



Universidad de Valladolid

Escuela de Doctorado

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Física

**Caracterización de micelas autoensambladas basadas en
polipéptidos anfifílicos multibloque**

Autor:

Julio Fernández Fernández

Tutor/es:

José Carlos Rodríguez Cabello y Sergio Acosta Rodríguez



Caracterización de micelas autoensambladas basadas en polipéptidos anfífilos multibloque

Julio Fernández Fernández^a, Sergio Acosta Rodríguez^{b‡} y José Carlos Rodríguez-Cabello^c

28/06/2019

La producción recombinante de biomateriales autoensamblables permite desarrollar dispositivos nanoestructurados para la administración de fármacos y la regeneración de tejidos. En este sentido, los recombinámeros del tipo elastina (ELRs) anfífilos con diseño multibloque, debido a su comportamiento termosensible, han sido estudiados en profundidad para el desarrollo de nano-dispositivos biomédicos aplicables al tratamiento de tumores¹ o a la producción de nanovacunas². El objetivo de este trabajo es estudiar las propiedades de autoensamblado de dos ELRs anfífilos con diseño dibloque. Para entender la influencia de la secuencia en la formación de nanoestructuras dinámicas se caracterizó su comportamiento térmico mediante turbidimetría y calorimetría diferencial de barrido, y la formación de nanoestructuras mediante dispersión de luz dinámica y microrreología. De este modo, se demostró que la combinación de distintas interacciones hidrofóbicas permite el control de la formación de nanopartículas con un autoensamblado jerárquico. El conocimiento de los parámetros que controlan los mecanismos moleculares de autoensamblado de estos sistemas es vital para el desarrollo de dispositivos biomédicos mejorados con aplicaciones terapéuticas.

1. Introducción

Los avances en el mundo de la nanomedicina han cobrado importancia en estos últimos años permitiendo el desarrollo de dispositivos avanzados biomiméticos aplicados a la administración de fármacos, ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. De este modo, se han desarrollado nanopartículas para la liberación controlada de fármacos^{3,4}, o materiales capaces de mimetizar la matriz extracelular (ECM), y poder crear andamios moleculares capaces de promover la regeneración de tejidos⁵. En cuanto a la liberación controlada de fármacos, gracias a la creación de nanovehículos y sistemas nanoestructurados se ha podido mejorar el tratamiento de enfermedades, como determinados tipos de cáncer⁶. El objetivo de estos nanoportadores o nanocarriers es mejorar la farmacocinética de aquellos fármacos con una baja solubilidad o con importantes efectos secundarios, dirigiendo de manera selectiva el fármaco al tejido dañado. Dentro del gran abanico de posibles materiales para encapsular y dosificar fármacos⁷ cabe destacar los polímeros con capacidad para formar nanopartículas estables en solución. Este tipo de nanopartículas, comenzaron a estudiarse en la década de los 70 como alternativa a las limitacio-

nes asociadas a los liposomas⁷. Las nanopartículas poliméricas pueden dividirse en dos categorías: nanoesferas y nanocápsulas. Las nanoesferas son estructuras tipo matriz por la cual se dispersa el fármaco. En este tipo de polímeros destacan los polímeros biodegradables, por ejemplo, el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA) que se caracterizan por una aplicabilidad limitada, por su baja solubilidad, su alto ratio de degradación, su baja estabilidad térmica y su falta de monodispersidad⁸. Por otro lado, las micelas de origen sintético suelen estar formadas por polímeros anfífilos autoensamblables. Uno de los ejemplos más importantes de este tipo son las formadas con polietileno glicol (PEG)⁹. Sin embargo, las estructuras derivadas del PEG o los productos secundarios formados durante su síntesis pueden conducir a ciertos efectos secundarios como, por ejemplo, la hipersensibilidad⁹. Además de estos problemas, la síntesis química de todos estos polímeros tiene una desventaja importante y es que el coste de producción de un material sintético aumenta exponencialmente con su complejidad molecular. Hoy en día, los únicos materiales que no cumplen esta relación son los materiales recombinantes^{10,11}. La secuencia genética elegida se inserta dentro del genoma de un sistema celular (microorganismo) para su expresión y, este microorganismo modificado es él que produce el material deseado. Gracias a estas técnicas se obtienen materiales de alto peso molecular completamente monodispersos y puros.

Uno de los polímeros recombinantes más importantes es el de tipo elastina o Elastin Like Recombinamers (ELRs)^{10,12} en inglés.

^a ajuliofernandezfernandez@gmail.com, Valladolid, España.

^b sacosta@bioforge.uva.es, Valladolid, España.

[‡] Co-director del Trabajo Fin de Máster.

^c Director del Trabajo Fin de Máster. Director Bioforge, roca@bioforge.uva.es, Valladolid, España.

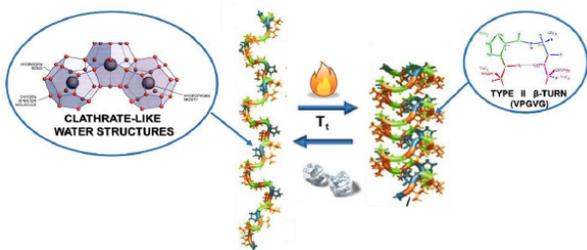


Fig. 1 Representación del cambio estructural que sufren los ELRs por encima y por debajo de su temperatura de transición (T_i).

Los ELRs son una familia de polipéptidos diseñados genéticamente basados en motivos conservados en la elastina humana, principalmente en el pentapéptido valina-prolina-glicina-Xaa-glicina (VPGXG), donde X puede ser cualquier aminoácido excepto la prolina¹³. Aparte de tener las ventajas explicadas anteriormente, estos polímeros comparten las mismas propiedades fisicoquímicas de la elastina^{14,15}; mecánicamente son materiales caracterizados por una gran elasticidad y resiliencia, pero además debido a que están basados en una proteína de la matriz extracelular, permiten estimular la regeneración tisular. La capacidad más importante que heredan estos materiales de la elastina, debido a su posible uso como vehículo de fármacos, es el comportamiento de transición de fase reversible sensible a la temperatura. Por encima de una temperatura característica denominada temperatura de transición^{10,13}, el material experimenta una transición de fase reversible a nivel molecular en solución acuosa. Por debajo de esta temperatura, las cadenas del ELR se encuentran solubles debido a una hidratación hidrófoba, caracterizada por la presencia de estructuras de tipo clatrato¹⁶. Cuando la temperatura se acerca a la T_i estas estructuras de tipo clatrato se desestabilizan y la cadena pierde las moléculas de agua, plegándose formando espirales de tipo β , que se estabiliza mediante contactos hi-

do factores externos¹⁸, como la temperatura, pH o concentración es posible desencadenar de forma controlada el autoensamblado en diferentes nanoestructuras, según el diseño molecular del ELR. Conticello et al.¹⁹ desarrollaron la primera nanopartícula autoensamblable basada en ELR con un diseño dibloque anfifílico, formado por un bloque catiónico y un bloque conteniendo fenilalaninas. Gracias a sus resultados de biocompatibilidad y estabilidad fisiológica convirtieron estos materiales en candidatos para aplicaciones en las regeneraciones de tejidos y liberación controlada de fármacos. Además de estas investigaciones, Chilkoti et al. realizaron ensayos *in vitro* y *in vivo* de ciertos dibloques demostrando que esta clase de polímeros pueden utilizarse como transportadores de fármacos en terapias contra el cáncer¹ o como nanoportadores que autoensamblan nanovacunas².

El objetivo de este trabajo es el estudio de la influencia de la secuencia del bloque hidrofóbico en la capacidad de autoensamblado en nanoestructuras micelares de dibloques anfifílicos de tipo elastina. En concreto, vamos a estudiar la influencia de las interacciones $\Pi - \Pi$ ²⁰ entre anillos aromáticos dentro del núcleo hidrofóbico. Para ello se va a estudiar la nanoestructuración de dos ELRs anfifílicos con diseño dibloque, cuya secuencia se detalla en el cuadro 1. El primer ELR (oEI) está basado en un bloque hidrofílico oE ([VPGEG]₁₀) y un bloque hidrofóbico I (VGIPG₆₀). El segundo ELR (oEIFA), comparte la misma secuencia y mismo número de pentapéptidos pero en cambio incorpora fenilalaninas en su bloque hidrofóbico. Mediante técnicas de dispersión de luz dinámica y microrreológicas estudiaremos el mecanismo de autoensamblado de los dibloques, desde nanopartículas hasta nanogeles.

Nombre	Secuencia	aas	$M_w(Theo)$	$M_w(Exp)$
oEI	MESLLP-[VPGEG] ₁₀ [VGIPG] ₆₀ V	357	30593.4	30580.50 ± 3.61
oEIFA	MESLLP-[VPGEG] ₁₀ [(VGIPG)-(VGFPG)-(VPAPG)-(VGFPG)-(VGAPG)-(VGIPG)] ₁₀ V	357	30432.1	30424.66 ± 2.42

Cuadro 1 Características de los polímeros ERLs: oEI y oEIFA.

dróforos. El cambio experimentado es una transición de un estado soluble a uno insoluble en un disolvente acuoso, siendo este plegamiento completamente reversible. Esta T_i depende, principalmente, por la composición del aminoácido invitado X, pero además puede variar en función de diferentes factores^{15,17}, como el peso molecular del ELR, su concentración, la polaridad del medio, la presencia de iones, el pH. Si se combinan dos o más bloques/secuencias diferentes de VPGXG se pueden formar multibloques recombinantes que pueden modificar las temperaturas de transición de cada bloque y mejorar el autoensamblado de las estructuras. Estas moléculas multibloque incorporan en la misma molécula diferentes propiedades en función del aminoácido invitado de cada pentapéptido individual. Las diferentes propiedades de cada bloque implican diversas hidrofobicidades y, por tanto, diferentes temperaturas de transición de fases. Controlan-

2. Sección experimental:

2.1. Materiales:

Los procedimientos genéticos, tanto de clonación como de biología molecular, se han realizado siguiendo los métodos estándares de ingeniería genética. Los dibloques (oEI y oEIFA) se produjeron recombinantemente como proteínas heterólogas en *Escherichia coli*^{17,21,22}.

En este Trabajo Fin de Master se ha estudiado el comportamiento de dos dibloques anfifílicos ELRs, oEI y oEIFA, donde M=L-metionina, E=L-glutámico, S=L-serina, L=L-leucina, I=L-isoleucina, F=L-fenilalanina y A=L-alanina. Los bloques o[VPGEG]₁₀, parte hidrofílica, tienen una temperatura de transición alta (250 °C¹³) a pH neutro debido a la alta polaridad de los grupos carboxilatos de sus cadenas laterales. Sin embargo, el bloque [VGIPG]₆₀ debido a su mayor hidrofobicidad tiene una temperatura de transición inferior a la temperatura fisiológica (14 °C). El ELR oEIFA, comparte el bloque hidrofílico pe-

ro en su bloque hidrofóbico [(VGIPG) – (VGFPG) – (VPAPG) – (VGFPG) – (VGAPG) – (VGIPG)]₁₀, se han incorporado pentapéptidos con fenilalaninas y alaninas: Las fenilalaninas presentan un grupo aromático en su cadena lateral que permite la formación de interacciones hidrofóbicas $\Pi - \Pi$ ²⁰ entre sus anillos. En la misma proporción se incorporaron alaninas para obtener un ELR con una temperatura de transición similar al ELR original, oEI.

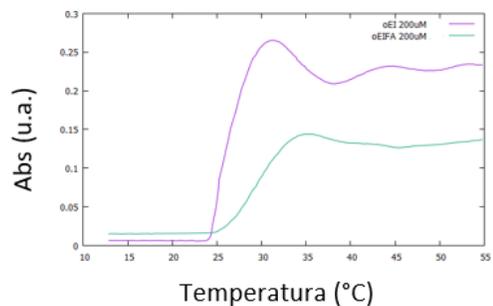
2.2. Técnicas experimentales:

Calorimetría diferencial de barrido: El comportamiento térmico de los ELRs se analizó mediante DSC²³ empleando un equipo Mettler Toledo 822e con refrigeración de nitrógeno líquido. La calibración de la temperatura y de la entalpía se realizaron con muestras estándar de indio. Se introdujeron en cada ensayo 20 μ L de la disolución dentro de una bandeja de aluminio estándar de 40 μ L herméticamente sellada. El mismo volumen de disolvente se sitúa en la bandeja de referencia. Se prepararon dos soluciones a la misma concentración, 50 mg/mL, una de ellas en PBS a pH 7.4, la otra solución en mQ a pH 8.1 para el polímero oEI y pH 7.1 para el oEIFA.

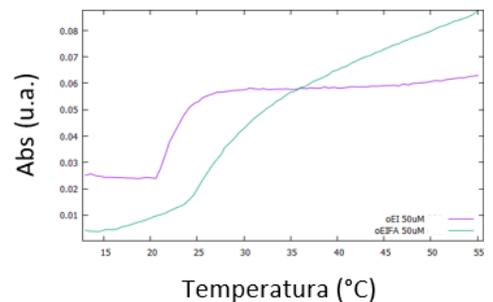
Turbidimetría: La turbidimetría²⁴ se basa en la atenuación de un rayo incidente en un medio dispersivo. Esta técnica, junto al DSC, sirve para caracterizar la temperatura de transición inversa: cuando el material se autoensambla formando estructuras 3D la absorbancia aumenta significativamente. Esta T_i se caracteriza monitorizando la absorción a 350 nm como función de la temperatura en un espectrofotómetro de UV-visible (Cary Series UV-Vis, Agilent Technologies). Se realizó un barrido de temperatura en el rango 13.00-55.00 °C, tanto en PBS, como en mQ con dos concentraciones, 200 μ M y 50 μ M, respectivamente.

Dispersión dinámica de la luz (DLS) La técnica DLS²⁵ o también conocida como espectroscopía de correlación de fotones o dispersión de luz cuasi elástica mide el movimiento browniano de las partículas a través de la autocorrelación de los fotones y lo relaciona con el tamaño de las mismas. DLS se ha utilizado para determinar la distribución de tamaños de las nanopartículas oEI y oEIFA. Las medidas se realizaron utilizando un Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments) equipado con un láser de 10 mW He-Ne a una longitud de onda de 633 nm y temperatura de 37 °C. Se utilizó una tecnología de retrodispersión no invasiva (NIBS) en 173° para aumentar la sensibilidad de detección y reducir la dispersión múltiple y los efectos del polvo. Se prepararon soluciones desde 2.5 mM hasta 25 μ M en PBS incubándolas toda la noche a 5° C. Finalmente, las disoluciones se introdujeron en cubetas de poliestireno y se dejaron estabilizar 5 minutos a 37° C.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM): Las medidas del TEM se realizaron usando un microscopio electrónico de transmisión Tecnai T20 operando a un voltaje de 200 kV. Se depositaron entre 10-15 μ L de oEI y oEIFA a 25 μ M PBS en rejillas de cobre recubierta de carbono tratado con plasma precalentado (Plasma Cleaner). Para su tinción negativa se utilizó acetato de uranilo 1% (w/v).



(a) Concentraciones de 200 μ M oEI y oEIFA en mQ.



(b) Concentraciones de 50 μ M oEI y oEIFA en PBS.

Fig. 2 Absorbancia de los polímeros oEI y oEIFA a $\lambda = 350$ nm en mQ y PBS.

Microrreología: La microrreología pasiva se basa en la dispersión dinámica individual de la luz²⁶⁻³⁰.

Mientras que la técnica de microrreología activa involucra una fuerza externa actuando en las nanopartículas usadas como trazador, la microrreología pasiva usa el movimiento térmico (movimiento browniano) de estas partículas. Entre las ventajas de esta técnica frente a las técnicas reológicas convencionales cabe destacar la disminución del volumen necesario y el aumento del rango de frecuencias utilizado. El trazador utilizado en este trabajo ha sido partículas de resina de melamina carboxiladas superficialmente (microParticles GmbH, nombre en el catálogo MF-COOH-AR586, diámetro nominal = 1.02 μ m y $\rho = 1.51$ g/cm³). Para evaluar la nanoestructuración de los ELRs en solución a distintas concentraciones se estudió su comportamiento microrreológico. Para cada experimento, se agregaron 5 μ L de trazador en las disoluciones de los ELRs en mQ y hasta 30 μ L en las disoluciones en PBS a 900 μ L de muestra, procurando que el sistema esté bien disperso. Las medidas se realizaron utilizando un Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments) equipado con un láser de 10 mW He-Ne, ángulo de incidencia de 173°, longitud de onda de 633 nm y dos temperaturas: 5 °C y 37 °C.

3. Resultados y discusión

El autoensamblado de macromoléculas anfifílicas basado en interacciones físicas puede ser una herramienta importante en el diseño de materiales nanométricos con aplicaciones biomédicas.

Las medidas de turbidimetría y DSC demostraron que ambos ELRs presentan una transición de fase inferior a la temperatura fisiológica, como podemos observar en las figuras 2 y 3 (cuadro 2).

T_t	Turbidimetría mQ	Turbidimetría PBS
oEI	24.32	21.07
oEIFA	26.07	24.57

T_t	DSC mQ	DSC PBS
oEI	16.82	15.33
oEIFA	19.01	15.91

Cuadro 2 Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) de transición de oEI y oEIFA.

Por debajo de la temperatura T_t las soluciones polipeptídicas son transparentes pero cuando se supera su temperatura de transición inversa se vuelven turbias, debido a los autoensamblados de los polímeros.

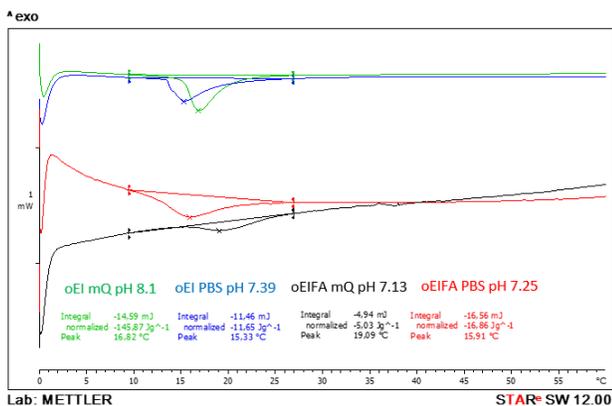
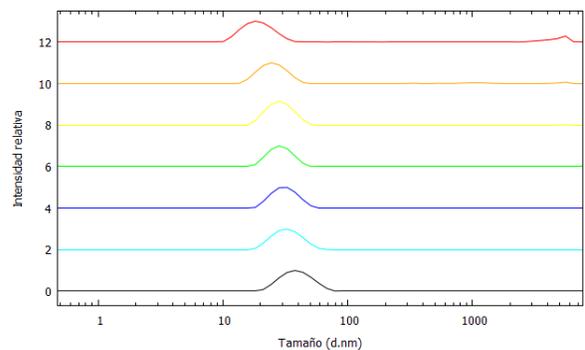


Fig. 3 Comportamiento térmico de los materiales oEI y oEIFA en mQ y PBS.

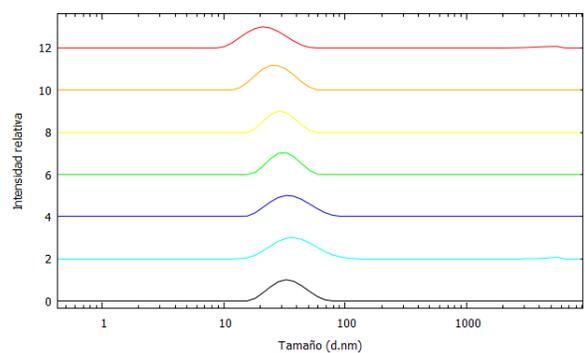
En la imagen 3 se puede ver el comportamiento térmico de estos polímeros en mQ y PBS medido mediante DSC. El pico endotérmico característico³¹ obtenido en todas las medidas es el resultado de dos fenómenos³²: destrucción de las estructuras ordenadas acuosas (agregados de agua) y, el doblamiento y autoensamblado de las cadenas. La temperatura de transición inversa se ve afectada por la concentración de sales presentes en el PBS. Este hecho se debe a que al aumentar la fuerza iónica del medio, el agua interacciona con los iones del tampón fosfato (PBS) disminuyendo así los agregados de agua que estabilizan las zonas hidrofóbicas, favoreciendo las interacciones hidrofóbicas. El proceso de ensamblado está dominado por los bloques hidrofóbicos de los polímeros, en este caso por la presencia de isoleucinas y fenilalaninas. Debido a las diferencias en su composición, las temperaturas T_t de ambos ELRs son distintas: $T_t(oEIFA) > T_t(oEI)$. Aunque las fenilalaninas favorecen las interacciones hidrofóbicas y disminuyen la T_t , la presencia de alaninas compensan este cambio, originando una T_t ligeramente superior a la de oEI. Además, cabe destacar que las T_t también se ven afectadas por la concentración. Como observamos en el cuadro 2, los valores de las T_t obtenidos por turbidimetría y DSC son diferentes. Esto se debe a que la transición de fase consiste en un proceso cooperativo dependiente de la concentración del ELR, de este modo al aumentar la concentración se disminuye la T_t .

Una vez estudiadas las temperaturas de transición se estudió el

autoensamblado de ambos ELRs mediante DLS por debajo (5°C) y por encima (37°C) de la T_t , figura 4.



(a)

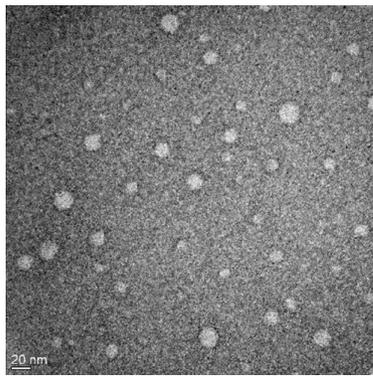


(b)

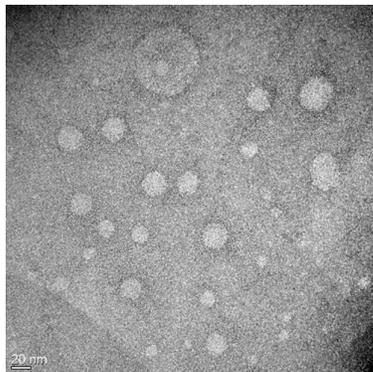
Fig. 4 Distribución de tamaño de los dos polímeros, oEI (a) y oEIFA (b) a 37°C estabilizados 5 minutos. En color rojo concentración de 2.5 mM, color naranja concentración de 1.25 mM, color amarillo concentración de $500\ \mu\text{M}$, color verde concentración de $250\ \mu\text{M}$, color azul concentración de $125\ \mu\text{M}$, color negro concentración de $50\ \mu\text{M}$ y color azul concentración de $25\ \mu\text{M}$.

Los dos polímeros muestran una distribución monomodal para concentraciones entre [$25\ \mu\text{M}$ - $1.25\ \text{mM}$]. Para concentraciones menores de $500\ \mu\text{M}$, se observaron que ambos ELRs se ensamblan formando nanopartículas con una única distribución en tamaño en torno a 30 nm y una polidispersidad de 0.18 para el polímero oEI, y en torno a 31.48 nm y una polidispersidad de 0.07 (monodispersidad alta) para el polímero oEIFA. Debido a que existen interacciones hidrofóbicas más fuertes en el polímero oEIFA (debido a la formación de acoplamiento $\Pi - \Pi$), los tamaños de las nanoestructuras que se originan son más monodispersos. Las interacciones atractivas, no covalentes entre los anillos aromáticos de las fenilalaninas estabilizan las nanoestructuras de los polímeros oEIFA. Por encima de $500\ \mu\text{M}$, las distribuciones se desplazan hacia valores menores y comienzan a aparecer estructuras con tamaños mucho más grandes^{10,35}. Sin embargo, estos diámetros hidrodinámicos deben tomarse con precaución, ya que el valor de polidispersidad es alto (~ 0.33) y el DLS es menos preciso en estas condiciones.

Sin embargo, tras evaluar las muestras mediante TEM, no se vieron diferencias en la morfología, ambos ELRs forman nanopartículas esféricas con estructura micelar (Figura 5).



(a)



(b)

Fig. 5 Muestras oEI(a) y oEIFA(b) a 25 μ M en PBS a T=37 °C obtenidas por TEM.

Las propiedades reológicas de estos dos polímeros se evaluaron mediante técnicas microrreológicas. Para poder estudiar estas propiedades se debe asumir que las soluciones se comportan como medios continuos viscoelásticos³⁵. Como resultado de esta suposición, el tamaño del trazador debe de ser más grande que las soluciones sometidas a estudio (diferentes órdenes de magnitud). La resina de melanina fue la partícula trazadora que se utilizó, ya que la interacción solución-trazador es mínima y el tamaño de estas partículas es el adecuado³⁵.

En estos experimentos, la viscosidad proporciona una visión cuantitativa del movimiento térmico de las partículas trazadoras. Esta viscosidad se obtiene a través del coeficiente de difusión a partir de la función de autocorrelación obtenida por DLS.

En la figura 6 se representa la viscosidad en función de la frecuencia angular, la viscosidad es proporcional a la concentración, a mayor concentración mayor viscosidad. Observando la viscosidad de estos materiales en mQ, se puede destacar que por debajo de sus temperaturas de transición (5 °C), y a bajas frecuencias las viscosidades son independientes de la frecuencia, indicando así un comportamiento newtoniano. Sin embargo, a frecuencias altas tienden a ser dependientes, originando un comportamiento viscoelástico. Este comportamiento viscoelástico se aprecia más intensamente para las concentraciones de 1.25 mM. Para los dos ELRs el comportamiento elástico aparece con valores de las frecuencias más bajas, mientras que para concentraciones inferio-

res no existe una dependencia con la frecuencia. Por otro lado, al aumentar la temperatura por encima de las temperaturas de transición, el comportamiento de la viscosidad varía, existe una tendencia hacia valores más bajos. Evaluando la evolución de la viscosidad en función de la frecuencia a temperatura fisiológica (37 °C), se observa que a bajas concentraciones (125, 250 μ M) se mantiene un comportamiento newtoniano similar al observado por debajo de la temperatura de transición. Los ELRs se encuentran formando nanoestructuras micelares y se comportan como un fluido newtoniano. Sin embargo, a partir de 500 μ M la dependencia de la viscosidad con la frecuencia aumenta, generando un comportamiento viscoelástico. Aunque los dos ELRs presentan esta misma propiedad, en las soluciones del polímero oEIFA se aprecia un comportamiento elástico más pronunciado. Tras esto, la influencia de las sales fue analizada y observamos que para 5 °C el comportamiento de estos materiales en PBS, al igual que sucedía en mQ. Si se aumenta la temperatura hasta 37 °C, las soluciones transicionan y se autoensamblan. En este medio, PBS, la dependencia de la viscosidad es más apreciable. Al contrario que en mQ, el comportamiento viscoelástico se a partir de 250 μ M. Según la viscosidad compleja, no se producen diferencias entre los dos ELRs para estas tres concentraciones mayores: 1.25mM, 500 μ M y 250 μ M.

En un experimento de microrreología, el desplazamiento cuadrático medio (MSD) proporciona una visión cuantitativa del movimiento térmico de las partículas trazadoras. Este valor se obtiene de la función autocorrelación cuando el DLS se utiliza para seguir el trazador. En la figura 7 se muestran los valores de MSD para diferentes concentraciones en función del tiempo para dos temperaturas, T = 5 °C y T = 37 °C. Para estudiar el comportamiento viscoelástico de estas concentraciones ajustamos estos valores a funciones polinómicas o potenciales (cuadro 3). La respuesta lineal en una escala logarítmica indica una difusión de un líquido newtoniano ideal. Esta es la razón por la que fueron empleadas potencias a la hora de ajustar estos datos. A medida que el exponente de la potencia se aleja de la unidad el comportamiento de la solución se aleja de ser un líquido newtoniano.

5 °C	1.25 mM	500 μ M	250 μ M	125 μ M
oEI	x^5	$x^{0.99}$	$x^{0.96}$	$x^{0.95}$
oEIFA	x^6	$x^{0.92}$	$x^{0.93}$	$x^{0.95}$
37 °C	1.25 mM	500 μ M	250 μ M	125 μ M
oEI	x^6	$x^{0.92}$	$x^{0.97}$	$x^{0.99}$
oEIFA	x^6	$x^{0.88}$	$x^{0.91}$	$x^{0.95}$

Cuadro 3 Aproximación matemática del Desplazamiento Cuadrático Medio (MSD) en mQ.

Si se atiende primero al comportamiento de estos materiales en mQ a T= 5 °C, se demuestra que para las concentraciones inferiores a 1.25 mM los datos se pueden ajustar a potencias cuyos exponentes están cercanos a la unidad (comportamiento lineal), en cambio, para concentraciones de 1.25 mM los dos ELRs, oEI y oEIFA, se ajustan por dos polinomios de grados 5 y 6. El desplazamiento para estas concentraciones es sub-difusivo, indicando un

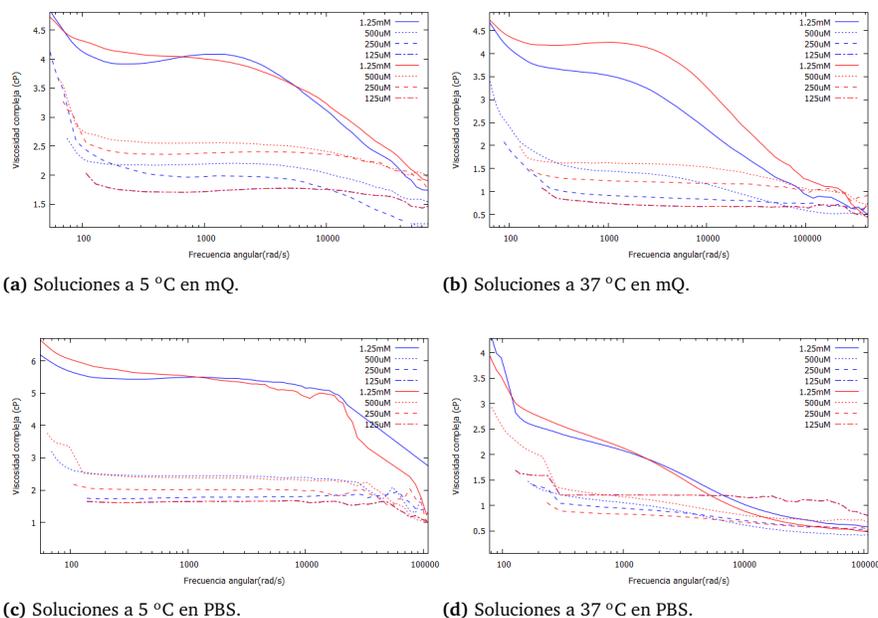


Fig. 6 Viscosidad Compleja. En color rojo el polímero oEI y en color azul el polímero oEIFA.

módulo elástico³⁶. Si se aumenta la temperatura se puede apreciar cambios significativos: Para concentraciones de 1.25 mM, los valores de MSD de los dos polímeros se ajustan a polinomios de grados 6, indicando así un claro comportamiento elástico. A tiempos cortos, las partículas trazadoras experimentan un movimiento obstaculizado, atrapadas por la elasticidad de la solución, lo que nos indica la presencia de nanoestructuras de mayor tamaño. Para las demás concentraciones se pueden ajustar mediante potencias. El cambio más significativo de los valores de los exponentes frente a los obtenidos a 5 °C se producen en el polímero oEIFA a 500 μM y 250 μM . A estas concentraciones, gracias a la presencia de las fenilalaninas las estructuras micelares evolucionan a estructuras más complejas, lo que se traduce en un comportamiento más elástico de la solución, comparándolo con el oEI. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por la viscosidad, ya que estas viscosidades se caracterizan por una mayor dependencia con la frecuencia. Las soluciones del polímero oEIFA muestran una especie de red elástica por la que impide el movimiento de las partículas trazadoras.

Una vez visto el comportamiento en mQ se estudia su comportamiento en PBS, ver cuadro 4. A 5 °C todas las concentraciones de los dos polímeros se comportan como fluidos, ya que todos los datos se ajustan a potencias con un exponente próximo a 1. El tampón químico PBS favorece el comportamiento fluido de los dos polímeros. Estos resultados concuerdan con los obtenidos de la viscosidad (las viscosidades permanecen constantes). Para concentraciones de 1.25 mM de los dos ELRs se ajustan a un polinomio de grado 6. Por debajo de esta concentración se aprecian diferencias significativas: Primero, a 500 μM la solución del polímero oEIFA se ajusta a un polinomio de grado 6, mientras que la solución del polímero oEI se ajusta a una potencia de exponente 0.89. Esto implica que el polímero oEIFA muestra una evidente red elástica a partir de 500 μM , mientras que el políme-

ro oEI tiene un comportamiento más viscoelástico. Segundo, para concentraciones de 250 μM los dos tienen un comportamiento viscoelástico pero todavía, en estas concentraciones, es el polímero oEIFA el que enfatiza más este comportamiento. Por debajo de 250 μM los dos ELRs tienden a ser fluidos newtonianos.

5 °C	1.25 mM	500 μM	250 μM	125 μM
oEI	$x^{0,96}$	$x^{0,95}$	$x^{0,97}$	$x^{0,95}$
oEIFA	$x^{0,96}$	$x^{0,98}$	$x^{0,91}$	$x^{0,99}$
37 °C	1.25 mM	500 μM	250 μM	125 μM
oEI	x^6	$x^{0,89}$	$x^{0,91}$	$x^{0,94}$
oEIFA	x^6	x^6	$x^{0,87}$	$x^{0,97}$

Cuadro 4 Aproximación matemática del Desplazamiento Cuadrático Medio (MSD) en PBS.

Usando las relaciones de Stokes-Einstein³⁰ se calculan los módulos viscoelásticos usando el método descrito por Mason³⁰. La dependencia del módulo de elasticidad (G') y de viscosidad (G'') con la frecuencia angular se representa en la figura 8. En este conjunto de imágenes se muestran los módulos viscoelásticos para tres concentraciones (1.25 mM, 500 μM y 250 μM). Para las concentraciones de 1.25 mM y 250 μM los módulos elásticos son mayores que los módulos viscosos, $G_{oEIFA}' > G_{oEI}''$, mientras que para la concentración de 500 μM son parecidos y el valor de G' es mayor. Los dos módulos correspondientes a oEIFA 500mM se aproximan más adaptando un comportamiento más elástico. En general, en el medio de PBS el comportamiento elástico se acentúa más. Para las concentraciones de 1.25 mM y 250 μM los módulos viscosos son mayores que los módulos elásticos, $G_{oEI}'' > G_{oEIFA}'$, mientras que para la concentración de 500 μM tienen valores parecidos. Los módulos elásticos tienen valores

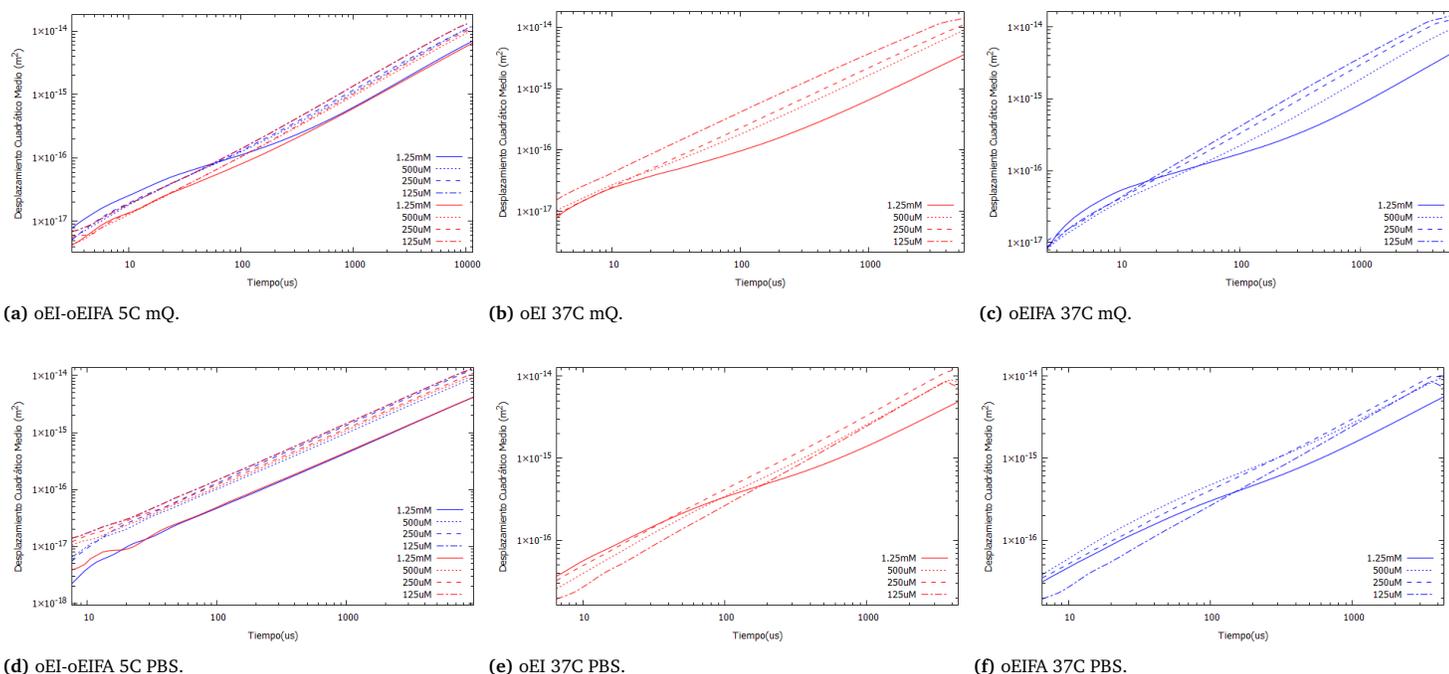


Fig. 7 Desplazamiento Cuadrático Medio (MSD). En color rojo el polímero oEI y en color azul el polímero oEIFA.

parecidos para concentraciones de 1.25 mM, los dos materiales tienen un comportamiento elástico bien definido. En el caso de 500 μM se produce una aproximación más pronunciada (en torno a 9000 rad/s) en el polímero oEIFA.

Las diferencias entre estos dos ELRs también se aprecian en las propiedades mecánicas. En mQ y por debajo de T_i las soluciones, exceptuando la más grande, muestran un comportamiento fluido, ya que los módulos complejos viscoelástico están dominados por el módulo de pérdidas (G''). A estas temperaturas las propiedades mecánicas de estas nanoestructuras están relacionadas con las de un fluido viscoelástico. En PBS y por debajo de esta temperatura, todas las concentraciones muestran este comportamiento. Este estado es compatible con la existencia de un gran número de cadenas de ELR que están hidratadas y libres, con muy pocas interacciones intermoleculares debidas a las interacciones hidrofóbicas. Por encima de T_i , las cadenas experimentan un gran número de contactos hidrofóbicos moleculares emergiendo un comportamiento elástico. Este comportamiento se aprecia mejor en los polímeros caracterizados por la presencia de fenilalaninas, oEIFA. Gracias a las técnicas microrreológicas se ha demostrado que realmente sí existen diferencias significativas entre los dos ELRs. La presencia de las interacciones $\Pi - \Pi$ acentúan un comportamiento más elástico que las interacciones hidrofóbicas presentes en el bloque $[VGIPG]_{60}$. Gracias al acoplamiento entre los anillos aromáticos de las fenilalaninas las soluciones crean una especie de red caracterizada por un comportamiento elástico.

Como se ha demostrado, estos dos ELRs estudiados muestran un comportamiento de auto-ensamblado que permite la forma-

ción de nanoestructuras micelares y nanogeles. Además de las diferencias que experimentan estos ELRs con la temperatura, también se pueden diferenciar por las estructuras que originan al autoensamblarse, una vez superada la T_i . Cuando los dos polímeros se encuentran a temperatura fisiológica se autoensamblan formando nanopartículas con diferentes grados de polidispersidad. Para concentraciones de 1.25 mM, los dos ELRs muestran estructuras de gran tamaño reproduciendo una red elástica, para concentraciones menores, los dos ELRs se autoensamblan en micelas. En el caso del ELR oEIFA, a concentraciones de 500 μM y 250 μM , estas micelas interactúan entre sí formando una clase de red elástica, la cual no está presente en el ELR oEI, impulsada por las interacciones $\Pi - \Pi$ de las fenilalaninas. Por debajo de 250 μM los dos ELRs son fluidos newtonianos formados por micelas.

4. Conclusiones:

Gracias a las técnicas microrreológicas y al DLS se ha podido caracterizar la formación de nanoestructuras supramoleculares basadas en dibloques anfífilos del tipo elastina. La composición de la secuencia de los bloques hidrofóbicos es un parámetro que condiciona fuertemente la estabilización de sistemas micelares y la formación de nanogeles. Se ha demostrado que los ELRs anfífilos oEI y oEIFA se organizan en micelas estables en condiciones fisiológicas con potencial aplicación para la encapsulación de fármacos³⁷. Además, la presencia de fenilalaninas en el bloque hidrofóbico predetermina las propiedades mecánicas de estos materiales. El ELR oEIFA, gracias a la existencia de las interacciones $\Pi - \Pi$, exhibe un comportamiento viscoelástico más pronunciado que el oEI. Este tipo de dibloques (oEIFA) puede ser importante para la liberación de fármacos porque, debido a la presencia de las fenilalaninas puede mejorar la encapsulación de fármacos

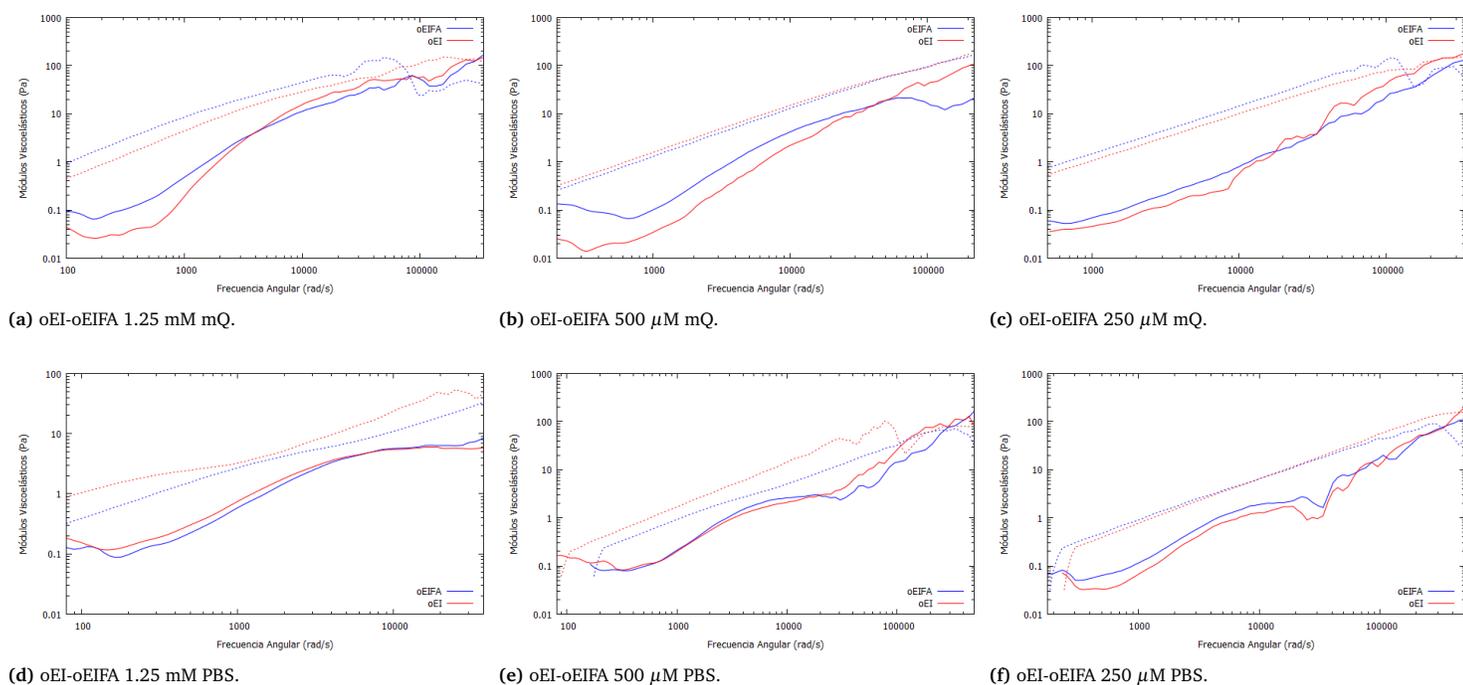


Fig. 8 Módulos de viscosidad en mQ y PBS a $T=37^\circ\text{C}$. En color rojo el polímero oEI y en color azul el polímero oEIFA. Módulo elástico línea continua y módulo viscoso línea discontinua.

hidrofóbicos y además, gracias a su comportamiento termosensibil a temperatura fisiológica, se agregan en nanogeles inyectables³⁸⁻⁴⁰.

Información complementaria:

Los coeficientes de correlación de las medidas tomadas por las técnicas DSL y microrreología se adjuntan en un documento adicional.

Agradecimientos

Para la realización de este trabajo ha sido fundamental la ayuda de todos los miembros del grupo BIOFORGE. En especial, quiero destacar a José Carlos Rodríguez Cabello, por haberme dado la oportunidad de trabajar en un ambiente multidisciplinar como es la biotecnología y a Sergio Rodríguez Acosta, por su infinita paciencia, su atención e implicación a la hora del trabajo práctico, pero también por sus consejos y recomendaciones que, sin suda, han hecho de mí un mejor investigador.

Referencias

- 1 Cancer Res. 2001 Feb 15;61(4):1548-54.
- 2 Mol. Pharmaceutics 2013, 10, 2, 586-597.
- 3 Advanced Drug Delivery Reviews 62 (2010) 1456-1467.
- 4 R. Lin, H. Cui, Supramolecular nanostructures as drug carriers, Curr. Opin. Chem. Eng. 7 (2015) 75-83.
- 5 Materialstoday Volume 14, Issue 3, March 2011, Pages 88-95.
- 6 Advanced Drug Delivery Reviews Volume 54, Issue 8, 18 October 2002, Pages 1093-1111.
- 7 AAPS PharmSciTech, Vol. 15, No. 4, August 2014 (@ 2014).

- 8 EPMA J. 2010 Mar; 1(1): 164-209.
- 9 Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 6288 - 6308.
- 10 Advanced Drug Delivery Reviews 97 (2016) 85-100.
- 11 Nanotechnology in Regenerative Medicine: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 811.
- 12 Urry DW. J Phys Chem B 1997;101:11007-28.
- 13 Urry DW. What sustains life? Consilient mechanisms for protein-based machines and materials. Basel: Birkhäuser; 2006.
- 14 Wikipedia. Elastina. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Elastina>
- 15 Self-Assembling Biomaterials. Molecular Design, Characterization and Application in Biology and Medicine Woodhead Publishing Series in Biomaterials 2018, Pages 49-78.
- 16 Biopolymers, Vol. 54, 282-288 (2000).
- 17 Melba Navarro and Josep A. Planell (eds.), Nanotechnology in Regenerative Medicine: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 811.
- 18 Nano Lett. 2012 Apr 11;12(4):2165-70.
- 19 Adv. Mater. 2000, 12, No. 15, August 2.
- 20 J. Am. Chem. Soc., Vol. 112, No. 14, 1990.
- 21 J. Am. Chem. Soc. 2004 12, 64, 11, 3212-13213.
- 22 J Mater Sci Mater Med. 2004 Apr;15(4):479-84.
- 23 G. W. H. Höhne . W. F. Hemminger H.-J. Flammersheim Differential Scanning Calorimetry 2nd revised and enlarged edition
- 24 H.Günzler and A.Williams Handbook of Analytical Techniques Wiley-VCH 2001.

- 25 DLS technical note MRK656-01 MALVERN INSTRUMENTS
- 26 *Soft Matter*, 2007, 3, 1449-1455 1449.
- 27 *Rheol Acta* (2000) 39:371–378.
- 28 *ACS Cent. Sci.* 2017, 3, 12941303.
- 29 *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014, 6, 1450914515.
- 30 *Rheol Acta* (2000) 39:371–378.
- 31 *Macromolecules* 37 (2004) 3396e3400.
- 32 *Chemical Physics Letters* 388 (2004) 127–131.
- 33 *Prog. Polym. Sci.* 30 (2005) 1119–1145.
- 34 *Polymer* 81 (2015) 37e44.
- 35 *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014, 6, 14509–14515.
- 36 *An Introduction to DLS Microrheology Malvern Instrumentd Worldwide* 2017.
- 37 *Adv Drug Deliv Rev.* 2010 Dec 30; 62(15): 1456–1467.
- 38 *Biomacromolecules* 2011, 12, 4240–4246.
- 39 *Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2005, 43, 6048.
- 40 *Biofabrication.* 2016 Nov 15;8(4):045009.