



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Desarrollo de Polímeros tipo Elastina con propiedades
mucoadhesivas mejoradas.**

Autora: Tamara Postigo Casado

Tutor/es: Francisco Javier Arias Vallejo

Rosario Iglesias Álvarez

Este proyecto va dedicado a todas aquellas personas que han hecho que esto haya sido posible.

Gracias por el tiempo dedicado, los consejos y el apoyo. Gracias por las respuestas a todas mis preguntas, por la ayuda prestada en cualquier momento, las mil explicaciones del funcionamiento de cada uno de los equipos y por los constantes ánimos. Gracias por enseñarme a pensar e ir siempre más allá. GRACIAS.

Gracias por venir a quedaros y no estar de paso. Gracias por los abrazos, las risas y las pocas cervezas que he podido tomarme este año. Gracias a los que vinieron y se fueron, porque también me aportaron. Gracias por entender y comprender mi ausencia. Gracias por aguantarme en mis peores momentos y, a pesar de todo, esperarme para los buenos. Por las palabras de aliento y las visitas inesperadas. Por las llamadas a cualquier hora del día y no preguntar por qué. GRACIAS.

Gracias por ser y estar desde hace casi 5 años. Gracias por darme la mano y acompañarme. Por guiarme cuando más perdida estaba y por mostrarme siempre la otra cara de la moneda. Gracias por ser incondicional. Gracias por darle sentido a todo. GRACIAS.

Gracias por el día a día, porque sois los que la peor parte os lleváis. Gracias por la comprensión, los ánimos incansables y por el apoyo total y absoluto. Por creer en mí siempre y por enseñarme a buscar el lado positivo a todo. Por quererme. GRACIAS.

No quiero acabar los agradecimientos sin hacer una mención especial a mis abuelos. Gracias por animarme desde pequeña a estudiar y a esforzarme siempre al máximo para conseguir lo que me proponga. Gracias por confiar en mí.

“Cuando llegue la inspiración,
que me encuentre trabajando.”

- Pablo Picasso.

1.	RESUMEN.	7
2.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.	9
3.	INTRODUCCIÓN.	12
3.1.	ANATOMÍA DEL GLOBO OCULAR Y MEMBRANAS MUCOSAS.	12
3.2.	MUCINAS.	13
3.2.1.	Estructura de las mucinas.	13
3.2.2.	Tipos y función de las mucinas en la superficie ocular.	14
3.3.	MUCOADHESIÓN.	16
3.3.1.	Bioadhesión.	16
3.3.2.	Mucoadhesión.	16
3.3.3.	Mucoadhesivos.	17
3.4.	LA ELASTINA Y POLÍMEROS TIPO ELASTINA.	19
3.4.1.	La elastina.	19
3.4.2.	Polímeros tipo elastina.	20
3.4.3.	Transición inversa con la Temperatura.	21
3.4.4.	Aplicaciones biomédicas de los ELR.	23
3.5.	HIDROGELES	23
3.5.1.	Hidrogeles.	23
3.5.2.	Nanogeles.	25
3.6.	REACCIÓN TIPO 'CLICK'.	26
4.	MATERIALES, TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y MÉTODOS.	29
4.1.	MATERIALES.	29
4.1.1.	Reactivos y disolventes.	29
4.1.2.	Materiales.	30
4.2.	EQUIPAMIENTO UTILIZADO INSTRUMENTALES.	30
4.2.1.	Espectroscopía de infrarrojo.	30
4.2.2.	Espectrofotometría UV-Vis.	32
4.2.3.	Dinamic light scattering y laser Doppler velocimetry/phase analysis light scattering (PALS)	
	(M3-PALS)	33
4.2.4.	Electroforesis	35
4.3.	MÉTODOS.	36
4.3.1.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE POLÍMEROS TIPO ELASTINA.	36
4.3.2.	MODIFICACIÓN DE LOS RECOMBINÁMEROS TIPO ELASTINA.	41
4.3.2.1.	ELRs sometidos a modificación.	41
4.3.2.2.	Modificación del extremo C-terminal de ELR-VOKx72.	42
4.3.2.2.1.	Modificación del extremo C-terminal del ELR VOKx72 con un compuesto que contiene un triple enlace terminal, propargilamina.	42
4.3.2.2.2.	Modificación del extremo C-terminal del ELR VOKx72 con un compuesto que contiene un grupo azido terminal, espermina.	44
4.3.2.3.	TIOLACIÓN. Modificación de los grupos ε-amino de los aminoácidos Lisina presentes en la estructura de ELR-VKVx24.	45
4.3.2.3.1.1.	Reacción de tiolación del VKVx24 con 1,5/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio HCl pH 4.	45
4.3.2.3.1.2.	Reacción de tiolación del VKVx24 con 3/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio HCl pH 4.	46
4.3.2.3.1.3.	Reacción de tiolación del VKVx24 con 1,5/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio buffer MES pH 3,83.	47
4.3.2.3.1.4.	Reacción de tiolación del VKVx24 con 3/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio buffer MES pH 3,83.	47
4.3.2.3.1.5.	Reacción de tiolación del VKVx24 con 10/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio HCl pH 4.	48
4.3.3.	REACCIÓN DE AMIDACIÓN ENTRE EL ÁCIDO 5-HEXENOICO Y LA ESPERMINA.	48
4.3.4.	ELABORACIÓN DE NANOGELES.	49
4.3.5.	Ensayos de mucoadhesión.	50
4.3.5.1.	Procedimiento de preparación de mucinas.	51
4.3.5.2.	Medidas de las propiedades mucoadhesivas.	52

4.3.6.	Anclaje de ELR modificado a la superficie del nanogel.	54
4.6.1.	Estudio de las propiedades mucoadhesivas de los nanogeles de partida y modificados superficialmente mediante medidas de potencial zeta.	55
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	56
5.2.	MODIFICACIÓN DE POLÍMEROS.	56
5.2.1.	Modificación del extremo C-terminal de ELR-VOKx72.	56
5.2.1.1.	Reacción de amidación vía DCC.	56
5.2.1.2.	Reacción de amidación vía DCC en presencia de NHS.	57
5.2.1.3.	Modificaciones del biopolímero ELR-VOKx72.	58
5.2.1.3.1.	ELR-VOKx72.	58
5.2.1.3.2.	Modificación del extremo C-terminal del ELR VOKx72 con un compuesto que contiene un triple enlace terminal, propargilamina.	60
5.2.1.3.3.	Modificación del extremo C-terminal del ELR VOKx72 con un compuesto que contiene un grupo azido terminal, espermina.	63
5.2.2.	Modificación por tiolación de los grupos ε-amino de los aminoácidos Lisina presentes en la estructura de ELR-VKVx24.	68
5.2.2.1.	Tiómeros.	68
5.2.2.2.	Química de las tiolactonas.	69
5.2.2.3.	Tiolación.	70
5.2.2.4.	Modificaciones del biopolímero ELR-VKVx24.	71
5.2.2.4.1.	Biopolímero ELR-VKVx24.	71
5.2.2.4.2.	Modificación por tiolación del biopolímero ERL-VKVx24 con 1,5/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio HCl pH 4.	74
5.2.2.4.3.	Modificación por tiolación del biopolímero ERL-VKVx24 con 3/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio HCl pH 4.	75
5.2.2.4.4.	Modificación por tiolación del biopolímero ERL-VKVx24 con 1,5/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio buffer MES pH 3,83.	77
5.2.2.4.5.	Modificación por tiolación del biopolímero ERL-VKVx24 con 3/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio buffer MES pH 3,83.	78
5.2.2.4.6.	Modificación por tiolación del biopolímero ERL-VKVx24 con 10/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio HCl pH 4.	80
5.3.	Ensayos de mucoadhesión.	82
5.3.1.	Tamaño y potencial zeta de nanogeles elaborados y MUCIII tras el tratamiento.	83
5.3.2.	Resultados de las medidas de las propiedades mucoadhesivas.	84
5.3.3.1.	Resultados de los análisis de las propiedades mucoadhesivas de los nanogeles por turbidimetría.	85
5.3.3.2.	Resultados de los análisis de las propiedades mucoadhesivas del ELR VOKx72 por turbidimetría.	86
5.3.3.3.	Resultados de los análisis de las propiedades mucoadhesivas del ELR VKVx24 por turbidimetría.	87
5.3.3.4.	Resultados de los análisis de las propiedades mucoadhesivas por turbidimetría del ELR VKVx24 modificado con tres grupos tiol en su estructura.	89
5.4.	Anclaje del biopolímero ELR-VOKx72 modificado con un extremo azido terminal.	91
5.5.	Valoración de las propiedades mucoadhesivas de los nanogeles modificados y de partida con el equipo Zsizer Nano.	93
	CONCLUSIONES.	96
	REFERENCIAS.	97
	APÉNDICE.	99
	ANEXO	100
	LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS.	107

1. RESUMEN.

Los recombinámeros tipo elastina (ELRs) son biopolímeros cuya composición se inspira en la elastina natural presente en los seres vivos y presentan una amplia variedad de aplicaciones en el ámbito de la Biomedicina y/o la clínica.

Para su aplicación tanto en Ingeniería de Tejidos como para la liberación de fármacos controlada, se utilizan preferentemente en forma de hidrogeles. En la actualidad, estas estructuras reticulares se forman por entrecruzamiento de las cadenas de los biopolímeros ELRs, ayudándose de la química denominada 'click' entre grupos funcionales azido y alquínilo, metodología que puede realizarse en condiciones fisiológicas y cuyos componentes son biocompatibles.

Uno de los propósitos de estos hidrogeles sintetizados es la adhesión de éstos a órganos, tejidos y mucosas con fines farmacológicos. A la adherencia de estos polímeros a un material de naturaleza biológica se la denomina bioadhesión, y cuando ésta se produce a una membrana mucosa recibe el nombre de mucoadhesión.

Con este proyecto lo que se persigue es mejorar la mucoadhesión de los hidrogeles creados a partir de ELRs. Se pretende intensificar su unión sobre la mucosa ocular, anclando sobre su superficie biopolímeros que interaccionen fuertemente con las mucinas presentes. Para ello se injertarán sobre la superficie del hidrogel ELRs cargados positivamente que interaccionen electrostáticamente con las mucinas, que presentan cargas negativas; o bien, ELRs portadores de grupos tioles que puedan dar lugar a enlaces disulfuro con los tioles presentes en las mucinas. Es necesario, por tanto, previamente modificar químicamente los polímeros que se quieren fijar para que se unan a la superficie por uno de sus extremos mediante tecnología 'click'.

De esta manera conseguiremos aumentar la superficie disponible del hidrogel a la vez que la carga positiva distribuida alrededor de su extensión. Esto se traduce en una mayor interacción hidrogel-mucosa, aumentando de esta forma el contacto y la duración del mismo, dando una mayor viabilidad a tratamientos, en este caso oculares, como la dosificación de fármacos como acetazolamida que persiguen la cura y control del Glaucoma.

Abstract.

The elastin like recombinamers (ELRs) are a biopolymers alike to the elastin in living organisms that have a myriad of applications in the field of biology and / or clinical issues.

One of its main direct uses is the development of hydrogels via 'click' chemistry between azido functional groups and alkynes, which needs no additives or heating to be done.

One of the targets of these synthesized hydrogels is their adherence to organs, tissues and mucous for clinical purposes. The adhesion of these polymers to a biological material is called bioadhesion, and when this occurs to a mucous membrane it is called mucoadhesion.

The aim of this project is to improve this mucoadhesion these hydrogels created from ELRs possess by anchoring on their surface biopolymers with the same nature. To set them into the hydrogels surface they need to be previously modified and then they can be anchored by this 'click' technology described below improving this type of adherence.

Thus, we achieve an improvement of the available surface in the hydrogel and the distributed charge around its extension. This results in an increased interaction between hidrogel-mucosa, thereby increasing contact and its duration, providing a greater viability in treatments, ocular issues in this case, as drug dosification pursuing the cure and control of Glaucoma.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

El presente proyecto realizado en las instalaciones del grupo BIOFORGE en el edificio LUCIA de la Universidad de Valladolid está dirigido al estudio y aplicación de los polímeros recombinantes tipo elastina como biomateriales en ámbitos como la Biomedicina o la Nanotecnología y sus múltiples variantes.

Uno de los estudios que se están realizando en el grupo de investigación BIOFORGE está dirigido hacia el tratamiento de la enfermedad ocular llamada Glaucoma.

El glaucoma es una neuropatía óptica que sucede por la pérdida de células ganglionares de la retina (RGCs) causada principalmente por la elevación de la presión intraocular (IOP) que puede conducir hasta la ceguera. Hoy en día existen varios tipos de medicamentos disponibles para los tratamientos anti-glaucoma y la aplicación tópica todavía se considera la primera opción para esta terapia oftalmológica, aunque no la única.

Casi todos los fármacos anti-glaucoma, incluyendo bloqueadores beta, análogos de prostaglandina, inhibidores de la anhidrasa carbónica, etc, se administran por vía tópica en forma de gotas en los ojos (en forma de soluciones o suspensiones). Este tipo de aplicación de fármacos presenta unas limitaciones, como la entrega insuficiente e irregular del agente terapéutico al ojo y la pobre biodisponibilidad del fármaco debido a la anatomía y fisiología del ojo que, debido al drenaje lagrimal, después de la administración de la gota se produce una rápida eliminación de los fármacos.

Por esta razón, el objetivo principal en el tratamiento ocular es tratar de lograr una alta concentración farmacológica en la superficie ocular sin dañarla y mejorar la biodisponibilidad del agente. Desde las últimas décadas se han desarrollado diferentes estrategias cuyo propósito principal es aumentar la permeabilidad corneal y el tiempo de contacto con la superficie ocular.

Las formulaciones oculares poliméricas estudiadas para mejorar la viscosidad y mucoadhesión más notables han sido los hidrogeles. Los hidrogeles son redes poliméricas hidrófilas tridimensionales acuosas reticuladas por enlaces físicos o químicos. En nuestro caso utilizaremos recombinámeros tipo elastina, ELRs,

convenientemente modificados para formar las redes poliméricas de los hidrogeles por entrecruzamiento vía “química click”.

A fin de mejorar la biodisponibilidad del fármaco seleccionado para el tratamiento del glaucoma y, por lo tanto, la eficiencia de éste, en este estudio se ha propuesto el uso de polímeros mucoadhesivos, como son los recombinámeros tipo elastina que presentan una cierta carga positiva capaz de interactuar con las mucinas oculares que presentan carga negativa, para el recubrimiento de la superficie de los hidrogeles utilizados para la administración de dicho fármaco. Mediante el revestimiento de los hidrogeles con los ELRs seleccionados, a través de su anclaje en la superficie, se persigue mejorar la interacción entre la membrana mucosa y el hidrogel, es decir, su mucoadhesión.

Por lo tanto, el primer objetivo de este proyecto será la modificación de uno de los extremos del polímero ELR seleccionado para anclar a la superficie del hidrogel, de manera que añadiremos un grupo funcional capaz de reaccionar con los grupos funcionales dispuestos sobre la superficie en la que le pretendemos anclar. En este caso el polímero seleccionado es el VOK, el cual contiene una gran cantidad de grupos amino cargados positivamente en condiciones fisiológicas, 72 aminoácidos lisina, a lo largo de la cadena polipeptídica. El ELR-VOK sería capaz de producir una alta interacción con las proteínas presentes en la mucosa ocular; para ello es necesario realizar la modificación de su carboxilo terminal, de manera que nos permita injertarlo a la superficie del hidrogel por dicho extremo.

Debido a que estos hidrogeles se forman a partir de una metodología ‘click’ entre los grupos azido y triples enlaces presentes en los biopolímeros que forman la red, las funcionalidades que incorporaremos al ELR-VOK para que se produzca su anclaje superficial serán grupos azido que puedan reaccionar con los grupos ciclooctino residuales de la superficie del hidrogel. La unión del injerto se producirá a través de química ‘click’ mediante la formación del anillo de 1, 2, 3-triazol entre los grupos participantes en la reacción.

El segundo objetivo de este proyecto es la modificación de las cadenas laterales de otros de los ELR bioproducidos en las instalaciones del grupo de investigación BIOFORGE.

En este caso la modificación se hará sobre el recombinámero VKVx24, el cual dispone de 24 aminoácidos lisina a lo largo de su estructura, portadores de grupos amino adecuados para llevar a cabo las correspondientes reacciones de modificación. Nuestro objetivo consiste en incorporar a la estructura del biopolímero grupos tiol capaces de formar puentes disulfuro con los grupos tiol presentes en los dominios ricos en cisteína de las proteínas propias de las membranas mucosas, las mucinas. De esta manera se pretende mejorar las propiedades mucoadhesivas del hidrogel a través del injerto en su superficie del biopolímero VKVx24 modificado con grupos tiol, el cual puede dar lugar a la unión covalente mediante puentes disulfuro a la membrana de la mucosa, una vez injertado.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1. ANATOMÍA DEL GLOBO OCULAR Y MEMBRANAS MUCOSAS.

Las membranas mucosas son las superficies húmedas que recubren las paredes de diversas cavidades y zonas expuestas al exterior que no se encuentran recubiertas por piel. El moco constituye la primera barrera con la que los nutrientes y fármacos interactúan y a través de la cual difunden, con el fin de ser absorbidos y tener acceso al sistema circulatorio y órganos diana.

La mucosa se compone de una capa de tejido conectivo (lámina propia), por encima de la cual se encuentra una capa epitelial, superficie que se mantiene húmeda por la presencia de esta capa de moco. El epitelio puede ser simple (estómago, intestino y bronquios) o estratificado (esófago, vagina y córnea) [1].

El globo ocular está formado por tres túnicas concéntricas: una túnica exterior o la esclerótica y la córnea, una túnica intermedia o capa uveal y la túnica más interna o retina (*Figura 3.1.1*).

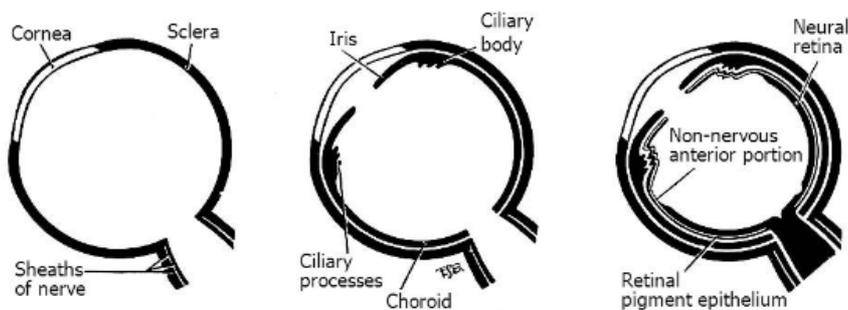


Figura 3.1.1: Representación de la capas del globo ocular.

La superficie ocular está protegida de diversas condiciones ambientales por la película lagrimal. La película lagrimal es compleja y contiene múltiples capas secretadas por diferentes glándulas y tejidos.

La capa más externa de la película lagrimal contiene lípidos secretados por las glándulas de Meibomio. La capa intermedia es la capa acuosa que consiste en proteínas, electrolitos y agua. El principal colaborador de esta capa es la glándula lagrimal, aunque las células epiteliales de la conjuntiva y córnea también contribuyen. La capa más interna de la película lagrimal es la capa mucosa, que está compuesta por unas proteínas

características denominadas mucinas, además de poseer electrolitos y agua producidos por las células caliciformes conjuntivales. En la córnea, las mucinas transmembrana se expresan en las células apicales para formar el glicocálix (*Figura 3.1.2*).

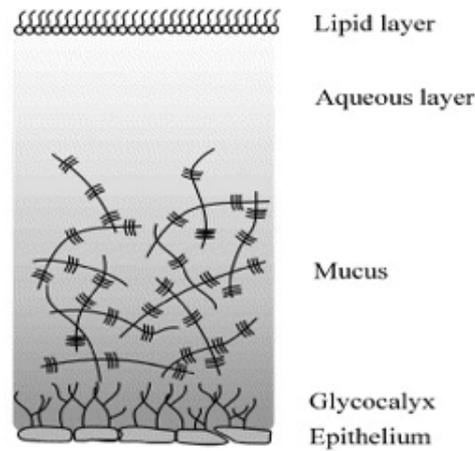


Figura 3.1.2: Representación de las diferentes capas que componen la película lagrimal.

La córnea y la conjuntiva han desarrollado múltiples mecanismos para responder a los constantes cambios de las condiciones ambientales y la producción y liberación de la capa de moco en la superficie ocular a través de las lágrimas es el mejor mecanismo de protección que poseen [2].

Este moco está compuesto principalmente por agua (95%), pero también contiene sales, lípidos tales como ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol además de diferentes tipos de proteínas. Sin embargo, las mucinas (glicoproteínas) son los componentes más importantes que participan en la formación del gel que constituye la mucosa, dándole esas propiedades cohesivas y adhesivas características. Estas mucinas forman una capa denominada glicocálix, que es de naturaleza altamente hidrófila y se puede extender hasta 500 nm de la superficie epitelial.

3.2. MUCINAS.

3.2.1. Estructura de las mucinas.

Las mucinas consisten en un esqueleto proteico compuesto por un gran número de repeticiones de secuencias ricas en serina, treonina y prolina que poseen un número variable de cadenas laterales de oligosacáridos y una alta proporción de dominios de cisteína, generalmente superior al 10% (*Figura 3.2.1.1*). Las cadenas laterales de

carbohidratos se enlazan a las cadenas laterales hidroxilo de los aminoácidos serina y treonina del núcleo de la proteína a través de enlaces covalentes O-glucosídicos. El peso molecular de las mucinas se extiende aproximadamente desde 200 kDa a 40 MDa.

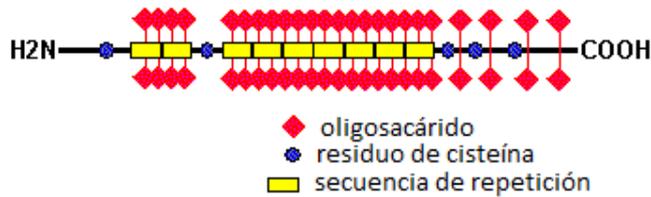


Figura 3.2.1.1: Representación genérica de la estructura de un monómero de mucina.

Los hidratos de carbono suponen un 80% del total de la estructura de la proteína siendo éstos principalmente fucosa, galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilneuramínico o derivados del ácido siálico y trazas de manosa. La presencia de estos azúcares ácidos hace que las mucinas tengan una carga neta negativa [3].

3.2.2. Tipos y función de las mucinas en la superficie ocular.

Las mucinas de la superficie ocular se pueden dividir en mucinas asociadas a la membrana donde se incluyen las mucinas MUC1, MUC4 y MUC16 y mucinas secretadas. Se conocen dos tipos de mucinas secretadas, mucinas solubles pequeñas (MUC7 y MUC9) y las más grandes, mucinas formadoras de gel (MUCs 2, 5AC, 5B y 6) la mucina secretada más prevalente en el fluido lagrimal es MUC5AC (Figura 3.2.2.1).

La estructura de las mucinas asociadas a la membrana se puede dividir en tres regiones principales: 1) la cola citoplásmica, 2) dominio que abarca la membrana, y 3) dominio extracelular.

La cola citoplásmica es principalmente una región de anclaje de estas mucinas que se inserta en la membrana plasmática de las células. El dominio que abarca la membrana es hidrófobo y se extiende por la membrana celular. El dominio extracelular se extiende dentro de la película de lagrimal sobre unos 250 nm y se encuentra fuertemente glicosilada. Esta glicosilación contribuye a la mayor parte del peso molecular y aporta una carga hidrófila negativa a las mucinas, como ya hemos mencionado anteriormente.

Debido a su estructura son las mucinas asociadas a la membrana las que se encuentran formando la barrera densa que es el glicocalix en la interfase de la película lagrimal epitelial. Esta barrera es la que evita la penetración de patógenos y al ser una superficie lubricante permite a los párpados deslizarse suavemente sobre el epitelio de la córnea sin adherencia.

Mientras que las mucinas secretadas se encuentran en el líquido lagrimal actuando como un mecanismo de limpieza y/o eliminación de desechos de redes multiméricas, al mismo tiempo, a través de su naturaleza hidrófila, las mucinas retienen el agua y contribuyen a la lubricación de la superficie epitelial. Estas mucinas secretadas pueden moverse fácilmente sobre las mucinas del glicocalix porque ambos tipos tienen carácter aniónico que crea fuerzas de repulsión entre ellas.

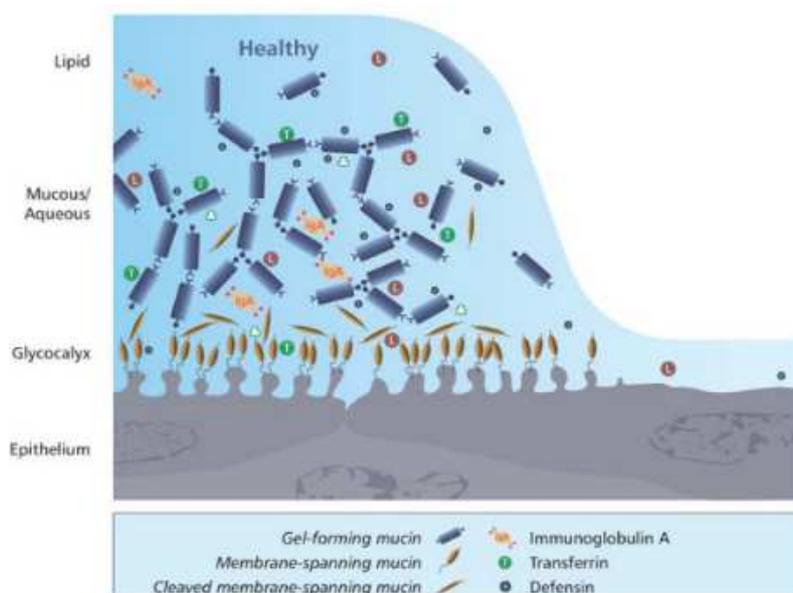


Figura 3.2.2.1: Representación de la distribución de los diferentes tipos de mucinas sobre la superficie ocular.

Las mucinas son el componente esencial de las membranas mucosas de diversas partes del organismo y su estructura confiere al moco unas propiedades adhesivas, las cuales permiten la adherencia de diversos materiales con fines clínicos y biológicos [4].

3.3. MUCOADHESIÓN.

3.3.1. Bioadhesión.

La bioadhesión se puede definir como el estado en el que dos materiales, al menos uno de los cuales es de naturaleza biológica, se mantienen juntos por períodos prolongados de tiempo por fuerzas interfaciales. En las ciencias farmacéuticas a este fenómeno, cuando en la unión adhesiva el material biológico es una membrana mucosa, se le conoce como mucoadhesión [5].

3.3.2. Mucoadhesión.

La mucoadhesión se puede describir como la interacción atractiva entre un mucoadhesivo y la membrana mucosa siendo un mucoadhesivo un material capaz de interactuar con la capa de gel mucoso que cubre las superficies epiteliales de las principales áreas de absorción en el cuerpo humano.

La mucoadhesión se divide generalmente en dos etapas: la etapa de contacto y la etapa de consolidación, el periodo en el que se establecen las interacciones adhesivas (*Figura 3.3.2.1*).

La primera etapa se caracteriza por el contacto entre el material y la membrana mucosa, con la difusión y el hinchamiento del mucoadhesivo, iniciando el contacto con la capa de moco. En la etapa de consolidación, los materiales mucoadhesivos son activados por la presencia de humedad. La humedad plastifica el sistema, lo que permite que las moléculas mucoadhesivas se libereren uniéndose por fuerzas de Van Der Waals débiles y enlaces de hidrógeno [6].

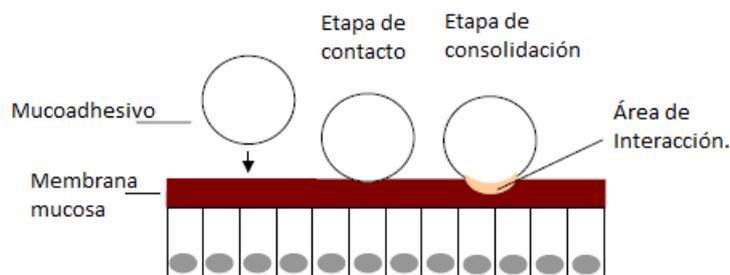


Figura 3.3.2.1: Representación de las dos etapas que conforman el mecanismo de mucoadhesión.

Así, la cohesión intermolecular posterior es debida a enlaces covalentes o no covalentes y/o atracciones. Ejemplos de tales interacciones químicas incluyen enlaces iónicos o covalentes así como fuerzas dipolo-dipolo electrostáticas, enlaces de hidrógeno o fuerzas hidrófobas.

La mucoadhesión es un proceso complejo y se han propuesto numerosas teorías para explicar los mecanismos implicados en ella. Entre las cuales se encuentran: la teoría humectante, la teoría de la fractura, la teoría electrónica, la teoría de adsorción, la teoría mecánica, y una de las más ilustrativas, la teoría de la difusión, la cual sugiere que la mucoadhesión se basa en la interdifusión de las cadenas de polímeros a través de una interfaz de adhesivo (*Figura 3.3.2.2*) [7].

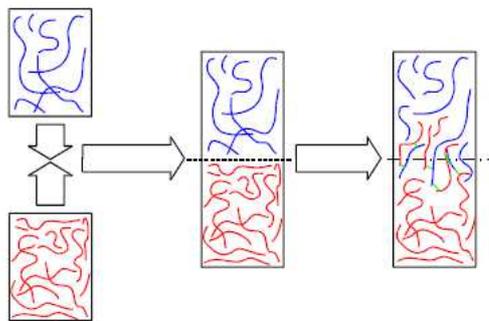


Figura 3.3.2.2: Representación de la interpenetración entre las cadenas poliméricas.

3.3.3. Mucoadhesivos.

Un mucoadhesivo es un material capaz de interaccionar con la capa mucosa que se encuentra cubriendo el epitelio y puede tener diferentes formas tales como pastillas, películas, parches, geles, etc.

A través de los años, los polímeros mucoadhesivos mostraron ser capaces de adherirse a las membranas mucosas. La capacidad de adherirse a la capa de gel de moco que cubre los tejidos epiteliales hace que dichos polímeros sean unos excipientes muy útiles en la administración de fármacos.

Cuando se utilizan polímeros mucoadhesivos, el tiempo de residencia de los dispositivos de dosificación en la mucosa se puede prolongar de manera significativa, lo que permite una liberación sostenida del fármaco en un órgano diana dado. Una solución simple, por ejemplo, desaparece de la superficie ocular al cabo de unos pocos

minutos; sin embargo, el tiempo de residencia se puede extender a horas en presencia de un polímero mucoadhesivo [8].

Los polímeros mucoadhesivos también pueden utilizarse como agentes terapéuticos por derecho propio, para recubrir y proteger los tejidos dañados (úlceras gástricas o lesiones de la mucosa oral) o para actuar como agentes lubricantes (en la cavidad oral, ojo y vagina).

Este tipo de polímeros se pueden clasificar de diversas maneras, como por ejemplo, por su mecanismo de unión, naturaleza o estructura química.

En principio, el resto carboxílico (-COOH) de los polímeros aniónicos, tales como el ácido poliacrílico (PAA), es predominantemente responsable de la formación de enlaces de hidrógeno. En polímeros catiónicos, tales como quitosano, la mucoadhesión resulta de las interacciones electrostáticas entre el polímero y las subestructuras aniónicas, como pueden ser las mucinas que poseen una carga negativa, dentro de la capa de moco. Para los polímeros no iónicos, tales como polietilenglicoles (PEG), se cree que los responsables de la adhesión son los enlaces hidrógeno con el consecuente enredo de las cadenas de poliméricas. De manera que podemos comprobar que los polímeros tienden a formar enlaces no covalentes con subestructuras mucosas.

Una clase innovadora de mucoadhesivos funcionalizados que son capaces de formar enlaces disulfuro covalentes en las superficies mucosas son los polímeros tiolados. Estos polímeros se denominan tíómeros y están equipados con restos tiol en la cadena lateral polimérica y, por lo tanto, son capaces de interactuar a través de reacciones de intercambio tiol-disulfuro. Los enlaces disulfuro se pueden formar debido a que las mucinas que se encuentran formando parte de las mucosas contienen subestructuras ricas en cisteína. Este tipo de unión covalente (enlaces disulfuro) entre mucinas y polímero se traduce en una mejor cohesión y una fuerte mucoadhesión [9].

Un polímero ideal bioadhesivo para un sistema de administración de fármacos debe no ser tóxico ni irritante, se debe adherir rápidamente a los tejidos, debe permitir una fácil incorporación del fármaco y no ofrecer obstáculo para su dispensación y no debe descomponerse durante el almacenamiento o su vida útil.

Un tipo de polímeros que cumple estas especificaciones son los polímeros recombinantes tipo elastina, ELRs.

3.4. LA ELASTINA Y POLÍMEROS TIPO ELASTINA.

3.4.1. La elastina.

Es esencial que todos los organismos multicelulares incluyan algunos materiales con alta resistencia a la tracción y rigidez, como lo son el hueso y el colágeno, además de tener un componente con elasticidad intrínseca que pueda estirarse y someterse a retroceso elástico cuando sea necesario, la elastina.

La elastina es una parte esencial de diversos tejidos humanos que dependen de la elasticidad. Las fibras de elastina están presentes prácticamente en todos los tejidos de los vertebrados, aunque sólo es apreciable dentro de unos pocos, como arterias, ligamentos, y pulmones, en los cuales el porcentaje presente de elastina es mayor. La elastina proporciona a estos tejidos elásticos la capacidad de estirar y retroceder, desempeñando también un papel fundamental en el apoyo y el mantenimiento de las células sanas. En la piel, la mayor parte de la elastina se encuentra en la dermis, que es la capa intermedia elástica [10].

La composición polipeptídica de la elastina tiene secuencias repetidas tales como VPGVG, APGVG, etc. Estas secuencias le confieren a este polímero natural la capacidad de sufrir grandes deformaciones en su estructura sin romperse pudiendo recuperar después su estructura original tras esa deformación.

Las nuevas técnicas de ingeniería genética permiten obtener polímeros sintéticos 'a la carta' similares a la elastina controlando sus propiedades a través del diseño de su secuencia aminoacídica [11].

Típicamente, la incorporación de secuencias de oligopéptidos repetitivas a partir de la estructura primaria de aminoácidos de una proteína nativa como lo es la elastina, proporciona propiedades estructurales críticas de la proteína matriz a la proteína recombinante. Además, también existe la posibilidad de mejorar las características biológicas, termodinámicas, y propiedades mecánicas del polímero a través de la modificación de la longitud de la cadena peptídica, secuencia de repetición, o la introducción de grupos funcionales adicionales [12].

3.4.2. Polímeros tipo elastina.

Las proteínas recombinantes tipo elastina (*elastin like recombinamers, ELRs*) representan una nueva y prometedora clase de biomateriales con aplicaciones potenciales en la administración de fármacos, la ingeniería de tejidos, o como componentes de dispositivos médicos implantados.

En comparación con los polímeros convencionales, los biomateriales derivados de las proteínas recombinantes pueden servir como alternativas viables a aplicaciones clínicas. Las técnicas moleculares que sustentan estas tecnologías de 'polímeros de proteínas' se detallaron por primera vez a finales del siglo XX.

El uso de los ELRs en diferentes campos, como la nanotecnología y la biomedicina, ha recibido un gran interés en los últimos años. Su comportamiento inteligente, auto-ensamblaje, compleja bioactividad, alta biocompatibilidad, y la posibilidad de compenetrar todas estas propiedades de manera viable y conveniente han abierto el camino a una nueva vía de ingeniería de diseños poliméricos con un rendimiento potencial más allá del alcance de cualquier otra familia de polímeros [13], [14]. Además, debido a la naturaleza peptídica de estos polímeros, es posible producir proteínas recombinantes en organismos genéticamente modificados, tales como bacterias.

Debido a su origen como cadenas de polipéptidos naturales, los polímeros proteicos son biodegradables, dejando sólo pequeños péptidos y aminoácidos como subproductos metabólicos.

Los recombinámeros tipo elastina (ELRs) son una clase de biopolímeros inspirados en los dominios intrínsecamente desordenados de la tropoelastina que se componen de repeticiones de una secuencia hidrofóbica de aminoácidos (Val-Pro-Gly-X-Gly)_n, donde X es el 'residuo huésped' y n determina el número de repeticiones de los pentapéptidos. El residuo huésped puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, cuya presencia interfiere con la coacervación.

Estas proteínas recombinantes presentan una separación de fases reversible mediante la cual las muestras permanecen solubles por debajo de una temperatura de transición (T_t), y forman coacervados amorfos por encima de esa T_t , lo que significa que tienen una transición inversa con la temperatura (ITT). Este comportamiento de fase tiene muchas aplicaciones posibles en la purificación, detección y activación de estos polímeros [15], [16].

3.4.3. Transición inversa con la Temperatura.

La elastina experimenta una transición inversa con la temperatura, de tal manera que su estructura se hace más ordenada a medida que aumenta la temperatura.

Así, uno de los aspectos principales de los biomateriales ELR implica su capacidad para formar coacervados, de manera reversible, en función del cambio de temperatura (Figura 3.4.3.1).

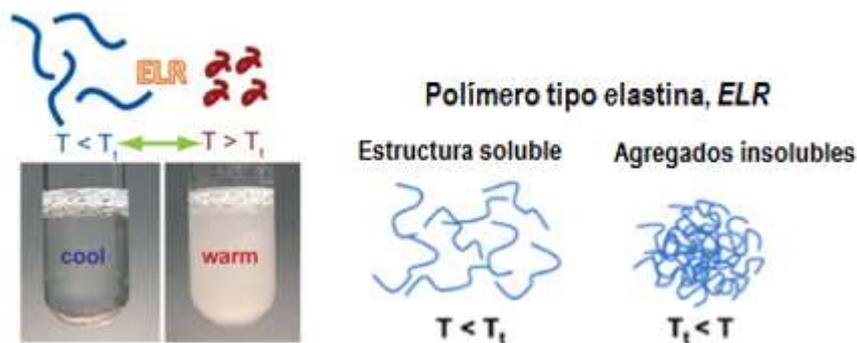


Figura 3.4.3.1: Representación ilustrativa del cambio de estado por encima de la temperatura de transición.

Esta temperatura de transición (T_t) se explica termodinámicamente en función de la energía libre de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Si ΔG durante una transición con la temperatura es cero ($\Delta G_t = 0$), entonces $\Delta H_t = T_t\Delta S_t$, que se pueden reordenar dando $T_t = \Delta H_t / \Delta S_t$. El incremento en el orden de los ELR a la temperatura de transición (T_t) puede parecer que contradice la segunda ley de la termodinámica (el orden de un sistema tiene una relación inversa con la temperatura) pero hay que considerar el sistema al completo del ELR, lo que incluye el agua de su hidratación hidrófoba [17].

En solución acuosa, por debajo de la temperatura de transición, T_t , las cadenas de polímero libre permanecerán desorganizadas en forma de 'random coil' completamente hidratadas, principalmente por la hidratación hidrofóbica. Las cadenas laterales hidrofóbicas de las secuencias VPGXG permanecen rodeadas por moléculas de agua tipo clatrato, ordenadas, en un estado de baja entropía. Por encima de la T_t la cadena se pliega y ensambla de forma hidrófoba para formar un estado separado de fases de agua y polímero. Las moléculas de agua agrupadas alrededor de los aminoácidos hidrofóbicos son expulsadas al exterior, donde se encuentran la mayor parte de las moléculas de agua. Esto favorece un aumento de la entropía del disolvente y permite a las cadenas laterales no polares formar interacciones intra e intermoleculares con moléculas de ELRs vecinas. Las interacciones hidrofóbicas facilitan el plegado y montaje en estructuras secundarias más ordenadas como las espirales tipo β (Figura 3.4.3.2 y Figura 3.4.3.3) [18].

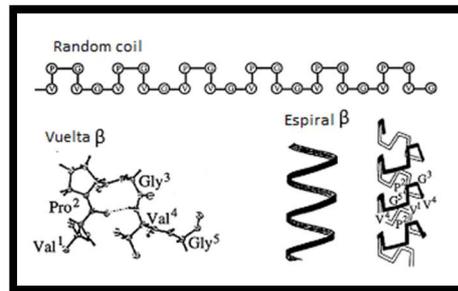


Figura 3.4.3.2: Estructuras de los ELRs por encima y por debajo de T_t .

El proceso de ITT (Inverse Temperature Transition) es completamente reversible y tiene un calor latente asociado, ΔH_t , que resulta de una combinación de la alteración de las estructuras con las moléculas agua y del plegamiento y estabilización resultante mediante fuerzas de Van Der Waals.

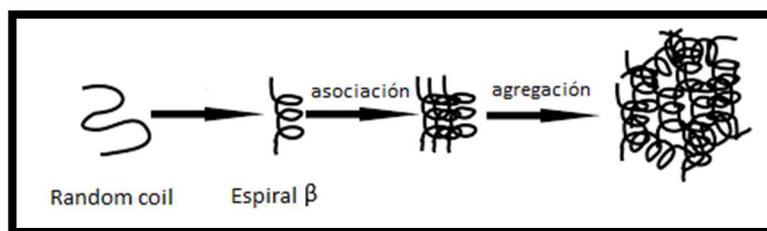


Figura 3.4.3.3: Representación del proceso de agregación de los polímeros tipo elastina por encima de la temperatura de transición inversa.

3.4.4. Aplicaciones biomédicas de los ELR.

La versatilidad de los ELRs en nanomedicina está impulsando el interés en su utilización en un amplio espectro de disciplinas. La primera de sus aplicaciones es en el campo de la oncología ocupando hasta un 35% del total de sus aplicaciones. Pero más allá de la oncología, existe un gran número de métodos pioneros en los que participan los ELRs, aportando su versatilidad en campos tan diversos como la Genética, la oftalmología, y las enfermedades cardiovasculares (*Figura 3.4.4.1*) [19].

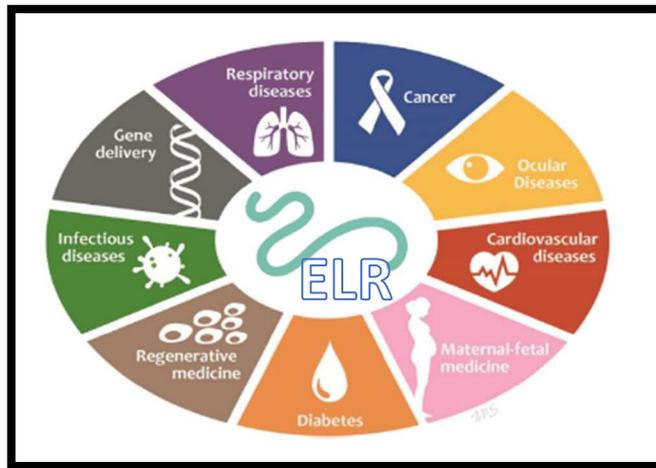


Figura 3.4.4.1: Diferentes ámbitos de aplicación de los ELRs dentro de la medicina.

Una de las funcionalidades más interesantes de los ELRs es la formación de hidrogeles. Estos hidrogeles tienen una extensa utilidad para fines clínicos, tanto en medicina regenerativa como para liberación controlada de fármacos [20]. Es en este campo donde nos vamos a centrar en el trabajo de investigación y, concretamente, en su aplicación para el tratamiento de enfermedades oculares como el Glaucoma.

3.5. HIDROGELES

3.5.1. Hidrogeles.

Los hidrogeles son matrices poliméricas, formadas por entrecruzamiento de las cadenas de polímeros hidrofílicos. Son estructuras insolubles, altamente hidrofílicas, capaces de absorber grandes cantidades de agua. Se utilizan principalmente como

lentes de contacto, membranas para biosensores, como materiales sustitutos de piel artificial y como sistemas de administración de fármacos (Figura 3.5.1.1).

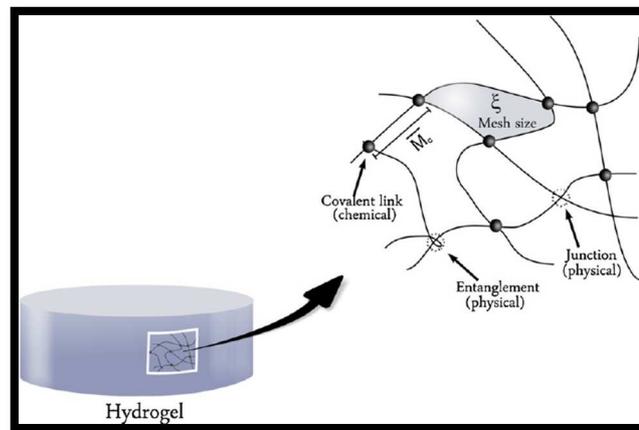


Figura 3.5.1.1: Estructura genérica y apariencia física de un hidrogel.

Los hidrogeles son una clase de materiales que se pueden preparar a través de diferentes mecanismos de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas. Destacamos entre ellos, la metodología 'click' utilizada en este trabajo para la obtención de hidrogeles biocompatibles. Los entrecruzamientos que forman la red del hidrogel pueden ser de diferentes tipos como: enlaces químicos covalentes, enlaces por fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, u otras interacciones electrostáticas. La estructura de la red de un hidrogel determina sus propiedades como dispositivo de administración de fármacos [20].

Existen tres parámetros principales que caracterizan la estructura reticular de los hidrogeles:

- Su volumen cuando se encuentra hinchado.
- El peso molecular de la cadena polimérica entre dos puntos de cruzamiento vecinos.
- El tamaño de la red.

Dependiendo de los monómeros incorporados en el hidrogel y las condiciones del medio, los hidrogeles pueden exhibir una alta variedad de las propiedades de carga, pudiendo ser neutros, catiónicos o aniónicos. Esta carga de la red de los hidrogeles depende fuertemente de pH del medio en el que se encuentran, ya que éste determina el estado de protonación de los grupos funcionales incorporados.

Para proporcionar carga negativa a un hidrogel normalmente se utilizan grupos carboxílicos y para proporcionar carga positiva, grupos amino.

Los hidrogeles más comúnmente usados incluyen materiales sintéticos como poli(etilenglicol) (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), o poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA), así como materiales de origen natural como agarosa, alginato, quitosano, colágeno, fibrina, y ácido hialurónico [21], [22].

En nuestro caso el tipo de hidrogel que tendremos es un gel catiónico, ya que está formado a partir del entrecruzamiento de ELRs cuya cadena proteica está compuesta por una secuencia repetida de aminoácidos, estando presentes lisinas portadoras de grupos amino protonados, que proporcionan al polímero una carga neta positiva.

Esta carga positiva va a ser la que interaccionará con la carga negativa que tienen las mucinas en su estructura, proporcionada por los oligosacáridos de sus cadenas laterales, produciéndose así la interacción denominada mucoadhesión (*Figura 3.5.1.2*).

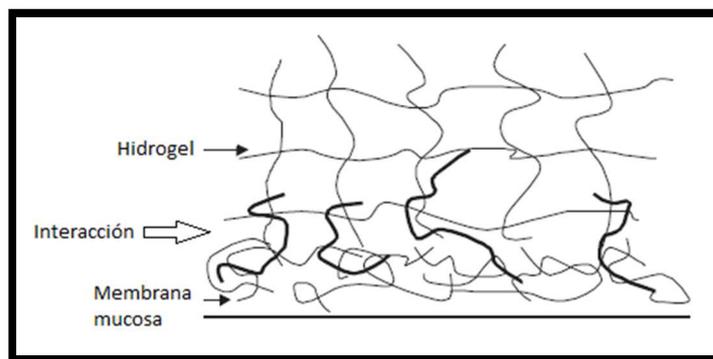


Figura 3.5.1.2: Mucoadhesión entre un hidrogel y una membrana mucosa.

Hoy en día, existe la necesidad de métodos de reticulación que sean selectivos, aptos a nivel biológico, ortogonales y que permitan el control sobre la densidad de la red polimérica. Una de las reacciones más interesantes para este tipo de aplicación es la reacción tipo 'click' de cicloadición 1,3-dipolar, en ausencia de catalizador, entre un grupo azido y otro alquínico, la cual explicaremos a continuación.

3.5.2. Nanogeles.

Los hidrogeles se pueden producir a macro, micro y nano escala adaptando las propiedades y funcionalidades químicas. En los últimos años, los micro y nanogeles

(Figura 3.5.2.1) han atraído especial atención debido a un aumento en el interés en la ciencia de materiales, persiguiendo poder modificar las propiedades superficiales y aumentar sus áreas [23].

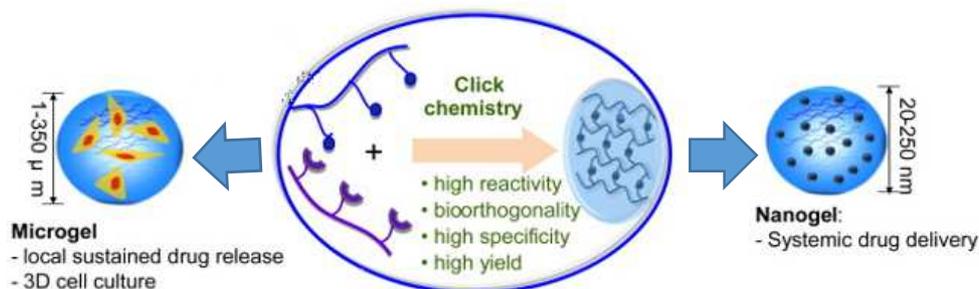


Figura 3.5.2.1: Preparación de hidrogel, nanogel y microgel tipo 'click'.

Los nanogel son partículas de hidrogel esféricas reticuladas que tienen nano dimensiones con unas medidas de entre 20-250nm. Tienen una excelente biocompatibilidad, alto contenido de agua, tamaños ajustables, y abundante espacio para acomodar bioactivos tales como fármacos y células vivas o anclar otros compuestos orgánicos.

La fabricación de nanogel con tamaños y funcionalidades controladas ha permitido el estudio de las primeras etapas de formación del hidrogel, ya que éstas son equivalentes a las condiciones existentes a pequeña escala, formándose nanoagregados más fáciles de interpretar [24].

3.6. REACCIÓN TIPO 'CLICK'.

A principios del S.XXI K. B. Sharpless y colaboradores desarrollaron un estudio que describía una nueva estrategia sintética basada en un grupo de reacciones eficientes, versátiles y selectivas que requerían unas condiciones de reacción suaves y métodos de purificación accesibles. A esta estrategia sintética se la denominó química 'click'.

El término de 'click' se utiliza para las reacciones que cumplen los siguientes criterios definidos en 2001 por el premio Nobel Karl Barry Sharpless: 'Una reacción click debe ser modular, amplia en su alcance, de alto rendimiento, capaz de crear únicamente

subproductos inofensivos, fácil de realizar y en la que los disolventes en los que se llevan a cabo son fáciles de eliminar' [25].

Muchas son las reacciones pueden incluirse dentro de este tipo de mecanismo como son: la reacción de Michael, algunas reacciones de formación de oximas e hidrazonas y las reacciones de cicloadición, destacando dentro de éstas las de cicloadición 1,3- dipolar [26].

La reacción que utilizamos sobre nuestros polímeros tipo elastina es una cicloadición [3 + 2] de azidas a acetilenos, también llamada cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre alquinos y azidas orgánicas. Esta reacción es la más representativa dentro de lo que se conoce como la química 'click' (Figura 3.6.1).

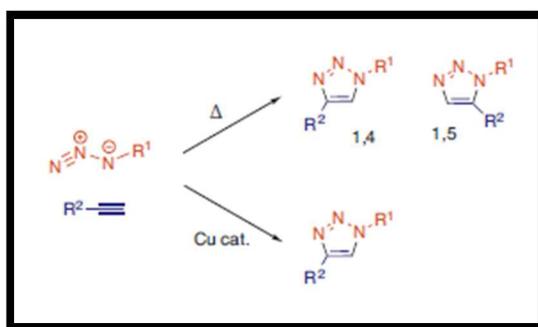


Figura 3.6.1: Reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre alquinos y azidas orgánicas.

Fue en el año 2002 cuando Sharpless y Meldal descubrieron que este proceso podía ser catalizado por adición de Cu(I) acelerándose la reacción de manera significativa. Esta adición se puede hacer de manera directa, mediante el uso de sales de Cu(I), o bien, mediante una reducción de sales de Cu(II) a Cu(I). Esta reacción es también llamada CuAAC, (*Copper-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition*) (Figura 3.6.2) [27].

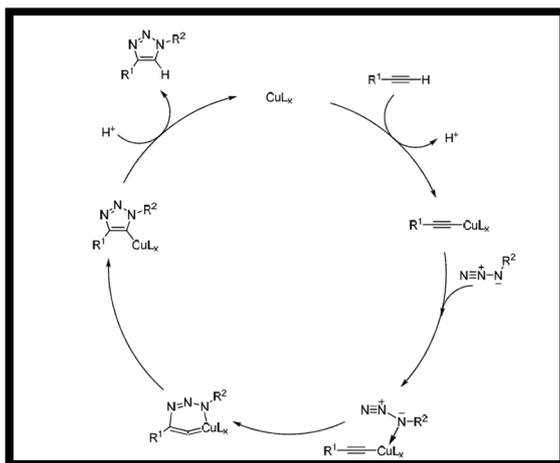


Figura 3.6.2: Ciclo catalítico de la reacción entre alquinos y azidas catalizada por cobre.

La temperatura requerida, o el uso de cobre para catalizar la reacción, hacen que este tipo de proceso no se pueda llevar a cabo para fines biológicos por posibles daños en células. Sin embargo, esta cicloadición se puede realizar a temperatura ambiente y sin necesidad de utilizar ningún tipo de catalizador si utilizamos un ciclo que soporte el triple enlace y sobre el cual se ha de producir la reacción

Esta reacción fue descrita por Wittig y Krebs a mediados del S.XX y fue utilizada por Bertozzi y colaboradores en 2004 utilizando un anillo de ciclooctino como portador del triple enlace (Figura 3.6.3). Debido a la liberación de la tensión estérica en el ciclooctino, estos procesos transcurren a temperatura ambiente en ausencia de catalizador. A esta reacción se la conoce por el nombre de SPAAC, *strain-promoted alkyne-azide cycloaddition* [28].

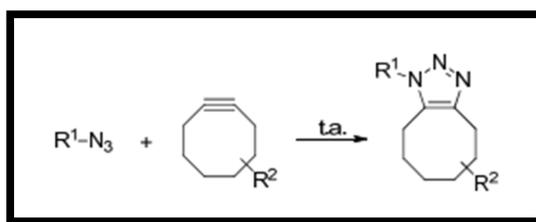


Figura 3.6.3: Reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre una azida y un triple enlace soportado sobre un ciclooctino obteniendo el 1,2,3-triazol correspondiente.

Hoy en día, las reacciones de cicloadición 1,3-dipolares están siendo explotadas con frecuencia hacia la síntesis de ciclos complejos esenciales para estudios con fines clínicos, biológicos y mecánicos.

4. MATERIALES, TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y MÉTODOS.

4.1. MATERIALES.

4.1.1. Reactivos y disolventes.

Reactivos	Fórmula molecular	Peso molecular (gr/mol)	Proveedores
Ácido 5-hexenoico	C6H10O2	114,14	Sigma Aldrich
Propargilamina	C3H5N	55,08	Sigma Aldrich
Hidróxido sódico	NaOH	39,99	Fisher Chemical
Ácido clorhídrico	HCl	36,46	Sigma Aldrich
Diciclohexilcarbodiimida (DCC)	C13H22N2	206,33	Acros Organics
N-hidroxisuccinimida (NHS)	C4H5NO3	115,09	Sigma Aldrich
Glicerina	C3H8O3	92,02	Fisher Chemical
Dodecil sulfato sódico (SDS)	NaC12H25SO4	288,37	Apollo Scientific
2-β-mercaptoetanol	C2H6OS	78,13	Sigma Aldrich
Tetrametilendiamina (TEMED)	C6H16N2	116,21	Sigma Aldrich
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)	C4H11NO3	121,14	Fisher Chemical
Mucina tipo III	-	-	Sigma Aldrich
Ácido 2-morfolino etanosulfónico monohidrato (MES)	C6H15NO5S	213,25	Sigma Aldrich
D-L-acetilhomocisteína tiolactona	C6H9NO2S	159,21	Sigma Aldrich
Espermina (spermine (3HHHN))	C10H24N6*3HCl	337,7	Irish Biotec

Tabla 4.1.1.1: Tabla de reactivos empleados y proveedores.

Disolventes	Proveedores
Éter	Sigma Aldrich
Hexano	Sigma Aldrich
Metanol	Sharlau
Etanol	Sigma Aldrich
Dimetilsulfoxido (DMSO)	Sigma Aldrich
DMSO-D6 (deuterado)	Sigma Aldrich
Diclorometano (DCM)	Sigma Aldrich
Butanol	Sigma Aldrich
Dimetilformamida (DMF)	Acros Organics
Etanol	Fisher Chemical
Acetona	Panreac

Tabla 4.1.1.2: Tabla de disolventes empleados y sus proveedores.

4.1.2. Materiales.

Se han utilizado materiales de plástico desechables en puntas de micropipeta, tubos falcon y eppendorf.

Todo tipo de material de vidrio necesario en un laboratorio para elaborar disoluciones o contener reacciones. Este material ha de estar siempre previamente lavado y aclarado con agua destilada.

Aquello que vaya a tener fines biológicos se ha de utilizar en las condiciones óptimas de esterilidad, lavado previamente con etanol Al 70% y autoclaveado.

4.2. EQUIPAMIENTO UTILIZADO INSTRUMENTALES.

Equipo	Casa Comercial	Localización
Infrarrojo Tensor27	Bruker	Instalaciones del grupo BIOFORGE
NanoDrop 2000c	Thermo-Scientific	Instalaciones del grupo BIOFORGE
RMN 400	Agilent Technologies	Edificio I+D+i
Rotavapor R-215	BÜCHI	Instalaciones del grupo BIOFORGE
Sonicador	J.P. Selecta	Instalaciones del grupo BIOFORGE
zSizer Nano	Malvern	Instalaciones del grupo BIOFORGE
Espectrómetro de masas Bruker Autoflex	Bruker	Edificio I+D+i
Centrifuga Avanti	Beckman	Instalaciones del grupo BIOFORGE
Centrifuga ST 16R	Thermo-Scientific	Instalaciones del grupo BIOFORGE
DSC 8822*	Mettler Toledo	Instalaciones del grupo BIOFORGE
Equipamiento de electroforesis	Biosciences/Bio-Rad	Instalaciones del grupo BIOFORGE
Incubadora de agitación orbital	Thermo electron Corporation	Instalaciones del grupo BIOFORGE

Tabla 4.2.1: Equipamiento utilizado durante el presente proyecto.

4.2.1. Espectroscopía de infrarrojo.

La espectroscopía IR mide las vibraciones de los átomos, y en base a esto, es posible determinar la grupos funcionales presentes. Generalmente, los enlaces más fuertes y átomos más ligeros vibran a una frecuencia alta de estiramiento (longitud de onda).

La luz infrarroja impuesta a una molécula no va a crear transiciones electrónicas pero contiene suficiente energía para interactuar con una molécula causando cambios de vibración y rotación. La molécula puede absorber la energía contenida en la luz incidente y el resultado es una rotación más rápida o una vibración más pronunciada.

Dentro de la espectroscopía de infrarrojo, se ha empleado la técnica FTIR-ATR, (Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de reflectancia total atenuada).

La espectroscopía de infrarrojo que utiliza la transformada de Fourier (FT-IR) fue desarrollada con el fin de superar las limitaciones encontradas con los instrumentos de dispersión. Se necesitaba un método capaz de medir todas las frecuencias de infrarrojo simultáneamente y la solución fue el uso de un instrumento óptico, el interferómetro.

La reflectancia total atenuada (ATR) permite el análisis cualitativo o cuantitativo de las muestras con una poca o nula necesidad de preparación previa, que acelera en gran medida el tiempo análisis.

El equipo utilizado para la aplicación de esta técnica descrita fue un espectrómetro de Infrarrojo Bruker, TENSOR 27 (*Figura 4.2.1.1*) equipado con un dispositivo de ATR (KBr) que permite la ejecución de espectrogramas en el MIR (espectro medio de infrarrojo) con un rango de entre 4000 a 400 cm^{-1} .

El programa utilizado para la computación de espectros fue el software OPUS, versión 4.2 (Mattson Instrument, INC).

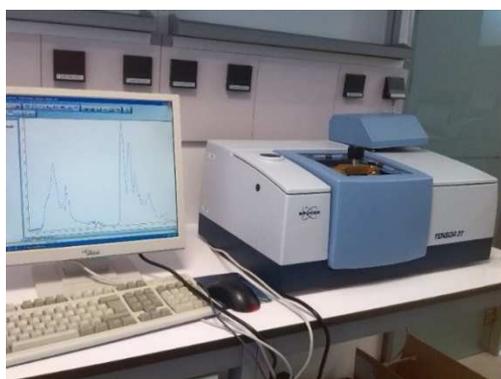


Figura 4.2.1.1: Equipo de FTIR-ATR Bruker TENSOR 27.

La muestra se coloca directamente sobre el pequeño cristal y el brazo se gira presionando la muestra hacia abajo sobre la cara superior del cristal para conseguir un mejor contacto.

4.2.2. Espectrofotometría UV-Vis.

La espectrofotometría es un método que se utiliza para medir la cantidad de luz que absorbe una sustancia química mediante la medición de la intensidad de la luz que atraviesa una disolución de una muestra. El principio en el que se basa es en que cada compuesto químico absorbe, transmite o refleja la luz (radiación electromagnética) a lo largo de un cierto rango de longitud de onda.

Un espectrofotómetro se utiliza para medir la diferencia entre la cantidad de luz que entra y la que sale de la muestra. La luz que pasa a través de la muestra (no absorbida) se llama luz transmitida. Esta diferencia entre la luz original y la transmitida es a lo que se le llama absorbancia.

La gráfica de absorbancia de luz de una muestra a diversas longitudes de onda se le llama espectro de absorción. (El eje de abscisas o horizontal se puede expresar en términos de longitud de onda y la ordenada o eje vertical en términos de absorbancia).

La ley de Lambert-Beer indica que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de una muestra y sólo puede aplicarse cuando hay una relación lineal: $A = \varepsilon \cdot l \cdot c$. Donde; A es la absorbancia, ε es el coeficiente de extinción molar, l es la longitud de la cubeta y c la concentración de la muestra.

El equipo utilizado en este caso para la aplicación de esta técnica fue un Espectrofotómetro NanoDrop 2000c UV-Vis de THERMO SCIENTIFIC (*Figura 4.2.2.1*) con un rango de medida del espectro de entre 190nm-840nm. Posee un pedestal en el cual con una cantidad mínima de muestra (0.5 – 2 μ L) es capaz de medir la absorbancia de un compuesto con una longitud de 'cubeta' de 1mm y tiempo de 3". Los espectros generados se obtienen a través del software propio del equipo para hacer el correspondiente tratamiento de los resultados.



Figura 4.2.2.1: Equipo espectrofotométrico NanoDrop 2000c UV-Vis de THERMO SCIENTIFIC.

El pequeño volumen de muestra se deposita sobre el pedestal y se baja el brazo para proceder a la medida.

4.2.3. Dinamic light scattering y laser Doppler velocimetry/phase analysis light scattering (PALS) (M3-PALS).

- *Dinamic light sattering (DLS)*

El *Dinamic light sattering (DLS* - también conocido como *Photon Correlation Spectroscopy o Quasi-Elastic Light Scattering*) es una de las técnicas de dispersión de luz más utilizadas, ya que permite analizar el tamaño de partículas como polímeros, proteínas, nanopartículas o coloides en disolución.

La muestra es irradiada por un rayo de luz láser y se detectan las fluctuaciones de la intensidad la luz dispersada en función del tiempo. El detector utilizado que capta esta luz dispersada suele ser un fotomultiplicador el cual está situado a un ángulo conocido de dispersión θ .

La técnica de DLS mide la difusión de las partículas que se mueven bajo el movimiento browniano, y la convierte al tamaño y una distribución de tamaño utilizando la relación de Stokes-Einstein.

El coeficiente de difusión D está relacionado con el radio R de las partículas a través de la ecuación de Stokes-Einstein: $D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$

Donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura y η la viscosidad.

El tamaño de partícula se da en términos del radio hidrodinámico. El radio hidrodinámico es el radio de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión que la partícula analizada: $d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$

- *Doppler velocimetry/phase analysis light scattering (PALS) (M3-PALS).*

Se utiliza para determinar el potencial zeta de las partículas presentes en la muestra y si éstas tienden a flocular a partir de la determinación de la movilidad electroforética.

El potencial zeta: potencial existente entre la superficie de la partícula y el líquido de dispersión que varía en función de la distancia a la superficie de la partícula (*Figura 4.2.3.1*).

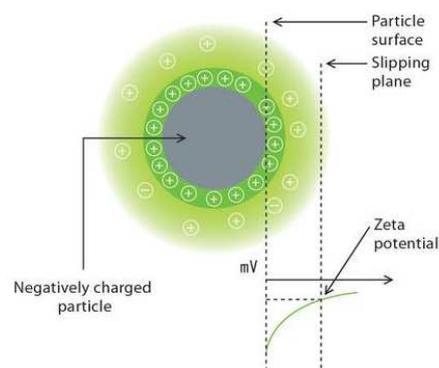


Figura 4.2.3.1: Representación esquemática del potencial zeta.

La técnica *M3-PALS* es una mejora del tradicional velocímetro de láser Doppler combinándole con el *Phase Analysis Light Scattering* y con la implementación M3, la aplicación del M3-PALS permite analizar muestras de muy baja motilidad y calcular sus distribuciones de movilidad.

Se aplica un campo eléctrico a una disolución de moléculas o a una dispersión de partículas, que como respuesta se van a mover con una velocidad hacia el electrodo correspondiente que va a estar relacionada con su potencial zeta.

La velocidad de una partícula en una unidad de campo eléctrico se conoce como movilidad electroforética. Y el potencial zeta está relacionado con la movilidad electroforética a través de la ecuación de Henry: $U_E = \frac{2\epsilon z f(ka)}{3\eta}$

Donde; U_E es la movilidad electroforética, z es el potencial zeta, ϵ la constante dieléctrica, η la viscosidad y $f(ka)$ es la función de Henry, donde k es el espesor de la doble capa eléctrica situada alrededor de la partícula cargada, y a el radio de la partícula.

Ambas técnicas son no destructivas y las muestras se pueden volver a recuperar tras el análisis.

En nuestro caso, el equipo utilizado para la determinación del tamaño de partícula y potencial zeta de las muestras aplicando las anteriores técnicas fue el Malvern Zsizer Nano ZSP (Figura 4.2.3.2). Utiliza como fuente de luz un láser de He-Ne 633nm con un rango de temperaturas de uso admisibles de medidas de entre 0 y 90°C.



Figura 4.2.3.2: Equipo Malvern Zsizer Nano ZSP.

4.2.4. Electroforesis.

Las proteínas son macromoléculas que llevan una carga global a un pH particular, por lo tanto, pueden ser separadas en función a su tamaño mediante una electroforesis en gel.

Para que la migración no se vea afectada por su estructura terciaria, las proteínas deben ser desnaturalizadas por calentamiento y tratamiento con un detergente (SDS o dodecil sulfato de sodio).

Los geles de proteínas se componen de poliacrilamida (electroforesis en gel de poliacrilamida o PAGE). La polimerización de la acrilamida es un proceso químico provocado por el compuesto TEMED.

Los geles de poliacrilamida están divididos en dos secciones. La sección superior, donde se crean los pocillos y se cargan las muestras, denominada *'stacking gel'*. Está compuesto generalmente por un 3,5-4% de poliacrilamida y pH 6,8. En este gel, las proteínas forman bandas discretas que mejoran su resolución. La sección inferior se le denomina *'resolving gel'* y oscila desde un 4 hasta un 20% de poliacrilamida (en función de las proteínas investigadas) y pH 8,8. Es en el gel de resolución en el que se analizan las bandas de proteína.

Posteriormente a la formación del gel, éste se coloca en una cubeta que contiene una disolución tampón, se depositan las muestras en los pocillos y se aplica una corriente eléctrica con un amperaje constante, 25mA (*Figura 4.2.4.1*).

Tras la electroforesis se obtendrá el gel a través del cual las proteínas han migrado y se procederá a su tinción, normalmente de azul, con azul de Coomassie o con una sal de cobre, para poder observar las proteínas y clasificarlas según su tamaño.



Figura 4.2.4.1: Electroforesis en gel de poliacrilamida, cubeta.

4.3. MÉTODOS.

4.3.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE POLÍMEROS TIPO ELASTINA.

La biosíntesis se puede esquematizar en (*Figura 4.3.1.1*):

- Diseño y construcción del gen que codifica la proteína de interés y su clonaje en un plásmido que posea un fuerte control transcripcional.
- Inserción del vector recombinante en células bacterianas capacitadas para su clonación y análisis.
- Análisis de los plásmidos introducidos en las bacterias, realizando una búsqueda del clon deseado y controlando la exactitud de la secuencia de ADN plasmídico.

- Transformación de una cepa bacteriana de expresión del plásmido elegido.
- Producción de la biomasa e inducción de la expresión del polipéptido recombinante.
- Purificación del polipéptido de interés.

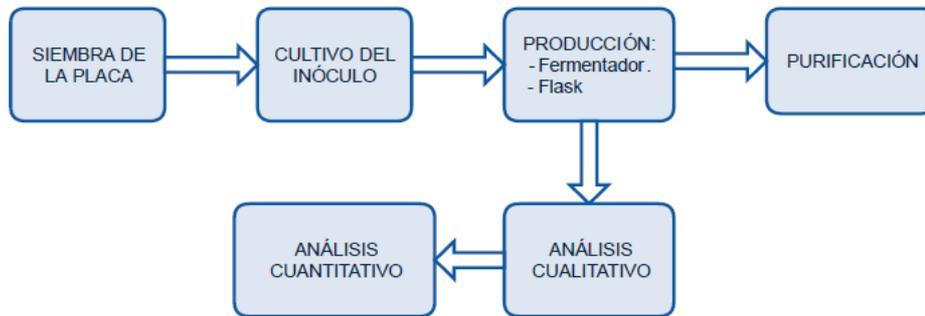


Figura 4.3.1.1: Diagrama de flujo de la bioproducción del polímero diseñado.

1. Siembra de la placa.

Para la síntesis del polímero se utiliza una cepa de *Escherichia coli* previamente modificada genéticamente en el laboratorio de biología molecular de las instalaciones del grupo BIOFORGE.

La siembra se lleva a cabo en placas de LB agar ayudándonos de un asa de platino. En las placas además del medio, tenemos el antibiótico al que la cepa tiene resistencia y un porcentaje diferente de glucosa en función del biopolímero que finalmente obtengamos para aportar los nutrientes necesarios para que se puedan reproducir las bacterias. Todo esto en condiciones asépticas y en campana de flujo laminar.

2. Cultivo del inóculo.

Utilizando un asa de platino o un palillo de madera estéril que nos pueda hacer la misma función, se siembra cada colonia seleccionada, se deja que se reproduzca durante 24 h en agitación orbital constante a 250 rpm y una temperatura de 37°C.

Después se selecciona aquella colonia cuya bioproducción haya sido máxima, en base al resultado obtenido de la realización de una electroforesis de proteínas (SDS-PAGE). En el “screening” podemos analizar el crecimiento de cada una.

La colonia seleccionada será la que se utilice para el proceso de producción del biopolímero.

3. Crecimiento bacteriano.

Para poder analizar el crecimiento bacteriano el método utilizado es una espectroscopía de UV-Vis, midiendo la absorbancia del medio podemos saber la cantidad de células presentes en él.

Si se representa en una gráfica la biomasa en función del tiempo podemos observar el perfil que sigue el crecimiento bacteriano y cada una de sus fases (*Figura 4.3.1.2*):

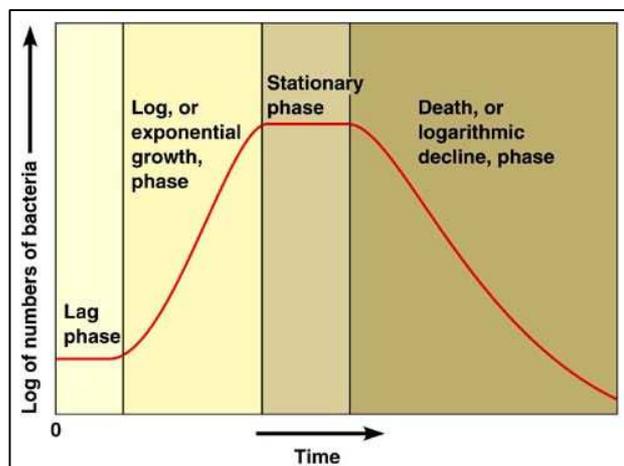


Figura 4.3.1.2: Gráfica de crecimiento bacteriano.

Estas fases las podemos diferenciar midiendo la absorbancia a diferentes tiempos. El valor máximo de absorbancia lo obtendremos en la fase estacionaria, éste va a depender de diversos factores y va a ser diferente para cada cepa bacteriana y colonia seleccionada. Cuando se observa que la absorbancia empieza a caer se debe parar el proceso de crecimiento ya que significa que las células están empezando a entrar en la fase de 'muerte celular'.

4. Producción.

El cultivo de las bacterias se puede realizar tanto en fermentador como en un matraz Erlenmeyer, "flask". La diferencia entre ambas va a ser el control de las condiciones bajo las que se desarrolla la producción. Mientras que en el fermentador se pueden controlar variables importantes en el proceso tales como el pH, la temperatura o la cantidad de

O₂ en el medio, en “flask” únicamente se puede controlar la temperatura a la que se pone el medio de producción y la agitación que proporciona la incubadora.

4.1. Cultivo en flask.

La producción del biopolímero se llevó a cabo en matraces erlenmeyer de 2L, utilizando 500mL de medio de cultivo. En este caso se utilizaron 12 matraces erlenmeyer de PVC; como medio de cultivo TB suplementado con el antibiótico adecuado, que será diferente según el ELR que se desea obtener y como microorganismos la colonia seleccionada que dio lugar a una bioproducción máxima.

A cada matraz se le añaden 500mL de medio de cultivo TB, 5mL de antibiótico y 25μl de bacteria a T^a ambiente.

Estos erlenmeyers se colocan en una incubadora en la que se mantienen a 37°C y una agitación orbital de 250rpm durante el tiempo necesario hasta poder verificar que el cultivo ha entrado en la fase de ‘muerte celular’.

Para poder verificar la entrada en esta fase es necesario controlar el crecimiento celular del cultivo, el cual se lleva a cabo como ya se ha citado anteriormente mediante medidas regulares de la absorbancia del cultivo a $\lambda = 600\text{nm}$, para que se pueda cumplir una relación lineal entre absorbancia y crecimiento del cultivo hay que diluir la muestra a medir.

Este proceso duró aproximadamente 24h. Tras este periodo de tiempo se transfieren los volúmenes contenidos en cada uno de los 12 matraces erlenmeyer utilizados en el cultivo a unos recipientes con capacidad de 2 L. Se realiza una centrifugación a 4200rpm y a una temperatura de 12°C durante 12 minutos, separando así las células para su posterior lavado.

5. Lavado de células.

Las células sedimentadas por centrifugación se recogen del fondo del recipiente utilizando una espátula y agitando vigorosamente, a continuación se resuspenden en una disolución tampón de lavado de bacterias (Tris-base 20mM y NaCl 140mM, pH 8) hasta llenar los 2 L de capacidad de cada uno de los recipientes.

Para el lavado de las células resultantes del cultivo se procede a la realización de varios ciclos de centrifugación y resuspensión de las células a 8000 rpm y 4°C y la disolución tampón citada previamente. Se suelen realizar 3 ciclos de lavado de células con este procedimiento o hasta que el sobrenadante obtenido sea transparente.

Después del último ciclo de lavado las células se resuspenden en un tampón de sonicación (Tris- base 20mM, EDTA 1mM y PMSF mM, pH 8).

6. Purificación.

En este caso para llevar a cabo la purificación, las células obtenidas en el proceso anterior se someten a una ruptura celular utilizando un equipo que las rompe liberando su contenido, este equipo se denomina disruptor de células ultrasónico. Este proceso se realiza manteniendo a una Tª de 0°C, tanto la suspensión de células en el tampón de sonicación como el producto resultante de la ruptura.

Este producto se pasa a unos recipientes de centrifuga y se centrifuga a 14000 rpm y 4°C durante una hora.

Tras la centrifugación se recoge el sobrenadante en un erlenmeyer de vidrio y se calienta a 42°C durante 2 horas, o se acidifica hasta obtener un pH de aproximadamente 4 con HCl manteniendo una temperatura de 0°C durante la acidificación y agitación constante para la homogeneización de la disolución.

El material precipitado se retira tras una centrifugación rápida de 15 min a 11000 rpm y 4°C ya que estará compuesto en su mayoría por proteínas desnaturalizadas por la modificación del pH que no nos interesan.

El sobrenadante procedente de la centrifugación o del calentamiento a 42°C se lleva a 4°C (temperatura a la cual el 'elastin like' se encuentra en disolución) y se mantienen durante toda la noche en la cámara fría y agitación constante.

Después de pasar toda la noche en agitación y baja Tª la disolución resultante se centrifuga a 14000 rpm en frío (4°C-5°C) durante una hora. Después al sobrenadante resultante se le somete a un ciclo de 40 minutos de calentamiento/centrifugación (20'/20') a una temperatura de 35°C en ambos casos y 7000 rpm en la centrifugación. A

esta Tª el polímero bioproducido precipita y separaremos el precipitado obtenido del sobrenadante, el cual llevará compuestos que no nos interesan.

El precipitado se resuspende en frío con H₂O-MQ y se le purifica con una diálisis, en la cual eliminaremos sales que se encuentran impurificando el polímero que queremos obtener.

Mediante una electroforesis SDS PAGE podremos finalmente determinar la pureza del polímero resultante, etiquetarlo y almacenarlo correctamente.

En cada paso del proceso de producción se han ido tomando muestras, tanto del sobrenadante como del precipitado, para poder comprobar como en cada paso vamos obteniendo un polímero más puro y verificar que la parte que desechamos en cada etapa no contiene polímero, ya que no nos interesa perder nada de producto al ser éste un proceso muy costoso.

4.3.2. MODIFICACIÓN DE LOS RECOMBINÁMEROS TIPO ELASTINA.

4.3.2.1. ELRs sometidos a modificación.

Los ELR que van a ser modificados en este proyecto van a ser los siguientes:

- ELR-VOKx72:

En el caso del ELR-VOK, existe una secuencia de iniciación al comienzo de la cadena polimérica, MESLLP. El componente estructural principal se basa en la repetición de un dominio formado por 5 aminoácidos (VPGKG) un total de 72 veces, donde el residuo huésped es la Lisina (K). Este residuo huésped confiere a la proteína recombinante una carga neta positiva.

- ELR-VKVx24:

El recombinámero ELR-VKV está compuesto por una secuencia de iniciación, la cual aparece al principio de la cadena (MESLLP), y un bloque de repetición compuesto por dos tipos de secuencias, (VPGVG)₅, donde el residuo huésped es la Valina y se repite un total de 5 veces dentro del dominio de repetición y (VPGKG), en la cual el residuo huésped es la Lisina (K). El dominio de

repetición se repite un total de 24 veces. El ELR-VKVx24 tiene una carga neta positiva.

Biopolímero ELR	Secuencia de iniciación	Secuencia de repetición	PM/Da
VOKx72	MESLLP	(VPGKG)x72	32364
VKVx24	MESLLP	[(VPGVG)5VPGKG]x24	60462

Tabla 4.3.2.1.1: Tabla resumen de las principales características de los biopolímeros ELR utilizados.

4.3.2.2. Modificación del extremo C-terminal de ELR-VOKx72.

Para obtener los polímeros modificados que necesitamos, portadores de un grupo azido terminal/alquínilo terminal, necesitamos modificar el extremo carboxilo de nuestro polipéptido ELR.

La síntesis de las amidas a partir de los ácidos carboxílicos correspondientes es una transformación básica en síntesis orgánica, siendo particularmente útiles para la preparación de enlaces peptídicos.

En este caso hemos elegido dos posibles vías para producir la reacción combinando diferentes compuestos y condiciones.

4.3.2.2.1. Modificación del extremo C-terminal del ELR VOKx72 con un compuesto que contiene un triple enlace terminal, propargilamina.

La modificación se va a realizar acoplando una molécula de propargilamina al extremo C-terminal del biopolímero ELR-VOKx72 proporcionando el grupo alquínilo que necesitamos al extremo de la cadena polipeptídica (*Figura 4.3.2.2.1.1*).

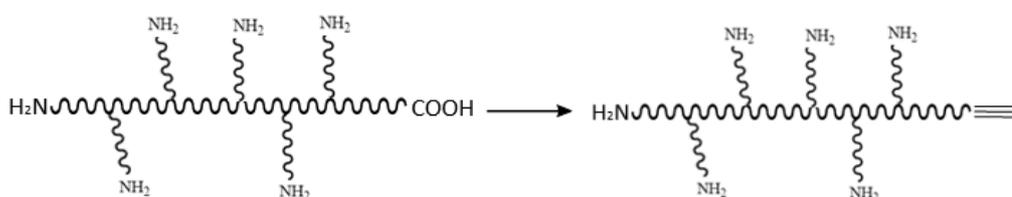


Figura 4.3.2.2.1.1: Modificación del extremo C-terminal de ELR-VOKx72 por acoplamiento de una molécula de propargilamina.

En primer lugar, esta modificación se va a llevar a cabo a través de un mecanismo de reacción mediado por la DCC.

Se modificaron 100 mg de ELR VOKx72 (PM = 32314 Da, $3,0 \cdot 10^{-3}$ mmol, 1 eq), los cuales se depositaron en un matraz de fondo redondo transparente en atmósfera inerte de N₂ y se disolvieron en 3 mL de DMSO; a la disolución obtenida se le añadió 1 mL de una disolución de DCC en DMSO (PM = 206,3 g/mol, 0,61 mg, $3'0 \cdot 10^{-3}$ mmol, 1 eq). Esta masa se tuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora, a continuación se añadieron 100 µL de una disolución de propargilamina de 165 mg/mL (PM = 55,1g/mol, 16,5 mg, 0,30 mmol, 100eq), obteniendo una masa final de reacción de aproximadamente 5 mL. La reacción se mantiene durante 3 días en constante agitación, a temperatura ambiente y atmósfera de N₂.

La purificación del producto resultante se realiza por ciclos de diálisis en H₂O-MQ (3x5L). La posterior liofilización da lugar a los correspondientes derivados sólidos de aspecto algodonoso.

Utilizando un segundo método, la modificación se va a realizar acoplado una molécula de propargilamina a través del mecanismo de reacción mediado por la combinación de compuestos DCC/NHS proporcionando el grupo alquínico que necesitamos al extremo de la cadena polipeptídica.

En este caso se modificaron 30,2 mg de VOKx72 (PM = 32314 Da, $9,34 \cdot 10^{-4}$ mmol, 1 eq), disueltos en 3 mL de DMSO. A la disolución obtenida se le añadieron 0,25 mL de una disolución de DCC de 0,8mg/mL en DMSO (PM = 206, 3 mg/mol, 0,2 mg, $9,34 \cdot 10^{-4}$ mmol, 1 eq) y se mantiene en agitación constante a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 0,10 mL de una disolución de NHS de 1,0 mg/mL en DMSO (PM = 115,1g/mol, 0,10 mg, $9,34 \cdot 10^{-4}$ mmol, 1eq). Finalmente, pasada 1 hora, se añadieron 0,3 mL de una disolución de propargilamina de 20 µl/mL en DMSO (PM = 55,1 g/mol, 5,14 mg, 0,093 mmol, 100 eq). Tras 24h de reacción se procedió a la purificación del producto.

La purificación realizó siguiendo el mismo procedimiento que en el caso anterior.

4.3.2.2.2. Modificación del extremo C-terminal del ELR VOKx72 con un compuesto que contiene un grupo azido terminal, espermina.

A la vista de los resultados obtenidos en las reacciones anteriores, la modificación del extremo C-terminal del biopolímero ERL-VOKx72 con la espermina se llevó a cabo utilizando el segundo método de reacción. En este segundo método la modificación se realiza a través de un mecanismo arbitrado por la combinación de compuestos DCC/NHS con exceso de equivalentes del reactivo aminado (*Figura 4.3.2.2.2.1*).

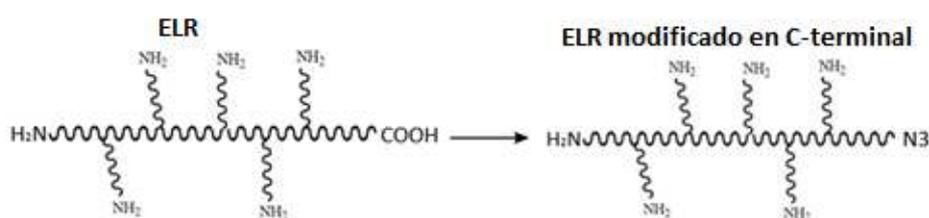


Figura 4.3.2.2.2.1: Representación de la modificación del extremo C-terminal del ELR correspondiente por compuesto que contiene un grupo azido terminal.

Para esta reacción se utilizaron las mismas condiciones que en las reacciones anteriores; atmósfera inerte (N_2) y temperatura ambiente.

Se disolvieron 70,5 mg de VOKx72 ($PM = 32314 \text{ Da}$, $2,18 \cdot 10^{-3} \text{ mmol}$) en 5 mL de DMSO. A la disolución resultante se le añadieron 0,32 mL de una disolución de DCC de 1,4 mg/mL en DMSO ($PM = 206,3 \text{ g/mol}$, 0,45 mg, $2,18 \cdot 10^{-3} \text{ mmol}$, 1 eq). Pasados aproximadamente 25 minutos, se añadieron 0,17 mL de una disolución de NHS de 1,4 mg/mL en DMSO ($PM = 115,1 \text{ g/mol}$, 0,24 mg, $2,18 \cdot 10^{-3} \text{ mmol}$, 1 eq).

Por último, una hora después, se añadieron 6 mL de una disolución de espermina de 6,14 mg/mL en DMSO ($PM = 337,7 \text{ g/mol}$, 36,8 mg, 0,11 mmol, 50 eq) obteniendo una masa final de reacción de aproximadamente 10 mL. La reacción se deja en agitación durante 48h y se purifica.

La purificación del producto resultante se realiza por ciclos de diálisis en H_2O -MQ (3x5L). La posterior liofilización da lugar a los correspondientes derivados sólidos de aspecto algodonoso.

4.3.2.3. TIOLACIÓN. Modificación de los grupos ϵ -amino de los aminoácidos Lisina presentes en la estructura de ELR-VKVx24.

Los recombinámeros tipo elastina (ELRs) se modifican químicamente transformando los grupos ϵ amino (*Figura 4.3.2.3.1*) presentes en la cadena lateral de los aminoácidos lisina que se encuentran a lo largo de la cadena principal del biopolímero.

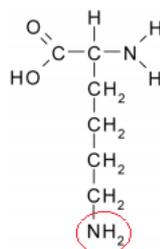


Figura 4.3.2.3.1: Grupo ϵ amino de la lisina susceptible de sufrir la reacción de tiolación.

Para esta modificación utilizaremos un compuesto que contenga un grupo funcional que nos aporte un grupo tiol al reaccionar con estos grupos amino. A esta reacción se la denomina 'tiolación' (*Figura 4.3.2.3.2*).

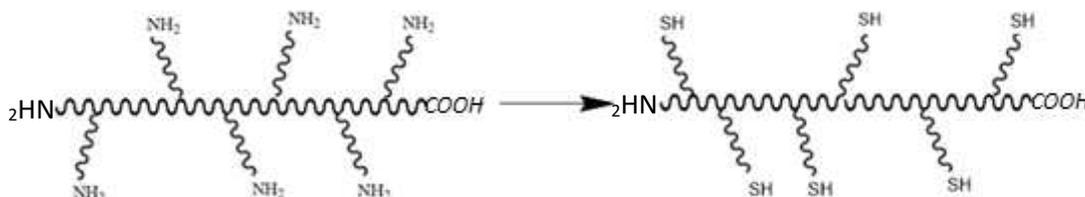


Figura 4.3.2.3.2: Modificación de las cadenas laterales del ELR a través de la reacción de tiolación sobre los grupos amino presentes en las lisinas de la secuencia polipeptídica.

Se hicieron varias pruebas de esta modificación sobre el mismo tipo de polímero, VKVx24, variando ligeramente las condiciones entre cada una de ellas para poder conseguir una optimización de las mismas y el máximo rendimiento posible.

4.3.2.3.1.1. Reacción de tiolación del VKVx24 con 1,5/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio HCl pH 4.

En este caso en la reacción se utilizaron 1,5 moles de tiolactona por mol de polímero. El polímero posee 24 lisinas y, por lo tanto, 24 grupos amino reactivos. Por

este motivo, el número de equivalentes utilizado en la reacción sería de 1,5/24 equivalentes. El medio de reacción utilizado fue HCl a pH 4.

El motivo de la elección de estos equivalentes para la reacción era poder conseguir tener al menos un grupo tiol por cada cadena polimérica.

En un matraz de fondo redondo opaco de 50 mL de capacidad se añadieron 100 mg de polímero VKVx24 (PM = 60462 Da, $1,64 \cdot 10^{-3}$ mmol, 24 lisinas, 1 eq), en atmósfera inerte de N₂, y se disuelven en 8,50 mL de una disolución acuosa de HCl pH 4. Una vez disuelto el polímero, se adiciona βmercaptoetanol que ayudará a adecuar las condiciones reductoras necesarias, en una relación al 0,3% (v/v), (0,54 mL de una disolución de 100 mgβmercapto/2mLdis (PM = 78, 13 g/mol, 27 mg, 0,34 mmol); y, a continuación, se añade el reactivo acetilhomocisteína tiolactona (PM = 159,2 g/mol, 0,39 mg, $2,47 \cdot 10^{-3}$ mmol, 1,5/24 eq) hasta un volumen total de la disolución de 9,50 mL y pH 4,87 de la disolución resultante.

La reacción se mantuvo durante 3 días en constante agitación, RT y atmósfera de N₂. La purificación del producto se realiza mediante ciclos de diálisis (3x 5L) contra una disolución de HCl H₂O-MQ $2,00 \cdot 10^{-4}$ M pH 5,3. La liofilización posterior de la masa de reacción produce un sólido blanco esponjoso.

4.3.2.3.1.2. Reacción de tiolación del VKVx24 con 3/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio HCl pH 4.

Con objeto de optimizar el rendimiento de la reacción y poder obtener un mayor número de grupos tiol se aumentaron el número de equivalentes de reactivo a los que enfrentábamos el polímero en la reacción de tiolación.

A 100 mg de ELR-VKVx24 (PM = 60462 Da, $1,64 \cdot 10^{-3}$ mmol, 24 lisinas, 1 eq) en iguales condiciones que en la reacción anterior, se añade βmercaptoetanol en una relación de 0,7% (v/v), tras obtener las condiciones reductoras requeridas se añade el reactivo, acetilhomocisteína tiolactona (0,78 mg, $4,94 \cdot 10^{-3}$ mmol, 3/24 eq). Obteniendo, en este caso, una masa de reacción con un pH 5,08.

La purificación del producto resultante se llevó a cabo siguiendo los mismos procesos que en el caso anterior tras 3 días de reacción.

4.3.2.3.1.3. Reacción de tiolación del VKVx24 con 1,5/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio buffer MES pH 3,83.

En esta reacción se cambió el medio que proporciona este pH ligeramente ácido necesario para la reacción, siendo ahora el tampón MES 0,075 M con pH 3,83 el encargado de dicha función.

En condiciones reductoras, 100 mg de ELR-VKVx24 (PM = 60462 Da, $1,64 \cdot 10^{-3}$ mmol, 24 lisinas, 1 eq) se disuelven en 8,50 mL de tampón MES pH 3,83. Se añade el β mercaptoetanol al 0,3% (v/v) con respecto al volumen total de la masa de reacción (PM = 78,1 g/mol, 27 mg, 0,34 mmol).

Por último, se añade la acetilhomocisteína (PM = 159,2 g/mol, 0,39 mg, $2,47 \cdot 10^{-3}$ mmol, 1,5/24 eq). El volumen total de la disolución de es 9,50 mL y pH 5,02.

Tras 3 días en agitación se da por finalizada la reacción y se purifica el producto obtenido mediante ciclos de diálisis (3x 5L) contra una disolución de HCl H₂O-MQ $2,00 \cdot 10^{-4}$ M pH 5,3. La liofilización posterior de la masa de reacción produce un sólido blanco esponjoso.

4.3.2.3.1.4. Reacción de tiolación del VKVx24 con 3/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio buffer MES pH 3,83.

En esta reacción se aumentaron los equivalentes del reactivo para poder comprobar los problemas o las ventajas que nos puede generar el uso de una mayor cantidad de reactivo.

A una misma cantidad de polímero ELR-VKVx24 (PM = 60462 Da, 100 mg, $1,64 \cdot 10^{-3}$ mmol, 24 lisinas, 1 eq) y en iguales condiciones que los casos anteriores (N₂, RT, β -mercaptoetanol 0,7% (v/v), etc) se la hizo reaccionar con 0,78 mg de la tiolactona (PM = 159,2 g/mol, $4,94 \cdot 10^{-3}$, 3/24 eq). Teniendo un volumen total de disolución de 10 mL y pH 5,3.

Tras 3 días de reacción, al producto se le sometió al procedimiento de purificación ya expuesto.

4.3.2.3.1.5. Reacción de tiolación del VKVx24 con 10/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio HCl pH 4.

A la vista de los resultados obtenidos en las reacciones previas se decidió hacer una reacción de tiolación pero esta vez con un mayor número de equivalentes del reactivo homoacetilcisteína tiolactona (10/24 eq) persiguiendo introducir un mayor número de grupos tiol a la cadena polimérica para su posterior aplicación. El mecanismo de la reacción es exactamente igual a los casos anteriormente citados y descritos.

Tras la total disolución del polímero ELR-VKVx24 (PM = 60462 Da, 100 mg, $1,64 \cdot 10^{-3}$ mmol, 24 lisinas, 1 eq) en 8 mL de una disolución acuosa de HCl pH 4, se agregó el β mercaptoetanol al matraz de reacción, en una relación de 0,7% (v/v) con respecto al volumen final de la disolución. Una vez adquiridas las condiciones reductoras necesarias para el transcurso de la reacción, se añaden 10 eq de reactivo (2,65 mg, PM = 159,2 g/mol, 0,0016 mmol, 10eq).

Por último, la purificación del producto se realiza pasados los 3 días de reacción siguiendo los procesos ya mencionados, ciclos de diálisis (3x5L) contra una disolución de HCl H₂O-MQ $2,00 \cdot 10^{-4}$ M pH 5,3. La liofilización posterior de la masa de reacción produce un sólido blanco esponjoso.

4.3.3. REACCIÓN DE AMIDACIÓN ENTRE EL ÁCIDO 5-HEXENOICO Y LA ESPERMINA.

La molécula que pretendemos hacer reaccionar con el ELR VOKx72 posee 3 grupos amino (*Figura 4.3.3.1*) susceptibles de poder reaccionar, es por ello que esta reacción se hizo en forma de un ensayo de concepto.

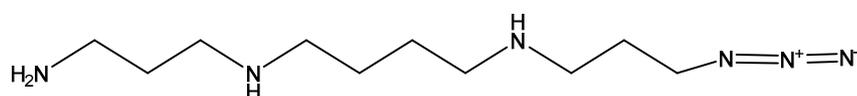


Figura 4.3.3.1: Espermina.

A un volumen de 3,33mL de una disolución de 3 mg/mL de ácido 5-hexenoico en metanol (PM = 114,1 g/mol, 10,0 mg, 0,09 mmol, 1 eq) se le acondiciona en un matraz de reacción en atmósfera inerte de N₂. Se añaden 0,40mL de una disolución de DCC de 45,0 mg/mL en MeOH (PM = 206,3g/mol, 18,0 mg, 0,09 mmol, 1 eq). Tras una hora en agitación constante y RT, se añaden 3mL de una disolución de espermina de 9,79 g/mL

(337,3 g/mol, 29,4 mg, 0,09 mmol, 1 eq). Obteniendo una masa de reacción total de aproximadamente 6,50 mL. La reacción se mantuvo durante 4 horas en agitación y RT hasta que se retiró y se procedió a la extracción del producto resultante.

A esta masa bruta se la caracterizó mediante un espectro de ^1H RMN y se comprobó que se encontraba impurificada por restos de reactivos.

El bruto de reacción se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando una relación de éter:hexano (5:1) como eluyente.

4.3.4. ELABORACIÓN DE NANOGELES.

Los nanogeles que se utilizaron en este estudio están formados a partir de ELRs modificados (VKV-ciclo/VKV-azida) [29], a los cuales se les ha incorporado químicamente grupos azido y ciclooctinos en las cadenas laterales a través de una reacción con los grupos ϵ amino de las lisinas presentes en el polímero. De esta manera se hace posible la reacción química tipo 'click' entre ambos ELRs modificados sin necesidad de catalizador al ponerles en contacto uno con el otro (*Figura 4.3.4.1*).

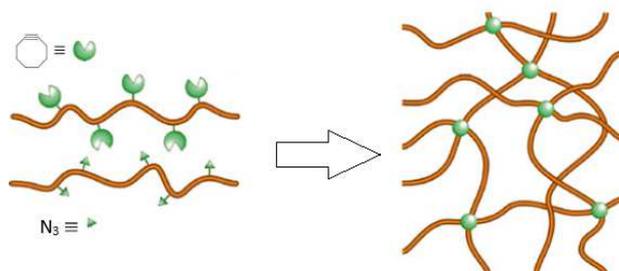


Figura 4.3.4.1: Reacción 'click' entre los polímeros VKV-N3 y VKV-ciclo, obteniendo estructuras reticuladas.

Al tratarse de nanogeles, esta reacción se realiza en condiciones suaves y disoluciones diluidas, propias de la reacción tipo 'click' y de la elaboración de nanogeles, respectivamente. El resultado de este proceso no se podrá apreciar a simple vista pero podremos analizar el producto resultante mediante la técnica de *DLS (dinamic light scattering)* y midiendo el potencial zeta de las partículas obtenidas.

Los nanogeles que producimos se pueden elaborar a dos temperaturas diferentes, 4°C y 37°C , obteniendo en cada caso una estructura distinta. La temperatura

elegida para este experimento fué de 37°C, a la cual los nanogeles adquieren una forma esférica (Figura 4.3.4.2).

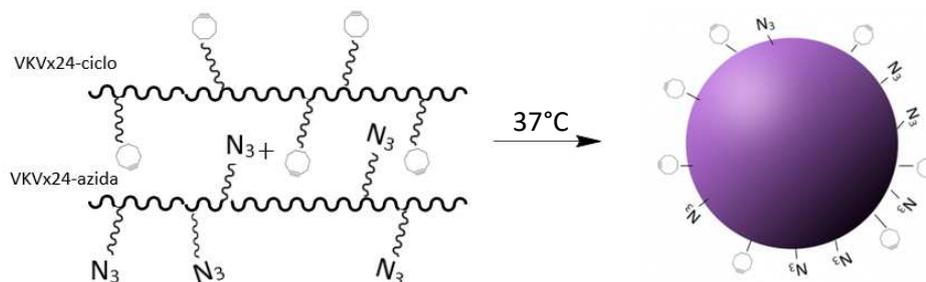


Figura 4.3.4.2: Obtención de nanogeles con forma esférica a 37°C.

Para la elaboración de los nanogeles se necesita preparar dos disoluciones diluidas de los polímeros modificados VKV-N₃ y VKV-ciclo, a 1 mg/mL.

Disolverlas y mantenerlas a 4°C 'overnight', asegurándonos así de su completa disolución para su utilización el día siguiente.

Tras este paso, estas disoluciones se filtran con un filtro con un tamaño de poro de 0,4 µm a 4°C.

Ya que la elaboración de los nanogeles va a ser a 37°C, antes de su preparación se ponen a temperatura ambiente para que no haya un cambio brusco de temperatura que pueda causar alguna alteración en la estructura de los polímeros previa a la reacción 'click' que se va a llevar a cabo.

Una vez atemperadas las disoluciones, éstas se mezclan en iguales proporciones 1:1, obteniendo 2,0 mL de disolución total, la cual inmediatamente se incuba a 37°C y pasados 40' se analiza su tamaño y potencial zeta con el equipo Malvern Zsizer Nano ZSP verificando que se ha producido la reacción tipo 'click' y que tenemos los correspondientes nanogeles en la disolución.

4.3.5. Ensayos de mucoadhesión.

Para verificar que los polímeros modificados cumplen con la finalidad deseada se les va a someter a unas pruebas de mucoadhesión.

En estas pruebas se van a analizar cada uno de los polímeros obtenidos para determinar si cumplen la función para la cual han sido modificados. Es decir, vamos a

determinar qué capacidad mucoadhesiva poseen y si ésta va a ser útil para su aplicación en hidrogeles.

Para poder determinar esta aplicación se van a utilizar nanogeles (hidrogeles a nanoescala) los cuales van a ser más sencillos de trabajar y analizar.

A estos polímeros y nanogeles se les va a enfrentar a un material que pueda mimetizar las membranas mucosas oculares para determinar si se produce o no la adherencia y si se produce, en qué medida. En este caso lo que vamos a utilizar es MUCIII, mucina tipo III (de estómago de cerdo).

4.3.5.1. Procedimiento de preparación de mucinas.

Para poder utilizar la MUCIII se necesita un tratamiento previo, ya que al tratarse de proteínas de origen animal es difícil su control y homogeneidad dentro de la disolución. Es por eso que se precisa medir tamaños de partícula y potenciales zeta de las mucinas en disolución para después obtener resultados interpretables en cualquier prueba que requiera su uso.

- *Tratamiento de la mucina tipo III:*

Se pesa una cantidad determinada de MUCIII el día anterior a su uso y se disuelve obteniendo una disolución con una concentración de 2 mg/mL y se deja en agitación orbital constante a 37°C 'overnight'.

La disolución de MUC tipo III, repartida en pequeños volúmenes en diferentes viales de vidrio, se somete a un tratamiento de sonicación por ultrasonidos que rompe los agregados de las partículas de mucina, hasta obtener un tamaño de partícula inferior a 1µm, medida por *DLS (Malvern Zsizer ZSP)*.

Por último, se reúnen todos los volúmenes en un tubo falcon y se centrifuga a 13000 rpm durante 10' y se recupera el sobrenadante.

Los tamaños de partícula y potenciales zeta obtenidos de las proteínas en las disoluciones de MUCIII utilizadas tras este tratamiento se pueden ver en el apartado de resultados.

4.3.5.2. Medidas de las propiedades mucoadhesivas.

La turbidez se define como la reducción de la transparencia de un líquido causada por la presencia de partículas no disueltas de material distinto al propio líquido. La turbidez es un indicador de apariencia óptica ocasionado por la dispersión y absorción de la energía lumínica a través del líquido (*Figura 4.3.5.2.1*) y es proporcional a la concentración de partículas; cumpliendo la Ley de Lambert-Beer ($A = -\log \frac{I}{I_0} = \alpha cl$), fundamentada en la relación de la intensidad de la luz incidente y de la luz dispersada por el medio.

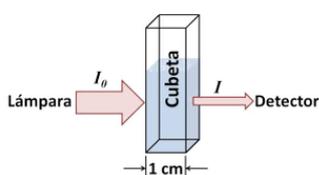


Figura 4.3.5.2.1: Representación gráfica de la transmitancia óptica.

Mediante turbidimetría podemos determinar la interacción entre los polímeros modificados, los nanogel y la mucina comercial, MUCIII [30].

Estos ELR han sido evaluados midiendo la interacción por un método turbidimétrico descrito por *He y colaboradores en 1998* [31].

- *Procedimiento:*

Se prepararon diferentes disoluciones de partida, de mucina; MUCIII a 2 mg/mL y de los mucoadhesivos; nanogel a 1 mg/mL y polímeros a 1 mg/mL, cada disolución se elabora siguiendo su protocolo correspondiente. El disolvente utilizado fue H₂O-MQ.

Los polímeros que analizados fueron el VOKx72 modificado (grupo azido terminal), el biopolímero ELR-VKVx24 de partida y el tiómero obtenido en la reacción de en de tiolación 4.3.2.3.1.5. (VKVx24 x10eq tiolactona, HCl pH 4) con alrededor de 3 grupos tiol en su estructura.

A partir de estas disoluciones se elaboraron cada una de las muestras a analizar las cuales tenían un volumen total de 40 µL y estaban compuestas por una mezcla de mucoadhesivo-mucina.

De cada mucoadhesivo se realizaron 7 muestras donde la concentración del polímero o nanogel utilizado era constante, 0,25 mg/mL, y la cantidad de mucina presente variaba; expresado en (w/v): 0, 0,0125, 0,025, 0,0375, 0,05, 0,075, 0,125 % MUCIII (w/v).

Cada una de las muestras se hizo por sextuplicado (n=6).

Para caracterizar las cualidades mucoadhesivas de cada uno de los materiales, modificados o elaborados, las medidas turbidimétricas se tomaron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm y pH neutro.

A partir de cada una de estas disoluciones, además de las muestras, se elaboraron unos controles (sistema de no interacción) en los cuales cada uno de los elementos iba a estar en las mismas condiciones y concentraciones que en las muestras pero por separado.

Las absorbancias de los polímeros, nanogel y mucina por separado (sistemas de no interacción) sirvieron de control y la suma algebraica de estas muestras individuales fué utilizada para obtener la absorbancia teórica de cada una de las mezclas (1).

$$(1) A_{TEÓRICA} = A_{mucoadhesivo} + A_{MUCIII}$$

En caso de existir una interacción, la absorbancia medida experimentalmente de la muestra (mezcla mucoadhesivo-mucina) será mayor que la calculada de forma teórica de los sistemas por separado.

Y la diferencia de estas absorbancias, teórica y experimental, reflejará la existencia de esa interacción (2).

$$(2) \Delta A = A_{EXPERIMENTAL} - A_{TEÓRICA}$$

Es decir; la absorbancia teórica ($A_{TEÓRICA}$) se calculó mediante la suma de las absorbancias por separado de la dispersión de mucina y la de polímero o nanogel utilizado. La diferencia de absorbancias (ΔA) entre $A_{EXPERIMENTAL}$ y $A_{TEÓRICA}$ es la medida de la interacción entre la mucina y estos mucoadhesivos (3).

$$(3) \text{Mucoadhesión} \propto \Delta A = A_{EXPERIMENTAL} - A_{TEÓRICA}$$

Cuando no existe interacción $\Delta A = 0$; y para valores de $\Delta A > 0$, existe una interacción entre los componentes presentes en la muestra.

Comparando los resultados obtenidos con cada uno de los materiales podremos determinar si éstos aumentarían las propiedades mucoadhesivas de un hidrogel si fueran anclados a su superficie, o si, por el contrario, no suponen una mejora con respecto a la mucoadhesión propia del hidrogel en cuestión (o nanogel, al ser éste tipo el utilizado para el estudio).

4.3.6. Anclaje de ELR modificado a la superficie del nanogel.

La modificación superficial se ha convertido en un método para modificar la superficie del biomaterial mediante el injerto de cadenas de polímero. Estas cadenas tienen unidos químicamente uno de sus extremos a la superficie del material proporcionándole ciertas propiedades sin cambiar su estructura basal.

La idea básica de la utilización de estos polímeros anclados es mejorar la mucoadhesión cuando el sistema contacta con la capa mucosa formando numerosas interacciones adhesivas que actúan como puente entre la mucosa y el gel, a través de la interfase (*Figura 4.3.6.1*).

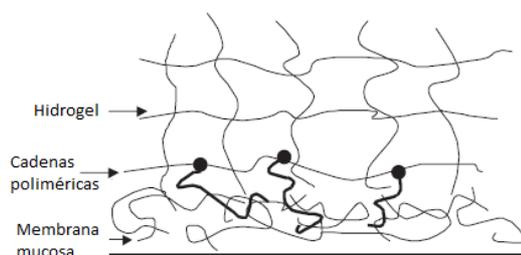


Figura 4.3.6.1: Mucoadhesión de un hidrogel a una membrana mucosa promovida por los polímeros anclados a su superficie.

Para mejorar y promover la mucoadhesión de los nanogeles elaborados se van a anclar a su superficie cadenas de biopolímeros ELR modificados en su extremo carboxi-terminal. Estos extremos van a ser capaces de reaccionar con los grupos funcionales presentes en la superficie de los nanogeles por la química 'click' (*Figura 4.3.6.2*).

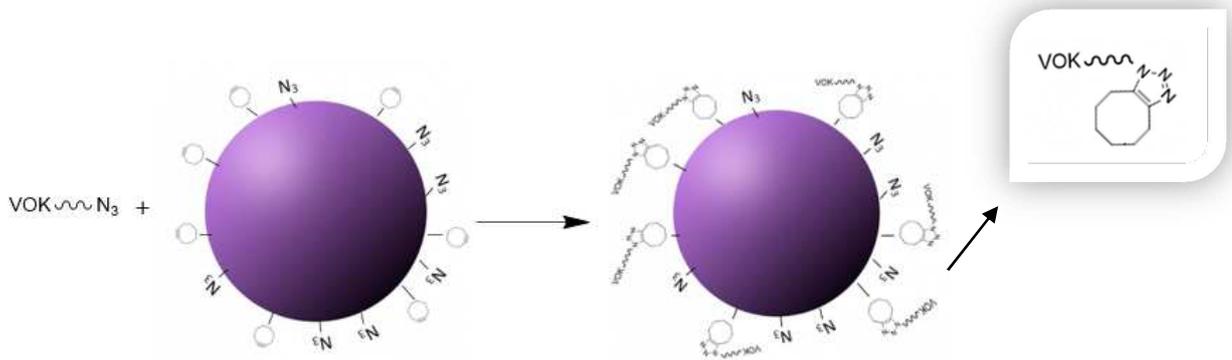


Figura 4.3.6.2: Imagen de la simulación del nanogel con el polímero VOKx72 (azido) anclado a su superficie.

Para producir este anclaje a la superficie, se van a poner en contacto diferentes proporciones de la disolución que contiene los nanogel elaborados con una disolución que contiene el polímero modificado correspondiente. Las proporciones utilizadas están expresadas en ratios en masa y en cada caso se utilizaron las relaciones 1:0,5, 1:1 y 1:1,5, de nanogel y polímero respectivamente a partir de disoluciones con una concentración de 1 mg/mL cada una.

Para comprobar que la reacción ‘click’ se ha producido, y por lo tanto, el correspondiente anclaje del polímero al nanogel se va a utilizar un equipo *Malvern Zsizer* el cual nos va a proporcionar unas medidas de tamaño por *DLS (dynamic light scattering)* y medidas del potencial zeta ($z = q/s$) de las partículas formadas en la disolución a partir de su movilidad electroforética.

4.6.1. Estudio de las propiedades mucoadhesivas de los nanogel de partida y modificados superficialmente mediante medidas de potencial zeta.

Cada muestra estudiada se preparó con diferentes proporciones de nanogel modificado y MUCIII expresadas en ratios en masa. Los ratios en masa NANOGEL modificado:MUCIII de cada una de las muestras fueron: 1:0, 1:1, 1:1,5, 1:2 y 1:3. Para el caso de los nanogel de partida, los ratios en masa NANOGEL:MUCIII utilizados fueron: 1:0, 1:0,05, 1:0,1, 1:0,2 y 1:0,5. Una última muestra únicamente tendrá partículas de mucina para poder comparar el potencial zeta de ambos sistemas por separado.

Mediante el estudio de las variaciones de potencial zeta observadas en cada uno de los casos se pueden determinar las propiedades mucoadhesivas de cada material.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.2. MODIFICACIÓN DE POLÍMEROS.

5.2.1. Modificación del extremo C-terminal de ELR-VOKx72.

El polímero tipo elastina, VOKx72, se modifica químicamente transformando el ácido carboxílico terminal mediante reacción de amidación con el reactivo aminado adecuado. Esta reacción permite obtener un grupo funcional diferente (azido/alquínilo) en lo que antes era el extremo C-terminal, dependiendo del reactivo utilizado. Este extremo nuevo tendrá una funcionalidad final esencial para su posterior unión al hidrogel (*Figura 5.2.1.1*).

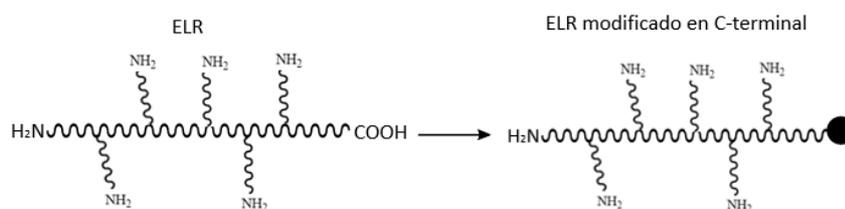


Figura 5.2.1.1 : Representación de la modificación del extremo C-terminal del ELR correspondiente.

5.2.1.1. Reacción de amidación vía DCC.

Reacción de amidación a través de la activación del grupo carboxilo utilizando una carbodiimida, N,N'-diciclohexilcarbodiimida, DCC.

En el primer mecanismo de reacción, se utilizó DCC como activador del grupo carboxilo terminal del polímero.

El uso de carbodiimidas tales como diciclohexilcarbodiimida (DCC) para la activación de un ácido carboxílico junto con la adición de una amina es un procedimiento utilizado frecuentemente para las reacciones de amidación [32] a pesar de la formación de los subproductos derivados de la urea, los cuales van a ser eliminados durante el proceso de purificación del producto resultante.

El grupo carboxilo terminal del ERL-VOKx72 es activado por la carbodiimida (N, N'-diciclohexilcarbodiimida) formando intermediarios reactivos de O-acilisourea.

Los mecanismos principales propuestos mediante los cuales sucede la reacción son los siguientes (Figura 5.2.1.1.1):

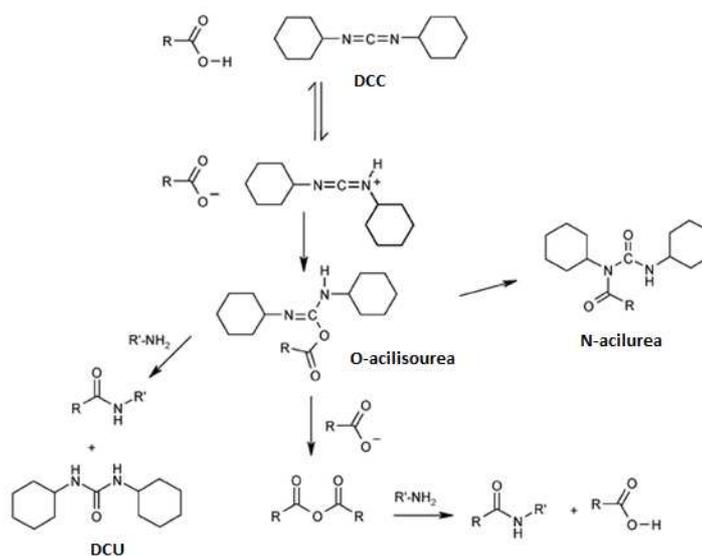


Figura 5.2.1.1.1: Vías posibles de reacción para el acoplamiento mediado por la carbodiimida DCC.

La reacción de amidación se lleva a cabo en exceso del compuesto aminado, con objeto de evitar las reacciones competitivas.

5.2.1.2. Reacción de amidación vía DCC en presencia de NHS.

En este caso, la reacción de amidación se produce a partir de la activación del grupo carboxilo con DCC y posterior formación de un éster semiestable con N-hidroxisuccinimida, NHS.

Todas las vías posibles que pueden ocurrir durante el proceso de la reacción mediada por la DCC y que no son las deseadas pueden evitarse, o al menos ser mitigadas, a través de la complementación de ciertos aditivos, tales como la N-hidroxisuccinimida (NHS), el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) o la 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (HOObt).

Para aumentar la eficiencia del acoplamiento mediado por una carbodiimida, DCC en este caso, uno de los reactivos más eficientes es la N-hidroxisuccinimida (NHS)

que es capaz de reaccionar con el intermedio de O-acilisourea para producir un éster semiestable de NHS el cual es amino-reactivo [33].

Por otro lado, seguimos teniendo las rutas competitivas, que son la formación del anhídrido por deshidratación de la O-acilisourea con un ácido carboxílico vecino y la generación de N-acilurea a través de un reordenamiento intramolecular acilo.

El anhídrido puede someterse a una reacción con la NHS para producir el NHS-éster o con la amina primaria para formar la amida que queremos obtener acompañada de la regeneración del grupo ácido en nuestro polímero de partida. Sin embargo, la N-acilurea que se pueda formar es un producto estable e irreversible que no puede reaccionar con los grupos amino pertinentes ni con la NHS añadida (*Figura 5.2.1.2.1*).

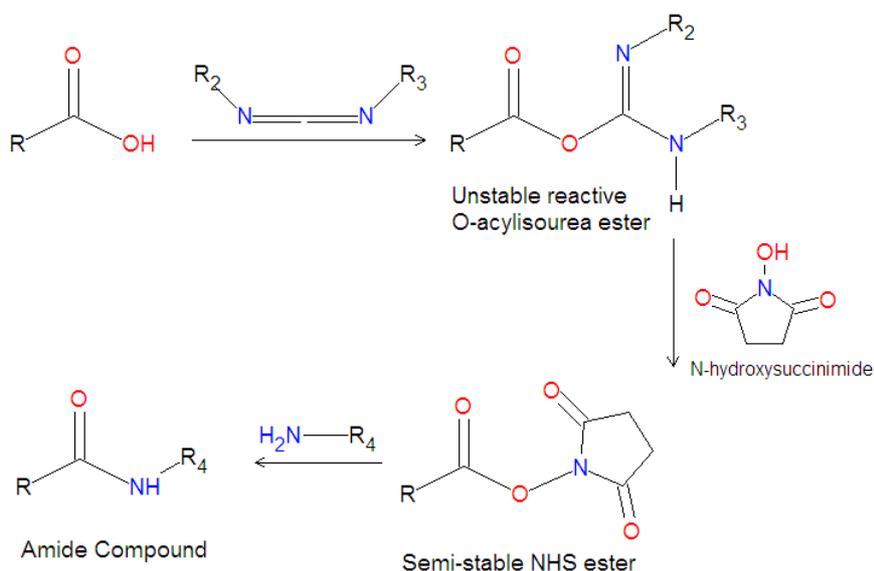


Figura 5.2.1.2.1: Mecanismo de la reacción de acoplamiento a un ácido carboxilo mediada por DCC/NHS.

5.2.1.3. Modificaciones del biopolímero ELR-VOKx72.

5.2.1.3.1. ELR-VOKx72.

A partir de la caracterización del espectro del ELR base, VOKx72, utilizando las técnicas de ^1H RMN, MALDI-ToF y FTIR-ATR, podemos determinar si se ha producido alguna modificación en el polímero y, si es así, si ésta es la deseada. Además, como último análisis se realizó una electroforesis cuyos resultados nos informarán sobre posibles polimerizaciones.

El VOKx72 está formado por 72 repeticiones del pentapéptido VPGKG. En cada pentapéptido existen un total de 31 protones distribuidos de manera que, a un desplazamiento de 1 ppm aparecen los protones pertenecientes a los metilos (CH₃) presentes en el aminoácido Valina; entre 1,2 y 4,5 ppm los protones de los metilenos (CH₂) de los diferentes aminoácidos que conforman la estructura del ELR-VOK, y por último, a un desplazamiento en torno a 8 ppm, resuenan los protones correspondientes a los NH de los grupos amido de los aminoácidos Valina, Glicina y Lisina. Esto supone un total de 2232 protones a lo largo de la cadena polipeptídica, 31 protones/pentapéptido x 72 repeticiones = 2232 protones totales (*Figura 5.2.1.3.1.1*).

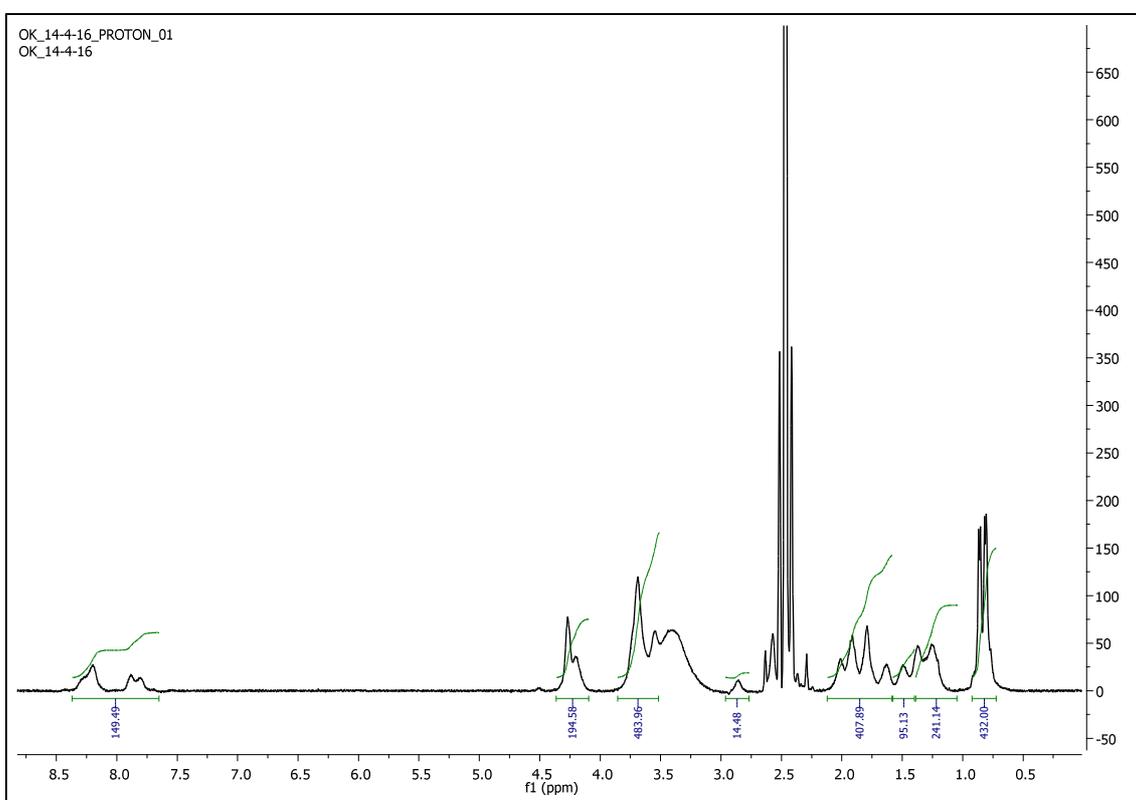


Figura 5.2.1.3.1.1: Espectro de 1H RMN del ERL VOKx72 sin modificar en DMSO.

A partir de espectro de masas MALDI-ToF se determina que el peso teórico de VOKx72 es de 32364±9 Da, 32364±9 g/mol. En el FTIR las señales características observadas de nuestro polímero de partida (ERL-VKVx72) son aquellas que aparecen entre 1600 y 1700cm⁻¹, que indican la presencia de los enlaces amido (C=O st), así como aquellas que se encuentran entre 3100 y 3500 cm⁻¹ que nos indican tanto la presencia de estos enlaces amido, como la de enlaces amino (N-H st) (*ANEXO; Figura 1 y Figura 2*).

5.2.1.3.2. Modificación del extremo C-terminal del ELR VOKx72 con un compuesto que contiene un triple enlace terminal, propargilamina.

En primer lugar la modificación se realizó acoplado una molécula de propargilamina a través del mecanismo de reacción descrito mediado por la DCC proporcionando el grupo alquínico que necesitamos al extremo de la cadena polipeptídica (*Figura 5.2.1.3.2.1*).

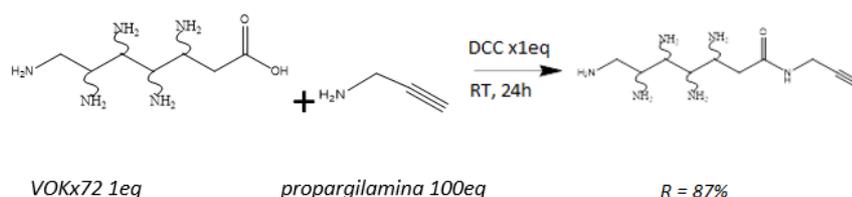


Figura 5.2.1.3.2.1: Reacción de amidación del grupo carboxilo terminal de ERL-VOKx72 vía DCC y un compuesto aminado que contiene un triple enlace terminal, propargilamina.

La reacción de VOKx72 (1 eq) con DCC debería proporcionar un polímero portador de un grupo carboxilo activado, que reaccionaría con propargilamina (100 eq) como reactivo aminado, sin embargo, los resultados obtenidos muestran espectros de ^1H RMN similares para el producto sin modificar y el modificado; asimismo se observa una variación de Peso Molecular en su espectro de masas MALDI-ToF de unos 200 Da, lo que concuerda aproximadamente con el peso molecular de la carbodiimida utilizada para activar el grupo carboxilo, DCC (PM= 206.33 g/mol) (*Figura 5.2.1.3.2.3*). Esto significa que la reacción probablemente ha evolucionado hacia la obtención de la N-acilurea irreversible, la cual no permite que tenga lugar la reacción de amidación y acoplamiento de la molécula que deseamos. La variación de la estructura no genera señales en ^1H RMN muy diferentes a las encontradas en el producto de partida (*ANEXO, Figura 3 y Figura 5.2.1.3.2.2*).

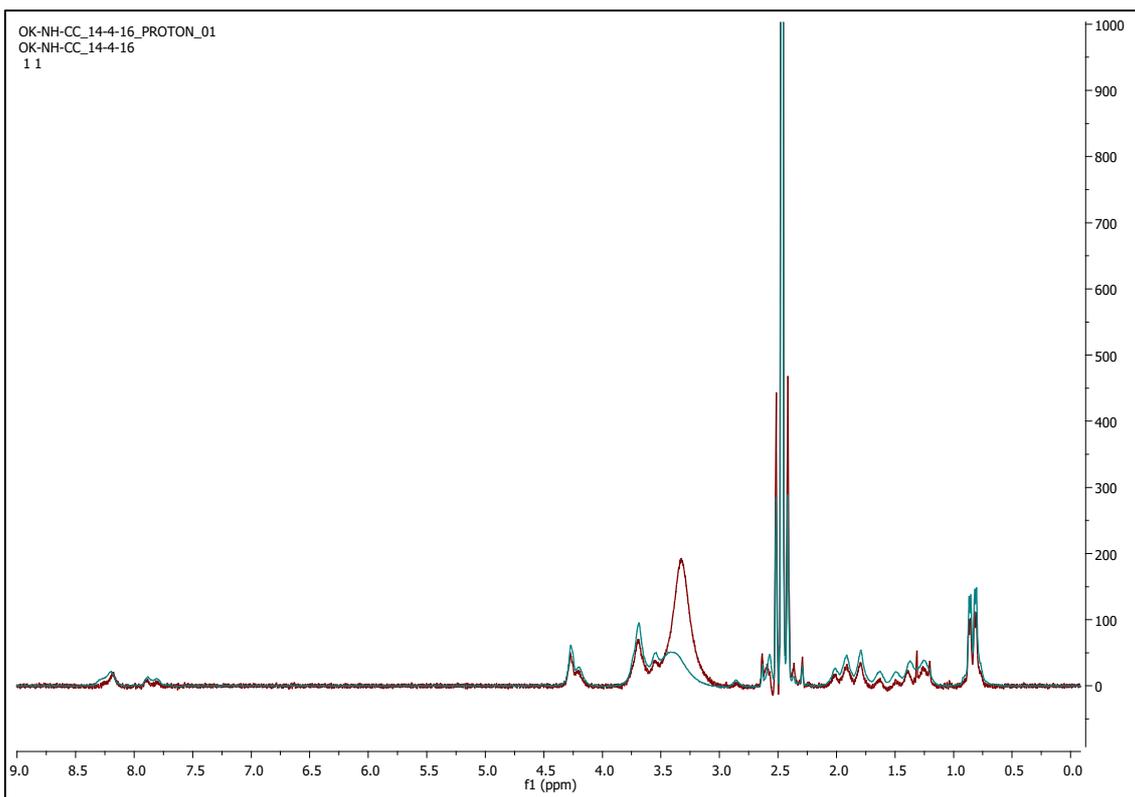


Figura 5.2.1.3.2.2 : Superposición de espectros de ^1H RMN del biopolímero ELR-VOKx72 de partida (rojo) y ELR-VOKx72 modificado (azul).

No se observan cambios en el espectro de ^1H RMN y el producto resultante no proporciona ningún pico característico a ningún desplazamiento distinto de los encontrados en el biopolímero sin modificar.

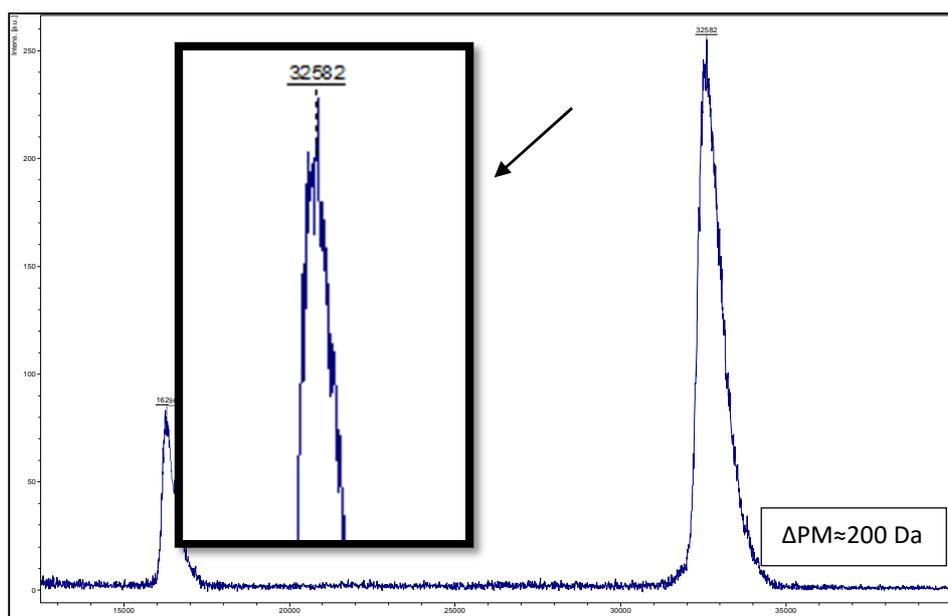


Figura 5.2.1.3.2.3 : Espectro de masas MALDI-ToF del producto resultante de la reacción entre el VOKx72 y la propargilamina, activador DCC.

Por lo que respecta al espectro de MALDI-ToF, se observa una diferencia de pesos moleculares entre el VOKx72 sin modificar (32364 ± 9 Da) y el producto de la reacción (32546 ± 36 Da), de en torno a 200 Da, lo que concuerda, aproximadamente, con el peso molecular de la carbodiimida utilizada para activar el grupo carboxilo, DCC (PM= 206.33 g/mol).

Con la finalidad de conseguir una optimización de la reacción, ésta se llevó a cabo en presencia de NHS (1 eq), y de nuevo, en exceso de propargilamina (100 eq) (Figura 5.2.1.3.2.4). Como se observa en el espectro de masas MALDI-ToF, se produce un aumento en el Peso Molecular de aproximadamente 57 g/mol, lo que concuerda con la introducción de 1 equivalente de propargilamina en la estructura (Figura 5.2.1.3.2.5). De nuevo no se observan cambios significativos ni en el espectro de ^1H RMN, ni en el espectro de FTIR, debido al tamaño del biopolímero sin modificar (ANEXO, Figs. 4 y 5). En el NMR, la presencia de propargilamina unida en el extremo sólo supone la aparición de 3 protones nuevos que, frente a los 2232 que contiene el biopolímero de partida, resultan prácticamente inapreciables.

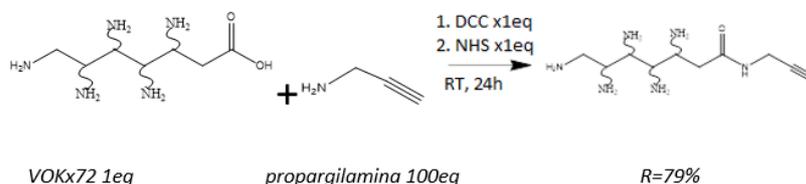


Figura 5.2.1.3.2.4 : Reacción de amidación del grupo carboxilo terminal del VOKx72 vía DCC/NHS y un grupo amino de un compuesto con contiene un triple enlace terminal.

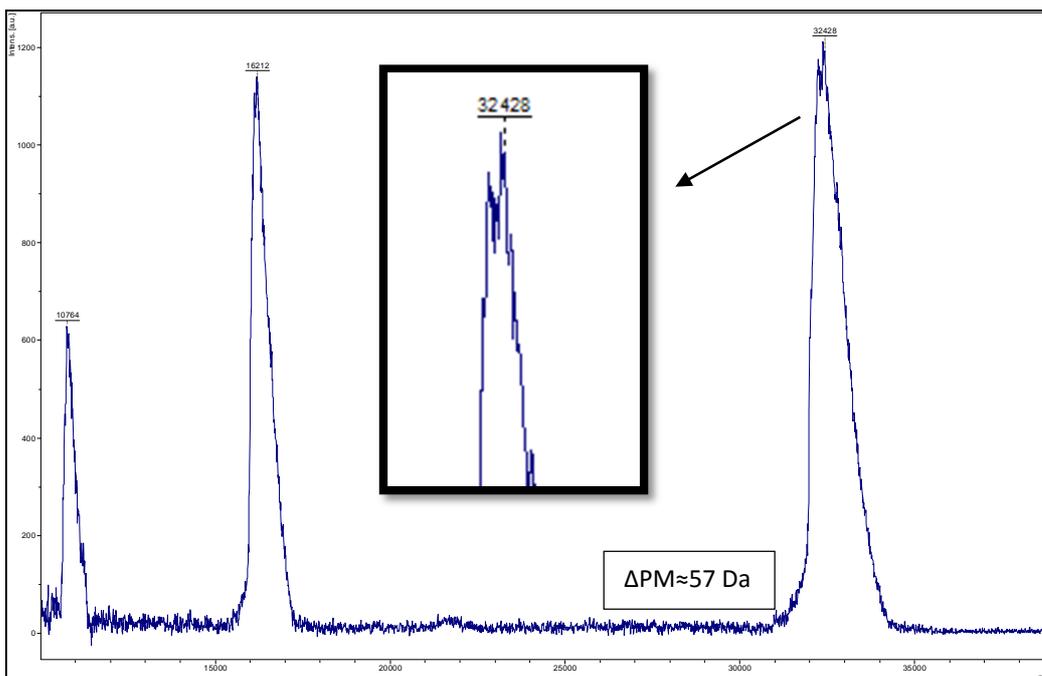


Figura 5.2.1.3.2.5 : Espectro de masas MALDI-ToF del producto resultante de la reacción entre el VOKx72 y la propargilamina, vía DCC/NHS.

En este caso la masa que obtenemos es de 32412 ± 13 Da, (32412 ± 13 g/mol). Si hacemos la diferencia entre el peso molecular obtenido para VOKx72 de partida y el peso molecular obtenido en el biopolímero modificado resultante obtenemos una diferencia de masa que probablemente se pueda corresponder con los 57 g/mol que tiene de peso molecular de la propargilamina.

5.2.1.3.3. Modificación del extremo C-terminal del ELR VOKx72 con un compuesto que contiene un grupo azido terminal, espermina.

El objeto de esta modificación es acoplar una molécula de espermina en el extremo C-terminal, de manera que obtengamos un grupo azido disponible en dicho extremo de la cadena polipeptídica (Figura 5.2.1.3.3.1). A la vista de los resultados obtenidos para la amidación de ELR-VOKx72 con propargilamina, la modificación del biopolímero se lleva a cabo en presencia de NHS (1 eq) y exceso del reactivo aminado, espermina (50 eq). En un experimento inicial de control se lleva a cabo la reacción entre ácido hexenoico y espermina, con objeto de determinar la quimiospecificidad de la reacción y corroborar que la reacción de amidación se produce en el grupo amino primario (Ver ANEXO).

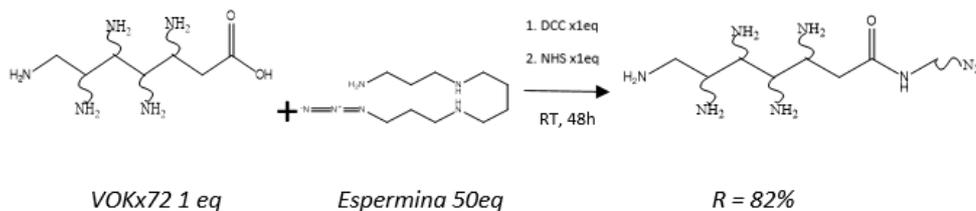


Figura 5.2.1.3.3.1 : Reacción de amidación del grupo carboxilo terminal del VOKx72 y un grupo amino de un compuesto con contiene una azida terminal via DCC/NHS.

La reacción de VOKx72 (1 eq) con DCC (1 eq), en presencia de NHS (1 eq) y en exceso de espermina (50 eq), conduce a la obtención del biopolímero modificado, portando la espermina en su extremo C-terminal. En primer lugar, en su espectro de ^1H RMN se observa la aparición de una nueva señal a 2,6 ppm, y el aumento de la señal a 1,5 ppm, que indican la presencia de espermina (Figura 5.2.1.3.3.2). Por otro lado, observamos que se ha producido modificación química en el biopolímero, por el aumento del PM en el espectro MALDI-ToF (ANEXO, Figura 6). En el espectro de FTIR, la presencia del grupo azido quiere intuirse a 2100 cm^{-1} , pero al tratarse de un único grupo en una macromolécula no se aprecia correctamente (Figura 5.2.1.3.3).

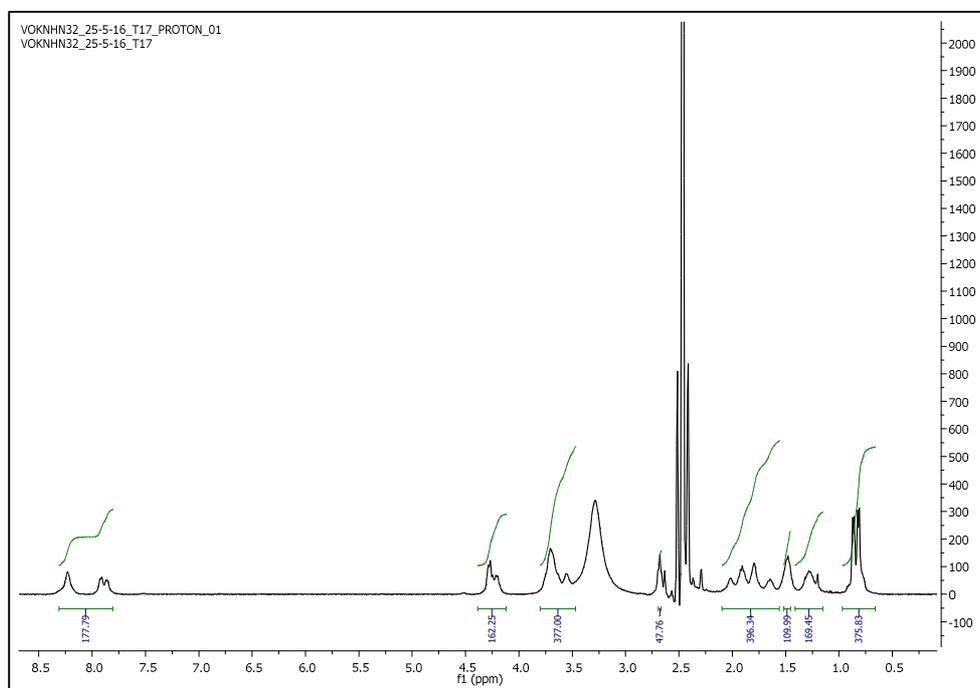


Figura 5.2.1.3.3.2 : Espectro de ^1H RMN del producto de reacción de amidación entre la espermina y ELR-VOKx72 vía DCC/NHS en DMSO.

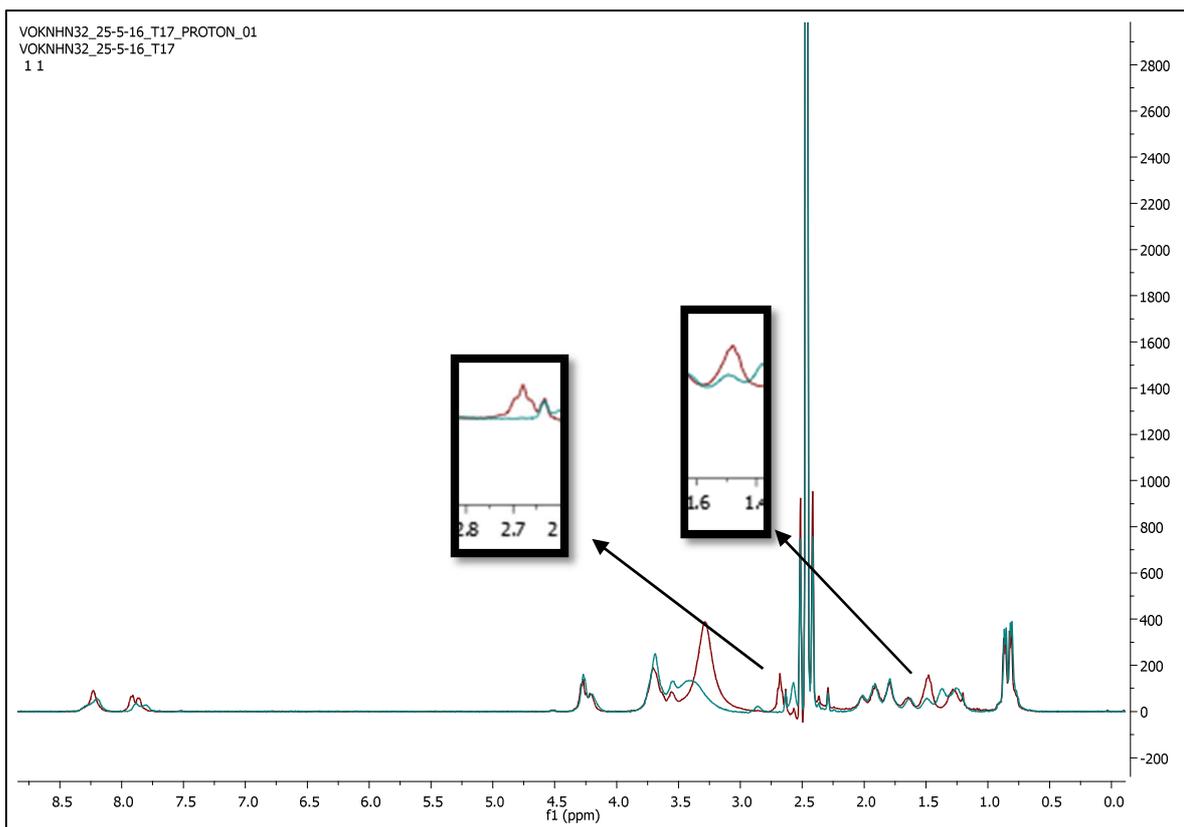


Figura 5.2.1.3.3.3 : Imagen de la superposición de Espectros de ^1H RMN del biopolímero de partida ELR- VOKx72 (azul) y el producto resultante de la reacción entre el VOKx72 y el compuesto con un grupo azido terminal vía DCC/NHS (rojo) en DMSO.

Si comparamos por NMR las estructuras de los biopolímeros sin modificar y modificados con espermina, la superposición de espectros nos muestra la aparición de un nuevo pico a un desplazamiento de 2,6 ppm y el aumento de una de las señales ya existentes, a 1,5 ppm.

El estudio comparativo del espectro obtenido a través del ChemDraw© (Figura 5.2.1.3.3.4) para espermina, nos ayuda a determinar que la señal que aparece aumentada a 1, 5 ppm en el producto obtenido de la modificación del ELR-VOKx72 se corresponde con varios de los protones de la molécula de espermina. Estos protones son los de los grupos amino y los de los grupos metileno no adyacentes a los grupos amino en la espermina. Si restamos el valor de la integral del pico a este desplazamiento en el espectro del biopolímero ELR-VOKx72 de partida (109) y el que aparece en el producto de la modificación (96), obtenemos una diferencia de 13 protones. La suma total de los protones que se encuentran en la molécula de espermina que pueden

aparecer a este desplazamiento es de 14. Por lo tanto, podemos decir que la molécula se ha acoplado al extremo de VOKx72, produciéndose así la modificación.

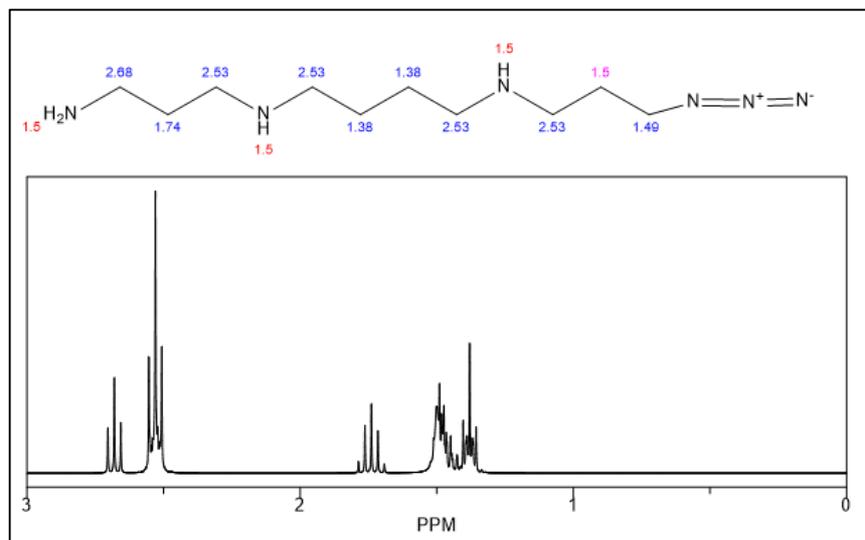


Figura 5.2.1.3.3.4: Espectro de la molécula espermina creado por el programa informático ChemDraw.

Al desplazamiento de 2,6 ppm se observa la presencia de una señal que no estaba presente en el biopolímero de partida. Esta señal se correspondería con los protones de grupos metileno adyacentes a los grupos amino de la espermina. Además, a este desplazamiento nos podemos encontrar con señales pertenecientes a los reactivos utilizados durante la reacción, como el NHS, el cual posee protones que resuenan a un desplazamiento de 2,64 ppm, por lo que no nos permite determinar de forma cuantitativa la cantidad de espermina unida.

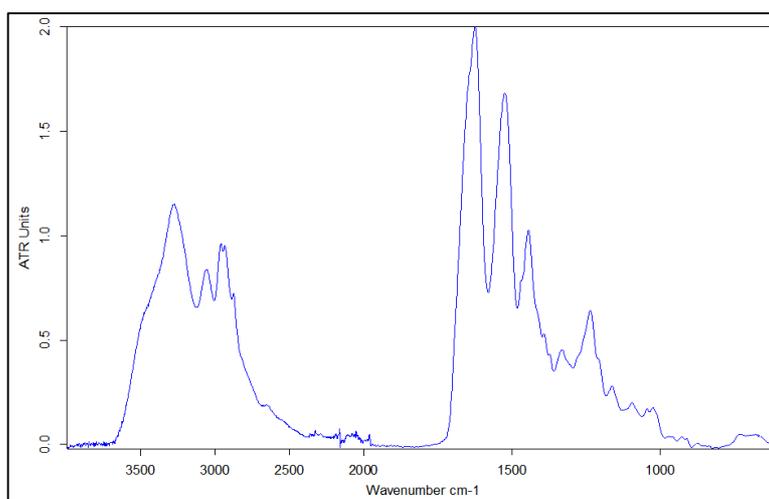


Figura 5.2.1.3.3.5 : Espectro de FTIR-ATR del producto resultante de la reacción entre el VOKx72 y un compuesto con un grupo azido terminal vía DCC/NHS.

No se observa ninguna modificación notable en el espectro de FT-IR. En caso de observarse, debería aparecer una señal a 2100cm^{-1} , sin embargo, un único grupo azido presente en una cadena polimérica va a ser difícil de ver utilizando la técnica del FT-IR y más con la presencia de ruido en la línea base en la zona de observación, como ocurre en este caso.

- Análisis de las posibles polimerizaciones:

Como prueba final del conjunto de reacciones llevadas a cabo sobre el ELR VOKx72, se realizó una electroforesis de proteínas, SDS-PAGE (*Figura 5.2.1.3.3.6*).

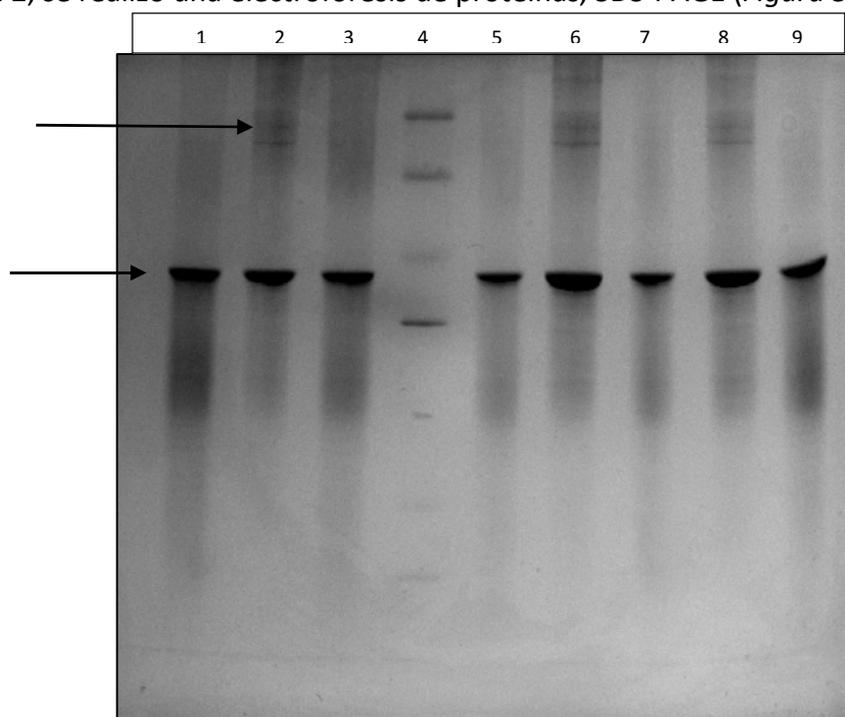


Figura 5.2.1.3.3.6 : SDS-PAGE de todos los productos obtenidos a partir de las reacciones a las que ha sido sometido el VOKx72. Apareciendo de izquierda a derecha: 1- VOKx72 de partida, 2-VOKx72 activado por el DCC, 3- VOKx72 más propargilamina vía DCC, 4- PROTEIN MARKER, 5- VOKx72 más espermina vía DCC/NHS, 6- VOKx72 más espermina vía DCC, 7- VOKx72 y propargilamina vía DCC/NHS y las dos últimas calles son re repetición, 8- VOKx72 más espermina vía DCC/NHS y 9- VOKx72 más espermina vía DCC. El PROTEIN MARKER señala unos pesos en kDa que empezando por arriba son: 116,0 kDa, 66,2 kDa, 45,0 kDa, 35,0 kDa y 25,0 kDa.

Como podemos ver con esta última prueba las reacciones que se han producido correctamente son aquellas en las que la amidación ha sido mediada vía DCC/NHS.

Las bandas más anchas y de coloración más intensa que podemos observar a 35,0 kDa aprox, pertenecen a los biopolímeros principales presentes en cada una de las muestras, las bandas más claras presentes al inicio de alguna de las calles pertenecen a

polímeros resultantes de posibles polimerizaciones ocurridas entre las moléculas del biopolímero sometido a la modificación.

Las reacciones en las que únicamente se ha utilizado DCC como agente activador de la reacción han dado lugar a algún tipo de polimerización de las moléculas de biopolímero entre ellas no obteniendo los productos deseados como hemos podido ver en los resultados.

Así podemos llegar a la conclusión, que en el caso de la modificación de grupos carboxilo en polímeros o moléculas que posean largas cadenas va a ser necesario la utilización de una carbodiimida como agente activador combinada con otro tipo de compuesto que proporcione el éster semiestable amino-reactivo o a algún otro compuesto que pueda favorecer la introducción de la molécula deseada para obtener el producto final.

5.2.2. Modificación por tiolación de los grupos ϵ -amino de los aminoácidos Lisina presentes en la estructura de ELR-VKx24.

5.2.2.1. Tiómeros.

Los tiómeros (*3.Introducción*) son macromoléculas hidrófilas que presentan grupos tiol libres en la cadena principal polimérica capaces de formar enlaces disulfuro (*Figura 5.2.2.1.1*) con los subdominios ricos en cisteína de glicoproteínas mucosas (mucinas), mostrando unas altas propiedades mucoadhesivas.

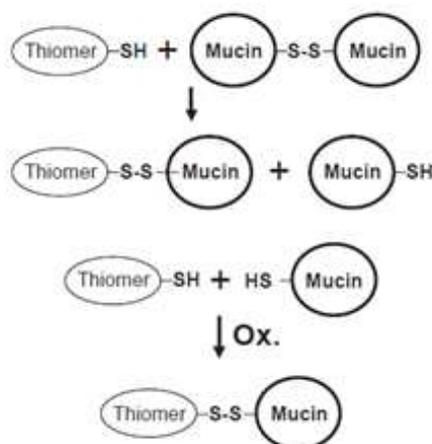


Figura 5.2.2.1.1: Mecanismo de formación de enlaces entre los grupos tiol de los tiómeros y las mucinas presentes en las membranas mucosas.

Es por esto, por lo que una de las reacciones estudiadas en este proyecto sea la tiolación. Con la finalidad de poder inmovilizar grupos tiol a los largo de la cadena polimérica de nuestros ELRs y poder mejorar las correspondientes propiedades mucoadhesivas de los biopolímeros.

5.2.2.2. Química de las tiolactonas.

Los tioles se caracterizan por poseer olores desagradables, escasa disponibilidad y una corta vida útil debido a la tendencia a formar puentes disulfuro entre ellos.

Así, los reactivos seleccionados como alternativa al uso de compuestos con grupos tiol han sido las tiolactonas, ya que nos sirven como precursores de grupos tiol pero protegidos de reacciones secundarias proporcionando todas las propiedades que los tioles poseen sin la necesidad de su uso directo en una reacción (*Figura 5.2.2.2.1*).

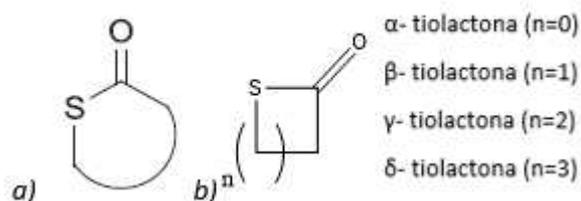


Figura 5.2.2.2.1 : a) Tiolactona genérica; b) tiolactonas más utilizadas.

La propiedad más importante relacionada con la reactividad de tiolactonas es la lisis del anillo por la acción de un nucleófilo dando como resultado la liberación de un grupo sulfhidrilo libre. Esto puede ser logrado por medio de la reacción con una amplia variedad de nucleófilos de una manera ortogonal. Existen varios nucleófilos que pueden dar lugar a la apertura del anillo de una tiolactona, los más frecuentes son: el agua, los alcoholes y las aminas; dependiendo del tipo de nucleófilo que actúe tendremos una reacción de hidrólisis, alcoholólisis o aminólisis.

La hidrólisis y alcoholólisis sólo son significativas en medio básico, aunque la hidrólisis siempre va a ser una reacción secundaria importante a tener en cuenta en una aminólisis (*Figura 5.2.2.2.2*).

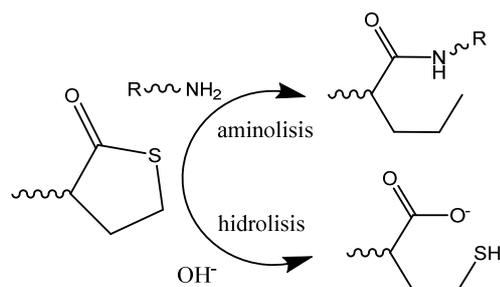


Figura 5.2.2.2.2 : Posibles reacciones de la tiolactona, siendo los nucleófilos un grupo amino o un grupo hidróxilo.

5.2.2.3. Tiolación.

Esta reacción se basa en el ataque nucleófilo de un grupo amino al anillo que conforma la estructura de la tiolactona correspondiente (Figura 5.2.2.3.1) produciéndose así la apertura del anillo y permitiéndonos obtener el polímero modificado con grupos tiol a lo largo de la cadena.

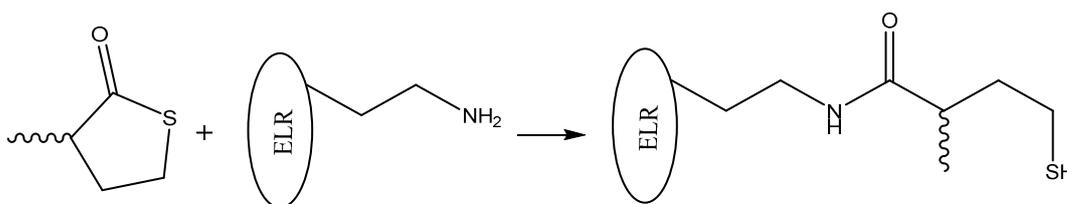


Figura 5.2.2.3.1: Modificación del ELR por ataque nucleófilo del grupo ϵ amino de las lisinas presentes a lo largo de la cadena polimérica.

Hay que tener un especial cuidado con los reactivos que tienen en su estructura grupos tiol o derivados de éstos, ya que los átomos de azufre entre sí son capaces de formar enlaces disulfuro haciendo la modificación ineficaz para su finalidad. De manera que cuantos más grupos tiol haya presentes en el producto mayor probabilidad hay de que se formen puentes disulfuro entre ellos. Es por esto que la cantidad de compuesto utilizada en un principio para que se produzca la reacción es la de 1,5 o 3 moles de reactivo (tiolactona) por mol de polímero VKVx24, o expresado de otra manera, por cada 24 grupos amino reactivos pertenecientes a las 24 lisinas presentes en el polímero, utilizamos 1,5 o 3 moles de tiolactona.

Para evitar la formación de estos enlaces covalentes entre los átomos de azufre también se necesitan unas condiciones reductoras durante la reacción. Estas condiciones incluyen una atmósfera inerte y un medio protegido de los rayos UV de la luz. Además en este caso se necesitará un pH ligeramente ácido en un rango de pH entre

5 – 6,5 ya que en este intervalo la concentración de aniones tiolato, que representan la forma reactiva de la oxidación de los grupos tiol, es baja, y la formación de enlaces disulfuro puede quedar casi excluida al igual que las posibles reacciones secundarias, como la hidrólisis.

Cuanto mayor sea el pH mayor será la cantidad de iones hidróxilo presentes en la reacción y por lo tanto mayor será la probabilidad de que ocurra la hidrólisis sobre la aminólisis. La formación de los puentes disulfuro también ocurre más rápido. Es por esto que un control del pH durante la reacción va a ser esencial para que ésta se pueda producir tal y como esperamos.

Para ayudar a estas condiciones reductoras también se añadió un compuesto que evita la formación de puentes disulfuro entre los grupos tiol de los reactivos, el β -mercaptoetanol.

Se hicieron varias pruebas de esta modificación sobre el mismo tipo de polímero, VKVx24, variando ligeramente las condiciones entre cada una de ellas para poder conseguir una optimización de las mismas y el máximo rendimiento posible.

El mecanismo de la reacción va a ser siempre el mismo (*Figura 5.2.2.3.2*) pero siempre en diferentes condiciones y proporciones de reactivo.

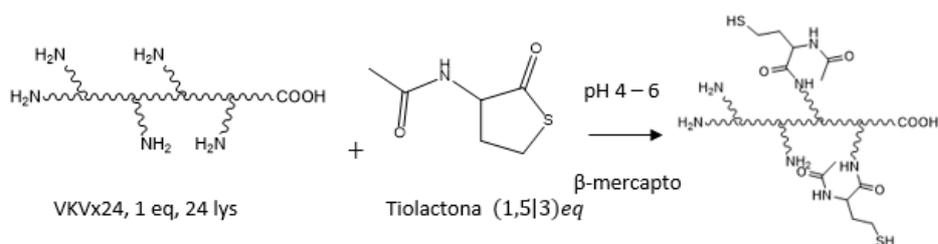


Figura 5.2.2.3.2: Tiolación del ELR VKVx24 por ataque nucleófilo del grupo ϵ amino de las lisinas presentes a lo largo de la cadena polimérica.

5.2.2.4. Modificaciones del biopolímero ELR-VKVx24.

5.2.2.4.1. Biopolímero ELR-VKVx24.

A partir de la caracterización del espectro del ELR de partida, el VKVx24, utilizando las técnicas de ^1H RMN, MALDI-ToF y FTIR-ATR, podemos determinar si se ha

modificado el polímero. Además, como último análisis se realizó una electroforesis cuyos resultados nos pueden informar sobre posibles polimerizaciones.

El VKVx24 está formado por 24 repeticiones de la secuencia (VPGVG)₅VPGKG, y una inicial MESLLP. Según los átomos localizados a lo largo de su estructura podemos deducir que al desplazamiento de aproximadamente 1 ppm nos va a aparecer una señal correspondiente a todos los protones pertenecientes a los CH₃ (metilos) presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos Leucina, Prolina y Valina. Entre los desplazamientos 1,7 y 4,5 δ tenemos los picos correspondientes a los protones de los grupos metileno y metino de los aminoácidos que componen la estructura de VKVx24. Y, por último, a un desplazamiento de 8 ppm nos aparecen los protones de los NH de los grupos amido formados a partir de los aminoácidos Glicina, Valina y Lisina.

En total la cadena polimérica consta de 4435 protones en su estructura y cada una de las secuencias aporta un número determinado de protones. Así tenemos la secuencia MESLLP, secuencia de inicio la cual aporta un total de 47 protones a la cadena, el pentapéptido VPGVG aporta 31 protones, que multiplicado por 5, que son las veces que aparece por bloque suman un total de 155 y por 24 veces que son las que repiten en total a lo largo de la cadena del biopolímero VKVx24 son 3720 protones. Por último, el pentapéptido VPGKG, con un total de 31 protones, multiplicado por 24 veces que se repite a lo largo del biopolímero suma 744 protones (*Figura 5.2.2.4.1.1*).

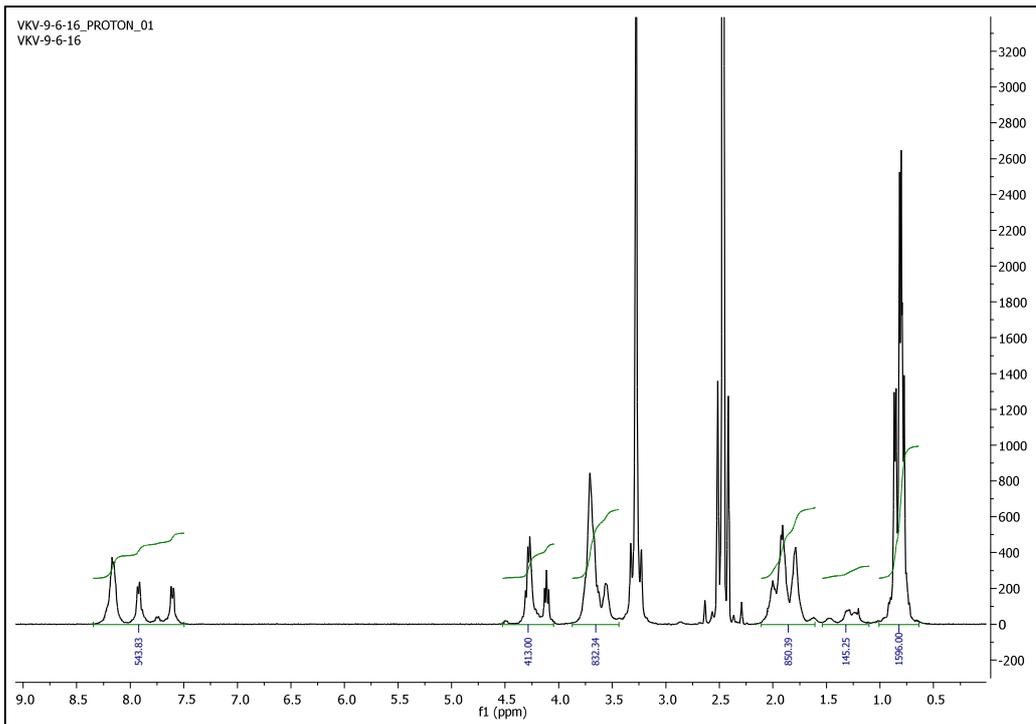


Figura 5.2.2.4.1.1 : Espectro 1H RMN del polímero VKVx24 de partida.

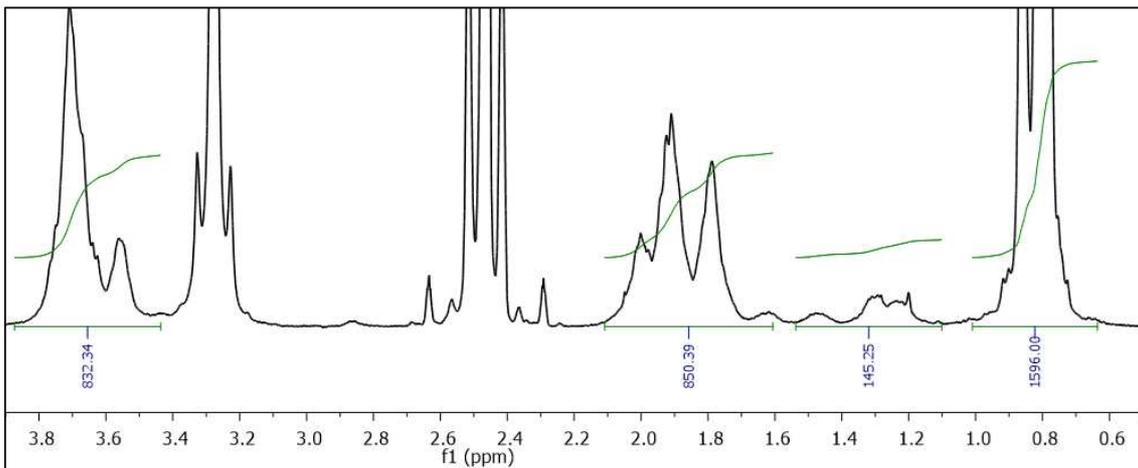


Figura 5.2.2.4.1.2 : Imagen del espectro aumentado de ERL-VKVx24 en la base, zona de observación de las modificaciones.

A partir de espectro de masas MALDI-ToF se determina que el peso teórico de VKVx24 es de 60462 Da. En el FTIR las señales características observadas de nuestro polímero de partida (ERL-VKVx24) corresponden a las que aparecen entre 1600 y 1700 cm^{-1} , que indican la presencia de los enlaces amido (C=O st), así como aquellas que aparecen entre 3100 y 3500 cm^{-1} que nos indican tanto la presencia de estos enlaces amido, como la de enlaces amino (N-H st) (Ver ANEXO; Figura 7).

5.2.2.4.2. Modificación por tiolación del biopolímero ERL-VKVx24 con 1,5/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio HCl pH 4.

La reacción del recombinámero VKVx24 (1 eq) en presencia del agente reductor β -mercaptoetanol con la tiolactona (1,5/24 eq) da lugar a un tiómero que contiene el derivado de cisteína unido a su cadena peptídica. Del espectro de ^1H RMN podemos deducir que, aproximadamente, se han unido 1,5 moléculas de cisteína (*Figura 5.2.2.4.2.1*).

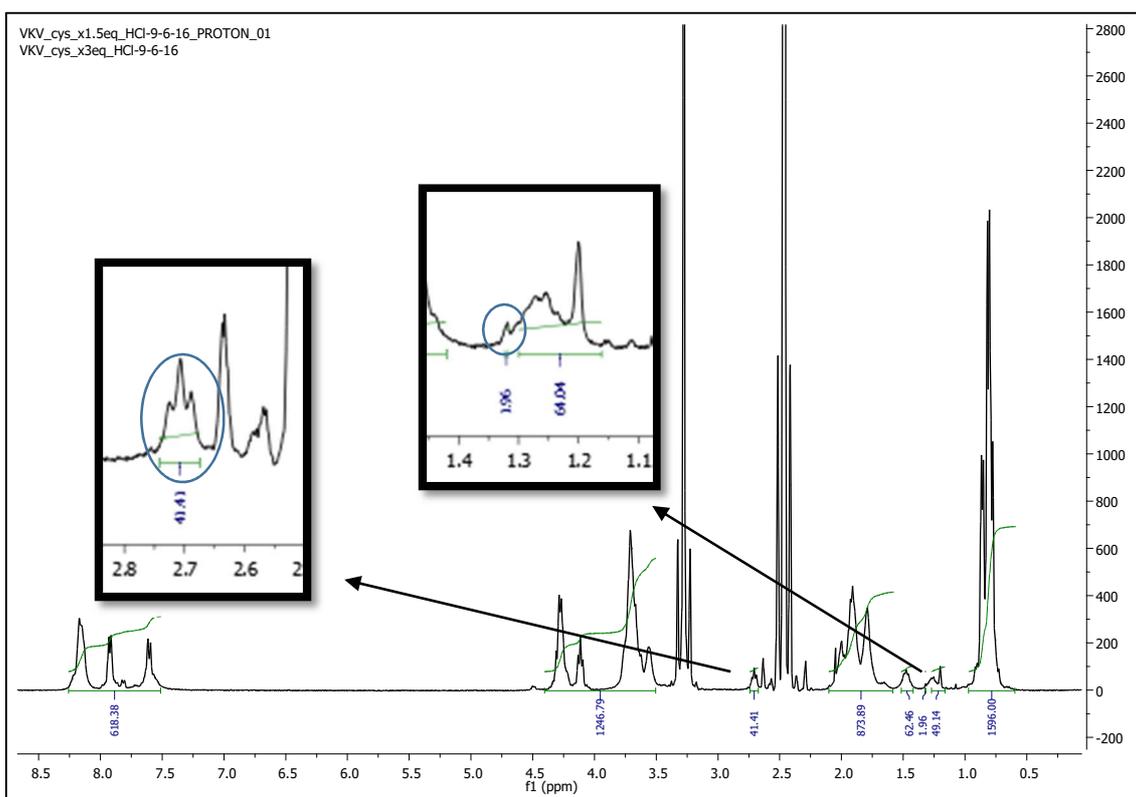


Figura 5.2.2.4.2.1 : Espectro ^1H RMN del polímero VKVx24 x1.5eq de la tiolactona seleccionada.

El espectro de ^1H RMN muestra la aparición de dos nuevos picos, de los cuales uno se asigna al grupo resultante del anclaje de la tiolactona a las cadenas laterales del polímero. El protón que resuena a 1,3 δ , aproximadamente, lo asignamos al protón del grupo tiol presente en la cadena lateral tipo cisteína. La segunda señal que aparece a 2,75 δ , se asigna a los protones del carbono adyacente al grupo tiol del beta mercaptoetanol que haya podido quedar adsorbido al polímero tras la purificación y, es probable, que solape las señales del metileno adyacente al grupo tiol en la propia cisteína unida a la cadena.

Para verificar estos resultados, nos hemos apoyado en el espectro obtenido a partir del espectro dibujado en el programa informático ChemDraw© de lo que sería la molécula de tiolactona una vez producido su anclaje a la cadena peptídica (Figura 5.2.2.4.2.2).

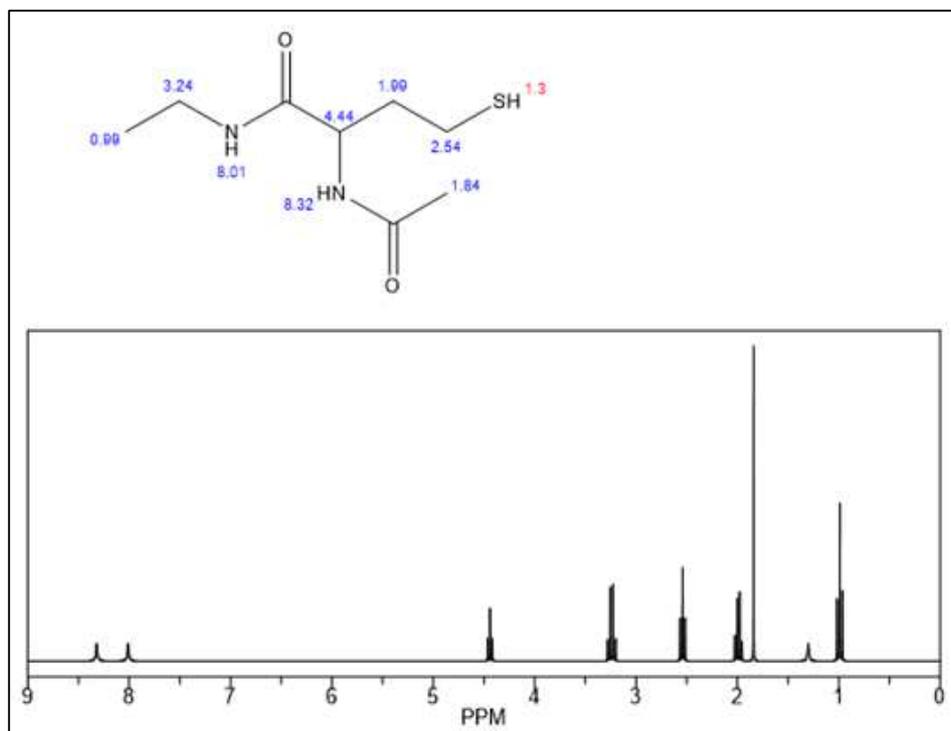


Figura 5.2.2.4.2.2 : Espectro del anillo de D-L-acetil homocisteína tiolactona abierto.

En este caso, la señal a 1,3 ppm que muestra la modificación del biopolímero no nos permite determinar de manera exacta el grado de conversión del biopolímero, ya que dicha señal se superpone con otra del biopolímero de partida sin modificar. Al tratarse de una señal ancha y que integra por un número elevado de protones, resulta difícil determinar el número de moléculas exactas de polímero modificadas, máxime teniendo en cuenta que la señal del tiol integra únicamente por un protón.

5.2.2.4.3. Modificación por tiolación del biopolímero ERL-VKVx24 con 3/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio HCl pH 4.

Con el propósito de aumentar el número de grupos tiol presentes a la largo de la cadena de nuestro biopolímero, se aumentó el número de equivalentes utilizado. Por lo que en este caso la reacción de modificación de ELR-VKVx24 (1 eq) en presencia de β mercaptoetanol con la tiolactona (3/24 eq) dió lugar a un tiómero con,

aproximadamente, 2 moléculas del derivado de la cisteína unidas a su estructura, proporcionando así al biopolímero de partida aproximadamente 2 grupos tiol (SH) como podemos observar en el correspondiente espectro de ^1H RMN (Figura 5.2.2.4.3.1). El espectro de masas MALDI-ToF del producto obtenido nos indica la incorporación de entre 1 y 2 moléculas de reactivo al biopolímero ELR-VKVx24 (Figura 5.2.2.4.3.2).

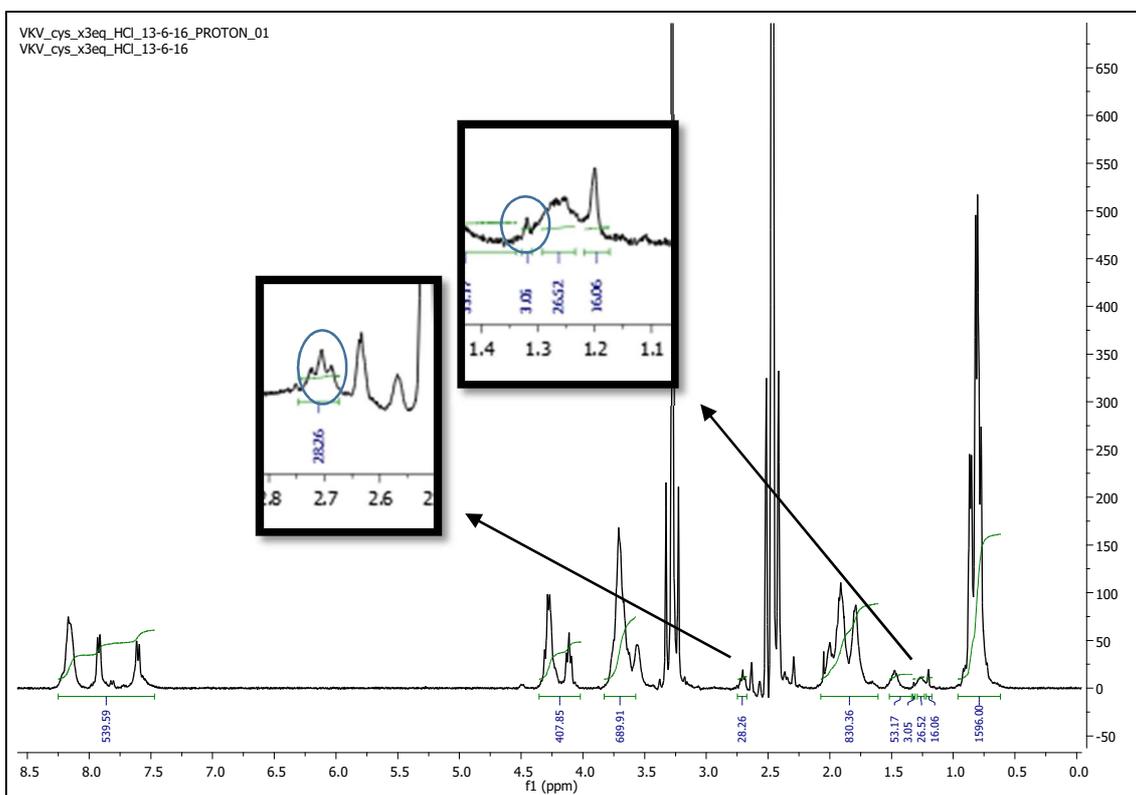


Figura 5.2.2.4.3.1 : Espectro ^1H RMN del polímero VKVx24 x3eq de la tiolactona seleccionada en HCl.

En este espectro podemos observar la aparición de dos nuevas señales como en el caso anterior, a 2,75 ppm y 1,3 ppm. En este caso, el pico perteneciente al protón del grupo tiol integra por una mayor magnitud, lo cual puede ser debido a una mayor incorporación de grupos tiol al biopolímero de partida a través de la unión de las moléculas de derivado de cisteína a la cadena polimérica.

A 2,75 ppm resuenan los protones del metileno adyacente al grupo funcional tiol de la estructura del derivado de la cisteína adherida a la cadena polimérica, además de los protones de las moléculas de β -mercaptoetanol que no han sido eliminadas y han podido quedar adsorbidas al biopolímero modificado tras su purificación.

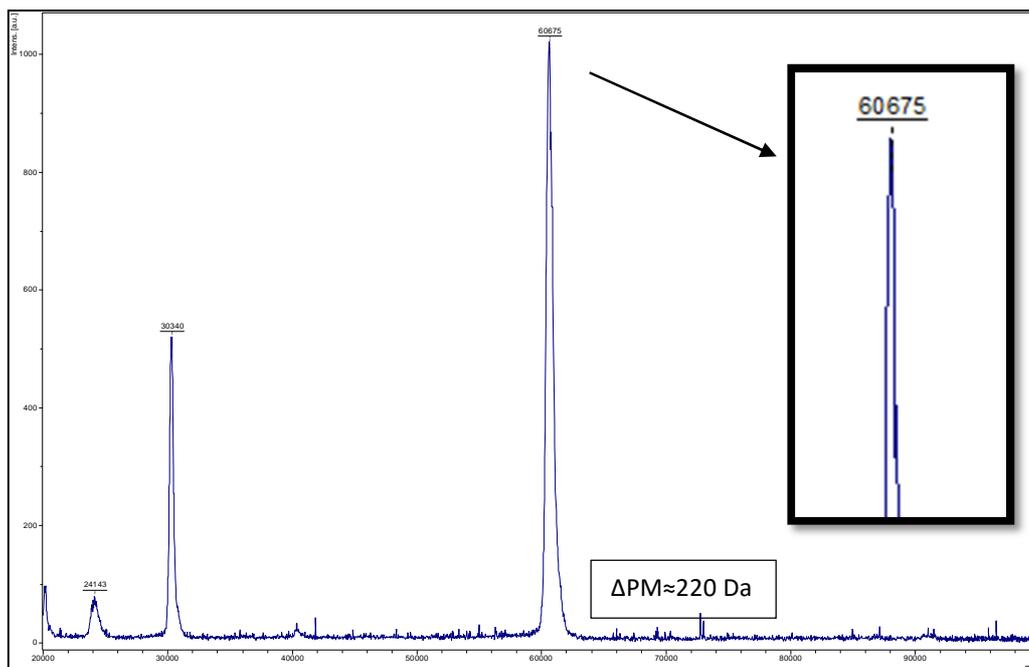


Figura 5.2.2.4.3.2 : Espectro de masas MALDI-ToF del polímero VKVx24 sobre el producto de reacción del VKVx24 con 3eq. de la tiolactona seleccionada en HCl.

En este caso el espectro de masas nos desvela la introducción de entre 1 y 2 moléculas de tiolactona por cada molécula de polímero, y así nos lo hace ver con el pico de mayor intensidad que se corresponde con una masa de 60659 ± 41 Da y una diferencia con el peso molecular del biopolímero de partida de más de 200 Da. La diferencia de pesos moleculares obtenida entre ambos resultados y su división entre el peso molecular de la tiolactona utilizada es de 1.4, siendo ésta la media de las moléculas del derivado de cisteína incorporadas al biopolímero de partida.

5.2.2.4.4. Modificación por tiolación del biopolímero ERL-VKVx24 con 1,5/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio buffer MES pH 3,83.

Para esta reacción se cambió el medio que proporciona el pH ligeramente ácido necesario para mantener las condiciones que este tipo de reacción precisa. Se pretendía estudiar qué tipo de medio proporciona mejores condiciones y resultados a la reacción de modificación por tiolación. El biopolímero ELR-VKVx24 (1 eq) en condiciones reductoras reacciona con la tiolactona seleccionada (1,5/24 eq) dando lugar a un tiómero que presenta una molécula del derivado de la cisteína unida a su cadena polimérica, como podemos observar en el espectro de ^1H RMN (Figura 5.2.2.4.4.1).

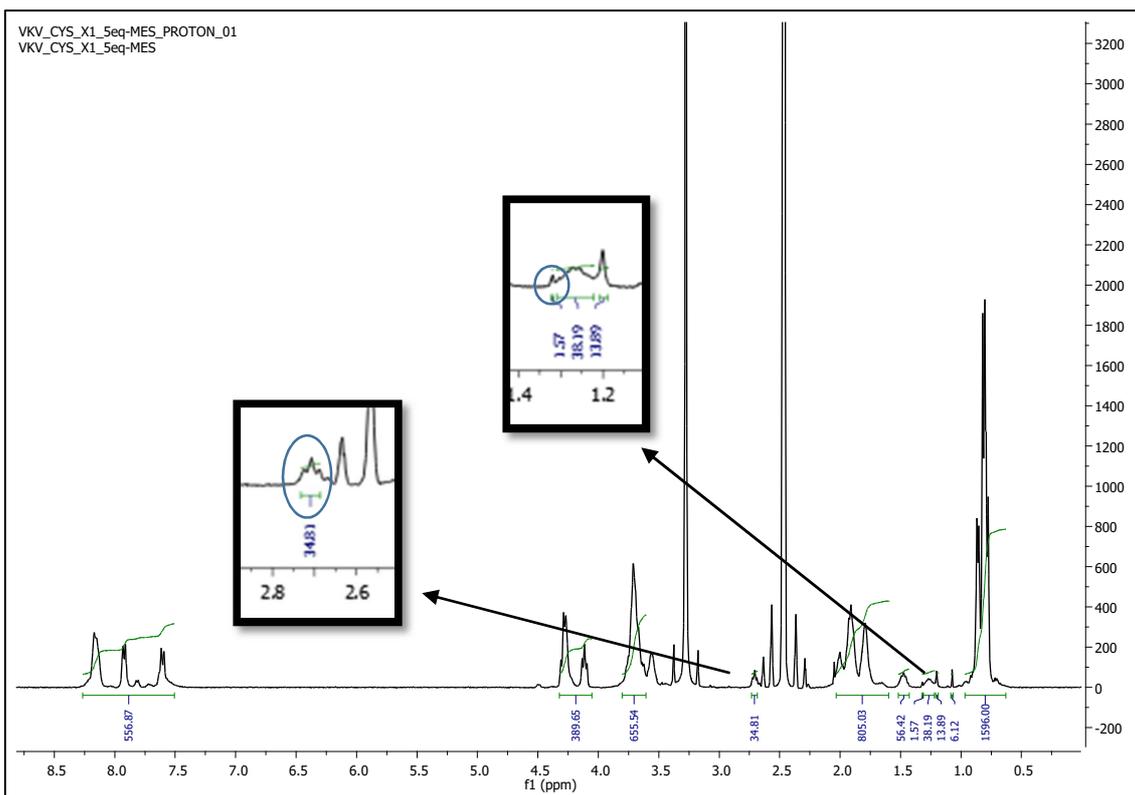


Figura 5.2.2.4.4.1 : Espectro ^1H RMN del polímero VKVx24 x1.5eq de la tiolactona seleccionada en buffer MES.

Se puede observar, como en los casos anteriores, los picos característicos de esta modificación a 2,75 ppm y 1,3 ppm, protones del metileno y grupo tiol, respectivamente. La señal perteneciente al protón del grupo tiol es bastante pequeña, luego, se puede deducir que, a pesar de no poder ser cuantificada la cantidad de biopolímero modificado, sí que se ha producido la reacción.

5.2.2.4.5. Modificación por tiolación del biopolímero ERL-VKVx24 con 3/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio buffer MES pH 3,83.

Con objeto de observar si es posible la introducción de un mayor número de moléculas del derivado de la cisteína a la cadena polipeptídica del biopolímero utilizado se aumentaron, como en el caso del medio HCl, el número de equivalentes utilizados.

La reacción del recombinámero tipo elastina VKVx24 en presencia del agente reductor β mercaptoetanol con la tiolactona (3/24 eq) ha dado lugar a un tiómero, del cual no se puede determinar con exactitud el número de grupos tiol a partir del espectro de ^1H RMN obtenido (Figura 5.2.2.4.5.1).

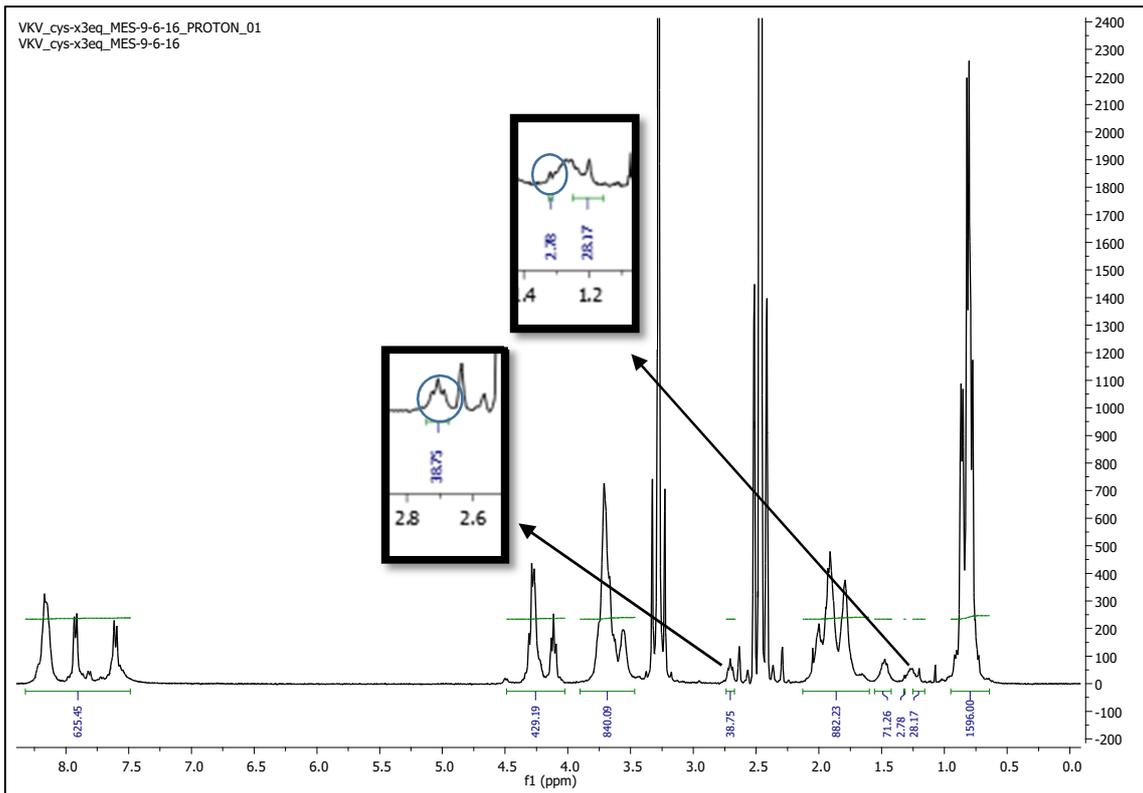


Figura 5.2.2.4.5.1 : Espectro 1H RMN del polímero VKVx24 x3eq de la tiolactona seleccionada en buffer MES.

En este caso el pico que aparece a 1,3 ppm integra por casi 3 unidades, lo que muestra un mayor grado de conversión en el biopolímero, al cual resultaría modificado por 3 moléculas de cisteína.

- Análisis de las posibles polimerizaciones:

Además de la caracterización de cada uno de los productos obtenidos a través de la utilización de estas 3 técnicas, se realizó una electroforesis a los productos obtenidos (Figura 5.2.2.4.5.2).

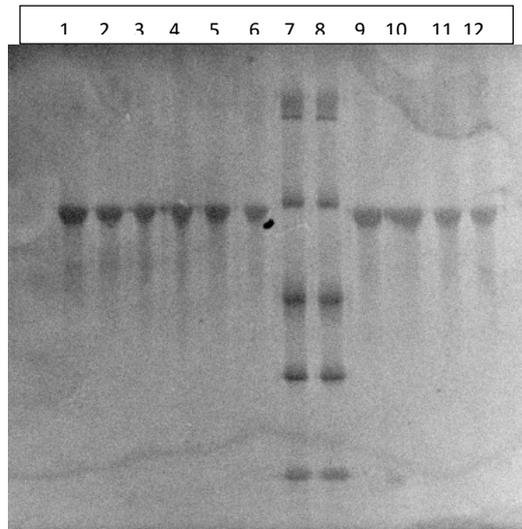


Figura 5.2.2.4.5.2 : Imagen adquirida por el programa 'KODAK 1D Scientific Imaging'. Resultado de la electroforesis de cada una de los productos de tiolación del VKVx24. Teniendo de izquierda a derecha en cargas pares: calles 1-2 VKVx24 x1.5eq cys en MES, calles 3-4 VKVx24 x3eq cys en MES, calles 5-6 VKVx24 de partida, calles 7-8 MARKER DE PROTEÍNAS, calles 9-10 VKVx24 x1.5eq cys en HCl, calles 11-12 VKVx24 x3eq cys en HCl. El PROTEÍN MARKER consta de unas proteínas patrón que nos indican los siguientes pesos moleculares comenzando por la parte superior: 116, 66.2, 45.0, 35.0 y 25.0 kDa. El loading buffer de carga utilizado no contenía β -mercaptoetanol.

Uno de los aspectos más importantes de la reacción de tiolación es el control de las condiciones del medio en el que se realiza. Debido a que estos grupos tiol tienden a formar puentes disulfuro entre ellos, tanto a pHs altos como en presencia de oxidantes, como puede ser el propio oxígeno atmosférico.

A partir de los resultados obtenidos en la electroforesis podemos determinar que no se ha producido una polimerización observable entre las moléculas de los polímeros modificados a través de puentes disulfuro. Sin embargo, no podemos descartar los posibles enlaces producidos entre los grupos tiol de una misma molécula de ELR-VKVx24 modificada (enlaces intramoleculares) los cuales no van a ser observables por electroforesis.

5.2.2.4.6. Modificación por tiolación del biopolímero ERL-VKVx24 con 10/24 eq de acetilhomocisteína tiolactona en medio HCl pH 4.

A la vista de los experimentos previos realizados, y con objeto de aumentar el grado de modificación del biopolímero VKVx24, se llevó a cabo una reacción en la cual aumentamos considerablemente el número de equivalentes de tiolactona para obtener una modificación con unas posteriores aplicaciones más apreciables. Así, al biopolímero ERL-VKVx24 (1 eq) en presencia del agente reductor ya citado se le hizo reaccionar con

la tiolactona (10/24 eq) obteniéndose en este caso un tíómero con un número de grupos tiol superior. Se verifica tanto por el espectro de ^1H RMN (Figura 5.2.2.4.6.1) como por el espectro de masas MALDI-ToF (Figura 5.2.2.4.6.2), la incorporación a la cadena polimérica de aproximadamente 3 moléculas del derivado de la cisteína.

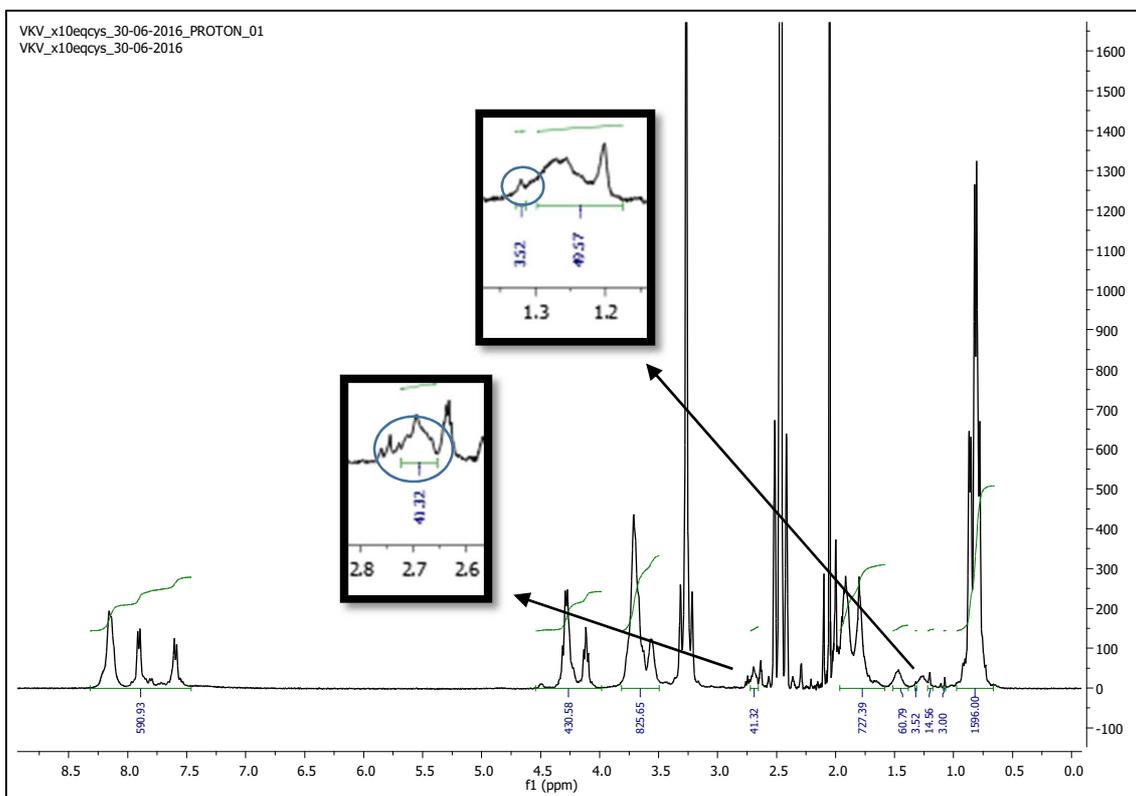


Figura 5.2.2.4.6.1 : Espectro ^1H RMN del polímero VKVx24 x10/24eq de la tiolactona seleccionada en medio HCl pH 4.

En este espectro podemos seguir observando señales a un desplazamiento de 1,3 ppm y 2,75 ppm, correspondientes al protón del grupo tiol y protones del metileno adyacente al grupo tiol de la molécula incorporada a la estructura del biopolímero modificado.

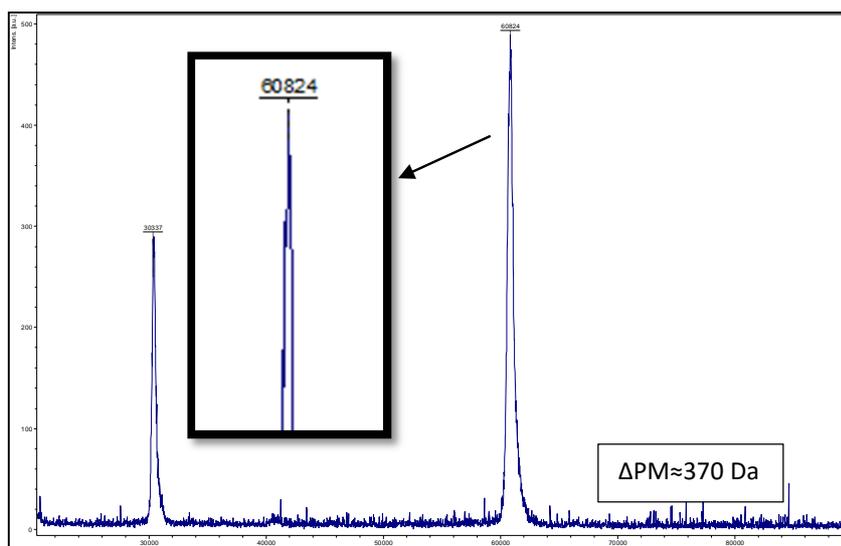


Figura 5.2.2.4.6.2 : Espectro de masas MALDI- TOF del polímero VKVx24 sobre el producto de reacción del VKVx24 con 10eq. de la tiolactona seleccionada en medio HCl pH 4.

En este caso si hacemos la diferencia entre el peso molecular del biopolímero ELR-VKVx24 de partida y el producto resultante de la reacción tenemos como resultado 370 Da. Este peso añadido obtenido se va a deber a la introducción de aproximadamente entre 2 y 3 moléculas del derivado de la cisteína a la estructura de ERL-VKVx24 a través de la reacción con el grupo ϵ amino de los aminoácidos lisina presentes en la cadena.

5.3. Ensayos de mucoadhesión.

El método utilizado (*apartado 4.3.5.2. Medidas de las propiedades mucoadhesivas*) describe que la intensidad de la mucoadhesión es proporcional a la diferencia existente entre la suma algebraica de las absorbancias de los materiales que interaccionan por separado ($A_{TEÓRICA} = A_{MUCIII} + A_{mucoadhesivo}$) y la absorbancia (o turbidez) obtenida de la muestra en la cual se encuentran ambos compuestos enfrentados ($A_{EXPERIMENTAL}$).

$$\text{Mucoadhesión} \propto \Delta A = A_{EXPERIMENTAL} - A_{TEÓRICA}$$

Cuando no existe interacción $\Delta A = 0$; y para valores de $\Delta A > 0$, existe una interacción entre los componentes presentes en la muestra indicando una alta mucoadhesión.

Los materiales mucoadhesivos estudiados en estos ensayos fueron los nanogeles elaborados y los biopolímeros VOKx72 modificado (grupo azido terminal), ELR-VKVx24

de partida y el tiómero obtenido en la reacción de tiolación 4.3.2.3.1.5. (VKVx24 x10eq tiolactona, HCl pH 4) con alrededor de 3 grupos tiol en su estructura.

A partir de las disoluciones de partida (MUCIII a 2 mg/mL y de los mucoadhesivos; nanogel a 1 mg/mL y polímeros a 1 mg/mL) se elaboraron cada una de las muestras a analizar las cuales tenían un volumen total de 40µL y estaban compuestas por una mezcla de mucoadhesivo-mucina.

De cada mucoadhesivo se realizaron 7 muestras donde la concentración del polímero o nanogel utilizado era constante, 0,25 mg/mL, y la cantidad de mucina presente variaba; expresado en %(w/v): 0, 0,0125, 0,025, 0,0375, 0,05, 0,075, 0,125 % (w/v) MUCIII.

Las absorbancias son aditivas, por lo que cabría esperar que una mezcla de dos compuestos diera como absorbancia total la suma de las absorbancias de cada uno de ellos por separado. Sin embargo, cuando existe interacción entre los compuestos presentes en una disolución el valor de absorbancia experimental obtenida es mayor que el valor teórico calculado, lo que demuestra la existencia de mucoadhesión.

Las medidas de turbidez fueron tomadas a una longitud de onda de 500 nm, como blanco el disolvente utilizado fue H₂O-MQ y a pH neutro.

5.3.1. Tamaño y potencial zeta de nanogeles elaborados y MUCIII tras el tratamiento.

Para llevar a cabo los ensayos de mucoadhesión hemos preparado nanogeles como los descritos previamente en el grupo de investigación [29] con un tamaño lo más homogéneo posible y, por otro lado, hemos tratado la mucina de manera que tenga un tamaño pequeño, en comparación con los agregados disponibles comercialmente, y que forme una población lo más homogénea posible [34] (Tabla 5.3.1.1).

MUESTRA	T	Z-Ave	PdI	Zeta Potential
	°C	d.nm		mV
Nanogel.MQ.(1 mg/mL). 37°C	35,5	172,5±6,8	0,163±0,017	+38,94±1,14
MUCIII.MQ.(2 mg/mL)..	35,5	197,1±11,3	0,428±0,046	-28,32±0,73

Tabla 5.3.1.1: Diámetro de partícula y potencial zeta de las mucinas tratadas y nanogeles elaborados.

Así, en este caso, se muestra que los nanogeles obtenidos poseen un diámetro de partícula medio de 172 nm con una polidispersidad de 0,163. La polidispersidad (PDI) nos va a indicar la variedad de tamaños de partícula que tenemos presentes en la muestra, el PDI da valores que se encuentran entre 0 y la unidad, lo que quiere decir que, en este caso, una polidispersidad de 0,163 significará que hay una alta homogeneidad dentro del tamaño de partícula que estos nanogeles elaborados poseen.

Del mismo modo, las partículas de mucina utilizadas disponen de un tamaño adecuado, con un diámetro de partícula medio de 197 nm, aunque su polidispersidad es mayor, 0.428. En el caso de las mucinas, el PDI obtenido es un buen resultado ya que al tratarse de proteínas de origen animal, y por tanto, heterogéneas su control será más complicado.

Los potenciales obtenidos para cada uno de los sistemas, positivo para los hidrogeles y negativo para la mucina, son los debidos y adecuados para su utilización.

A partir de estos resultados podemos concluir que tanto los nanogeles como las mucinas obtenidas son correctas para su uso en las pruebas siguientes.

5.3.2. Resultados de las medidas de las propiedades mucoadhesivas.

Los resultados obtenidos se exponen a continuación, haciendo primero una comparativa entre las absorbancias experimentales obtenidas y teóricas calculadas, las diferencias existentes entre ellas (ΔA , proporcional a la mucoadhesión) y, por último, una comparativa general del comportamiento de cada uno de los materiales mucoadhesivos con objeto de llegar a una conclusión final.

- Absorbancias de los sistemas de no interacción a $\lambda = 500\text{nm}$:

A partir de las absorbancias obtenidas de los sistemas de no interacción (disoluciones en las que únicamente se encuentra presente un compuesto) se calculan las absorbancias teóricas que se utilizarán para la posterior comparación con las obtenidas experimentalmente.

$$A_{\text{TEÓRICA}} = A_{\text{mucoadhesivo}} + A_{\text{MUCIII}}$$

La absorbancia teórica de cada muestra será la suma de las absorbancias medidas de cada uno de los compuestos por separado, las cuales aparecen en las siguientes tablas (*Tabla 5.3.2.1 y Tabla 5.3.2.2*).

· MUCIII:

En la tabla presentada a continuación se muestran las absorbancias obtenidas de cada una de las muestras en las cuales solo se encuentra presente la mucina.

MUCIII %(w/v)	0,0125	0,025	0,0375	0,05	0,075	0,125
Abs	0,0015±0,0005	0,0013±0,0003	0,0020±0	0,0035±0,0005	0,0050±0,0010	0,0115±0,0010

Tabla 5.3.2.1 : Medidas de absorbancia de las muestras de mucina.

·Mucoadhesivos:

En la tabla presentada a continuación se muestran las absorbancias obtenidas de cada una de las muestras en las cuales sólo se encuentra presente cada uno de los mucoadhesivos estudiados a una concentración de 0,25 mg/mL.

Mucoadhesivo	VKVx24/3SH	VKVx24	VOKx72
Abs	0,0071±0,0008	0,0065±0,0005	0,0093±0,0016

Tabla 5.3.2.2 : Medidas de absorbancia de las muestras de los mucoadhesivos analizados.

5.3.3.1. Resultados de los análisis de las propiedades mucoadhesivas de los nanogel por turbidimetría.

Como podemos observar en la gráfica (*Figura 5.3.3.1.1*) existe una diferencia entre los valores teóricos de las absorbancias calculadas a partir de la suma de los sistemas de no interacción y las obtenidas a partir de cada muestra experimentalmente. Esta diferencia demuestra la existencia de la interacción entre el mucoadhesivo (nanogel) y mucina (MUCIII).

Estas propiedades mucoadhesivas del nanogel van a ser debidas principalmente a la gran superficie que el nanogel dispone para interaccionar con las partículas de mucina presentes en la muestra.

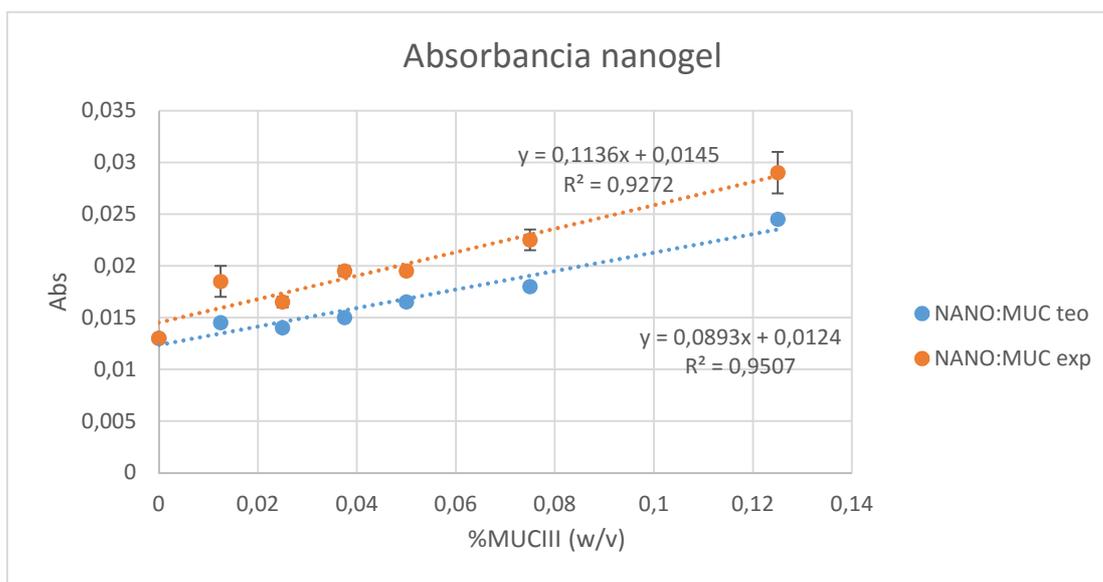


Figura 5.3.3.1.1: Comparativa de las absorbancias teóricas y las obtenidas experimentalmente de las muestras de nanogel a 0,25mg/mL enfrentadas a diferentes cantidades de MUCIII.

5.3.3.2. Resultados de los análisis de las propiedades mucoadhesivas del ELR VOKx72 por turbidimetría.

En el caso del biopolímero ELR-VOKx72, la evidencia de la existencia de una gran interacción entre este mucoadhesivo y la mucina se puede ver en la gráfica elaborada (Figura 5.3.3.2.1). La diferencia entre los valores de las absorbancias teóricas calculadas y las obtenidas experimentalmente es mayor que en el caso de los nanogeles.

Este gran poder mucoadhesivo que posee el biopolímero ELR-VOKx72 es debido a la presencia de 72 aminoácidos lisina a lo largo de su estructura, lo que significa que, a pH neutro, los grupos amino que contienen estos aminoácidos se encontrarán cargados positivamente proporcionando al biopolímero una carga neta positiva que interaccionará con la carga neta negativa de las mucinas dando lugar a una alta interacción entre estos dos sistemas, mucoadhesión.

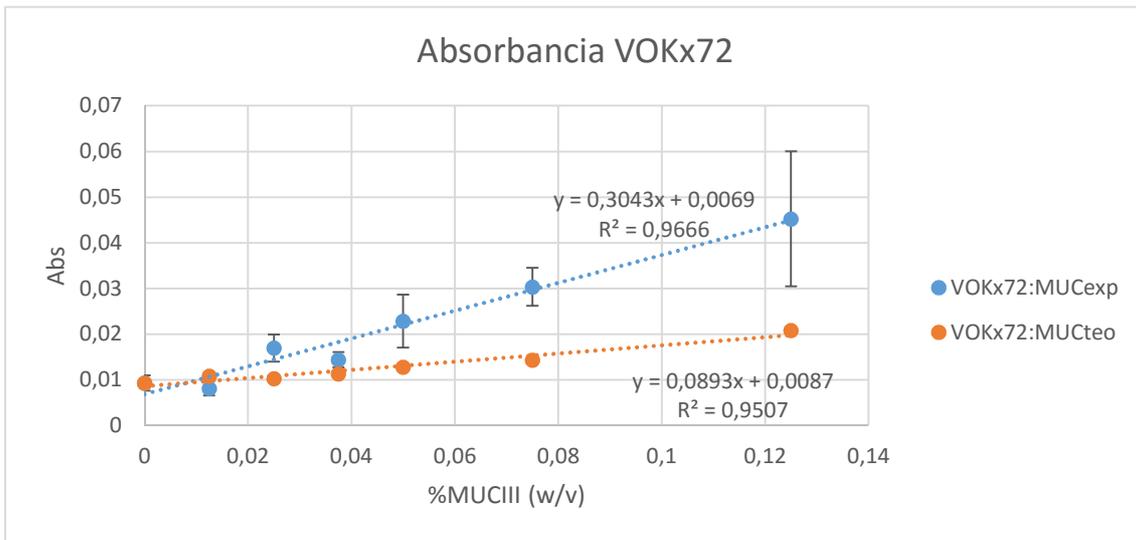


Figura 5.3.3.2.1 : Comparativa de las absorbancias teóricas y las obtenidas experimentalmente de las muestras de VOKx72 a 0,25mgr/mL enfrentadas a diferentes cantidades de MUCIII.

5.3.3.3. Resultados de los análisis de las propiedades mucoadhesivas del ELR VKVx24 por turbidimetría.

En esta ocasión, en la gráfica (Figura 5.3.3.3.1) se puede observar cómo las 4 primeras medidas de absorbancia tomadas se aproximan bastante a las calculadas teóricamente y que, con cantidades mayores de mucina (0,075 y 0,125 % (w/v)), podemos ver un cambio en las absorbancias.

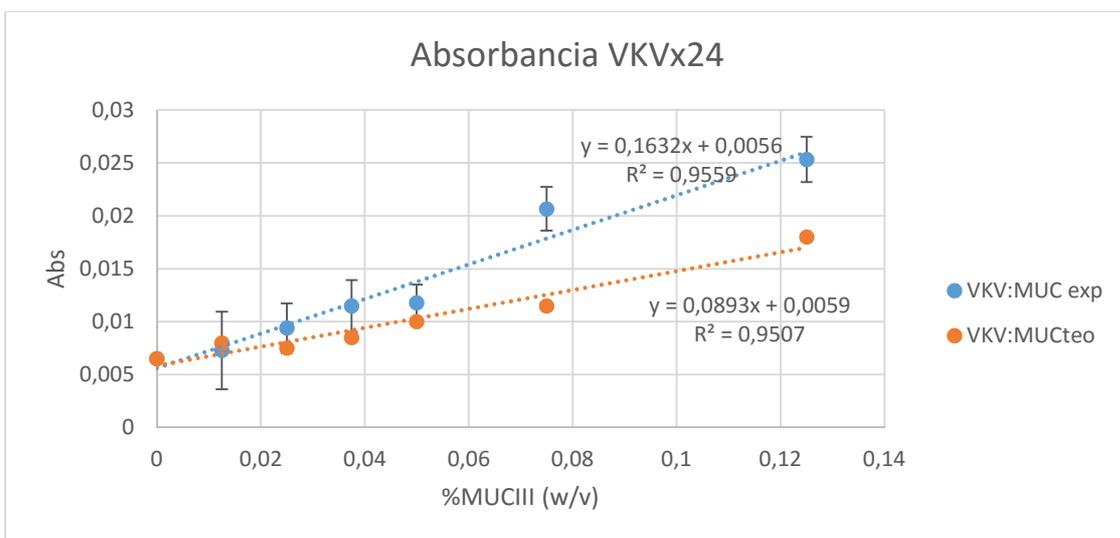


Figura 5.3.3.3.1 : Comparativa de las absorbancias teóricas y obtenidas experimentalmente de las muestras de VKVx24a 0,25mgr/mL enfrentadas a diferentes concentraciones de MUCIII.

Dividiendo en dos los resultados de las absorbancias obtenidas en cada una de las muestras de ELR-VKVx24 con MUCIII, podemos comprobar cómo existen dos tendencias diferentes (Figura 5.3.3.3.2).

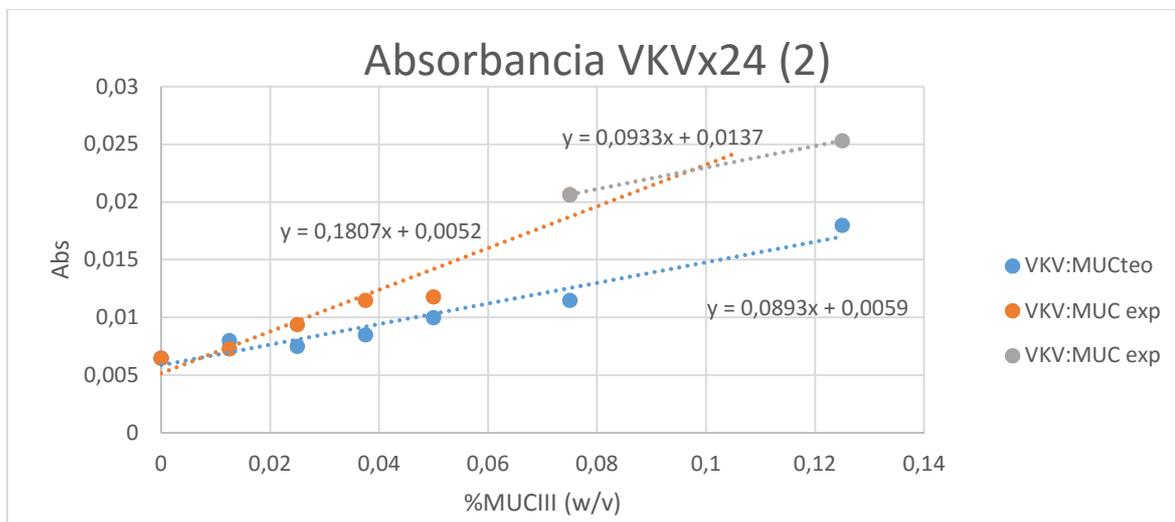


Figura 5.3.3.3.2 : Representación de las dos tendencias observadas en las absorbancias del VKVx24.

Para la obtención del último de los resultados la pendiente de la línea de tendencia es diferente a la del conjunto de los primeros resultados e igual a la pendiente de las absorbancias calculadas de manera teórica a partir de los sistemas de no interacción.

Esto quiere decir que, a una cantidad de mucina presente en la muestra del 0,075% (w/v) MUCIII, el polímero contenido ha interactuado en su totalidad, y por lo tanto, las siguientes medidas de absorbancia tomadas a muestras con una mayor cantidad de mucina, como ocurre en aquella con un 0,125% (w/v) MUCIII, van a ser debidas únicamente a ese aumento de la cantidad de mucina existente.

Aun así, se puede observar cómo las diferencias entre las absorbancias teóricas y experimentales no son muy altas. Siendo así el biopolímero ELR-VKVx24 un polímero con bajas propiedades mucoadhesivas.

El VKVx24 tendrá propiedades mucoadhesivas, aunque éstas sean bajas, debido a que en su estructura existen 24 grupos amino presentes en cada uno de sus aminoácidos lisina, los cuales estarán cargados positivamente a pH neutro.

5.3.3.4. Resultados de los análisis de las propiedades mucoadhesivas por turbidimetría del ELR VKVx24 modificado con tres grupos tiol en su estructura.

Estudiando la gráfica de los resultados que nos proporciona el tiómetro que tiene presentes en su estructura 3 grupos tiol, podemos observar una clara mejora en las propiedades mucoadhesivas con respecto al biopolímero ELR-VKVx24 de partida (*Figura 5.3.3.4.1*).

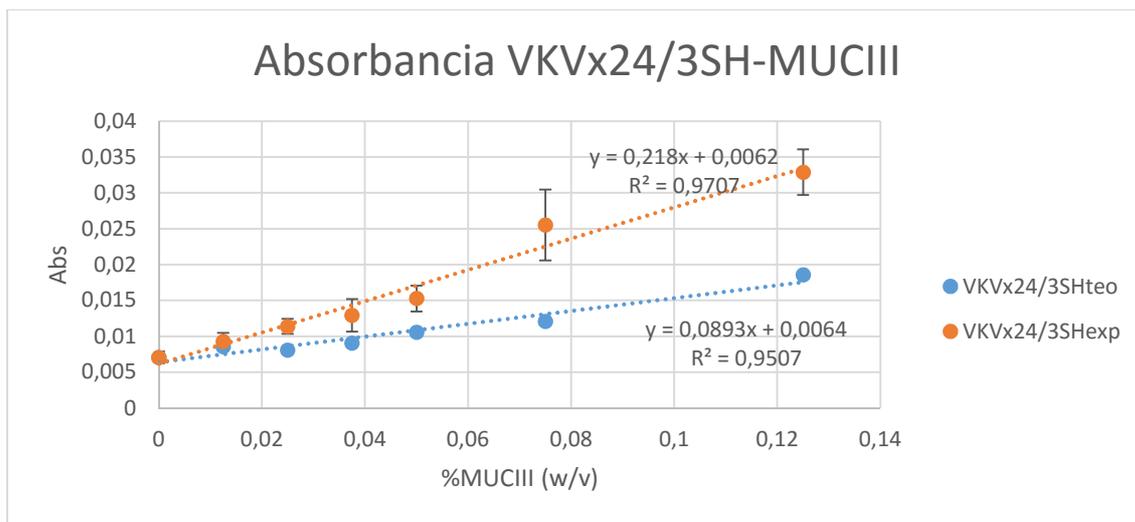


Figura 5.3.3.4.1 : Comparativa de las absorbancias teóricas y las obtenidas experimentalmente de las muestras de VKVx24 con tres grupos tiol en su estructura a 0,25mgr/mL enfrentadas a diferentes concentraciones de MUCIII.

Con este ejemplo se puede verificar la mejora de la mucoadhesión que supone la incorporación de grupos tiol a la estructura de un biopolímero debido a la formación de puentes disulfuro entre los dominios de cisteína presentes en la mucina y los átomos de azufre de los tioles.

- *Comparación de las propiedades mucoadhesivas de los sistemas estudiados.*

Para valorar qué polímero será el mejor para llevar a cabo la modificación sobre la superficie de los nanogeles y así mejorar la mucoadhesión de su correspondiente macroscópico, el hidrogel, y conseguir una mayor adherencia a las membranas mucosas oculares, se ha hecho una gráfica comparativa de las propiedades mucoadhesivas ($\text{Mucoadhesión} \propto \Delta A = A_{\text{EXPERIMENTAL}} - A_{\text{TEÓRICA}}$) de cada uno de los materiales analizados (*Figura 5.3.3.4.2*).

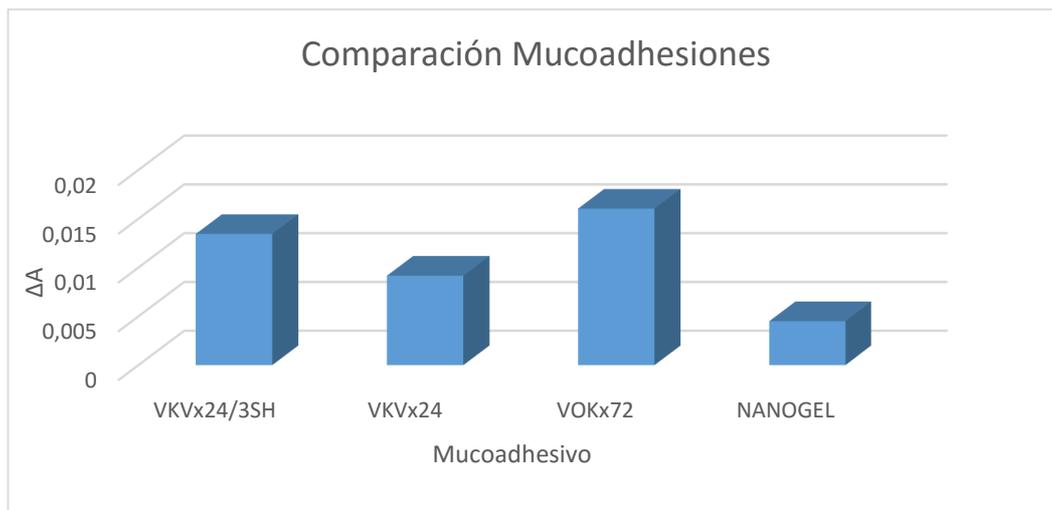


Figura 5.3.3.4.2 : Gráfica comparativa al 0,075% (w/v) MUCIII de las diferentes propiedades mucoadhesivas de los materiales estudiados, elaborados y modificados.

En esta comparativa podemos ver que el tiómero resultante de la modificación del biopolímero ELR-VKVx24 con 3 moléculas del derivado de la cisteína incorporadas a su estructura presenta una mayor interacción con las mucinas, traducándose en una mayor mucoadhesión.

De manera que, las propiedades mucoadhesivas del biopolímero ELR-VKVx24 modificado con estos restos tiol presentes en su estructura son 1,5 veces mayores que las del biopolímero ELR-VKVx24 de partida.

Haciendo una comparativa general, las propiedades mucoadhesivas de VOKx72 y de VKVx24 modificado con tres restos tiol en su estructura son superiores a las de los nanogeles elaborados, como ya hemos ido describiendo.

Por encima de todos los mucoadhesivos analizados destacan las propiedades que tiene el polímero VOKx72, de lo cual podemos deducir que las interacciones electrostáticas establecidas entre las mucinas con carga neta negativa y el polímero VOKx72 con carga neta positiva proporcionan una mucoadhesión superior a la que aportan los grupos tiol en la estructura del VKVx24.

Sin embargo, aún tratándose de polímeros diferentes y no poder hacer una comparativa directa sobre qué interacción predomina en la mucoadhesión, podemos observar como la incorporación de restos tiol a la estructura del biopolímero ELR-VKVx24 le proporciona unas propiedades mucoadhesivas muy parecidas a las que la

carga neta positiva a pH fisiológico facilita al ELR-VOKx72. Pudiendo así verificar la importancia de la presencia de restos tiol en un biopolímero para su posterior aplicación clínica a una membrana mucosa.

La interacción entre las mucinas y el polímero ELR-VOKx72 se puede valorar visualmente (*Figura 5.3.3.4.3*), donde se aprecia la turbidez existente.



Figura 5.3.3.4.3 : Prueba visual. Comparación de la turbidez generada entre la interacción mucina/nanogeles (izquierda) y mucina/VOKx72 (derecha, turbia).

A partir de esta imagen podemos verificar que las propiedades mucoadhesivas del VOKx72 son las más eficaces, estando por encima de las propiedades de los nanogeles elaborados que se pretenden modificar superficialmente.

5.4. Anclaje del biopolímero ELR-VOKx72 modificado con un extremo azido terminal.

Para mejorar y promover la mucoadhesión de los nanogeles elaborados se van a anclar a su superficie cadenas de biopolímeros ELR modificados en su extremo carboxi-terminal, VOKx72 con un grupo azido terminal. Este extremo se va a fijar a la superficie del nanogel por química 'click' entre el grupo azido terminal del ELR modificado y los ciclooctinos presentes en esta superficie.

Este anclaje se produce poniendo en contacto una determinada cantidad de nanogel y polímero modificado en disolución.

Las proporciones utilizadas de cada material expresadas en ratios en masa (nanogel:VOKx72) en cada caso fueron 1:0,5, 1:1 y 1:1,5, partiendo en cada caso de disoluciones con una concentración de 1 mg/mL.

Se puede observar como con la modificación superficial, el tamaño (diámetro de partícula), aumenta a medida que aumentamos la cantidad de polímero a la que enfrentamos el nanogel (Figura 5.4.1).

Con la modificación superficial el potencial zeta no sigue una tendencia clara, para explicar este hecho tenemos que recurrir al proceso a través del cual el equipo Zsizer Nano nos proporciona esta medida.

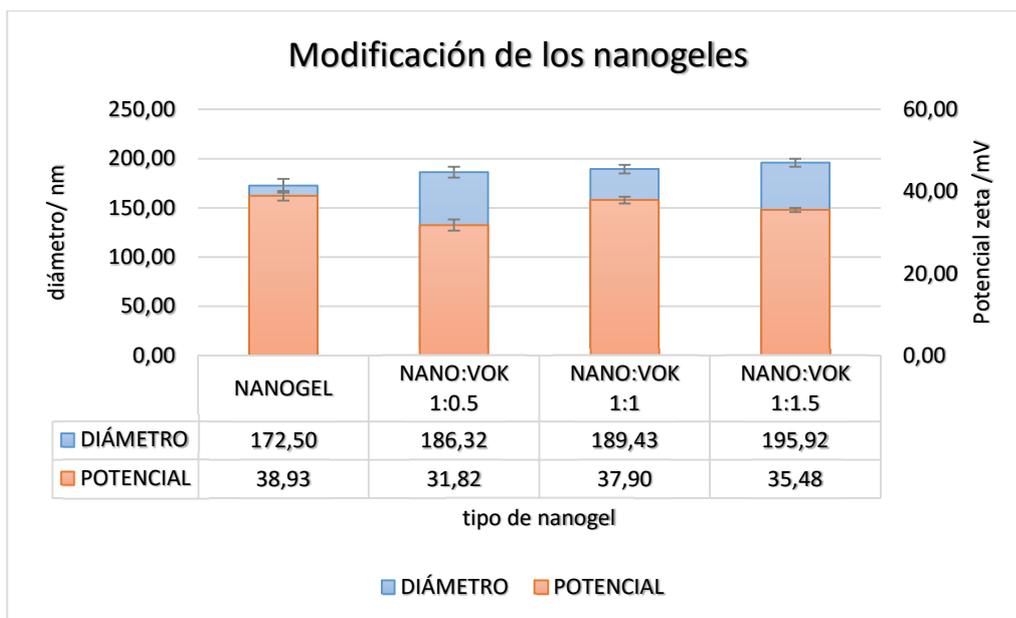


Figura 5.4.1: Variación del diámetro de partícula y potencial zeta del nanogel con la modificación superficial.

MUESTRA	Z-Ave/d.nm	Pdl	Zeta Potential/mV
MUCIII.	197,1±11,3	0,428±0,046	-28,31±0,73
Nanogel.	172,5±6,8	0,163±0,017	+38,93±1,14
NANO:VOK 1:0.5	186,3±6,8	0,143±0,017	+31,81±1,38
NANO:VOK 1:1	189,4±4,4	0,153±0,020	+37,90±0,79
NANO:VOK 1:1.5	195,9±4.0	0,159±0,026	+35,48±0,50

Tabla 5.4.1: Tabla resumen de las propiedades del nanogel de partida y modificados en su superficie.

El potencial zeta es el potencial existente entre la superficie de la partícula y el líquido de dispersión, que varía en función de la distancia a la superficie de la partícula.

El Zetasizer Nano produce un espectro de frecuencia a partir del cual se calcula la movilidad electroforética. El potencial z está relacionado con la movilidad electroforética a través de la ecuación de Henry, de donde obtenemos que:

$$z \propto \frac{U_e}{f(ka)}$$

Con el aumento de la cantidad de biopolímero disponible para anclarse a la superficie del nanogel hay un aumento en la conductividad medida. Sin embargo, hay otro factor que afecta a la medida del potencial zeta que vamos a obtener de cada tipo de nanogel, éste es el conjunto del radio de la partícula y espesor de la doble capa eléctrica, la función de Henry $f(ka)$.

En este caso tanto el radio (como hemos podido ver en la *Figura 5.4.1* como el espesor de la doble capa eléctrica aumentará al aumentar la superficie del nanogel con la modificación producida mediante el anclaje superficial. Lo que significará, analizando la ecuación de Henry, que el aumento de la magnitud $f(ka)$ que se produce con la modificación superficial del nanogel será mayor que el aumento de la movilidad electroforética con cada modificación superficial dando como resultado un potencial zeta homogéneo, o incluso, algo más bajo que el de partida.

5.5. Valoración de las propiedades mucoadhesivas de los nanogeles modificados y de partida con el equipo Zsizer Nano.

Con este estudio se espera que las propiedades superficiales de las partículas de mucina se vean modificadas por la adhesión a su superficie de nanogeles que poseen las moléculas VOKx72 ancladas, esto sólo ocurrirá si los nanogeles modificados utilizados poseen propiedades mucoadhesivas [34]. La ocurrencia de dicho cambio fue detectada mediante la medición del potencial zeta con el equipo Zsizer Nano.

Para realizar estas pruebas se utilizaron las muestras ya estudiadas expresadas en ratio en masa nanogel:polímero del apartado anterior, y, en este caso, las proporciones a las que enfrentamos estos nanogeles modificados con diferentes cantidades de MUCIII también están expresadas en ratio masa. Siendo estos ratios; 1:0, 1:1, 1:1,5, 1:2 y 1:3 (nanogel:MUCIII).

Partiendo de las características que tienen cada uno de los sistemas utilizados (*Tabla 5.4.1*). Los resultados obtenidos sugieren que los nanogeles modificados tienen una alta afinidad por las partículas de mucina y éstos se encontrarán cubriendo y modificando su superficie, como se puede observar valorando los cambios de potencial zeta en cada una de las muestras analizadas (*Figura 5.5.1*).

Al ir aumentando la proporción de nanogel modificado presente en la muestra se puede observar como el potencial zeta va aumentando y, al ratio 1:1, el potencial zeta de las partículas de mucina ya se aproxima a cero, esto indica que sí que ocurre una modificación de las propiedades superficiales de las partículas de mucina presentes en la muestra por adhesión de los nanogeles modificados a ellas.

Cuanto mayor es la cantidad de biopolímero VOKx72-extremo azido injertado al nanogel, más notorio es el cambio del potencial zeta que podemos observar ya que tenemos un mayor número de cargas positivas en la superficie del nanogel.

La alta interacción entre los nanogel y partículas de mucina y las concentraciones utilizadas dió lugar a la presencia de una turbidez en la muestra que no permitía medir correctamente los valores de PDI y tamaño ya que estos se veían aumentados considerablemente.

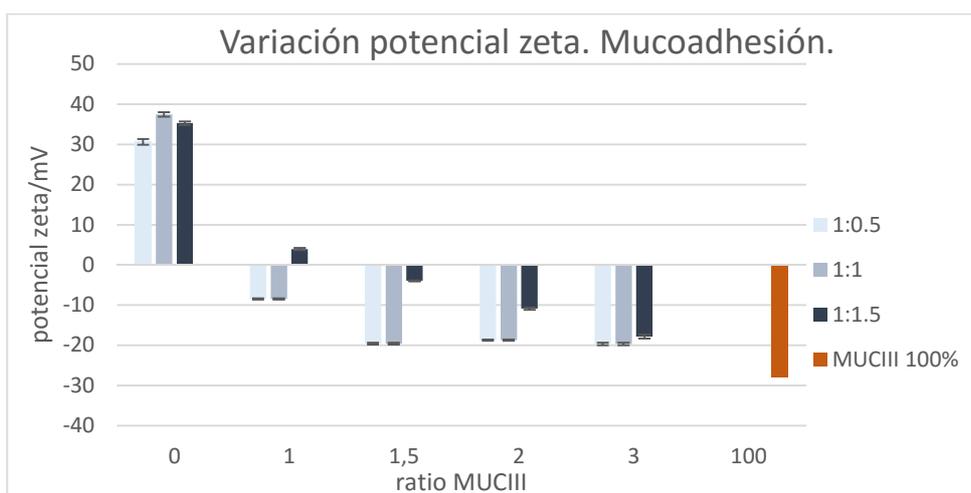


Figura 5.5.1: Evolución del potencial zeta con la adhesión de los nanogel modificados superficialmente a las partículas de mucina.

Si comparamos estos resultados obtenidos sobre las propiedades mucoadhesivas de los nanogel modificados con los obtenidos sobre las propiedades que poseen los nanogel de partida (Apartado 4.6.1) (Figura 5.5.2) podemos observar que se necesitan unas proporciones mucho mayores de nanogel de partida con respecto a la cantidad de mucina presente en la muestra para poder observar una variación del potencial zeta de estas partículas de mucina. Esto quiere decir que, las propiedades superficiales de las partículas de mucina van a ser modificadas en menor medida por los

nanogel de partida que por los nanogel a los cuales se encuentran anclados en la superficie moléculas de VOKx72 por su extremo azido.

En el caso de los nanogel de partida necesitamos tener presente en la muestra 20 veces más cantidad de nanogel que de mucina para poder observar un cambio considerable en el potencial zeta medido.

Pudiendo verificar así, la mejora de las propiedades mucoadhesivas de los nanogel de partida con la correspondiente modificación superficial ya descrita.

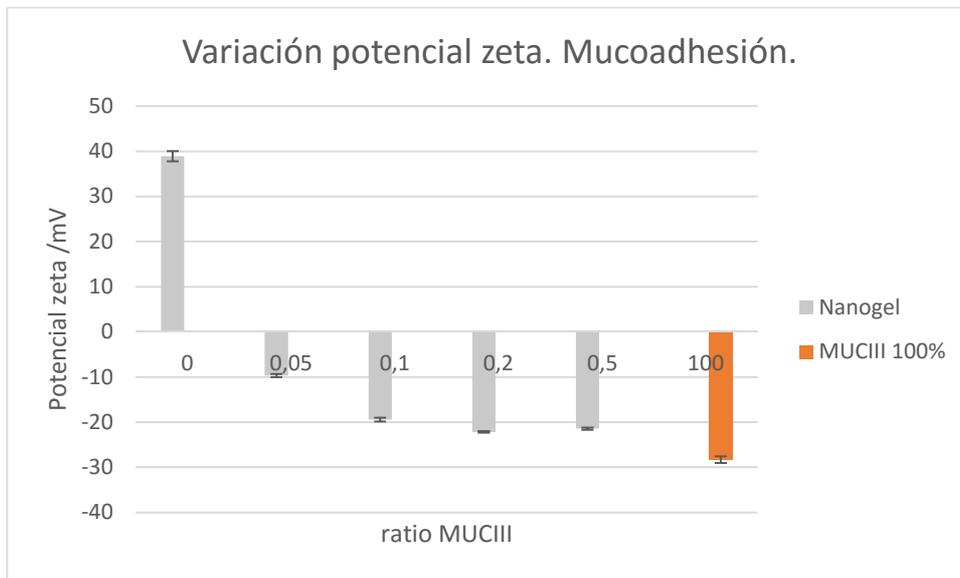


Figura 5.5.2: Evolución del potencial zeta con la adhesión de los nanogel de partida a las partículas de mucina.

CONCLUSIONES.

Se ha podido optimizar la reacción de modificación del extremo C-terminal del biopolímero ELR-VOKx72 comprobando cómo la presencia de la N-hidroxisuccinimida durante la activación del grupo carboxilo del biopolímero ELR-VOKx72 por una carbodiimida (DCC) mejora la reacción de amidación por acoplamiento de un compuesto aminado convirtiendo la O – acilisourea intermedia en un NHS-ester amino reactivo.

Se ha conseguido modificar químicamente el extremo C-terminal del biopolímero ELR-VOKx72, pudiendo así incorporar un grupo azido o alquínico terminal esencial para su posterior aplicación en el anclaje superficial en hidrogeles.

Se ha modificado el biopolímero ELR-VKVx24 con un reactivo biocompatible y libre de reacciones secundarias controlando las condiciones de reacción reductoras necesarias. Así, se ha conseguido modificar las cadenas laterales del biopolímero ELR-VKVx24 incorporando a su estructura moléculas derivadas de la cisteína que le proporcionan restos tiol, obteniendo tímeros.

Se corroborado con estudios de mucoadhesión por turbidimetría la existencia una mejora de la interacción polímero-mucina con la incorporación de grupos tiol al biopolímero ELR-VKVx24 modificado.

Se ha comprobado el gran poder mucoadhesivo del biopolímero ELR-VOKx72 mediante ensayos turbidimétricos debido a su carga neta positiva a pH fisiológico por la presencia de 72 grupos amino a lo largo de la cadena polimérica. Es posible, por tanto, que las propiedades mucoadhesivas de este biopolímero se vean altamente incrementadas con la incorporación de restos tiol a su estructura.

Se ha conseguido anclar a la superficie del nanogel el biopolímero VOKx72 con un resto azido terminal mediante la química 'click', aumentando considerablemente las propiedades mucoadhesivas del nanogel de partida.

Se estima que en la mejora de la mucoadhesión puede participar tanto la presencia de mayor carga positiva, de tioles y de moléculas con capacidad de movimiento (como hemos podido comprobar sobre los nanogeles).

REFERENCIAS.

- [1] Ilene K. Gipson. Distribution of mucins at the ocular surface. **2004**, 379, 382.
- [2] Robin R. Hodges; Darlene A. Dartt. Tear Film Mucins: Front Line Defenders of the Ocular Surface; Comparison with Airway and Gastrointestinal Tract Mucins. **2013**, 63, 65, 70.
- [3] Olof Svensson; Thomas Arnebrant. Mucin layers and multilayers — Physicochemical properties and applications. **2010**.
- [4] Marika Ruponen; Arto Urtti. Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery. **2015**, 442 – 446.
- [5] Kumar Roy; Bala PrabhakarBioadhesive. Polymeric Platforms for Transmucosal Drug Delivery Systems. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, February **2010**; 91-104.
- [6] Nikolaos A. Peppas; Pierre A. Burri. SURFACE, INTERFACIAL AND MOLECULAR ASPECTS OF POLYMER BIOADHESION ON SOFT TISSUES. *Journal of Controlled Release*, 2 **1985**, 257-275
- [7] John D. Smart. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **2005**, 1559 – 1565.
- [8] Gavin P. Andrews, Thomas P. Laverty, David S. Jones. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71, **2009**, 505–518
- [9] Mythri .G, K. Kavitha, M. Rupesh Kumar, Sd. Jagadeesh Singh. Novel Mucoadhesive Polymers. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*; **2011**, 37-42
- [10] Health Center at Tyler Department of Biochemistry Tyler, Texas, USA. Elastin and the lung, Review. **2010**, 577 – 585.
- [11] Arias, F. J., Reboto, V., Martin, S., Lopez, I., Rodriguez-Cabello, J. C., Tailored recombinant elastin-like polymers for advanced biomedical and nano(bio)technological applications. *Biotechnol Lett.* **2006**, 28, 687 – 695.
- [12] karthik Nagapudi, William T. Brinkman, Johannes E. Leisen, Lei Huang, R. Andrew McMillan, Robert P. Apkarian, Vincent P. Conticello, Elliot L. Chaikof. Photomediated Solid-State Cross-Linking of an Elastin-Mimetic Recombinant Protein Polymer. **2002**, 35, 1730-1737.
- [13] C. García Arévalo, M. Pierna, A. Girotti, F. Javier Arias, J. Carlos Rodriguez- Cabello, *Soft Matter*. **2012**, 8, 3239.398.
- [14] L. Martín, E. Castro, A. Ribeiro, M. Alonso, J. C. Rodriguez-Cabello, *Biomacromolecules*. **2012**, 13, 293.
- [15] Rory E. Sallach a,b , Wanxing Cui a , Jing Wen a , Adam Martinez a,b , Vincent P. Conticello, Elliot L. Chaikof. Elastin-mimetic protein polymers capable of physical and chemical crosslinking. **2009**, 409 – 422.
- [16] Jordan Despanie, Jugal P. Dhandhukia, Sarah F. Hamm-Alvarez, J. Andrew MacKay. Elastin-like polypeptides: Therapeutic applications for an emerging class of nanomedicines. **2015**, 2 – 6.
- [17] Bin Li; Darwin O. V. Alonso; Valerie Daggett. The molecular basis for the inverse temperature transition of elastin. **2001**, 581 – 592.
- [18] Jordan Despaniea, Jugal P. Dhandhukiaa, Sarah F. Hamm-Alvareza, c, J. Andrew MacKay. Elastin-like polypeptides: Therapeutic applications for an emerging class of nanomedicines. **2015**.

- [19] Sarah R. MacEwan, Ashutosh Chilkoti. Applications of elastin-like polypeptides in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. Volume 190, **2014**, Pages 314–330
- [20] Michael C. Koetting; Jonathan T. Peters; Stephanie D. Steichen; Nicholas A. Peppas Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. **2015**, 3 – 6.
- [21] Todd R. Hoare; Daniel S. Kohane. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **2008**, 1994 – 1999.
- [22] Nikolaos A. Peppas and Jennifer J. Sahlin. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. **1996**, 1553 – 1561.
- [23] Kruti S. Soni, Swapnil S. Desale, Tatiana K. Bronich. Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *Journal of Controlled Release*. **2015**.
- [24] Yanjiao Jianga, Jing Chena, Chao Denga, Erik J. Suuronenb, Zhiyuan Zhong. Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. **2014**, 4969–4985
- [25] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [26] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless and V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853.
- [27] Andrés Suárez. Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares a alquinos catalizadas por cobre. *An. Quím.* **2012**, *108(4)*, 306 – 313.
- [28] Rodríguez-Cabello, J. C., Girotti A., Ribeiro A., Arias F.J. Synthesis of Genetically Engineered Protein Polymers (Recombinamers) as an example of Advances Self- Assembles Smart Materials. *Methods Mol.* **2012**, 17 – 38.
- [29] Israel González de Torre, Luis Quintanilla, Guillermo Pinedo-Martín, Matilde Alonso, and José Carlos Rodríguez-Cabello. Nanogel Formation from Dilute Solutions of Clickable Elastin-like Recombinamers and its Dependence on Temperature: Two Fractal Gelation Modes. *Appl. Mater. Interfaces*. **2014**, *6*, 14509–14515.
- [30] Dayana Acebo-González y Armando T. Hernández-García. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *CENIC Ciencias Biológicas*. **2013**.
- [31] Hassana Hsein, Ghislain Garrait, Eric Beyssac, Valérie Hoffart. Whey protein mucoadhesive properties for oral drug delivery: Mucin–whey protein interaction and mucoadhesive bond strength. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2015**, 799–808.
- [32] Christian A. G. N. Montalbetti, Virginie Falque. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* *61*. **2005**, 10827–10852.
- [33] Lin Liua, Dehua Denga, Yun Xinga, Sujuan Li a, Baiqing Yuana, Jing Chena, Ning Xiaa. Activity analysis of the carbodiimide-mediated amine coupling reaction on self-assembled monolayers by cyclic voltammetry. *Electrochimica Acta* *89*. 2013, 616– 622.
- [34] Hirofumi Takeuchi, Jringjai Thongborisute, Yuji Matsui, Hikaru Sugihara, Hiromitsu Yamamoto, Yoshiaki Kawashima. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2005**, 1583–1594.
- [35] Zetasizer Nano series technical note MRK654-01.

APÉNDICE.

Aminoácidos	Códigos a tres letras	Códigos a una letra
Cisteína	cys	C
Glicina	gly	G
Ácido glutámico	glu	E
Leucina	leu	L
Lisina	lys	K
Metionina	met	M
Prolina	pro	P
Serina	ser	S
Valina	val	V

Tabla A.0.1: Códigos de los aminoácidos contenidos en los biopolímeros utilizados.

ABREVIATURAS

ELR	Elastin Like Recombinamer.
Tt	Temperatura de transición.
FTIR-ATR	Acrónimo inglés 'Fourier Transformed InfraRed attenuated Total Reflectance. Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada.
¹ H RMN	Acrónimo inglés para 'Proton Nuclear Magnetic Resonance'. Espectroscopía nuclear de resonancia magnética nuclear.
MALDI-ToF	Acrónimo inglés para 'Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight'. Desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo.
°C	Grados centígrados.
DCC	Diciclohexilcarbodiimida.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
eq	Peso equivalente.
mV	miliVoltio.
nm	Nanómetro.
PM	Peso Molecular.
w/v	peso/volumen
v/v	volumen/volumen
rpm	revoluciones por minuto.
TEMED	Tetrametilendiamina.
Da	Daltons.
Cys	Abreviatura utilizada para la referencia del derivado de la cisteína en forma de tiolactona utilizada para la reacción de tiolación.
MUCIII	Mucina comercial tipo III.

ANEXO

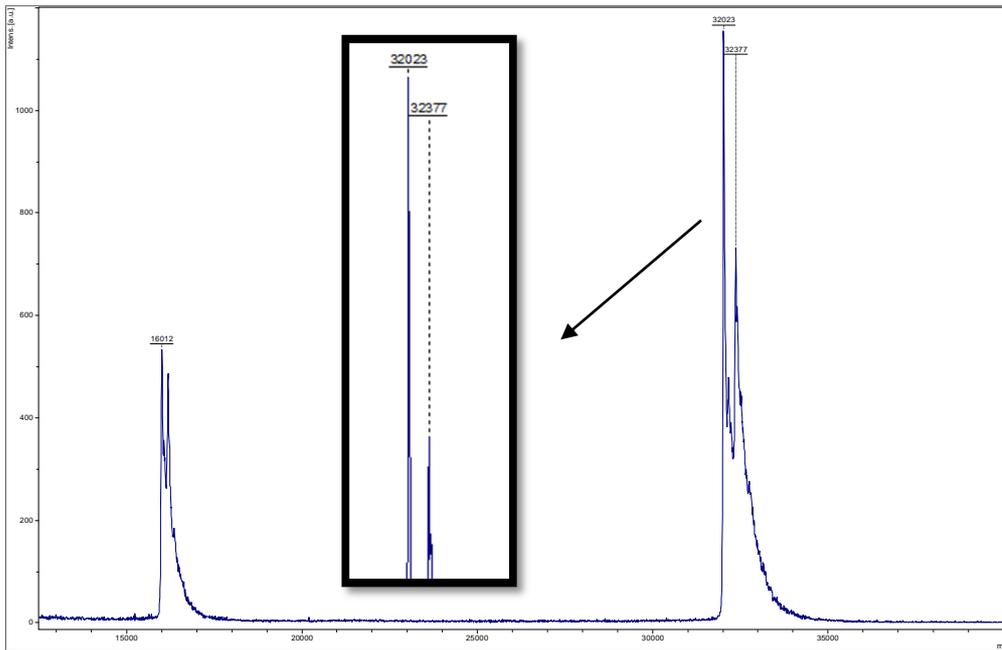


Figura 1: Espectro de masas MALDI-ToF del recombinámero VOKx72.

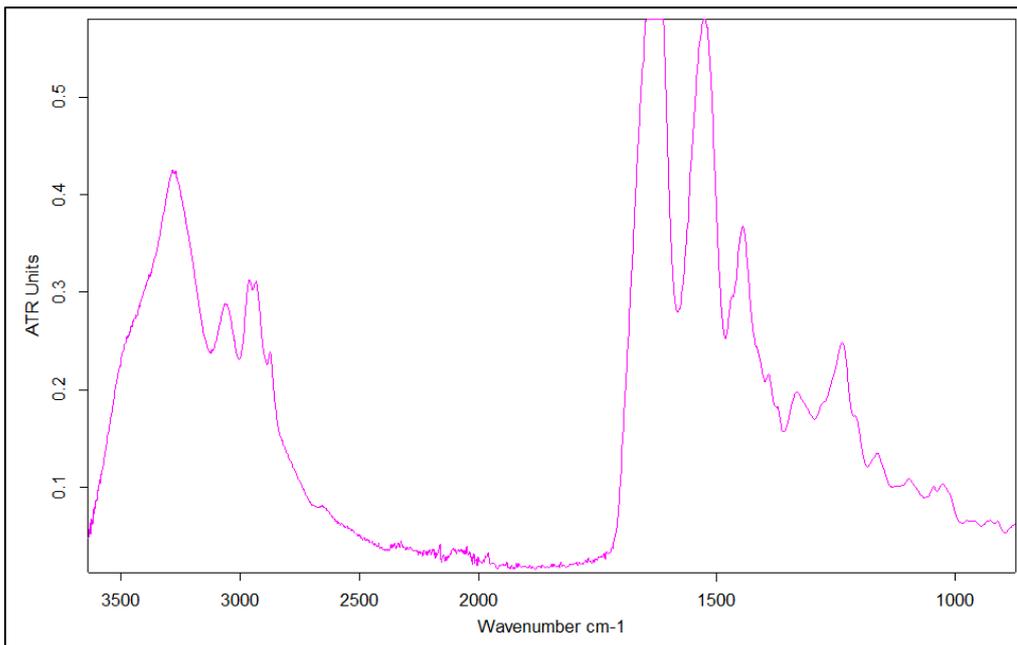


Figura 2: Espectro de FTIR-ATR del ERL VOKx72.

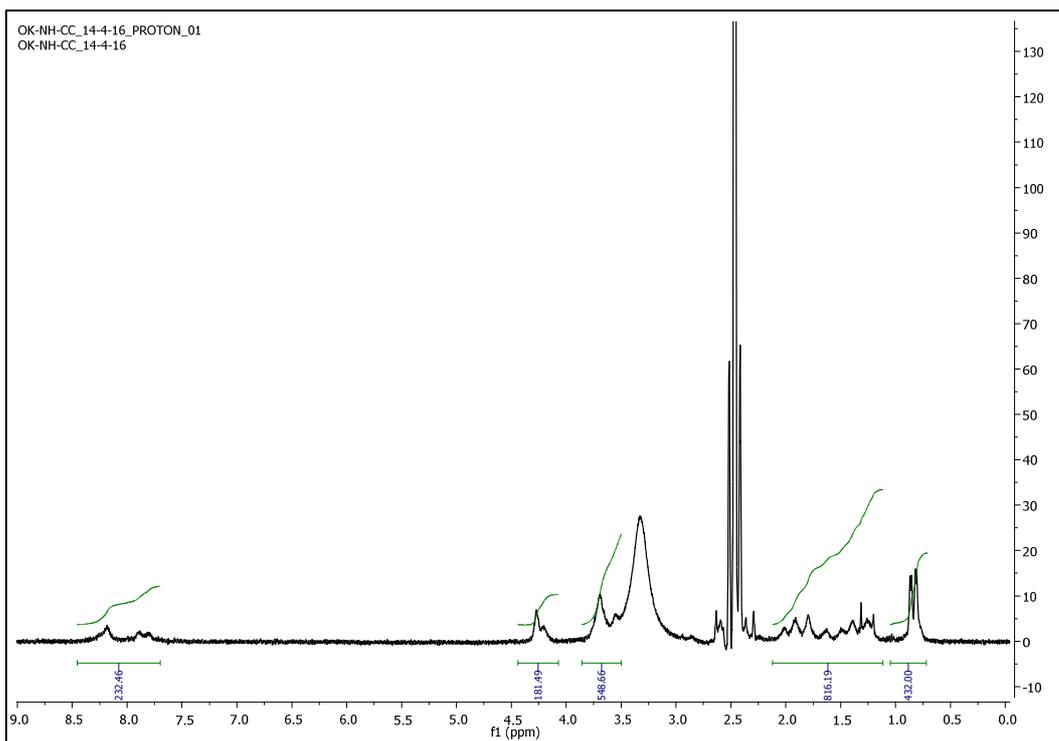


Figura 3: Espectro de ^1H RMN del producto resultante de la reacción entre VOKx72 y propargilamina, activador DCC.

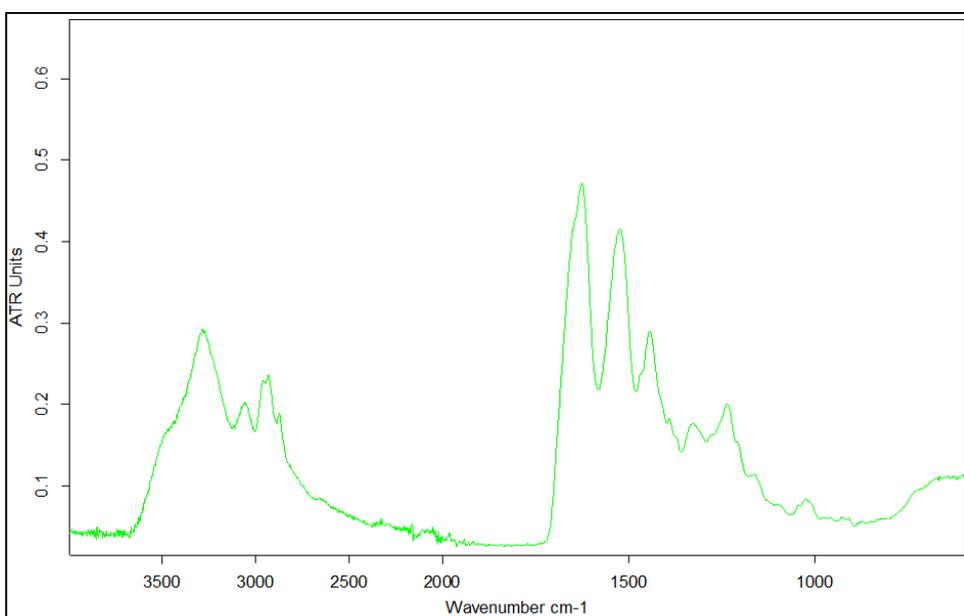


Figura 4: Espectro de FTIR-ATR del producto resultante de la reacción entre el VOKx72 y la propargilamina via DCC/NHS.

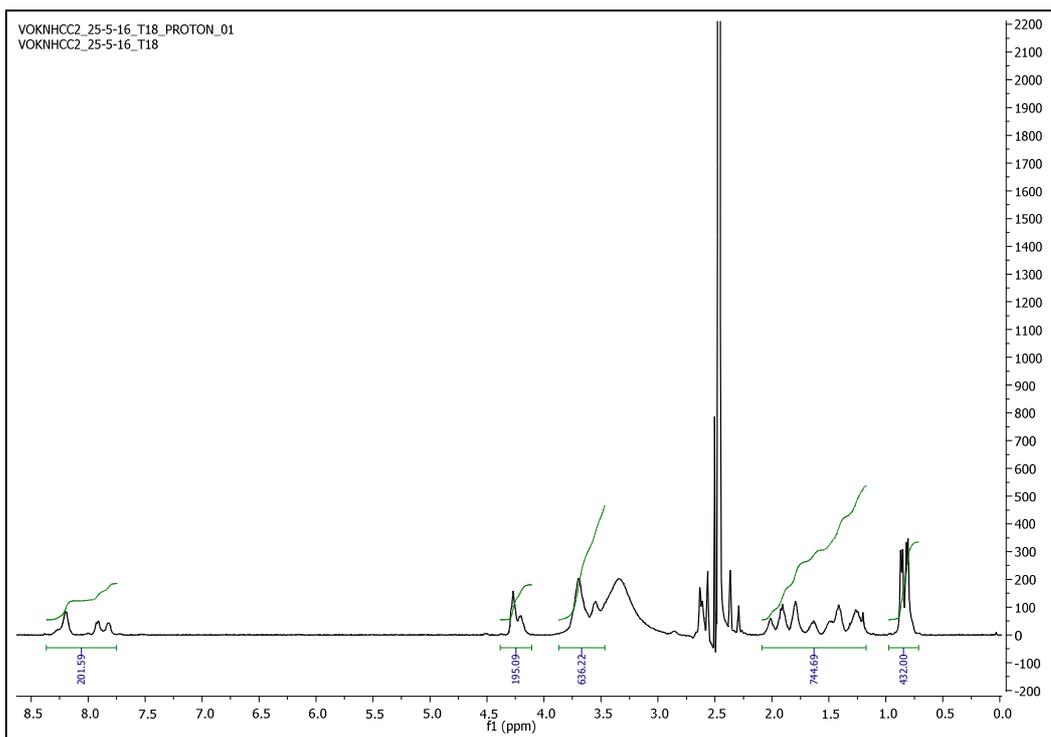


Figura 5: Espectro de ^1H RMN del producto de reacción de amidación entre la VOKx72 y la propargilamina via DCC/NHS.

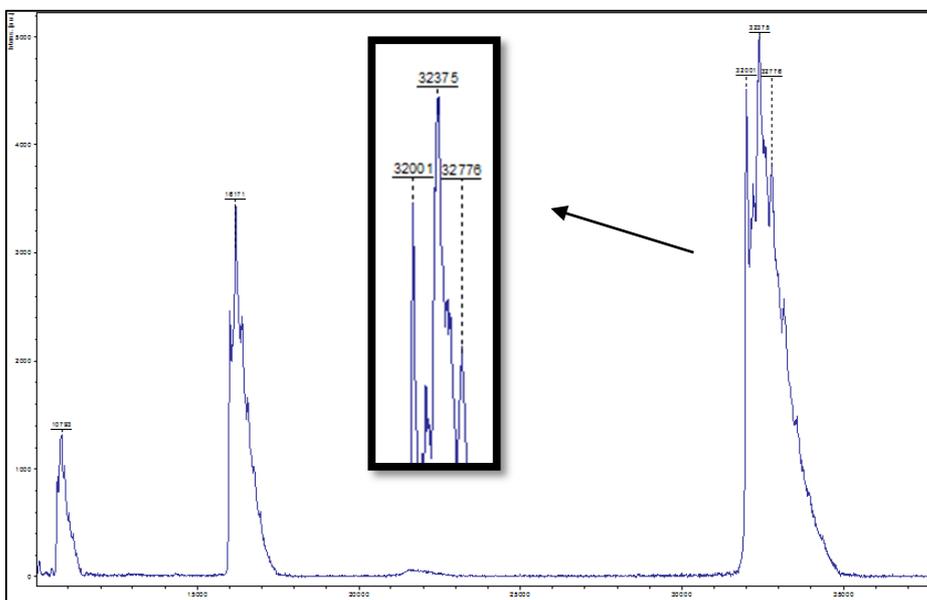


Figura 6: Espectro de masas MALDI-ToF del producto resultante de la reacción entre el VOKx72 y la espermina, vía DCC/NHS.

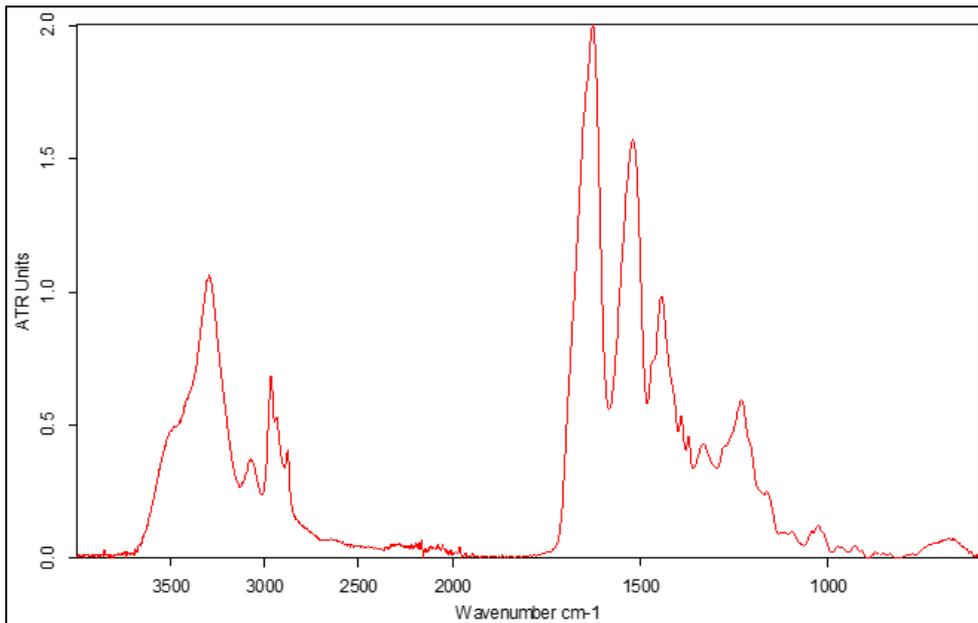


Figura 7: Espectro FTIR-ATR del VKVx24 de partida.

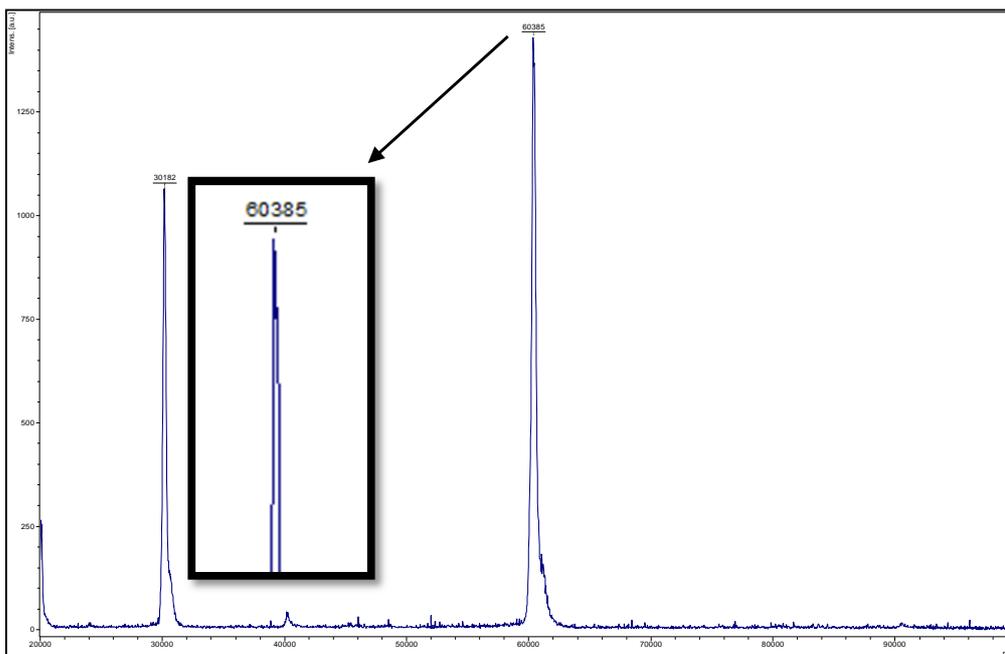


Figura 8: Espectro de masas MALDI-ToF del polímero VKVx24 sobre el producto de reacción del VKVx24 con 1.5eq. de la tiolactona seleccionada en HCl.

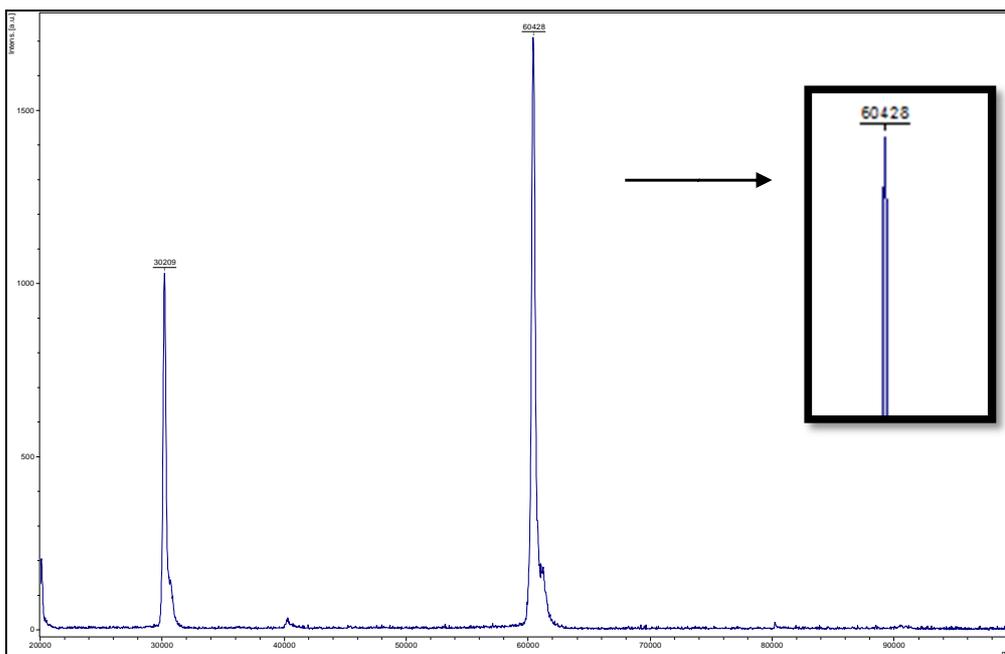


Figura 9: Espectro de masas MALDI-ToF del polímero VKVx24 x1.5eq de la tiolactona seleccionada.

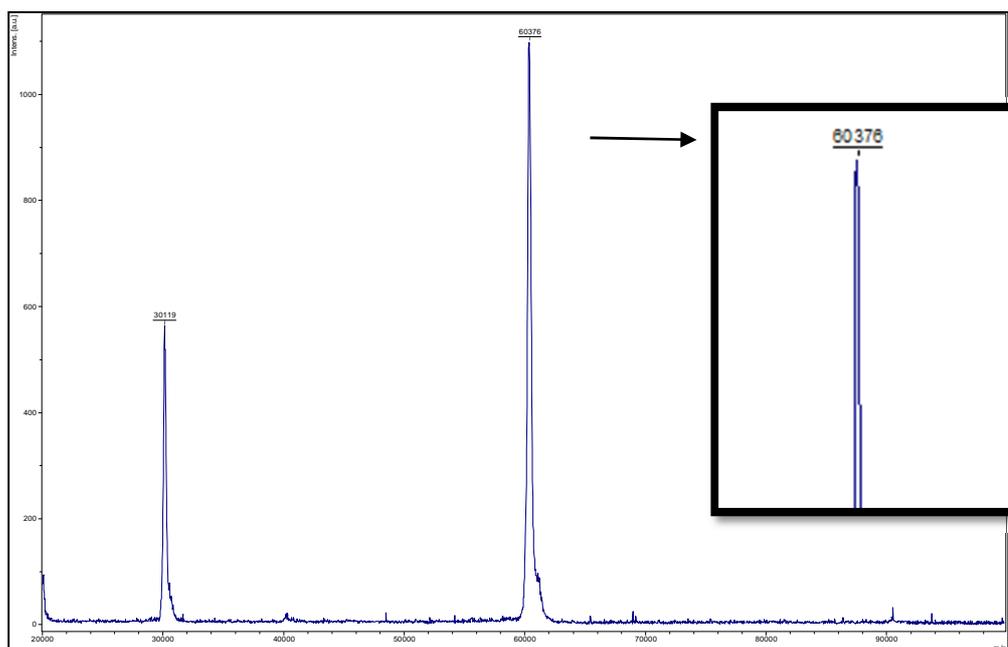


Figura 10: Espectro de masas MALDI- ToF del polímero VKVx24 sobre el producto de reacción del VKVx24 con 3eq. de la tiolactona seleccionada en buffer MES.

Reacción de amidación del ácido 5-hexenoico y la molécula estudiada, espermina.

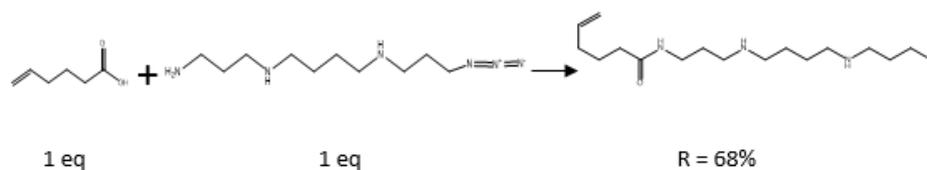


Figura 10.1: Reacción de amidación entre el ácido 5-hexenoico y la espermina mediada por la DCC.

Se ha podido verificar que el grupo amino a través del cual sucede la reacción de amidación en el caso de la modificación del extremo C-terminal del biopolímero ELR-VOKx72 es el grupo amino terminal de la espermina. Esto lo hemos podido comprobar por la presencia del protón del grupo amido que se genera tras la reacción, el cual aparece a un desplazamiento de 8 ppm (Figura 10.2) y no se encuentra asociado a ningún carbono (Figura 10.3).

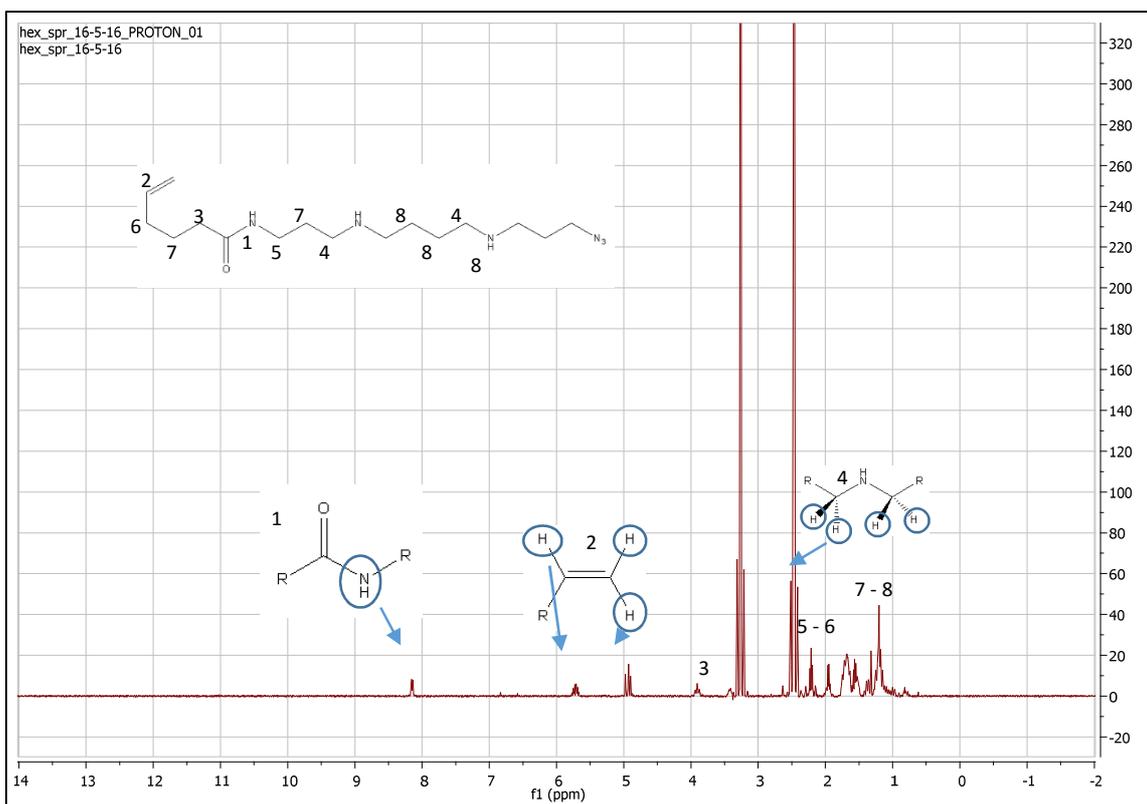


Figura 10.2: Espectro de 1H RMN del producto de la reacción del ácido 5-hexenoico con la espermina tras su purificación.

Al aparecer un pico a un desplazamiento de aproximadamente 8 ppm, podemos determinar que la reacción de amidación se ha producido y que el acoplamiento se ha dado a través del grupo amino terminal de la espermina, ya que esta señal corresponde al protón del grupo amido que se ha formado.

El enlace amida formado en cualquiera de los otros dos casos posibles (grupos amino intermedios del compuesto) no tendría asociado ningún protón, luego no aparecería en el espectro de ^1H RMN.

Para poder verificar las interpretaciones que se han obtenido del espectro, se realizó una combinación de los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN, COSY.

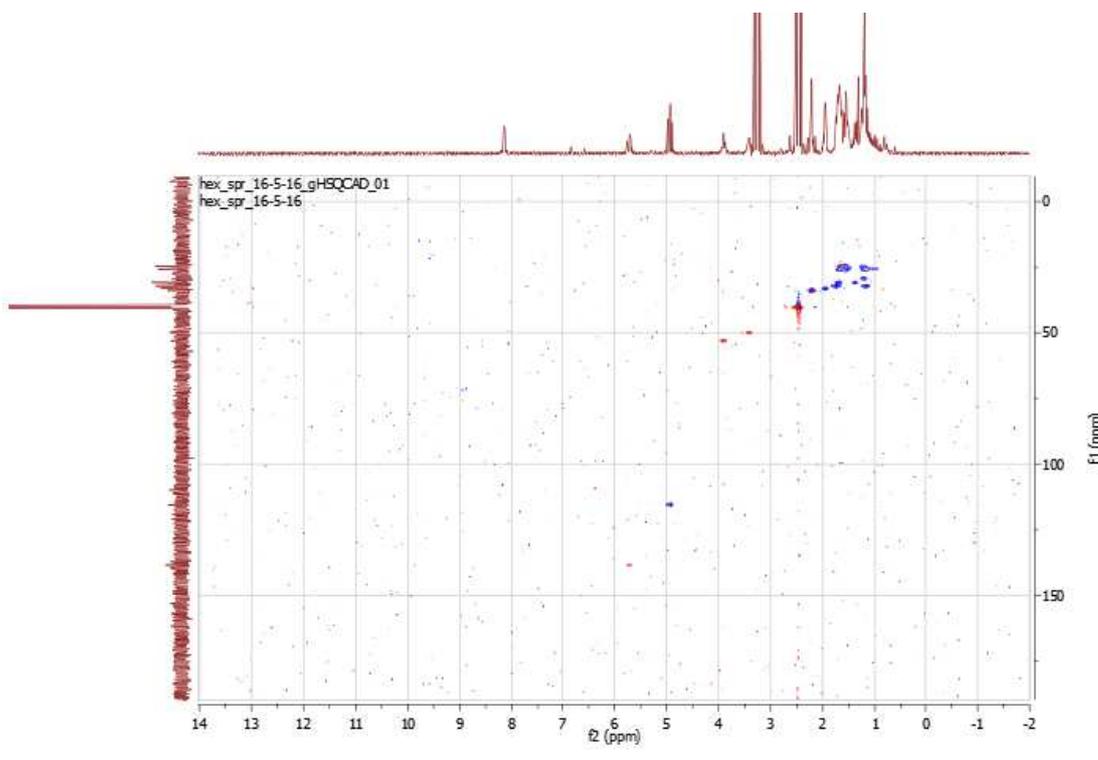


Figura 10.3: Imagen de la combinación del espectro de ^1H RMN (horizontal) y ^{13}C RMN (vertical) del producto de la reacción del ácido 5-hexenoico con la espermina purificado.

A partir de este espectro, podemos verificar que la señal que aparece en el espectro de ^1H RMN a un desplazamiento de 8ppm no está asociada a ningún carbono que aparece en el espectro vertical de ^{13}C RMN de la derecha.

De manera que podemos verificar, que la señal que aparece a 8ppm se corresponde con la señal del protón unido al átomo de nitrógeno que se encuentra formando parte del enlace amida.

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS.

Figura 3.1.1: Representación de la capas del globo ocular.	12
Figura 3.1.2: Representación de las diferentes capas que componen la película lagrimal.	13
Figura 3.2.1.1: Representación genérica de la estructura de un monómero de mucina.	14
Figura 3.2.2.1: Representación de la distribución de los diferentes tipos de mucinas sobre la superficie ocular.	15
Figura 3.3.2.1: Representación de las dos etapas que conforman el mecanismo de mucoadhesión.	16
Figura 3.3.2.2: Representación de la interpenetración entre las cadenas poliméricas.	17
Figura 3.4.3.1: Representación ilustrativa del cambio de estado por encima de la temperatura de transición.	21
Figura 3.4.3.2: Estructuras de los ELRs por encima y por debajo de Tt.	22
Figura 3.4.3.3: Representación del proceso de agregación de los polímeros tipo elastina por encima de la temperatura de transición inversa.	22
Figura 3.4.4.1: Diferentes ámbitos de aplicación de los ELRs dentro de la medicina.	23
Figura 3.5.1.1: Estructura genérica y apariencia física de un hidrogel.	24
Figura 3.5.1.2: Mucoadhesión entre un hidrogel y una membrana mucosa.	25
Figura 3.5.2.1: Preparación de hidrogeles, nanogeles y microgeles tipo 'click'.	26
Figura 3.6.1: Reacción de cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre alquinos y azidas orgánicas.	27
Figura 3.6.2: Ciclo catalítico de la reacción entre alquinos y azidas catalizada por cobre.	28
Figura 3.6.3: Reacción de cicloadición 1, 3-dipolar de Huisgen entre una azida y un triple enlace soportado sobre un ciclooctino obteniendo el 1, 2, 3-triazol correspondiente.	28
Figura 4.2.2.1: Equipo espectrofotométrico NanoDrop 2000c UV-Vis de THERMO SCIENTIFIC.	33
Figura 4.2.3.1: Representación esquemática del potencial zeta.	34
Figura 4.2.3.2: Equipo Malvern Zsizer Nano ZSP.	35
Figura 4.2.4.1: Electroforesis en gel de poliacrilamida, cubeta.	36
Figura 4.3.1.1: Diagrama de flujo de la bioproducción del polímero diseñado.	37
Figura 4.3.1.2: Gráfica de crecimiento bacteriano.	38
Figura 4.3.2.2.2.1: Representación de la modificación del extremo C-terminal del ELR correspondiente por compuesto que contiene un grupo azido terminal.	44
Figura 4.3.2.3.1: Grupo ε amino de la lisina susceptible de sufrir la reacción de tiolación.	45
Figura 4.3.2.3.2: Modificación de las cadenas laterales del ELR a través de la reacción de tiolación sobre los grupos amino presentes en las lisinas de la secuencia polipeptídica.	45
Figura 4.3.3.1: Espermina.	48
Figura 4.3.4.1: Reacción 'click' entre los polímeros VKV-N3 y VKV-ciclo, obteniendo estructuras reticuladas.	49
Figura 4.3.4.2: Obtención de nanogeles con forma esférica a 37°C.	50
Figura 4.3.5.2.1: Representación gráfica de la transmitancia óptica.	52
Figura 4.3.6.1: Mucoadhesión de un hidrogel a una membrana mucosa promovida por los polímeros anclados a su superficie.	54
Figura 4.3.6.2: Imagen de la simulación del nanogel con el polímero VOKx72 (azido) anclado a su superficie.	55
Figura 5.2.1.1 : Representación de la modificación del extremo C-terminal del ELR correspondiente.	56
Figura 5.2.1.1.1: Vías posibles de reacción para el acoplamiento mediado por la carbodiimida DCC.	57
Figura 5.2.1.2.1: Mecanismo de la reacción de acoplamiento a un ácido carboxilo mediada por DCC/NHS.	58
Figura 5.2.1.3.1.1: Espectro de 1H RMN del ERL VOKx72 sin modificar en DMSO.	59
Figura 5.2.1.3.2.1: Reacción de amidación del grupo carboxilo terminal de ERL-VOKx72 vía DCC y un compuesto aminado que contiene un triple enlace terminal, propargilamina.	60
Figura 5.2.1.3.2.2 : Superposición de espectros de 1H RMN del biopolímero ELR-VOKx72 de partida (rojo) y ELR-VOKx72 modificado (azul).	61
Figura 5.2.1.3.2.3 : Espectro de masas MALDI-ToF del producto resultante de la reacción entre el VOKx72 y la propargilamina, activador DCC.	61

Figura 5.2.1.3.2.4 : Reacción de amidación del grupo carboxilo terminal del VOKx72 vía DCC/NHS y un grupo amino de un compuesto con contiene un triple enlace terminal.	62
Figura 5.2.1.3.2.5 : Espectro de masas MALDI-ToF del producto resultante de la reacción entre el VOKx72 y la propargilamina, vía DCC/NHS.	63
Figura 5.2.1.3.3.1 : Reacción de amidación del grupo carboxilo terminal del VOKx72 y un grupo amino de un compuesto con contiene una azida terminal vía DCC/NHS.	64
Figura 5.2.1.3.3.2 : Espectro de 1H RMN del producto de reacción de amidación entre la espermina y ELR-VOKx72 vía DCC/NHS en DMSO.	64
Figura 5.2.1.3.3.3 : Imagen de la superposición de Espectros de 1H RMN del biopolímero de partida ELR-VOKx72 (azul) y el producto resultante de la reacción entre el VOKx72 y el compuesto con un grupo azido terminal vía DCC/NHS (rojo) en DMSO.	65
Figura 5.2.1.3.3.4: Espectro de la molécula espermina creado por el programa informático ChemDraw.	66
Figura 5.2.1.3.3.5 : Espectro de FTIR-ATR del producto resultante de la reacción entre el VOKx72 y un compuesto con un grupo azido terminal vía DCC/NHS.	66
____ Como prueba final del conjunto de reacciones llevadas a cabo sobre el ELR VOKx72, se realizó una electroforesis de proteínas, SDS-PAGE (Figura 5.2.1.3.3.6).	67
Figura 5.2.2.1.1: Mecanismo de formación de enlaces entre los grupos tiol de los tiómeros y las mucinas presentes en las membranas mucosas.	68
Figura 5.2.2.2.1 : a) Tiolactona genérica; b) tiolactonas más utilizadas.	69
Figura 5.2.2.2.2 : Posibles reacciones de la tiolactona, siendo los nucleófilos un grupo amino o un grupo hidróxilo.	70
Figura 5.2.2.4.1.1 : Espectro 1H RMN del polímero VKVx24 de partida.	73
Figura 5.2.2.4.1.2 : Imagen del espectro aumentado de ERL-VKVx24 en la base, zona de observación de las modificaciones.	73
Figura 5.2.2.4.2.1 : Espectro 1H RMN del polímero VKVx24 x1.5eq de la tiolactona seleccionada.	74
Figura 5.2.2.4.2.2 : Espectro del anillo de D-L-acetil homocisteína tiolactona abierto.	75
Figura 5.2.2.4.3.1 : Espectro 1H RMN del polímero VKVx24 x3eq de la tiolactona seleccionada en HCl.	76
Figura 5.2.2.4.3.2 : Espectro de masas MALDI-ToF del polímero VKVx24 sobre el producto de reacción del VKVx24 con 3eq. de la tiolactona seleccionada en HCl.	77
Figura 5.2.2.4.4.1 : Espectro 1H RMN del polímero VKVx24 x1.5eq de la tiolactona seleccionada.	78
Figura 5.2.2.4.5.1 : Espectro 1H RMN del polímero VKVx24 x3eq de la tiolactona seleccionada.	79
Figura 5.2.2.4.6.1 : Espectro 1H RMN del polímero VKVx24 x10/24eq de la tiolactona seleccionada en medio HCl pH 4.	81
Figura 5.2.2.4.6.2 : Espectro de masas MALDI- TOF del polímero VKVx24 sobre el producto de reacción del VKVx24 con 10eq. de la tiolactona seleccionada en medio HCl pH 4.	82
Figura 5.3.3.2.1 : Comparativa de las absorbancias teóricas y las obtenidas experimentalmente de las muestras de VOKx72 a 0,25mgr/mL enfrentadas a diferentes cantidades de MUCIII.	87
Figura 5.3.3.3.2 : Representación de las dos tendencias observadas en las absorbancias del VKVx24.	88
Figura 5.3.3.4.2 : Gráfica comparativa al 0,075% (w/v) MUCIII de las diferentes propiedades mucoadhesivas de los materiales estudiados, elaborados y modificados.	90
Figura 5.3.3.4.3 : Prueba visual. Comparación de la turbidez generada entre la interacción mucina/nanogeles (izquierda) y mucina/VOKx72 (derecha, turbia).	91
Figura 5.4.1: Variación del diámetro de partícula y potencial zeta del nanogel con la modificación superficial.	92
Figura 10.1: Reacción de amidación entre el ácido 5-hexenoico y la espermina mediada por la DCC.	105
Figura 10.2: Espectro de 1H RMN del producto de la reacción del ácido 5-hexenoico con la espermina tras su purificación.	105
Figura 10.3: Imagen de la combinación del espectro de 1H RMN (horizontal) y 13C RMN (vertical) del producto de la reacción del ácido 5-hexenoico con la espermina purificado.	106