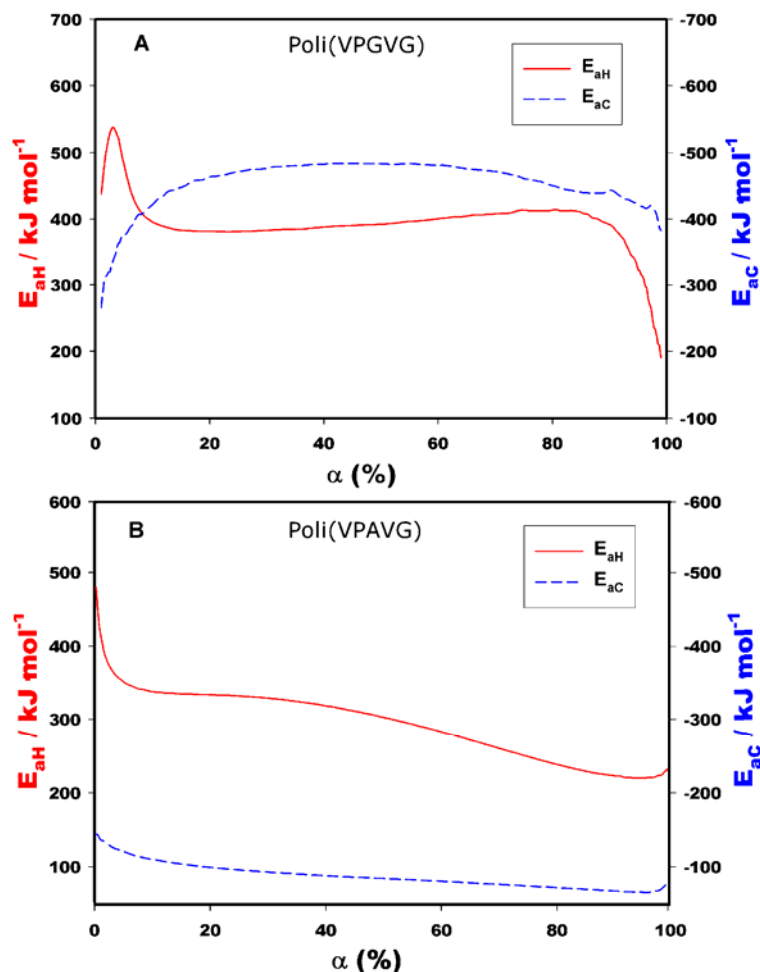


Figura 4.4: Energías de activación en función del grado de conversión α para: **A)** poli(VPGVG) y **B)** poli(VPAVG).

El análisis cinético para el polímero poli(VPGVG), llevado a cabo como se describe en la sección de materiales y métodos, produce las dos relaciones representadas en la figura 4.4A, es decir, una para hidratación-desplegamiento del polímero durante el evento de enfriamiento (“ E_{aC} ”) y otra para el otro proceso, el de deshidratación-plegamiento producido en calentamiento (“ E_{aH} ”). Como era de esperar, E_{aC} muestra valores negativos debido a la variación negativa de la temperatura durante los experimentos de enfriamiento; sin embargo, es el valor absoluto lo que importa para el propósito del análisis. En este caso, E_{aC} y E_{aH} han mostrado variaciones claras durante el proceso de conversión. Esto indica sin ambigüedad que, como era presumible, los dos procesos pueden ser considerados como procesos multipaso (*multistep*)

complejos que no pueden ser descritos satisfactoriamente por análisis con modelos cinéticos convencionales. Consecuentemente, la elección de un análisis cinético de modelo-libre está suficientemente justificada a pesar de tratarse de un procedimiento más complicado y de la carencia de una interpretación absoluta de los datos. El valor de E_{aH} , el cual describe el proceso de plegamiento de cadena y su deshidratación concurrente, empieza mostrando valores altos (alrededor de 537 KJ mol^{-1}), indicando una cinética inicial lenta. Sin embargo, el proceso rápidamente se acelera como se puede observar con una disminución substancial de E_{aH} a un nivel en torno a 380 kJ mol^{-1} . Este valor se sostiene durante el resto de la conversión con solamente un ligero incremento desde aproximadamente $\alpha=20\%$ a $\alpha=80\%$. Este tipo de zona plana suele indicar la existencia de un paso limitante en esta parte del proceso que condiciona la cinética de procesos total dentro del rango de conversión. De este análisis cinético, no es posible determinar cual es el paso limitante. Sin embargo, en muchos otros procesos que involucran agua, la difusión de moléculas de agua es tomada como el paso limitante [91,95]. Si este también es el caso aquí, la difusión de agua desde la superficie de las estructuras de SNP al grueso del agua podría también ser el paso limitante que tiene lugar. Adicionalmente es necesario tener en mente la naturaleza compleja y peculiar de los procesos que tienen lugar en este sistema. Por lo tanto, otros pasos tales como el plegamiento de la cadena en si mismo, podría también ser un plausible estado limitante. En la última parte de la conversión, más allá de $\alpha=80\%$, el proceso se acelera, y se aprecia una caída final en E_{aH} (ver figura 4.4A). En términos generales, la forma de la curva E_{aH} es del tipo expuesto por la mayoría de los procesos reversibles [91,95].

Si comparamos ahora la tendencia mostrada por E_{aC} del poli(VPGVG) con su energía de activación en calentamiento E_{aH} , podremos ver que el comportamiento difiere en algunos aspectos (ver figura 4.4A). Al contrario de lo que pasa en el primer estado de E_{aH} , la cinética de enfriamiento muestra valores bajos del modulo de E_{aC} (260 KJ mol^{-1}). Sin embargo, estos valores bajos se

pierden fácilmente y se observa un aumento intenso hasta los 480 KJ mol^{-1} durante el primer 20% de la conversión. En torno a $\alpha = 8\%$ el valor absoluto de E_{aC} se hace más alto que E_{aH} , indicando que, para una gran parte de ambos procesos, el desplegamiento e hidratación de la cadena muestra una cinética mas lenta que el proceso contrario de plegamiento y deshidratación. Para valores mayores al 20%, la curva de E_{aC} muestra una zona principalmente plana, aunque con forma ligeramente convexa sobre la curva total. De nuevo, la presencia de una zona plana más o menos definida parecería indicar la existencia de un paso limitante durante la mayor parte del proceso. Adicionalmente, esta forma convexa ha sido identificada en muchos sistemas diferentes con un paso de difusión limitante [91,95]. Entonces, es plausible pensar que el agua que difunde desde el grueso del agua a las estructuras de SNP nuevamente formadas es el paso limitante de este proceso de desplegamiento-hidratación.

La situación encontrada para el polímero poli(VPAVG) muestra similitudes pero también diferencias significativas con el poli(VPGVG). La evolución de E_{aH} y E_{aC} del poli(VPAVG) ha sido representada en la figura 4.4B. La E_{aH} muestra valores iniciales en torno a 480 KJ mol^{-1} , los cuales rápidamente disminuyen a 340 kJ mol^{-1} durante los momentos iniciales de la conversión. De este punto en adelante, la curva E_{aH} tiende a alcanzar una zona plana similar a la observada para poli(VPGVG). Sin embargo, esta tendencia es mantenida solamente hasta una conversión de aproximadamente del 30%. De este punto en adelante, E_{aH} experimenta una caída suave y sólo llega a ser estable a valores de 220 kJ mol^{-1} durante la etapa final, a conversiones de más de 85%. De acuerdo con la bibliografía [95], la forma citada mostrada por E_{aH} se asemeja perfectamente a la típica forma de un proceso en el que existe un cambio en el paso limitante. Además, uno puede razonablemente asumir que esta circunstancia está teniendo lugar durante la cinética del plegado y deshidratación de poli(VPAVG).

Por otro lado la E_{aC} del poli(VPAVG) difiere fuertemente de la encontrada para el poli(VPGVG), indicando que este proceso de desplegado e hidratación

progresa a una mayor velocidad para poli(VPAVG) que para poli(VPGVG). En cuanto a los valores de E_{aC} mostrados por el poli(VPAVG), estos son también menores que los de E_{aH} , y contrariamente a lo que fue observado para el poli(VPGVG) ahora el proceso de desplegamiento-hidratación se produce de una forma más rápida que el de plegamiento-deshidratación. Finalmente, y en este caso, la curva de E_{aC} claramente muestra una zona plana para prácticamente la totalidad de α , sugiriendo una cinética con un fuerte paso limitante.

Para intentar comprender estas diferencias, tenemos que considerar que, como se discutió inicialmente, se espera que la sustitución de glicina por alanina impida o dificulte la rotación necesaria para el establecimiento o destrucción de las horquillas β , la característica principal del estado plegado para ambos polímeros [35]. Como se ha encontrado inicialmente, el proceso de desplegamiento parece estar parcialmente bloqueado por la voluminosidad del grupo metilo de la cadena lateral de la alanina y sólo tiene lugar ante fuertes sobreenfriamientos. Consecuentemente, no es sorprendente que ante estas circunstancias de sobreenfriamiento considerable, y claramente lejos del equilibrio termodinámico, la cinética de desplegamiento sea más rápida y muestre un evidente paso limitante.

4.1.2 Modulación en Temperatura (TMDSC). Separación de componentes de la ITT en los ELPs modelo.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una herramienta excelente para cuantificar muchos aspectos de la ITT. Sin embargo, como se ha discutido en el anterior capítulo, esta característica térmica presenta una cinética compleja en la que es posible suponer que existen varios fenómenos que ocurran durante esta transición como podrían ser la destrucción de las estructuras ordenadas de SNP o el plegamiento y autoensamblado de las cadenas poliméricas. Puesto que estos fenómenos son de naturaleza física bien distinta, sería de gran utilidad un

método térmico que provea una estimación cuantitativa de cada componente en la comprensión del efecto hidrófobo subyacente en el comportamiento llamativo de esta familia de polímeros funcionales avanzados. La calorimetría diferencial de barrido con modulación en temperatura (TMDSC) provee una oportunidad atractiva para acercarnos a ese objetivo. Se presenta entonces como hipótesis de trabajo ver si mediante TMDSC es posible la separación de los diferentes fenómenos que tienen lugar durante la ITT y que producen una cinética compleja como la estudiada en el capítulo anterior.

Como se ha comentado en el capítulo 2.8.2 el TMDSC es una medida de DSC avanzada que es capaz de separar fenómenos térmicamente solapados con diferentes dependencias temporales mediante el uso de un programa de calentamiento que contenga una función de temperatura alternante tal como un seno o una función de diente de sierra, superpuesta a una velocidad de calentamiento constante (r) [111-119]. En principio, la TMDSC proveerá una separación clara de dos fenómenos separados cuando, bajo unas condiciones dinámicas particulares, uno es reversible y el otro no o simplemente presentan cinéticas distintas.

En este capítulo se describe el uso de TMDSC para el estudio de la característica termodinámica de los fenómenos solapados que tienen lugar durante la ITT para tres ELPs diferentes. Los polímeros elegidos han sido el polímero poli(VPGVG) sintetizado químicamente el cual ha sido tomado en numerosas publicaciones como el ELP modelo, su homólogo bioproducido, el polímero (GVGVP)₂₅₁ y el polímero (GVGIP)₃₂₀ el cual presenta una naturaleza más apolar que el anterior. Desde luego, un candidato evidente adicional, según se ha discutido con anterioridad sería el polímero poli(VPAVG), utilizado en el cálculo de cinéticas. Desgraciadamente debe adelantarse en este momento que no se ha podido obtener ningún resultado mediante la TMDSC debido probablemente a la gran histéresis que este presenta. Hay que tener en cuenta que bajo estas circunstancias, la componente modulada del programa de temperatura

debería tener una amplitud comparable a la de la propia diferencia de temperaturas entre los picos que aparecen en enfriamiento y calentamiento. Esta amplitud es tan grande que impide completamente el proceso experimental.

La figura 4.5 muestra experimentos convencionales de DSC para las tres disoluciones de polímeros. Los termogramas muestran la típica endoterma asociada con la ITT. Las características térmicas son las esperadas, con (GVGIP)₃₂₀ mostrando los valores más altos de la entalpía de transición y los menores de T_t como consecuencia del aumento de hidrofobicidad del monómero GVGIP comparado con GVGVP. Los polímeros que contienen el monómero GVGVP muestran aproximadamente la misma entalpía de transición como resultado de su idéntica hidrofobicidad pero el poli(VPGVG) muestra un valor mayor de T_t que (GVGVP)₂₅₁. Este último efecto puede ser causado por la polidispersidad del poli(VPGVG) y la influencia de las fracciones de bajo peso molecular en T_t [46,152,158,159].

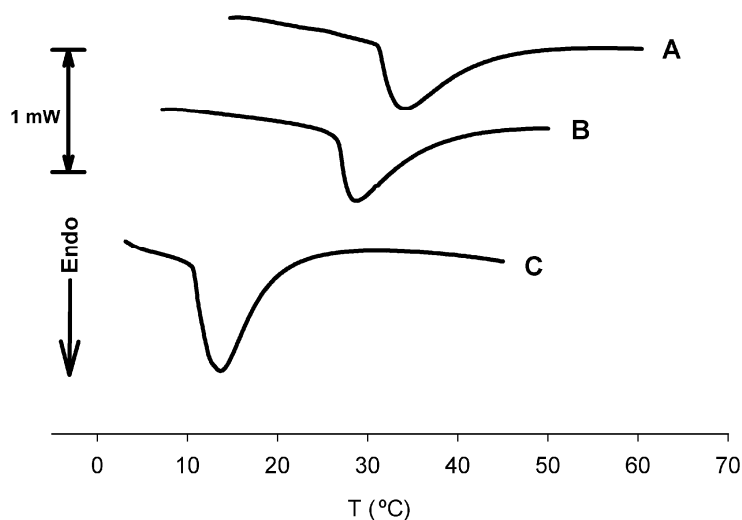


Figura 4.5: Termograma de DSC convencional de una disolución acuosa de 125mg/mL para (A) poli(GVGVP); (B) (GVGVP)₂₅₁; (C) (GVGIP)₃₂₀ ($r = 10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$).

Como hemos visto ya, durante el calentamiento de una disolución de este polímero y al sobrepasar T_t se produce una destrucción de las estructuras ordenadas de hidratación hidrófoba, que es un fenómeno similar a la fusión y debe ser considerado como endotérmico. Por el contrario, una vez el polímero ha

perdido su hidratación hidrófoba, la formación del estado ordenado plegado con la estabilización mediante contactos de Van der Waals debe ser considerada como un proceso exotérmico ya que se forman nuevos enlaces. Con lo cual, la endoterma encontrada en el ensayo de DSC será por tanto el resultado neto de la suma de ambas contribuciones de signo opuesto. Naturalmente, aunque ambos eventos tienen lugar simultáneamente, tienen una naturaleza muy diferente. En particular, es razonable considerar que ambos fenómenos ocurren con cinéticas diferentes. En efecto, como se ha discutido previamente en el estudio realizado sobre el mismo polímero poli(VPGVG) el proceso de separación de fase es más rápido que el proceso de redisolución. Por ello, ambos fenómenos podrían ser separados mediante TMDSC si somos capaces de encontrar la frecuencia de la componente periódica del programa de temperaturas suficientemente baja para que el fenómeno más rápido pueda seguir los cambios oscilantes de temperatura (*reversing*) y suficientemente alta para impedir este comportamiento alternante al fenómeno más lento (*non-reversing*).

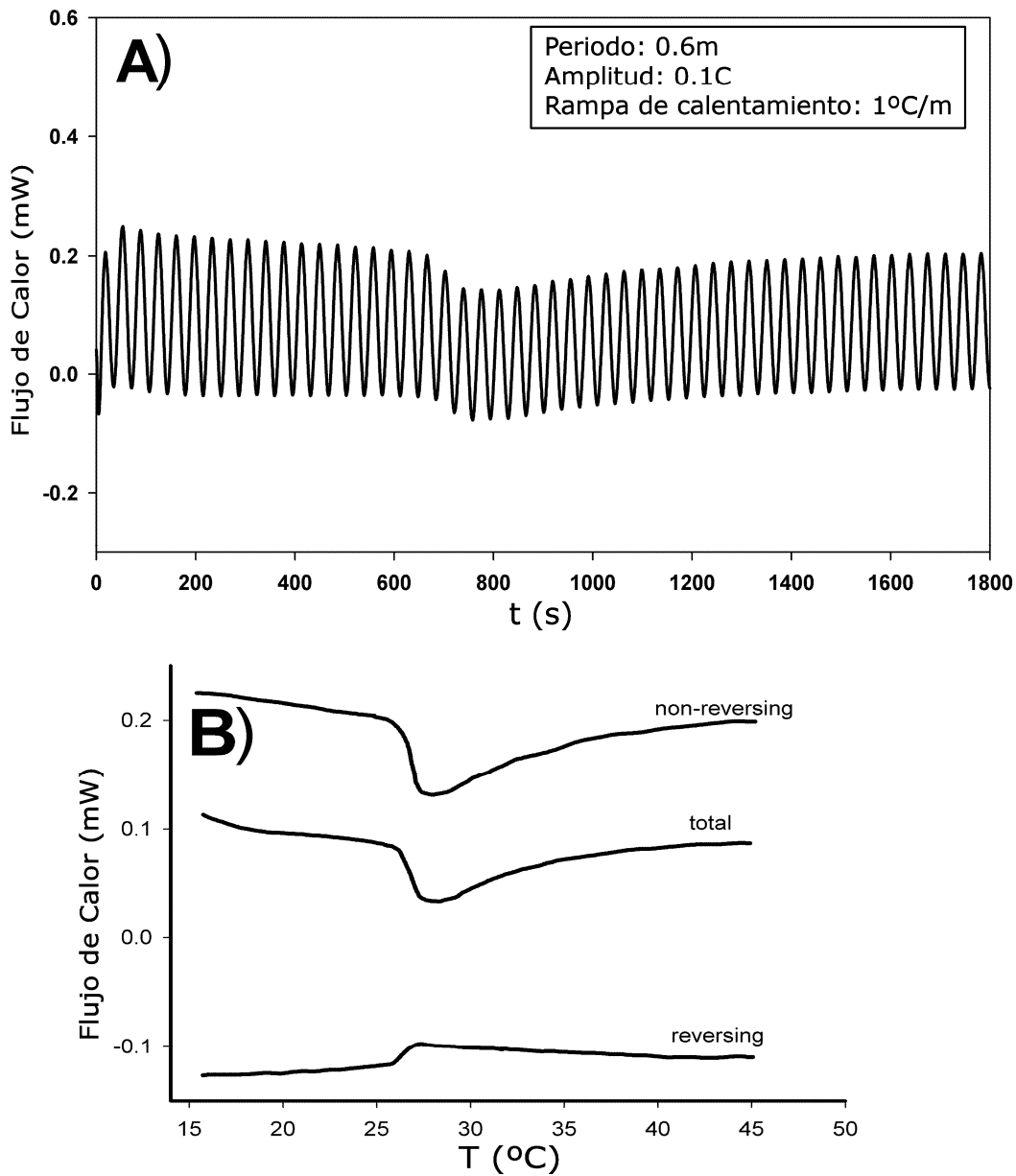


Figura 4.6: **A)** Flujo de calor como función del tiempo en un experimento de TMDSC de una disolución acuosa de (GVGVP)₂₅₁. **B)** Componentes reversing, non-reversing y total.

En la figura 4.6A se muestra, como ejemplo, uno de los termogramas de TMDSC para el polímero (GVGVP)₂₅₁ mientras que la figura 4.6B muestra los resultados del análisis correspondiente. Como se ha presentado en la hipótesis previa, bajo estas condiciones experimentales, la curva endotérmica total ($\Delta H_{\text{Tot}} = 10,4 \text{ J g}^{-1}$, $T_t = 27,7 \text{ °C}$) está compuesta por una componente *non-reversing* endotérmica ($\Delta H_{\text{non-rev}} = 14,0 \text{ J g}^{-1}$, $T_t = 27,6 \text{ °C}$) y por una componente *reversing*

exotérmica ($\Delta H_{\text{rev}} = -3.3 \text{ J g}^{-1}$, $T_t = 27.3 \text{ °C}$). Un análisis detallado ha sido llevado a cabo para determinar la dependencia de las componentes *reversing* y *non-reversing* en función de la velocidad de calentamiento (r), la amplitud (A) y el periodo (P). Los cambios en r (0.5-1.5 °C/min), A (0.1-1 °C) y P (0.1-10 min) no afectan significativamente los valores de entalpía y de T_t de la contribución total, los cuales son similares a los obtenidos por DSC convencional. Además las componentes *reversing* y *non-reversing* tampoco parecen verse afectadas por los cambios en r y A . A diferencia de las variables r y A , la variable P muestra una fuerte influencia sobre los valores de entalpía de ambas componentes. En la figura 4.7 se muestran la descomposición en componentes *reversing* (Figura 4.7.A) y *non-reversing* (Figura 4.7.B) para el polímero sintetizado químicamente el poli(VPGVG) a diferentes periodos de oscilación. De igual forma se puede ver esta descomposición para el polímero (GVGVP)₂₅₁ (Figura 4.8) y para el polímero (GVGIP)₃₂₀ (Figura 4.9). Como puede observarse el patrón de comportamiento de las componentes *reversing* es el mismo para los tres polímeros (Figura 4.7.A, Figura 4.8.A y Figura 4.9.A): para periodos bajos las transiciones son exotérmicas aunque de valor muy bajo, y aumentando con el periodo, hasta que llega un punto en el que la tendencia se invierte y el pico disminuye para terminar convirtiéndose en endotérmico a periodos altos. De igual forma las componentes *non-reversing* (Figura 4.7.B, Figura 4.8.B y Figura 4.9.B) muestran un comportamiento similar para los tres polímeros, mostrando una mayor entalpía para las curvas que corresponden a periodos intermedios.

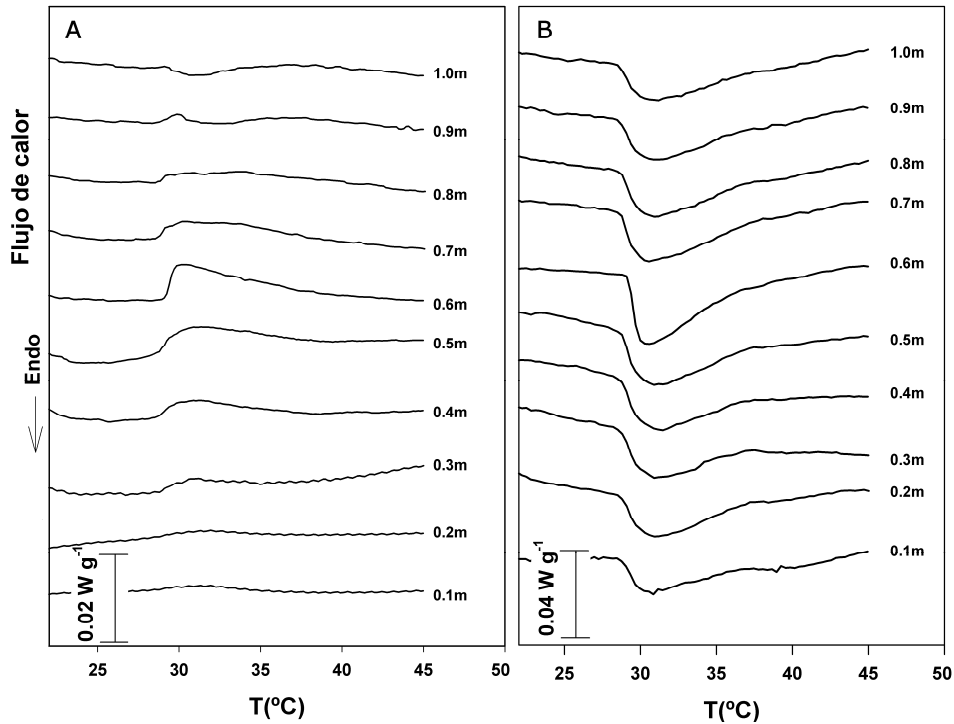


Figura 4.7: Descomposición en las componentes de TMDSC de una disolución de Poli(VPGVG) variando el periodo de oscilación. **A)** Componente reversing; **B)** Componente nonreversing ($r = 10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ y $A=0.1 \text{ }^\circ\text{C}$)

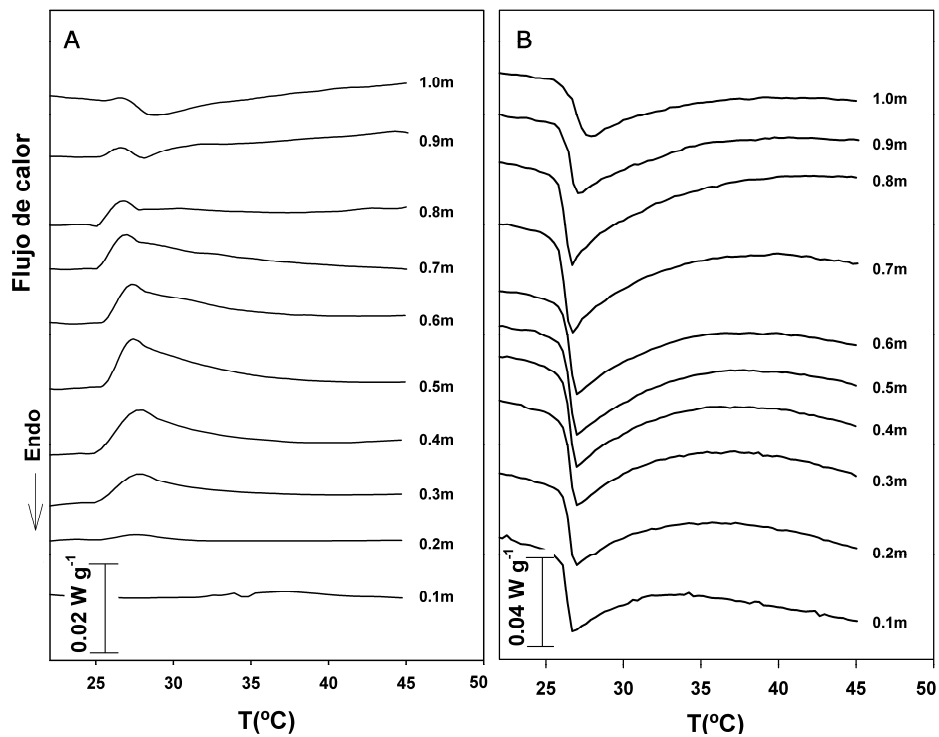


Figura 4.8: Descomposición en las componentes de TMDSC de una disolución de (GVGVP)₂₅₁ variando el periodo de oscilación. **A)** Componente reversing; **B)** Componente nonreversing ($r = 10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ y $A=0.1 \text{ }^\circ\text{C}$)

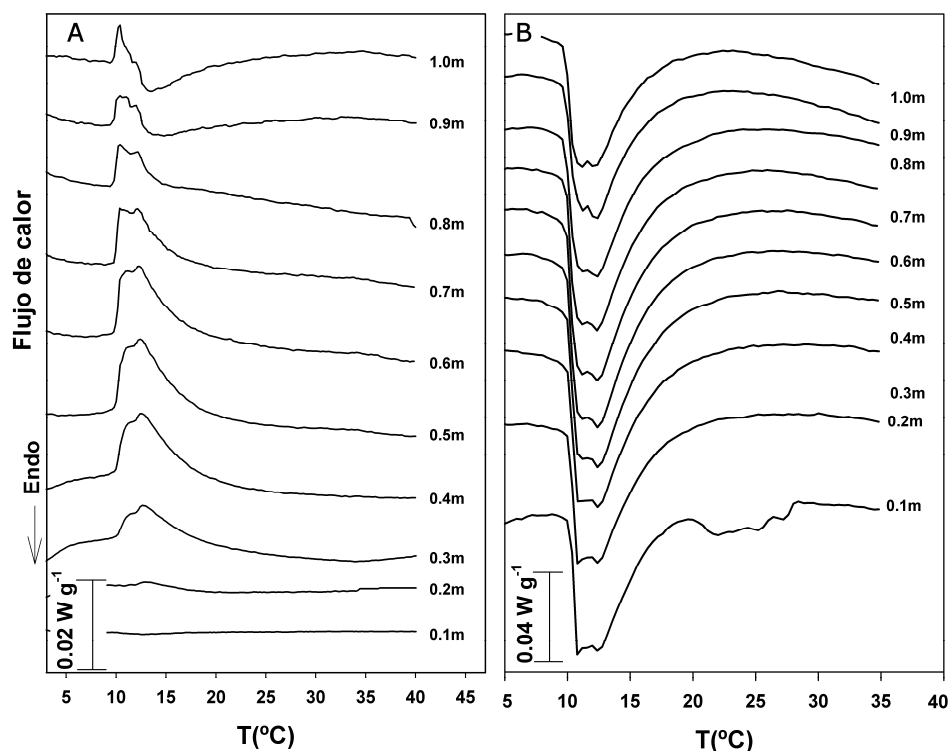


Figura 4.9: Descomposición en las componentes de TMDSC de una disolución de $(GVGIP)_{320}$ variando el periodo de oscilación. **A)** Componente *reversing*; **B)** Componente *non-reversing* ($r = 10 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$ y $A=0.1 \text{ } ^\circ\text{C}$)

La entalpía de la componente *reversing* ΔH_{rev} ha sido representada en la figura 4.10 en función del periodo P para los tres polímeros. En todos los casos, a baja frecuencia (alto P), la componente *reversing* muestra un pico endotérmico con una entalpía comparable a la mostrada por el pico endotérmico total. Por lo tanto, a estos valores altos de P , el plegamiento de la cadena y deshidratación no son separadas experimentalmente. Sin embargo, cuando P disminuye, ΔH_{rev} experimenta un aumento substancial. A valores de P en el intervalo 0.8-1 min, la componente *reversing* se transforma en pico exotérmico, el cual alcanza un máximo a periodos $P=0.5\text{-}0.6$ min (P_M) o lo que es lo mismo entre 28 y 33 mHz.

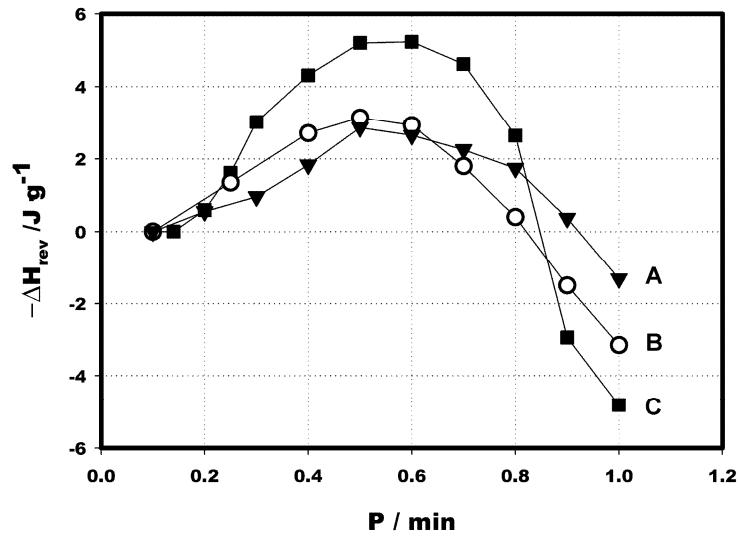


Figura 4.10: ΔH_{rev} como función de P para una disolución acuosa de 125mg mL^{-1} de: **A)** poli(GVGVP); **B)** (GVGVP)₂₅₁; **C)** (GVGIP)₃₂₀ ($r = 10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ y $A=0.1\text{ }^\circ\text{C}$).

Paralelamente $\Delta H_{\text{non-rev}}$, que es la substracción $\Delta H_{\text{Tot}} - \Delta H_{\text{rev}}$, sufre una variación equivalente (de signo contrario) siendo cero para periodos muy grandes y su valor máximo para P_M . Por consiguiente, cuando P disminuye, la componente *reversing* se ve enriquecida con el fenómeno exotérmico (plegamiento de la cadena), mientras que la *non-reversing* se ve enriquecida con el fenómeno endotérmico (deshidratación). Los valores de ΔH_{rev} , $\Delta H_{\text{non-rev}}$, ΔH_{Tot} encontrados a P_M pueden verse en la tabla 4.2. Para una mayor disminución de P , existe una reducción progresiva en ΔH_{rev} hasta cero, y un aumento en $\Delta H_{\text{non-rev}}$ hasta la entalpía total como consecuencia de un solapamiento completo de los dos fenómenos en la componente *non-reversing*.

La máxima separación del solapamiento se encuentra aproximadamente al mismo P_M independientemente del polímero. Adicionalmente, la comparación de los datos encontrados para (GVGVP)₂₅₁ y (GVGIP)₃₂₀ indica que la componente *reversing* en el máximo es más alto para (GVGIP)₃₂₀. Debido a la mayor hidrofobicidad del aminoácido I comparado con V, su plegamiento de cadena muestra una mayor ΔH_{rev} exotérmica (ver tabla 4.2). Por consiguiente, los valores de ΔH_{rev} podrían entonces ser usados como una medida cuantitativa de la

hidrofobicidad de los aminoácidos. Adicionalmente, el aumento en hidrofobicidad de (GVGIP)₃₂₀ induciría también una mayor extensión de la hidratación hidrófoba, así un mayor $\Delta H_{\text{non-rev}}$ endotérmico es también razonable.

No hay diferencias significativas cuando se comparan los datos de (GVGVP)₂₅₁ y poli(GVGVP) (ver tabla 4.2). Siendo la única diferencia entre estos polímeros su dispersidad en el peso molecular, sus resultados de TMDSC son prácticamente los mismos, lo cual implicaría que las componentes *reversing* y *non-reversing* dependen principalmente de la hidrofobicidad media del polímero.

Algunos valores típicos de ΔH encontrados en la bibliografía para reacciones de plegamiento de proteínas naturales se encuentran en el orden de 66 kcal mol⁻¹ para ribonucleasas o 12.4 kcal mol⁻¹ para citocromo c [160]. Los valores de ΔH_{tot} encontrados para los ELPs usados en este trabajo son casi un orden de magnitud mayor (Tabla 4.2), lo cual indica la idoneidad de estos polímeros como modelo de las proteínas naturales. Por otro lado, los gases no polares son prácticamente el único sistema experimental donde la hidratación hidrófoba puede ser seguida sin interferencias. En la serie de alcanos, la entalpía de disolución en agua es de unas 5 kcal mol⁻¹(de -CH₂) [161]. Los valores encontrados aquí para $\Delta H_{\text{non-rev}}$ se encuentran por encima de ese valor aunque en el mismo orden de magnitudes. Sin embargo, teniendo en cuenta las enormes diferencias en sus pesos moleculares, la presencia de estructuras menos perfectas de agua ordenada en los polímeros comparada a los que tienen lugar en los gases no polares es plausible. Tales estructuras heterogéneas con estabilidades variables han sido ya sugeridas [47].

Tabla 4.2: Valores de entalpía de las componentes reversibles, no reversibles, y total encontradas a P_M . (el signo negativo indica proceso exotérmico)

Polímero	ΔH_{rev} [J/g (kcal·mol ⁻¹)]	$\Delta H_{non-rev}$ [J/g (kcal·mol ⁻¹)]	ΔH_{tot} [J/g (kcal·mol ⁻¹)]	P_M [min]
(GVGIP) ₃₂₀	-5.61 (-177.4)	22.82 (672.6)	17.21 (507.2)	0.6
(GVGVP) ₂₅₁	-3.14 (-77.14)	11.34 (278.6)	7.50 (184.2)	0.5
Poli(GVGVP)	-2.96 (-68.02)	11.11 (255.3)	8.79 (202.0)	0.5

Con todo esto, el TMDSC ha demostrado ser un método efectivo para separar los fenómenos superpuestos presentes en la ITT de los polímeros elásticos basados en péptidos. Mediante un ajuste de la frecuencia de la componente periódica, se puede lograr una máxima separación la cual muestra una contribución exotérmica procedente de las interacciones de Van der Waals presentes en el plegamiento de cadena y ensamblado, y una contribución endotérmica atribuible a la pérdida de hidratación hidrófoba. El valor de la primera, en valor absoluto, es aproximadamente la cuarta parte del de la segunda. Los valores de entalpía de ambas contribuciones parecen depender exclusivamente de la hidrofobicidad media del monómero y no de otros parámetros tales como la polidispersidad en el peso molecular. Hasta este momento, el TMDSC es el único método disponible para separar ambas contribuciones. Consecuentemente, su utilización en futuras investigaciones para evaluar la hidrofobicidad de todos los posibles aminoácidos naturales y modificaciones relevantes de estos es clara y su relevancia en el plegamiento hidrófobo de polímeros y proteínas naturales es notoria.

4.1.3 Influencia de la adición de sales en las componentes endotérmicas y exotérmicas de la ITT.

La utilización de ELPs como materiales avanzados en aplicaciones biomédicas hace que sea necesario el estudio de la influencia de los compuestos fisiológicos en sus propiedades. Desde este punto de vista, el efecto del NaCl, el cual es la sal más prominente en el medio extracelular, es de vital importancia,

especialmente sabiendo el gran efecto que las sales producen en la ITT de los ELPs [9]. En los primeros estudios sobre el efecto del NaCl sobre la ITT se ha puesto de manifiesto, mediante DSC, que el aumento de la concentración de NaCl produce una disminución en la T_t y un aumento de la entalpía (ΔH). Sin embargo, existe una carencia de información que explique ese fenómeno. En este capítulo, se estudia el efecto de NaCl en las componentes endotérmicas y exotérmicas de la ITT usando TMDSC, de forma similar a como se ha realizado en los experimentos mostrados en el capítulo anterior. El objetivo es intentar arrojar luz sobre el efecto que causa la presencia de sales en los diferentes procesos que experimentan estos polímeros durante la ITT.

Como se ha visto antes, la ITT del polímero (GVGVP)₂₅₁ se manifiesta en los experimentos de DSC como una endoterma. Cuando se añade NaCl, dicha endoterma se desplaza a menores temperaturas a la vez que aumenta su área (ver figura 4.11).

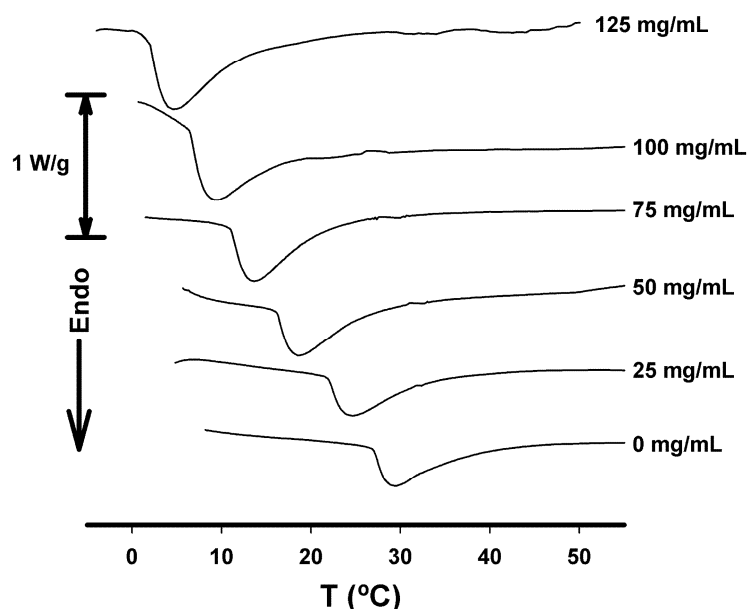


Figura 4.11: Termogramas de DSC obtenidos para una disolución acuosa de 50 mg mL⁻¹ de (GVGVP)₂₅₁ para diferentes concentraciones de NaCl.

A partir de los datos de T_t y entalpía de la figura anterior, se puede cuantificar dicha dependencia (Figura 4.12). En la figura 4.12A se puede observar una variación prácticamente lineal de T_t en función de la concentración de NaCl. La pendiente de dicha recta es $\delta T_t / \delta M = -11.5 \text{ } ^\circ\text{C M}^{-1}$ ($= -0.2 \text{ } ^\circ\text{C}/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$), la cual sólo presenta una pequeña disminución para valores altos de la concentración de NaCl, donde se observa una pequeña pérdida de la tendencia lineal.

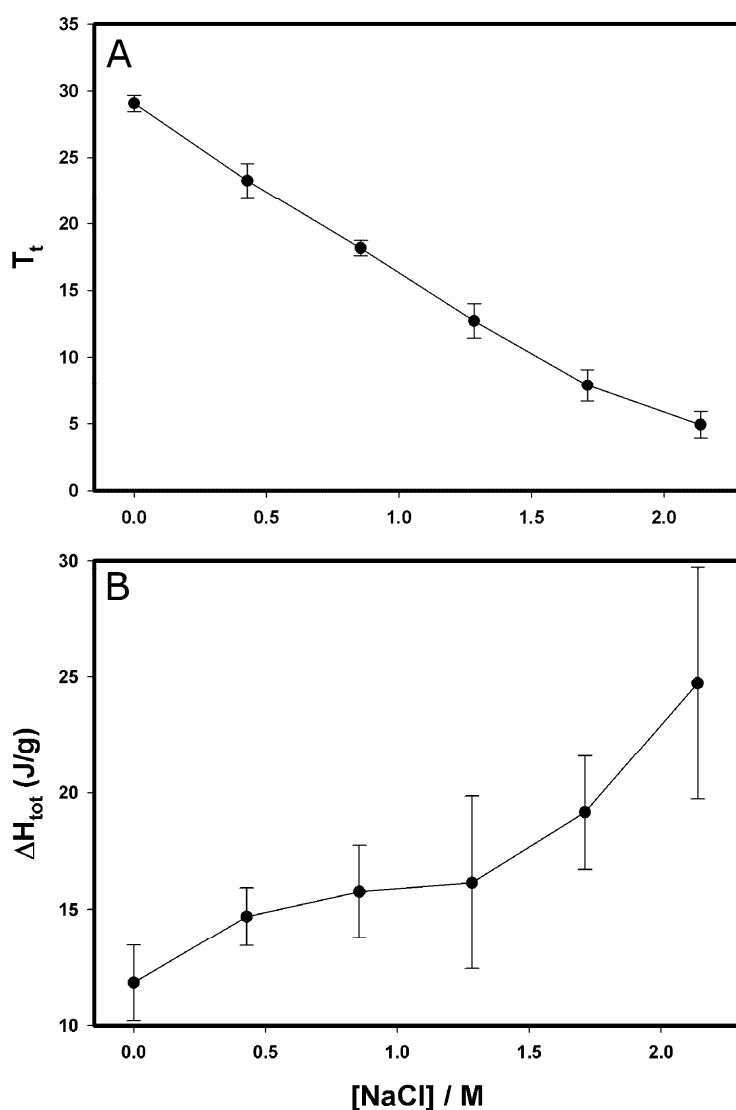


Figura 4.12: Influencia de la concentración de NaCl en la ITT de una disolución acuosa de 50mg/mL de (GVGVP)₂₅₁. **A)** T_t de la ITT; **B)** ΔH de la ITT.

Por otro lado, la entalpía presenta un incremento que podría tratarse de un incremento lineal con $\delta\Delta H/\delta M = 5.26 \text{ J g}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ($=90 \text{ mJ}\cdot\text{g}^{-1}/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$), aunque, dado el error experimental en la determinación de ΔH , no es posible determinar con mejor precisión este hecho (Figura 4.12B).

La disminución de la temperatura de transición implica que la forma hidrófobamente plegada se vuelve más estable con respecto a la forma extendida en ese rango de ΔT y se produce la transición. Por otro lado, existe también un incremento en la entalpía de la ITT con la adición de NaCl, estando esa entalpía relacionada, en gran parte, con la destrucción de las estructuras de agua que rodean los restos hidrófobos [162], así que podría tratarse de la aparición de más moléculas de agua en las estructuras ordenadas de hidratación hidrófoba o un mejor ordenamiento de las mismas o ambas cosas. De esta forma, la causa de la disminución de la T_t no debe entenderse como una pérdida de la estabilidad de la forma plegada como consecuencia de la presencia de NaCl y la destrucción de las estructuras de agua de la SNP, lo que es relevante porque esta explicación ha sido esgrimida con anterioridad para explicar el efecto de el NaCl en la LCST (“lower critical solution temperature”) de polímeros termosensibles como el poli(N-isopropilacrilamida) PNIPAM o el poli(vinilmethileter) (PVME).

Efectivamente, para estos polímeros sintéticos que exhiben una transición de fase LCST, el efecto de las sales es explicado por la destrucción de las estructuras de agua al formarse estructuras de hidratación en los iones (*salting out*), cambiando de agua estructurada al grueso del agua (*bulk*), como ha sido expuesto recientemente por Van Durme y colaboradores utilizando técnicas de TMDSC y HR-US [163]. El diferente comportamiento entre polímeros que exhiben una LCST como el PNIPAM o el PVME y los ELPs que exhiben una ITT se debe a la mayor complejidad del proceso de la ITT [9,164], el cual involucra no sólo la destrucción de la estructuras de agua de hidratación hidrófoba y la asociación hidrófoba, sino también un incremento en el orden de

la cadena principal y su subsiguiente estabilización. Estos hechos hacen necesario un estudio termodinámico más exhaustivo.

Para comprobar como la adición de NaCl influye sobre las estructuras de agua o la interacción con la cadena principal, se han realizado algunos experimentos mediante TMDSC. Con esta técnica ha sido posible separar hasta cierto grado ambas contribuciones simultáneas que tienen lugar durante la ITT, como hemos visto en el capítulo (4.1.2) [162].

Los experimentos de TMDSC recogidos en dicho capítulo, muestran como la endoterma de la ITT se separa en dos componentes que representan dos procesos superpuestos, la *non-reversing* que es endotérmica y la *reversing* que es exotérmica. Las entalpías de estos procesos dependen de la frecuencia de oscilación del experimento de TMDSC.

La figura 4.13 muestra la descomposición en componentes *reversing* y *non-reversing*, a diferentes periodos, de una disolución del polímero (GVGVP)₂₅₁ en agua y ausencia de NaCl, mientras que en la figura 4.14 y en la figura 4.15 se muestran las componentes para una disolución del polímero en presencia salina a concentraciones 0.86 M y 1.71 M (50 y 100mg/mL) respectivamente. Como puede verse, sigue manteniéndose el mismo patrón que anteriormente. Existe una mayor entalpía exotérmica a periodos intermedios para la componente *reversing* coincidiendo con una menor entalpía endotérmica en la componente *non-reversing*, con la adición de NaCl, este patrón se mantiene aunque con valores mayores de entalpía.

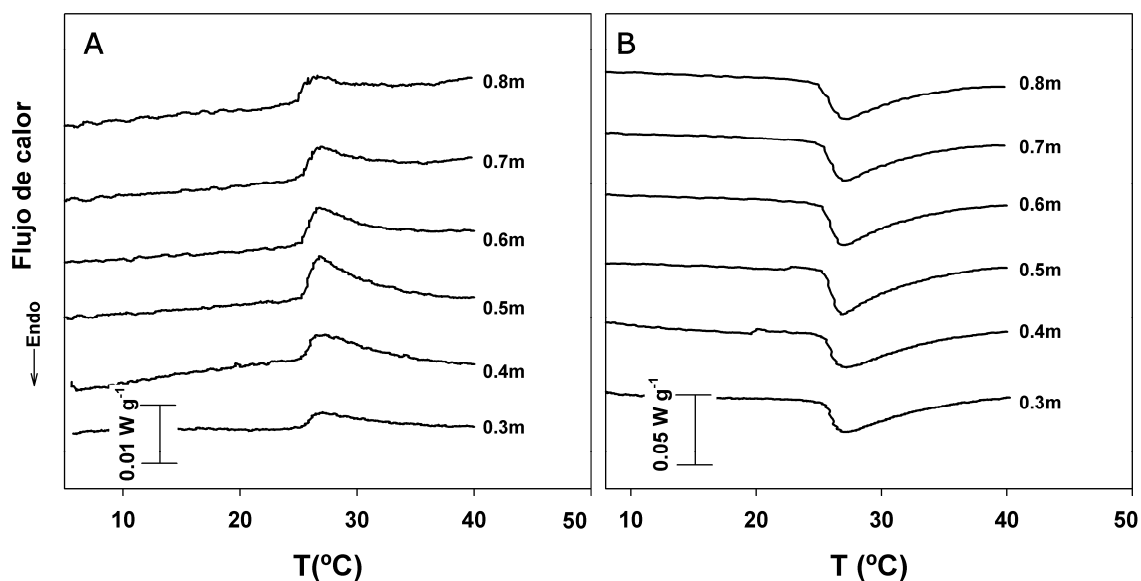


Figura 4.13: Componente **A)** *reversing* y **B)** *non-reversing*; del flujo de calor en experimentos de TMDSC para una muestra acuosa de 50mg/mL de (GVGVP)₂₅₁ y concentración de NaCl de 0 M, ($r = 10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, $A=0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ y P variando entre 0.3 y 0.8min)

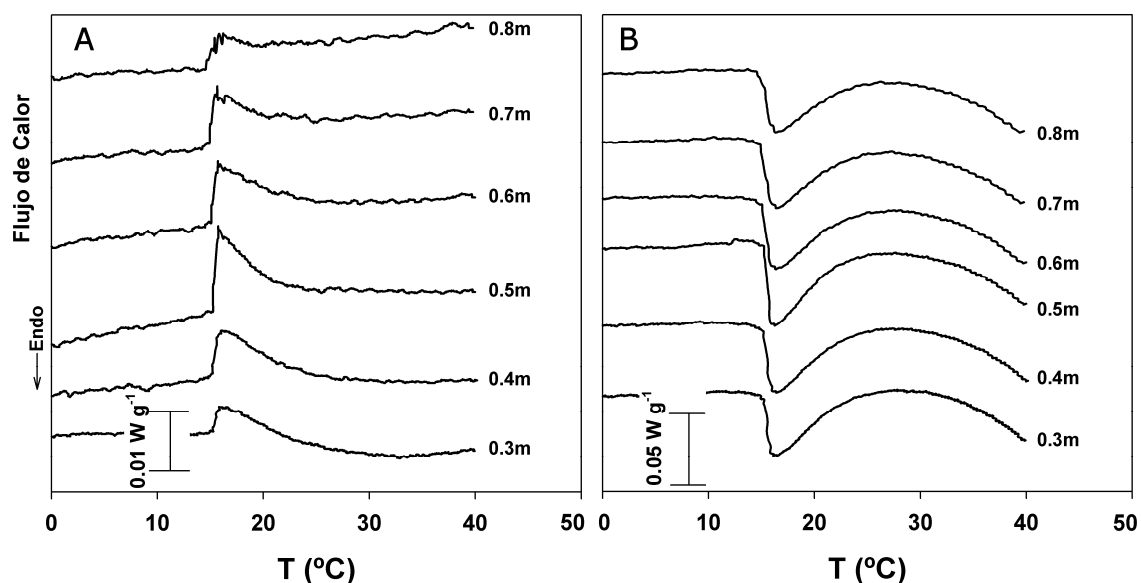


Figura 4.14: Componente **A)** *reversing* y **B)** *non-reversing*; del flujo de calor en experimentos de TMDSC para una muestra acuosa de 50mg/mL de (GVGVP)₂₅₁ y concentración de NaCl de 0.86 M, ($r = 10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, $A=0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ y P variando entre 0.3 y 0.8min)

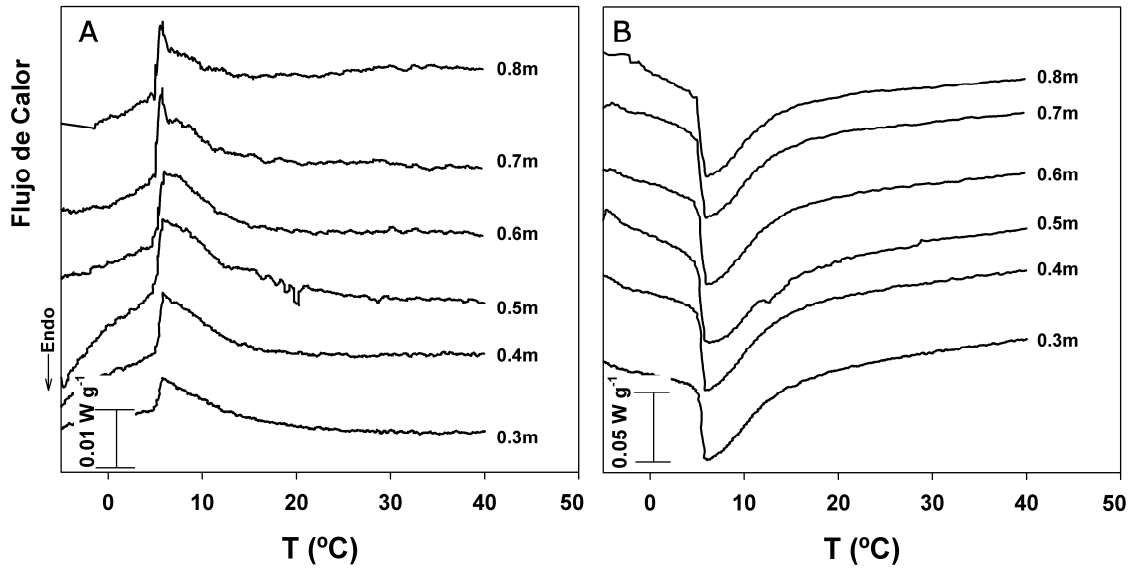


Figura 4.15: Componente **A)** *reversing* y **B)** *non-reversing*; del flujo de calor en experimentos de TMDSC para una muestra acuosa de 50mg/mL de (GVGVP)₂₅₁ y concentración de NaCl de 1.71 M, ($r = 10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, $A=0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ y P variando entre 0.3 y 0.8min)

En la figura 4.16 se puede ver la entalpía del pico exotérmico de la componente *reversing* ΔH_{rev} en función del periodo para frecuencias intermedias. Como puede observarse en la gráfica existe un máximo en esta componente (en valor absoluto) para frecuencias entorno a $P_M \approx 0.6\text{min}$ que se corresponde con el punto en el cual los fenómenos exotérmicos y endotérmicos están más separados. Por supuesto, esto también se corresponde con el máximo de la componente *non-reversing* $\Delta H_{\text{non-rev}}$ ya que $\Delta H_{\text{non-rev}} = \Delta H_{\text{tot}} - \Delta H_{\text{rev}}$. En la figura 4.16 los diferentes trazos representan la componente *reversing* a concentraciones de 0, 50 y 100 mg/mL de NaCl. Como puede observarse, hay un incremento en la entalpía de la parte *reversing* con la concentración de NaCl.

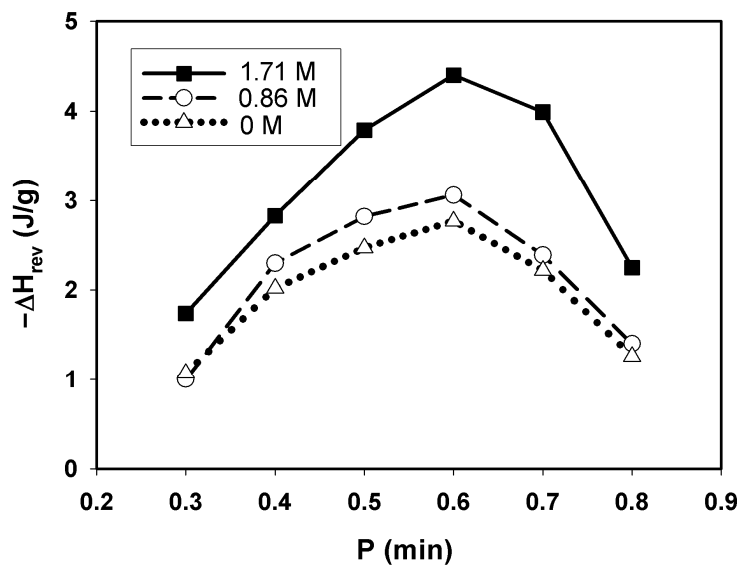


Figura 4.16: Entalpía de la parte *reversing* en función del periodo de oscilación para una muestra acuosa de 50mg/mL de (GVGVP)₂₅₁ y concentración de NaCl de 0, 0.86 y 1.71 M (0, 50 y 100mg/mL). (Velocidad de calentamiento= 1°C/min; Amplitud=0.1°C).

El aumento de ΔH_{rev} con la concentración de NaCl a P_M puede verse en la figura 4.17A, mientras que en la figura 4.17B se puede ver la variación de $\Delta H_{\text{non-rev}}$. Este aumento en entalpía mantiene la relación $|\Delta H_{\text{tot}}/\Delta H_{\text{rev}}|$ alrededor de 3.7 y $|\Delta H_{\text{non-rev}}/\Delta H_{\text{rev}}|$ alrededor de 4.8.

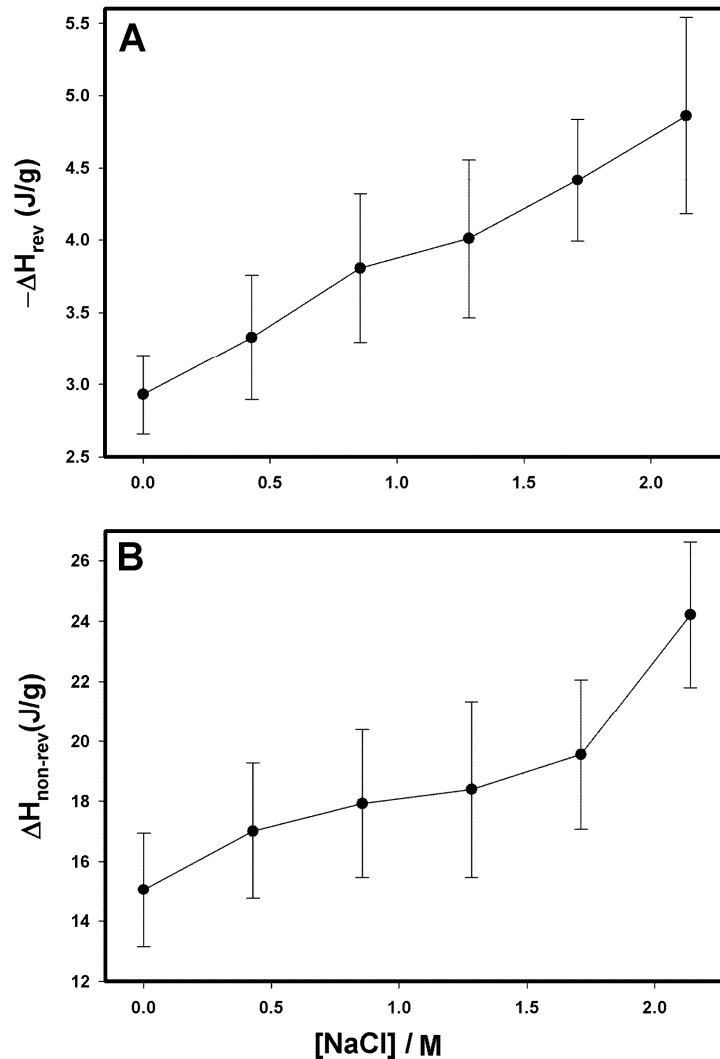


Figura 4.17: Valores de entalpía obtenidos mediante experimentos de TMDSC de una disolución acuosa de 50mg mL^{-1} de $(\text{GVGVP})_{251}$ en función de la concentración de NaCl ($r=1^\circ\text{C}/\text{min}$; $A=0.1^\circ\text{C}$; $P=0.6\text{min}$) **A)** Entalpía de la componente *reversing* **B)** Entalpía de la componente *non-reversing*.

Ambas componentes, tanto la endotérmica como la exotérmica aumentan con la concentración de NaCl. Puesto que la componente endotérmica está relacionada con la destrucción de las estructuras de agua de SNP durante la ITT, el NaCl no puede causar la destrucción de las estructuras de agua lo que conllevaría el efecto opuesto, disminuyendo la energía necesaria para la ruptura de dichas estructuras.

Como ha sido mencionado anteriormente [165], el efecto por el cual el NaCl afecta a la ITT no puede ser de tipo no electrostático inespecífico, ni la

unión directa de grupos específicos en la cadena polimérica porque las cadenas laterales de estos polímeros no están cargadas y son esencialmente apolares. De acuerdo a los presentes datos, y teniendo en cuenta el comportamiento explicado en la bibliografía, el efecto del incremento de NaCl es equivalente a un aumento en la hidrofobicidad de la cadena polimérica, lo cual, como ha sido mostrado anteriormente, causa una disminución en T_t y un aumento en ΔH , y un aumento simultáneo de ambas componentes ΔH_{nonrev} y ΔH_{rev} . Por lo tanto, el efecto del NaCl podría ser entendido como un efecto opuesto en la polaridad del disolvente. En este sentido, un aumento en $[\text{NaCl}]$ podría causar un aumento en la polaridad efectiva del disolvente, y esa mayor diferencia en polaridad con respecto a los restos hidrófobos del polímero causa una mayor cantidad de estructuras de agua ordenada rodeando las cadenas poliméricas o un mejor ordenamiento de estas. En definitiva, el NaCl parece actuar como un sistema de *offset* capaz de aumentar la polaridad efectiva del disolvente y, por tanto, aumentando la diferencia de polaridad entre el polímero y el medio. El comportamiento sería entonces equivalente al que, sin cambiar la polaridad del disolvente, disminuyera la polaridad del polímero.

Una forma adicional para obtener mayor información sobre el papel del agua que rodea las cadenas poliméricas es estudiar la ITT desde el exceso al defecto de agua. Este estudio puede ser usado para obtener información sobre la hidratación de estas moléculas como se ha descrito anteriormente y su evolución desde las fases iniciales donde la cantidad de agua es insuficiente para completar dichas estructuras [47]. En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio similar en presencia y en ausencia de NaCl (figura 4.18). Ya que ambas entalpías en las componentes de TMDSC aumentan de igual forma cuando la entalpía total aumenta, aquí solo son presentados los resultados obtenidos por DSC convencional. Como se puede ver en la figura 4.18A, existe un incremento de T_t para concentraciones altas y bajas, estando el mínimo de T_t entre 40 y 125 mg/mL. La entalpía del proceso ΔH sufre una disminución conjuntamente con el

aumento de T_t para bajas y altas concentraciones (figura 4.18B). El aumento de T_t a bajas y altas concentraciones se debe a factores diferentes. Para concentraciones altas, el incremento en T_t y disminución en ΔH es debido a la deficiencia de agua. En esta deficiencia de agua sólo se forman las estructuras de hidratación hidrófoba más estables, lo cual causa un lógico aumento de T_t mientras ΔH disminuye [47]. Por otro lado, el aumento en T_t con la disminución en la concentración de polímero ha sido probado por turbidimetría [62] y DSC [164,166]. Ese aumento en T_t se ajusta bien con el logaritmo de la concentración ($T_t = m \ln(C) + b$) como se menciona en el trabajo de Meyer [166]. Los datos presentados aquí también ajustan bien para bajas concentraciones, siendo $m = -0.97$ y -0.62°C para la disolución sin y con NaCl respectivamente, así que este parámetro depende de la concentración de NaCl. Adicionalmente al aumento de T_t , hay una disminución en ΔH con la disminución en la concentración de polímero. Este comportamiento puede ser explicado por una disminución en la cooperatividad intercadena que puede aparecer en disoluciones diluidas. Esta falta de eficiencia en la cooperatividad intercadena entorpecería el proceso de plegamiento causando los efectos térmicos observados.

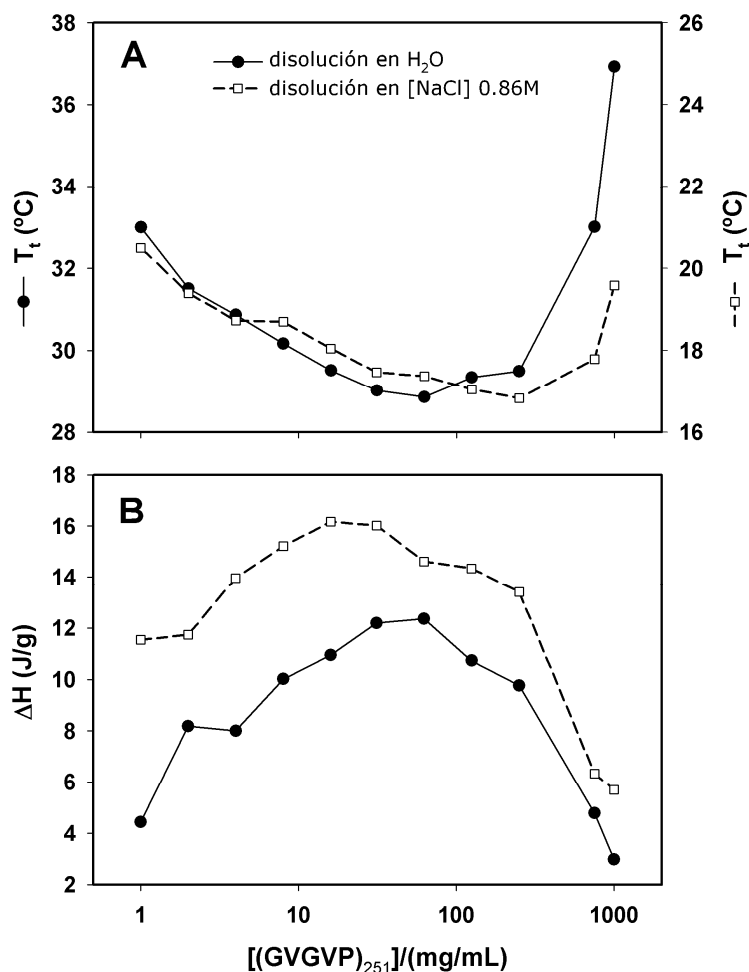


Figura 4.18: Experimentos de DSC convencional en una disolución acuosa de (GVGVP)₂₅₁ en función de la concentración de polímero, sin NaCl (—●—) y con 0.86M (50mg/mL) de NaCl (—□—). **A)** Temperatura de transición T_t ; **B)** Entalpía total de la endoterma (por gramo de polímero).

Como se puede observar en la figura 4.18, la disolución de polímero con NaCl muestra valores de T_t más bajos y valores de ΔH más altos que la disolución sin NaCl, para todas las concentraciones. Este hecho indicaría que no existe una competición real por el agua entre los restos apolares y los iones de sal. Si la entalpía se presenta por gramo de agua, y asumiendo que para altas concentraciones toda el agua disponible forma parte de la hidratación del polímero y no existe agua en volumen (en el *bulk*) es posible ver el efecto del NaCl en esas estructuras (figura 4.19). La entalpía de transición por gramo de agua no alcanza una línea horizontal. Este hecho claramente indica que existe varios tipos de estructuras de agua con diferente estabilidad y, acorde con esto,

diferentes entalpías de “fusión” [47]. También, como la entalpía por gramo de agua de la disolución con NaCl es más alta que la de disolución sin NaCl, existe un claro efecto de la presencia de NaCl que puede ser interpretada como un aumento en la calidad del ordenamiento de la hidratación hidrófoba o dicho de otra manera, que con NaCl las estructuras de agua que son predominantes entre las diferentes poblaciones de estructuras son las más ordenadas.

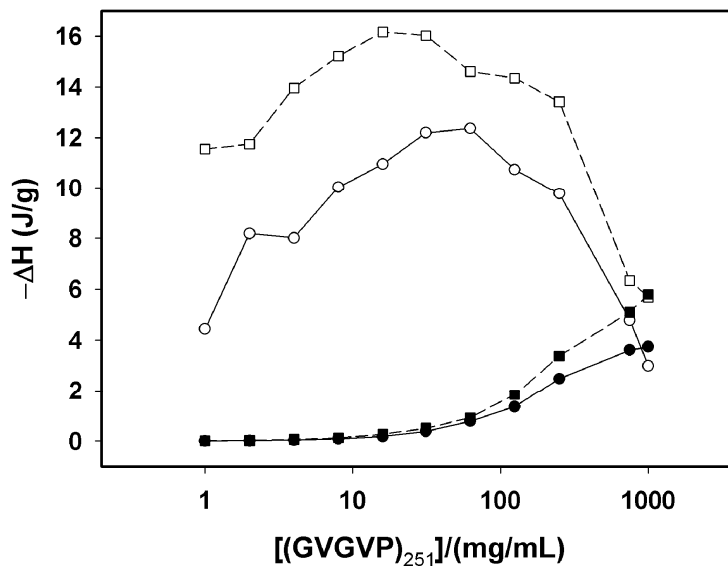


Figura 4.19: Entalpía de la ITT de una disolución acuosa de (GVGVP)₂₅₁. Con NaCl y por gramo de polímero (—□—); Sin NaCl y por gramo de polímero (—○—); Con NaCl y por gramo de agua (—■—); Sin NaCl y por gramo de agua (—●—).

Como vimos antes, el aumento de concentración de NaCl causa una disminución en la T_t y un aumento en la ΔH . Por otro lado, y gracias a la utilización del TMDSC, se ha podido observar que tanto la componente *reversing* como la *non-reversing* de la ITT aumentan con la concentración de NaCl en una proporción constante, lo cual apunta a la interpretación de que el efecto del NaCl es causado principalmente por una mejor organización del polímero en el estado plegado y por la mayor formación de estructuras de agua de hidratación hidrófoba y con mayor ordenamiento rodeando los restos apolares en el estado extendido de la cadena polimérica. Conjuntamente con todo esto se ve que los datos de DSC convencional en disoluciones con deficiencia de agua

muestran una mayor entalpía por gramo de agua con la presencia de NaCl, apuntando a un mayor ordenamiento del agua en el último caso.

4.1.4 Orden en la mesoescala en polímeros tipo elastina modelo, determinado mediante experimentos de SAXS de sincrotrón.

A parte del estudio termodinámico hecho en los capítulos anteriores sobre la complejidad de la transición, sería interesante también obtener más información sobre la estructura de estos polímeros mediante técnicas de rayos X en función de la temperatura. Como se ha visto en la introducción (capítulo 2.3) la estructura de la fase agregada en los polímeros ITT ha sido materia de cierta controversia. Algunos grupos sustentan la descripción de una estructura ordenada para los agregados en la que las cadenas poliméricas adoptan una estructura de espiral β , [9,44,164]. Estos modelos se apoyan en datos experimentales como el CD y la NMR [19,167,168]. Por otro lado, otros datos procedentes principalmente de simulaciones de dinámica molecular, respaldan el modelo de ovillo estadístico (*random coil*) para este estado agregado [36,37]. La resolución de esta controversia es de gran importancia para la comprensión del plegamiento en proteínas y polímeros, además de ser de gran importancia práctica desde el punto de vista de la utilización de ELPs como base de nanoestructuras avanzadas autoensambladas y en aplicaciones de índole tecnológica [81,143,169,170]. La existencia o no de tal orden a nivel molecular y sus posibilidades de desarrollar orden en la mesoescala es, por tanto, de una relevancia evidente.

En este capítulo se expone el uso de dispersión de rayos X a ángulos bajos (SAXS) procedentes de una fuente de sincrotrón sobre el ELP recombinante (GVGIP)₃₂₀. Este polímero es predominante hidrófobo y muestra una T_t de 14.8 °C y una $\Delta H=18$ J/g (figura 4.20). La evolución del orden en la mesoescala en función de la temperatura ha sido observada por sincrotrón SAXS para este polímero.

Como se ha observado previamente [162], la endoterma de DSC es la combinación de dos componentes opuestas; la deshidratación endotérmica y el plegamiento y estabilización exotérmicos.

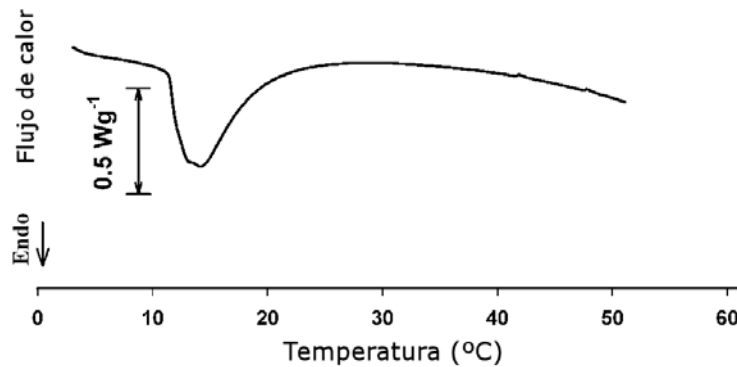


Figura 4.20: Termograma de DSC de una disolución acuosa 100mg/mL de (GVGIP)₃₂₀. Velocidad de calentamiento $r = 2.5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

Para determinar si la ITT de este ELP da lugar a la emergencia de estructura ordenada en la mesoescala, se han observados mediante técnicas de difracción WAXS y SAXS la evolución de una disolución acuosa de 100mg/mL durante un ciclo de calentamiento-enfriamiento a $2.5^\circ\text{C}/\text{min}$ entre 10°C y 45°C .

En los experimentos de difracción modo WAXS (Figura 4.21), no se observó la emergencia de ninguna señal o modificación del patrón de difracción a ninguna temperatura por debajo o encima de T_t . El hecho de que no aparezca ningún patrón de WAXS indica la ausencia de cristalinidad de este material mostrando que las estructuras secundarias que se forman tienden a ser estructuras dinámicas, en las cuales no se mantiene un orden a largas distancias, y por tanto no aparece reflejado en el patrón de difracción WAXS.

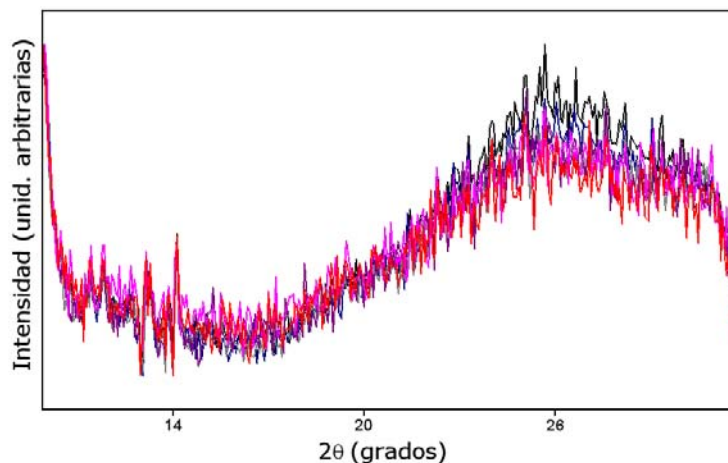


Figura 4.21: Patrón de WAXS obtenido para una disolución acuosa de 100mg/mL del polímero (GVGIP)₃₂₀ a diferentes temperaturas desde 10°C (línea roja) a 45°C (línea negra).

Por el contrario, en los patrones de SAXS si que se observaron eventos interesantes. En la figura 4.22 se muestra los patrones de SAXS en experimentos estáticos paso a paso (isotermos). En estos experimentos, se calentó una disolución de polímero hasta una temperatura dada y se mantuvo en ella hasta alcanzar un estado estacionario. Para una temperatura de 10°C, es decir, por debajo de la T_t , no se observan características significativas en el patrón de difracción, sin embargo cuando aumentamos la temperatura a 20°C, es decir, sobrepasamos la T_t , el patrón de difracción muestra un pico de difracción claro, con el máximo de intensidad para un vector de dispersión de $q \sim 0.11 \text{ nm}^{-1}$ que corresponde a una longitud característica de $\sim 55 \text{ nm}$. Un aumento posterior de la temperatura de 20°C a 25°C hace que el máximo de dispersión se desplace a 0.10 nm^{-1} correspondiendo a una distancia característica de $\sim 62 \text{ nm}$.

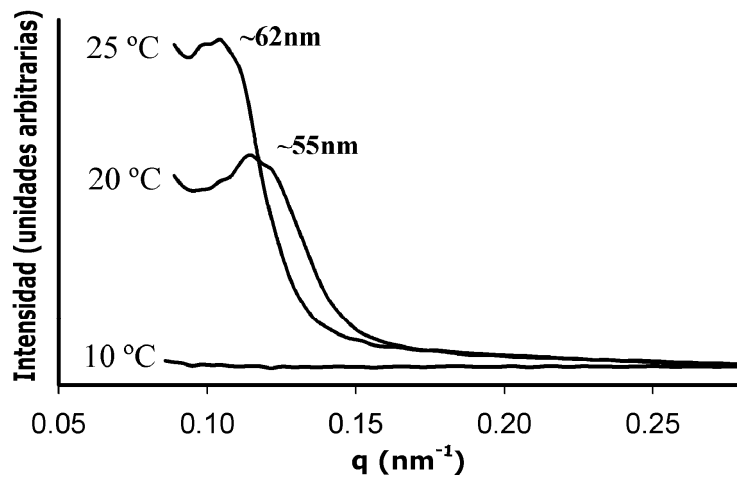


Figura 4.22: Patrón de SAXS obtenido para una disolución de 100mg/mL del polímero (GVGIP)₃₂₀ en experimentos estáticos isoterms.

Alternativamente a estos experimentos estáticos se realizaron experimentos dinámicos en la que la disolución de (GVGIP)₃₂₀ fue sometida a un calentamiento desde 15 a 45°C con una velocidad de calentamiento lineal de 2.5°C/min y un posterior enfriamiento a -2.5°C/min entre 45 y 15°C. La figura 4.23 muestra el perfil de SAXS para diferentes temperaturas de este barrido. Los primeros perfiles de difracción cercanos al pico de la transición T_t , no muestran características significativas en el patrón de difracción, sin embargo cuando la temperatura aumenta, aparece un pico claro en el patrón de difracción, con el máximo de intensidad en el intervalo de vector de dispersión (vector de *scattering*) $q = 0.10 - 0.17 \text{ nm}^{-1}$ dependiendo de la temperatura de medida. Estos vectores de dispersión equivalen a longitudes características de entre 38 y 64 nm, respectivamente. La comparación de estos experimentos con los experimentos estáticos anteriores (Figura 4.22) revela que existe un cierto grado de retraso térmico ya que la longitud característica para cada temperatura es mayor para los experimentos dinámicos que para los estáticos. A pesar de esto, tanto las medidas dinámicas como las estáticas prueban una relación directa entre las características del estado ordenado, por encima de T_t , y la temperatura.

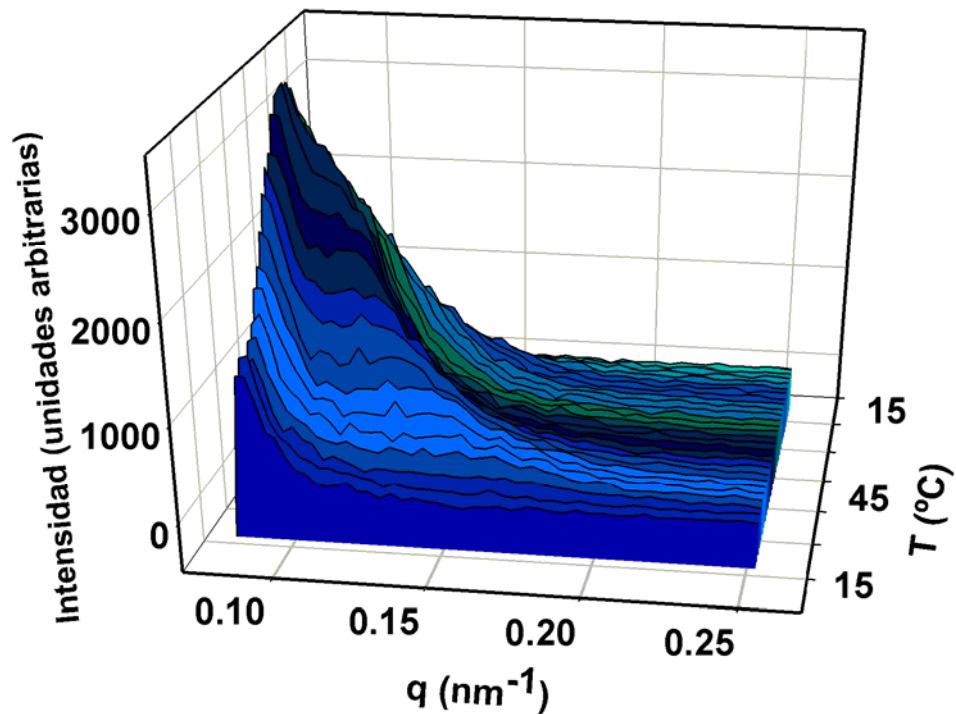


Figura 4.23: Patrón de SAXS obtenido para una disolución acuosa de 100mg/mL del polímero (GVGIP)320 durante un ciclo de calentamiento-enfriamiento de 15°C a 45°C y de 45° a 15°C.

En la difracción SAXS analizada se observan variaciones, tanto en intensidad como en posición, al cambiar la temperatura. Al aumentar la temperatura la intensidad aumenta y la posición se desplaza a valores menores del vector de dispersión. Como puede verse en la figura 4.24, la presencia de esta difracción revela la emergencia de un patrón estructural regular con una longitud característica en el intervalo de de 38-64 nm con una dependencia casi lineal con la temperatura. El incremento en la intensidad de la difracción parece indicar que la calidad de estructuras ordenadas aumenta con la temperatura, este hecho por tanto, viene acompañado con un incremento en la longitud característica que nos revelaba el desplazamiento de esta difracción (figura 4.24). El proceso es completamente reversible, existiendo una disminución de intensidad y un desplazamiento a valores mayores del vector de dispersión al disminuir la temperatura de nuevo, desapareciendo finalmente para temperaturas en torno a T_t .

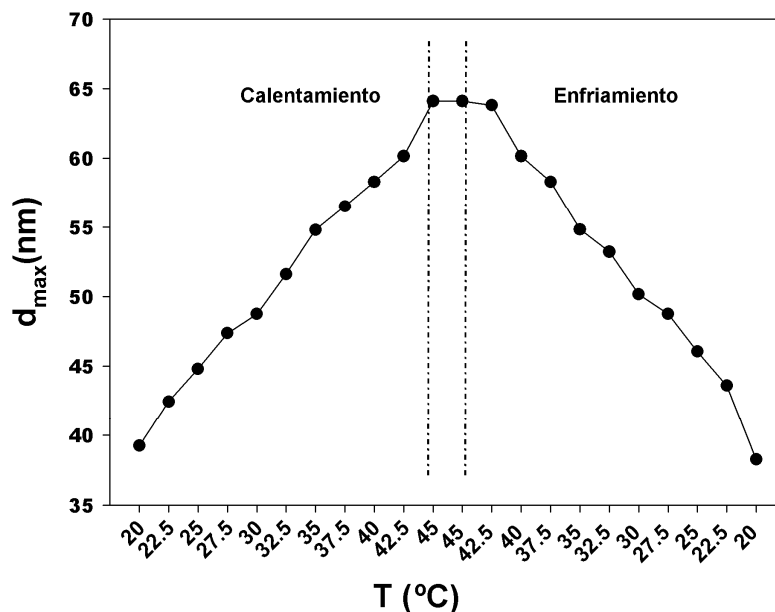


Figura 4.24: Posición del máximo de difracción que aparece en el patrón de SAXS obtenido para una disolución acuosa de 100mg/mL del polímero (GVGIP)320 durante un ciclo de calentamiento-enfriamiento de 15°C a 45°C y de 45° a 15°C.

Estos resultados parecen reforzar la teoría de la existencia de un estado ordenado para la fase segregada en ELPs. Evidentemente es difícilmente imaginable como el orden en la mesoescala observado en SAXS puede originarse a partir de la agregación de un polímero desordenado (random-coil). Sin embargo, la naturaleza del estado ordenado revelado por los datos de SAXS es intrigante. Las dimensiones de las espirales β (con aproximadamente tres pentámeros por vuelta) son unos 1.8nm en diámetro y con una separación entre vueltas de aproximadamente 1nm [62], mientras que el diámetro de los nanofilamentos que resultan de la asociación de varias cadenas es del orden de 5nm [62]. La escala de longitud encontrada mediante SAXS claramente apunta a un orden a mayor escala que las correspondientes a la formación de espirales β y la consecuente asociación en nanofilamentos. Por lo tanto, estos experimentos de SAXS apuntan a un panorama en la autoagregación de los ELPs más complejo que el descrito previamente. La formación inicial de espirales β y la subsecuente autoasociación en estructuras nanofibrilares parecen no ser las únicas características que tienen lugar durante la ITT. De los datos de SAXS, es

evidente que el proceso de ordenamiento continúa, de una forma jerárquica, a más altos niveles. Este resultado es de enorme importancia a la vista de las enormes expectativas que los ELPs recombinantes han despertado en la nano(bio)tecnología de autoensamblado.

4.2 Polímeros tipo elastina sensibles a la temperatura y al pH.

4.2.1 Influencia del peso molecular en polímeros tipo elastina sensibles al pH.

Dentro de los polímeros tipo elastina que presentan una naturaleza sensible a diferentes estímulos, se encuentran los polímeros sensibles a cambios en el pH. Estos polímeros hacen uso del mecanismo ΔT_t en el que se produce una modificación de la T_t debido a un cambio de polaridad de alguno de los aminoácidos al cambiar el pH. El polímero tipo elastina sensible al pH utilizado en este trabajo es el $[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]_n$. Este polímero está compuesto por el monómero modelo tipo elastina, el VPGVG, en el que se ha sustituido la valina (V) que se encuentra entre las dos glicinas por un ácido glutámico (E) en uno de cada cinco pentapéptidos. Se eligió el aminoácido E de todos los que cambian con el pH ya que es el que presenta un mayor cambio de polaridad al cambiar el pH en torno al pKa [9], y por lo tanto un número pequeño de estos aminoácidos consiguen un gran cambio en la temperatura de transición. El cambio de polaridad del E es producido por su grupo γ -carboxilo, el cual pasa de un estado protonado (carboxilo $-\text{COOH}$) a un desprotonado (carboxilato $-\text{COO}^-$) cuando se produce un aumento de pH entorno al pKa de este grupo.

El hecho de poder realizar una síntesis por metodología de DNA recombinante ha permitido obtener un polímero con un número de monómeros exacto, es decir monodisperso y con peso molecular bien definido, y en el que se encuentran un número de ácidos glutámicos equiespaciados exactamente uno cada 25 aminoácidos. El hecho de que sean monodispersos nos ha permitido

estudiar la influencia del peso molecular (MW) en las características de la ITT de este tipo de polímeros sensibles al pH. Para ello se han sintetizado 5 polímeros diferentes basados en el monómero anteriormente descrito y con el número de monómeros n variando entre 5 y 45. De esta forma, la única diferencia molecular entre ellos es estrictamente su peso molecular; i.e., la longitud de su cadena.

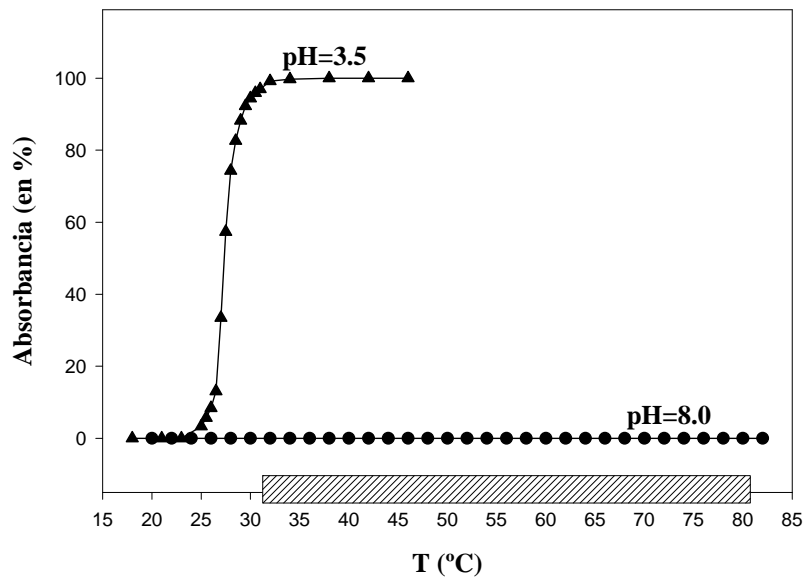


Figura 4.25: Perfil de turbidez del polímero [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]₄₅ para una disolución de 5mg/mL en tampón fosfato 20mM. El cuadro rallado en la parte de abajo representa la ventana de temperaturas de trabajo.

Mediante simples experimentos de turbidimetría es sencillo observar el cambio en la temperatura de transición, como se muestra en la figura 4.25 en la que a pH neutro o básico la temperatura de transición está fuera del intervalo de medida y produciendo un desplazamiento de la T_t de más de 50 °C. Por otro lado, los ensayos de DSC nos permiten obtener información sobre la T_t y ΔH de la transición. En la figura 4.26 se muestran los termogramas de los 5 polímeros en tampón fosfato 0.1M a pH 2.5. Este pH es suficientemente bajo para producir una protonación completa de todos los residuos γ -carboxilo del polímero. Los termogramas muestran la típica endoterma asociada con la ITT. Cualitativamente se pueden apreciar ciertas diferencias entre los cinco polímeros. Con el aumento

del peso molecular la endoterma se desplaza a valores más pequeños de temperatura, es decir disminuye la T_t , y se hace más grande (mayor área) con lo que aumenta la ΔH .

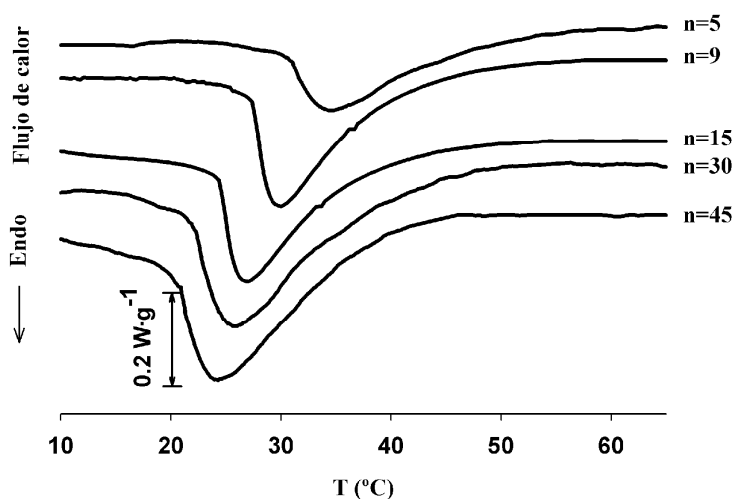


Figura 4.26: Termogramas de DSC de una disolución acuosa, 50mg/mL en tampón fosfato (0.1M, pH 2.5), de los polímeros estudiados. El grado de polimerización n es el indicado a la derecha de la gráfica. Velocidad de calentamiento de 10°C/min.

El posible retraso térmico inherente a la técnica del DSC no causa ningún cambio en el valor de ΔH , sin embargo si que puede causar un pequeño aumento en los resultados de T_t . Para corregirlo, en este caso, se ha estimado el llamado T_t verdadero (T_{tv}) para los 5 polímeros estudiados. Según la bibliografía, esta temperatura debe ser entendida como el punto físico verdadero a la que ocurre la transición. Los valores de valores T_{tv} se pueden obtener mediante extrapolación de las secciones lineales del gráfico de T_t en función de la raíz cuadrada de la velocidad de calentamiento [171] a velocidades de calentamiento nulas. Los resultados de este análisis se pueden ver en figura 4.27, asimismo, el resultado final en el que se muestra la dependencia de T_{tv} con el peso molecular puede verse en la figura 4.28. Como se había comentado anteriormente de forma cualitativa, la dependencia de T_{tv} con el peso molecular del polímero no es un artefacto, siendo esta variación de la temperatura de transición de unos 10 °C entre los polímeros de peso molecular menor ($n=5$) y mayor ($n=45$) ensayados en

este trabajo. Además, como se muestra en la figura 4.28, esta dependencia no es lineal, existiendo una mayor variación de T_{tv} para los pesos moleculares menores.

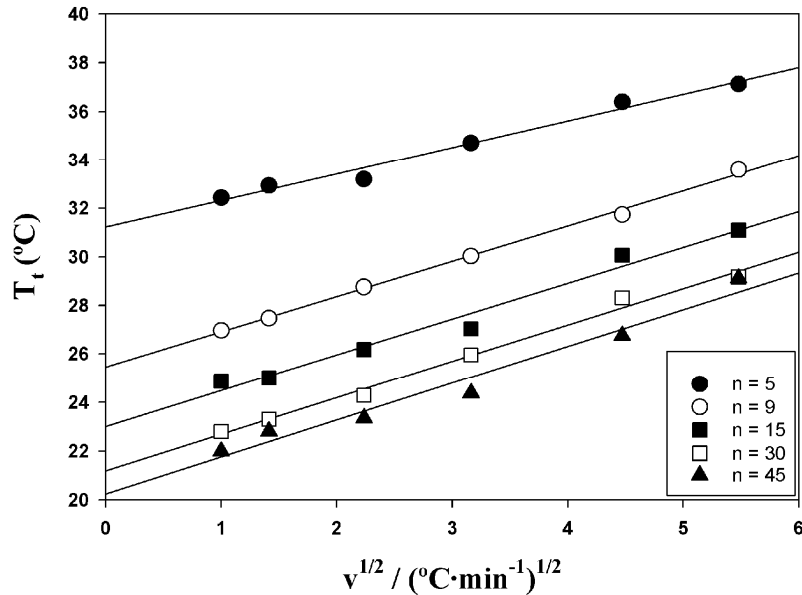


Figura 4.27: Dependencia de T_t con la raíz cuadrada de la velocidad de calentamiento para los polímeros estudiados. El grado de polimerización n está indicado en la leyenda. Las líneas representan las regresiones lineales de los datos para cada n .

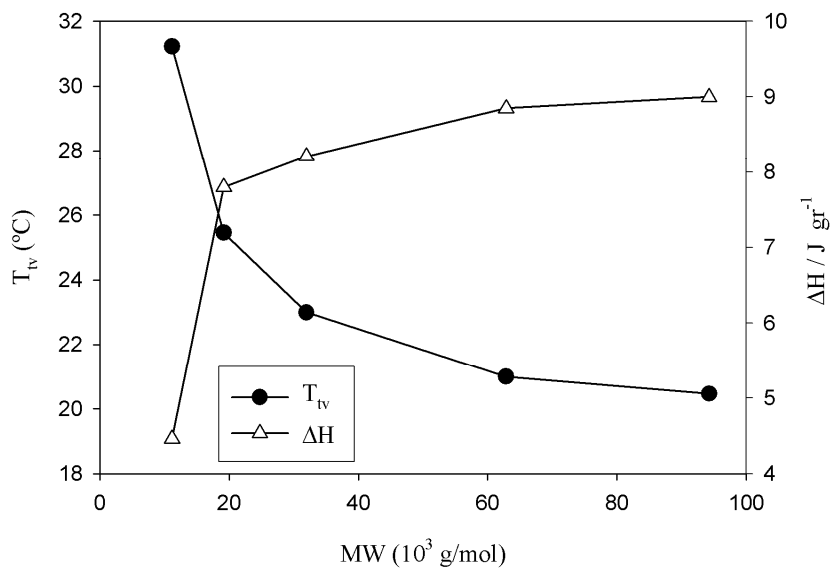


Figura 4.28: Dependencia de T_{tv} y ΔH con el peso molecular (MW) para el polímero modelo estudiado.

En la figura 4.28 también se muestra la dependencia de ΔH con el peso molecular a pH 2.5. Al igual que con la T_{tv} , existe una clara dependencia de este parámetro con MW. ΔH claramente aumenta de una forma no lineal con el aumento de MW encontrándose las mayores variaciones de nuevo para los pesos moleculares menores.

Dada la naturaleza sensible al pH de estos polímeros, resulta interesante ver el pH como nuevo parámetro que afecta a la ITT (T_t y ΔH). Con este objetivo, se ha llevado a cabo un análisis completo de DSC teniendo en cuenta no sólo el peso molecular sino el pH. Los experimentos se realizaron con disoluciones en medios de los polímeros en tampón fosfato con pHs variando entre 2.0 y 5.5-6. Los resultados de la T_t en función del pH han sido representados en la figura 4.29. Los cinco polímeros muestran una tendencia similar: hasta un cierto pH, los valores de T_t permanecen prácticamente constantes y a partir de ese pH particular la T_t aumenta rápidamente. De igual forma para ΔH , se observó un comportamiento similar, con valores constantes hasta un cierto pH y luego una rápida disminución. La figura 4.30 muestra ΔH en función del pH para los pesos moleculares extremos $n=5$ y $n=45$ (los otros pesos moleculares poseen valores entre estos dos y no han sido representados para obtener una mayor claridad).

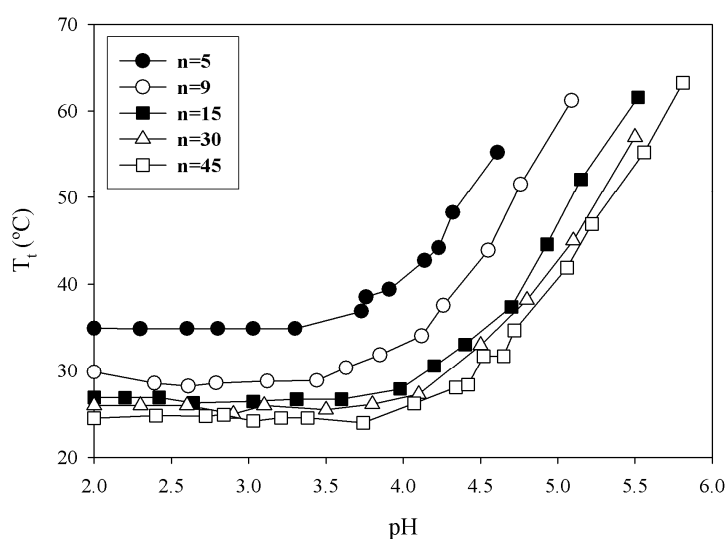


Figura 4.29: Curvas de dependencia de T_t con el pH para cada polímero (como se indica en el gráfico). Valores obtenidos por DSC para disoluciones de 50 mg/mL con velocidades de calentamiento de 10°C/min.

Este comportamiento es el esperado conforme a la bibliografía [9] y puede ser fácilmente explicado. Como resultado de un aumento en el pH, el grupo γ -carboxilo del ácido glutámico comienza a desprotonarse. Esta desprotonación conlleva un aumento en la polaridad media del polímero lo que causa un desplazamiento de T_t a temperaturas más altas y una disminución de ΔH , puesto que esta última cantidad depende primariamente de la cantidad de agua de hidratación hidrófoba rodeando el polímero, y este modo de hidratación no es posible en la vecindad de los carboxilatos cargados [9].

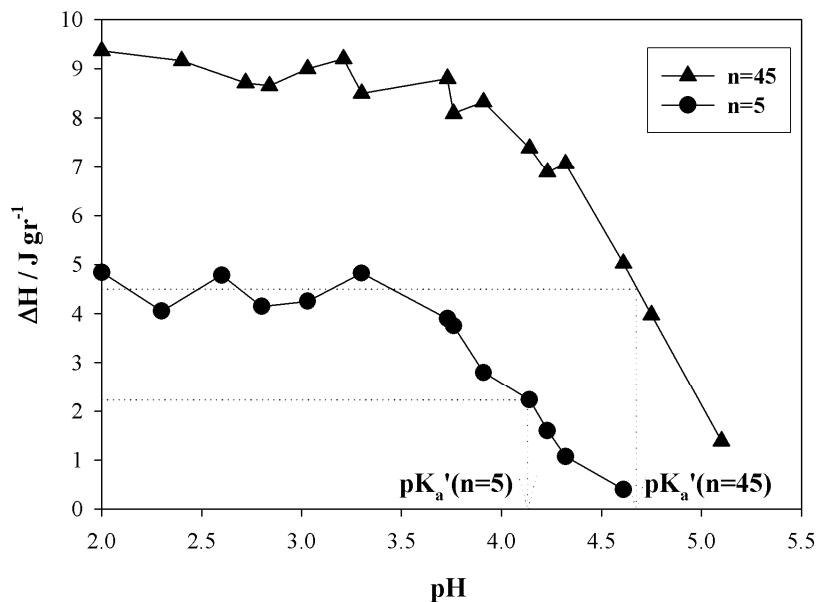


Figura 4.30: Dependencia de ΔH con el pH para los polímeros con el grado de polimerización $n=5$ y $n=45$ (como se indica el gráfico). Las líneas punteadas indican el procedimiento para estimar los valores de pK_a' para el grupo γ -carboxilo del ácido glutámico.

El punto de pH en el cual comienza a aumentar la T_t y disminuir ΔH está relacionado con el punto donde comienzan la desprotonación del γ -carboxilo. Como puede verse en figura 4.29 y figura 4.30, este pH es diferente para los diferentes polímeros. Insólitamente, este hecho implicaría que la constante de equilibrio de protonación-desprotonación del grupo γ -carboxilo dependería del peso molecular. Para observar esta variación, calculamos el pK_a' de estos polímeros y lo representamos en función del peso molecular. El pK_a' ha

sido estimado como el pH que produce un 50% en la caída de ΔH (figura 4.30), que de acuerdo con la interpretación de ΔH , puede ser considerada como el 50% del estado desprotonado de los carboxilos libres, es decir el pKa. La dependencia de pKa' con el MW se puede ver en la figura 4.31. Puede observarse un aumento del pKa' con el MW desde 4.13 (para n=5) hasta 4.68 (para n=45) y de nuevo la mayor variación de pKa' se da para los MWs más pequeños.

Este no es el primer caso donde se observa una variación en los valores de pKa de los carboxilos libres como consecuencia de cambios en las características intrínsecas de los polímeros tipo elastina que presentan carboxilos libres en su composición. Como se ha descrito en la bibliografía [172], el efecto del aumento en la hidrofobicidad media para un polímero con la secuencias poli[0.8(PGVGV),0.2(PGEGV)], poli[0.8(PGVGI), 0.2(PGEGI)] y poli[0.75(PGFGV), 0.25(PGEGV)] causa una variación positiva del pKa de 1.7 unidades. En un trabajo posterior del mismo autor, mediante un diseño nanométrico apropiado de la composición de polímero, se ha conseguido cambios en el pKa del ácido aspártico de hasta 6.2 unidades [173]. De igual forma se han observado cambios de pKa de hasta 4.7 unidades en residuos enterrados en microentornos hidrófobos de ciertas proteínas naturales [174]. Todos estos cambios comparten el patrón común de haber sido obtenidos como resultado de un aumento de la hidratación hidrófoba en la vecindad de las especies cargadas.

De nuevo puede apreciarse una similitud entre aumento de peso molecular y aumento de hidrofobicidad media del polímero. De esta forma existe un paralelismo entre los cambios de pKa' encontrados en este trabajo como consecuencia de cambios en el peso molecular y los cambios de pKa debidos a una variación de la polaridad media del polímero de forma similar a lo encontrado previamente para $[T_t]_{pH=2.5}$ y $[\Delta H]_{pH=2.5}$.

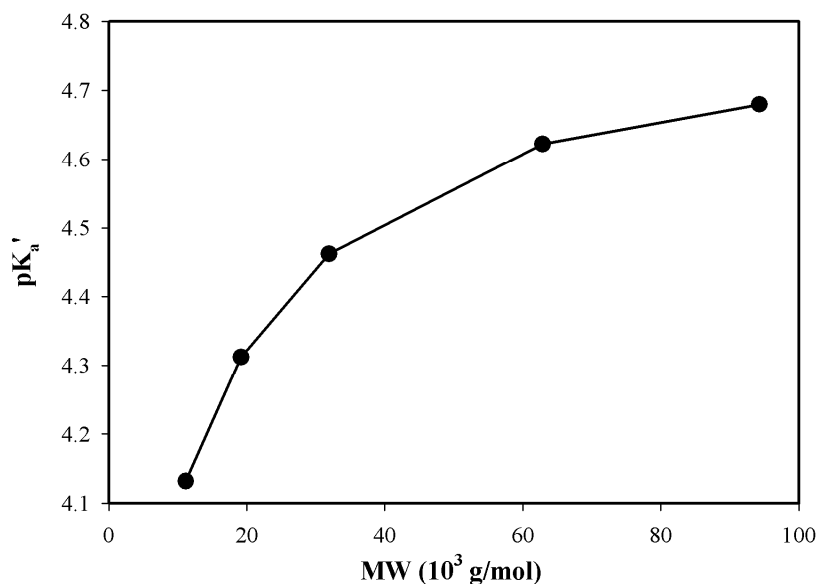


Figura 4.31: Dependencia de pKa' del grupo γ -carboxilo del ácido glutámico con el peso molecular.

En resumen, del estudio de este conjunto de polímeros tipo elastina sensibles al pH uno puede concluir que el peso molecular tiene una influencia evidente en el comportamiento de los parámetros de la ITT. La disminución en MW causa un aumento en la T_t , una disminución en ΔH , y desplazamiento de pKa' a valores menores. Todos estos efectos han sido descritos anteriormente para otros polímeros tipo elastina cuando estos efectos tenían como causa una reducción de la hidrofobicidad media del polímero mediante una sustitución de ciertos aminoácidos en la cadena polimérica. Por consiguiente, existe un cierto paralelismo entre la longitud del polímero y hidrofobicidad de polímero. Esta equivalencia puede ser parcialmente explicada por la influencia de los grupos terminales de cadena, siendo lógicamente esta influencia mayor para pesos moleculares menores. Sin embargo, el efecto exclusivo de la polaridad de los grupos finales de cadena no parece suficiente para dar cuenta de la fuerte influencia descrita en este trabajo y este fenómeno podría ser debido también a un fenómeno de cooperatividad inter- e intracadena en el autoensambado hidrófobo que tiene lugar durante la ITT [175]. En este sentido, es razonable

pensar que cadenas cortas no muestran una cooperación eficiente de modo que el autoensamblado está dificultado, de igual modo que la presencia de restos polares en largas cadenas impiden el plegamiento hidrófobo característico y autoensamblado durante la ITT.

4.2.2 Autoensamblado: Formación de nanoporos del ELP recombinante [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]₁₅

Una posibilidad interesante en el polímero [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]₁₅ es que esta distribución regular de la anfifilicidad a lo largo de la cadena del polímero podría conducir a la formación de estructuras topográficas autoensambladas en la escala nanométrica. Para comprobar esta posibilidad, se ha depositado una disolución acuosa de [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]₁₅ sobre una superficie hidrófoba, como se indica en la sección experimental, a temperatura ambiente, es decir, por debajo de T_i . Esto ha sido así para evitar la formación espontánea espirales β que conllevarían la asociación en estructuras fibrilares [87,141] y la subsecuente formación de partículas de agregados en la superficie, algo que se ha evitado en este trabajo.

Cuando el polímero es depositado, mediante un método de *spin-coating* sobre la superficie hidrófoba partiendo de una disolución básica de este, la formación de una distribución homogénea aperiódica de nanoporos es una característica topológica notable. La figura 4.32 muestra una imagen de AFM en tres dimensiones de la estructura con nanoporos. Los nanoporos son en media de 70nm de ancho, 8nm de profundos (lo cual es probablemente subestimado debido al radio de curvatura finito del tip de AFM) y están separados unos 150nm. La figura 4.33 muestra el resultado de la deposición mediante *spin-coating* de una disolución ácida del mismo polímero. Bajo este medio ácido el polímero muestra una superficie más o menos plana sin ninguna característica topológica reseñable.

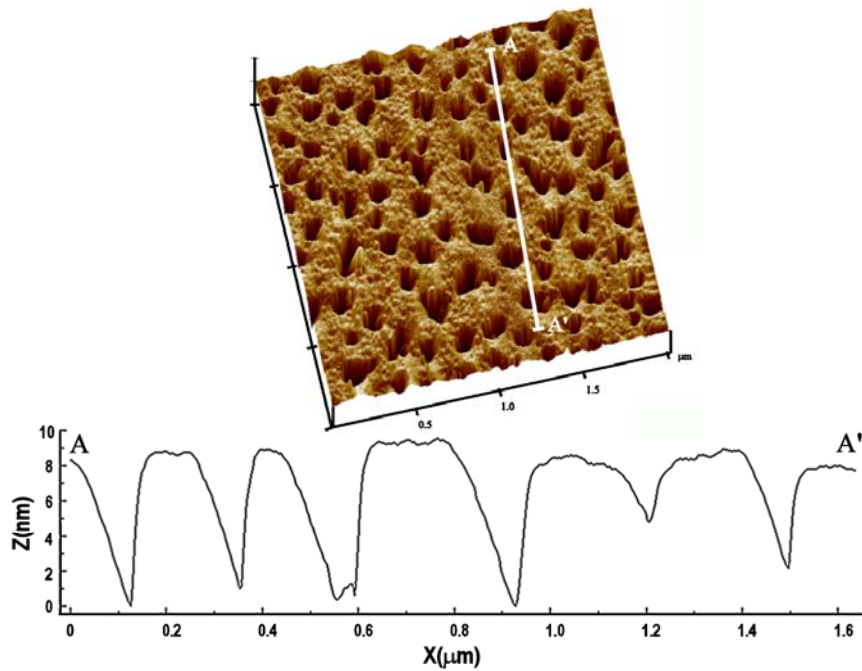


Figura 4.32: Arriba: TMAFM imagen 3D de $[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]_{15}$ depositado, partiendo de una disolución básica del mismo. Abajo: sección transversal del polímero depositado.

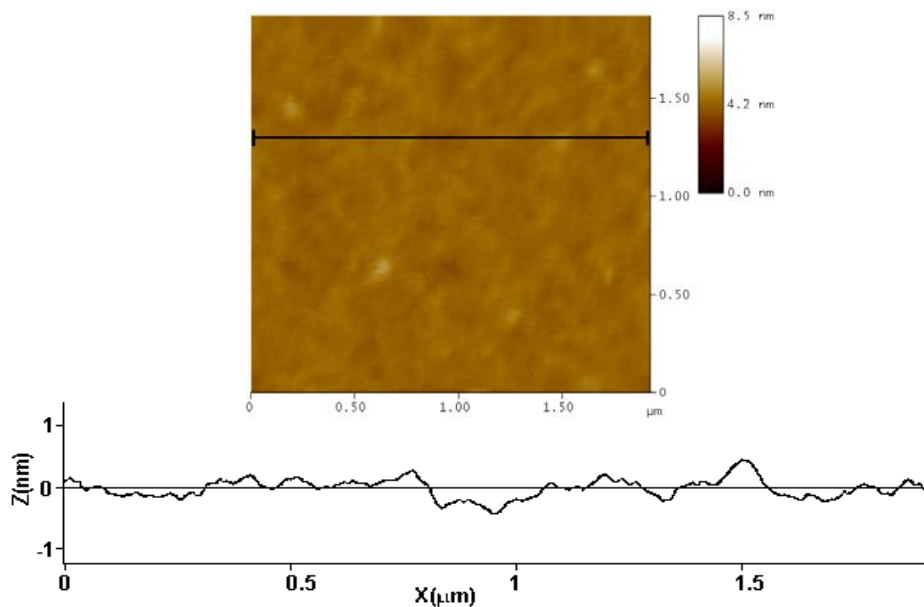


Figura 4.33: Arriba: TMAFM imagen 2D de $[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]_{15}$ depositado, partiendo de una disolución ácida del mismo. Abajo: sección transversal del polímero depositado.

Desde el punto de vista molecular, el diferente comportamiento encontrado bajo las condiciones básicas o ácidas puede ser explicado por el diferente estado

de polaridad exhibido por los grupos γ -carboxilo de E (figura 4.34). Cuando está disuelto en medio básico, el carboxilato cargado negativamente, debido a la naturaleza apolar del resto de aminoácidos llega a ser el punto de más alta polaridad a lo largo de la cadena, contrastando con el entorno hidrófobo de sus vecindades. Esto lleva a una estructura heterogénea del polímero con una cadena predominantemente apolar mostrando dominios altamente polares repetidos regularmente a lo largo de ésta.

Estos dominios, debido a su carga, impiden en su vecindad tanto los contactos hidrófobos entre cadenas como la interacción hidrófoba con el sustrato. Estos dominios y su agua de hidratación son finalmente segregados del entorno predominantemente hidrófobo dando lugar a la formación de poros de dimensiones nanométricas. Sin embargo, en la disolución ácida, los grupos γ -carboxilo libres están protonados y muestran una menor polaridad, llevando a una mayor homogeneidad en la polaridad de polímero a lo largo de su cadena. En este estado protonado, el *spin-coating* de la disolución sobre el sustrato hidrófobo lleva a una deposición plana y homogénea sin ninguna característica topológica reseñable.

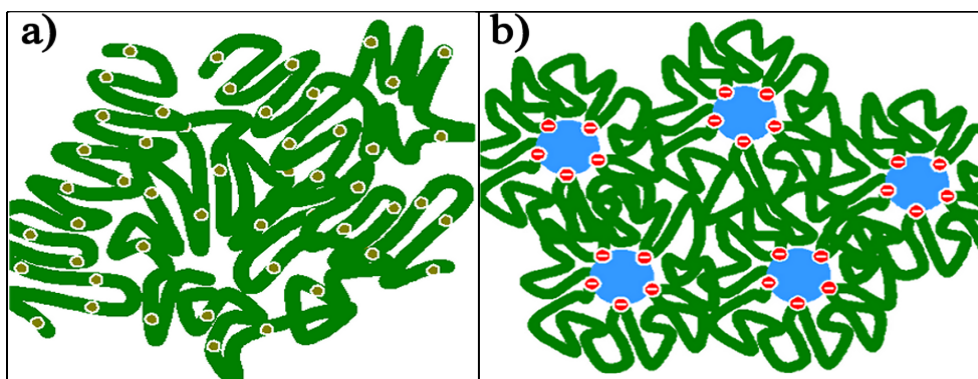


Figura 4.34: Gráfico esquemático de la distribución del polímero sobre un sustrato hidrófobo: a) en medio ácido; b) en medio básico. Contraíones no han sido dibujados para mayor claridad.

Para demostrar que este efecto es debido a estos grupos γ -carboxilo el polímero de control (VPGVG)₄₈, fue depositado bajo las mismas condiciones a las usadas para el polímero que contiene ácido glutámico. Como puede

observarse en la figura 4.35 la deposición no muestra las características topográficas obtenidas polímero con ácido glutámico en medio básico (nanoporos), y sólo una cierta rugosidad es observada en la superficie. Estos resultados de nuevo apuntan al papel de los grupos γ -carboxilo libres de E en el desarrollo de las estructuras de nanoporos observadas.

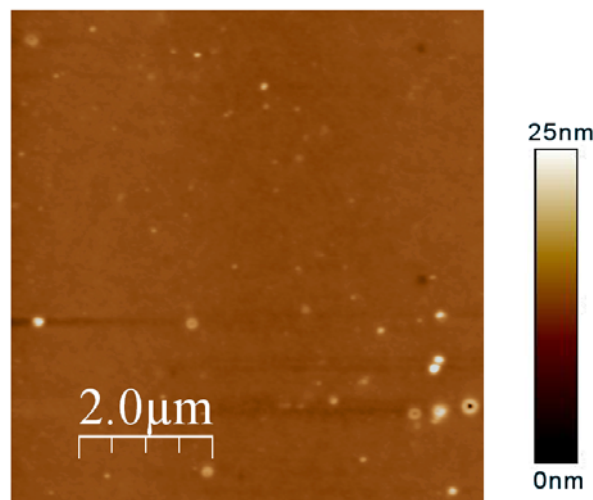


Figura 4.35: Imagen de TMAFM del $(VPGVG)_{48}$ depositado sobre una superficie hidrófoba de silicio.

Para el caso del polímero $[(VPGVG)_2-(VPGEG)-(VPGVG)_2]_{15}$ depositado sobre otros substratos como es el caso de substratos hidrófilos de mica, los experimentos no han sido concluyentes, ya que no se produce repetitividad, existiendo gran variedad incluso en diferentes zonas de la misma muestra, y apareciendo diferentes topografías que probablemente dependerán de las condiciones de preparación secado (*dewetting*) o incluso del tiempo desde la preparación de la muestra hasta la medida. En la figura 4.36 se muestra como ejemplo, uno de los casos de deposición que se ha visto en algunas deposiciones. En este caso aparecen estructuras con agujeros en dos escalas distintas, unos a unos 10-20 nm y otros mayores, entorno a los 100nm que posiblemente se hayan formado por colapso de varios de los pequeños. El grosor es más pequeño que en el caso de la superficie hidrófoba de silicio, estando éste en torno a los 2-3nm.

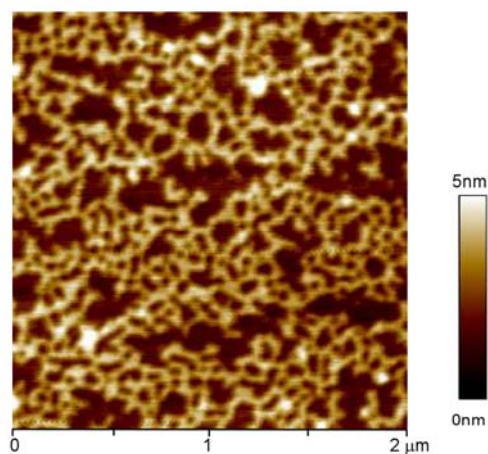


Figura 4.36: Imagen de TMAFM de una disolución básica de $[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]_{15}$ depositado sobre una superficie hidrófila de mica.

En conclusión, este ELP obtenido genéticamente induce la formación de películas de nanoporos cuando es depositado en una superficie hidrófoba. Este proceso es controlado por el pH del medio que le rodea en el sentido que los poros son formados sólo cuando la deposición está hecha partiendo de un medio básico. Además debido a la naturaleza polipeptídica del polímero y a la manera en la cual éste se ha producido, la inclusión de diferentes (bio)funcionalidades a lo largo de la cadena del polímero es fácilmente factible.

4.3 Copolímeros en bloque. Influencia de la arquitectura molecular en las características de la ITT.

Desde el principio del desarrollo de los polímeros tipo elastina hasta el momento actual, las dos principales características termodinámicas de la ITT; i.e., la T_t y el calor latente asociado, ΔH , y sus diferencias entre los diferentes ELPs producidos hasta la fecha, se han considerado siempre como consecuencia exclusiva de la mera polaridad media de la cadena polimérica [9,49]. Desde luego, hay importantes evidencias que apoyan este hecho, pero en este caso, estas evidencias experimentales están basadas en homopolímeros con arquitecturas moleculares simples. Sin embargo, este mismo concepto se está aplicando hoy en

día a ELPs cuyas arquitecturas moleculares son mucho más complejas que las de esos simples ELPs. En muchos casos, estos polímeros están diseñados para aplicaciones en las que la predicción exacta del valor de la T_t es obligatoria. Este es el caso de los polímeros tipo elastina diseñados por el grupo de Chilkoti para aplicaciones en dosificación localizada de fármacos mediante hipertermia local [176]. Para esta aplicación, la T_t debe mantenerse en un intervalo muy estrecho de temperaturas por encima de la temperatura corporal. Este mismo grupo ha desarrollado incluso expresiones matemáticas que permiten predecir la T_t final del material obtenido a partir de promediar las diferentes polaridades de los distintos aminoácidos que forman parte de la composición del polímero [177]. Otra aplicación que se describe en la bibliografía, y que depende de una predeterminación precisa del valor final de la T_t , es el uso de quimeras de un ELP con otra proteína recombinante de interés. En estos casos, el ELP es usado para simplificar la tarea de purificación de esa proteína recombinante, que es en realidad la proteína de interés.

La hipótesis de este trabajo es que la polaridad media del polímero no es el único factor que condiciona el valor de la T_t , y por ende de la ΔH , sino que existe una importante contribución de la propia arquitectura molecular del polímero en el valor de esos dos parámetros clave.

El uso de tecnología de DNA recombinante en la producción de ELPs permite obtener ELPs complejos con un control absoluto de su composición y arquitectura. Este hecho será utilizado en este trabajo para construir una serie de ELPs que, con diferentes arquitecturas, presenten una polaridad controlada y bien determinada de forma que podamos aislar y cuantificar el posible efecto de la arquitectura molecular.

La arquitectura elegida es de tipo copolímero en bloque. Diferentes copolímeros en bloque han sido diseñados y sintetizados cumpliendo con lo anteriormente dicho, es decir, con bloques de polímeros conocidos en los que se conoce el efecto de la polaridad en la temperatura de transición. Los

homopolímeros en los que están basados estos copolímeros son dos de los polímeros estudiados en los capítulos anteriores: uno de estos homopolímeros es el $[(VPGVG)_2-(VPGEG)-(VPGVG)_2]_n$ que como se ha mostrado anteriormente presenta dos estados de polaridad dependiendo del pH y por tanto una naturaleza inteligente ante cambios de éste; y el otro es el homopolímero $[VPAVG]_m$. Entre los copolímeros sintetizados (ver capítulo 3.1.7) se encuentran tres dibloques con un tamaño fijo del bloque conteniendo el ácido L-glutámico (bloque *E*), y tres diferentes tamaños del bloque conteniendo L-alanina (bloque *A*) que denotamos por E50A20, E50A40 y E50A60; tres tribloques en los cuales los bloques de los extremos son bloques *E* de tamaño fijo y el bloque del medio es un bloque *A* con tres tamaños diferentes (E50A20E50, E50A40E50 y E50A60E50), un dibloque igual en peso molecular y en proporciones de los bloques al tribloque de tamaño intermedio (E100A40), un tetrabloque de igual en peso molecular y relación entre bloques a este último dibloque y al tribloque (E50A20E50A20); y otro dibloque con una unión de diez glicinas entre los dos bloques principales (E50-G_L-A40). La relación de tamaños de los bloques en número de pentapéptidos puede verse esquemáticamente en la figura 4.37. Junto a estos, se han utilizado como controles, los dos homopolímeros correspondientes a las composiciones de los dos diferentes bloques usados.

En general, los bloques que forman parte de las distintas estructuras copolímicas usadas podrán encontrarse en el estado disuelto-extendido si están por debajo de la temperatura de transición o en el estado colapsado-agregado por encima de T_t . Además esas temperaturas se verán modificadas por el pH para el bloque *E* o debido a la histéresis para el bloque *A*. En aquellas condiciones en las que ambos bloques se encuentren en estados distintos, es decir que su parámetro de interacción con el disolvente sea muy distinto ($\chi_{\text{agregado}} \gg \chi_{\text{disuelto}}$) habrá una segregación de uno respecto del otro dando lugar a estructuras interesantes en diferentes sistemas (disolución, depositados, anclados a una superficie, etc.). Estas estructuras serán el foco de interés de futuros trabajos. El hecho de que

esos bloques formen parte de la misma molécula puede hacer que exista una gran influencia de uno sobre otro, que quedará reflejada tanto en las temperaturas como en las entalpías de transición cuando se comparan sus valores con los de los correspondientes homopolímeros control.



Figura 4.37: Esquema de longitudes de los bloques en los diferentes copolímeros. Los números indican el número de pentapéptidos de cada bloque y el bloque verde (G_L “glycine linker”) corresponde a una molécula de unión de 10 glicinas.

La figura 4.38.A muestra un experimento de DSC en un ciclo de calentamiento-enfriamiento de [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]₁₅ y poli(VPAVG), 50% en peso. Interesantemente, y a pesar del hecho de que la transición es un proceso cooperativo, las dos transiciones aparecen independientemente. En calentamiento, el experimento de DSC muestra dos endotermas: la primera corresponde a la transición del polímero que contiene L-glutámico y la segunda a la transición del polímero que contiene L-alanina. La temperatura de pico de la primera transición es de 30°C, que es un poco más alta que la del homopolímero sólo (28.8 °C). Tal pequeña diferencia puede ser debida simplemente al solapamiento con la curva de la transición del otro polímero, que es sensiblemente mayor, y la consecuente deformación de la forma de la endoterma. La temperatura de pico de la segunda transición es de 33°C, que se corresponde bien con la temperatura de pico de la transición del polímero que

contiene L-alanina. La entalpía de las dos transiciones es de $20.4 \text{ J/g}_{\text{total}}$ que corresponde aproximadamente a la suma de los 9 J/g (capítulo 4.2.1) de la transición del polímero que contiene glutámico más los 34 J/g (capítulo 4.1.1) de la transición del polímero que contiene L-alanina (al ser una disolución 50% en peso: $9 \cdot 0.5 + 34 \cdot 0.5 = 21.5 \text{ J/g}_{\text{total}}$). En enfriamiento, aparecen transiciones mucho más anchas como se ha visto en capítulos anteriores: la primera corresponde a la transición del polímero con ácido L-glutámico a 26.4°C , esta temperatura está un poco desplazada con respecto a la de calentamiento debido al retraso térmico inherente a la propia técnica de DSC [171] y con una entalpía de $4.8 \text{ J/g}_{\text{total}}$ que se corresponde aproximadamente con los 9 J/g del polímero que contiene ácido L-glutámico (hay que tener en cuenta el gran error experimental de la medida de entalpía). Seguidamente aparece la transición del polímero que contiene L-alanina a -1°C mostrando una gran histéresis y un pico exotérmico mucho más ancho y grande que el que aparece en calentamiento con una entalpía de $35.1 \text{ J/g}_{\text{total}}$, lo que supone una entalpía de 70.2 J por gramo de polímero conteniendo L-alanina. Cuando el experimento de DSC es realizado en condiciones de pH neutras o básicas (Figura 4.38.B) solamente aparece el pico correspondiente a la transición del polímero que contiene L-alanina no siendo afectado por el cambio en pH.

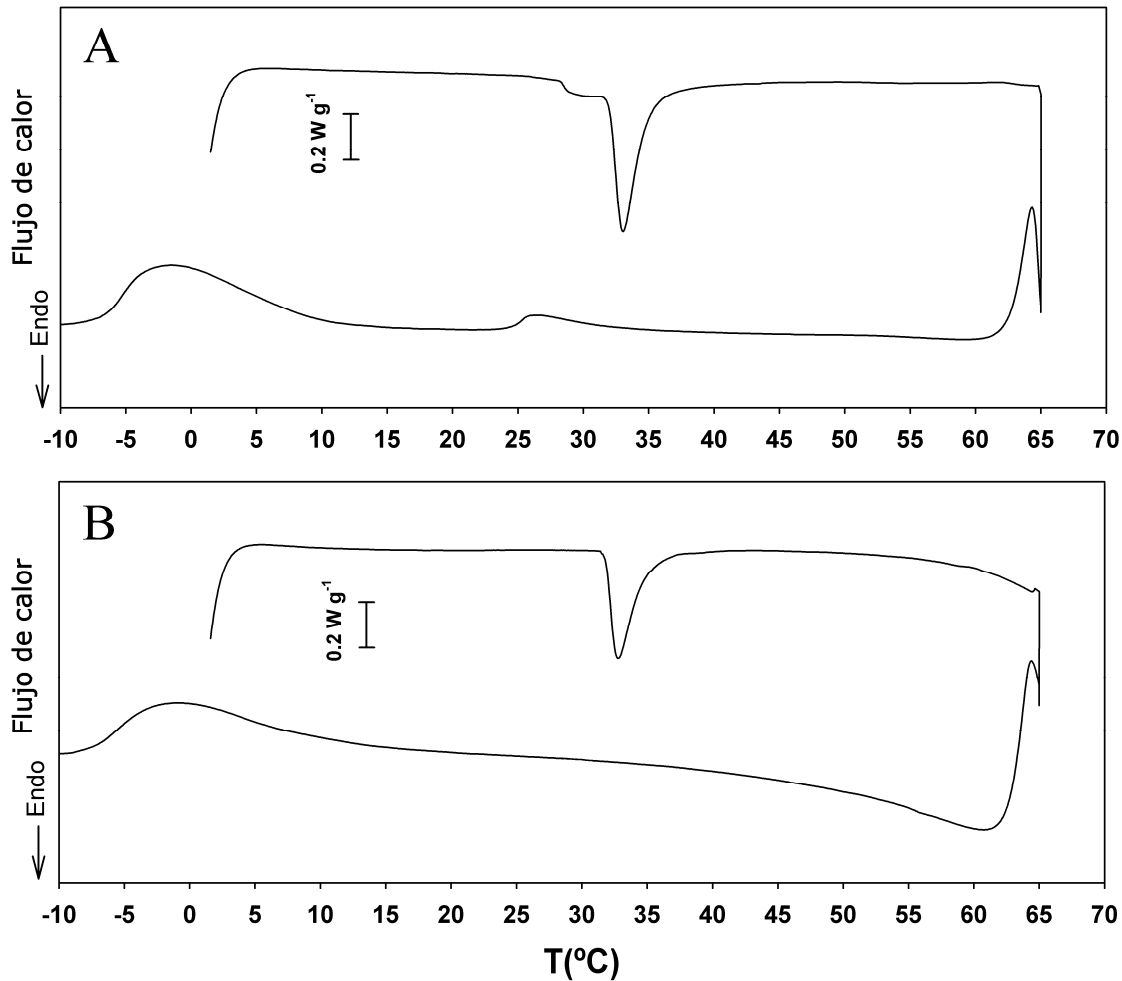


Figura 4.38: Termogramas de DSC en un barrido cíclico de calentamiento enfriamiento ($5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) de una disolución acuosa ($50\text{mg}/\text{mL}$) de una mezcla de $[(\text{VPGVG})_2(\text{VPGEG})(\text{VPGVG})_2]_{15}$ y poli(VPAVG) (50% w/w). **A)** $\text{pH}=2.5$, **B)** $\text{pH} 7$.

Por lo tanto estos homopolímeros se comportan de manera independiente cuando se encuentran mezclados en una disolución, sin embargo, cuando los bloques están restringidos a permanecer juntos en una única molécula lineal existe una influencia mutua de los bloques. Esta influencia mutua, es por tanto, una influencia exclusivamente intramolecular.

4.3.1 Desacoplamiento entre bloques mediante una unión con glicinas.

Cuando estos polímeros se unen para formar un copolímero en bloque, es posible esperar una influencia mutua entre los distintos bloques. Una hipótesis

interesante es la de suponer que esta influencia está causada por la transferencia del estado ordenado del bloque que primero empieza a plegarse. Para determinar si este hecho es cierto, se ha diseñado una estructura dibloque, E50-G_L-A60, en la cual los dos bloques están conectados mediante un puente de 10 glicinas (G_L:“glycine linker”). Dicho copolímero es similar a otro de los dibloques sintetizado, el E50A60, pero con la inclusión entre los dos bloques de una cadena de 10 glicinas. Debido a la gran facilidad que presentan las glicinas para facilitar la rotación de los enlaces del esqueleto molecular, este tipo de puentes no presentan tendencia a exhibir ningún tipo preferencial de estructura conformacional y por tanto, en este copolímero, actuarán como desacopladores de posibles influencias mutuas, en términos de organización mutuamente inducida, que puedan estar propagándose a lo largo del esqueleto molecular mediante mecanismos cinéticos de cooperatividad intracadena.

En la figura 4.39 se muestran las diferentes temperaturas de transición y entalpías para los dos polímeros estudiados a diferentes estados de pH. Como puede observarse en la figura 4.39A las T_t de los dos polímeros son prácticamente iguales siendo ligeramente superiores para el polímero que contiene la unión de glicinas (0.1°C a pH=2.5 y 0.2°C a pH=7). De igual forma las entalpías son muy parecidas aunque con valores menores para el polímero que contiene la unión de glicinas (Figura 4.39B) aunque aquí tenemos que tener en cuenta que la unión que hemos añadido a la molécula no contribuye a la entalpía y que el error experimental es mayor.

En el caso de que se produjese un desacoplamiento, a pH neutro o básico en el que tenemos sólo la transición del bloque *A*, éste se debe dar a temperaturas más parecidas a la del homopolímero que contiene alanina cuanto menos efecto tenga el bloque que contiene glutámico, es decir, cuanto más desacoplado, menor debe de ser la temperatura de transición, y lo mismo para la entalpía, cuanto más desacoplados, mayor debe de ser la entalpía. En nuestro caso, el efecto de añadirle la unión de glicinas produce el efecto opuesto, salvando el error

experimental, aumenta ligeramente la T_t y disminuye ΔH . De esta forma vemos que no se produce una disminución en el efecto mutuo entre los dos bloques y que esta unión de glicinas, siendo algo menos polar que los aminoácidos del bloque de alanina, podría aumentar ligeramente la transición de éste.

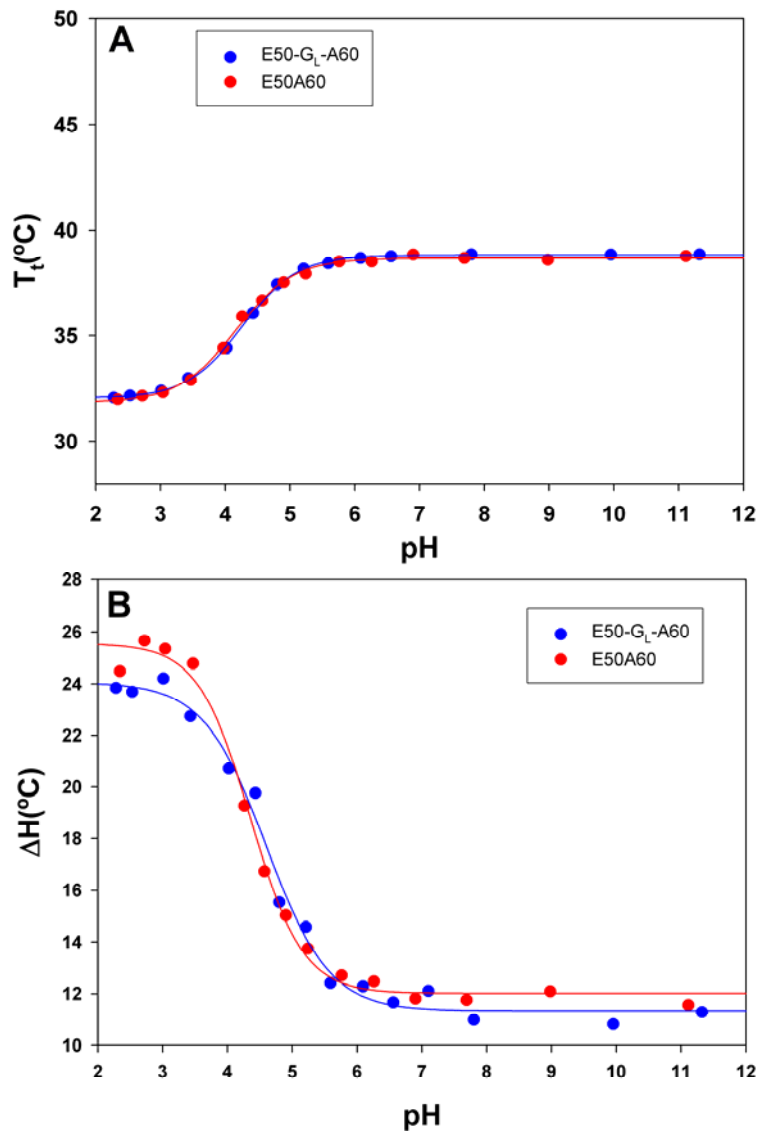


Figura 4.39: Variación de la temperatura de transición (A) y de la entalpía (B) para los copolímeros en bloque *E50A60* y *E50-GL-A60*. (Experimentos hechos en calentamiento a 5°C/min)

Se puede entonces argumentar, que la separación entre los dos bloques obtenido por la incorporación de esta unión de diez glicinas no produce un claro desacoplamiento entre los bloques. Luego su influencia mutua no está causada

por un mero contagio cinético de propagación estructural desde un bloque al vecino.

4.3.2 Escenario General de la influencia de la estructura molecular en los parámetros de la ITT

Un caso general de estos copolímeros puede verse en la figura 4.40 y figura 4.41 en calentamiento y enfriamiento respectivamente para el copolímero en bloque (tribloque) *E50A40E50*. En calentamiento se observa que en medio ácido el termograma muestra dos transiciones, la primera correspondiente a la agregación del bloque *E* y la segunda es la correspondiente al bloque *A*. Cuando se aumenta el pH la endoterma del bloque *E* se desplaza a mayores temperaturas conjuntamente con una disminución de la entalpía hasta que desaparece completamente. Para condiciones neutras o básicas existe sólo la transición del bloque *A* que aparece claramente desplazado a temperaturas mayores. En enfriamiento (Figura 4.41) sólo una endoterma es observada, y ésta aparece a temperaturas más bajas que en calentamiento mostrando una clara histéresis en el ciclo calentamiento-enfriamiento. Este único pico en enfriamiento podría ser debido a un solapamiento de los dos picos anchos y la gran diferencia de tamaños entre la entalpía de la transición del bloque *A* en comparación con la del bloque *E*. Conjuntamente con esto se puede observar un desplazamiento hacia temperaturas mayores con el aumento en el pH.

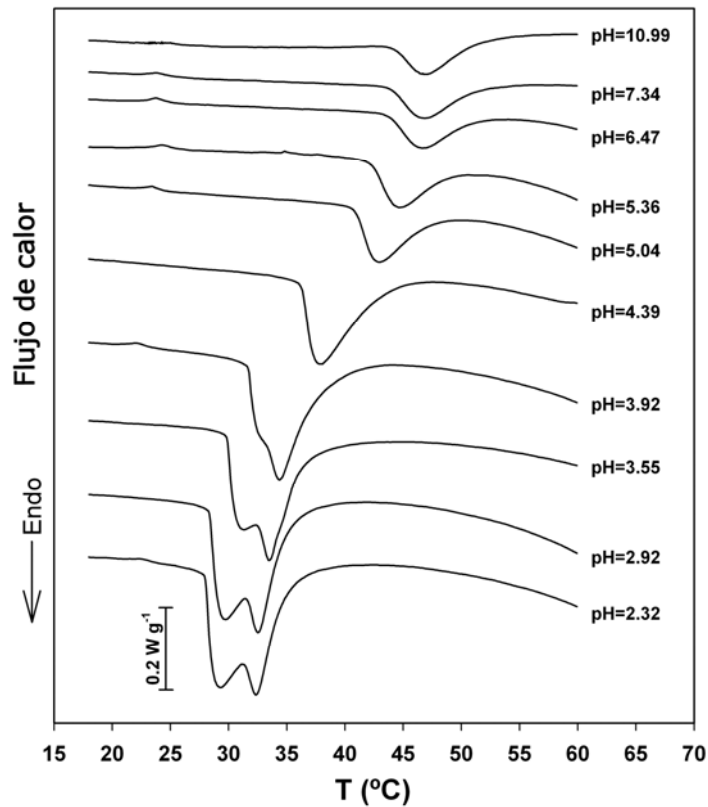


Figura 4.40: Termograma de DSC, en un barrido en calentamiento (5°C/min) a diferentes pHs para el polímero *E50A40E50* en disolución acuosa (50mg/mL).

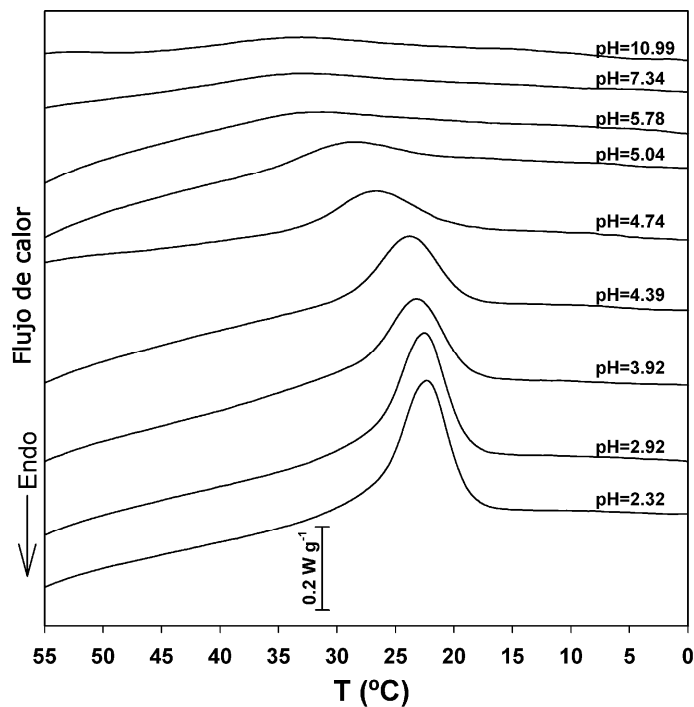


Figura 4.41: Termograma de DSC, en un barrido en enfriamiento (-5°C/min) a diferentes pHs para el polímero *E50A40E50* en disolución acuosa (50mg/mL).

No en todos los copolímeros ocurre exactamente lo mismo. En la figura 4.42 se muestran los termogramas para todos los polímeros ensayados para disoluciones en medio ácido (rojo) y en medio neutro/básico (negro). Como puede observarse los termogramas presentan distintas formas y las transiciones ocurren a diferentes temperaturas siendo estos cambios especialmente notables en medios neutros/básicos. De la comparativa de estos termogramas se pueden obtener diferentes observaciones como se va a relatar en los apartados que se exponen a continuación.

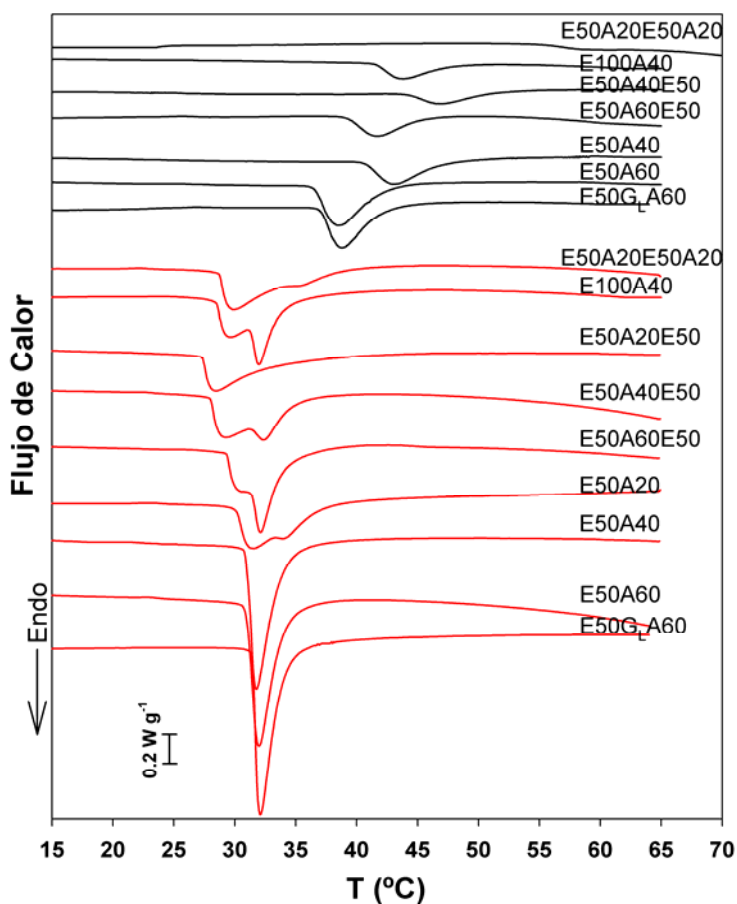


Figura 4.42: Termogramas de DSC en calentamiento (5°C/min) de los diferentes dibloques y tribloques a pH=2.5 (rojo) y pH=7 (negro).

4.3.3 Comparativa entre los diferentes dibloques

Para realizar una comparativa con los dibloques podemos fijarnos en los termogramas correspondientes a los dibloques *E50A20*, *E50A40* y *E50A60* que corresponden a diferentes copolímeros con un tamaño fijo del bloque *E* y un tamaño incremental para el bloque *A*. En medio ácido (termogramas en rojo), en el polímero más pequeño de todos (*E50A20*) se puede observar las dos transiciones del bloque *E* y el bloque *A*, sin embargo para los otros dos polímeros sólo una endoterma es visible dándose está a una temperatura de transición intermedia entre la de los homopolímeros separados aunque mucho más cercana a la de la transición del homopolímero que contiene L-alanina y siendo mayor cuanto mayor es el bloque *A* (Tabla 4.3). El efecto de que sólo un pico sea visible puede ser debido a que la entalpía mucho mayor del bloque *A* influye enormemente sobre el otro bloque y hace que se produzca una única transición. En estos polímeros se puede observar también que las temperaturas de transición del dibloque *E50A20* se producen a temperaturas mucho mayores de lo esperado. Este efecto puede ser achacado al hecho del pequeño peso molecular de este polímero. Como hemos visto anteriormente existe un efecto en el aumento en la temperatura de transición al disminuir el tamaño, especialmente para los polímeros pequeños (Figura 4.28) efecto que se hace despreciable cuando el polímero es suficientemente grande por lo que para los otros polímeros no es tan significativo.

Tabla 4.3: Temperaturas de transición para los copolímeros en bloque ensayados.

Polímero	pH=2.5				pH=7			ΔT_H (°C)
	$T_{th E}$ (°C)	$T_{th A}$ (°C)	T_{tC} (°C)	Histéresis $T_{th A} - T_{tC}$	T_{th} (°C)	T_{tC} (°C)	Histéresis $T_{th} - T_{tC}$	
<i>E50A20</i>	31.6	34.2	24.4	9.8	*62.6	--	--	*28.4
<i>E50A40</i>	--	31.7	17.9	13.8	43.2	28.6	14.2	11.5
<i>E50A60</i>	--	31.9	15.7	16.2	38.6	22.0	16.6	6.7
<i>E50-G_L-A60</i>	--	32.0	16.0	16.1	38.8	22.3	16.5	6.8
<i>E100A40</i>	29.7	32.0	18.7	12.3	43.8	27.4	16.4	11.8
<i>E50A20E50</i>	28.5	--	25.7	£2.8	*75.3	--	--	£,*46.8
<i>E50A40E50</i>	29.3	32.2	22.6	9.6	47.1	33.3	13.8	14.9
<i>E50A60E50</i>	30.7	32.0	20.9	11.1	41.7	27.4	14.3	9.7
<i>E50A20E50A20</i>	29.8	34.9	26.9	8.0	60.1	--	--	25.2

* Datos obtenidos por extrapolación tras el ajuste a una función sigmoïdal.

£ Este valor es de $T_{th|E} - T_{tC}$ ya que no aparece transición en la posición del polímero de alanina.

T_{th} Temperatura de transición en calentamiento (|_E del bloque *E*, |_A del bloque *A*)

T_{tC} Temperatura de transición en enfriamiento.

ΔT_H Aumento de la temperatura de transición en calentamiento (del bloque de alanina) al aumentar el pH por encima del pKa.

Cuando en estos tres dibloques se aumenta el pH, la transición del bloque *E* se desplaza hacia temperaturas mayores y desaparece en cuanto el pH supera el valor del pKa para el grupo γ -carboxilo del ácido L-glutámico presente en ese bloque, por tanto la transición que quedará será sólo debida a la del bloque *A*, y esta transición se verá además afectada por la influencia del bloque *E* siendo mayor cuanto más pequeño es el bloque que contiene la L-alanina. En la figura 4.42 pueden verse estas transiciones de estos dibloques para medios neutros o básicos excepto para el dibloque *E50A20* que no presenta transición en estas condiciones, puede verse como hay un aumento en la temperatura de transición y una disminución de la entalpía con la disminución del bloque *A* llegando incluso a desaparecer para el polímero *E50A20*. La variación de la temperatura de transición con el pH se ajusta bien a una curva sigmoïdal como puede verse en la figura 4.43A similarmente a las curvas de valoración ácido base ya que en ambos casos se produce una desprotonación al cambiar el pH. En la figura 4.43B podemos ver el ajuste para la entalpía total del proceso (incluyendo las dos transiciones). Este ajuste se ha utilizado para obtener una temperatura de transición del polímero *E50A20* en medio ácido (Tabla 4.3) por lo que podemos

ver que el efecto no es lineal y la mayor variación de T_t con el pH se produce para los bloques A más pequeños.

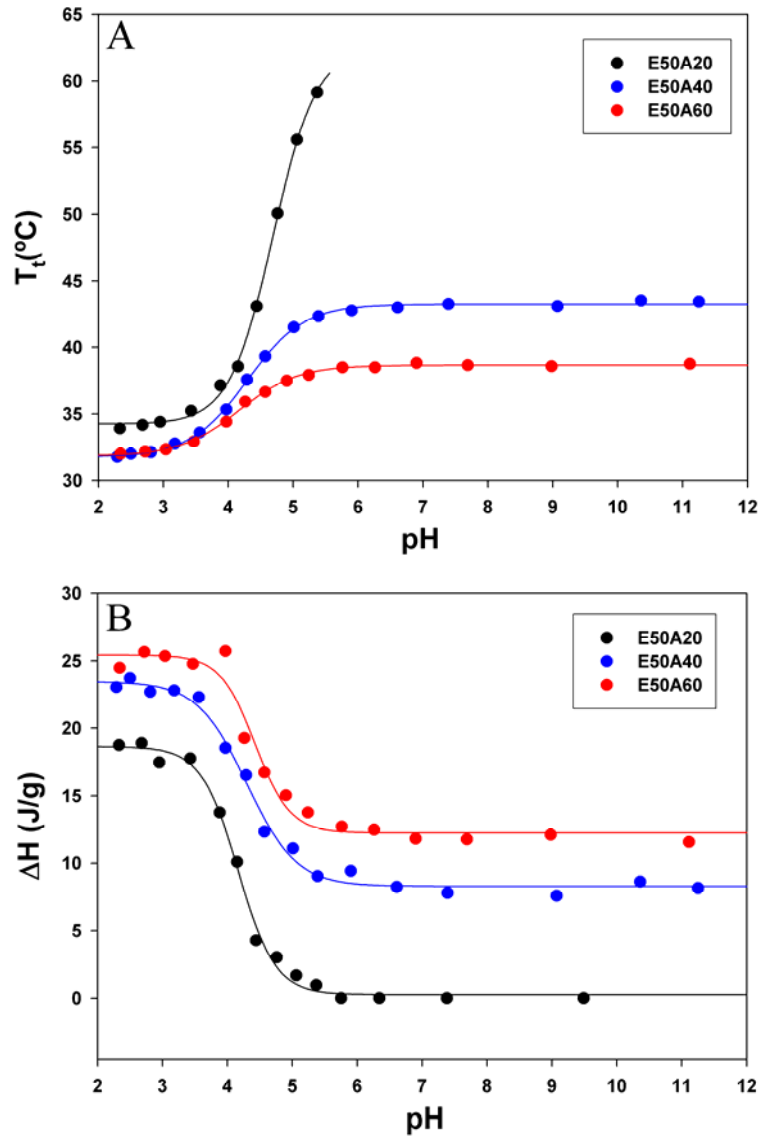


Figura 4.43: Comparativa para dibloques con tamaño variable del bloque A. **A)** Variación de la temperatura de transición del bloque que contiene L-alanina con la variación en el pH. **B)** Variación de la entalpía con el pH. (Experimentos hechos en calentamiento a $5^\circ\text{C}/\text{min}$)

4.3.4 Comparativa entre los diferentes tribloques

En la figura 4.42 también puede verse el comportamiento para los tribloques con una cantidad incremental del bloque intermedio A ($E50AxE50$ con

$x=20, 40$ y 60 en la figura). Para medio ácido podemos ver que para el más pequeño de ellos, el *E50A20E50*, sólo un pico es visible en la posición de la transición del homopolímero con ácido L-glutámico, siendo el caso opuesto a los dos dibloques mayores en los que prevalecía la transición del bloque de L-alanina. La gran cantidad de bloque *E* puede hacer que la transición del pequeño segmento de bloque *A* en medio de dos grandes fragmentos de bloque *E* tenga una transición conjuntamente con los dos otros bloques en la posición de la transición del polímero de glutámico o bien simplemente ocultarla debido a su mucho mayor entalpía. En los otros dos polímeros se pueden ver las dos transiciones con una contribución diferente en las entalpías que refleja las diferencias en la fracción molar de cada bloque. También se puede apreciar en estos termogramas una variación en la temperatura de onset (temperatura a la que comienza la transición, del bloque *E* en este caso) aumentando a medida que aumenta el bloque *A* siendo de 1.8°C entre el *E50A20E50* y el *E50A60E50*. Ya que este es un efecto contrario al que podría producir por el efecto del tamaño podremos inferir que el bloque *A* arrastra la transición del bloque *E* acercándolo a su transición.

Con el aumento de pH, la transición del bloque *E* se da a temperaturas más altas y disminuye su entalpía hasta desaparecer. La transición del tribloque *E50A20E50* con su gran contribución del bloque *E* llega a desaparecer y en los otros dos polímeros queda sólo la transición del bloque *A* aunque desplazada a la temperaturas más altas (Figura 4.44) cuanto menor es su bloque central. De nuevo el valor de T_t en medio ácido del copolímero *E50A20E50* se ha obtenido mediante el ajuste a una función sigmoideal mostrando el gran efecto de los bloques laterales cuando el bloque *A* central es muy pequeño. Esta variación es de 5.4°C (de 41.7°C a 47.1°C) al pasar de 60 pentapéptidos a 40 en el bloque *A*, y de 28.2°C (de 47.1°C a 75.3°C) al pasar de 40 a 20 pentapéptidos.

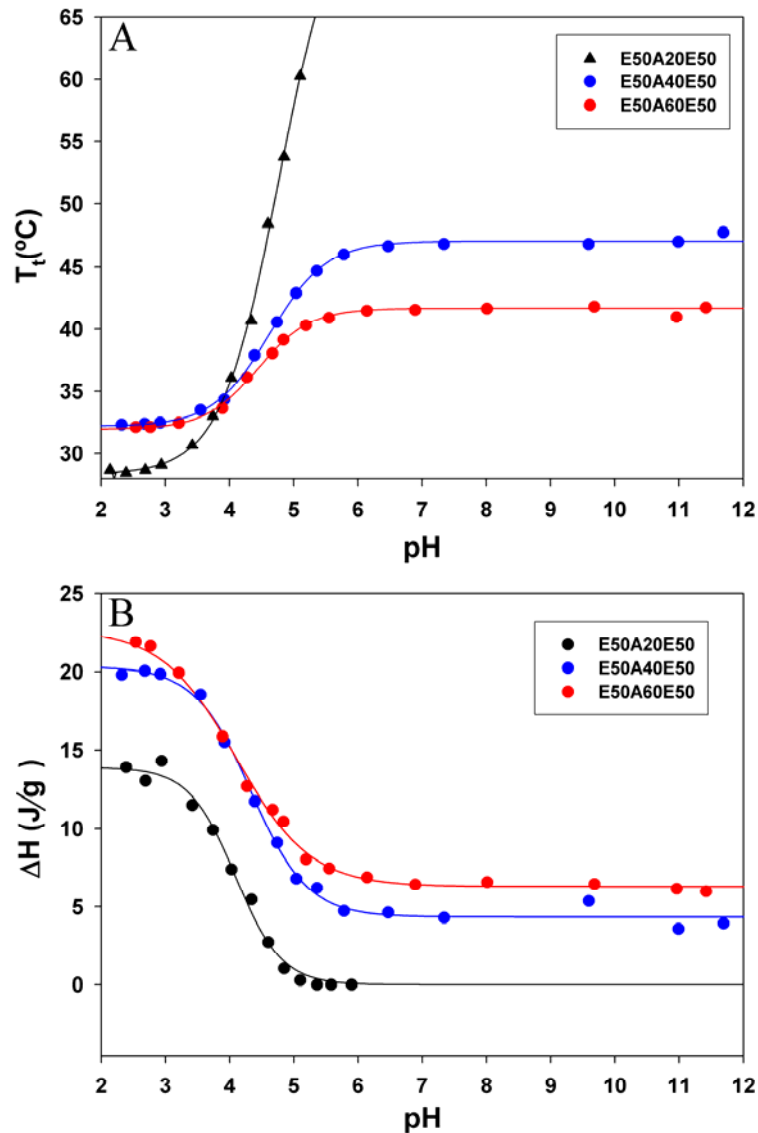


Figura 4.44: Comparativa para tribloques con tamaño variable del bloque *A*. **A)** Variación de la temperatura de transición del bloque que contiene alanina con la variación en el pH (excepto para el tribloque *E50A20E50* en el que sólo aparece una transición en la posición de la del bloque del glutámico). **B)** Variación de la entalpía total con el pH. (Experimentos hechos en calentamiento a 5°C/min)

4.3.5 Influencia de la distribución de los bloques (di, tri y tetrabloques)

Para comparar el efecto de la distribución de los bloques (en dos o tres o cuatro bloques) nos podemos fijar en los polímeros *E100A40*, *E50A40E50* y *E50A20E50A20*. Estos polímeros tienen la misma fracción molar de cada bloque

pero distribuida en formas distintas. Se puede observar en la figura 4.42 que para medio ácido la relación entre el tamaño de la endoterma del bloque *E* a la de la del bloque *A* es mayor cuanto mayor es el número de bloques del polímero. Una posible explicación es que al haber más pentapéptidos del bloque *E* cercanos al bloque *A*, existe una mayor interacción entre ellos y esto haga que el bloque *A* con su mayor hidratación hidrófoba (mayor entalpía), aumente la hidratación hidrófoba de los pentapéptidos del bloque *E* sobre todo a los más cercanos, y por el contrario el bloque *E* menos hidratado disminuya la hidratación del bloque *A* de tal manera que aumentaría la primera endoterma y disminuiría la segunda.

Al irnos a pHs neutros o básicos, en los que tenemos sólo la transición del bloque *A* quedando esta desplazada por el efecto del otro bloque (Figura 4.45A), vemos que el desplazamiento en temperatura que se produce depende de la arquitectura de nuestro polímero siendo mayor cuanto mayor es el número de bloques del polímero. Esta dependencia con el número de bloques queda también reflejada en la disminución de la entalpía con el número de bloques figura 4.45B. El fenómeno de la variación de T_t y ΔH con la arquitectura molecular puede ser explicado de nuevo por el efecto mutuo entre bloques, ya que los carboxilatos cargados del bloque *E* producirán una destrucción de las estructuras de agua de hidratación hidrófoba del bloque *A*, y este efecto es de esperar que sea mayor cuanto más cerca estén esos grupos cargados de las estructuras de agua, la configuración en tetrabloque es la que más favorece este hecho y la del dibloque la que menos.

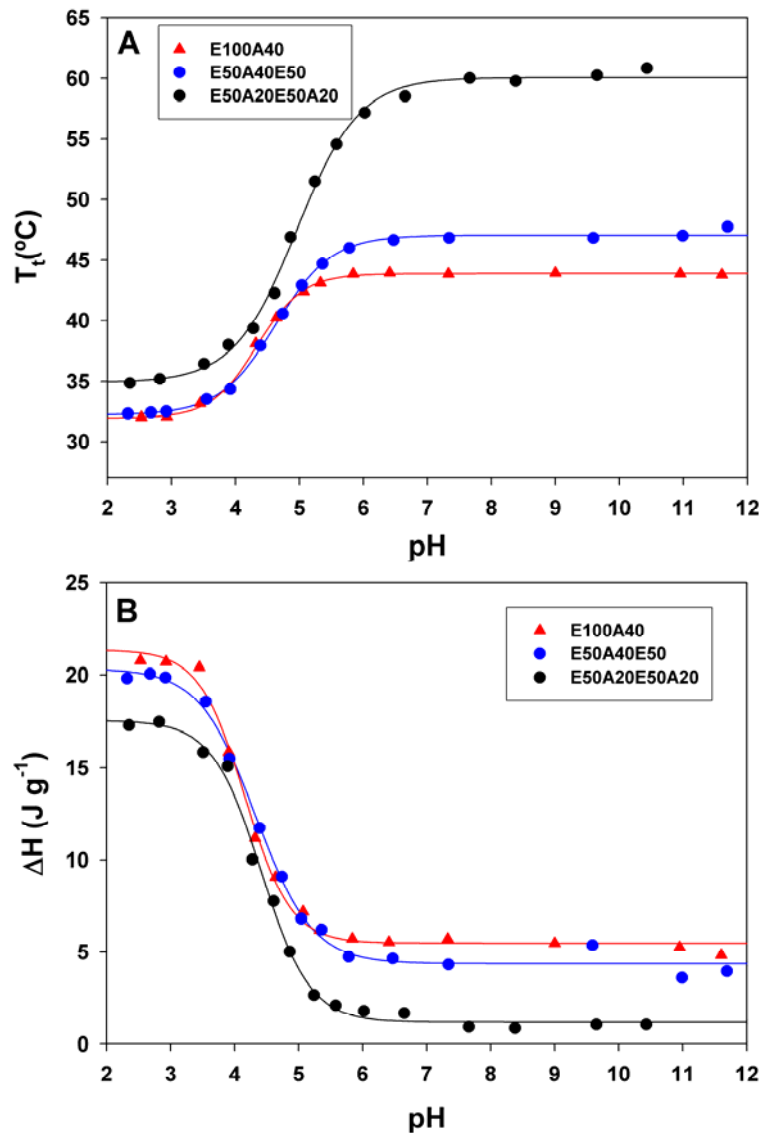


Figura 4.45: Variación de la temperatura de transición (A) y de la entalpía (B) para los copolímeros en bloque *E100A40*, *E50A40E50* y *E50A20E50A20*. (Experimentos hechos en calentamiento a 5°C/min)

4.3.6 Análisis de la variación de las temperaturas de transición y de la histéresis

Como hemos visto las temperaturas de transición del bloque *A* se ven modificadas por los grupos cargados del bloque *E* y esta modificación dependerá del tamaño del bloque *A* y de la configuración del copolímero (di, tri o tetrabloque). En la figura 4.46.B se puede ver esta variación con el tamaño del

bloque *A* para un medio neutro (o básico) que es el de más interés puesto que es la que hace que sólo un bloque se agregue. Como puede observarse la temperatura de transición aumenta enormemente al disminuir el tamaño del bloque *A*, siendo mayor esta variación para tamaños pequeños, además el incremento es mayor cuando este bloque se encuentra rodeado por ambos extremos por el bloque cargado *E* (tribloques) o cuando esta separado en dos partes y rodeado, como en el caso de tetrabloque. Otra observación curiosa es que la temperatura de transición del *E100A40* es prácticamente la misma que el del *E50A40*. Esto podría ser explicado asumiendo que sólo las especies cargadas cercanas (en la molécula) al bloque *A* afectan mediante destrucción a las estructuras de agua de hidratación hidrófoba y causan aumento en la temperatura de transición, con lo que los pentapéptidos más allá del 50 no afectan significativamente al otro bloque.

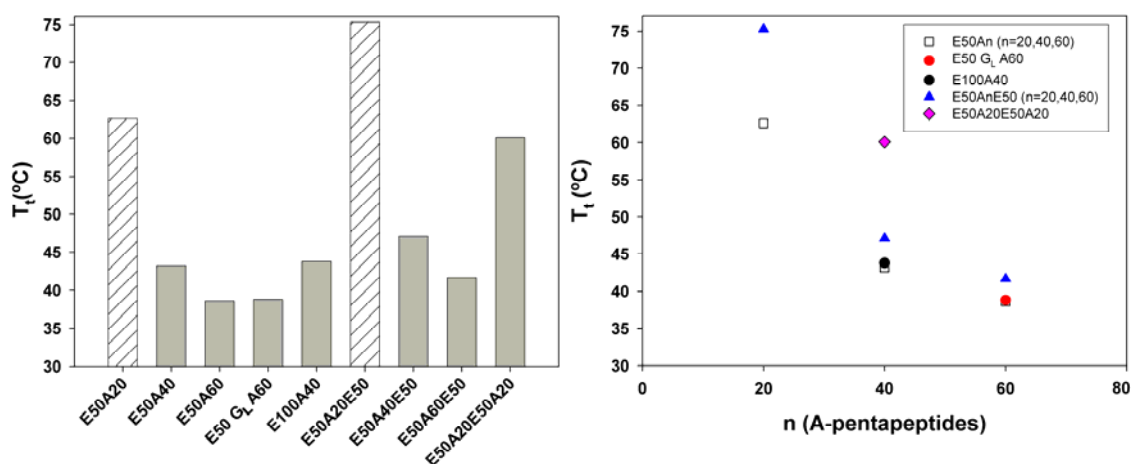


Figura 4.46: Temperaturas de transición de los copolímeros en bloque para un medio neutro (o básico) **A)** Gráfico de barras comparativa (las barras rayadas son extrapolaciones). **B)** Temperaturas de transición en función del tamaño del bloque *A* (en número de pentapéptidos) para los diferentes polímeros.

Otra característica que se ve afectada por la presencia de los bloques *E* es la histéresis del bloque *A*. En la tabla 4.3 se pueden ver los valores de esta tanto para medio ácido como para medio neutro (o básico). Los valores de la histéresis son mayores para medio neutro que para medio ácido, especialmente en los tribloques. También puede verse la gran dependencia de la histéresis con el

tamaño del bloque *A* (Figura 4.47, para medio ácido) tendiendo a cero a medida que el bloque se hace más pequeño y siendo menor cuando este se encuentra flanqueado por el bloque *E* llegando incluso a desaparecer para el *E50A20E50*. De nuevo el polímero *E100A40* presenta una gran similitud con el *E50A40* corroborando la teoría de que sólo los pentapéptidos del bloque *E* cercanos a la unión producen influencia mutua, y el polímero *E50A60* tiene prácticamente el mismo valor que el *E50-G_L-A60* mostrando la incapacidad de esta unión para producir desacoplamiento.

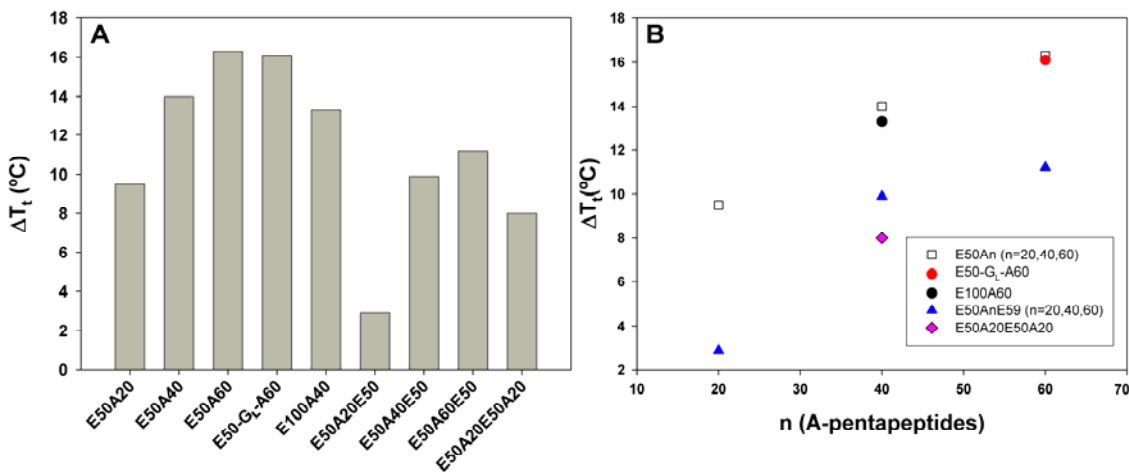


Figura 4.47: Histéresis ($\Delta T_t = T_{IH|A} - T_C$) para los diferentes polímeros a pH=2.5 **A)** Gráfico de barras comparativa. **B)** Histéresis en función del tamaño del bloque *A* (en número de pentapéptidos) para los diferentes polímeros.

4.3.7 Entalpías de transición, reflejo de la interacción mutua.

Si nos fijamos en la entalpía podemos también extraer ciertas conclusiones que nos ayuden a interpretar el funcionamiento de estos copolímeros en bloque. En la Tabla 4.4 se muestran los resultados experimentales de las transiciones para todos los copolímeros ensayados. Para pH= 2.5 la entalpía es la que sale de integrar las dos transiciones juntas, reflejando la entalpía total al pasar del polímero totalmente disuelto a totalmente agregado. A pH=7, sin embargo, sólo aparece la entalpía de la transición del bloque *A* como puede inferirse de su valor mucho más bajo. La tercera columna de datos muestra la entalpía (en medio

neutro) por unidad de masa de bloque *A*. Como puede observarse este valor es más pequeño que el del homopolímero sólo (34 J/g) reflejando la influencia del bloque *E* cargado y poniendo de manifiesto como la hidratación del bloque *A* se ve afectada más en los tribloques que en los dibloques y que el efecto disminuye cuanto más grande sea este bloque más apolar *A*. Esto mismo lo podemos inferir de los copolímeros E100A40, E50A40E50 y E50A20E50A20 en los que las entalpías por gramo de bloque *A* son 19, 14.8 y 4.1 J/g respectivamente mostrando claramente una disminución de la entalpía al aumentar el número de bloques y acercar los grupos γ -carboxilo cargados a los pentapéptidos del bloque *A*.

En las últimas columnas, aparecen las entalpías que tendría que tener el polímero si los bloques fueran totalmente independientes es decir sumando la entalpía de cada homopolímero por el tanto por uno en peso de cada bloque. Como puede observarse y se ha comentado para medio neutro (o básico) la entalpía es menor que la que tendría la transición del bloque de la alanina sólo debido a la influencia de las especies cargadas cercanas a este bloque. Sin embargo para medio ácido (pH=2.5) la entalpía experimental es mayor que la que se daría con la suma de las transiciones de los dos bloques por separado, de forma que existe un aumento de la hidratación hidrófoba de estos polímeros siendo lo más razonable pensar que la gran hidratación hidrófoba del bloque *A* induce una mayor hidratación sobre el bloque *E*.

Otra observación es que la entalpía por unidad de masa de bloque *A* a pH=7 del polímero E50A40 y del E100A40 es prácticamente la misma respaldando la hipótesis de que sólo los pentapéptidos cargados del bloque *E* afectan al bloque *A* disminuyendo su hidratación hidrófoba.

Tabla 4.4: Entalpía de la transición de los copolímeros en bloque en distintos medios de pH, resultado experimentales (3 primeras columnas) y datos teóricos de la entalpía obtenida como la suma de las entalpías de las transiciones de los dos homopolímeros si estuviesen mezclados en la misma proporción (2 últimas columnas).

Polímero	Entalpía (J/g)			Entalpía teórica (J/g)	
	pH=2.5	pH=7		pH=2.5	pH=7
		(J/g _{Total})	(J/g _{A-block})		
<i>E50A20</i>	18.6	0	0	16.2	9.8
<i>E50A40</i>	23.5	8.3	18.5	20.2	15.2
<i>E50A60</i>	25.4	11.8	21.5	22.8	18.7
<i>E50-G_L-A60</i>	24.1	11.3	20.8	22.6	18.5
<i>E100A40</i>	21.4	5.5	19.0	16.2	9.8
<i>E50A20E50</i>	13.4	0	0	13.2	5.8
<i>E50A40E50</i>	20.3	4.3	14.8	16.2	9.8
<i>E50A60E50</i>	21.9	6.3	16.6	18.5	12.9
<i>E50A20E50A20</i>	17.5	1.2	4.1	16.2	9.8

En la figura 4.48 podemos ver la representación de las entalpías esquemáticamente, las líneas discontinuas representan el valor de la entalpía en función de la fracción molar de cada bloque suponiendo que los bloques se comportan de forma independiente, la superior para medio ácido y la inferior en medio neutro-básico. El conjunto de puntos representa el valor de la entalpía para cada polímero, los que están por encima de las líneas son para medio ácido y los de debajo para medio neutro-básico.

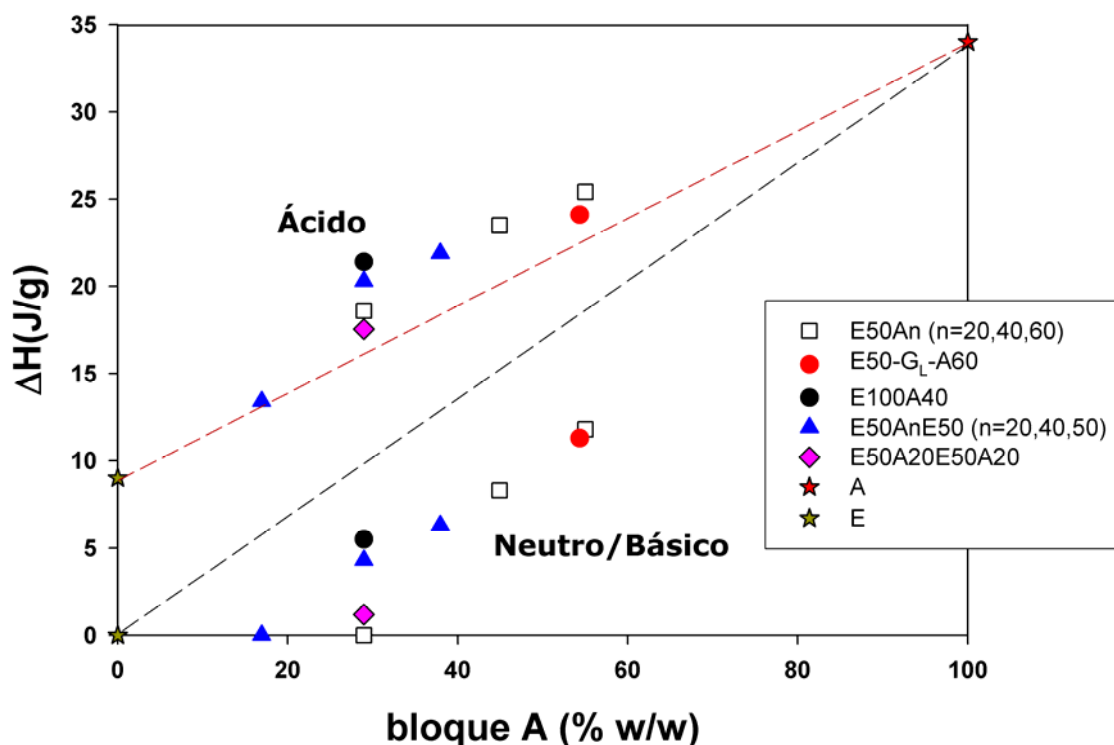


Figura 4.48: Entalpía de la transición de los copolímeros en bloque a pH=2.5 (puntos superiores) y pH=7 (puntos inferiores), las líneas discontinuas indican el valor teórico de la entalpía total si los bloques estuviesen separados en diferentes homopolímeros (medio ácido línea negra, y medio neutro línea roja).

4.3.8 Influencia de NaCl sobre la ITT de los copolímeros en bloque

Como hemos visto anteriormente la adición de sales (en concreto NaCl) es una forma efectiva de regular la temperatura de transición de estos polímeros. Es necesario conocer el efecto de NaCl sobre estos copolímeros en bloque tanto por la necesidad de utilizar medios salinos en algunas aplicaciones por ejemplo en aplicaciones biomédicas con condiciones fisiológicas de $[\text{NaCl}] = 0.15\text{M}$, tanto como para conseguir un ajuste fino de la temperatura de transición en aplicaciones nanotecnológicas.

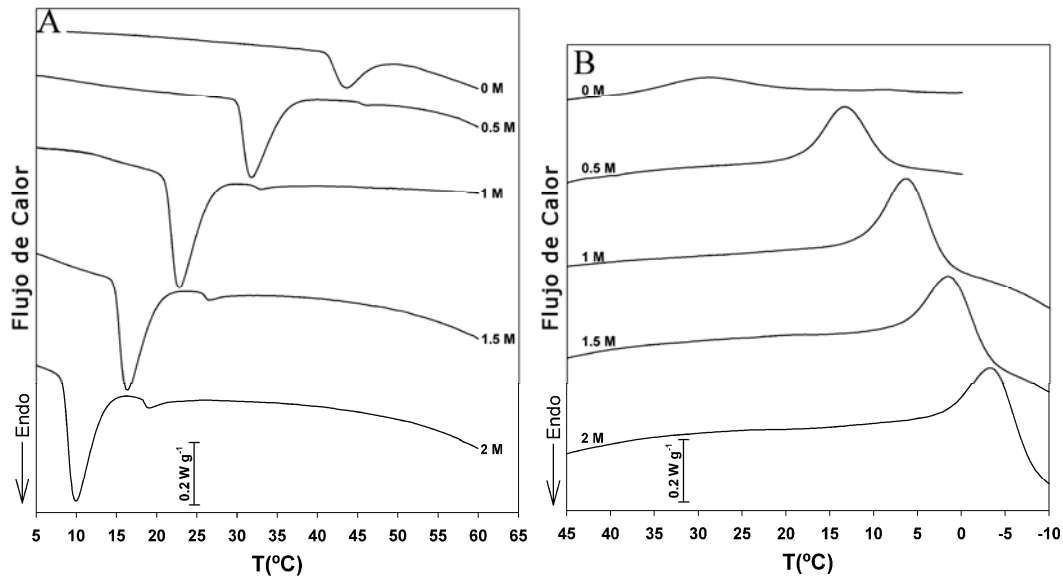


Figura 4.49: Termogramas de DSC para una disolución acuosa (50mg/mL, pH=9) del polímero *E50A40E50* a varias concentraciones salinas. **A)** Barrido en calentamiento (5°C/min) **B)** Barrido en enfriamiento (-5°C/min).

Este efecto puede ayudar a bajar la temperatura de transición en medio neutro-básico a temperaturas inferiores, por ejemplo en la figura 4.49 se puede ver el efecto de la adición de NaCl sobre la transición del tribloque *E50A40E50*, como puede verse existe una disminución en la temperatura de transición y un aumento de la entalpía tanto en calentamiento como en enfriamiento. Interesantemente para concentraciones salinas de más de 0.5M en calentamiento se hace visible la transición correspondiente al bloque *E*. La variación de la temperatura de transición es similar para los dos bloques (Figura 4.50) aunque se ha observado que para concentraciones más bajas el efecto de las sales es mucho mayor para los polímeros cargados [3].

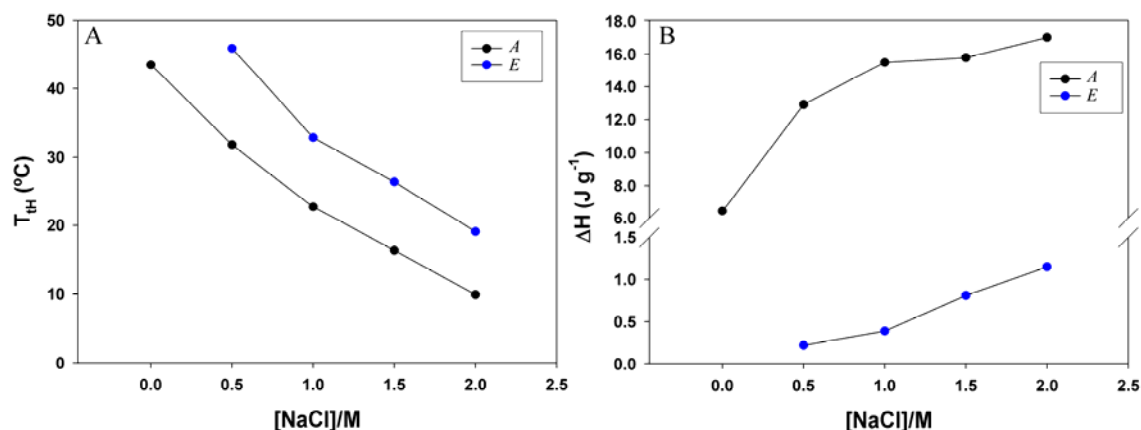


Figura 4.50: Temperaturas de transición (A) y entalpías (B) de la transición en calentamiento del polímero *E50A40E50* en función de la concentración de NaCl.

El efecto del NaCl también puede hacer que transiciones que antes no aparecían porque se producían a temperaturas muy altas a la vez que su entalpía se hacía cero, aparezcan ahora. En la figura 4.51.A se pueden ver los termogramas de disoluciones, de *E50A20E50* en presencia de 1M de NaCl. Gracias al NaCl se pueden ver las dos transiciones para todo el intervalo de pHs, en medios neutros-básicos donde antes el polímero estaba siempre disuelto, ahora aparecen dos transiciones a 31.5 y 36.6 °C referentes al bloque *A* y el bloque *E* respectivamente. En la figura 4.51.B se pueden ver las temperaturas de transición del bloque *A* (rojo) y del bloque *E* (verde) en presencia de 1M de NaCl y la gran diferencia que aparece con la transición que se daba sin NaCl (negro). Es apreciable también la inversión que se produce en el orden de las transiciones con el aumento del pH lo cual podría ser de gran utilidad en ciertas aplicaciones avanzadas.

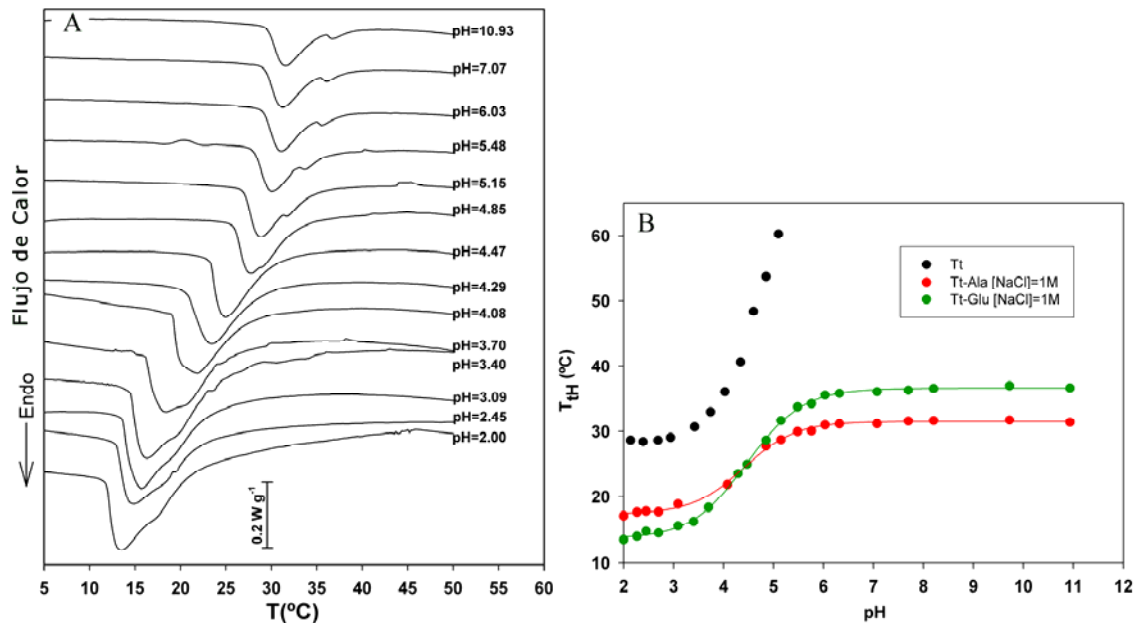


Figura 4.51: A) Termogramas de DSC en calentamiento de una disolución acuosa de E50A20E50 en presencia de 1M de NaCl a varios pHs. B) Temperaturas de transición del gráfico de la izquierda para el bloque A (rojo) y para el bloque E (verde) y en ausencia de NaCl (negro).

4.3.9 Consideraciones finales:

Hemos visto en este capítulo como el hecho de que tengamos dos homopolímeros unidos en un solo copolímero en bloque influencia el comportamiento de cada uno de estos bloques variando la temperatura de transición de cada uno de ellos así como la entalpía de los procesos. Con esto queda demostrado que la T_t no sólo depende de la polaridad media del polímero, si no que también depende de arquitectura y de la disposición de las zonas polares y apolares. Esto hace que la predicción de la temperatura de transición se reduzca a homopolímeros simples como los estudiados por D.W. Urry [3], mientras que otros polímeros más complejos como las polímeros de fusión estudiadas por A. Chilkoti [177], en las que él intenta predecir la T_t en base a la composición y los resultados experimentales de otros polímeros, sea prácticamente imposible, si no se introducen nuevos parámetros que den cuenta de la arquitectura molecular y no solamente los debidos a la composición.

5 Conclusiones

- Se ha observado que el polímero poli(VPAVG) presenta un comportamiento atípico dentro de los polímeros tipo elastina encabezados por el poli(VPGVG). Mediante DSC y turbidimetría se ha observado una clara histéresis en su ciclo de calentamiento-enfriamiento, mostrando una clara dependencia cinética en enfriamiento, aunque, aún así, apareciendo una clara histéresis en los experimentos estáticos de turbidimetría.
- Los estudios cinéticos, con un método isoconversional de modelo libre, han demostrado ser los únicos válidos para estudiar estos polímeros ya que la ITT presenta un comportamiento que involucra varios fenómenos o multipaso (*multistep*) que puede verse en la variación de la energía de activación con el grado de conversión.

Del análisis cinético se ha podido identificar la existencia de pasos limitantes en calentamiento mostrando una curva de energía de activación similar para el poli(VPGVG) y para el poli(VPAVG), mientras que en enfriamiento los valores de energía de activación son mucho menores para el poli(VPAVG), mostrando que debido al sobreenfriamiento, dado por la histéresis del sistema, cuando se alcanza la transición ésta se produce de forma más rápida.

- Se ha demostrado como la técnica de TMDSC es una técnica válida para separar fenómenos superpuestos en la ITT de los polímeros tipo elastina. Se ha conseguido separar la transición endotérmica típica de la ITT en una transición endotérmica en la componente *non-reversing* y una exotérmica en la componente *reversing* del análisis de TMDSC. Se ha observado una variación de la entalpía de estas componentes con la frecuencia (inexistente con la amplitud o la velocidad de calentamiento) existiendo un máximo para periodos en torno a 0.5-0.6 min. La componente exotérmica se ha identificado con la formación de enlaces de Van der Waals durante el plegamiento de las cadenas poliméricas mientras que la componente endotérmica se ha identificado con la destrucción de las estructuras de agua de hidratación hidrófoba. El máximo de entalpía en la componente endotérmica, da de esta forma, un valor mínimo de la entalpía de formación de enlaces durante el plegamiento siendo éste aproximadamente un cuarto de la

entalpía de destrucción de las estructuras de las moléculas de agua. También se ha observado cómo ambas componentes dependen de la hidrofobicidad del polímero.

- Se ha demostrado que la adición de NaCl produce un aumento en las dos componentes del TMDSC, tanto en el componente *reversing* como en el *non-reversing*, de tal forma que tanto la estabilización de la estructura plegada de las cadenas como la estructuración del agua de hidratación hidrófoba aumentan con la presencia de NaCl.

Con una medida de la ITT en función de la concentración, con y sin NaCl, se ha podido ver que el NaCl produce un efecto similar para todas las concentraciones. Además para concentraciones altas, y suponiendo que toda el agua forma parte de la hidratación hidrófoba, se ha visto que el agua de hidratación hidrófoba forma estructuras más estables con la presencia de NaCl. Se puede concluir que la presencia de NaCl tiene un comportamiento análogo al del aumento de la apolaridad del polímero, o lo que es lo mismo el NaCl aumenta la polaridad del disolvente.

- Mediante la utilización de SAXS se ha demostrado que por encima de la T_t existe un ordenamiento en la mesoescala con periodicidades entre los 38 nm y 64nm superior a los tamaños de las espirales β o de los filamentos formadas por éstas, pero formado posiblemente por un supraordenamiento de éstas.
- Utilizando el polímero $[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]_n$ (con $n=5, 9, 15, 30, 45$) se ha demostrado la disminución de la T_t y el aumento de ΔH con el peso molecular, siendo esta variación mayor para pesos moleculares menores. Además se ha demostrado que el aumento en el peso molecular produce un aumento en el pKa' del polímero volviéndolo menos ácido para pesos moleculares mayores. Se ha concluido que el aumento del peso molecular es equivalente a un aumento en la hidrofobicidad del polímero, y esto causa un cambio en el equilibrio de protonación-desprotonación del grupo γ -carboxilo de los ácidos glutámico.
- Mediante la utilización, de nuevo, del polímero $[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]_{15}$ se ha demostrado como la equiespaciación de grupos polares dentro de un entorno predominantemente apolar puede dar lugar a la formación de nanoestructuras autoensambladas. En concreto, se ha obtenido el autoensamblado en nanoporos de unos 7nm de diámetro mediante la deposición de una disolución a pH=8 de este

polímero mediante una técnica de *spin-coating* sobre una superficie de silicio hidrófoba.

- Con el estudio de los dibloques con la forma general $[(VPGVG)_2-(VPGEG)-(VPGVG)_2]_n-[VPAVG]_m$ y los tribloques $[(VPGVG)_2-(VPGEG)-(VPGVG)_2]_n-[VPAVG]_m-[(VPGVG)_2-(VPGEG)-(VPGVG)_2]_n$ se ha demostrado como las propiedades de uno de los bloques afectaba al otro, en concreto la variación con el pH del bloque $[(VPGVG)_2-(VPGEG)-(VPGVG)_2]_n$ afecta al bloque $[VPAVG]_m$ y lo hace en mayor medida cuanto más pequeño sea este segundo bloque. Además la comparación entre los dibloques y tribloques ha permitido demostrar que el comportamiento del polímero no depende solamente de la polaridad media de estos polímeros sino también de su arquitectura molecular. Por último se ha visto como la utilización de NaCl influye en los dos bloques y se convierte en un método efectivo de controlar sus transiciones.

6 Referencias

- [1] Jeong, B.; Gutowska, A. Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 305-311.
- [2] Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. 'Smart' polymers and what they could do in biotechnology and medicine. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 335-340.
- [3] Urry, D. W., *What sustains life? Consilient mechanisms for protein-based machines and materials*. Springer-Verlag: New York, **2006**;
- [4] Schild, H. G. Poly (N-Isopropylacrylamide) - Experiment, Theory and Application. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, *17*, 163-249.
- [5] Gil, E. S.; Hudson, S. A. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 1173-1222.
- [6] Schmaljohann, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **2006**, *58*, 1655-1670.
- [7] Urry, D. W. Entropic Elastic Processes in Protein Mechanisms .1. Elastic Structure Due to an Inverse Temperature Transition and Elasticity Due to Internal Chain Dynamics. *J. Protein Chem.* **1988**, *7*, 1-34.
- [8] Rodríguez-Cabello, J. C.; Reguera, J.; Girotti, A.; Arias, F. J.; Alonso, M. Genetic Engineering of Protein-Based Polymers: The Example of Elastinlike Polymers. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *200*, 119-167.
- [9] Urry, D. W. Molecular Machines - How Motion and Other Functions of Living Organisms Can Result from Reversible Chemical-Changes. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1993**, *32*, 819-841.
- [10] Rodríguez-Cabello, J. C.; Reguera, J.; Girotti, A.; Alonso, M.; Testera, A. M. Developing functionality in elastin-like polymers by increasing their molecular complexity: the power of the genetic engineering approach. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 1119-1145.
- [11] Mithieux, S. M.; Weiss, A. S. Elastin. *Adv. Protein Chem.* **2005**, *70*, 437-461.
- [12] Debelle, L.; Tamburro, A. M. Elastin: molecular description and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31*, 261-272.
- [13] Nakamura, F.; Suyama, K. Isolation and Structural Identification of a New Cross-Linking Amino-Acid, Allodesmosine, from the Acid Hydrolysate of Elastin. *Agric. Biol. Chem.* **1991**, *55*, 547-554.
- [14] Tamburro, A. M.; Guantieri, V.; Scopa, A.; Drabble, J. M. Polypeptide Models of Elastin - Cd and Nmr-Studies on Synthetic Poly(X-Gly-Gly). *Chirality* **1991**, *3*, 318-323.
- [15] Keeley, F. W.; Bellingham, C. M.; Woodhouse, K. A. 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. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* **2002**, *357*, 185-189.
- [16] Sandberg, L. B.; Leslie, J. G.; Leach, C. T.; Alvarez, V. L.; Torres, A. R.; Smith, D. W. Elastin Covalent Structure as Determined by Solid-Phase Amino-Acid Sequencing. *Pathol. Biol.* **1985**, *33*, 266-274.
- [17] Cox, B. A.; Starcher, B. C.; Urry, D. W. Coacervation of Alpha-Elastin Results in Fiber Formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *317*, 209-213.

- [18] Urry, D. W. Protein Elasticity Based on Conformations of Sequential Polypeptides - the Biological Elastic Fiber. *J. Protein Chem.* **1984**, 3, 403-436.
- [19] Urry, D. W. Characterization of Soluble Peptides of Elastin by Physical Techniques. *Methods Enzymol.* **1982**, 82, 673-716.
- [20] Urry, D. W. Molecular Perspectives of Vascular Wall Structure and Disease - Elastic Component. *Perspect. Biol. Med.* **1978**, 21, 265-295.
- [21] Urry, D. W.; Long, M. M.; Harris, R. D.; Prasad, K. U. Temperature-Related Force and Structure Development in Elastomeric Polypeptides - the Ile1 Analog of the Polypentapeptide of Elastin. *Biopolymers* **1986**, 25, 1939-1953.
- [22] Khaled, M. A.; Prasad, K. U.; Venkatachalam, C. M.; Urry, D. W. Nuclear Magnetic-Resonance and Conformational Energy Characterization of Repeat Peptides of Elastin - the Cyclohexadecapeptide, Cyclo-(L-Val1-L-Pro2-Gly3-Gly4)4. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7139-7145.
- [23] Guantieri, V.; Tamburro, A. M.; Cabrol, D.; Broch, H.; Vasilescu, D. Conformational Studies on Polypeptide Models of Collagen - Poly(Gly-Pro-Val), Poly(Gly-Pro-Met), Poly(Gly-Val-Pro) and Poly(Gly-Met-Pro). *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, 29, 216-230.
- [24] Cook, W. J.; Einspahr, H.; Trapane, T. L.; Urry, D. W.; Bugg, C. E. Crystal-Structure and Conformation of the Cyclic Trimer of a Repeat Pentapeptide of Elastin, Cyclo-(L-Valyl-L-Prolylglycyl-L-Valylglycyl)3. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5502-5505.
- [25] Thomas, G. J.; Prescott, B.; Urry, D. W. Raman Amide Bands of Type-I β Turns in Cyclo-(Vpvgv)3 and Poly-(Vpvgv), and Implications for Protein Secondary-Structure Analysis. *Biopolymers* **1987**, 26, 921-934.
- [26] Volpin, D.; Urry, D. W.; Pasqualironchetti, I.; Gotte, L. Studies by Electron-Microscopy on Structure of Coacervates of Synthetic Polypeptides of Tropoelastin. *Micron* **1976**, 7, 193-198.
- [27] Urry, D. W.; Peng, S. Q.; Xu, J.; McPherson, D. T. Characterization of waters of hydrophobic hydration by microwave dielectric relaxation. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1161-1162.
- [28] Khaled, M. A.; Renugopalakrishnan, V.; Urry, D. W. Proton Magnetic-Resonance and Conformational Energy Calculations of Repeat Peptides of Tropoelastin - Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 7547-7553.
- [29] Buchet, R.; Luan, C. H.; Prasad, K. U.; Harris, R. D.; Urry, D. W. Dielectric-Relaxation Studies on Analogs of the Polypentapeptide of Elastin. *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 511-517.
- [30] Rodríguez-Cabello, J. C.; Alonso, M.; Diez, M. I.; Caballero, M. I.; Herguedas, M. M. Structural investigation of the poly(pentapeptide) of elastin, poly(GVGVP), in the solid state. *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, 200, 1831-1838.
- [31] Rodríguez-Cabello, J. C.; Alonso, M.; Caballero, M. I.; Herguedas, M. M. Experimental study of the assignment of non-amide Raman bands of the polypentapeptide of elastin, poly(VPGVG). *J. Raman Spectrosc.* **2000**, 31, 523-527.
- [32] Schmidt, P.; Dybal, J.; Rodríguez-Cabello, J. C.; Alonso, M. Raman spectroscopy of secondary structure of elastinlike polymer poly(GVGVP). *Biopolymers* **2001**, 62, 150-157.

- [33] Schmidt, P.; Dybal, J.; Rodriguez-Cabello, J. C.; Reboto, V. Role of water in structural changes of poly(AVGVP) and poly(GVGVP) studied by FTIR and Raman spectroscopy and ab initio calculations. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 697-706.
- [34] Sallach, R. E.; Wei, M.; Biswas, N.; Conticello, V. P.; Lecommandoux, S.; Dluhy, R. A.; Chaikof, E. L. Micelle density regulated by a reversible switch of protein secondary structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12014-12019.
- [35] Kurkova, D.; Kriz, J.; Schmidt, P.; Dybal, J.; Rodriguez-Cabello, J. C.; Alonso, M. Structure and dynamics of two elastin-like polypentapeptides studied by NMR spectroscopy. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 589-601.
- [36] Li, B.; Alonso, D. O. V.; Bennion, B. J.; Daggett, V. Hydrophobic hydration is an important source of elasticity in elastin-based biopolymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11991-11998.
- [37] Li, B.; Alonso, D. O. V.; Daggett, V. The molecular basis for the inverse temperature transition of elastin. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 581-592.
- [38] Gross, P. C.; Possart, W.; Zeppezauer, M. An alternative structure model for the polypentapeptide in elastin. *Z.Naturforsch.(C)* **2003**, *58*, 873-878.
- [39] Urry, D. W.; Trapane, T. L.; Sugano, H.; Prasad, K. U. Sequential Polypeptides of Elastin - Cyclic Conformational Correlates of the Linear Polypentapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2080-2089.
- [40] Urry, D. W. Five axioms for the functional design of peptide-based polymers as molecular machines and materials: Principle for macromolecular assemblies. *Biopolymers* **1998**, *47*, 167-178.
- [41] Gowda, D. C.; Parker, T. M.; Harris, R. D.; Urry, D. W., Synthesis, Characterization and Medical Applications of Bioelastic Materials. In *Peptides: Design, Synthesis and Biological Activity*, Basava, C.; Anantharamaiah, G. M., Eds. Birkhäuser: Boston, **1994**; pp 81-111.
- [42] Hoffman, A. S.; Stayton, P. S.; Bulmus, V.; Chen, G. H.; Chen, J. P.; Cheung, C.; Chilkoti, A.; Ding, Z. L.; Dong, L. C.; Fong, R.; Lackey, C. A.; Long, C. J.; Miura, M.; Morris, J. E.; Murthy, N.; Nabeshima, Y.; Park, T. G.; Press, O. W.; Shimoboji, T.; Shoemaker, S.; Yang, H. J.; Monji, N.; Nowinski, R. C.; Cole, C. A.; Priest, J. H.; Harris, J. M.; Nakamae, K.; Nishino, T.; Miyata, T. Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 577-586.
- [43] Butler, J. A. V. The energy and entropy of hydration of organic compounds. *Trans. Faraday Soc.* **1937**, *33*, 229-238.
- [44] Manno, M.; Emanuele, A.; Martorana, V.; San Biagio, P. L.; Bulone, D.; Palma-Vittorelli, M. B.; McPherson, D. T.; Xu, J.; Parker, T. M.; Urry, D. W. Interaction of processes on different length scales in a bioelastomer capable of performing energy conversion. *Biopolymers* **2001**, *59*, 51-64.
- [45] Urry, D. W. The change in Gibbs free energy for hydrophobic association - Derivation and evaluation by means of inverse temperature transitions. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *399*, 177-183.
- [46] Urry, D. W.; Trapane, T. L.; Prasad, K. U. Phase-structure transitions of the elastin polypentapeptide-water system within the framework of composition-temperature studies. *Biopolymers* **1985**, *24*, 2345-56.
- [47] Rodríguez-Cabello, J. C.; Alonso, M.; Perez, T.; Herguedas, M. M. Differential scanning calorimetry study of the hydrophobic hydration of the elastin-based

- poly(pentapeptide), poly(VPGVG), from deficiency to excess of water. *Biopolymers* **2000**, 54, 282-288.
- [48] Urry, D. W. Free-Energy Transduction in Polypeptides and Proteins Based on Inverse Temperature Transitions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1992**, 57, 23-57.
- [49] Urry, D. W.; Gowda, D. C.; Parker, T. M.; Luan, C. H.; Reid, M. C.; Harris, C. M.; Pattanaik, A.; Harris, R. D. Hydrophobicity Scale for Proteins Based on Inverse Temperature Transitions. *Biopolymers* **1992**, 32, 1243-1250.
- [50] Stackelberg, M. V.; Müller, H. R. Zur Struktur der Gashydrate *Naturwissenschaften* **1951**, 38, 156-458.
- [51] Urry, D. W.; Hayes, L. C.; Gowda, D. C.; Harris, C. M.; Harris, R. D. Reduction-Driven Polypeptide Folding by the Delta-Tt Mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 188, 611-617.
- [52] Strzegowski, L. A.; Martinez, M. B.; Gowda, D. C.; Urry, D. W.; Tirrell, D. A. Photomodulation of the Inverse Temperature Transition of a Modified Elastin Poly(Pentapeptide). *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 813-814.
- [53] Alonso, M.; Reboto, V.; Guiscardo, L.; Mate, V.; Rodríguez-Cabello, J. C. Novel photoresponsive p-phenylazobenzene derivative of an elastin-like polymer with enhanced control of azobenzene content and without pH sensitiveness. *Macromolecules* **2001**, 34, 8072-8077.
- [54] Heimbach, C. J. Photochemical transduction by hydrophobically poised bioelastic proteins. Ph.D. Dissertation, The University of Alabama, Birmingham, **1998**.
- [55] Alonso, M.; Reboto, V.; Guiscardo, L.; San Martin, A.; Rodríguez-Cabello, J. C. Spiropyran derivative of an elastin-like bioelastic polymer: Photoresponsive molecular machine to convert sunlight into mechanical work. *Macromolecules* **2000**, 33, 9480-9482.
- [56] Rodríguez-Cabello, J. C.; Alonso, M.; Guiscardo, L.; Reboto, V.; Girotti, A. Amplified photoresponse of a p-phenylazobenzene derivative of an elastin-like polymer by alpha-cyclodextrin: The amplified Delta T-t mechanism. *Adv. Mater.* **2002**, 14, 1151-1154.
- [57] Zhang, Y. J.; Cremer, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 658-663.
- [58] Kunz, W.; Henle, J.; Ninham, B. W. 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2004**, 9, 19-37.
- [59] Zhang, Y. J.; Trabbic-Carlson, K.; Albertorio, F.; Chilkoti, A.; Cremer, P. S. Aqueous two-phase system formation kinetics for elastin-like polypeptides of varying chain length. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2192-2199.
- [60] Urry, D. W.; Hayes, L. C.; Gowda, D. C.; Parker, T. M. Pressure Effect on Inverse Temperature Transitions - Biological Implications. *Chem. Phys. Lett.* **1991**, 182, 101-106.
- [61] Tamura, T.; Yamaoka, T.; Kunugi, S.; Panitch, A.; Tirrell, D. A. Effects of temperature and pressure on the aggregation properties of an engineered elastin model polypeptide in aqueous solution. *Biomacromolecules* **2000**, 1, 552-5.
- [62] Urry, D. W. Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 11007-11028.

- [63] Urry, D. W., Deciphering engineering principles for the design of protein-based nanomachines. In *Bionanotechnology: Proteins to Nanodevices*, Renugopalakrishnan, V.; Lewis, R. V., Eds. Springer: Dordrecht, **2006**; pp 141-189.
- [64] Urry, D. W.; Hayes, L. C.; Gowda, D. C.; Peng, S. Q.; Jing, N. J. Electrochemical Transduction in Elastic Protein-Based Polymers - a Model for an Energy-Conversion Step of Oxidative-Phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 210, 1031-1039.
- [65] Urry, D. W.; Peng, S. Q.; Hayes, L.; Jaggard, J.; Harris, R. D. A New Mechanism of Mechanochemical Coupling - Stretch-Induced Increase in Carboxyl Pka as a Diagnostic. *Biopolymers* **1990**, 30, 215-218.
- [66] Urry, D. W.; Peng, S. Q. Nonlinear Mechanical Force Induced Pk(a) Shifts - Implications for Efficiency of Conversion to Chemical Energy. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8478-8479.
- [67] Urry, D. W. Function of the F-1-motor (F-1-ATPase) of ATP synthase by apolar-polar repulsion through internal interfacial water. *Cell Biol. Int.* **2006**, 30, 44-55.
- [68] McPherson, D. T.; Morrow, C.; Minehan, D. S.; Wu, J. G.; Hunter, E.; Urry, D. W. Production and Purification of a Recombinant Elastomeric Polypeptide, G-(Vpvgv)19-Vpvgv, from Escherichia-Coli. *Biotechnol. Prog.* **1992**, 8, 347-352.
- [69] Scheller, J.; Leps, M.; Conrad, U. Forcing single-chain variable fragment production in tobacco seeds by fusion to elastin-like polypeptides. *Plant Biotechnology Journal* **2006**, 4, 243-249.
- [70] Girotti, A.; Reguera, J.; Rodríguez-Cabello, J. C.; Arias, F. J.; Alonso, M.; Testera, A. M. Design and bioproduction of a recombinant multi(bio)functional elastin-like protein polymer containing cell adhesion sequences for tissue engineering purposes. *J Mater Sci-Mater M* **2004**, 15, 479-484.
- [71] Bronowski, J., *The ascent of man*. Little Brown & Co: Boston/Toronto, **1974**;
- [72] Chow, D. C.; Dreher, M. R.; Trabbic-Carlson, K.; Chilkoti, A. Ultra-high expression of a thermally responsive recombinant fusion protein in E-coli. *Biotechnol. Prog.* **2006**, 22, 638-646.
- [73] Urry, D. W.; Parker, T. M.; Reid, M. C.; Gowda, D. C. Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(GVGVP) and Its Gamma-Irradiation Cross-Linked Matrix - Summary of Generic Biological Test-Results. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1991**, 6, 263-282.
- [74] Urry, D. W.; Woods, T. C.; Hayes, L. C.; Xu, J.; McPherson, D. T.; Iwama, M.; Furuta, M.; Hayashi, T.; Murata, M.; Parker, T. M., Elastic Protein-Based Biomaterials: Elements of Basic Science, Controlled Release and Biocompatibility. In *Biomaterials Handbook—Advanced Applications of Basic Sciences and Bioengineering*, Wise, D. L.; Hasirci, V.; Yaszemski, M. J.; Altobelli, D. E.; Lewandrowski, K. U.; Trantolo, D. J., Eds. Marcel Dekker: New York, **2003**.
- [75] Urry, D. W.; Nicol, A.; Gowda, D. C.; Hoban, L. D.; McKee, A.; Williams, T.; Olsen, D. B.; Cox, B. A., Medical applications of bioelastic materials. In *Biotechnological polymers: medical, pharmaceutical and industrial applications*, Gebelein, C. G., Ed. Technomic: Atlanta, **1993**; pp 82-103.
- [76] Nicol, A.; Gowda, D. C.; Urry, D. W. Cell-Adhesion and Growth on Synthetic Elastomeric Matrices Containing Arg-Gly-Asp-Ser. *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, 26, 393-413.

- [77] Urry, D. W.; Gowda, D. C.; Harris, C. M.; Harris, R. D., Bioelastic materials and the ΔT_t -Mechanism in drug delivery. In *Polymeric Drugs and Drug Administration*, Ottenbrite, R. M., Ed. ACS: Washintong DC, **1994**; p 15.
- [78] Urry, D. W. Preprogrammed Drug Delivery Systems Using Chemical Triggers for Drug Release by Mechanochemical Coupling. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1990**, 200, 74.
- [79] Herrero-Vanrell, R.; Rincon, A. C.; Alonso, M.; Reboto, V.; Molina-Martinez, I. T.; Rodriguez-Cabello, J. C. Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release. *J. Controlled Release* **2005**, 102, 113-122.
- [80] Nath, N.; Chilkoti, A. Interfacial phase transition of an environmentally responsive elastin biopolymer adsorbed on functionalized gold nanoparticles studied by colloidal surface plasmon resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8197-8202.
- [81] Nath, N.; Chilkoti, A. Creating "Smart" surfaces using stimuli responsive polymers. *Adv. Mater.* **2002**, 14, 1243-1247.
- [82] Trabbic-Carlson, K.; Liu, L.; Kim, B.; Chilkoti, A. Expression and purification of recombinant proteins from Escherichia coli: Comparison of an elastin-like polypeptide fusion with an oligohistidine fusion. *Protein Sci.* **2004**, 13, 3274-3284.
- [83] Ge, X.; Yang, D. S. C.; Trabbic-Carlson, K.; Kim, B.; Chilkoti, A.; Filipe, C. D. M. Self-cleavable stimulus responsive tags for protein purification without chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11228-11229.
- [84] Chilkoti, A.; Christensen, T.; MacKay, J. A. Stimulus responsive elastin biopolymers: applications in medicine and biotechnology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 652-657.
- [85] Nath, N.; Chilkoti, A. Fabrication of a reversible protein array directly from cell lysate using a stimuli-responsive polypeptide. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 709-715.
- [86] Nath, N.; Hyun, J.; Ma, H.; Chilkoti, A. Surface engineering strategies for control of protein and cell interactions. *Surf. Sci.* **2004**, 570, 98-110.
- [87] Hyun, J.; Lee, W. K.; Nath, N.; Chilkoti, A.; Zauscher, S. Capture and release of proteins on the nanoscale by stimuli-responsive elastin-like polypeptide "switches". *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7330-7335.
- [88] Zhang, H. L.; Iwama, M.; Akaike, T.; Urry, D. W.; Pattanaik, A.; Parker, T. M.; Konishi, I.; Nikaido, T. Human amniotic cell sheet harvest using a novel temperature-responsive culture surface coated with protein-based polymer. *Tissue Eng.* **2006**, 12, 391-401.
- [89] Bartos, H.; Götz, F.; Peters, R., Microfluidics meets nano: Lab-on-a-chip devices and their potential for nanobiotechnology. In *Nanobiotechnology : concepts, applications and perspectives*, Niemeyer, C. M.; Mirkin, C. A., Eds. Wiley-VCH: Weinheim, **2004**; pp 13-30.
- [90] Galwey, A. K.; Brown, M. E., *Thermal decomposition of ionic solids*. 1st ed.; Elsevier: Amsterdam ; New York, **1999**;
- [91] Vyazovkin, S.; Wight, C. A. Kinetics in solids. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, 48, 125-149.
- [92] Maciejewski, M.; Reller, A. How (Un)Reliable Are Kinetic Data of Reversible Solid-State Decomposition Processes. *Thermochim. Acta* **1987**, 110, 145-152.
- [93] Vyazovkin, S. A unified approach to kinetic processing of nonisothermal data. *Int. J. Chem. Kinet.* **1996**, 28, 95-101.

- [94] Vyazovkin, S. Reply to "What is meant by the term 'variable activation energy' when applied in the kinetics analyses of solid state decompositions (crystolysis reactions)?" *Thermochim. Acta* **2003**, 397, 269-271.
- [95] Vyazovkin, S. V.; Lesnikovich, A. I. An Approach to the Solution of the Inverse Kinetic Problem in the Case of Complex Processes .1. Methods Employing a Series of Thermoanalytical Curves. *Thermochim. Acta* **1990**, 165, 273-280.
- [96] Garn, P. D. Kinetics of Thermal-Decomposition of the Solid-State .2. Delimiting the Homogeneous-Reaction Model. *Thermochim. Acta* **1990**, 160, 135-145.
- [97] Vyazovkin, S.; Wight, C. A. Isothermal and nonisothermal reaction kinetics in solids: In search of ways toward consensus. *J. Phys. Chem. A* **1997**, 101, 8279-8284.
- [98] Galwey, A. K.; Brown, M. E. A Theoretical Justification for the Application of the Arrhenius Equation to Kinetics of Solid-State Reactions (Mainly Ionic-Crystals). *Proc. R. Soc. London, A* **1995**, 450, 501-512.
- [99] Vyazovkin, S. V.; Lesnikovich, A. I. The Influence of Errors of Arrhenius Parameter Calculation on the Exactness of the Solution of the Direct Kinetic Problem. *Thermochim. Acta* **1991**, 182, 133-142.
- [100] Friedman, H. L. Kinetics of Thermal Degradation of Char-Forming Plastics from Thermogravimetry . Application to Phenolic Plastic. *J. Polym. Sci., Part C: Polym. Symp.* **1964**, 6, 183-195.
- [101] Ozawa, T. A New Method of Analyzing Thermogravimetric Data. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1965**, 38, 1881-1886.
- [102] Flynn, J. H.; Wall, L. A. General Treatment of Thermogravimetry of Polymers. *J Res Nbs a Phys Ch* **1966**, A 70, 487-523.
- [103] Vyazovkin, S.; Sbirrazzuoli, N. Isoconversional kinetic analysis of thermally stimulated processes in polymers. *Macromolecular Rapid Communications* **2006**, 27, 1515-1532.
- [104] Vyazovkin, S. V.; Lesnikovich, A. I. Practical Application of Isoconversional Methods. *Thermochim. Acta* **1992**, 203, 177-185.
- [105] Lesnikovich, A. I.; Levchik, S. V. Isoparametric Kinetic Relations for Chemical-Transformations in Condensed Substances (Analytical Survey) .2. Reactions Involving the Participation of Solid Substances. *J. Therm. Anal.* **1985**, 30, 677-702.
- [106] Maccallum, J. R.; Munro, M. V. The Kinetic Compensation Effect for the Thermal-Decomposition of Some Polymers. *Thermochim. Acta* **1992**, 203, 457-463.
- [107] Vyazovkin, S. V.; Goryachko, V. I.; Lesnikovich, A. I. An Approach to the Solution of the Inverse Kinetic Problem in the Case of Complex Processes .3. Parallel Independent Reactions. *Thermochim. Acta* **1992**, 197, 41-51.
- [108] Vyazovkin, S. Conversion Dependence of Activation-Energy for Model Dsc Curves of Consecutive Reactions. *Thermochim. Acta* **1994**, 236, 1-13.
- [109] Vyazovkin, S.; Linert, W. Kinetic-Analysis of Reversible Thermal-Decomposition of Solids. *Int. J. Chem. Kinet.* **1995**, 27, 73-84.
- [110] Vyazovkin, S.; Sbirrazzuoli, N. Mechanism and kinetics of epoxy-amine cure studied by differential scanning calorimetry. *Macromolecules* **1996**, 29, 1867-1873.
- [111] Reading, M. Modulated differential scanning calorimetry - a new way. forward in materials characterization. *Trends in Polymer Science* **1993**, 1, 248-253.
- [112] Wunderlich, B.; Androsch, R.; Pyda, M.; Kwon, Y. K. Heat capacity by multi-frequencies sawtooth modulation. *Thermochim. Acta* **2000**, 348, 181-190.

- [113] Reading, M.; Luget, A.; Wilson, R. Modulated Differential Scanning Calorimetry. *Thermochim. Acta* **1994**, 238, 295-307.
- [114] Wunderlich, B.; Boller, A.; Okazaki, I.; Ishikiriyama, K.; Chen, W.; Pyda, M.; Pak, J.; Moon, I.; Androsch, R. Temperature-modulated differential scanning calorimetry of reversible and irreversible first-order transitions. *Thermochim. Acta* **1999**, 330, 21-38.
- [115] Reading, M.; Elliott, D.; Hill, V. L. A New Approach to the Calorimetric Investigation of Physical and Chemical-Transitions. *J. Therm. Anal.* **1993**, 40, 949-955.
- [116] Gill, P. S.; Sauerbrunn, S. R.; Reading, M. Modulated Differential Scanning Calorimetry. *J. Therm. Anal.* **1993**, 40, 931-939.
- [117] Verdonck, E.; Schaap, K.; Thomas, L. C. A discussion of the principles and applications of Modulated Temperature DSC (MTDSC). *Int. J. Pharm.* **1999**, 192, 3-20.
- [118] Jorimann, U.; Widmann, G.; Riesen, R. Temperature modulated DSC (TMDSC) - Applications and limits of phase information, c(p) determination and effect separation. *J. Therm. Anal. Calorim.* **1999**, 56, 639-647.
- [119] Menczel, J. D.; Judovits, L. Literature status on temperature-modulated differential scanning calorimetry. *J. Therm. Anal. Calorim.* **1998**, 54, 419-436.
- [120] Jones, K. J.; Kinshott, I.; Reading, M.; Lacey, A. A.; Nikolopoulos, C.; Pollock, H. M. The origin and interpretation of the signals of MTDSC. *Thermochim. Acta* **1997**, 305, 187-199.
- [121] Schawe, J. E. K. A Comparison of Different Evaluation Methods in Modulated Temperature DSC. *Thermochim. Acta* **1995**, 260, 1-16.
- [122] Reading, M. A comparison of different evaluation methods in modulated-temperature DSC - Comments. *Thermochim. Acta* **1997**, 292, 179-187.
- [123] Nielsen, J. K.; Dyre, J. C. Fluctuation-dissipation theorem for frequency-dependent specific heat. *Physical Review B* **1996**, 54, 15754-15761.
- [124] Simon, S. L. Temperature-modulated differential scanning calorimetry: theory and application. *Thermochim. Acta* **2001**, 374, 55-71.
- [125] Simon, S. L.; McKenna, G. B. Quantitative analysis of errors in TMDSC in the glass transition region. *Thermochim. Acta* **2000**, 348, 77-89.
- [126] Van Assche, G.; Van Hemelrijck, A.; Rahier, H.; Van Mele, B. Modulated temperature differential scanning calorimetry: Cure, vitrification, and devitrification of thermosetting systems. *Thermochim. Acta* **1997**, 305, 317-334.
- [127] Marcus, S. M.; Blaine, R. L. Thermal-Conductivity of Polymers, Glasses and Ceramics by Modulated DSC. *Thermochim. Acta* **1994**, 243, 231-239.
- [128] S. Hyde; S. Andersson; K. Larsson; Z. Blum T. Landh; S. Lidin; Ninham, B. W., *The language of shape*. Elsevier Science: New York, **1997**;
- [129] Wilchek, M.; Bayer, E. A. Applications of Avidin-Biotin Technology - Literature Survey. *Methods Enzymol.* **1990**, 184, 14-45.
- [130] Wilchek, M.; Bayer, E. A.; Livnah, O. Essentials of biorecognition: The (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. *Immunol. Lett.* **2006**, 103, 27-32.
- [131] Fukushima, H.; Morgan, H.; Taylor, D. M. Self-Assembly of Avidin and Streptavidin with Multifunctional Biotin Molecules. *Thin Solid Films* **1994**, 244, 789-793.
- [132] Robinson, W. H. Antigen arrays for antibody profiling. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 67-72.

- [133] Davies, D. R.; Padlan, E. A.; Sheriff, S. Antibody-Antigen Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 439-473.
- [134] Rajagopal, K.; Schneider, J. P. Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 480-486.
- [135] Potekhin, S. A.; Melnik, T. N.; Popov, V.; Lanina, N. F.; Vazina, A. A.; Rigler, P.; Verdini, A. S.; Corradin, G.; Kajava, A. V. De novo design of fibrils made of short alpha-helical coiled coil peptides. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1025-1032.
- [136] Pandya, M. J.; Spooner, G. M.; Sunde, M.; Thorpe, J. R.; Rodger, A.; Woolfson, D. N. Sticky-end assembly of a designed peptide fiber provides insight into protein fibrillogenesis. *Biochemistry* **2000**, *39*, 8728-8734.
- [137] Sofia, S.; McCarthy, M. B.; Gronowicz, G.; Kaplan, D. L. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *54*, 139-148.
- [138] Altman, G. H.; Diaz, F.; Jakuba, C.; Calabro, T.; Horan, R. L.; Chen, J. S.; Lu, H.; Richmond, J.; Kaplan, D. L. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* **2003**, *24*, 401-416.
- [139] Petka, W. A.; Harden, J. L.; McGrath, K. P.; Wirtz, D.; Tirrell, D. A. Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins. *Science* **1998**, *281*, 389-392.
- [140] Miao, M.; Cirulis, J. T.; Lee, S.; Keeley, F. W. Structural determinants of cross-linking and hydrophobic domains for self-assembly of elastin-like polypeptides. *Biochemistry* **2005**, *44*, 14367-14375.
- [141] Yang, G. C.; Woodhouse, K. A.; Yip, C. M. Substrate-facilitated assembly of elastin-like peptides: Studies by variable-temperature in situ atomic force microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10648-10649.
- [142] Lee, T. A. T.; Cooper, A.; Apkarian, R. P.; Conticello, V. P. Thermo-reversible self-assembly of nanoparticles derived from elastin-mimetic polypeptides. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1105-1110.
- [143] Wright, E. R.; Conticello, V. P. Self-assembly of block copolymers derived from elastin-mimetic polypeptide sequences. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **2002**, *54*, 1057-1073.
- [144] Park, C.; Yoon, J.; Thomas, E. L. Enabling nanotechnology with self assembled block copolymer patterns. *Polymer* **2003**, *44*, 6725-6760.
- [145] Bates, F. S.; Fredrickson, G. H. Block copolymers - Designer soft materials. *Physics Today* **1999**, *52*, 32-38.
- [146] Li, M. Q.; Ober, C. K. Block copolymer patterns and templates. *Materials Today* **2006**, *9*, 30-39.
- [147] Kita-Tokarczyk, K.; Grumelard, J.; Haefele, T.; Meier, W. Block copolymer vesicles - using concepts from polymer chemistry to mimic biomembranes. *Polymer* **2005**, *46*, 3540-3563.
- [148] Reboto, V. Diseño, síntesis y caracterización de materiales y máquinas moleculares fotosensibles basados en polipéptidos tipo elastina. PhD. Thesis, Universidad de Valladolid, Valladolid, **2003**.
- [149] Alonso, M.; Arranz, D.; Reboto, V.; Rodríguez-Cabello, J. C. Effect of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on the inverse temperature transition of the bioelastic thermo-responsive polymer poly(VPGVG). *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, *202*, 3027-3034.
- [150] McPherson, D. T.; Xu, J.; Urry, D. W. Product purification by reversible phase transition following Escherichia coli expression of genes encoding up to 251 repeats of the elastomeric pentapeptide GVGVP. *Protein Expr. Purif.* **1996**, *7*, 51-57.

- [151] Girotti, A. Desarrollo de una plataforma biotecnológica para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina. PhD. Thesis, Universidad de Valladolid, Valladolid, **2007**.
- [152] Girotti, A.; Reguera, J.; Arias, F. J.; Alonso, M.; Testera, A. M.; Rodríguez-Cabello, J. C. Influence of the molecular weight on the inverse temperature transition of a model genetically engineered elastin-like pH-responsive polymer. *Macromolecules* **2004**, *37*, 3396-3400.
- [153] Ribeiro, A.; Reguera, J.; Arias, F. J.; J.C., R.-C. Amphiphilic Elastin-like Block Copolymers: Influence of the Molecular Architecture on the Phases States. **2008**, In preparation.
- [154] Lopez-Rubio, A.; Lagaron, J. M.; Gimenez, E.; Cava, D.; Hernandez-Munoz, P.; Yamamoto, T.; Gavara, R. Morphological alterations induced by temperature and humidity in ethylene-vinyl alcohol copolymers. *Macromolecules* **2003**, *36*, 9467-9476.
- [155] Higashi, G. S.; Chabal, Y. J.; Trucks, G. W.; Raghavachari, K. Ideal Hydrogen Termination of the Si-(111) Surface. *Appl. Phys. Lett.* **1990**, *56*, 656-658.
- [156] Rao, G. V. R.; Balamurugan, S.; Meyer, D. E.; Chilkoti, A.; Lopez, G. P. Hybrid bioinorganic smart membranes that incorporate protein-based molecular switches. *Langmuir* **2002**, *18*, 1819-1824.
- [157] Brown, M. E.; Maciejewski, M.; Vyazovkin, S.; Nomen, R.; Sempere, J.; Burnham, A.; Opfermann, J.; Strey, R.; Anderson, H. L.; Kemmler, A.; Keuleers, R.; Janssens, J.; Desseyn, H. O.; Li, C. R.; Tang, T. B.; Roduit, B.; Malek, J.; Mitsunashi, T. Computational aspects of kinetic analysis Part A: The ICTAC kinetics project-data, methods and results. *Thermochim. Acta* **2000**, *355*, 125-143.
- [158] Urry, D. W.; McPherson, D. T.; Xu, J.; Daniell, H.; Guda, C.; Gowda, D. C.; Jing, N.; Parker, T. M., Protein-Based Polymeric Materials: Syntheses and Properties. In *The Polymeric Materials Encyclopedia: Synthesis, Properties and Applications*, Salamone, J. C., Ed. CRC Press, Boca Raton: Florida, **1996**; pp 7263-7279.
- [159] Meyer, D. E.; Chilkoti, A. Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: Examples from the elastin-like polypeptide system. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 357-367.
- [160] Privalov, P. L.; Khechina, N. Thermodynamic Approach to Problem of Stabilization of Globular Protein Structure - Calorimetric Study. *Journal of Molecular Biology* **1974**, *86*, 665-684.
- [161] Abraham, M. H.; Nasehzadeh, A. Thermodynamics of Solution of Gaseous Tetramethyltin in 36 Solvents - Comparison of Experimental Results with Cavity-Theory Calculations. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I* **1981**, *77*, 321-339.
- [162] Rodríguez-Cabello, J. C.; Reguera, J.; Alonso, M.; Parker, T. M.; McPherson, D. T.; Urry, D. W. Endothermic and exothermic components of an inverse temperature transition for hydrophobic association by TMDSC. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *388*, 127-131.
- [163] VanDurme, K.; Rahier, H.; VanMele, B. Influence of Additives on the Thermoresponsive Behavior of Polymers in Aqueous Solution. *Macromolecules* **2005**, *38*, 10155-10163.
- [164] Yamaoka, T.; Tamura, T.; Seto, Y.; Tada, T.; Kunugi, S.; Tirrell, D. A. Mechanism for the phase transition of a genetically engineered elastin model peptide (VPGIG)(40) in aqueous solution. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1680-1685.

- [165] Luan, C. H.; Parker, T. M.; Prasad, K. U.; Urry, D. W. Differential Scanning Calorimetry Studies of NaCl Effect on the Inverse Temperature Transition of Some Elastin-Based Polytetrapeptides, Polypentapeptides, and Polynona-peptides. *Biopolymers* **1991**, 31, 465-475.
- [166] Meyer, D. E.; Chilkoti, A. Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 846-851.
- [167] Chang, D. K.; Venkatachalam, C. M.; Prasad, K. U.; Urry, D. W. Nuclear Overhauser Effect and Computational Characterization of the Beta-Spiral of the Polypentapeptide of Elastin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, 6, 851-858.
- [168] Urry, D. W.; Long, M. M.; Ohnishi, T.; Jacobs, M. Circular dichroism and absorption of the polytetrapeptide of elastin: A polymer model for the β -turn. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, 61, 1427-1433.
- [169] Reguera, J.; Fahmi, A.; Moriarty, P.; Girotti, A.; Rodríguez-Cabello, J. C. Nanopore formation by self-assembly of the model genetically engineered elastin-like polymer [(VPGVG)(2)(VPGEG)(VPGVG)(2)](15). *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13212-13213.
- [170] Zhang, S. G. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1171-1178.
- [171] Bershtein, V. A.; Egorov, V. M., *Differential scanning calorimetry of polymers : physics, chemistry, analysis, technology*. Ellis Horwood: **1994**;
- [172] Urry, D. W.; Peng, S. Q.; Parker, T. M. Hydrophobicity-Induced pK Shifts in Elastin Protein-Based Polymers. *Biopolymers* **1992**, 32, 373-379.
- [173] Urry, D. W.; Gowda, D. C.; Peng, S. Q.; Parker, T. M.; Jing, N. J.; Harris, R. D. Nanometric Design of Extraordinary Hydrophobic-Induced pKa Shifts for Aspartic-Acid - Relevance to Protein Mechanisms. *Biopolymers* **1994**, 34, 889-896.
- [174] Mehler, E. L.; Fuxreiter, M.; I, S.; Garcia-Moreno E, B. The role of hydrophobic microenvironments in modulating pKa shifts in proteins. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2002**, 48, 283-292.
- [175] San Biagio, P. L.; Madonia, F.; Trapane, T. L.; Urry, D. W. The Overlap of Elastomeric Polypeptide Coils in Solution Required for Single-Phase Initiation of Elastogenesis. *Chem. Phys. Lett.* **1988**, 145, 571-574.
- [176] Meyer, D. E.; Kong, G. A.; Dewhirst, M. W.; Zalutsky, M. R.; Chilkoti, A. Targeting a genetically engineered elastin-like polypeptide to solid tumors by local hyperthermia. *Cancer Res.* **2001**, 61, 1548-54.
- [177] Trabbic-Carlson, K.; Meyer, D. E.; Liu, L.; Piervincenzi, R.; Nath, N.; LaBean, T.; Chilkoti, A. Effect of protein fusion on the transition temperature of an environmentally responsive elastin-like polypeptide: a role for surface hydrophobicity? *Protein Engineering Design & Selection* **2004**, 17, 57-66.

7 Anexos

Anexo1: Lista de abreviaturas y acrónimos.

Abreviaturas usadas en texto:

Abreviatura	Nombre completo
CD	Dicroísmo Circular
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
ELP	Polímeros tipo elastina
HR-US	Espectroscopia de ultrasonidos de alta resolución
ITT	Transición inversa con la temperatura
LCST	Temperatura de disolución crítica inferior (Lower Critical Solution Temperatura)
MD	Dinámica molecular
MDR	Relajación Dieléctrica de Microondas
MW	Peso molecular
PNIPAM	poli[N-isopropil-acrilamida]
PVME	poli(vinil metil eter)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SAXS	Difracción de rayos X a ángulos bajos
SNP	Solvatación no polar
TMDSC	DSC con modulación en temperatura
WAXS	Difracción de rayos X a ángulos altos

Abreviatura de aminoácidos naturales:

Nombre completo	Código de 3 letras	Código de 1 letras
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteina	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K

Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V

Anexo 2: Código del programa de cinéticas

Formulario Principal

Option Explicit

```
Private Sub Cmdcalcular_Click()
```

```
'=====
'===== Declaraciones      ||
'=====
```

```
Const NMaximoCurvas As Integer = 20
```

```
Dim Nmult As Integer
```

```
Dim dtiemp(i) As Double 'Tiempo inicial
```

```
Dim dtiempf() As Double 'Tiempo final
```

```
Dim dQi() As Double 'Flujos iniciales
```

```
Dim dQf() As Double 'Flujos finales
```

```
Dim dTi(NMaximoCurvas) As Double 'Temperatura inicial
```

```

Dim dTf(NMaximoCurvas) As Double      'Temperatura final
Dim dH(NMaximoCurvas) As Double      'Calor total dividido por
el n° de interacciones

Dim dbT(NMaximoCurvas) As Double      'Pendientes de las rectas
"Y = daT + dbT·X"; T = daT + dbT·tiemp
Dim daT(NMaximoCurvas) As Double      'Ordenadas en el origen
Dim iNdatos(NMaximoCurvas) As Integer 'Número de registros en
cada tabla de datos

Dim Tinic() As Double      'variable iniciales
Dim Hinic() As Double      'variable iniciales
Dim tiempinic() As Double  'variable iniciales

Dim Tampli() As Double     'variable ampliada
Dim Hampli() As Double     'variable ampliada
Dim Tiempampli() As Double 'variable ampliada
Dim Aampli() As Double     'variable de areas parciales

Dim Aporcent() As Double   'variable de areas parciales
Dim Tporcent() As Double   'variable de areas parciales
Dim Hporcent() As Double   'variable de areas parciales
Dim porc() As Double       'variable de porcentajes
Dim i, j, k, l As Integer   'Contadores
Dim temptxt As String      'Cadena para abrir tablas
Dim DQ1, DQ2, dtiemp1, dtiemp2, Atot, T1, Q1, T2, Q2 As Double
'variables provisionales
Dim x, y, x1, x2, x3, y1, y2, y3 As Double 'variables
provisionales
Dim max As Integer
max = 0
Nmult = TxtMultiplicador.Text
ReDim dtiemp1(NMaximoCurvas, 1 To TxtPLBase.Text)      'Tiempo
inicial
ReDim dtiempf(NMaximoCurvas, 1 To TxtPLBase.Text)      'Tiempo final
ReDim dQi(NMaximoCurvas, 1 To TxtPLBase.Text)          'Flujos
iniciales
ReDim dQf(NMaximoCurvas, 1 To TxtPLBase.Text)          'Flujos
finales

```

```

'-----Borramos las tablas
anteriores-----
    StBar1.SimpleText = "Estado de cálculo: Borrando buffer"
    StBar1.Refresh
    Call borrar

'-----
-----
'***** Hallar las rectas para integrar
*****
'-----
-----

    StBar1.SimpleText = "Estado de cálculo: Hallando rectas de
integración"

'Ptos iniciales y finales que usamos más tarde para las rectas
base

For i = 1 To CboN.Text
    temptxt = "SELECT * FROM datos" & i & " ORDER BY tmp"
    If Not (Den1.rsCommD.Supports(adFind)) Then
        Den1.rsCommD.Open temptxt
    Else
        Den1.rsCommD.Close
        Den1.rsCommD.Open temptxt
    End If
    Den1.rsCommD.MoveFirst
    dtiemp(i, 1) = Den1.rsCommD.Fields("tmp").Value
    dQi(i, 1) = Den1.rsCommD.Fields("Q").Value
    dTi(i) = Den1.rsCommD.Fields("T").Value
    For j = 2 To TxtPLBase.Text
        Den1.rsCommD.MoveNext
        dtiemp(i, j) = Den1.rsCommD.Fields("tmp").Value
        dQi(i, j) = Den1.rsCommD.Fields("Q").Value
    Next
    Den1.rsCommD.MoveLast
    dtiempf(i, 1) = Den1.rsCommD.Fields("tmp").Value

```

```

    dQf(i, 1) = Den1.rsCommD.Fields("Q").Value
    dTf(i) = Den1.rsCommD.Fields("T").Value
For j = 2 To TxtPLBase.Text
    Den1.rsCommD.MovePrevious
    dtiempf(i, j) = Den1.rsCommD.Fields("tmp").Value
    dQf(i, j) = Den1.rsCommD.Fields("Q").Value
Next

iNdatos(i) = Den1.rsCommD.RecordCount
If iNdatos(i) > max Then
    max = iNdatos(i)
End If
Den1.rsCommD.Close
Next

'Creamos las matrices donde se almacenan los datos:
Redimensionamos

    ReDim Tinic(1 To CboN.Text, 1 To max)
'Tparc(Nº de curvas, n elementos)
    ReDim Hinic(1 To CboN.Text, 1 To max)
'Hparc(Nº de curvas, n elementos)
    ReDim tiempnic(1 To CboN.Text, 1 To max)
'tiempparc(Nº de curvas, n elementos)

    ReDim Aporcent(1 To CboN.Text, 1 To TxtNpuntos.Text)
'Aporcent(Nº de curvas, n interac)
    ReDim Tporcent(1 To CboN.Text, 1 To TxtNpuntos.Text)
'Tporcent(Nº de curvas, n interac)
    ReDim Hporcent(1 To CboN.Text, 1 To TxtNpuntos.Text)
'Hporcent(Nº de curvas, n interac)
    ReDim porc(1 To TxtNpuntos.Text)
'porc (interacciones)

'Constantes de las rectas:  $Y = da + db*X$  ;  $Y = daT + dbT*X$ 

    Call RegreI(dQi(), dQf(), dtiemp(), dtiempf())
For i = 1 To CboN.Text

```



```

    ' db(i) = (dQf(i, 1) - dQi(i, 1)) / (dtiempf(i, 1) - dtiemp(i,
1))
    ' da(i) = (dQi(i, 1) * dtiempf(i, 1) - dQf(i, 1) * dtiemp(i,
1)) / (dtiempf(i, 1) - dtiemp(i, 1))

    dbT(i) = (dTf(i) - dTi(i)) / (dtiempf(i, 1) - dtiemp(i, 1))
    daT(i) = (dTi(i) * dtiempf(i, 1) - dTf(i) * dtiemp(i, 1)) /
(dtiempf(i, 1) - dtiemp(i, 1))
    ' MsgBox "a" & i & "=" & da(i) & "b" & i & "=" & db(i)
Next

```

```

    '*****                                Cargando                                datos
*****
    StBar1.SimpleText = "Estado de cálculo: Cargando datos"
    StBar1.Refresh

    For i = 1 To CboN.Text
    'Abrir la tabla de datos
        temptxt = "SELECT * FROM datos" & i & " ORDER BY tmp"
        If Not (Den1.rsCommD.Supports(adFind)) Then
            Den1.rsCommD.Open temptxt
        Else
            Den1.rsCommD.Close
            Den1.rsCommD.Open temptxt
        End If
        Den1.rsCommD.MoveFirst
        tiempnic(i, 1) = Den1.rsCommD.Fields("tmp").Value
        Tinic(i, 1) = Den1.rsCommD.Fields("T").Value
        Hinic(i, 1) = Den1.rsCommD.Fields("Q").Value
        For j = 2 To iNdatos(i)
            Den1.rsCommD.MoveNext
            tiempnic(i, j) = Den1.rsCommD.Fields("tmp").Value
            Tinic(i, j) = Den1.rsCommD.Fields("T").Value
            Hinic(i, j) = Den1.rsCommD.Fields("Q").Value
        Next
    Next
Next

```



```

        Hampli(i, l + k) = (Hinic(i, j + 1) - Hinic(i,
j)) / Nmult * k + Hinic(i, j)
    Next
Next
iNdatos(i) = iNdatos(i) * Nmult - Nmult + 1
Else
    For j = 1 To iNdatos(i)
        Tiempampli(i, j) = tiempinic(i, j)
        Tampli(i, j) = Tinic(i, j)
        Hampli(i, j) = Hinic(i, j)
    Next
End If
Next
ElseIf Optbcuad.Value = True Then
    For i = 1 To CboN.Text
        If LstAumentarPuntos.Selected(i - 1) = True Then
            For j = 1 To iNdatos(i)
                l = (j - 1) * Nmult + 1
                Tiempampli(i, l) = tiempinic(i, j)
                Tampli(i, l) = Tinic(i, j)
                Hampli(i, l) = Hinic(i, j)
            Next
            For j = 1 To iNdatos(i) - 2
                For k = 1 To Nmult - 1
                    l = (j - 1) * Nmult + 1
                    x1 = tiempinic(i, j)
                    x2 = tiempinic(i, j + 1)
                    x3 = tiempinic(i, j + 2)
                    y1 = Hinic(i, j)
                    y2 = Hinic(i, j + 1)
                    y3 = Hinic(i, j + 2)
                    x = (tiempinic(i, j + 1) - tiempinic(i, j)) /
Nmult * k + tiempinic(i, j)
                    y = ((x1 * x3 * y2 * (x3 - x1) + x2 ^ 2 * (x3
* y1 - x1 * y3) + x2 * (x1 ^ 2 * y3 - x3 ^ 2 * y1)) + (x3 ^ 2 * (y1 -
y2) + x1 ^ 2 * (y2 - y3) + x2 ^ 2 * (y3 - y1)) * x + (x3 * (y2 - y1) +
x2 * (y1 - y3) + x1 * (y3 - y2)) * x ^ 2) / ((x1 - x2) * (x1 - x3) *
(x2 - x3)) 'formula para interpolación cuadrática con tres puntos
                    Tiempampli(i, l + k) = x

```

```

        Tampli(i, l + k) = daT(i) + dbT(i) * x
        Hampli(i, l + k) = y
    Next
Next
For k = 1 To Nmult - 1
    j = iNdatos(i) - 1
    l = (j - 1) * Nmult + 1
    x = (tiempinic(i, j + 1) - tiempinic(i, j)) /
Nmult * k + tiempinic(i, j)
    y = ((x1 * x3 * y2 * (x3 - x1) + x2 ^ 2 * (x3 * y1
- x1 * y3) + x2 * (x1 ^ 2 * y3 - x3 ^ 2 * y1)) + (x3 ^ 2 * (y1 - y2) +
x1 ^ 2 * (y2 - y3) + x2 ^ 2 * (y3 - y1)) * x + (x3 * (y2 - y1) + x2 *
(y1 - y3) + x1 * (y3 - y2)) * x ^ 2) / ((x1 - x2) * (x1 - x3) * (x2 -
x3)) 'formula para interpolación cuadrática con tres puntos
    Tiempamplic(i, l + k) = x
    Tampli(i, l + k) = daT(i) + dbT(i) * x
    Hampli(i, l + k) = y
Next
iNdatos(i) = iNdatos(i) * Nmult - Nmult + 1
Else
    For j = 1 To iNdatos(i)
        Tiempamplic(i, j) = tiempinic(i, j)
        Tampli(i, j) = Tinic(i, j)
        Hampli(i, j) = Hinic(i, j)
    Next
End If
Next
End If
'***** Hallar las áreas parciales *****

StBar1.SimpleText = "Estado de cálculo: Hallando porcentajes de
cristalización"
StBar1.Refresh
CboH.Clear

For i = 1 To CboN.Text

    dtiemp1 = Tiempamplic(i, 1)
    DQ1 = Hampli(i, 1)

```

```

        Atot = 0
        For j = 1 To iNdatos(i)      'dtiemp1 es el tiempo del dato
anterior y dtiemp2 es el del registro actual
            dtiemp2 = Tiempampli(i, j)
            DQ2 = Hampli(i, j)
            Atot = Atot + (dtiemp2 - dtiemp1) * ((DQ2 - (da(i) + db(i)
* dtiemp2)) + (DQ1 - (da(i) + db(i) * dtiemp1))) / 2
            Hampli(i, j) = Hampli(i, j) - (da(i) + db(i) * dtiemp2)
            Aampli(i, j) = Atot
            dtiemp1 = dtiemp2
            DQ1 = DQ2
        Next
        dH(i) = Atot
        CboH.AddItem "H" & i & " = " & dH(i)
    Next

    '***** CÁLCULOS *****(de valores para cada punto del
resultado)*****

    StBar1.SimpleText = "Estado de cálculo: Hallando datos para cada
porción de área"
    StBar1.Refresh

    'porcentajes de la variable porc

    For j = 1 To TxtNpuntos.Text
        porc(j) = j * (1 / TxtNpuntos.Text)
    Next

    'Bucle para cada curva
    For i = 1 To CboN.Text 'Bucle para cada curva i
        For j = 1 To TxtNpuntos.Text 'Bucle para cada interacción
j
            x1 = 0
            T1 = Tampli(i, 1)
            Q1 = Hampli(i, 1)

```

```

                x = porc(j) * dH(i)                                'porcentaje
de area
                For k = 1 To (iNdatos(i) - 1)                    'Me muevo
por la tabla de areas hasta encontrar el valor adecuado
                    x2 = Aampli(i, k)
                    T2 = Tampli(i, k)
                    Q2 = Hampli(i, k)
                    If Abs(x) >= Abs(x1) And Abs(x) <= Abs(x2) Then

                        Tporcent(i, j) = ((T1 * x2 - T2 * x1) + (T2 -
T1) * x) / (x2 - x1)
                        Hporcent(i, j) = ((Q1 * x2 - Q2 * x1) + (Q2 -
Q1) * x) / (x2 - x1)
                        Aporcent(i, j) = x
                        Exit For
                    End If
                    x1 = x2
                    T1 = T2
                    Q1 = Q2
                Next
            Next
            FrmCinet.Refresh
        Next

        'Llamamos a la función que hace las regresiones lineales
        StBar1.SimpleText = "Estado de cálculo: Rectas de regresión para
hallar Ea"
        StBar1.Refresh

        Call Regre(dH(), Tporcent(), Hporcent(), porc())

        StBar1.SimpleText = "Estado de cálculo: Cálculos terminados"
        StBar1.Refresh
        CboH.Visible = True
        LblH.Visible = True
        CmdResult.Enabled = True

```

```
Beep
MsgBox "Proceso terminado", vbInformation

End Sub

Private Sub CmdChangeDB_Click()
CmdNewDB.Enabled = True
TxtDBorigen.Enabled = True
End Sub

Private Sub Cmdexit_Click()
End
End Sub

Private Sub CmdImport_Click()
FrmImportDB.Show vbModal
If ((FrmImportDB.itabla - 1) > 3) And ((FrmImportDB.itabla - 1) <
21) Then
    CboN.Text = FrmImportDB.itabla - 1
End If

End Sub

Private Sub CmdNewDB_Click()
Den1.conn1.ConnectionString = "Provider =
Microsoft.Jet.OLEDB.4.0;Data Source= " & TxtDBorigen.Text & ";User
ID=;Mode=ReadWrite;Persist Security Info=False"
CmdNewDB.Enabled = False
TxtDBorigen.Enabled = False
End Sub

Private Sub CmdResult_Click()
frmResult.Show
End Sub

Private Sub Form_DblClick()
MsgBox ". Programa: BioKinetic 1.0" & vbCr & ". Programador:
Javier Reguera" & vbCr & ". Grupo de Biomateriales y Biomimetismo",
vbInformation, "Información:"
```

```
End Sub
```

```
Private Sub Form_Load()
```

```
    CboN.Text = 3
```

```
    TxtDBorigen.Text = App.Path & "\kinetic.mdb"
```

```
    Den1.conn1.ConnectionString = "Provider =  
Microsoft.Jet.OLEDB.4.0;Data Source= " & TxtDBorigen.Text & " ;User  
ID= ;Mode=ReadWrite;Persist Security Info=False"
```

```
End Sub
```

```
Private Sub mnuAyuda_Click()
```

```
    Frmayuda.Show vbModal
```

```
End Sub
```

```
Private Sub mnuborrar_Click()
```

```
    StBar1.SimpleText = "Estado de cálculo: Borrando"
```

```
    StBar1.Refresh
```

```
    Call borrar
```

```
    StBar1.SimpleText = "Estado de cálculo: Listo"
```

```
    StBar1.Refresh
```

```
    MsgBox "datos borrados", vbInformation
```

```
End Sub
```

```
Private Sub mnucalcular_Click()
```

```
    Call Cmdcalcular_Click
```

```
End Sub
```

```
Private Sub mnuImportarDatos_Click()
```

```
    Call CmdImport_Click
```

```
End Sub
```

```
Private Sub mnuinfosistema_Click()
```

```
    Call Form_DblClick
```

```
End Sub
```

```
Private Sub mnusalir_Click()
```

```
End
```

```
End Sub
```



```
Private Sub ChkAmpliar_Click()  
Dim i As Byte  
If ChkAmpliar.Value = vbChecked Then  
    LstAumentarPuntos.Enabled = True  
    TxtMultiplicador.Enabled = True  
    Label1.Enabled = True  
    Label3.Enabled = True  
    Label5.Enabled = True  
    Optblin.Enabled = True  
    Optbcuad.Enabled = True  
  
    Else  
        LstAumentarPuntos.Enabled = False  
        TxtMultiplicador.Enabled = False  
        Label1.Enabled = False  
        Label3.Enabled = False  
        Label5.Enabled = False  
        Optblin.Value = True  
        Optblin.Enabled = False  
        Optbcuad.Enabled = False  
        For i = 0 To (LstAumentarPuntos.ListCount - 1)  
            LstAumentarPuntos.Selected(i) = False  
        Next  
    End If  
End Sub  
  
Private Sub TxtNpuntos_GotFocus()  
TxtNpuntos.SelStart = 0  
TxtNpuntos.SelLength = TxtNpuntos.MaxLength  
End Sub  
  
Private Sub TxtPLBase_GotFocus()  
TxtPLBase.SelStart = 0  
TxtPLBase.SelLength = TxtPLBase.MaxLength  
End Sub  
  
Private Sub TxtMultiplicador_GotFocus()  
TxtMultiplicador.SelStart = 0
```

```

TxtMultiplicador.SelLength = TxtMultiplicador.MaxLength
End Sub

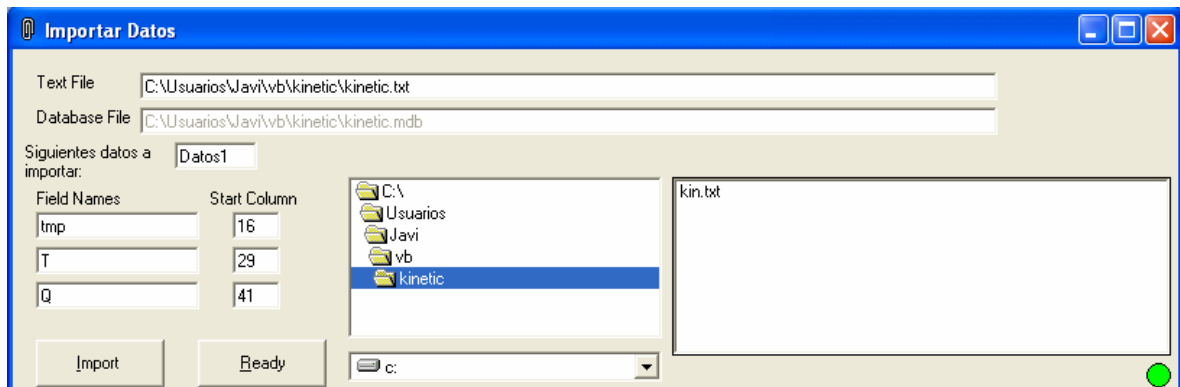
Private Sub Txtinter_KeyPress(KeyAscii As Integer)
Call letras(KeyAscii)
End Sub

Private Sub TxtMultiplicador_KeyPress(KeyAscii As Integer)
Call letras(KeyAscii)
End Sub

Private Sub TxtPLBase_KeyPress(KeyAscii As Integer)
Call letras(KeyAscii)
End Sub

```

Formulario Importar datos



```

Option Explicit
Public itabla As Integer

Private Sub CmdEnd_Click()
Unload Me
End Sub

Private Sub CmdImport_Click()
semaforo.BackColor = &HFF&
FrmImportDB.Refresh

```

```
'Dim wks As d
'Dim db As d
Dim conn1 As ADODB.Connection
Dim fnum As Integer
Dim text_line As String
Dim sql_statement As String
Dim field_names() As String
Dim field_start() As Integer
Dim max_field As Integer
Dim i As Integer
Dim field_value As String
Dim temptxt As String
Dim pos1 As Integer
Dim pos2 As Integer
Dim line_length As Integer

'-----Borrar Datos-----
On Error GoTo borrar
temptxt = "SELECT * FROM " & txtTable.Text
    If Not (Den1.rsCommD.Supports(adFind)) Then
        Den1.rsCommD.Open temptxt
    Else
        Den1.rsCommD.Close
        Den1.rsCommD.Open temptxt
    End If
If Den1.rsCommD.BOF = False Then
    Den1.rsCommD.MoveFirst
End If
For i = 1 To Den1.rsCommD.RecordCount
    Do While Den1.rsCommD.EOF = False
        Den1.rsCommD.Delete
        Den1.rsCommD.MoveNext
    Loop
Next

' Get the field information.
ReDim Preserve field_names(0 To txtField.UBound)
ReDim Preserve field_start(0 To txtField.UBound + 1)
```

```

For i = 0 To txtField.UBound
    field_names(i) = Trim$(txtField(i).Text)
    If Len(field_names(i)) = 0 Then Exit For
    field_start(i) = CInt(txtStart(i).Text)
Next i
max_field = i - 1
field_start(i) = 10000

' Open the text file.
fnum = FreeFile
On Error GoTo NoTextFile
Open txtTextFile.Text For Input As fnum

' Open the database.
On Error GoTo NoDatabase
Set conn1 = New ADODB.Connection
conn1.ConnectionString = "Provider =
Microsoft.Jet.OLEDB.4.0;Data Source=" & txtDatabaseFile.Text &
";Mode=ReadWrite;Persist Security Info=False"
conn1.Open

On Error GoTo 0

' Read the file and create records.
Do While Not EOF(fnum)
    ' Read a text line.
    Line Input #fnum, text_line
    'text_line = Trim$(text_line)
    line_length = Len(text_line)
    If Len(text_line) > 0 Then
        ' Build the field list.
        sql_statement = "INSERT INTO " & _
            txtTable.Text & " ("
        For i = 0 To max_field
            sql_statement = sql_statement & _
                field_names(i)
            If i < max_field Then _
                sql_statement = _
                    sql_statement & ", "

```

```

Next i
sql_statement = sql_statement & _
    ") VALUES ("

' Add the field values.
For i = 0 To max_field
    pos1 = field_start(i)
    If pos1 > line_length Then
        field_value = ""
    Else
        pos2 = field_start(i + 1) - 1
        If pos2 > line_length Then _
            pos2 = line_length
        field_value = Mid$(text_line, pos1, pos2 -
pos1 + 1)

    End If
    sql_statement = sql_statement & _
        """" & field_value & """"
    If i < max_field Then _
        sql_statement = _
            sql_statement & ", "
Next i
sql_statement = sql_statement & ")"

' Insert the record.
On Error GoTo SQLError
conn1.Execute sql_statement

On Error GoTo 0
End If
Loop

' Close the file and database.
Close fnum
conn1.Close
semaforo.BackColor = &HFF00&
' MsgBox "Ok"
itabla = itabla + 1
txtTable.Text = "Datos" & itabla

```

```
Exit Sub

'gestion de errores

NoTextFile:
'   MsgBox "Error opening text file."
'   semaforo.BackColor = &HFF00&
'   Exit Sub

NoDatabase:
'   MsgBox "Error opening database."
'   Close fnum
'   semaforo.BackColor = &HFF00&
'   Exit Sub

SQLException:
'   MsgBox "Error executing SQL statement '" & _
'       sql_statement & "'"
'   Close fnum
'   conn1.Close
'   semaforo.BackColor = &HFF00&
'   Exit Sub

borrar:
    MsgBox "Error en la importación de datos. Posibles errores:" &
vbCr _
    & "1. Se ha olvidado de borrar la cabecera de los archivos de
texto" & vbCr _
    & "2. Posible seaturación en la base de datos: borre los
registros de kinetic.mdb" & vbCr _
    & "3. Ha intentado introducir más de diez columnas" & vbCr _
    & "4. Error al colocar las posibles columnas"
    semaforo.BackColor = &HFF00&

End Sub

Private Sub Dir1_Change()
File1.Path = Dir1.Path
```

```
End Sub
```

```
Private Sub Drive1_Change()  
On Error GoTo error  
Dir1.Path = Drive1.Drive  
Exit Sub  
error:  
MsgBox "Error al leer esta unidad"  
End Sub
```

```
Private Sub File1_Click()  
txtTextFile.Text = File1.Path & "\" & File1.FileName  
End Sub
```

```
Private Sub File1_DblClick()  
Call CmdImport_Click  
End Sub
```

```
Private Sub Form_Load()  
    ' Enter default file and database names.  
    txtTextFile.Text = App.Path & "\kinetic.txt"  
    txtDatabaseFile.Text = FrmCinet.TxtDBorigen.Text  
    itabla = 1  
End Sub
```

Formulario Resultados

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	prc	Ea	PreExp	T1	T2	T3	T4	T5	T6
2	0.5	19.63887262	0.816962883	39.14000116	39.14000116	39.14000116			
3	0.75	-9.47022689	-10.15957008	38.64058859	38.64058859	38.64058859			
4	1	3.18445733	-5.098706687	38.22995992	38.22995992	38.22995992			
5	1.25	3.13457027	-4.970878701	37.88494884	37.88494884	37.88494884			
6	1.5	-4.17388402	-7.695045776	37.57967022	37.57967022	37.57967022			
7	2.25	3.45052165	-4.476081207	36.81868984	36.81868984	36.81868984			
8	2.5	10.01898455	-1.860463248	36.60094943	36.60094943	36.60094943			
9	2.75	-5.72869739	-7.920308823	36.39857978	36.39857978	36.39857978			
10	3	0.20786275	-5.559811488	36.20669349	36.20669349	36.20669349			
11	3.25	6.43543074	-3.088655583	36.02256964	36.02256964	36.02256964			
12	3.5	1.07257179	-5.13468749	35.84702599	35.84702599	35.84702599			
13	3.75	17.8761965	1.449032775	35.67972021	35.67972021	35.67972021			
14	4	15.50656115	0.567753747	35.51640374	35.51640374	35.51640374			
15	4.5	14.01826386	0.067482735	35.21106869	35.21106869	35.21106869			
16	4.75	-4.86398835	-7.262583836	35.06597169	35.06597169	35.06597169			
17	5.25	-0.444826285	-5.473972923	34.79009594	34.79009594	34.79009594			
18	5.5	-6.90935781	-7.966025616	34.65967371	34.65967371	34.65967371			
19	6	12.03941048	-0.491769114	34.40978738	34.40978738	34.40978738			
20	6.25	2.623227905	-4.144126739	34.29100554	34.29100554	34.29100554			

prc = grado de conversión
Ea = Energía de Activación
PreExp = ln(fA(a))
T1,T2... = Curvas de conversión VS T para las velocidades introducidas

```
Private Sub Form_Load()
```

```
Spsheet.Height = frmResult.Height - 1600
```

```
Spsheet.Width = frmResult.Width - 200
```

```
Lblinf.Top = frmResult.Height - 1300
```

```
Lblinf.Caption = "prc = grado de conversión" & vbCrLf _
```

```
& "Ea = Energía de Activación" & vbCrLf _
```

```
& "PreExp = ln(fA(a))" & vbCrLf _
```

```
& "T1,T2... = Curvas de conversión VS T para las
```

```
velocidades introducidas"
```

```
End Sub
```

```
Private Sub Form_Resize()
```

```
If frmResult.Height > 1600 Then
```

```
    Spsheet.Height = frmResult.Height - 1600
```

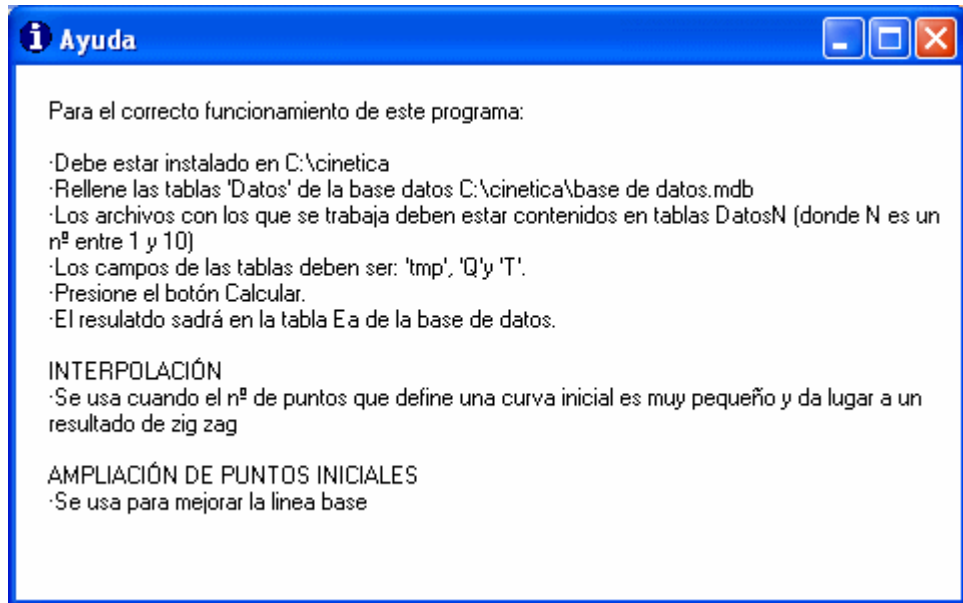
```
    Spsheet.Width = frmResult.Width - 200
```

```
    Lblinf.Top = frmResult.Height - 1300
```

```
End If
```

```
End Sub
```


Formulario Ayuda



```

Private Sub Form_Load()
    LblAyuda.Caption = "Para el correcto funcionamiento de este
programa:" & vbCrLf & vbCrLf _
    & ".Debe estar instalado en C:\cinetica" & vbCrLf _
    & ".Rellene las tablas 'Datos' de la base datos C:\cinetica\base
de datos.mdb" & vbCrLf _
    & ".Los archivos con los que se trabaja deben estar contenidos en
tablas DatosN (donde N es un nº entre 1 y 10)" & vbCrLf _
    & ".Los campos de las tablas deben ser: 'tmp', 'Q' y 'T'." & vbCrLf _
    & ".Presione el botón Calcular." & vbCrLf _
    & ".El resultado sairá en la tabla Ea de la base de datos." & vbCrLf
_
    & vbCrLf _
    & " INTERPOLACIÓN" & vbCrLf _
    & ".Se usa cuando el nº de puntos que define una curva inicial es
muy pequeño y da lugar a un resultado de zig zag" & vbCrLf _
    & vbCrLf _
    & " AMPLIACIÓN DE PUNTOS INICIALES" & vbCrLf _
    & ".Se usa para mejorar la linea base" & vbCrLf

End Sub

```

Módulo Borrar

```

Option Explicit
Public Sub borrar()

Dim temptxt As String
Dim i As Integer

'-----Borrar Ea-----
If Not (Den1.rsCommEa.Supports(adAddNew)) Then
    Den1.rsCommEa.Open
Else
    Den1.rsCommEa.Close
    Den1.rsCommEa.Open
End If
If Den1.rsCommEa.BOF = False Then
    Den1.rsCommEa.MoveFirst
End If
For i = 1 To Den1.rsCommEa.RecordCount
    Do While Den1.rsCommEa.EOF = False
        Den1.rsCommEa.Delete
        Den1.rsCommEa.MoveNext
    Loop
Next
End Sub

```

Módulo números

```

Option Explicit
Public Sub letras(KeyAscii As Integer)
If (KeyAscii < 48 Or KeyAscii > 57) And KeyAscii <> 8 Then
    KeyAscii = 0
End If
End Sub

```

Módulo Regresión

```

Option Explicit

```

```
Public Sub Regre(dH() As Double, Tporcent() As Double, Hporcent()
As Double, porc() As Double)

'Declaraciones
Const R = 8.31451 'J/mol·K
Dim i, j As Integer
Dim nCurvas As Integer      'Número de curvas (o pares x,y para la
regresión)
Dim SumX As Double
Dim SumY As Double
Dim SumX2 As Double
Dim SumY2 As Double
Dim SumXY As Double
Dim Ea As Double
Dim H, T As Double
Dim txttmp As String
Dim a, b, coefcorrelacion As Double      ' hallamos la ecuación de
regresión : y =a +b*x (y=H,x=T)
Dim bfallo As Boolean
bfallo = False

'La expresión que queremos es  $\ln(-1/w_0 * dw/dt) = \ln A + \ln(f(w/w_0)) -$ 
Ea/RT

'Abro la tabla de energías
If Not (Den1.rsCommEa.Supports(adAddNew)) Then
    Den1.rsCommEa.Open
Else
    Den1.rsCommEa.Close
    Den1.rsCommEa.Open
End If

nCurvas = FrmCinet.CboN.Text          'n: numero de curvas

For j = 1 To (FrmCinet.TxtNpuntos.Text) 'me muevo por cada
interacción
    SumX = 0
    SumY = 0
```

```

SumX2 = 0
SumY2 = 0
SumXY = 0
bfallo = False
For i = 1 To nCurvas
  H = Hporcent(i, j)
  T = Tporcent(i, j) + 273.15
  If (H / dH(i)) > 0 Then
    SumX = SumX + 1 / T
    SumY = SumY + Log(H / dH(i))
    SumY2 = SumY2 + (Log(H / dH(i))) ^ 2
    SumX2 = SumX2 + (1 / T) ^ 2
    SumXY = SumXY + (1 / T) * Log(H / dH(i))
  Else
    bfallo = True
  End If
Next

If ((nCurvas * SumX2 - (SumX) ^ 2) <> 0) And (bfallo = False)
Then
  b = (nCurvas * SumXY - SumX * SumY) / (nCurvas * SumX2 -
(SumX) ^ 2)
  a = SumY / nCurvas - b * SumX / nCurvas
  If (porc(j) <= 0.999 And porc(j) >= 0.001) Then
    Den1.rsCommEa.AddNew
    For i = 1 To nCurvas
      txttmp = "T" & i
      Den1.rsCommEa.Fields(txttmp).Value = b /
(Log(Hporcent(i, j) / dH(i)) - a) - 273.15
    Next
    For i = 1 To nCurvas
      txttmp = "T" & i
      Den1.rsCommEa.Fields(txttmp).Value = Tporcent(i,
j) 'conversión experimental
    Next
    ' Guardamos los datos en la tabla de salida
    Ea = (-1 * b * R)
    Den1.rsCommEa.Fields("prc").Value = porc(j) * 100
  'alpha (in %)

```

```

                Den1.rsCommEa.Fields("Ea").Value = Ea / 1000
'Ea (KJ/mol)
                Den1.rsCommEa.Fields("preEx").Value = a
                Den1.rsCommEa.Update
            End If
        End If
    Next

End Sub

```

Módulo Regresión 2

```

Option Explicit
Public db(20) As Double           'Pendientes de las rectas "Y = da
+ db·X"
Public da(20) As Double           'Ordenadas en el origen

Public Sub RegreI(dQi() As Double, dQf() As Double, dtiempI() As
Double, dtiempf() As Double)

'Declaraciones
Dim i, j As Integer
Dim nPuntos, nCurvas As Integer   'Número de pares x,y para la
regresión
Dim SumX As Double
Dim SumY As Double
Dim SumX2 As Double
Dim SumY2 As Double
Dim SumXY As Double

nPuntos = FrmCinet.TxtPLBase.Text   'n: numero a
interpoliar
nCurvas = FrmCinet.CboN.Text       'n: curvas

For i = 1 To nCurvas
    SumX = 0
    SumY = 0

```

```

SumX2 = 0
SumY2 = 0
SumXY = 0

For j = 1 To nPuntos
    SumX = SumX + dtiemp(i, j)
    SumY = SumY + dQi(i, j)
    SumY2 = SumY2 + (dQi(i, j)) ^ 2
    SumX2 = SumX2 + (dtiemp(i, j)) ^ 2
    SumXY = SumXY + dQi(i, j) * dtiemp(i, j)
Next

For j = 1 To nPuntos
    SumX = SumX + dtiempf(i, j)
    SumY = SumY + dQf(i, j)
    SumY2 = SumY2 + (dQf(i, j)) ^ 2
    SumX2 = SumX2 + (dtiempf(i, j)) ^ 2
    SumXY = SumXY + dQf(i, j) * dtiempf(i, j)
Next

If ((2 * nPuntos * SumX2 - (SumX) ^ 2) <> 0) Then
    db(i) = ((2 * nPuntos) * SumXY - SumX * SumY) / ((2 *
nPuntos) * SumX2 - (SumX) ^ 2)
    da(i) = SumY / (2 * nPuntos) - db(i) * SumX / (2 *
nPuntos)
    '          coefcorrelacion = (SumXY - SumX * SumY / 2*npuntos) /
(Sqr(SumX2 - SumX ^ 2 / 2*npuntos) * Sqr(SumY2 - SumY ^ 2 /
2*npuntos))
End If
Next

'MsgBox "da1:" & da(1) & "          da2:" & da(2) & "          da3:" &
da(3) & "          db1:" & db(1) & "          db2:" & db(2) & "          db3:" &
db(3)

End Sub

```

Anexo 3 Publicaciones

Artículos originales publicados con revisión por pares.

- Thermal Behavior and Kinetic Analysis of the Chain Unfolding and Refolding and of the Concomitant Nonpolar Solvation and Desolvation of Two Elastin-like Polymers. J. Reguera, J.M. Lagaron, M. Alonso, V. Reboto, B. Calvo, J.C. Rodríguez-Cabello, *Macromolecules* **2003**, 36 (22), 8470-8476.
- Endothermic and Exothermic Components of an Inverse Temperature Transition for Hydrophobic Association by TMDSC. J.C. Rodríguez-Cabello, J. Reguera, M. Alonso, T.M. Parker, D.T. McPherson, D.W. Urry. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 388 (1-3), 127-131
- Influence of the Molecular Weight on the Inverse Temperature Transition of a Model Genetically Engineered Elastin-like pH-Responsive Polymer. A. Girotti, J. Reguera, F.J. Arias, M. Alonso, A.M. Testera, J.C. Rodríguez-Cabello. *Macromolecules* **2004**, 37 (9), 3396-3400
- Nanopore Formation by Self-Assembly of the Model Genetically Engineered Elastin-like Polymer [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]₁₅. J. Reguera, A. Fahmi, P. Moriarty, A. Girotti, J.C. Rodríguez-Cabello. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (41), 13212-13213.
- Effect of NaCl on the Exothermic and Endothermic Components of the Inverse Temperature Transition of a Model Elastin-like Polymer. J. Reguera, D.W. Urry, T.M. Parker, D.T. McPherson, J.C. Rodríguez-Cabello. *Biomacromolecules*, **2007**, 8(2), 354 - 358.

- Influence of the Amino-Acid Sequence on the Inverse Temperature Transition of Elastin-Like Polymers. Artur Ribeiro, F. Javier Arias, Javier Reguera, Matilde Alonso, and J. Carlos Rodríguez-Cabello. *Biophysical Journal*, **2009**, 97, 312–320.

Manuscritos todavía no publicados.

- Mesoscale Order in a Model Elastin Like-Polymer as Determined by Synchrotron Saxs Experiments, Javier Reguera, Dan W. Urry, Timothy M. Parker, David T. McPherson, José M Lagarón, J. Carlos Rodríguez-Cabello.

Artículos de revisión y capítulos de libros derivados de esta tesis.

- Developing Functionality in Elastin-Like Polymers by Increasing their Molecular Complexity: The Power of the Genetic Engineering Approach. J. C. Rodríguez-Cabello, J. Reguera, A. Girotti, M. Alonso, A. M. Testera. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30 (11), 1119-1145.
- Genetic Engineering of Protein-Based Polymers: The Example of Elastin-like Polymers. J. C. Rodríguez-Cabello, J. Reguera, A. Girotti, F. J. Arias, M. Alonso, *Adv. Polym. Sci.*, **2006**, 200, 119-167.
- Nanobiotechnological approach to engineered biomaterial design: the example of elastin-like polymers. J.C. Rodríguez-Cabello, S. Prieto, F.J. Arias, J. Reguera, A. Ribeiro, *Nanomedicine.*, **2006**, 1(3), 267-280.
- J. Carlos Rodríguez-Cabello, Javier Reguera, Susana Prieto, Matilde Alonso "Protein-based Smart Polymers" in "Smart polymers: Production,

study and application in biotechnology and biomedicine" Second Edition, **2007** (Edited by: Igor Galaev, Bo Mattiasson) CRC press.

- Biofunctional design of elastin-like polymers for advanced applications in nanobiotechnology, J.Carlos Rodríguez-Cabello, S. Prieto, J. Reguera, F. Javier Arias, A. Ribeiro, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **2007**, 18(3), 269-286.
- J. C. Rodríguez-Cabello, A. Ribeiro, J. Reguera, A. Girotti, A. M. Testera "Elastin-like systems for tissue engineering" in "Natural-based Polymers for Biomedical Applications" (Edited by R. L. Reis) Woodhead Publishing Limited, Cambridge (Publication date: August **2008**).