



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

Grado en Física

**Estudio del proceso de co-autoensamblado de polipéptidos sensibles a estímulos.**

*Autor: Carmen Herrero Cabrero*

*Tutor/es: José Carlos Rodríguez Cabello y Jesús Medina García*

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
1.1. La ciencia de la Nanotecnología y los biomateriales	5
1.2. Elastin Like Recombinamers (ELRs)	6
1.3. Autoensamblado en dibloques: micelas	9
1.3.1. Energía libre del núcleo	10
1.3.2. Energía libre de la superficie separadora del núcleo y la corona	10
1.3.3. Energía libre de la corona	11
1.3.4. Dimensiones de las micelas	11
<b>2. Sección experimental</b>	<b>13</b>
2.1. Materiales	13
2.1.1. $E_{50}I_{60}$	13
2.1.2. $K_{48}I_{60}$	13
2.2. Técnicas experimentales	14
2.2.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	14
2.2.2. Turbidimetría	14
2.2.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	15
2.2.4. Dispersión dinámica de la luz (DLS)	16
<b>3. Resultados y discusión</b>	<b>19</b>
3.1. FTIR	19
3.2. Turbidimetría	19
3.3. DSC	21
3.4. DLS	23
<b>4. Conclusiones</b>	<b>26</b>
<b>5. Anexo I</b>	<b>28</b>
<b>6. Anexo II</b>	<b>30</b>
<b>7. Anexo III</b>	<b>31</b>
7.1. Información complementaria. Estadística ANOVA de un factor	31
<b>8. Agradecimientos</b>	<b>33</b>



## Resumen:

La producción recombinante de biomateriales autoensamblantes permite desarrollar dispositivos nanoestructurados para múltiples aplicaciones en biomedicina como la administración de fármacos o la regeneración de tejidos. En especial, los recombinámeros tipo elastina, ELRs, anfifílicos con diseño multibloque han sido estudiados para todas estas aplicaciones. El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es combinar contenidos físico-químicos para estudiar las nanoestructuras de autoensamblado que se forman al mezclar dos polipeptidos anfifílicos de cargas opuestas y buscar posibles mejoras para su futuro uso en nanociencia. Se han elegido dos ELRs dibloques que tienen características muy similares y están cargados eléctricamente con signos contrarios, uno de ellos contiene ácido glutámico ( $E_{50}I_{60}$ ) y el otro contiene lisinas ( $K_{48}I_{60}$ ). En este estudio lo que interesa es ver las interacciones físicas que puede haber entre ambos polímeros una vez estén mezclados en disolución a distintas proporciones de carga y ver cómo afecta eso a las nanoestructuras originadas tras el proceso de autoensamblado. Para ello, se prepararon muestras a distinta proporción de cada polímero y se estudiaron las características del proceso de autoensamblado y las nanopartículas formadas. Las técnicas predominantes en este trabajo han sido la Calorimetría Diferencial de Barrido (con siglas *DSC* en inglés) y la Dispersión Dinámica de la Luz (con siglas *DLS* en inglés) a través de las cuales se ha obtenido información crítica sobre la temperatura de transición inversa y el tamaño de las estructuras, aunque también se han realizado medidas complementarias mediante turbidimetría y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para caracterizar los polímeros puros por separado. La ventaja de conseguir cambios en las estructuras autoensambladas mediante interacciones físicas así como en el tamaño o en la temperatura de transición de las muestras es que, para futuras aplicaciones se pueden conseguir grandes mejoras a la hora de crear cápsulas de fármacos de mayor tamaño, modelar los materiales de tal forma que se consiga el cambio de fase a una temperatura específica, etc. Básicamente, es un parámetro a controlar que se suma a la hora de preparar un material recombinante con unas características determinadas deseadas.

## Abstract:

Recombinant production of self-assembling biomaterials makes it possible to develop nanostructured devices for multiple applications in biomedicine, such as medicine administration or tissue regeneration. In particular, the elastin-type recombinamers, ELRs, amphiphilic with multiblock design have been studied for all of these applications. The objective of this Final Degree Project is to combine physical-chemical contents to study the self-assembly nanostructures that are formed by mixing two amphiphilic polypeptides of opposite charges and to look for possible improvements for their future use in nanoscience. Two diblock ELRs that have very similar characteristics and are electrically charged with opposite signs have been chosen, one of them contains glutamic acid ( $E_{50}I_{60}$ ) and the other contains lysines ( $K_{48}I_{60}$ ). In this study, we are going to see the physical interactions that may exist between both polymers once they are mixed at different proportions and to see how this affects the nanostructures that originate after the self-assembly process. For this, the samples were prepared at a different proportion of each polymer and the characteristics of the self-assembly process and the nanoparticles formed were studied. The predominant techniques in this work have been Differential Scanning Calorimetry (*DSC*) and Dynamic Dispersion of Light (*DLS*) through which it has been obtained critical information about the reverse transition temperature and the size of the structures, although complementary measurements have also been made using turbidimetry and Fourier Transform infrared spectroscopy (FTIR) to characterize the pure polymers separately. The advantage of achieving changes in the self-assembled structures through physical interactions as well as in the size or transition temperature of the samples is that, for future applications, great improvements can be achieved when creating larger drug capsules, modeling materials in such a way that phase change is achieved at a specific temperature, etc. Basically, it could be a parameter to control which is added on time of preparing a recombinant material with certain desired characteristics.



# 1. Introducción

Este ensayo tiene como principal objetivo estudiar el proceso de autoensamblado en nanoestructuras de polipéptidos anfifílicos en bloque.

Los polipéptidos sometidos a este estudio son dos dibloques anfifílicos, caracterizados por tener en común la parte hidrofóbica y una diferente parte hidrofílica, por un lado tenemos el  $E_{50}I_{60}$ , que contiene ácido glutámico (carga negativa) y por el otro lado tenemos  $K_{48}I_{60}$  conteniendo lisina (carga positiva).

Se estudiará cómo la interacción física de estos dos dibloques anfifílicos, con capacidad independiente de autoensamblado, es capaz de hacer surgir sinergias entre ambas cuando se autoensamblan el uno en presencia del otro. Se estudiarán las nanoestructuras a las que dan lugar y se compararán con las que forman individualmente, previamente estudiadas.

En este trabajo se introducirá de forma teórica las características y propiedades de este tipo de materiales, el desarrollo de esta nueva ciencia y sus posibles aplicaciones. Posteriormente se plantearán el método y las técnicas experimentales que se han seguido durante la experiencia y finalmente se mostrarán todos los resultados obtenidos con sus conclusiones finales.

## 1.1. La ciencia de la Nanotecnología y los biomateriales

La Nanotecnología consiste en un campo multidisciplinar que comprende áreas como biología, química, física, ciencia de materiales, etc. Los avances en el mundo de la nanomedicina han permitido durante estos últimos años el desarrollo de multitud de dispositivos biométricos aplicados a la administración y transporte de fármacos, en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Así mismo, se han desarrollado portadores de fármacos biomacromoleculares para su administración controlada que además, pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas de una gran variedad de medicamentos con baja solubilidad o importantes efectos secundarios, o suministrar ácidos nucleicos que por si mismos son incapaces de atravesar membranas celulares. Dirigiéndolos así de forma selectiva al tejido dañado. [1] [2] [3]

Dentro del gran abanico de posibles materiales para encapsular y dosificar fármacos cabe destacar los polímeros con capacidad para formar nanopartículas estables en solución.

Las nanopartículas poliméricas se inventaron en la década de 1970 para superar las limitaciones asociadas con los liposomas ya que se considera que son más estables y ofrecen propiedades de liberación más controladas. Este tipo de nanopartículas pueden dividirse en dos categorías: nanoesferas y nanocápsulas [5]. Las nanoesferas son sistemas matriciales esféricos, que tienen el agente activo disperso en una matriz polimérica de manera homogénea, mientras que las nanocápsulas son sistemas vesiculares que rodean el agente dentro de una cavidad rodeada por una cubierta polimérica, que controla su liberación dependiendo de su naturaleza. Estas diferencias hacen que ambos tipos de nanopartículas tengan distintas propiedades en cuanto a la forma de liberar su contenido [4].

Entre estos tipos de polímeros destacan los que son biodegradables como el ácido proliláctico (PLA) o el ácido poliglicólico (PGA). Además, las micelas de origen sintético suelen estar formadas por polímeros anfifílicos autoensamblables de origen sintético. Uno de los ejemplos más importantes de este tipo son las formadas con polietileno glicol (PEG) [25]. Sin embargo, las estructuras derivadas del PEG o los productos secundarios formados durante su síntesis pueden conducir a ciertos efectos secundarios como la hipersensibilidad [26]. Pero el uso de estos polímeros traen algunas desventajas como su baja solubilidad, alto ratio de degradación, baja estabilidad térmica o la falta

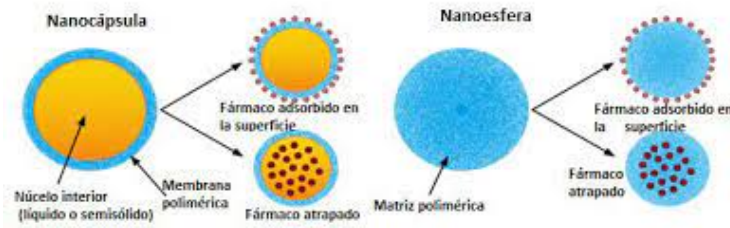


Figura 1: Nanoestructuras posibles para nanopartículas protéicas.

de monodispersidad .

En cuanto a los materiales poliméricos, podemos dividirlos en polímeros sintéticos y naturales.

Los materiales sintéticos ofrecen una capacidad de sintonización significativa, que es difícil de lograr con materiales recolectados naturalmente, sin embargo, persisten preocupaciones sobre la inmunogenicidad potencial y la toxicidad de los fragmentos degradados, reticulantes y agentes activantes utilizados para fabricar biomateriales sintéticos.

De esta manera, los polímeros recombinantes o modificados genéticamente tienen como objetivo llenar el vacío existente entre los polímeros naturales y sintéticos, combinando así la capacidad de sintonización de los biomateriales sintéticos con la biocompatibilidad y la citotoxicidad disminuida de los biomateriales naturales.

Su funcionalidad y complejidad han servido como inspiración para imitar sus propiedades y conseguir así desarrollar distintas aplicaciones en nanomedicina [6], teniendo la ventaja de poder utilizar estos polímeros para realizar filmes, apósitos, recubrimientos y/o paredes que liberen el aditivo contenido a velocidades controladas, para lo que hay que escoger un polímero adecuado.

Algunas de las ventajas de las nanopartículas protéicas para este tipo de aplicaciones son:

- Dependiendo de su tamaño son capaces de penetrar en tejidos y barreras biológicas como piel, mucosas o incluso membranas celulares.
- El recubrimiento proteico protege al fármaco del medio exterior.
- Dependiendo de sus características de solubilidad pueden alcanzar los órganos diana con una mayor efectividad.

## 1.2. Elastin Like Recombinamers (ELRs)

Más allá de imitar las funciones de los materiales biológicos, el principal objetivo es mejorarlas creando compuestos con diversas propiedades que no se encuentran en la naturaleza. De todos los biopolímeros que existen, en este trabajo nos vamos a centrar en describir y estudiar las características de los materiales recombinantes. Uno de los polímeros recombinantes más importantes es el de tipo elastina, comunmente conocidos como *Elastin-like Recombinamers* o *ELRs* en inglés.

La proteína elastina es uno de los componentes más importantes de la matriz extracelular. Aunque su función principal es proporcionar elasticidad a los tejidos, su función biológica no se limita a esta tarea, ya que desempeña un papel activo en la modulación del comportamiento celular y promover la reparación tisular.

La creciente disponibilidad de formas recombinantes de elastina que son virtualmente invisibles



para el sistema inmunológico ha permitido la formación de una amplia gama de construcciones y compuestos de biomateriales que se benefician de las propiedades inherentes de elastina de ensamblaje y elasticidad innatas. [8]

La elastina es una proteína fibrosa caracterizada por sus “monómeros” llamados *tropoelastina*, su secuencia aminoacídica está gobernada por los grupos VPGG, VPGVG, APGVG y VGVAPG. Estos grupos adquieren una estructura tal que permiten que la elastina sufra grandes deformaciones sin ruptura y que, una vez que el estrés desaparece, ésta recupere su conformación original. Este proceso tiene la gran ventaja de ocurrir sin pérdida de energía, puesto que la energía empleada para estirar la proteína se recupera inmediatamente al volver a su estado original. Podemos asemejar este comportamiento tan peculiar al de un muelle. Pero por el contrario al comportamiento de un muelle, la elastina cuando se encuentra en un medio acuoso y por debajo de cierta temperatura se encuentra soluble en el medio, pero al sobrepasar esta temperatura la proteína se autoensambla originando un agregado no soluble. Esta característica ha sido la revelación en la ciencia de los materiales y se han basado muchos polímeros en ella, como los ELRs. [9]

Los ELRs son una familia de polipéptidos diseñados genéticamente basados en la elastina humana, principalmente en la repetición del pentapéptido (o motivo) valina-prolina-glicina-Xaa-glicina  $[VPGXG]_n$ , donde el aminoácido invitado X puede ser cualquier aminoácido (natural o sintético) excepto la prolina y n es el número de veces que se repite el pentapéptido.

Se ha creado este nuevo término para el cual recombinámero enfatiza el hecho de que estas macromoléculas tienen una naturaleza tanto oligomérica como recombinante, para evocar todas estas las propiedades como la complejidad de la molécula, longitud, estequiometría y monodispersidad.

Como resultado del avance en ingeniería genética, la creciente disponibilidad de formas recombinantes de elastina ha llevado a la formación de una amplia gama de biomateriales y compuestos. Usando tecnología de ADN recombinante, puede haber un control preciso no solo de la secuencia y estereoquímica de los aminoácidos, sino también del peso molecular y su distribución. Además, el rendimiento mecánico de los ELR se acompaña de una extraordinaria biocompatibilidad, ya que el sistema inmunológico del organismo huésped es incapaz de distinguir entre elastina endógena y un ELR cuando el polímero se basa en los motivos más comunes presentes en la proteína natural. [7]

### **Naturaleza termosensible y comportamiento autoensamblante de los ELRs**

La característica más importante que heredan estos materiales, es el comportamiento reversible de transición de fase en función de agentes externos como puede ser la temperatura, el pH o la concentración de sales. En disolución acuosa y por debajo de cierta temperatura específica conocida como la temperatura de transición ( $T_t$ ) las cadenas del polímero son solubles ya que permanecen hidratadas hidrófobamente debido a la presencia de estructuras de tipo clatrato o jaula de moléculas de agua (parte izquierda de la Fig.2). Cuando la temperatura se acerca a la de transición estas estructuras de tipo clatrato empiezan a excitarse por agitación térmica y se desestabilizan, de esta forma las cadenas pierden las moléculas de agua (se deshidratan), desapareciendo así su organización de alto nivel y plegándose, adoptando una estructura regular llamada espiral tipo  $\beta$  que se estabiliza mediante contactos hidrófobos (parte derecha de la Fig.2). Este tipo de estructuras están constituidas por una sucesión de horquillas. En esta estructura, los contactos hidrofóbicos intra e intercadena dan como resultado la formación de un estado de fase separada. De esta forma, por encima de  $T_t$  el material ha experimentado una transición de fase de primer orden a nivel molecular, pasando de un estado soluble a uno insoluble en un disolvente acuoso, siendo este plegamiento totalmente reversible.

Durante el calentamiento, el polímero se pliega hidrofóbicamente, lo que provoca un aumento del orden local ya que las interacciones que se encuentran en las estructuras autoensamblantes son no covalentes (por ejemplo, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrófobas, capilaridad, apilamiento  $\pi$ - $\pi$  y enlaces de hidrógeno) y actúan a un nivel estrictamente local. Sin embargo, la fuerza de estas interacciones no covalentes suele ser menos energética que la de las interacciones covalentes en un factor de alrededor de 10 y se reorganizan adaptándose al entorno que las rodea. Para lograr la estabilidad, estas interacciones deben operar y ser más favorables energéticamente que las que llevarían a la ruptura de la estructura. Pero la magnitud de este orden local va a ser superada considerablemente por el desorden originado por la ruptura de las estructuras de clatrato causada por la agitación térmica. Todo esto se traduce en un aumento de entropía del sistema que es el que actúa como fuerza motora del plegamiento, facilitando que  $\Delta G < 0$  [9]. Como el autoensamblado tiene lugar en ausencia de fuerzas externas, el proceso conduce a una energía libre de Gibbs más baja, lo que significa que las estructuras autoensambladas son termodinámicamente más estables que sus componentes individuales. La minimización de energía impulsa el proceso y la estructura final está en equilibrio termodinámico con sus componentes. Como resultado, la compensación entre entalpía y entropía se convierte en el aspecto clave de la discusión. [11]

La cantidad de energía térmica requerida para desencadenar el proceso de transición inversa depende de la relación entre el agua y la cadena polimérica. Numerosos parámetros, como la concentración polimérica, la longitud del ELR, la composición aminoacídica, el pH o la fuerza iónica, son capaces de modular esta relación, determinando la formación de clatratos de diferente grado de perfección. Por tanto, estas variables han de ser consideradas cuando se define una determinada temperatura de transición. [9]

Este proceso de contracción inducido por estímulos ambientales lo podemos considerar como la conversión de energía térmica o química en trabajo mecánico útil. Además, el plegamiento es completamente reversible bajando la temperatura de la muestra por debajo de la  $T_t$ ; por todo ello, los ELRs han sido calificados como polímeros inteligentes, pues son capaces de percibir el ambiente y reaccionar a través de cambios en respuesta a él.

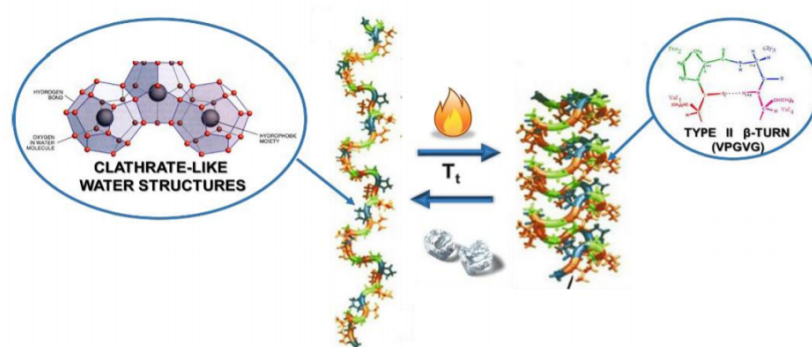


Figura 2: Representación esquemática del cambio de estructura que sufren los ELRs por antes y después de superar la temperatura de transición ( $T_t$ )

El aminoácido invitado en los motivos pentapeptídicos puede variar la temperatura de transición

y, en consecuencia, las propiedades fisico-químicas. Esto va a depender de los caracteres de cada aminoácido, por ejemplo, si el aminoácido huésped es una Leucina (L), el carácter anfifílico del bloque será hidrófobo mientras que será hidrófilo si el aminoácido es la Serina (S). En nuestro trabajo nos va a interesar el carácter eléctrico que adquieran los bloques, por ejemplo, estará cargado positivamente si nuestro aminoácido invitado es una Lisina (K) y negativamente si es un Ácido Glutámico (E). [10]

Se deben tener en cuenta numerosos parámetros, como la concentración de polímero, la composición de aminoácidos, el pH y la fuerza iónica, al definir un Tt específico. A la luz de esto, los ELR pueden considerarse polímeros inteligentes, ya que son capaces de responder a varios estímulos externos, detectando así su microambiente y experimentando cambios en respuesta a él. Gracias a sus resultados de compatibilidad y estabilidad fisiológica convirtieron estos materiales en candidatos para aplicaciones en las regeneraciones de tejidos y liberación controlada de fármacos. [7]

### 1.3. Autoensamblado en dibloques: micelas

En nuestro trabajo vamos a estudiar cómo interactúan dos polímeros dibloque que poseen cargas opuestas en el proceso de autoensamblado. Tenemos dos características que diferencian a los copolímeros dibloque ELRs en sus contrapartes sintéticas: en primer lugar, el cambio en la composición entre el bloque hidrófilo e hidrófobo se ajusta al cambio del residuo huésped dentro del pentapéptido para impartir anfifilicidad [11]. El bloque hidrofóbico comparte con el bloque hidrofílico los mismos cuatro aminoácidos que se repiten invariantes (V, P y G en la repetición VPGXG) dentro de la unidad de repetición del pentapéptido. En segundo lugar, los polímeros en cuestión son polipéptidos y, por lo tanto, tienen la propensión a formar estructuras secundarias a medida que experimentan su transición de fase, lo que podría agregar otro componente energético a la energía libre y provocar un cambio en la rigidez de la cadena para ambos bloques con el aumento de temperatura.

Para desarrollar un marco teórico del proceso de autoensamblaje activado por temperatura que permitiría el diseño racional, a priori, de micelas, primero probamos la aplicabilidad de una teoría de autoensamblaje desarrollada para dibloques sintéticos en estos polímeros peptídicos. Este modelo teórico fue probado previamente para describir la micelización de dibloques de poliestireno-poliisopropeno (PS-PI). Se encontró que las micelas tenían bloques de corona y núcleo estirados como se esperaba para micelas fuertes, y que las predicciones teóricas estaban de acuerdo con los valores determinados experimentalmente de radios de micelas y números de agregación. A partir de estos resultados, se empezó a utilizar este marco teórico para predecir las propiedades de las micelas formadas a partir de dibloques ELRs [12].

En este trabajo vamos a justificar de forma cualitativa las características de las partículas resultantes y estimar las propiedades en función de los resultados experimentales. En especial, para nuestros dibloques muestra se han medido la temperatura crítica micelar (temperatura a la cual se empiezan a formar dichas partículas, es decir, la temperatura de transición) y el radio hidrodinámico (R) en función de la proporción de carga.

Un modelo convencional concibe una micela como un agregado de moléculas con un núcleo más denso compuesto de bloques hidrofóbicos B con  $N_B$  monómeros (cada monómero tiene un tamaño  $a_B$ ) y una corona solvatada formada por bloques hidrofílicos A con  $N_A$  monómeros (cada monómero tiene un tamaño  $a_A$ ) tal que  $N_A, N_B \gg 1$ . El solvente es muy afín con el bloque hidrofílico A

sin embargo, tiene una afinidad muy pobre con el bloque hidrofóbico B, por esta razón, los bloques hidrofóbicos van a preferir interactuar entre ellos en lugar de hacerlo con el solvente, formando así el núcleo de la micela y, de forma contraria, los bloques hidrofílicos van a hacerlo libremente con el solvente, formando así la corona solventada.

Dentro de la aproximación de que la superficie núcleo-corona sea muy fina en comparación con el radio del núcleo y el grosor de la corona podemos definir la energía libre total de la micela ( $E$ ) como la suma de tres contribuciones: la energía de la corona, de la superficie separadora y la del núcleo:

$$E = E_{corona} + E_{interface} + E_{core} \quad (1)$$

Este balance de energías va a determinar las propiedades de las micelas.

Normalmente, las variaciones en las energías libres de la corona y la superficie separadora son dominantes con respecto a la del núcleo. Sin embargo, la energía libre elástica del núcleo determina las transiciones entre las diversas morfologías de micelas: esféricas, cilíndricas o laminares.

A continuación vamos a ver un poco en detalle cada contribución energética:

### 1.3.1. Energía libre del núcleo

El núcleo micelar está parcialmente hinchado por un disolvente pobre. Suponemos que la fracción de volumen  $\phi_B$  de los monómeros B en el núcleo micelar es independiente de la forma de la micela y de la distancia  $r$  desde su centro. Para un núcleo con baja densidad de polímero,  $\phi_B \ll 1$ , la fracción de volumen de equilibrio está determinada por el equilibrio del par atractivo y los contactos ternarios repulsivos entre los monómeros,  $\phi_B \sim \tau$  donde  $\tau$  es la derivación relativa de la temperatura ( $\theta$ ),  $\frac{T-\theta}{T}$ , del polímero B.

Para valores mayores de la fracción de volumen, las interacciones monómero-monómero de orden superior son relevantes. La energía libre de la interacción monómero-monómero por bloque B es independiente del número total de cadenas en la micela y coincide con la energía libre  $F_{B0}$  en el núcleo colapsado de un unímero (dibloque aislado en solución). Por lo tanto, podemos omitirlo de una consideración adicional porque no contribuye a la diferencia de energía libre entre unímero y micelas de diferente morfología y número de agregación. Aunque se vuelve importante al determinar la transición entre diferentes morfologías.

Para micelas con gran número de agregación, que es el número de moléculas presentes en una misma una vez que se ha alcanzado la concentración micelar crítica (para una micela esférica sería  $Q = \frac{4\pi R^3 \phi_B}{3N_B}$ , con  $R$  el radio del núcleo), los bloques B se estiran en el núcleo con respecto a su distancia gaussiana (distancia ideal que tendría una cadena o una molécula completamente libre) de extremo a extremo [14].

### 1.3.2. Energía libre de la superficie separadora del núcleo y la corona

En bajas fracciones de volumen de polímero en el núcleo ( $\phi_B \ll 1$ ) existe una relación de escala entre la tensión superficial,  $\gamma$ , y  $\phi_B$ :

$$\gamma a_B^2 / kT \sim \phi_B^2 \quad (2)$$

Además, para copolímeros de bloque compuestos de monómeros anfífilicos complejos (como es el caso de los pentapéptidos de nuestros polímeros), las interacciones monómero-monómero que gobiernan en el núcleo podrían diferir de las de la interfaz núcleo-corona, donde estos monómeros

podrían exhibir propiedades similares a las de los tensioactivos (reducir la tensión superficial). La anfifilicidad de los monómeros complejos podría conducir a una reducción significativa de la tensión superficial  $\gamma$ , dando como resultado nuevos estados de micelas. Si  $\gamma$  y  $\phi_B$  están desacoplados:

$$\gamma a_B^2/kT \ll \phi_B^2 \quad (3)$$

entonces en la solución emergerían micelas débiles con núcleos densos y bloques de corona casi sin estirar [14].

### 1.3.3. Energía libre de la corona

Hemos considerado una fina capa entre los bloques A y B de la micela, por lo tanto interpretaremos que los bloques de corona A se pueden imaginar como atados a la superficie del núcleo micelar. La estructura de equilibrio de la corona está determinada por el estiramiento elástico de los bloques A y la interacción repulsiva entre los monómeros. Aquí se tendrá también en cuenta también la carga de las cadenas del bloque A, que le proporcionará a nuestra micela una energía electrostática.

### 1.3.4. Dimensiones de las micelas

Mediante una visión general, hemos podido caracterizar a las micelas de forma que disponen de un núcleo apolar y una corona polar, la cual interactúa con el medio. De esta forma, el radio total de la micela va a ser la suma del radio del núcleo ( $R$ ) y el espesor de la corona ( $H$ ), ya que hemos considerado despreciable la capa que separa a ambos:

$$R_{tot} = R + H \quad (4)$$

En este trabajo vamos a tener en cuenta también el *diámetro hidrodinámico*, el cual estudiaremos mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS).

El tamaño de una partícula se calcula a partir del coeficiente de difusión translacional utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (5)$$

donde  $d_h$  es el diámetro hidrodinámico,  $D$  es el coeficiente de difusión translacional,  $k$  la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta y  $\eta$  la viscosidad. Podemos entonces definir el diámetro hidrodinámico como el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión de traslación que la partícula. Este coeficiente dependerá no solo del tamaño del “núcleo” de la partícula, sino también de cualquier estructura de superficie que afecte la difusión. velocidad, así como la concentración y tipo de iones en el medio [15].

De esta forma, podemos definir el radio hidrodinámico de una forma analítica muy sencilla:

$$R_h = R_{tot} + C(\lambda) \quad (6)$$

Donde  $C$  va a depender de cierto parámetro  $\lambda$ , el cual dará cuenta de los factores que influyen en el tamaño hidrodinámico. Algunos de estos factores son:

- *Estructura de la corona:* Que la micela tenga un espesor mayor, no solo influye en el aumento del radio total micelar, sino que influye también en el valor de  $C(\lambda)$ . En este caso, una capa de polímero adsorbido que se proyecta hacia el medio reducirá la velocidad de difusión más que si el polímero estuviera acostado sobre la superficie, y esto reduciría el tamaño hidrodinámico (ver Figura 4). También podríamos tener en cuenta la naturaleza de la superficie y el polímero, así como la concentración iónica del medio pueden afectar la conformación del polímero, que a su vez puede cambiar el tamaño aparente en varios nanómetros [14].

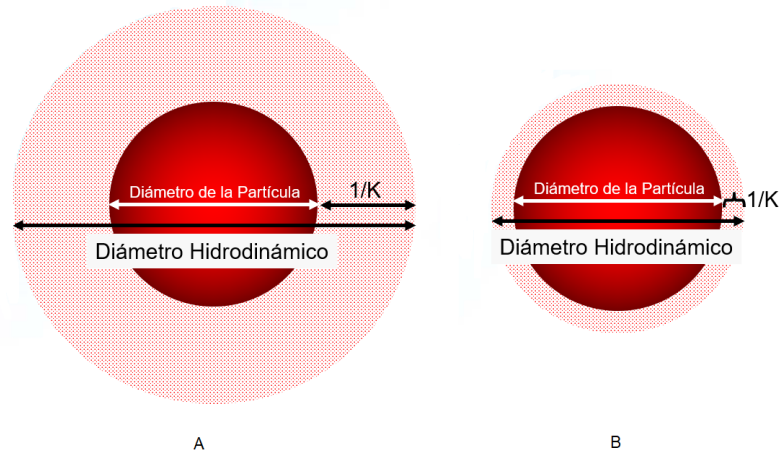


Figura 3: *Esquema del diámetro hidrodinámico.*  $1/K$  es la longitud de Debye, el grosor de la doble capa eléctrica. En la figura A tenemos una partícula en un medio de baja dureza iónica, donde la doble capa se amplía. Mientras que en la figura B tenemos una partícula en un medio con alta dureza iónica, y la doble capa se comprime.

- *Morfología de las micelas:* Si la micela no es esférica, su radio no va a ser constante. Teniendo en cuenta la definición de diámetro hidrodinámico, si la forma de una partícula cambia de una manera que afecta la velocidad de difusión, entonces el tamaño hidrodinámico cambiará.
- *Carga superficial y fuerza iónica del medio:* Que la superficie de la micela quede ionizada o cargada, facilita la interacción de la misma con el medio, afectando así a su velocidad y, en consecuencia, al tamaño aparente.

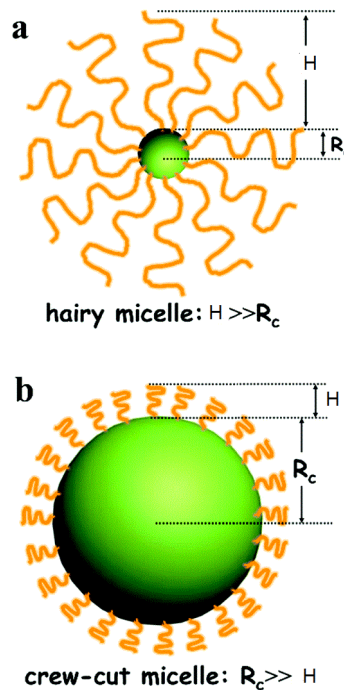


Figura 4: *Tipos de micelas.*

	$E_{50}I_{60}$	$K_{48}I_{60}$
Peso molecular/Da	46977	46581
Carga eléctrica	Negativa	Positiva
Secuencia	$(VGIPG)_{60}V - MESLLP((VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2)_{10}$	$(VGIPG)_{60}V - (VGKPG)_{48}$
Aminoácidos	557	541

Cuadro 1: Resumen de las características relevantes de cada ELR.

## 2. Sección experimental

### 2.1. Materiales

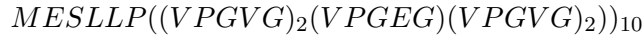
#### 2.1.1. $E_{50}I_{60}$

Como hemos estado tratando hasta ahora de polímeros recombinantes anfífilos, los ELRs que vamos a utilizar en esta experiencia práctica van a tener anfifilicidad. Combinando bloques base, obtenemos polímeros con estas características que son capaces de autoensamblarse en nanopartículas. De otros experimentos ajenos a este sabemos que el ELR  $E_{50}I_{60}$  se autoensambla en nanopartículas prácticamente esféricas.

El ELR  $E_{50}I_{60}$  está compuesto por el bloque  $I_{60}$  hidrofóbico:



que tiene una temperatura de transición inferior a la temperatura fisiológica, alrededor de los  $14^{\circ}C$ , y por el bloque  $E_{50}$  hidrofílico y cargado negativamente (el ácido glutámico, E, está ionizado con un grupo carboxilo):



con una temperatura de transición estimada a unos  $250^{\circ}C$  a un pH neutro debido a la alta polaridad de las cadenas laterales de los grupos carboxilatos [16].

#### 2.1.2. $K_{48}I_{60}$

Este es un polímero dibloque ELR que tiene la característica de anfifilicidad, al igual que el anterior.

El ELR  $K_{48}I_{60}$  está compuesto, del mismo modo que el  $E_{50}I_{60}$ , por el bloque  $I_{60}$  hidrofóbico:



con una temperatura de transición de unos  $19^{\circ}C$ , y por el bloque  $K_{48}$  hidrofílico y cargado positivamente (la lisina, K, está ionizada con un grupo amino):





## 2.2. Técnicas experimentales

### 2.2.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja es la medida de la interacción por absorción, emisión o reflexión de la radiación en el rango del infrarrojo con la materia en cualquier estado, sólido, líquido o gaseoso. Se utiliza para identificar grupos funcionales o sustancias químicas. Esto es debido a que cuando una molécula absorbe radiación infrarroja a una determinada frecuencia, la vibración intramolecular con se produce con la misma frecuencia que la de la radiación, aumentándose así la intensidad, lo que genera señales con frecuencias cuantizadas que corresponden al modo de vibración de un enlace específico.

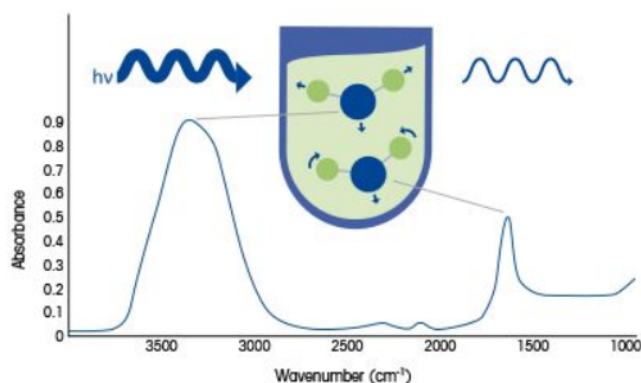


Figura 5: *Ejemplo explicativo de un espectro medido con espectroscopía infrarroja* [27].

Para llevar a cabo esta técnica se emite radiación con la frecuencia correspondiente al rango IR con un equipo especial llamado *espectrofotómetro infrarrojo*. Un espectro de infrarrojos puede visualizarse en una gráfica que relaciona la absorbancia (o transmitancia) con la frecuencia o la longitud de onda de luz emitida.

Antes de registrar el espectro de interés se realiza primero un barrido al blanco, en este caso al aire, para descartar los enlaces que contienen las moléculas suspendidas en el entorno [20].

**Aplicación a este estudio:** En este trabajo se ha hecho uso de un equipo de modelo Infrarrojo Tensor27 (Bruker) que lanza radiación de frecuencias comprendidas entre  $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ .

Se necesita una buena resolución para que los espectros puedan distinguirse y así no se mezclen.

Se dispuso una muestra ( $10 \text{ mg}$ ) de cada polímero puro en el equipo y se realizó un barrido de frecuencias.

### 2.2.2. Turbidimetría

Esta es una técnica analítica que determina cuánto se atenúa un haz de luz que se traslada a través de un medio en suspensión. Esta atenuación se produce gracias a los fenómenos de absorción y dispersión de la luz tras interferir con las partículas. El fundamento en el que se basa en la medición de la intensidad de la radiación transmitida a través de un medio constituido por partículas con dispersión y un índice de refracción distinto al de la suspensión donde se encuentran [19].

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.



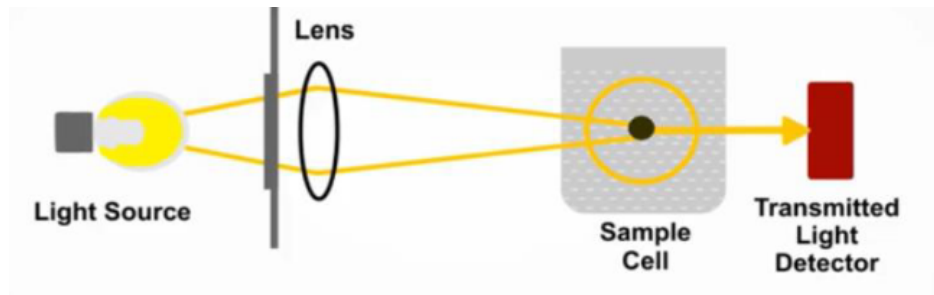


Figura 6: Demostración de cómo funciona la turbidimetría.

**Aplicación en este estudio:** Para las medidas de turbidimetría se utilizó en un espectrofotómetro de UV-visible (Cary Series UV-Vis, Agilent Technologies). Para la caracterización de  $T_t$  se monitoriza la absorción a  $350\text{ nm}$  en función de la temperatura.

Se prepararon dos disoluciones a una concentración de  $1\text{ mg/mL}$ , una de cada polímero, ambas en PBS. Se dispusieron en una cubeta, insertando  $1\text{ mL}$  en la muestra y se realizó un barrido de temperatura en el rango de  $4 - 50^\circ\text{C}$  para cada una.

### 2.2.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido, o DSC, es una técnica experimental dinámica que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia.

En la técnica experimental de Calorimetría Diferencial de Barrido se dispone de dos cápsulas, una de ellas contiene la muestra a analizar (en nuestro caso será una disolución) y la otra es la llamada cápsula de referencia, y contiene el medio en el que se ha disuelto nuestro material o la solución reguladora (en nuestro caso, el disolvente, PBS). Se usan calefactores individuales para cada cápsula y un sistema de control comprueba si se producen diferencias de temperatura entre ambas. Si se detecta cualquier diferencia, tendremos un gradiente de temperatura  $\Delta T$ , esto establece un voltaje, que se convierte en potencia y se utiliza para que los calefactores individuales lo corrijan de tal manera que  $\Delta T = 0$ , es decir, el instrumento compensa la energía necesaria para mantener la temperatura de los crisoles constante.

Esta compensación se traduce en un pico dibujado por la máquina en función del calor que se haya necesitado aplicar, se podrán distinguir los procesos endotérmicos y exotérmicos [17].

Esto va ser útil para caracterizar la estabilidad de una molécula proteica y medir el cambio de calor asociado a la desnaturalización térmica de la molécula cuando se calienta a un ritmo constante.

Esta estabilidad se estudia en función de la temperatura de transición, la cual se verá reflejada en la gráfica siendo en el extremo de la función dibujada.

Con esta técnica se podrá medir también la entalpía del proceso ( $\Delta H$ ) que es el área bajo la curva del saliente.

Gracias a esta técnica se podría conseguir elucidar los factores que contribuyen al plegamiento y estabilidad de las biomoléculas nativas. Entre estos factores se incluyen interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno entropía de conformación y ambiente físico. Estos arreglos estructurales dan lugar a la absorción de calor causada por la redistribución de enlaces no covalentes.

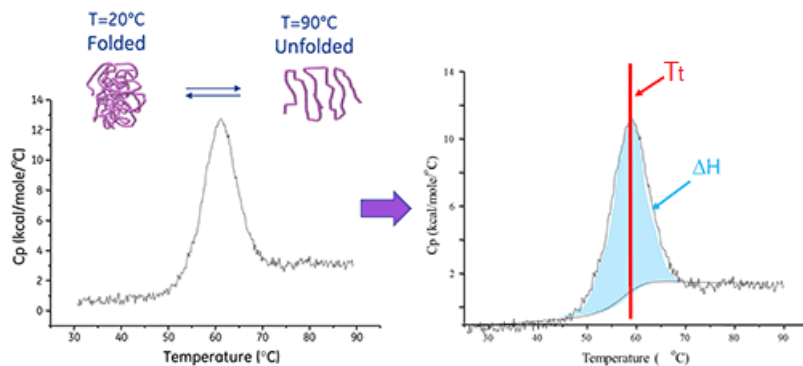


Figura 7: Interpretación de un proceso exotérmico mediante un gráfico dibujado por el instrumento.

**Aplicación a este estudio:** Para este caso particular se ha empleado un equipo Mettler Toledo 822e con refrigeración de nitrógeno líquido. Se introdujeron en cada ensayo  $20\mu L$  de la disolución dentro de una bandeja de aluminio estándar de  $40\mu L$  herméticamente sellada. El mismo volumen de disolvente se sitúa en la bandeja de referencia. Se prepararon dos soluciones en PBS, una de cada polímero, a la misma concentración,  $50\text{mg/mL}$ . La disolución del polímero  $E_{50}I_{60}$  a un pH de 7,31 y la del polímero  $K_{48}I_{60}$  que estaba a un pH de 8,57 pero se rebajó para que se aproximara al de la otra disolución, finalmente se mantuvo a un pH de 7,54.

A partir de estas soluciones, se crearon otras 5 en distintas proporciones:

$$100\% - 0\% \quad ; \quad 75\% - 25\% \quad ; \quad 50\% - 50\% \quad ; \quad 25\% - 75\% \quad ; \quad 0\% - 100\%$$

Se prepararon el día anterior y se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$  a la vez que se mezclaban hasta el momento de la toma de medidas.

Se realizó un barrido de temperaturas desde los  $4^{\circ}\text{C}$  hasta los  $40^{\circ}\text{C}$  incrementándose a un ritmo de  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

#### 2.2.4. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

La técnica DLS o también conocida por diversos nombres como *dispersión dinámica de la luz*, *espectroscopía de correlación de fotones* o *dispersión casi elástica de la luz* mide el movimiento Browniano de las partículas a través de la correlación de fotones y lo relaciona con el tamaño sub-micrónico de las mismas.

El movimiento browniano es el movimiento aleatorio de partículas debido al bombardeo de las moléculas de disolvente que las rodean. Cuanto más grande sea la partícula, más lento será el movimiento browniano. Las más pequeñas son “empujadas” más por las moléculas de solvente y se mueven más rápidamente. Necesitamos conocer la temperatura con exactitud para DLS porque se requiere conocimiento de la viscosidad, que está relacionada con ésta. La temperatura también debe ser estable, de lo contrario, las corrientes de convección en la muestra causarán movimientos no aleatorios que intervendrán en la interpretación del tamaño. La velocidad del movimiento browniano se define mediante una propiedad conocida como coeficiente de difusión de traslación,  $D$ .

El coeficiente de difusión de traslación se puede obtener mediante la función de correlación. A través el equipo se puede medir dicha función con el correlador. El correlador es un comparador de señales que mide el grado de similitud entre dos de ellas o una señal consigo misma en distintos

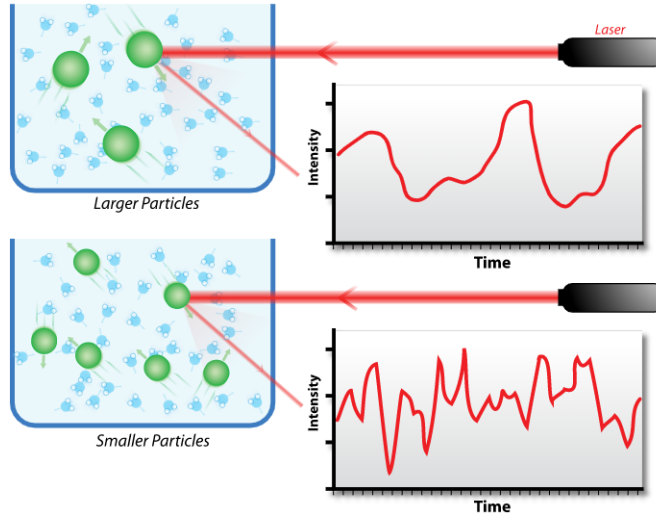


Figura 8: Demostración de cómo funciona la DLS [28].

intervalos de tiempo.

Si se compara la intensidad de una señal consigo misma a tiempo cero, se obtiene una correlación del 100 %, pero si se observa la señal en un momento posterior, la señal habrá cambiado y la correlación se reduce.

Para una señal arbitraria en algún momento su correlación será nula y no tendrá relación con la original. El tiempo que transcurre hasta que esto ocurre es característico de la velocidad de difusión y por tanto, del tamaño de las partículas. Si las partículas son grandes, la señal cambia lentamente, la correlación persistirá un largo tiempo mientras que si son pequeñas éstas se moverán rápidamente y entonces la señal variará también rápido, por lo que la correlación se reducirá antes.

En la figura 9 se pueden observar ambas situaciones a modo de ejemplo.

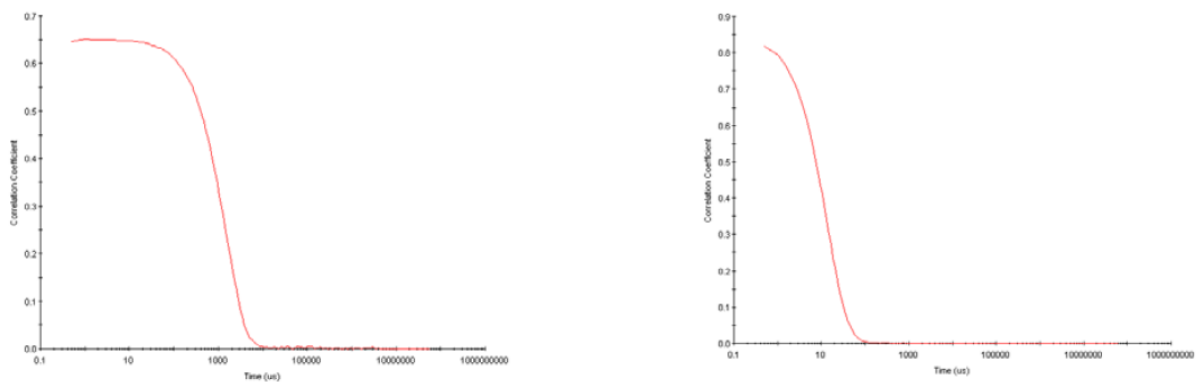


Figura 9: en la imagen de la izquierda tenemos la representación de la función correlación para partículas grandes y, a la izquierda, para partículas pequeñas.

Cuanto más pronunciada sea la curva, más monodispersa será la muestra. Por otro lado, si la curva extiende su decaimiento más, la muestra será más polidispersa.

Como se definió en apartados anteriores, el tamaño de las partículas medido a través de esta

técnica se rige en el diámetro hidrodinámico.

Si las partículas son **pequeñas** en comparación con la longitud de onda del láser utilizado ( $d \leq \lambda/10$  o alrededor de  $60nm$  para un láser He-Ne), entonces la dispersión de una partícula iluminada por un láser polarizado verticalmente será esencialmente isotrópica, es decir, iguales en todas las direcciones.

La aproximación de Rayleigh nos indica que

$$I \propto d^6$$
$$I \propto \frac{1}{\lambda^4}$$

donde  $I$  es a la intensidad de luz dispersada,  $d$  es diámetro de la partícula y  $\lambda$  la longitud de onda del láser.

El término  $d^6$  nos dice que existe el peligro de que la luz de las partículas más grandes inunde la luz dispersa de las más pequeñas. Mientras que la relación inversa con  $\lambda^4$  significa que se obtiene una mayor intensidad de dispersión a medida que disminuye la longitud de onda del láser utilizado.

Cuando el tamaño de las partículas “**grandes**” llega a ser equivalente al de la longitud de onda del láser, la difusión llega a ser una función compleja con un máximo y un mínimo respecto al ángulo de dispersión. La Teoría Mie es la única que explica correctamente el máximo y mínimo de la gráfica, se utiliza en el software Nano para convertir la distribución de intensidad en volumen.

**Cómo funciona la DLS:** En la dispersión dinámica de la luz, se mide la velocidad a la que las partículas se dispersan debido al movimiento browniano. Esto se hace determinando la velocidad de las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada cuando se detecta utilizando una disposición óptica adecuada. Estas fluctuaciones surgen de las interferencias de las ondas de la luz dispersada entre diferentes partículas.

**Aplicación a este estudio:** Se ha hecho uso de esta técnica para determinar la distribución de tamaños aparentes de las nanopartículas autoensambladas por los polímeros  $E_{50}I_{60}$  y  $K_{48}I_{60}$  en disolución en función de la proporción de ambos. Las medidas se realizaron utilizando un Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments) equipado con un láser de  $10mW$  He-Ne a una longitud de onda de  $633nm$  y una temperatura de  $37^\circ$ . Se utilizó una tecnología de retro dispersión no invasiva (NIBS) en  $173^\circ C$  para aumentar la sensibilidad de detección y reducir la dispersión múltiple y los efectos de moléculas de mayor tamaño como el polvo.

Para tomar medidas mediante esta técnica se prepararon dos disoluciones base a una concentración de  $1mg/mL$  en PBS, una de cada polímero y a partir de ellas se crearon finalmente 5 disoluciones en distintas proporciones:

$$100\% - 0\% \quad ; \quad 75\% - 25\% \quad ; \quad 50\%50\% \quad ; \quad 25\% - 75\% \quad ; \quad 0\% - 100\%$$

Se prepararon el día anterior y se incubaron a  $4^\circ C$  a la vez que se mezclaban hasta el momento de la toma de datos.

Se realizó un barrido de temperaturas desde los  $4^\circ C$  hasta los  $37^\circ C$  efectuando las medidas correspondientes a las temperaturas inicial y final.

Y finalmente, se realizó otro barrido de temperaturas desde los  $4^\circ C$  hasta los  $40^\circ C$  tomando medidas de forma continua para cada valor de  $T$ .

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. FTIR

La técnica se utiliza para identificar la estructura química de los materiales basándose en la irradiación infrarroja de la muestra para observar a qué longitudes de onda la muestra absorbe las radiaciones. Las primeras tomas de datos se realizaron con el objetivo de caracterizar los polímeros puros por separado. Se comenzó observando las similitudes que presentan los materiales en cuestión, para ello se observaron los espectros recogidos por espectroscopía infrarroja que se muestran en la figura 11.

Cada compuesto tiene un conjunto singular de bandas de absorción en su espectro infrarrojo, bandas específicas que se encuentran en los espectros infrarrojos de proteínas y polipéptidos, incluyendo la Amida I y Amida II. Estos últimos aparecen debido a los enlaces de los aminoácidos. La absorción relacionada con la Amida I conduce a las vibraciones de estiramiento del enlace  $C = O$  en la amida, mientras que la vibración asignada a la Amida II conduce principalmente a las vibraciones de flexión del enlace  $N - H$ . Como ambos enlaces están involucrados en las interacciones de hidrógeno que ocurren dentro de la estructura polipeptídica, las ubicaciones de las bandas Amida I y Amida II están relacionadas con el contenido de la estructura secundaria de las proteínas.

Encontramos picos entorno a unos números de onda cercanos a los  $1500\text{cm}^{-1}$  que podrían co-

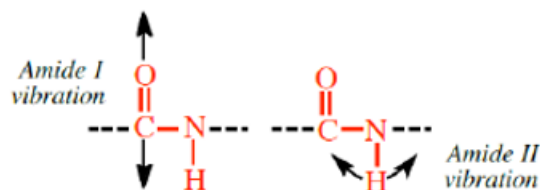


Figura 10: *Vibraciones responsables de las bandas de Amida I y Amida II en proteínas y polipéptidos. La Amida I es debido al estiramiento del carbonilo mientras que la Amida II se debe principalmente a las vibraciones de flexión del N-H.*

rrponder a los grupos funcionales de ácidos carboxílicos ( $1725 - 1700\text{cm}^{-1}$ ) o amidas ( $1690 - 1630\text{cm}^{-1}$ ). O también, los picos que se encuentran entre los valores de  $3500 - 3000\text{cm}^{-1}$  podrían corresponder a los grupos funcionales OH ( $3100 - 3200\text{cm}^{-1}$ ) con enlace de hidrógeno o incluso al enlace NH ( $3500 - 3300\text{cm}^{-1}$ ).

Como se puede observar, las diferencias apreciables entre ambos espectros son muy leves. Estos materiales muestran grandes semejanzas en cuanto a la cantidad de enlaces de los grupos funcionales que contienen. Por este motivo resultan tan interesantes para este estudio, ya que la disparidad más notable es el signo de la carga eléctrica que presentan.

#### 3.2. Turbidimetría

Por otra parte, se caracterizaron también los materiales en disolución con un espectrofotómetro, donde se muestran los resultados obtenidos en la figura 12. Se pueden observar las funciones definidas por la absorbancia de la muestra y, superpuesta, aparece la derivada que nos indica el punto de inflexión de la primera función. Este pico va a corresponder a la temperatura de transición.

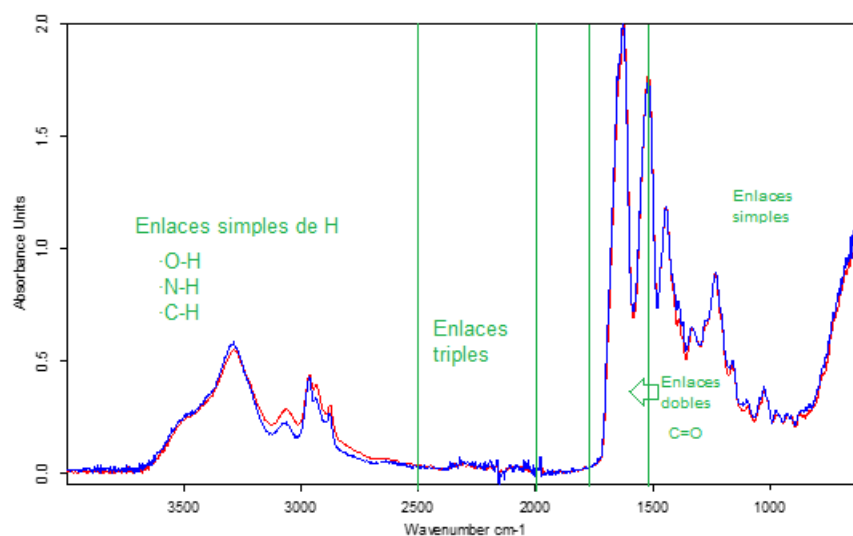


Figura 11: La figura muestra los espectros correspondientes a los polímeros puros en su estado original. La línea roja pertenece al ELR  $K_{48}I_{60}$  y la azul al  $E_{50}I_{60}$ .

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.

Se puede observar que las temperaturas de transición de ambos polímeros se encuentran entre los  $22 - 25^{\circ}C$ . Aunque el error parece bastante considerable ya que el pico dibujado por la primera derivada tiene una anchura notable.

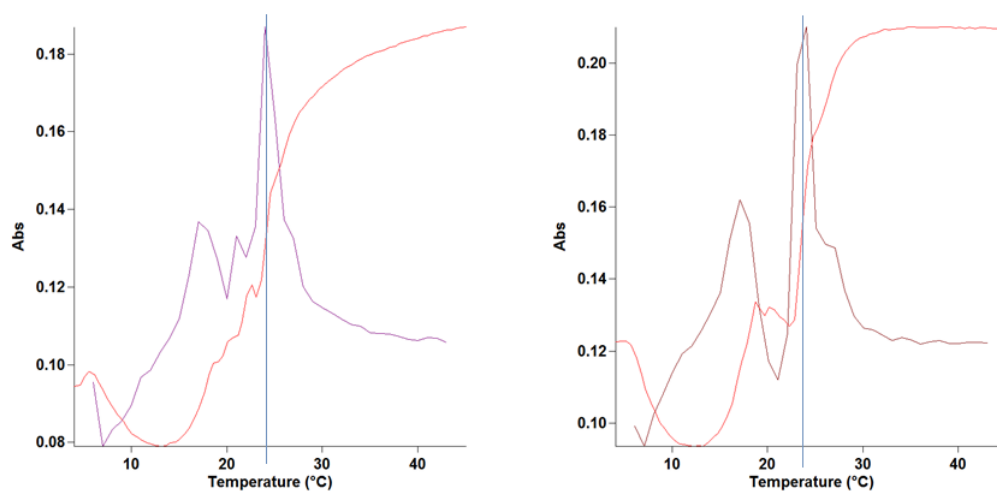


Figura 12: La figura muestra Las representaciones de la absorbancia en función de la temperatura recogidas con la técnica FTIR. La gráfica de la izquierda pertenece al ELR  $E_{50}I_{60}$  y la de la derecha al  $K_{48}I_{60}$ . La línea roja en ambas representaciones se corresponde con la función de la absorbancia, mientras que la morada y la marrón corresponden con las primeras derivadas de estas funciones.

### 3.3. DSC

Mediante esta técnica se realizó un mayor número de medidas, para distintas proporciones de carga en las disoluciones preparadas. Se disponía de 5 disoluciones diferentes, y se realizaron para cada una 3 barridos de temperatura, por lo que en total se recogieron 15 gráficas.

A continuación se muestra en la figura 13 el comportamiento térmico de estos polímeros en PBS para las diferentes disoluciones en una de las repeticiones.

El pico endotérmico característico obtenido en todas las medidas es el resultado de dos fenómenos:

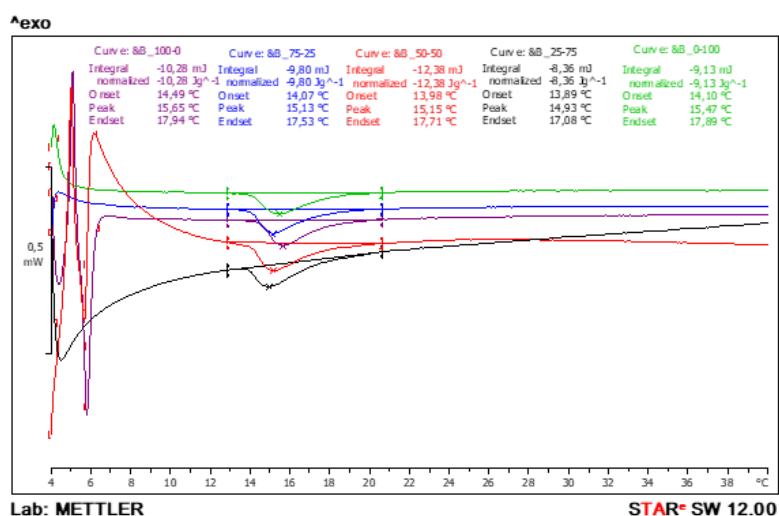


Figura 13: Representación de las 5 funciones dibujadas mediante DSC que nos indican con un saliente dónde se encuentra el proceso de transición. Cada color corresponde a una disolución, viene indicado en la leyenda.

destrucción de las estructuras ordenadas acuosas (agregados de agua) (proceso endotérmico) y, el doblamiento y autoensambado de las cadenas (proceso exotérmico).

La temperatura de transición inversa parece verse afectada por la proporción de las disoluciones, que se resume en una proporción de carga.

Este hecho puede deberse a que al mezclarse las cargas eléctricas, la fuerza iónica aumenta y las cargas se neutralizan unas con otras, favoreciendo las interacciones hidrofóbicas. El proceso de ensamblado está dominado por los bloques hidrofóbicos de los polímeros, en este caso por la presencia de isolucinas. Debido a las semejanzas en su composición, estos polímeros tienen unas  $T_t$  muy similares.

En los cuadros 2 y 3 se muestran los resultados de las medidas completas de la temperatura de transición y el incremento de entalpía durante el proceso, respectivamente.

Proporción ( $E_{50}I_{60} - K_{48}I_{60}$ )	100-0	75-25	50-50	25-75	0-100
$T_t / ^\circ C$	15,48	15,08	14,97	14,99	15,43
Desviación	0,08	0,10	0,12	0,09	0,04

Cuadro 2: Temperaturas medias ( $N=3$ ) de transición dadas en  $^\circ C$  con las desviaciones medias.

Al representar el promedio de las temperaturas de transición para cada disolución (Figura 14)

Proporción ( $E_{50}I_{60} - K_{48}I_{60}$ )	100-0	75-25	50-50	25-75	0-100
Entalpía/mJ	9,42	9,75	9,39	8,41	8,43
Desviación	0,74	0,08	0,67	0,23	0,23

Cuadro 3: Incrementos de entalpía promedios durante el proceso de transición dados en mJ.

se puede apreciar la tendencia que tienen en función de la proporción de carga.

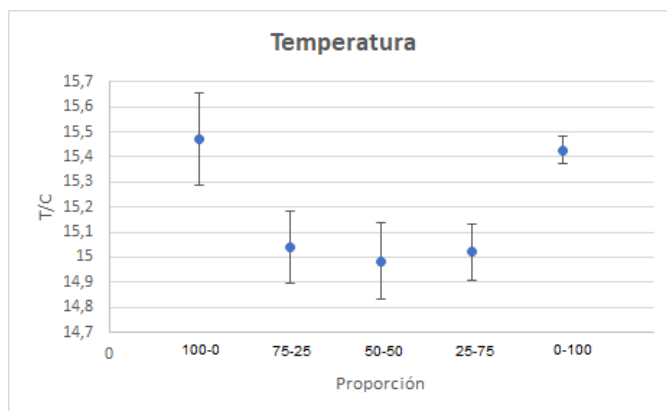


Figura 14: Representación de la  $T_t$  para cada disolución con barras de error relativo.

Para interpretar estos resultados de una forma más fiable y discutir si la media de las 5 poblaciones tienen diferencias significativas, se realizó un Análisis de Varianza o también conocido como ANOVA. Este análisis basa su funcionamiento en la comparación de la varianza entre las medias de los grupos y la varianza dentro de los grupos. De esta manera, se puede determinar si todos los grupos forman parte de una población conjunta y tienen  $T_t$  iguales o, por el contrario, pertenecen a una población diferente con las  $T_t$  distintas. Un desarrollo más completo sobre esta estadística se puede encontrar en el apartado de *información complementaria*.

Tras este estudio se han podido observar los resultados que se muestran en la figura 15. Habiendo realizado por tanto el ANOVA de 3 vemos que no hay diferencias significativas entre los grupos 25/75-50/50-05/75. Todas las demás combinaciones sí.

Como se puede apreciar, encontramos diferencias significativas entre las disoluciones de polímero puro y las mezclas, independientemente de la proporción. Por el contrario, se puede observar también que no se han encontrado diferencias entre los grupos de mezclas ni entre las dos disoluciones con los polímeros puros. Con esto sacamos que los valores obtenidos entre los puros y las mezclas sí hay diferencias significativas y combinaciones de las mezclas con los puros también. Entonces Parece indicar que los datos parecen significativos por lo tanto se pueden interpretar. Aunque las tres proporciones no son significativas se puede seguir estudiándolo puesto que entre las demás combinaciones sí. Lo que nos indica que hay una influencia considerable en el papel que juega las cargas de ambos polímeros. Las cargas lo que hacen es disminuir la temperatura de transición que, como se dijo anteriormente, es debido a la contrarresta de las fuerzas iónicas e hidrófobas, mientras que los polímeros entre si, al ser muy similares no presentan diferencias en esta propiedad, como se predijo mediante la técnica de turbidimetría.

Los resultados que obtuvimos mediante el DSC y turbidimetría vemos que difieren en cuanto al valor de  $T_t$ . Esto se debe a que la transición de fase consiste en un proceso cooperativo dependiente



	100-0	75-25	50-50	25-75	0-100
100-0					
75-25	-				
50-50	-	-			
25-75	-	-	-		
0-100	-	-	-	-	

Figura 15: En esta figura se muestran las correlaciones que existen entre los distintos grupos tras haber tratado los datos de la temperatura de transición mediante un Análisis de Varianza entre los distintos grupos, dos a dos. Cuando se hizo ANOVA con todas las poblaciones (5) salió un valor de 0.0063. Eso quiere decir que sí hay diferencias significativas entre uno de ellos. Eliminamos la hipótesis nula de que esos valores que nos han dado no tienen diferencias significativas sino que hay uno de ellos en el que algo se sale de los rangos y sí hay diferencias entre un grupo que no se sabe y los demás (mínimo, pueden ser uno dos o mas pero eso no se puede saber simplemente con ANOVA). Por ello después de esto se debe de ver cual es diferente a todos que para ello ANOVA de  $N=3$  pero probando todas las combinaciones de los grupos y, finalmente, dos a dos. En rojo se han caracterizado aquellos grupos que no presentan diferencias significativas y por lo tanto, pertenecen a la misma población. Mientras que, de color verde se han caracterizado aquellos grupos que si que han presentado discrepancias significativas y por lo tanto se consideran pertenecientes a la distintas poblaciones.

de la concentración del ELR, de este modo al aumentar la concentración se disminuye la  $T_t$ .

### 3.4. DLS

En esta sección se van a discutir los resultados obtenidos mediante las medidas realizadas con la técnica de dispersión dinámica de la luz.

En primer lugar, a través del DLS se ha podido determinar también la temperatura de transición mediante un barrido de temperaturas.

En la figura 16 se observan las funciones correspondientes a cada muestra de la intensidad en función de la temperatura. Para obtener la  $T_t$  se ha tomado la primera derivada, del mismo modo que se hizo en turbidimetría. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 4.

Proporción ( $E_{50}I_{60} - K_{48}I_{60}$ )	100-0	75-25	50-50	25-75	0-100
$T_t/^\circ C$	19,335	19,305	18,210	19,145	21,100

Cuadro 4: Temperaturas de transición aproximadas para cada muestra a una concentración de 1mg/mL en PBS, dadas en  $^\circ C$

Proporción ( $E_{50}I_{60} - K_{48}I_{60}$ )	100-0	75-25	50-50	25-75	0-100
$T_t$ (DSC)	15,48	15,08	14,97	14,99	15,43
$T_t$ (DLS)	19,335	19,305	18,210	19,145	21,100

Cuadro 5: Temperaturas de transición dadas en  $^\circ C$  obtenidas mediante dos técnicas distintas, DSC y DLS.

En el cuadro 5 se indican los resultados obtenidos de las temperaturas de transición mediante ambas técnicas. Lo primero que llama la atención es que haya un salto de varios grados centígrados

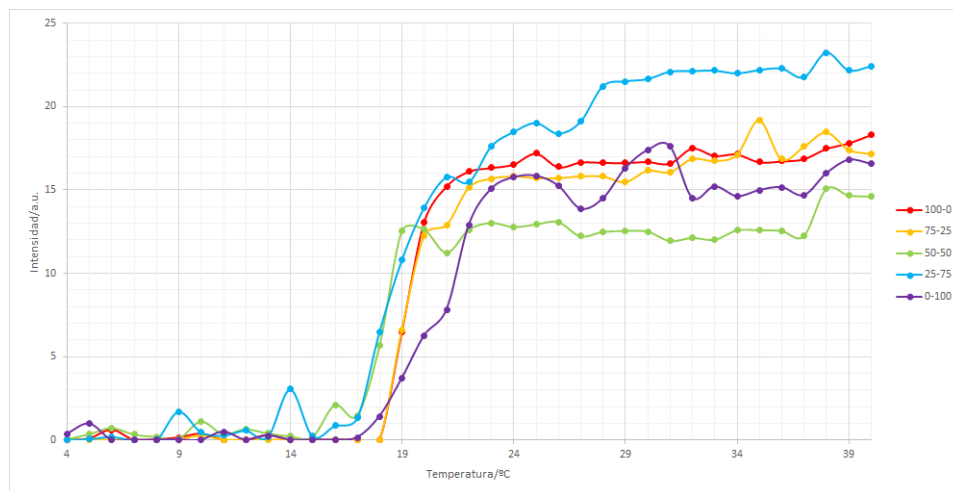


Figura 16: Representación de la intensidad en función de la temperatura para cada muestra.

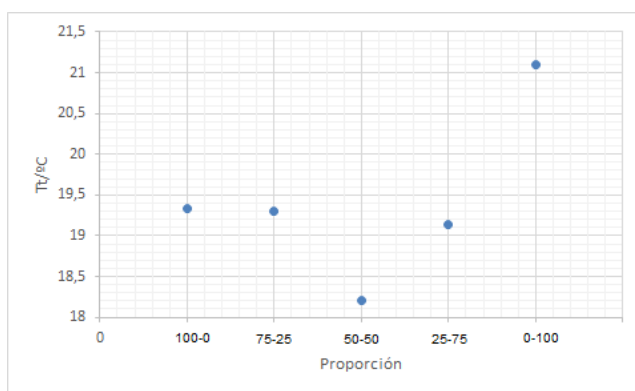


Figura 17: Representación de la temperatura de transición en función de la proporción de carga.

entre el lote de temperaturas del DSC y el del DLS, esto se explica con la diferencia de concentración. Como ya se comentó anteriormente, 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  $T_t$ .

Sin embargo, se puede observar que la tendencia que adquieren las temperaturas de transición en cada lote es muy similar, quedando las  $T_t$  de el polímero puro disuelto más altas que las  $T_t$  obtenidas con la mezcla de cargas.

En la figura 20 del anexo I se observan las gráficas de las correlaciones que presentan las partículas en todas las disoluciones. Si las partículas son grandes, la señal cambiará lentamente y la correlación se mantendrá por mucho tiempo. Sin embargo, si las partículas son pequeñas y se mueven rápidamente entonces la correlación desaparecerá más rápidamente. Como se puede ver en la figura, las partículas que se han obtenido en cada ocasión son consideradas *grandes* ya que la correlación permanece un tiempo y, además, se aprecia una baja polidispersidad en el decaimiento pronunciado.

El DLS también es capaz de proporcionar de forma numérica la polidispersidad de la muestra. En las medidas que se han realizado para las distintas proporciones de carga se puede visualizar en base a estos datos el proceso de autoensamblado, ya que a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  existe una

polispersidad muy alta mientras que a  $37^{\circ}\text{C}$  baja drásticamente. Esto significa que en el medio existen partículas con un tamaño muy próximo, de forma que no hay una alta desviación en los valores del mismo para cada estructura individual, lo que indica un claro indicio de un conjunto de partículas semejantes con las mismas características. En el cuadro 9 del anexo II se muestran los resultados obtenidos.

En base a la función correlación, se obtiene el tamaño aparente de las partículas. En la figura 21 del Anexo I se muestran las representaciones de la intensidad en función del diámetro hidrodinámico, donde se ve un pico pronunciado generalmente en todas las muestras. Esto significa que tenemos la totalidad de las partículas entorno a un tamaño muy concreto, este tamaño se ve reflejado en el cuadro 6 donde se presentan los diámetros hidrodinámicos promedios en cada muestra recogidos por el equipo utilizado.

En la figura 18 se muestra la representación gráfica de los tamaños medios de cada muestra.

Proporción ( $E_{50}I_{60} - K_{48}I_{60}$ )	100-0	75-25	50-50	25-75	0-100
$d_H/nm$	48,46	53,47	57,29	57,15	49,58
Desviación	1,23	0,67	0,97	1,48	0,23

Cuadro 6: *Diámetro hidrodinámico promedio medido mediante DLS a  $37^{\circ}\text{C}$  dado en nanómetros (nm).*

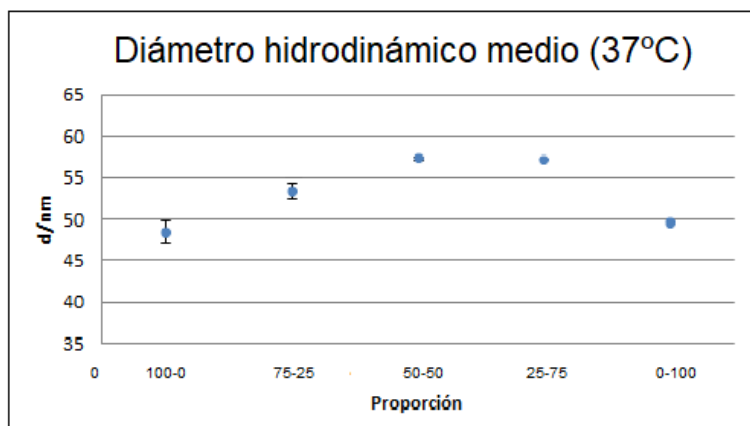


Figura 18: *Representación gráfica del diámetro hidrodinámico en función de la proporción de carga.*

Mediante todos estos datos se puede apreciar una diferencia notable en los tamaños de las partículas en función de la proporción de carga. Para ver si estas diferencias son significativas o en realidad son el mismo valor se ha comprobado mediante un análisis de varianza que ha sido desarrollado en el apartado de información complementaria, de este análisis se han obtenido los resultados mostrados en la figura 19. Los resultados muestran diferencias significativas entre prácticamente todas las muestras, exceptuando las dos de los polímeros puros que, como se ha visto anteriormente estos polímeros han mostrado grandes similitudes y, como era de esperar, también las presentan en el tamaño de las nanopartículas que forman al autoensamblarse.

También se ha podido comprobar que los grupos de las proporciones 50 – 50 y 25 – 75 pertenecen a la misma población, por lo que presentan un tamaño prácticamente igual. Esto nos hace esperar un máximo en el tamaño de las nanopartículas autoensambladas en una proporción intermedia entre ambos grupos.

	100-0	75-25	50-50	25-75	0-100
100-0					
75-25	-				
50-50	-	-			
25-75	-	-	-		
0-100	-	-	-	-	

Figura 19: En esta figura se muestran las correlaciones que existen entre los distintos grupos tras haber tratado los datos del diámetro hidrodinámico mediante un Análisis de Varianza entre los distintos grupos, dos a dos, del mismo modo que con los resultados del DSC. En verde se han caracterizado aquellos grupos que no presentan diferencias significativas y por lo tanto, pertenecen a distintas poblaciones. Mientras que, de color rojo se han caracterizado aquellos grupos que si que han presentado correlaciones y por lo tanto se consideran pertenecientes a la misma población.

Con esta técnica también se puede ver la influencia de las cargas eléctricas en el proceso de autoensamblado. Las lisinas tienen un mayor número de cargas en su secuencia que el ácido glutámico, y esa es la razón por la que vemos un máximo en el tamaño de las nanopartículas en un punto cuadrado de la proporción mitad y mitad, cuando la proporción en cantidad de ácido glutámico es ligeramente menor que la de las lisinas. De esta forma las cargas se anulan unas con otras quedando así libres una cantidad notable de cargas positivas que favorecen las fuerzas iónicas y contrarrestan las hidrófobas, forzando la formación de unas partículas de un tamaño aparente mayor.

## 4. Conclusiones

Los ELRs se han ido poniendo en el punto de mira de los científicos por sus grandes características para imitar sistemas naturales. Una de sus propiedades más destacables es la termosensibilidad, ya que son capaces de cambiar de fase a cierta temperatura y originar un nuevo estado en el que se presencien nanoestructuras micelares a una temperatura fisiológica. Cualquier parámetro adicional que pueda modificar las propiedades o características de este tipo de materiales puede llegar a ser un aliciente muy potente para futuras aplicaciones.

Como se ha visto en todo este trabajo, los dos polímeros ELRs estudiados han presentado grandes semejanzas en su composición química exceptuando el signo de la carga de las que están dopadas las secuencias pentapeptídicas. Esta característica les ha proporcionado unas propiedades muy similares y, en su defecto, las nanoestructuras originadas tras el proceso de autoensamblado también presentaron características semejantes.

Gracias a la técnica de DLS se ha podido caracterizar la formación de nanoestructuras supra-moleculares basadas en dibloques anfifílicos del tipo elastina. La composición de la secuencia de los bloques hidrofóbicos es un parámetro que condiciona fuertemente la estabilización de sistemas micelares y, como se ha podido comprobar, la presencia de cargas en los bloques también son una gran influencia en la creación de estas estructuras ya que se han visto afectadas principalmente en su tamaño que, a medida que se mezclan las cargas eléctricas, va aumentando.

Gracias también a las técnicas de DLS y DSC se ha podido caracterizar la temperatura de transición inversa a la que inician estos materiales el proceso de autoensamblado. Concluyendo que la presen-

cia de cargas eléctricas interactuando entre sí también favoreciendo al cambio de este parámetro. A medida que encontrábamos cargas interactuando y por tanto, un aumento en la fuerza iónica, la  $T_t$  disminuía, notando un salto entre las  $T_t$  de los polímeros mezclados y los polímeros puros.

Se ha demostrado que los ELRs anfífilos  $E_{50}I_{60}$  y  $K_{48}I_{60}$  se organizan en estructuras estables en condiciones fisiológicas, y además, si se combinan en una disolución, forman nanoestructuras con características distintas que pueden favorecer a las múltiples aplicaciones que ofrecen, como por ejemplo, la encapsulación de fármacos, dando la posibilidad de crear nanopartículas de un tamaño mayor donde pueda insertarse una mayor cantidad de fármaco sin perder todas las características y propiedades que ofrecen los ELRs. A su vez, también podría aprovecharse para futuras aplicaciones el cambio en la  $T_t$  de forma que pueda llegar a obtenerse un material con una  $T_t$  concreta también sin perder las propiedades que ofrecen este tipo de materiales. Todo esto es debido a que los polímeros elegidos interactúan físicamente cuando están mezclados gracias a la presencia de cargas de signo opuesto.

## 5. Anexo I

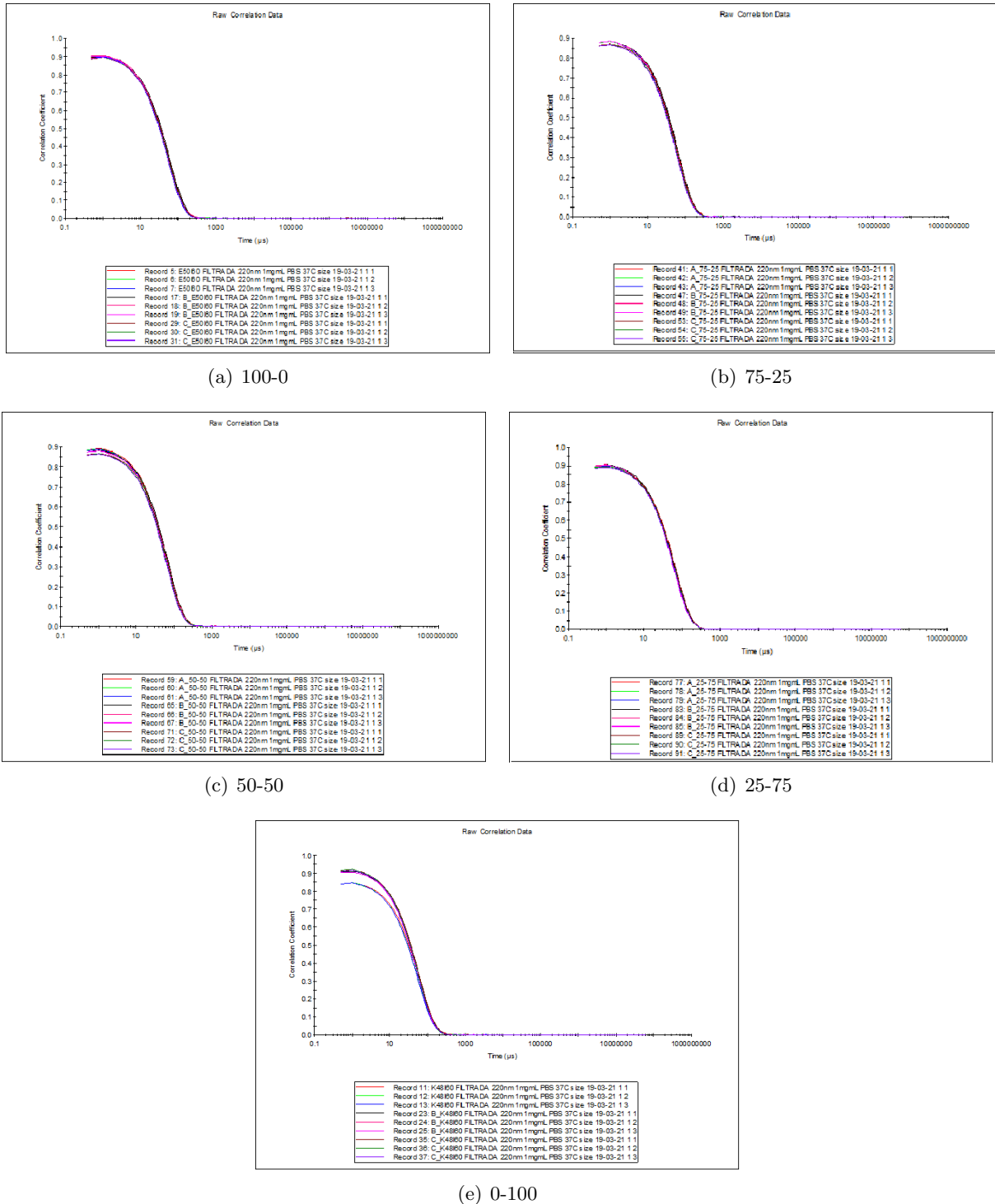
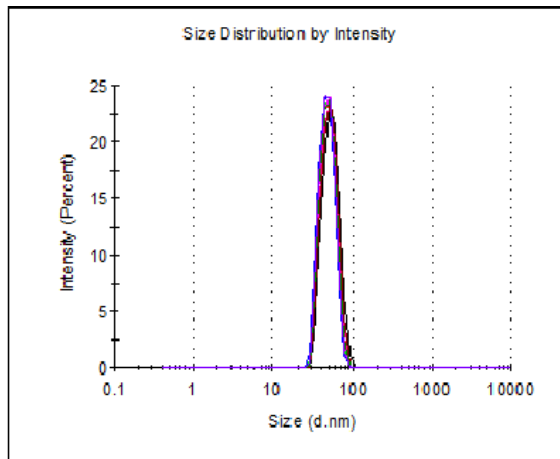
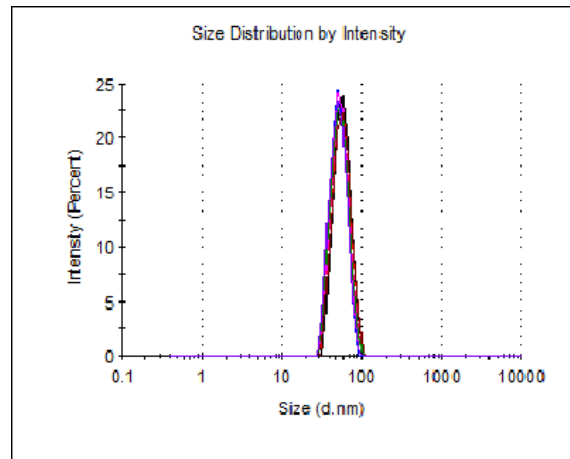


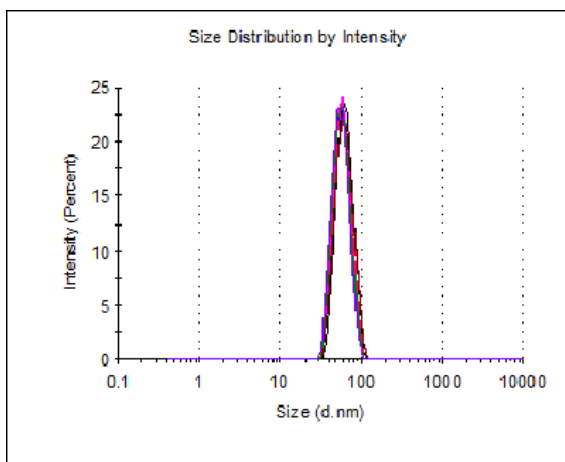
Figura 20: Correlaciones para cada disolución. Se presentan las gráficas de las 3 muestras en conjunto.



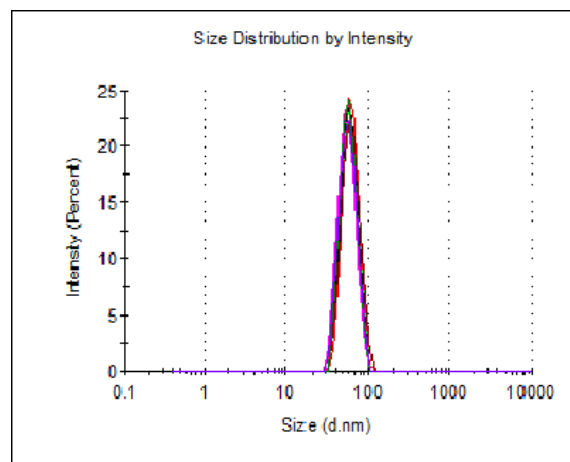
(a) 100-0



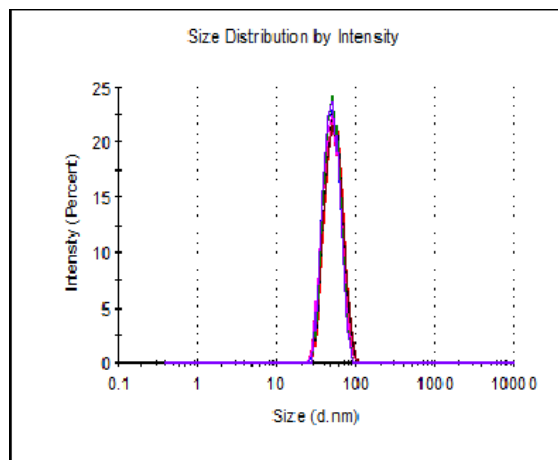
(b) 75-25



(c) 50-50



(d) 25-75



(e) 0-100

Figura 21: Representación del tamaño de las partículas en función de la intensidad para cada disolución. Se presentan las gráficas de las 3 muestras en conjunto.

## 6. Anexo II

Proporción ( $E_{50}I_{60} - K_{48}I_{60}$ )	100-0	75-25	50-50	25-75	0-100
Repetición					
1	15,4	15,13	14,92	15,00	15,46
2	15,56	15,15	15,10	14,90	15,44
3	15,48	14,96	14,88	15,08	15,39
<b>Media</b>	<b>15,48</b>	<b>15,08</b>	<b>14,97</b>	<b>14,99</b>	<b>15,43</b>
Desviación	0,08	0,10	0,12	0,09	0,04

Cuadro 7: Temperaturas de transición de cada muestra medidas con DSC y dadas en °C

Proporción ( $E_{50}I_{60} - K_{48}I_{60}$ )	100-0	75-25	50-50	25-75	0-100
Repetición					
1	10,02	9,68	8,85	8,6	8,13
2	9,66	9,84	10,14	8,47	8,56
3	8,59	9,73	9,18	8,16	8,62
<b>Media</b>	<b>9,42</b>	<b>9,75</b>	<b>9,39</b>	<b>8,41</b>	<b>8,43</b>
Desviación	0,74	0,08	0,67	0,23	0,23

Cuadro 8: Incrementos de entalpía durante el proceso de transición para cada muestra medidos mediante DSC y dados en mJ.

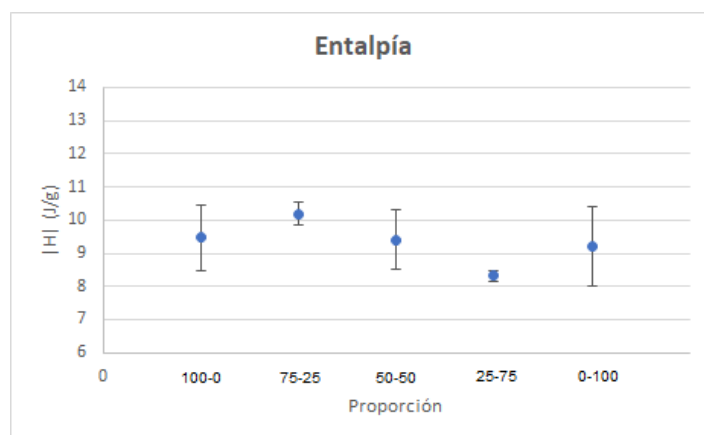


Figura 22: Relación de las entalpías medias de cada muestra en función de la proporción de cargas.



Muestra	Proporción ( $E_{50}I_{60} - K_{48}I_{60}$ )		100-0	75-25	50-50	25-75	0-100
	Temperatura						
A	4°C		0,378	0,503	0,505	0,469	0,411
	37°C		0,007	0,019	0,028	0,013	0,027
B	4°C		0,451	0,518	0,388	0,340	0,391
	37°C		0,018	0,010	0,007	0,024	0,030
C	4°C		0,471	0,539	0,385	0,562	0,415
	37°C		0,006	0,019	0,020	0,021	0,027
Media	4°C		0,433	0,520	0,426	0,457	0,406
	37°C		0,010	0,016	0,019	0,010	0,028

Cuadro 9: *Polidispersidad de cada muestra a 4°C y 37°C. El texto en rojo significa una polidispersidad alta mientras que el verde indica una muestra prácticamente monodispersa.*

Muestra	Proporción ( $E_{50}I_{60} - K_{48}I_{60}$ )				
	100-0	75-25	50-50	25-75	0-100
A	46,98	53,10	56,90	58,45	49,70
B	49,52	54,24	58,39	55,54	49,32
C	48,87	53,07	56,58	57,46	49,73
Media	<b>48,46</b>	<b>53,47</b>	<b>57,29</b>	<b>57,15</b>	<b>49,58</b>
Desviación	1,23	0,67	0,97	1,48	0,23

Cuadro 10: *Diámetros hidrodinámicos medidos mediante DLS a 37°C para cada muestra y dados en nanómetros (nm).*

## 7. Anexo III

### 7.1. Información complementaria. Estadística ANOVA de un factor

El Análisis de Varianza o Analysis of Variance (ANOVA) es una técnica de análisis multivariante de dependencia que se utilizan para analizar datos procedentes de diseños con una o más variables independientes (VI) cualitativas (medidas en escalas nominales u ordinales), conocidas también como factores, y una variable dependiente (VD) cuantitativa (medida con una escala de intervalo o de razón), también conocida como respuesta. Los distintos estados posibles de las VI se conocen como niveles o tratamientos.

Hay diferentes modelos de ANOVA, todos ellos permiten comparar los valores medios que toma la VD en las distintas poblaciones con la finalidad de averiguar si existen o no diferencias significativas entre ellos.

Según el número de factores, se pueden distinguir distintos tipos de ANOVA. El ANOVA de un factor, también llamada ANOVA unifactorial, señala si las dos variables, VI y VD, están relacionadas entre sí, es decir, comprueba si las variaciones de las medias de VD tienen un efecto medible en las diferentes categorías de la VI, determinando así si dos o más grupos son similares o distintos.

Normalmente la ANOVA se emplea cuando la VD está distribuida de manera normal en cada grupo y las varianzas de la VI en cada uno de ellos son similares (fenómeno que se conoce como homocedasticidad). Además, es necesario que los grupos sean independientes los unos de los otros.

La ANOVA de un factor solo puede aplicarse cuando se investiga un solo factor y una sola VD. Cuando se comparan las medias de tres o más grupos, puede indicar si al menos dos de esas poblaciones tienen medias diferentes, pero no puede indicar cuáles.

Se va a partir de una hipótesis nula  $H_0$  la cual indica que tres o más medias poblacionales son iguales frente a la hipótesis alternativa,  $H_a$ , de que al menos una de las medias es diferente. Mediante la ANOVA se va a probar si esta hipótesis es cierta o no ya que permite comparar múltiples medias a través del estudio de las varianzas..

Disponiendo de  $k$  medias, se puede escribir:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$$

$H_a : \text{no todas las medias son iguales.}$

donde  $\mu_i$  es la media del  $i$ -ésimo nivel del factor.

El funcionamiento básico de un ANOVA consiste en calcular la media de cada uno de los grupos para a continuación comparar la varianza de estas medias (intervarianza) frente a la varianza promedio dentro de los grupos (intravarianza).

Bajo la hipótesis nula de que las medias de los grupos pertenecen todas a la misma población, es decir, que tienen todas la misma varianza y son la misma media, se va a obtener que la varianza ponderada entre grupos será la misma que la varianza promedio dentro de los grupos. Conforme las medias de las categorías estén más alejadas las unas de las otras, la varianza entre medias se incrementará y dejará de ser igual a la varianza promedio dentro de los grupos.

Usualmente, los resultados del ANOVA se reflejan en una tabla característica llamada “tabla ANOVA”. La figura 23 muestra un ejemplo en la aplicación a este estudio.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,691173333	4	0,172793333	10,02281516	<b>0,001586056</b>	3,478049691
Dentro de los grupos	0,1724	10	0,01724			
Total	0,863573333	14				

Figura 23: Ejemplo real que muestra los datos que contiene una tabla ANOVA.

La estrategia para poner a prueba la hipótesis nula consiste en obtener el valor F que refleja el grado de semejanza existente entre las medias que se están comparando. Cuanto más alto sea F, más están relacionadas las variables, lo que significa que las medias de la VD difieren o varían mucho entre los grupos de la VI.

Para obtener este valor es necesario tener en cuenta algunas definiciones.

Se va a considerar  $Y$  la variable dependiente;  $J$  el número de grupos considerados, cada uno correspondiente a un factor distinto;  $n_1, n_2, \dots, n_J$  serán los tamaños de cada muestra y  $n = \sum_{j=1}^J n_j$  el tamaño muestral total; y por último,  $Y_{ij}$  que es el valor de VD correspondiente al grupo  $j$  ( $j = 1, 2, \dots, J$  y  $i = 1, 2, \dots, n_j$ ).

Para contrastar la hipótesis nula introducimos los conceptos de media cuadrática intergrupos

( $CM_E$ ) y de media cuadrática intra-grupos ( $CM_D$ ), que vienen dados por las expresiones:

$$CM_E = \frac{\sum_{j=1}^J n_j (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2}{J - 1} \quad (7)$$

$$CM_D = \frac{\sum_{j=1}^J \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2}{n - J} \quad (8)$$

Donde fácil identificar la suma de cuadrados entre grupos ( $SC_E$ ) y la suma de cuadrados dentro de grupos ( $SC_D$ ) en el primer y segundo numerador, respectivamente. Al igual que también se pueden identificar en los denominadores los grados de libertad asociadas a dichas sumas.

El estadístico prueba que utiliza ANOVA para contrastar la hipótesis nula planteada se construye a partir de los conceptos anteriores y viene dado por la expresión:

$$F_{J-1, n-J} = \frac{CM_E}{CM_D} = \frac{\frac{\sum_{j=1}^J n_j (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2}{J-1}}{\frac{\sum_{j=1}^J \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2}{n-J}} \quad (9)$$

Suponiendo cierta  $H_0$ , este estadístico sigue una distribución  $F$  de Snedecor con  $J - 1$  y  $n - J$  grados de libertad, por lo que dado un nivel de significación  $\alpha$ , la región crítica para el cumplimiento de dicha hipótesis vendrá determinada por los valores tales que  $F > F_{J-1, n-J}^{1-\alpha}$ , siendo  $P[F \leq F_{J-1, n-J}^{1-\alpha}] = 1 - \alpha$ .

Estos cálculos se pueden realizar con programas especializados para este tipo de análisis. Además, la tabla ANOVA que proporcionan algunos programas como el Excel que es el que se ha utilizado en este trabajo, viene incluido el p-valor asociado al estadístico prueba, lo que facilita la toma de decisión en relación a la aceptación o rechazo de la hipótesis nula. Si se trabaja con un nivel de significación del 5 %, como se ha hecho en este caso, aceptaremos como valores que rechacen la hipótesis nula aquellos que tengan un p-valor mayor que 0,05, mientras que cumplirán  $H_0$  aquellos que su p-valor sea mayor que dicho valor. En la figura 23 se puede observar que el p-valor obtenido es tal que  $0,001586056 < 0,05$  y por tanto, los grupos seleccionados cumplen  $H_a$  asegurando que al menos dos de ellos presentan diferencias significativas en sus valores medios [21], [22], [23], [24].

## 8. Agradecimientos

Para poder llevar a cabo este trabajo ha sido fundamental la ayuda de los miembros del grupo BIOFORGE. En especial quisiera dar las gracias a José Carlos Rodríguez Cabello por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto con ellos y a Julio Fernández Fernández, por enseñarme el funcionamiento del trabajo dentro del laboratorio y su infinita paciencia e implicación con este trabajo, sobre todo en la práctica, pero también por sus consejos y recomendaciones que, sin duda, me han alzado a terminar este proyecto habiendo aprendido grandes cosas del mundo de la investigación.

## Referencias

- [1] Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. *Nat. Nanotechnol.* 2007, 2, 751
- [2] Cheng, W; Gu.L; Ren, W; Liu, Y. *Sci. Eng., C.* 2014, 45, 600
- [3] Kanasty, R.; Dorkin, J.R.; Vegas, A.; Anderson, D. *Nat. Mater.*, 2013, 12, 967.
- [4] Chilkoti, A., Dreher, M. R., & Meyer, D. E. (2002b). Design of thermally responsive, recombinant polypeptide carriers for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(8), 1093–1111. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00060-1](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00060-1), 1-3.
- [5] Narvekar, M., Xue, H. Y., Eoh, J. Y., & Wong, H. L. (2014). Nanocarrier for Poorly Water-Soluble Anticancer Drugs—Barriers of Translation and Solutions. *AAPS PharmSciTech*, 15(4), 822–833. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0107-x>
- [6] Urrejola, M. C., Soto, L. V., Zumarán, C. C., Peñaloza, J. P., Álvarez, B., Fuentesvilla, I., & Haidar, Z. S. (2018). Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *International Journal of Morphology*, 36(4), 1463–1471. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022018000401463>, 1464
- [7] Girotti, A., Fernández-Colino, A., López, I. M., Rodríguez-Cabello, J. C., & Arias, F. J. (2011). Elastin-like recombinamers: Biosynthetic strategies and biotechnological applications. *Biotechnology Journal*, 6(10), 1174–1186. <https://doi.org/10.1002/biot.201100116>
- [8] Rodríguez-Cabello, J. C., Martín, L., Girotti, A., García-Arévalo, C., Arias, F. J., & Alonso, M. (2011). Emerging applications of multifunctional elastin-like recombinamers. *Nanomedicine*, 6(1), 111–122. <https://doi.org/10.2217/nmm.10.141>
- [9] Fernández-Colino, A., Girotti, A., López, M., Arias, F., & Rodríguez-Cabello, J. (2011). Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas. *Biomecánica*, 19(1). <https://doi.org/10.5821/sibb.v19i1.1811>
- [10] Misbah, M. H., Espanol, M., Quintanilla, L., Ginebra, M. P., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2016). Formation of calcium phosphate nanostructures under the influence of self-assembling hybrid elastin-like-statherin recombinamers. *RSC Advances*, 6(37), 31225–31234. <https://doi.org/10.1039/c6ra01100d>
- [11] Quintanilla-Sierra, L., García-Arévalo, C., & Rodríguez-Cabello, J. (2019). Self-assembly in elastin-like recombinamers: a mechanism to mimic natural complexity. *Materials Today Bio*, 2, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2019.100007>
- [12] LaRue, I., Adam, M., Zhulina, E. B., Rubinstein, M., Pitsikalis, M., Hadjichristidis, N., Ivanov, D. A., Gearba, R. I., Anokhin, D. V., & Sheiko, S. S. (2008). Effect of the Soluble Block Size on Spherical Diblock Copolymer Micelles. *Macromolecules*, 41(17), 6555–6563. <https://doi.org/10.1021/ma800403r>
- [13] Hassouneh, W., Zhulina, E. B., Chilkoti, A., & Rubinstein, M. (2015). Elastin-like Polypeptide Diblock Copolymers Self-Assemble into Weak Micelles. *Macromolecules*, 48(12), 4183–4195. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b00431>

- [14] Zhulina, E. B., Adam, M., LaRue, I., Sheiko, S. S., & Rubinstein, M. (2005). Di-block Copolymer Micelles in a Dilute Solution. *Macromolecules*, *38*(12), 5330–5351. <https://doi.org/10.1021/ma048102n>
- [15] Schurr, J. (1978). Theory of dynamic light scattering by polymers and gels. *Chemical Physics*, *30*(2), 243–247. [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(78\)85122-2](https://doi.org/10.1016/0301-0104(78)85122-2)
- [16] Misbah, M. H., Espanol, M., Quintanilla, L., Ginebra, M. P., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2016b). Formation of calcium phosphate nanostructures under the influence of self-assembling hybrid elastin-like-statherin recombinamers. *RSC Advances*, *6*(37), 31225–31234. <https://doi.org/10.1039/c6ra01100d>
- [17] Clavaguera-Mora, M., Suriñach, S., Baró, M., Otero, A., & Clavaguera, N. (1992). Determination of T-T-T and T-HR-T curves from non-isothermal crystallization kinetic experiments. *Thermochimica Acta*, *203*, 379–389. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(92\)85212-e](https://doi.org/10.1016/0040-6031(92)85212-e)
- [18] *Calorimetría de barrido diferencial (DSC) para el estudio de la estabilidad de proteínas.* (2011). Malvern Panalytical. <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/microcalorimetry/differential-scanning-calorimetry>
- [19] McGaw, B. (1994). Basic concepts of analytical chemistry S. M. Khopkar, Wiley Eastern, New Delhi, 1984 (third reprint 1992). Pages xvi + 368. ISBN 0–85226-461-5. *Talanta*, *41*(9), 1611. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(94\)80101-0](https://doi.org/10.1016/0039-9140(94)80101-0)
- [20] Espectroscopía infrarroja. (2019). Wikipedia. [https://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscop%C3%ADa\\_infrarroja](https://es.wikipedia.org/wiki/Espectroscop%C3%ADa_infrarroja)
- [21] Universidad Pablo de Olavide, Ordaz Sanz, J. A., Melgar Hiraldo, M. C., & Rubio Castaño, C. M. (2017). *MÉTODOS ESTADÍSTICOS Y ECONÓMICOS EN LA EMPRESA Y PARA FINANZAS.* [https://www.upo.es/export/portal/com/bin/portal/upo/profesores/jaordsan/profesor/1311101268463\\_mxtodos\\_estadisticos\\_y\\_economicos\\_en\\_la\\_empresa\\_y\\_para\\_finanzas.pdf](https://www.upo.es/export/portal/com/bin/portal/upo/profesores/jaordsan/profesor/1311101268463_mxtodos_estadisticos_y_economicos_en_la_empresa_y_para_finanzas.pdf)
- [22] Cardenas, J. (2018, 17 mayo). *Qué es ANOVA de un factor y cómo analizarla fácilmente.* Networkianos. Blog de Sociología. <http://networkianos.com/anova-de-un-factor-que-es-como-analizar/>
- [23] *ANOVA de un factor.* (2021). Introducción a la estadística — JMP. <https://www.jmp.com/es/es/statistics-knowledge-portal/one-way-anova.html>
- [24] Academia Edu. (2018). *Análisis de Varianza de un factor: El procedimiento ANOVA de un factor.*
- [25] EPMA J.2010Mar;1(1):164–209.
- [26] Angew.Chem.Int.Ed.2010,49,6288–6308.
- [27] Mettler-Toledo International Inc. all rights reserved. (2021, 7 julio). *FTIR Spectroscopy.* [https://www.mt.com/es/es/home/products/L1\\_AutochemProducts/ReactIR/ftir-spectroscopy.html](https://www.mt.com/es/es/home/products/L1_AutochemProducts/ReactIR/ftir-spectroscopy.html)
- [28] Wikipedia contributors. (2021, 14 julio). *Dynamic light scattering.* Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic\\_light\\_scattering#/media/File:DLS.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic_light_scattering#/media/File:DLS.svg)