



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Evaluación de distintos protocolos de purificación del polímero
(E₅₀I₆₀)₂RGD para su utilización como dosificador de fármacos**

Autora:

D^o. Laura Cordero Beitia

Tutores:

Dr. Israel González de Torre

Dr. Luis Debán Miguel

(Departamento de Química Analítica)

ÍNDICE

1. LISTADO DE ABREVIATURAS.....	3
2. RESUMEN DEL TRABAJO EN ESPAÑOL Y EN INGLÉS	4
3. INTRODUCCIÓN	6
3.1. Elastina	6
3.2. Polímeros tipo elastina.....	7
3.3. La naturaleza termosensible y el comportamiento autoensamblable de los ELR.....	8
3.4. Métodos de análisis	10
3.4.1. Análisis térmico	10
3.4.1.a. Análisis termogravimétrico (TGA)	10
3.4.1.b. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	11
3.4.2. Turbidimetría.....	12
3.4.3. Zetasizer: Dispersión de luz dinámica (DLS) y Dispersión de luz electroforética (ELS)	13
3.4.3.a. Dispersión de luz dinámica (DLS).....	13
3.4.3.b. Dispersión de luz electroforética (ELS)	13
3.5. Polímero de estudio.....	14
4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1. Materiales	16
5.2. Instrumentos de medida	17
5.3. Compuestos	19
5.4. Software	19
5.5. Métodos	19
5.5.1. Preparación de los polímeros.....	19
5.5.2. Análisis termogravimétrico (TGA).....	20

5.5.3. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	21
5.5.4. Turbidimetría	22
5.5.5. Zetasizer: Dispersión de luz dinámica (DLS) y Dispersión de luz electroforética (ELS)	23
5.5.5.a. Medida del tamaño de partícula mediante dispersión de luz dinámica (DLS)	24
5.5.5.b. Medida del potencial Z mediante dispersión de luz electroforética (ELS).....	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
6.1. Análisis termogravimétrico (TGA).....	25
6.2. Calorimetría de barrido diferencial (DSC).....	29
6.3. Turbidimetría	33
6.4. Zetasizer	38
6.4.a. Dispersión de luz dinámica (DLS).....	38
6.4.b. Dispersión de luz electroforética (ELS)	51
7. CONCLUSIONES.....	60
8. BIBLIOGRAFÍA.....	61
9. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS.....	64
10. ANEXOS.....	70
10.1. Termogravimetría (TGA)	70
10.2. Calorimetría de barrido diferencial (DSC).....	74
10.3. Turbidimetría.....	80
10.4. Zetasizer: DLS (tamaño de partícula).....	82
10.5. Valores críticos de F para pruebas de una cola ($p = 0,05$)	99

1. LISTADO DE ABREVIATURAS

ELP	Elastin Like Polymers = Polímeros tipo elastina
ELR	Elastin Like Recombinamers = Recombinámeros tipo elastina
T_t	Temperatura de transición
ITT	Inverse Temperature Transition = Temperatura inversa de transición
TGA	ThermoGravimetric Analysis = Análisis termogravimétrico
DSC	Differential Scanning Calorimetry = Calorimetría de barrido diferencial
DLS	Dynamic Light Scattering = Dispersión de luz dinámica
ELS	Electrophoretic Light Scattering = Dispersión de luz electroforética
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
mg	Miligramos
mQ	Agua Milli-Q

2. RESUMEN DEL TRABAJO EN ESPAÑOL Y EN INGLÉS

RESUMEN

Este trabajo se ha llevado a cabo en el grupo de investigación de materiales avanzados y nanobiotecnología BIOFORGE. En él, se tratará la determinación y la cuantificación de impurezas inorgánicas que pueden encontrarse en el recombinámero tipo elastina $(E_{50160})_2$ RGD. Este polímero se produce a través de un proceso de fermentación con bacterias *Escherichia coli* previamente modificadas genéticamente para introducir el código de ADN que dará lugar al ELR buscado.

Se estudiará si la pureza de los ELRs se puede relacionar con su temperatura de transición mediante técnicas de análisis térmicas, ópticas y eléctricas, entre las que se encuentran: termogravimetría (TGA), calorimetría de barrido diferencial (DSC), turbidimetría, dispersión de luz dinámica (DLS), dispersión de la luz electroforética (ELS).

El polímero tratado en este caso es un pentabloque compuesto por una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica. En contacto con agua, se produce el plegamiento de la parte hidrofóbica formando una partícula de interior hidrofóbico y exterior hidrofílico. El proceso de purificación se puede realizar mediante tres tratamientos diferentes, previo calentamiento a unos 37°C:

- Adición de NaCl.
- Adición de $(NH_4)_2SO_4$.
- Acidificación con HCl hasta pH próximo a tres, y adición posterior de NaCl y $(NH_4)_2SO_4$.

Realizando los correspondientes análisis, se determina qué procedimiento da lugar al polímero más puro.

En el caso del polímero recombinante tipo elastina (ELR) se obtiene una temperatura de transición en la que influyen:

- La cadena de aminoácidos: Con aminoácidos hidrofóbicos la temperatura de transición es más baja que con hidrofílicos.
- La concentración de polímero: Cuanto más alta es la concentración, más baja será la temperatura de transición.
- La pureza: La presencia de impurezas inorgánicas hace que la temperatura de transición disminuya.

ABSTRACT

This work has been carried out in the BIOFORGE advanced materials and nanobiotechnology research group. It will deal with the determination and quantification of inorganic impurities that can be found in the elastin-like recombinamer (E₅₀I₆₀)₂RGD. This polymer is produced through a fermentation process with Escherichia coli bacteria previously genetically modified to introduce the DNA code that will give rise to the desired ELR.

It will be studied whether the purity of ELRs can be related to their transition temperature by means of thermal, optical and electrical analysis techniques, including: thermogravimetry (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), turbidimetry, dynamic light scattering (DLS), electrophoretic light scattering (ELS).

The polymer treated in this case is a pentablock composed of a hydrophobic part and a hydrophilic part. In contact with water, the hydrophobic part folds to form a particle with a hydrophobic interior and a hydrophilic exterior. The purification process can be carried out by means of three different treatments, after heating to about 37°C:

- Addition of NaCl.
- Addition of (NH₄)₂SO₄.
- Acidification with HCl up to pH close to three, and subsequent addition of NaCl and (NH₄)₂SO₄.

By carrying out the corresponding analyses, it is determined which procedure gives rise to the purest polymer.

In the case of the Elastin Like Recombinamers (ELR), a transition temperature is obtained which is influenced by:

- The amino acid chain: with hydrophobic amino acids the transition temperature is lower than with hydrophilic amino acids.
- The concentration of polymer: The higher the concentration, the lower the transition temperature.
- The purity: The presence of inorganic impurities causes the transition temperature to decrease.

3. INTRODUCCIÓN

La ciencia, dentro del campo de la biomedicina, presenta un gran interés por la obtención de nuevos materiales con el fin de obtener proteínas sintéticas con propiedades de macromoléculas análogas a las naturales. Sus componentes aminoácidos pueden ser hidrofóbicos o hidrofílicos y portar grupos aromáticos, catiónicos, aniónicos o neutros, proporcionando a la proteína una amplia gama de características específicas. Al cambiar la secuencia, se consiguen estructuras complejas tales como: hélice alfa, hoja plegada beta o giro beta. [1]

3.1. Elastina

Entre las proteínas más importantes, se encuentra la elastina, componente de la matriz extracelular (MEC) que confiere integridad estructural, resistencia y elasticidad a muchos órganos y tejidos de los seres vivos, como la piel, los pulmones, las arterias, los ligamentos y los cartílagos, permitiéndoles recuperar su estado inicial en procesos de extensión y relajación. Esto se debe a la presencia de regiones hidrófobas dentro de la estructura de los monómeros de elastina, que tienden a agregarse y autoensamblarse, contribuyendo a la organización polimérica de la elastina. [1,2]

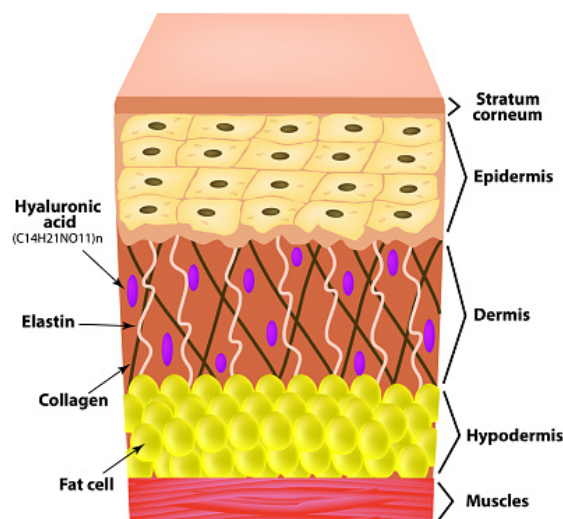


Figura 1. Estructura de la piel (VectorStock, "Anatomical structure of the skin elastin")

La elastina está formada a su vez por una matriz de tropoelastina entrecruzada compuesta por dos dominios principales desordenados intrínsecamente [3], un dominio reticular hidrófilo en α -hélice (responsable del entrecruzamiento), rico en residuos de K (Lisina) y A (Alanina), y

un dominio elástico hidrófobo de conformación en forma de espiral β , rico en residuos de V (Valina), P (Prolina), G (Glicina). El dominio elástico está compuesto por secuencias de aminoácidos con motivos que se repiten a lo largo de su cadena, como VPGG, VPGVG, APGVG y VGVAPG [4,5] Estos adoptan una estructura que permite que la elastina se deforme sin romperse, y al desaparecer la tensión, recupere su conformación original. En este proceso no hay pérdida de energía, ya que la energía empleada en estirar la proteína se recupera cuando vuelve a su estado inicial. [6] En la fig. 2 se muestra el comportamiento elástico tras la distensión y relajación de las moléculas de elastina.

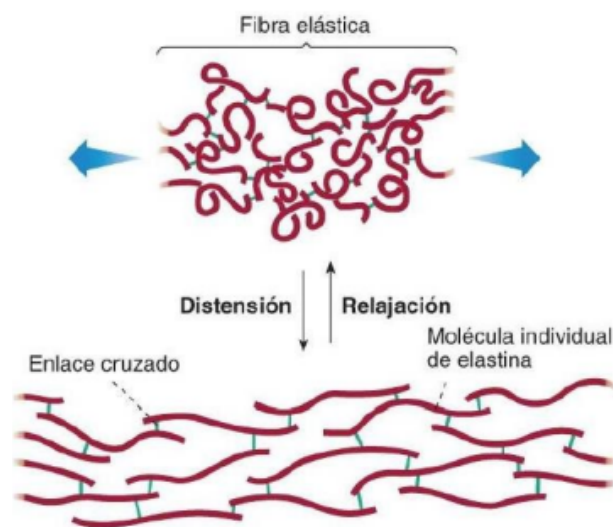


Figura 2. Comportamiento elástico de las moléculas de elastina (W. R. Gray, L. B. Sandberg, J.A. Foster, "Molecular Model for Elastin Structure and Function", Nature, 1973, Vol. 246 (5434), pp. 461-466)

3.2. Polímeros tipo elastina

Los polímeros tipo elastina (ELP, "Elastin Like Polymers") son polipéptidos sintetizados químicamente con una secuencia de aminoácidos que imita los motivos repetidos en la elastina natural. Los más utilizados consisten en repeticiones del motivo $(VPGXG)_n$, donde el residuo invitado "X" puede ser cualquier aminoácido natural excepto prolina (la estructura de prolina desestabiliza el giro β e impide el correcto empaquetamiento de la cadena polimérica [2,6]), y el subíndice "n" indica el número de repeticiones del pentapéptido. La capacidad de introducir un gen determinado en un microorganismo ha permitido "diseñar" el polímero proteico recombinante [6,7] y controlar su secuencia. En consecuencia, los ELP generados mediante técnicas recombinantes reciben el nombre de recombinámeros tipo elastina (ELR

“Elastin Like Recombinamers”) [6,8] y de este modo se recuerdan sus características más distintivas:

- 1) su similitud con la proteína elastina natural.
- 2) su obtención recombinante.
- 3) sus propiedades como polímero.

Además, el gran parecido a nivel de secuencia entre la elastina y los ELR, les proporciona propiedades también muy semejantes, como las propiedades mecánicas [6,9], la biocompatibilidad [6,10-13], la naturaleza termosensible, el comportamiento inteligente autoensamblable [6,14] y una gran capacidad para formar estructuras como: nanopartículas, nanofibras, películas o hidrogeles... convirtiendo a los ELR en uno de los materiales basados en proteínas más interesantes con gran utilidad en aplicaciones biomédicas, incluidos los implantes y los sistemas de administración de fármacos (DDS). [1, 15].

3.3. La naturaleza termosensible y el comportamiento autoensamblable de los ELR

Los ELR presentan una transición de fase reversible entre dos estados conformacionales en respuesta a los cambios de temperatura [6,16]

En solución acuosa por debajo de la temperatura de transición (T_t), las cadenas de polímero permanecen desordenadas, extendidas con una conformación de espiral aleatoria e hidratadas mediante hidratación hidrófoba con una estructura de agua tipo clatrato que rodea los restos apolares del polímero (las moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno entre sí, pero con una débil interacción con el grupo apolar creando una serie de estructura pentagonal) [6, 17].

Cuando la temperatura es mayor que la T_t , las moléculas de agua colocadas alrededor de los restos apolares pierden el orden por la agitación térmica y dejan de formar clatratos. La cadena polipeptídica se pliega hidrofóticamente formando una fase separada, y el polímero adopta una estructura espiral β [18], regular, dinámica y no aleatoria, formada por una sucesión de horquillas β . Se puede observar el comportamiento descrito en la fig. 3.

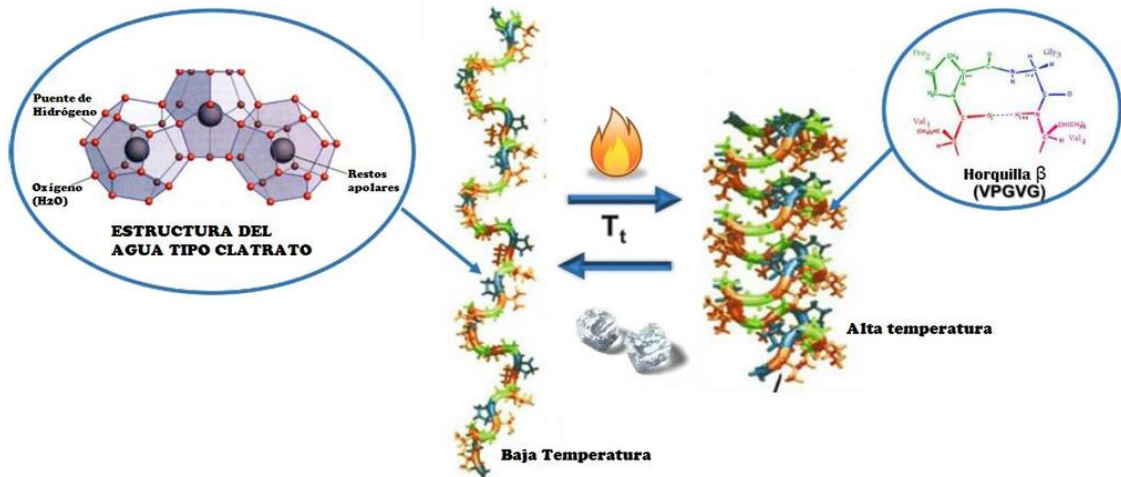


Figura 3. Cambio en la estructura de los ELR en la transición inversa. Por debajo de la temperatura de transición (izquierda), cadena extendida con estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de los restos apolares de la cadena del polímero. Por encima de la temperatura de transición (derecha), cadena plegada en conformación de horquilla β que forman los aminoácidos. (A. Fernández-Colino, A. Girotti, M.I. López, F.J. Arias, J.C. Rodríguez-Cabello, "Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas", *Biomecánica*, Vol.19, pp. 8-16, Nov. 2011)

Las proteínas comunes se desdoblaron y se desnaturalizan cuando aumenta la temperatura. El cambio descrito para los ELR de un estado desordenado a un estado ordenado al calentarse es la base de la transición inversa de temperatura (ITT). Se podría llegar a pensar que este comportamiento no es posible porque puede violar la segunda ley de la termodinámica. Sin embargo, la solución se encuentra en considerar el sistema de forma global, es decir, la proteína con el agua que la rodea en conjunto. Cuando el sistema se calienta, el polímero se pliega hidrofólicamente, pasando a un estado ordenado, pero el aumento en el orden del componente de la proteína es menor que el desorden del componente del agua provocado por la ruptura de las estructuras de clatrato debido a la agitación térmica, lo que da lugar a un aumento de la entropía, cumpliéndose la segunda ley de la termodinámica ($dS \geq 0$), y, en consecuencia, como $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, $\Delta G < 0$, siendo el plegamiento del polímero un proceso espontáneo [1,6]

La cantidad de energía térmica requerida para desencadenar el proceso de transición inversa depende de la relación entre el agua y la cadena polimérica. Para determinar dicha relación cuando se define una temperatura de transición hay que tener en cuenta algunas variables: concentración polimérica [19], longitud del ELR, composición aminoacídica [20], pH [21] y fuerza iónica [22].

3.4. Métodos de análisis

3.4.1. Análisis térmico

El análisis térmico engloba a una serie de técnicas en las que se mide una propiedad física de una sustancia inicial o de sus productos de reacción en función de la temperatura, mientras es sometida a un programa de temperatura controlado. Se muestran algunos ejemplos en la Tabla 1.

Entre los métodos térmicos que proporcionan información química se encuentran: análisis termogravimétrico (TGA), análisis térmico diferencial (DTA) y calorimetría de barrido diferencial (DSC). [23]

Nombre de la técnica	Parámetro a medir
Termogravimetría	Diferencia de masa
Termogravimetría derivada	Velocidad de cambio de masa
Análisis térmico diferencial	Diferencia de temperatura
Análisis térmico diferencial derivado	Velocidad de cambio de temperatura
Calorimetría de barrido diferencial	Diferencia de energía aportada
Volumetría termométrica	Volumen de valorante
Pirólisis lineal	Conductividad térmica
Dilatometría	Cambio de volumen
Termoluminiscencia	Emisión de radiación

Tabla 1. Técnicas de análisis térmico

3.4.1.a. Análisis termogravimétrico (TGA)

Esta técnica se basa en registrar la variación de la masa de una muestra en función de un cambio de temperatura en una atmósfera controlada. El termograma o curva de descomposición, representa el % masa en el eje de ordenadas y la temperatura o tiempo en el de abscisas. Permite obtener información cualitativa y cuantitativa de la muestra, pero sin identificar su composición química.

El instrumento utilizado, la termobalanza, consta de los siguientes componentes:

- Balanza analítica sensible.
- Horno: Se calibra mediante un material cuyo punto Curie se conoce [temperatura a la cual un material ferromagnético (en el dominio magnético, los espines de los electrones se colocan paralelos) se convierte en paramagnético (entra en contacto con un campo eléctrico externo,

se magnetiza y algunos electrones no están emparejados]) o bien se emplea un patrón de punto de fusión. La muestra se calienta hasta que se alcance su punto Curie o de fusión. Un sistema de gas proporciona una atmósfera inerte.

- Portamuestras: Las muestras se colocan en recipientes de platino, aluminio o alúmina de volúmenes normalmente entre 40 y 500 μL .

- Sistema computerizado para el control del instrumento, seguimiento del proceso y adquisición de los datos. [23]

En nuestro caso, los termogramas proporcionan información sobre los mecanismos de descomposición de las preparaciones poliméricas.

Cada tipo de polímero tiene un patrón de descomposición característico, por lo que puede utilizarse para su identificación. En la fig. 4 se representa el de algunos materiales poliméricos comunes.

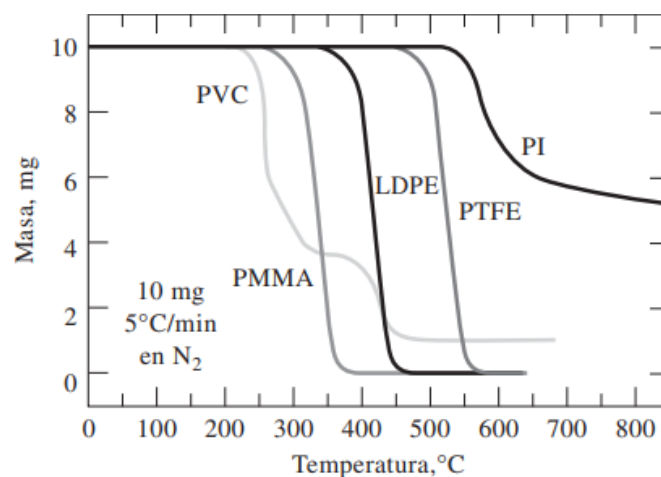


Figura 4. Termogramas de descomposición de: PVC: policloruro de vinilo; PMMA: metacrilato de polimetilo; LDPE: polietileno de baja densidad; PTFE: politetrafluoroetileno; PI: polipirometiltimida aromática (D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, "Principios de análisis instrumental", 2008)

3.4.1.b. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Es una técnica cuantitativa que permite obtener información de la temperatura a la cual tiene lugar el cambio energético en estudio y del calor involucrado en el proceso.

Se colocan la muestra y la referencia en platillos o crisoles de aluminio en el instrumento y se mide la diferencia en el flujo de calor entre ambas.

Hay dos tipos principales de DSC:

- De potencia compensada y de flujo de calor, este último es el utilizado en nuestro caso. Mide la variación en el flujo de calor entre la muestra y la referencia cuando se someten a un programa de variación constante de temperatura en una atmósfera controlada [23,24]. (Fig. 5)

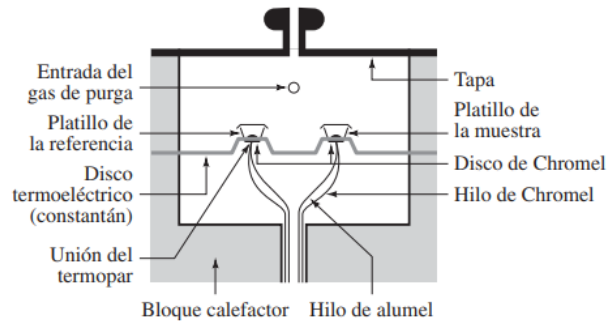


Figura 5. DSC de flujo de calor (D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, "Principios de análisis instrumental", 2008)

El instrumento se controla mediante un software que permite al usuario indicar el programa de temperatura y los parámetros de calibración.

Las aplicaciones de la DSC son muy útiles para establecer la pureza de polímeros y para la clasificación cualitativa de materiales, aunque no para su identificación. [24]

3.4.2. Turbidimetría

Determina la radiación transmitida al atravesar esta una suspensión de partículas, comparando la intensidad de la radiación que incide y la que sale después de atravesar dicha suspensión. La atenuación de dicha radiación (haz de luz) se debe a los fenómenos de absorción y dispersión de la luz tras interferir con las partículas. [25, 26], como se muestra en la fig. 6.

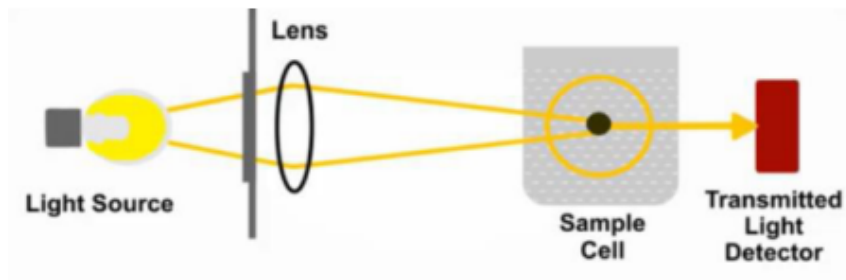


Figura 6. Funcionamiento turbidimetría y componentes: Fuente de luz, sistema óptico (colimador + selector de longitud de onda), cubeta con muestra y, detector en la misma dirección que la luz incidente (NotiJenck, "Mediciones de bajo nivel de turbidez")

3.4.3. Zetasizer: Dispersión de luz dinámica (DLS) y Dispersión de luz electroforética (ELS)

Análisis del tamaño de partículas, pesos moleculares, potencial, movilidad electroforética de proteínas y macromoléculas en solución.

Se utiliza el equipo analizador Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments) que cuenta con un láser de He-Ne con una longitud de onda de 633nm. Este instrumento emplea la dispersión de luz dinámica con óptica "NIBS" para analizar el tamaño de partículas y detectar agregados en las muestras. También tiene un analizador de potencial Z que utiliza la dispersión de luz electroforética para partículas, moléculas y superficies. Además, posee un analizador de peso molecular con dispersión de luz estática. [27]

3.4.3.a. Dispersión de luz dinámica (DLS)

Es una técnica no invasiva que determina: tamaño de las partículas, distribución del tamaño y su índice de polidispersidad. Para ello, se mide el movimiento Browniano de las mismas, que hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades y analizando estas fluctuaciones en la intensidad, se obtiene la velocidad del movimiento Browniano, que proporciona el tamaño de partícula al aplicar la relación de Stokes-Einstein [28, 29].

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Donde: R_H es el radio, T es la temperatura, D es el coeficiente de difusión y η la viscosidad del disolvente.

3.4.3.b. Dispersión de luz electroforética (ELS)

Técnica empleada para medir el potencial Z de las partículas (instrumento Zetasizer Nano ZSP).

El potencial Z es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas adyacentes en una disolución. Se calcula a partir de la movilidad de las partículas cargadas eléctricamente durante la dispersión electroforética de la luz (ELS). Su medición aporta información sobre la agregación o dispersión de las partículas. [30... 33]

3.5. Polímero de estudio

Se trata del polímero $(E_{50}I_{60})_2RGD$, lo que quiere decir que en el pentapéptido VPGXG, si el aminoácido X se sustituye por una E (ácido glutámico), puede estar cargado negativamente dependiendo del pH, dando al bloque $[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]$ carácter hidrofílico. Si se sustituye X por una I, se introduce una isoleucina, neutra, que tiene una cadena hidrofóbica haciendo al bloque (VPGIG) hidrofóbico.

El pentabloque tiene la siguiente secuencia:

MESLLP $[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]_{10}(VPGIG)_{60}[(VPGVG)_2(VPGEG)(VPGVG)_2]_{10}[VPGIG]_{60}[VPIG]_5[AVTGRGDSPASS]_6V$, donde la última secuencia (Arginina – Glicina - Ácido aspártico) es una molécula hidrofílica de adhesión celular.



Figura 7. Forma del pentabloque (A. Velasco del Olmo, "Variación de las propiedades mecánicas de hidrogeles de tipo elastina con la temperatura el tiempo y la concentración", G.I.P. Bioforge)

Cuando la temperatura es superior a la de transición, las cadenas se pliegan, quedando en el interior las partes hidrofóbicas y en el exterior las hidrofílicas, encontrándose la secuencia RGD en la parte más externa de las micelas. Si la temperatura es inferior a la de transición, las cadenas se extienden.

Si se trabaja con un fármaco hidrofóbico en un medio hidrofílico, el fármaco se asocia a las partes hidrofóbicas de la cadena extendida cuando la temperatura es inferior a la de transición, si se aumenta esta temperatura, las cadenas se pliegan atrapando dentro el fármaco. Cuando se vuelve a bajar la temperatura, las cadenas se extienden de nuevo y el fármaco se libera. Dicho comportamiento se muestra en la fig. 8.

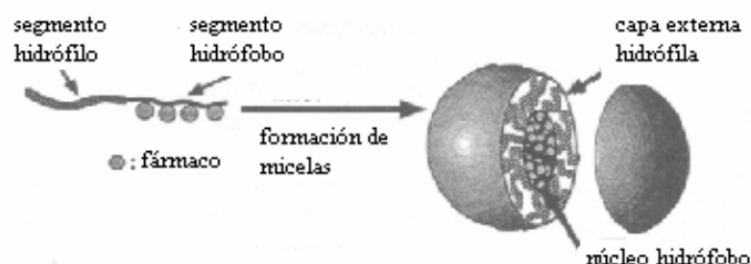


Figura 8. Formación de estructuras tipo micelas para encapsular fármacos (V. Sáez et al., "Liberación controlada de fármacos", Revista Iberoamericana de polímeros, Jul. 2004, Vol.5, No. 2)





















Aminoácido	Abreviatura	Letra	Estructura	Tipo	pK _{a1} (-COOH)	pK _{a2} (-NH ₂)	pK _{aR} (R)	pI
Glicina	GLY	G		Neutros apolares	2,34	9,78		6,06
Alanina	ALA	A			2,35	9,69		6,02
Valina	VAL	V			2,32	9,62		5,97
Leucina	LEU	L			2,36	9,64		6,00
Isoleucina	ILE	I			2,36	9,68		6,02
Metionina	MET	M			2,28	9,21		5,75
Prolina	PRO	P			1,99	10,60		6,30
Fenilalanina	PHE	F		Neutros aromáticos	1,83	9,29		5,53
Triptófano	TRP	W			2,38	9,39		5,89
Tirosina	TYR	Y			2,20	9,11	10,07	5,65
Serina	SER	S		Neutros polares	2,21	9,15		5,68
Cisteína	CYS	C			1,96	10,28	8,18	5,07
Treonina	THR	T			2,71	9,62		6,16
Asparagina	ASN	N			2,02	8,80		5,41
Glutamina	GLN	Q			2,17	9,13		5,65
Ácido aspártico	ASP	D		Ácidos	2,09	9,82	3,86	2,97
Ácido glutámico	GLU	E			2,19	9,67	4,25	3,22
Lisina	LYS	K		Básicos	2,18	8,95	10,53	9,74
Arginina	ARG	R			2,17	9,04	12,48	10,76
Histidina	HIS	H			1,82	9,17	6,00	7,58

Tabla 2: Resumen tipos de aminoácidos, abreviaturas y datos de pK_a del ácido carboxílico y de la amina si estuviesen libres (grupos ionizables), pK_a del radical correspondiente y punto isoeléctrico (en el que se compensan las cargas del aminoácido) (Modificación de tabla de Quimitube, Nov. 2017)

4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo de este trabajo es determinar cuál es el método de purificación más efectivo para el polímero de estudio $(E_{50}I_{60})_2RGD$ (ELR). Para ello se evalúa la presencia de impurezas inorgánicas, relacionándolas con su temperatura de transición empleando para ello las siguientes técnicas: termogravimetría (TGA), calorimetría de barrido diferencial (DSC), turbidimetría, dispersión de luz dinámica (DLS) y dispersión de luz electroforética (ELS).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

- Micropipetas de 2-20 μL , 20-100 μL , 50-200 μL , 200-1000 μL .
- Gradilla.
- Puntas para micropipetas.
- Pinzas.
- Tubos falcon de 15 mL y de 50 mL.
- Eppendorf de 1,5 mL.
- Jeringas de 10 mL.
- Agujas de 0,9 x 2.5 mm y de 0,80 x 120 mm.
- Filtros para jeringa de 45 μm .
- Tapas de cubetas.
- Cubetas de cuarzo.
- Cubetas de plástico 4 lados iguales.
- Cubetas semimicro de poliestireno.
- Cubetas de capilar plegado para Zetasizer Nano DT1070.
- Crisoles de aluminio de 40 μL .
- Soporte para crisoles.

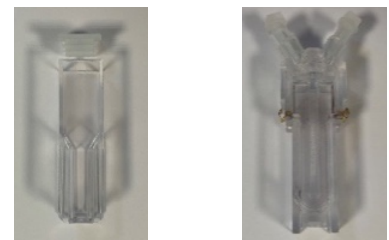


Figura 9. Fotografías de cubetas semimicro de poliestireno (DLS) y de capilar plegado (potencial Z)



Figura 10. Fotografía de los crisoles de aluminio y soporte

- Cierracrisoles Mettler Toledo.



Figura 11. Fotografía del cierracrisoles

- Crisoles de alúmina de 70 μ L.

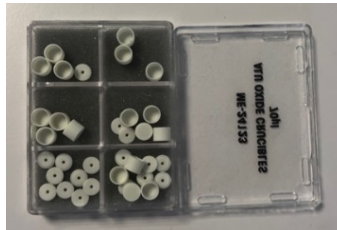


Figura 12. Fotografía de los crisoles de alúmina

- Campana esterilizada Telstar Mini-V/PCR.



Figura 13. Fotografía de la campana esterilizada con los polímeros

5.2. Instrumentos de medida

- Balanza analítica XS105 DualRange Mettler Toledo (precisión $\pm 0,01$ mg).



Figura 14. Fotografía de la balanza analítica

- pHmetro Basic20+ Crison.



Figura 15. Fotografía del pHmetro

- DSC822e Mettler Toledo.



Figura 16. Fotografía del DSC



Figura 17. Fotografía del interior del horno

- TGA/SDTA851e Mettler Toledo.



Figura 18. Fotografía de TGA

- Espectrofotómetro Cary 100 UV-Vis Agilent Technologies.



Figura 19. Fotografía del espectrofotómetro

- Zetasizer Nano ZSP.



Figura 20. Fotografía del Zetasizer

5.3. Compuestos

- Polímero $(E_{50160})_2$ RGD.
- PBS 10X (Solución salina con tampón fosfato ($pH \approx 7,4$) para mantener una concentración electrolítica y un pH del medio fisiológico. Contiene: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na_2HPO_4 y 18 mM KH_2PO_4).
- Agua ultra pura Milli-Q.
- Tapas de aluminio (para calibración).
- Discos de indio para calibración.

5.4. Software

- METTLER STARe, Cary WinUV (Scan y Thermal), Zetasizer Software, Sigmaplot, Statgraphics.

5.5. Métodos

5.5.1. Preparación de los polímeros

A partir de la disolución comercial PBS 10X, se prepara por dilución 1:10 con agua mQ una disolución PBS 1X, la cual se utiliza para disolver los polímeros $(E_{50160})_2$ a diferentes concentraciones: 50 mg/mL para DSC, 5 y 10 mg/mL para turbidimetría, 5mg/mL para DLS y potencial Z.

Por otro lado, a efectos de comparación, se preparan para DLS y potencial Z disoluciones de los polímeros de concentraciones 5 y 1 mg/mL en agua mQ.

5.5.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

Chequeo del TGA:

Se comprueba la correcta calibración del equipo con elementos patrón estables de punto de fusión conocido, en nuestro caso indio y aluminio. El equipo empleado (TGA/SDTA) realiza las mediciones de ambos elementos simultáneamente.

El TGA (Termogravimetría) determina la variación de la masa en función de la temperatura o del tiempo y el SDTA (Análisis térmico diferencial único) mide la diferencia de temperatura entre la muestra y un material de referencia sometidos al mismo proceso de calentamiento.

Para llevar a cabo el chequeo, el método empleado es "Check TGA851...In/Al". Se prepara un crisol de alúmina de 70 μ L con los patrones: Dos discos de In (en total entre 10 y 20 mg) y uno de Al (entre 2 y 6 mg) separados para evitar su contacto, y, por tanto, que formen una aleación. Se utiliza como gas de purga aire con un flujo de 0 mg/mL

Se evalúan los resultados, determinando así las temperaturas de fusión para cada uno de los materiales.

Preparación de muestras:

Se tara en la balanza del TGA un crisol de alúmina de 70 μ L y a continuación en una balanza analítica, se pesan entre 1 y 4 mg de polímero dentro del crisol. De este modo el valor de la masa que aparece en la pantalla del TGA se corresponde únicamente con la muestra.

Medida:

Se selecciona en el software (METTLER STARe) el método que se va a utilizar, en este caso, consta de tres segmentos: 1) Se incrementa la temperatura del horno de 25 a 500°C, con una velocidad de calentamiento constante de 20°C/min y flujo de aire de 60 mL/min. 2) Se mantiene durante 15 minutos la temperatura invariable a 500°C con flujo de aire de 60 mL/min. 3) Se aumenta la temperatura de 500 a 900°C, con una velocidad de calentamiento constante de 20°C/min y flujo de aire de 60 mL/min (limpieza del crisol).

Al someter a la muestra sólida a un programa de calentamiento a altas temperaturas, esta se descompone térmicamente, por lo que el residuo que quede en la balanza se corresponderá únicamente con las sales inorgánicas (impurezas), las cuales se van a poder cuantificar por diferencia de masa.

5.5.3. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Preparación de disoluciones:

Se toman cantidades del polímero y se añaden volúmenes de disolución de PBS 1X con el fin de conseguir disoluciones de concentración del orden de 50 mg/mL, según lo recogido en la tabla 3:

Preparación disoluciones 50 mg/mL DSC		
Muestra	Masa polímero (mg)	Volumen disolución PBS 1X (μL)
Polímero 1 (Purificado con NaCl)	9,74	194
Polímero 2 (Purificado con (NH ₄) ₂ SO ₄)	9,75	195
Polímero 3 (Purificado con cambio de pH, NaCl y (NH ₄) ₂ SO ₄)	9,90	198

Tabla 3: Preparación de las disoluciones de polímero de concentración 50 mg/mL para DSC

Las disoluciones preparadas se introducen en el refrigerador durante 24 horas a 4°C, procediéndose una vez transcurrido este tiempo a su análisis, de este modo, se asegura la formación de todas las nanopartículas.

Preparación de muestras:

En balanza analítica se coloca un crisol de aluminio de 40μL, se tara y se añaden 20μL de la disolución de polímero. Se anota el peso exacto y se cierra herméticamente con el cierracrisoles. Se repite la operación, solo con disolución de referencia PBS 1X.

Medida:

Se realiza en un equipo de DSC “Mettler Toledo” controlado por ordenador mediante un software (METTLER STARe) que permite seleccionar el programa de temperatura y los parámetros de calibración. El método empleado se realiza en las siguientes condiciones: 1) se mantiene la célula de medida con la muestra y la referencia a 0°C durante 5 minutos en flujo de nitrógeno 5mL/min (gas de purga que extrae la humedad y el oxígeno de la muestra y favorece la transferencia de calor al crisol); 2) Se aumenta la temperatura a 4°C y a continuación, en incremento constante de 5°C/min, hasta 60°C.

Al principio del diagrama se observa un pico correspondiente a la desestabilización de la línea base por cambio de fase del agua, de sólido (0°C iniciales) a líquido. Posteriormente, aparece el pico correspondiente a la temperatura de transición. Una vez obtenidos los resultados, se calcula la temperatura de transición media y su desviación estándar.

5.5.4. Turbidimetría

Preparación de disoluciones:

Se prepararán disoluciones del orden de 5mg/mL y 10 mg/mL, añadiendo la correspondiente cantidad del polímero a un volumen determinado de disolución de PBS, tablas 4 y 5.

Preparación disoluciones 5 mg/mL Turbidimetría+Zetasizer		
Muestra	Masa polímero (mg)	Volumen disolución PBS 1X (mL)
Polímero 1 (Purificado con NaCl)	56,71	11,3
Polímero 2 (Purificado con (NH ₄) ₂ SO ₄)	60,43	12,1
Polímero 3 (Purificado con cambio de pH, NaCl y (NH ₄) ₂ SO ₄)	56,41	11,3

Tabla 4: Preparación de las disoluciones de polímero de concentración 5 mg/mL para turbidimetría y Zetasizer

Preparación disoluciones 10 mg/mL Turbidimetría		
Muestra	Masa polímero (mg)	Volumen disolución PBS 1X (mL)
Polímero 1 (Purificado con NaCl)	60,06	6,0
Polímero 2 (Purificado con (NH ₄) ₂ SO ₄)	61,37	6,1
Polímero 3 (Purificado con cambio de pH, NaCl y (NH ₄) ₂ SO ₄)	60,29	6,0

Tabla 5: Preparación de las disoluciones de polímero de concentración 10 mg/mL para turbidimetría

Preparación de muestra:

Se comprueba con un pHmetro que todas las disoluciones en frío tengan un pH en torno a 7,4 debido a que se encuentran en el medio fisiológico PBS 1X.

Se eliminan posibles partículas grandes presentes en el medio que interfieran en la medida (como el polvo) mediante filtrado en frío, haciendo pasar con una jeringa la disolución a través de filtros de 45µm.

A continuación, con una micropipeta, se añade aproximadamente 1 mL de la disolución de cada polímero y el blanco en las cubetas.

Medida:

Se utiliza como instrumento un espectrofotómetro en el que la fuente de luz llega, atraviesa las muestras y se toman lecturas de absorbancia. Inicialmente, la disolución utilizada es totalmente transparente. Según va transicionando el polímero y se van formando nanopartículas, se aprecia una variación de la radiación que llega al detector.

Se enciende el equipo junto con el baño de etilenglicol termostataado, que nos va a permitir variar la temperatura durante las medidas, y se pasa aire comprimido seco para evitar la condensación de agua sobre las cubetas.

Para determinar la longitud de onda óptima: Se realizan barridos entre 200 y 800 nm, considerando 350 nm como la longitud de onda más adecuada para realizar nuestras medidas sin que pueda afectar la radiación a las características del polímero.

Se configura el software con la opción Thermal. Se introducen el blanco y las muestras en sus respectivas celdas y se comienza a tomar lecturas de la radiación detectada mientras se incrementa la temperatura desde 3 hasta 60°C a velocidad constante de 1°C/min. La temperatura de transición observada en la medida directa del espectro para el polímero en sus diferentes tratamientos se detecta en forma de sigmoide. Se realiza la primera derivada y se obtiene el valor concreto de la temperatura de transición, que coincide con el punto medio de la sigmoide anterior.

5.5.5. Zetasizer: Dispersión de luz dinámica (DLS) y Dispersión de luz electroforética (ELS)

Preparación de disoluciones

De forma análoga a como se realizaron en el caso de la turbidimetría, se preparan disoluciones de concentración del orden de 5 mg/mL, en PBS 1X y en agua mQ y de 1 mg/mL en agua mQ, según lo recogido en las tablas 6, 7 y 8:

Preparación disoluciones 5 mg/mL en PBS 1X Turbidimetría+Zetasizer		
Muestra	Masa polímero (mg)	Volumen disolución PBS 1X (mL)
Polímero 1 (Purificado con NaCl)	56,71	11,3
Polímero 2 (Purificado con (NH ₄) ₂ SO ₄)	60,43	12,1
Polímero 3 (Purificado con cambio de pH, NaCl y (NH ₄) ₂ SO ₄)	56,41	11,3

Tabla 6: Preparación de las disoluciones de polímero de concentración 5 mg/mL para turbidimetría y Zetasizer

Preparación disoluciones 5 mg/mL Zetasizer		
Muestra	Masa polímero (mg)	Volumen disolución agua mQ (mL)
Polímero 1 (Purificado con NaCl)	39,26	7,9
Polímero 2 (Purificado con (NH ₄) ₂ SO ₄)	57,74	11,5
Polímero 3 (Purificado con cambio de pH, NaCl y (NH ₄) ₂ SO ₄)	55,64	11,1

Tabla 7: Preparación de las disoluciones de polímero de concentración 5 mg/mL en agua mQ para Zetasizer

Preparación disoluciones 1 mg/mL Zetasizer		
Muestra	Masa polímero (mg)	Volumen disolución agua mQ (mL)
Polímero 1 (Purificado con NaCl)	8,51	11,3
Polímero 2 (Purificado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	11,60	12,1
Polímero 3 (Purificado con cambio de pH, NaCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	12,26	11,3

Tabla 8: Preparación de las disoluciones de polímero de concentración 1 mg/mL en agua mQ para Zetasizer

5.5.5.a. Medida del tamaño de partícula mediante dispersión de luz dinámica (DLS)

Se introducen en las cubetas semimicro de poliestireno las disoluciones del polímero disuelto en PBS o agua, se tapan para evitar procesos de evaporación y se configura el software Zetasizer para estabilizar la temperatura inicialmente a 4 °C y medir el tamaño de partícula, a continuación, se aumenta hasta 37°C y se mide de nuevo el tamaño. La medición de DLS se realiza mediante la dispersión de luz cuasi elástica, calculando el movimiento Browniano de las partículas y generando funciones de correlación para obtener el índice de polidispersidad y la distribución de tamaño. El tamaño de partícula medio (en nm) se puede determinar en función de la intensidad de la luz dispersada, la cual está relacionada con el volumen de las partículas y su número.

5.5.5.b. Medida del potencial Z mediante dispersión de luz electroforética (ELS)

Se introducen las cubetas de capilar plegado para Zetasizer Nano y se configura el software, se estabiliza inicialmente la temperatura a 4 °C y se mide el potencial Z a dicha temperatura, a continuación, se aumenta hasta 37°C y se mide de nuevo el potencial. Los valores del potencial se determinan usando las ecuaciones de Smoluchowski [34], que relacionan la movilidad iónica con la carga superficial.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

Se realizan tres medidas con cada muestra de polímero. Se obtiene una respuesta de la variación de masa en función del tiempo y la temperatura, determinando el porcentaje de masa perdida (Fig. 21), lo que permite calcular por diferencia el porcentaje de impurezas inorgánicas presentes.

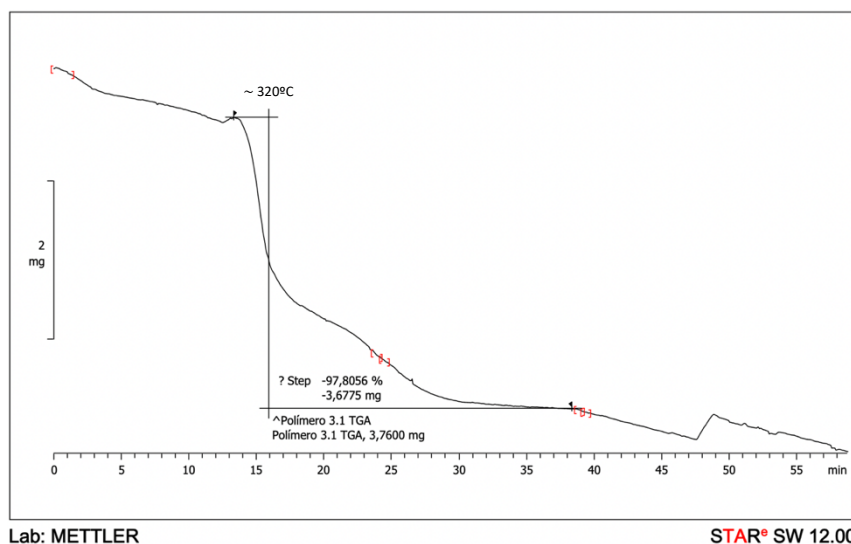


Figura 21. Termograma del polímero 3 (Repetición 1), purificado con acidificación hasta pH 3, NaCl y $(NH_4)_2SO_4$, masa perdida: 97,81% (~ 320°C)

El resto de gráficos obtenidos con su respectiva pérdida de masa, se recogen en el anexo 10.1.

En la tabla 9, se muestran: la masa pesada de polímero inicialmente, la masa perdida, el porcentaje de masa perdida durante el análisis y se calcula por diferencia el porcentaje de impurezas inorgánicas en cada medida. Con estos datos se determina el promedio del porcentaje de impurezas inorgánicas en cada polímero y su desviación estándar.

Muestra	Repetición	Masa inicial (mg)	Masa perdida (mg)	% masa perdida	% impurezas inorgánicas	Media % impurezas inorgánicas	Desviación estándar
P1	1	2,01	1,66	82,34	17,66	18,59	± 8,84
P1	2	2,64	1,90	72,14	27,86		
P1	3	1,29	1,16	89,75	10,25		
P2	1	3,09	2,93	95,10	4,90	3,49	± 1,48
P2	2	3,29	3,23	98,06	1,94		
P2	3	3,45	3,33	96,38	3,62		
P3	1	3,76	3,68	97,81	2,19	3,99	± 2,52
P3	2	3,71	3,46	93,13	6,87		
P3	3	3,84	3,73	97,09	2,91		

Tabla 9: Porcentaje de impurezas inorgánicas obtenidas en cada uno de los análisis por TGA, media y desviación estándar

A continuación, se representa la media del porcentaje de impurezas inorgánicas en cada polímero y su desviación estándar (Fig. 22).

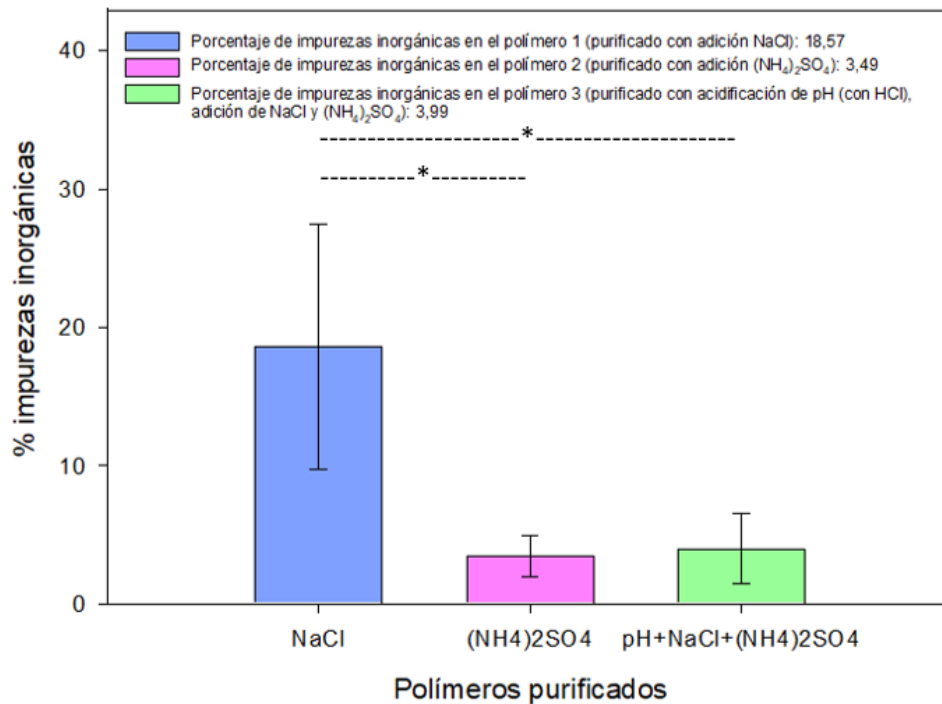


Figura 22. Media del porcentaje de impurezas inorgánicas obtenidas por TGA y su desviación estándar (*: hay diferencias estadísticamente significativas con nivel de significación de 5%, $P > 0,05$)

Se llevará a cabo un análisis de la varianza (ANOVA), que compara la varianza entre las medias de grupo frente a la varianza dentro de los grupos, es decir, determina las diferencias entre los grupos y en el propio grupo.

En este caso, se emplea el ANOVA de una vía (con una variable dependiente, el porcentaje de impurezas inorgánicas y como único factor, los polímeros) para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de tres grupos (polímeros 1, 2 y 3).

El análisis ANOVA se utiliza para contrastar una hipótesis nula, que establece que las medias son iguales, con una hipótesis alternativa, según la cual las medias no son iguales.

Análisis de la varianza:

El software utilizado, Statgraphics, crea la tabla ANOVA descomponiendo la varianza de porcentaje de impurezas inorgánicas en dos componentes: un componente entre-grupos y otro componente dentro-de-grupos (Intra-grupos).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	441,52	2	220,76	7,64	0,02
Intra grupos	173,46	6	28,91		
Total (Corr.)	614,99	8			

Tabla 10: Tabla AVOVA para TGA

En la tabla 10, se observa que la variación entre las medidas de las muestras entre grupos es significativamente mayor que la variabilidad dentro de grupos ($Razón-F > F_{crit(0,05;2;6)}=5,14$), las medias entre los grupos no son similares.

Además, el valor-P (0,02) de la prueba-F es menor que 0,05 (operando a un nivel de significación 5%), lo cual indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de impurezas inorgánicas entre un nivel de muestra (polímero) y otro, con un nivel del 5% de significación.

En la fig. 23 se muestran los resultados del modelo ANOVA en formato gráfico:

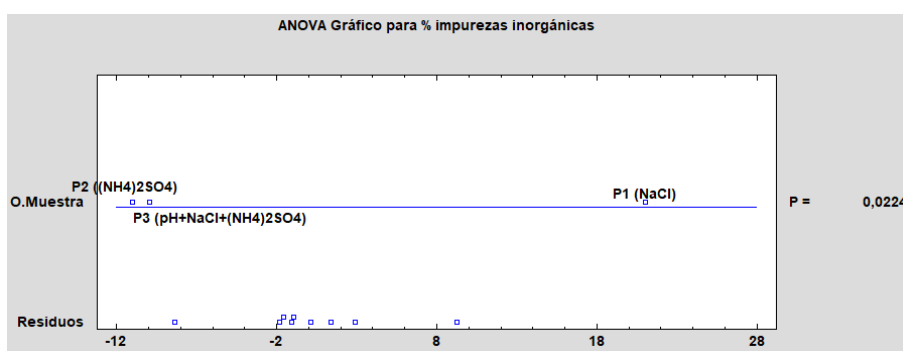


Figura 23. ANOVA gráfico para temperatura de transición por TGA

Como se puede apreciar, el grupo P1 está separado de los otros dos.

Para determinar qué medias son significativamente diferentes de otras, se realiza una comparación mediante “Pruebas de Múltiples Rangos”.

Comparación de medias:

Dado el P-valor en la tabla AVOVA, 0,02 (menor que 0,05), la media de la muestra debe ser examinada para determinar qué medias son significativamente diferentes de otras a partir de la realización de “Pruebas de Múltiples Rangos”. Se obtienen los resultados de las tablas 11 y 12.

O. Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	3	3,49	X
P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	3	3,99	X
P1 (NaCl)	3	18,59	X

Tabla 11: Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para TGA

Contraste	Sig.	Diferencia	±Límites
P1 (NaCl) - P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	*	15,10	10,74
P1 (NaCl) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	*	14,60	10,74
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)		-0,50	10,74

Tabla 12: Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para TGA

La tabla 12, muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. La columna *Diferencia* muestra la media del primer grupo menos el segundo y la columna *±Límites* muestra el intervalo de confianza para la diferencia. El asterisco en la columna *Sig.*, indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la tabla 11 (*Grupos Homogéneos*) se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten la misma posición de X dentro de la columna. El método que se ha empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

El mismo análisis puede ser mostrado en forma de Gráfico de medias (Fig. 24), que permite ver cada media de la muestra con un intervalo de confianza a su alrededor.

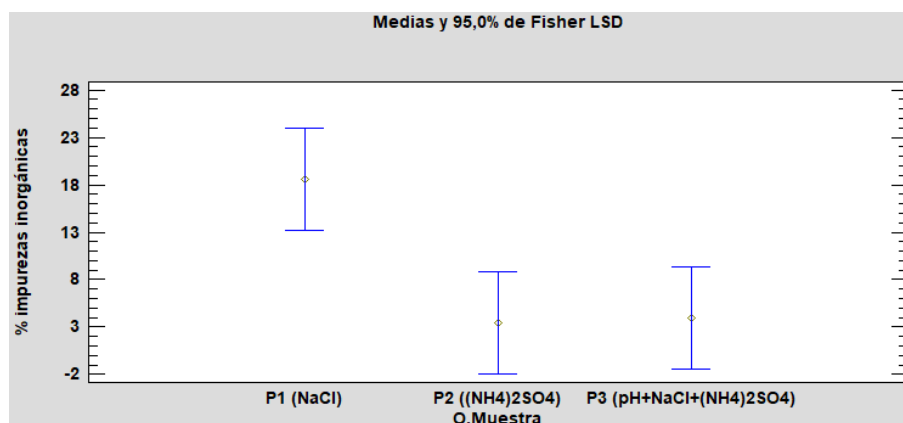


Figura 24. Gráfico de medias para TGA con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD

Se han empleado intervalos de Fisher LSD, escalonados de modo que un par de muestras tiene medias significativamente diferentes si los intervalos no se solapan en la dirección vertical. La posibilidad de considerar incorrectamente dos muestras con media diferente aplicando este método, sería del 5%.

En nuestro caso, se llega a la conclusión de que hay diferencias significativas entre las temperaturas de transición medias de los polímeros 1 y 2, y entre las de los polímeros 1 y 3.

Gráfico de residuos:

Necesario para verificar el supuesto de que los residuos están distribuidos aleatoriamente a los lados del 0 y no siguen ninguna tendencia, es decir, nos permite determinar si el error es aleatorio. En la fig. 25, se presenta el gráfico de residuos correspondiente al porcentaje de impurezas obtenido por TGA, mostrando que el análisis que se ha realizado no da lugar a errores sistemáticos.

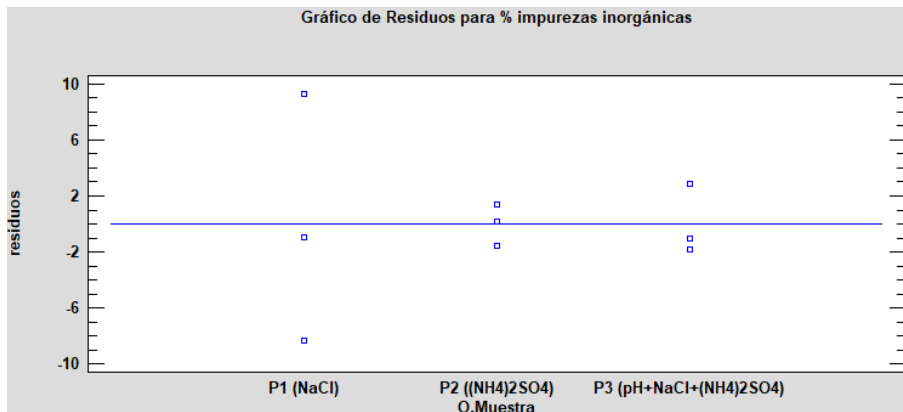


Figura 25. Gráfico de residuos TGA

6.2. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Se realizan tres medidas con cada una de las disoluciones de polímero. Se obtiene una respuesta de la variación de energía entre la muestra correspondiente al polímero y el blanco de PBS 1X utilizado como referencia, por lo que se determina la temperatura de transición a la que el polímero forma estructuras micelares (Fig. 26).

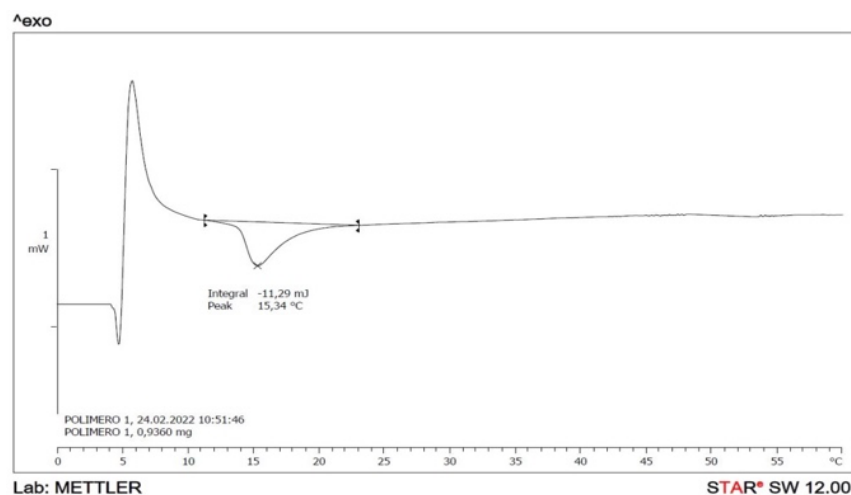


Figura 26. DSC del polímero 1 (repetición 1), purificado con NaCl, temperatura de transición: 15,34°C

El resto de gráficos obtenidos con sus respectivas temperaturas de transición, se recogen en el anexo 10.2.

En la tabla 13 se muestran: las masas pesadas de muestra y de referencia, se calcula la masa de polímero en cada una, la temperatura de transición. Con estos datos se determina el promedio de la temperatura de cada una de las disoluciones y su desviación estándar.

Muestra	Repetición	Masa muestra (mg)	Masa referencia (mg)	Masa polímero (mg)	Temperatura transición (°C)	Temperatura media (°C)	Desviación estándar
P1	1	18,72	18,86	0,94	15,34	15,37	± 0,05
P1	2	19,36	19,34	0,97	15,42		
P1	3	18,61	18,64	0,93	15,34		
P2	1	18,62	18,63	0,93	15,25	15,17	± 0,22
P2	2	18,42	18,34	0,92	15,33		
P2	3	19,66	19,67	0,98	14,92		
P3	1	19,06	19,05	0,95	15,67	15,70	± 0,12
P3	2	19,41	19,42	0,97	15,83		
P3	3	19,18	19,2	0,96	15,59		

Tabla 13: Temperaturas de transición obtenidas en cada uno de los análisis por DSC, media y desviación estándar

A continuación, se representa la temperatura de transición media obtenida para cada polímero y su desviación estándar (Fig. 27).

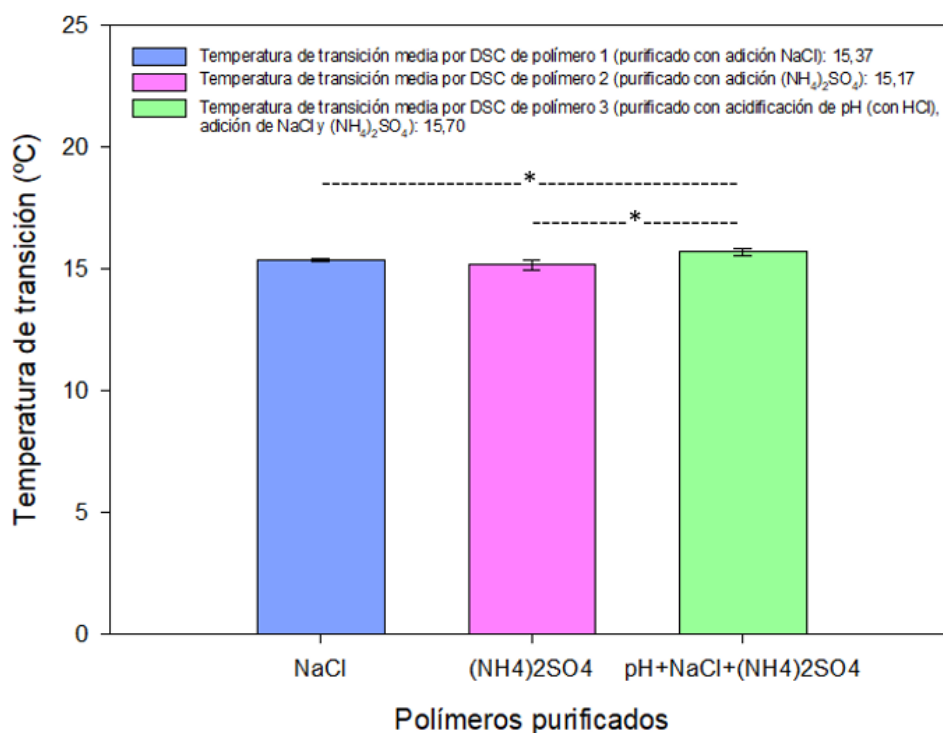


Figura 27. Temperaturas de transición medias obtenidas por DSC y su desviación estándar (*: hay diferencias estadísticamente significativas con nivel de significación de 5%, $P > 0,05$)

Se realiza un ANOVA de una vía para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las tres muestras de polímero.

Análisis de la varianza:

El software utilizado, Statgraphics, crea la tabla ANOVA descomponiendo la varianza de Temperatura de transición en dos componentes: un componente entre-grupos y otro componente dentro-de-grupos (Intra-grupos). Si la variabilidad entre grupos es significativamente mayor que la variabilidad dentro de grupos (razón-F > $F_{\text{crít}(0,05;2;6)}=5,14$), es evidente que las medias entre los grupos no son similares (Tabla 14).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,43	2	0,21	10,03	0,01
Intra grupos	0,13	6	0,02		
Total (Corr.)	0,56	8			

Tabla 14: Tabla AVOVA para DSC

Puesto que el valor-P (0,01) de la prueba-F es menor que 0,05 (operando a un nivel de significación 5%), existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de temperatura transición entre un nivel de muestra y otro, con un nivel del 5% de significación.

En la fig. 28 se muestran los resultados del modelo ANOVA en formato gráfico:

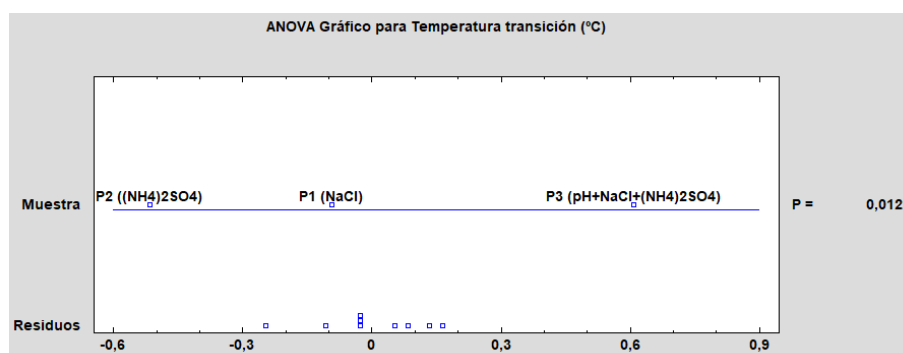


Figura 28. ANOVA gráfico para temperatura de transición por DSC

Como se puede apreciar, el grupo P3 está separado de los otros dos.

Para determinar qué medias son significativamente diferentes de otras, se realizan una comparación mediante "Pruebas de Múltiples Rangos".

Comparación de medias:

Dado el P-valor en la tabla AVOVA, 0,01 (menor que 0,05), la media de la muestra debe ser examinada para determinar qué medias son significativamente diferentes de otras a partir de

la realización de “Pruebas de Múltiples Rangos”. Se obtienen los resultados de las tablas 15 y 16.

A.Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	3	15,17	X
P1 (NaCl)	3	15,37	X
P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	3	15,70	X

Tabla 15: Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para DSC

Contraste	Sig.	Diferencia	±Límites
P1 (NaCl) - P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)		0,2	0,29
P1 (NaCl) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	*	-0,33	0,29
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	*	-0,53	0,29

Tabla 16: Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para DSC

La tabla 16, muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. La columna *Diferencia* muestra la media del primer grupo menos el segundo y la columna *±Límites* muestra el intervalo de confianza para la diferencia. El asterisco en la columna *Sig.*, indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la tabla 15 (*Grupos Homogéneos*) se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten la misma posición de X dentro de la columna. El método que se ha empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

El mismo análisis puede ser mostrado en forma de Gráfico de medias (Fig. 29), que muestra cada media de la muestra con un intervalo de confianza a su alrededor.

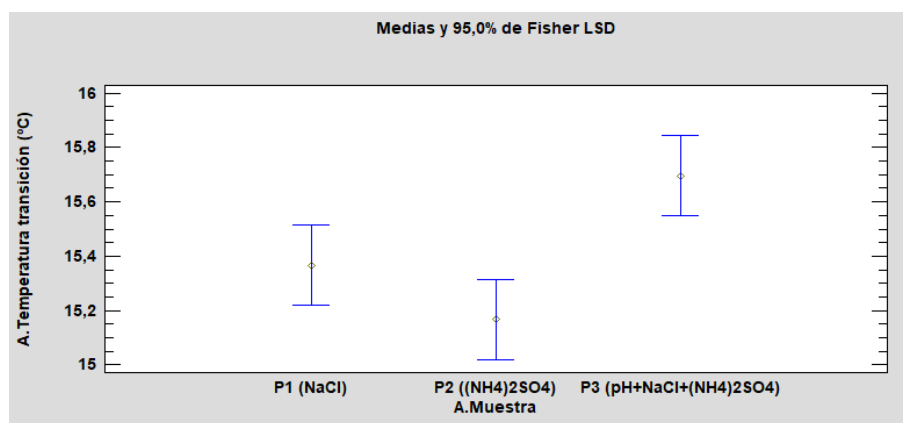


Figura 29. Gráfico de medias para DSC con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD

Se han empleado intervalos de Fisher LSD, escalonados de modo que un par de muestras tiene medias significativamente diferentes si los intervalos no se solapan en la dirección vertical. La posibilidad de considerar incorrectamente dos muestras con media diferente aplicando este método, sería del 5%.

En nuestro caso, se llega a la conclusión de que hay diferencias significativas entre las temperaturas de transición medias de los polímeros 3 y 1, y entre las de los polímeros 3 y 2.

Gráfico de residuos:

Necesario para verificar el supuesto de que los residuos están distribuidos aleatoriamente a los lados del 0 y no siguen ninguna tendencia, es decir, nos permite determinar si el error es aleatorio. En la fig. 30, se presenta el gráfico de residuos correspondiente a las temperaturas de transición obtenidas por DSC, mostrando que el análisis que se ha realizado no da lugar a errores sistemáticos.

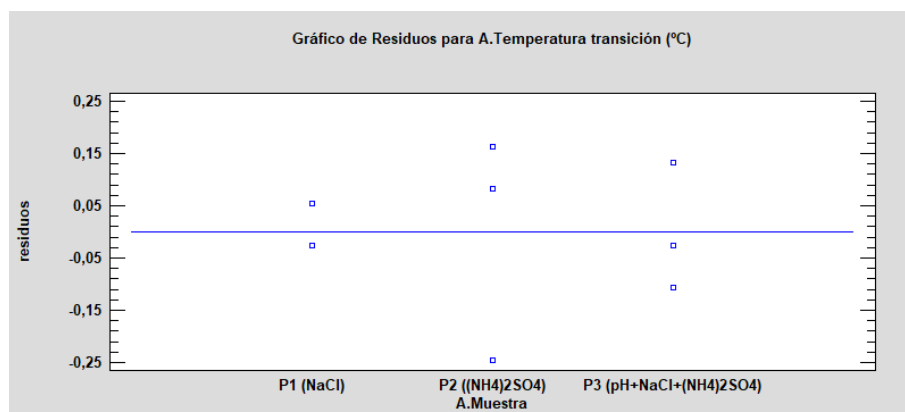


Figura 30. Gráfico de residuos DSC

6.3. Turbidimetría

Se hacen barridos de los polímeros y el blanco entre 200 y 800 nm a 25°C y se obtiene una respuesta según lo reflejado en las fig. 31 y 32 y anexo 10.3.

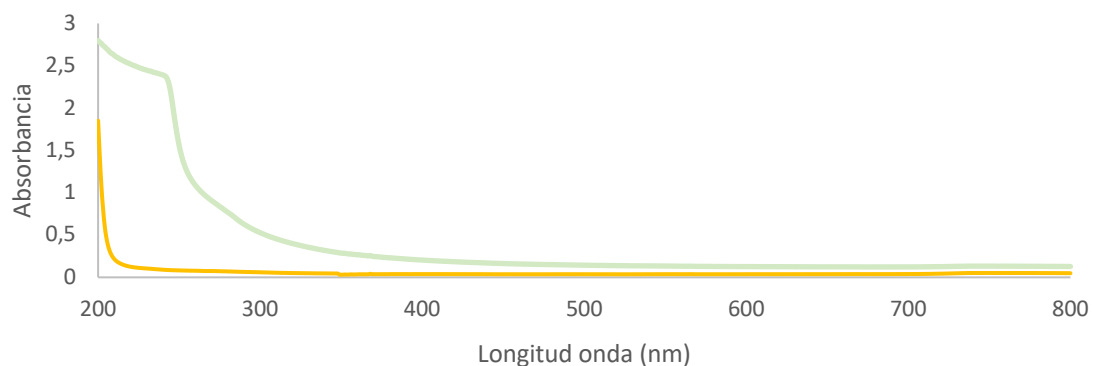


Figura 31. Barrido de 800 a 200 nm a 25°C del polímero 3 en PBS 1X y el blanco en cubetas de cuarzo

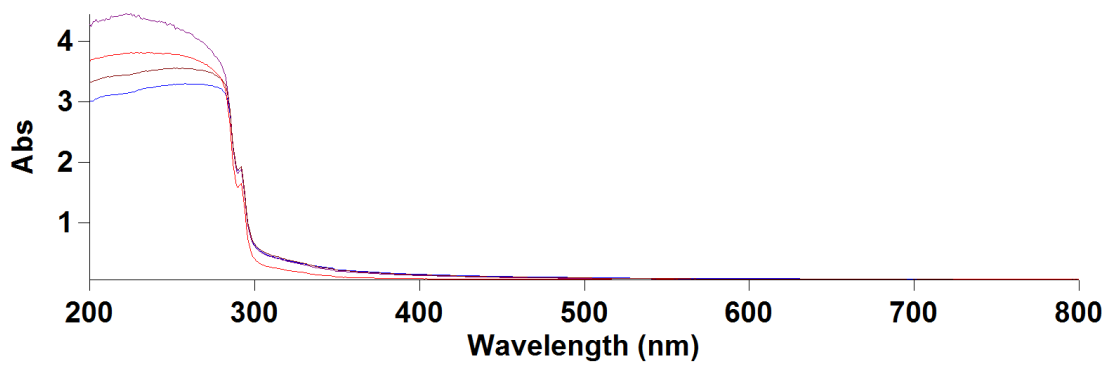


Figura 32. Barrido de 800 a 200 nm a 25°C de los polímeros en PBS 1X y el PBS 1X en cubetas de plástico

A continuación, con el fin de evitar posibles modificaciones en los polímeros al medir en ultravioleta a bajas longitudes de onda, se hace el estudio de la variación de la absorbancia frente a la temperatura a 350 nm, para disoluciones de los polímeros a concentraciones de 5 y 10 mg/mL, y se calcula la primera derivada para obtener la temperatura donde la pendiente adquiere un valor máximo, punto medio de la sigmoide, que corresponde a la temperatura de transición (Fig. 33 y 34 y anexo 10.3).

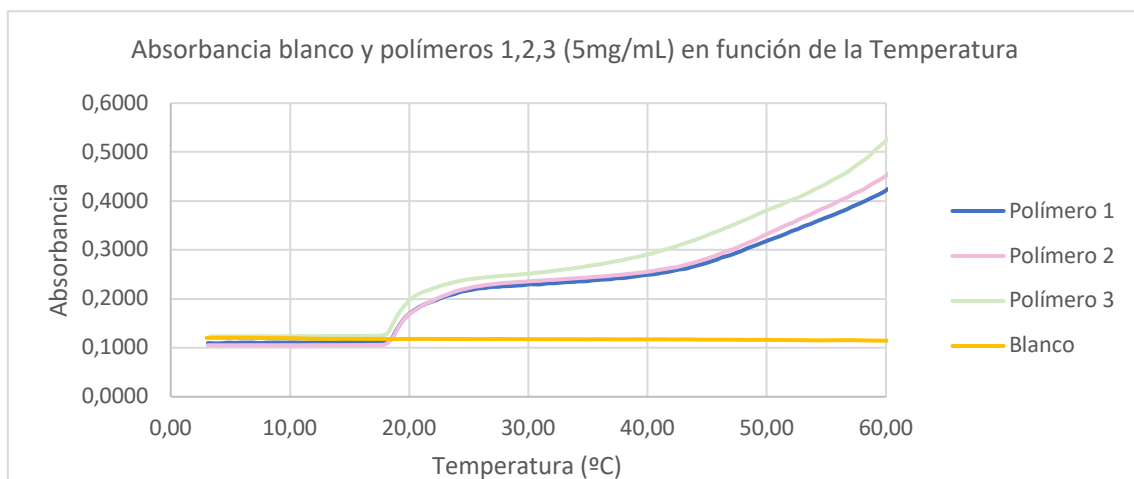


Figura 33. Representación de absorbancia frente a temperatura para turbidimetría de polímeros a 5 mg/mL en PBS 1X y blanco

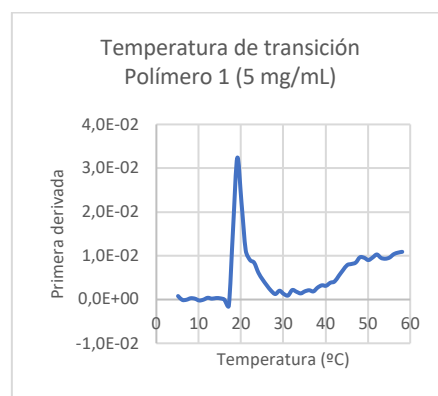


Figura 34. Gráfica de la primera derivada del polímero 1 a 5 mg/mL en PBS 1X para turbidimetría

Se aumenta la concentración de las disoluciones de polímero a 10 mg/mL y se repite el mismo procedimiento, ya que con las de 5 mg/mL los valores de absorbancia son muy bajos. De este modo se consigue mejorar la relación señal/ruido, ya que se incrementa el número de partículas y con ello, la señal. (Fig. 35, 36 y anexo 10.3)

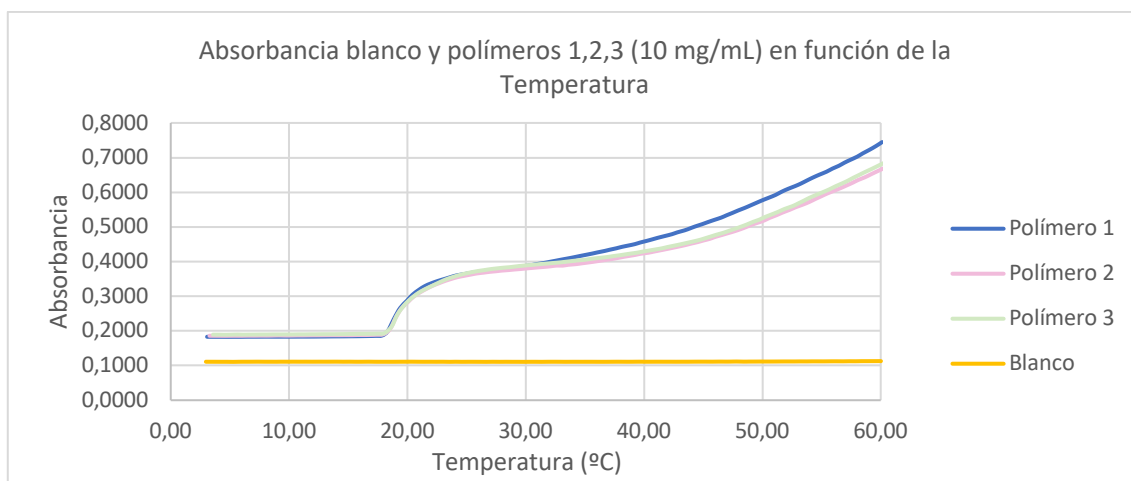


Figura 35. Representación de absorbancia frente a temperatura para turbidimetría de polímeros a 10 mg/mL en PBS 1X y blanco

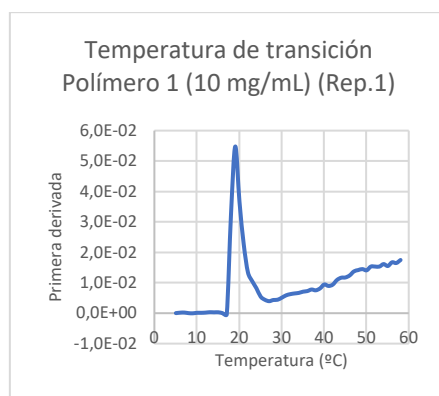


Figura 36. Gráfica de la primera derivada del polímero 1 a 10 mg/mL en PBS 1X, repetición 1 para turbidimetría

En la tabla 17, se recogen las temperaturas de transición de cada uno de los análisis, su promedio y desviación estándar.

Muestra	Repetición	Temperatura transición (°C)	Temperatura media (°C)	Desviación estándar
P1	1	19,07	19,02	± 0,05
P1	2	18,97		
P1	3	19,02		
P2	1	19,27	19,12	± 0,15
P2	2	18,97		
P2	3	19,12		
P3	1	19,57	19,27	± 0,26
P3	2	19,12		
P3	3	19,12		

Tabla 17: Temperaturas de transición obtenidas en cada uno de los análisis por turbidimetría, media y desviación estándar

A continuación, se representa la temperatura media obtenida para cada polímero y su desviación estándar (Fig. 37).

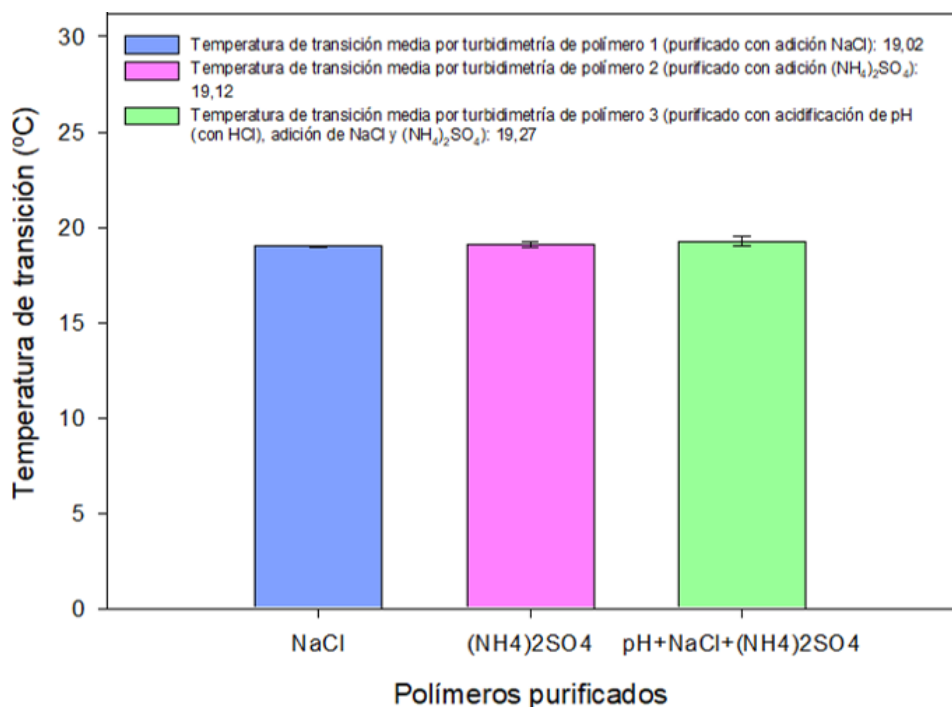


Figura 37. Temperaturas de transición medias obtenidas por turbidimetría y su desviación estándar

Se realiza un ANOVA de una vía para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tres polímeros.

La variable dependiente en este caso es la temperatura de transición, y el factor son los polímeros.

Análisis de la varianza:

Se sigue el mismo procedimiento que el desarrollo en el apartado anterior. Se crea la tabla ANOVA descomponiendo la varianza de Temperatura transición en un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,10	2	0,05	1,54	0,29
Intra grupos	0,19	6	0,03		
Total (Corr.)	0,29	8			

Tabla 18: Tabla ANOVA para turbidimetría

La variación entre las medias de las muestras entre grupos es poco mayor que la de dentro de grupos (razón-F < $F_{\text{crit}(0,05;2;6)}=5,14$), las medias entre los grupos son similares.

Puesto que el valor-P (0,29) de la prueba-F es mayor que 0,05, no existe diferencia estadísticamente significativa entre la media de temperatura transición de un polímero y otro, con un nivel del 5% de significación.

A continuación, se muestran los resultados del modelo ANOVA en formato gráfico (Fig. 38):

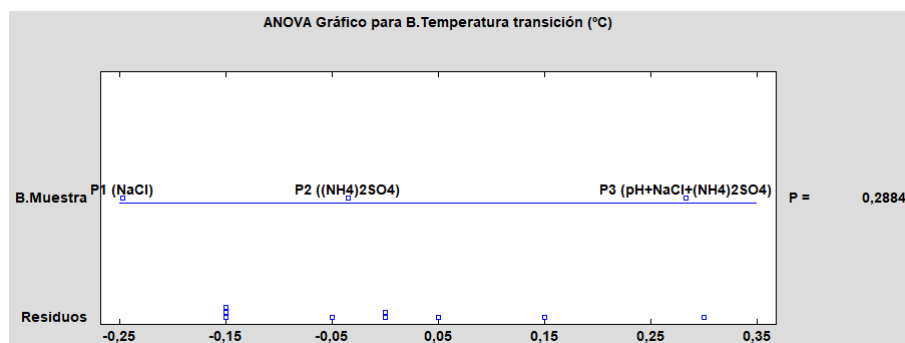


Figura 38. ANOVA gráfico para temperatura de transición por turbidimetría

No se observan diferencias significativas entre las medias de las temperaturas de transición, lo que se confirma a continuación mediante “Pruebas de Múltiples Rangos”.

Comparación de medias:

B. Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P1 (NaCl)	3	19,02	X
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	3	19,12	X
P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	3	19,27	X

Tabla 19: Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para turbidimetría

Contraste	Sig.	Diferencia	± Límites
P1 (NaCl) - P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)		-0,10	0,35
P1 (NaCl) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)		-0,25	0,35
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)		-0,15	0,35

Tabla 20: Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para turbidimetría

A la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos pares de medias con nivel de confianza del 95%. En la tabla 19, en *Grupos Homogéneos*, todas las X comparten una misma posición en la columna, esto confirma que no existen diferencias estadísticamente significativas.

El mismo análisis puede ser mostrado en forma de Gráfico de medias (Fig. 39).

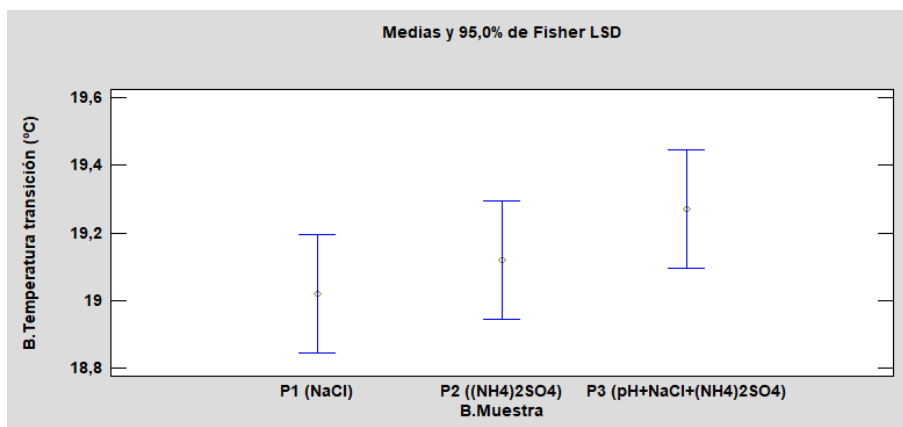


Figura 39. Gráfico de medias para turbidimetría con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD

Se han empleado intervalos de Fisher LSD.

Por esta técnica no se aprecian diferencias significativas entre las temperaturas de transición medias de los polímeros 1, 2 y 3

Gráfico de residuos:

En la fig. 40, se presenta el gráfico de residuos correspondiente a las temperaturas de transición obtenidas por turbidimetría.

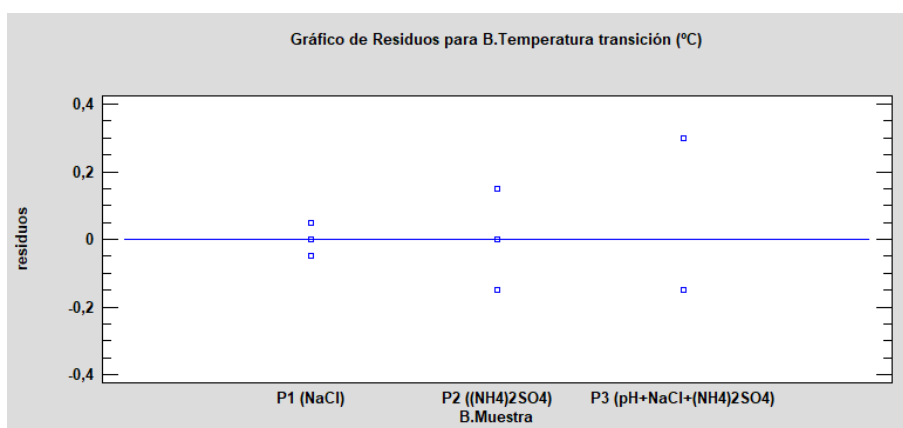


Figura 40. Gráfico de residuos turbidimetría

Los residuos están distribuidos aleatoriamente a ambos lados de lo que se toma como línea cero de abscisas y no siguen ninguna tendencia, es decir, el error sería de tipo aleatorio.

6.4. Zetasizer

6.4.a. Dispersión de luz dinámica (DLS)

Para determinar el tamaño de partícula, se realizan tres repeticiones con cada una de las disoluciones de polímero.

Se comienza tomando lecturas de las disoluciones 5 mg/mL en PBS 1X a 4 y a 37°C. Al finalizar los análisis se obtienen gráficos de los siguientes tipos:

- **Correlogramas:** se representa la variación del coeficiente de correlación del tamaño de partículas en función del tiempo para 4°C y 37°C, deduciéndose de la mayor pendiente que a 37°C las partículas presentan un tamaño similar (Fig. 41 y anexo 10.4).

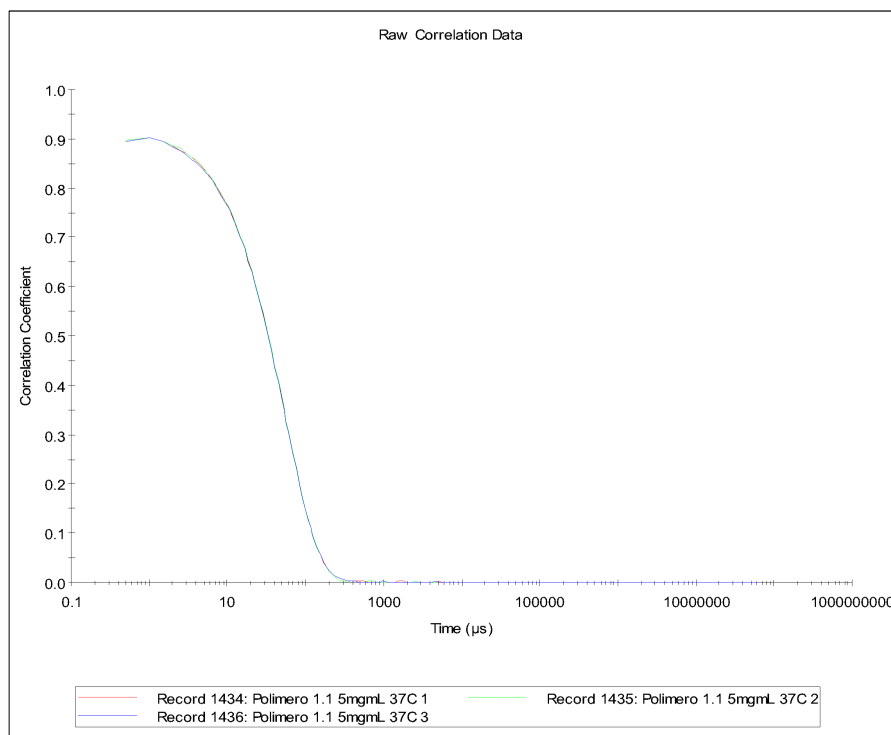
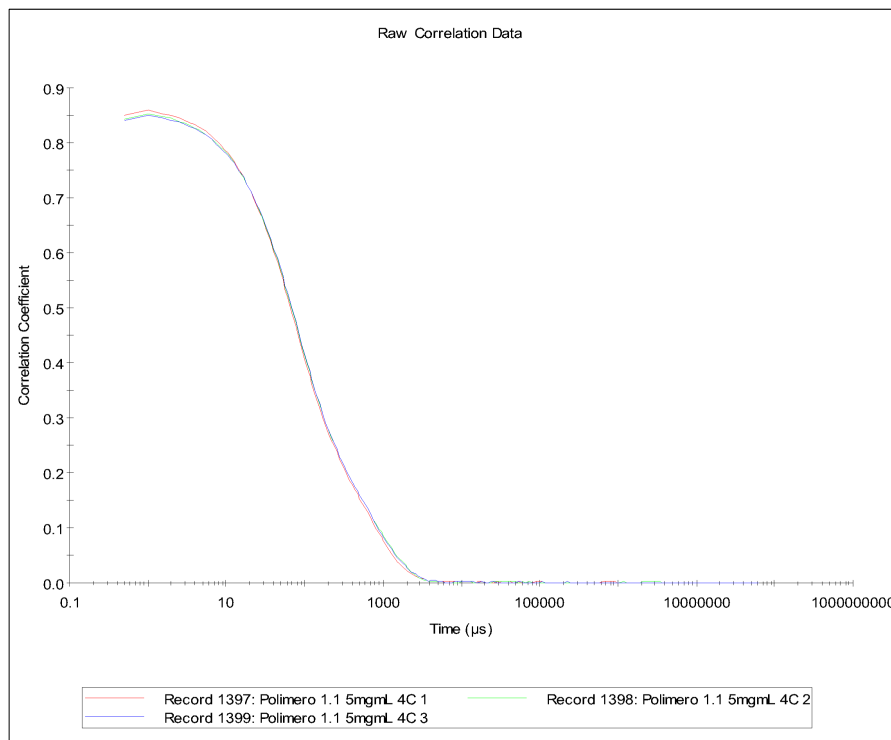


Figura 41. Correlogramas del polímero 1 a 5 mg/mL en PBS 1X (repetición 1) a 4 y 37°C

- **Intensidad:** se representa la intensidad de luz dispersada frente al tamaño de las partículas. Como se puede observar, en la figura 42 (y anexo 10.4), aparecen a 4°C aparecen dos bandas de distribución bien definidas, correspondientes a tamaños de partículas diferentes, mientras que a 37°C únicamente se aprecia una banda de distribución lo que confirma la homogeneidad de las partículas a esta temperatura.

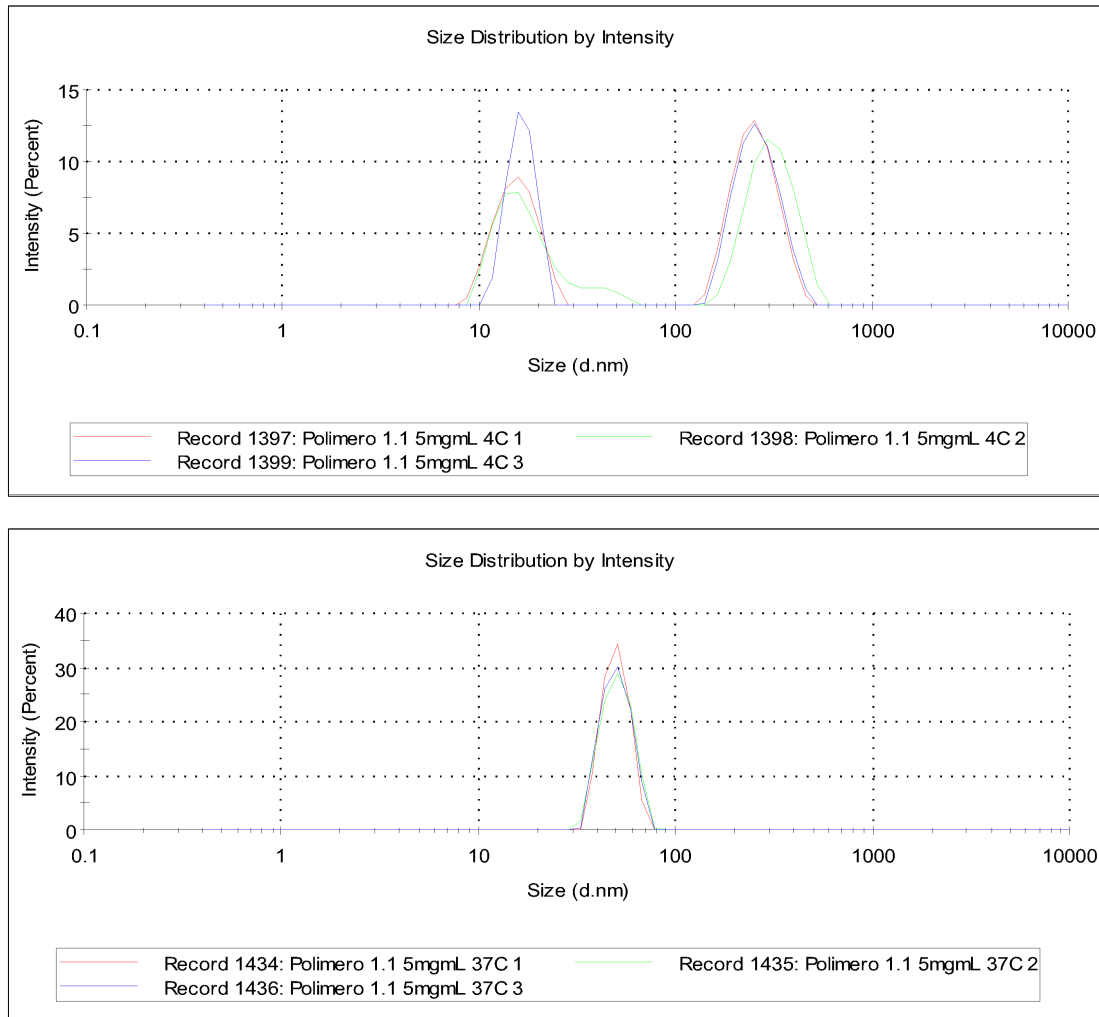


Figura 42. Distribución de tamaño de partícula por intensidad de polímero 1 a 5 mg/mL en PBS 1X (repetición 1) a 4 y 37°C

- **Volumen:** se representa la distribución del volumen de las partículas frente a su tamaño. Como se puede observar en la figura 43 (y anexo 10.4), aparecen varias bandas de distribución a 4°C mientras que a 37°C solo se observa una única banda, lo cual confirma la homogeneidad de las partículas a esta temperatura.

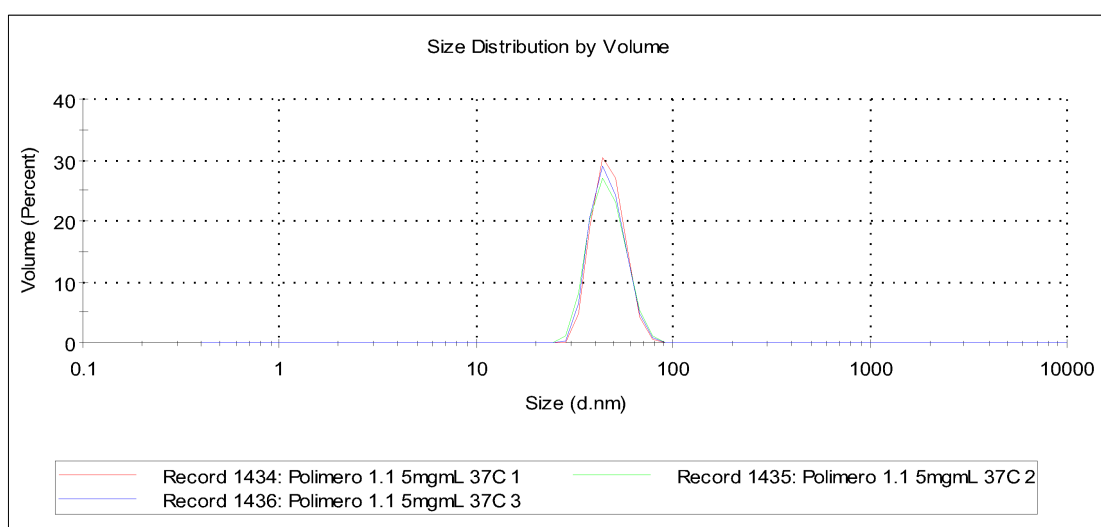
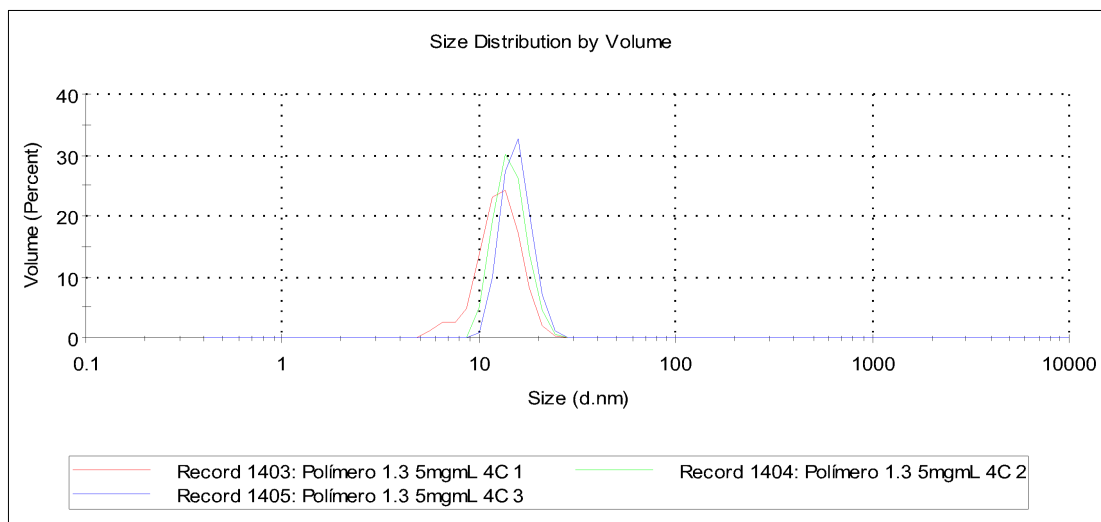


Figura 43. Distribución de tamaño de partícula por volumen del polímero 1 a 5 mg/mL en PBS 1X (repetición 1) a 4 y 37°C

Se repite el mismo procedimiento con los polímeros disueltos a concentraciones 5 mg/mL y 1 mg/mL en agua mQ.

En la tabla 21 y fig. 44...49, se representa el tamaño medio de las partículas y su desviación estándar para cada polímero, en las diferentes condiciones de medida: medio, concentración y temperatura.

Técnica analítica	Qué se mide	Disolvente	Concent. polímero	Rep.	Polímero 1			Polímero 2			Polímero 3			
					Respuesta	Media	Desviación estándar	Respuesta	Media	Desviación estándar	Respuesta	Media	Desviación estándar	
DLS	Tamaño de partícula a 4°C (nm)	PBS 1X	5 mg/mL	1	36,72	37,03	± 0,55	22,44	21,95	± 0,46	22,50	21,06	± 1,26	
				2	37,67			21,87			20,50			
				3	36,71			21,53			20,18			
		Agua mQ	5 mg/mL	1	183,07	176,98	± 5,15	22,53	22,69	± 0,61	21,23	19,93	± 0,96	
				2	178,97			21,98			19,24			
				3	171,20			23,45			20,08			
				4	174,70			22,81			19,18			
			1 mg/mL	1	61,70	49,58	± 1,19	21,48	20,67	± 1,76	20,70	21,09	± 1,73	
				2	50,63			18,85			19,33			
		Índice de polidispersidad (Pdl) a 4°C (Adimensional)	PBS 1X	5 mg/mL	1	0,913	0,932	± 0,025	0,405	0,406	± 0,006	0,395	0,393	± 0,07
					2	0,961			0,413			0,399		
					3	0,922			0,401			0,385		
	Agua mQ		5 mg/mL	1	0,814	0,787	± 0,034	0,946	0,960	± 0,018	0,981	0,983	± 0,012	
				2	0,751			0,985			1,000			
				3	0,818			0,955			0,977			
				4	0,763			0,953			0,975			
			1 mg/mL	1	1,000	1,000	± 0,000	0,859	0,842	± 0,026	0,946	0,958	± 0,014	
				2	1,000			0,837			0,976			
	Tamaño de partícula a 37°C (nm)		PBS 1X	5 mg/mL	1	49,16	48,79	± 0,34	46,93	46,68	± 0,25	47,10	46,87	± 0,26
					2	48,74			46,69			46,92		
					3	48,49			46,44			46,59		
		Agua mQ	5 mg/mL	1	83,65	62,38	± 1,87	25,16	25,30	± 0,17	43,42	36,07	± 6,77	
				2	62,94			25,30			30,10			
				3	60,30			25,54			58,40			
				4	63,91			25,20			34,70			
			1 mg/mL	1	88,65	85,61	± 4,47	53,24	56,84	± 6,23	114,60	108,65	± 13,78	
				2	87,71			55,84			92,89			
		Índice de polidispersidad (Pdl) a 37°C (Adimensional)	PBS 1X	5 mg/mL	1	0,027	0,038	± 0,009	0,020	0,021	± 0,001	0,019	0,013	± 0,006
					2	0,044			0,021			0,011		
					3	0,042			0,021			0,009		
	Agua mQ		5 mg/mL	1	1,000	1,00	± 0,00	0,434	0,435	± 0,032	0,536	0,487	± 0,043	
				2	1,000			0,422			0,457			
				3	1,000			0,480			0,567			
				4	1,000			0,406			0,468			
			1 mg/mL	1	0,612	0,614	± 0,016	0,534	0,554	± 0,026	0,411	0,409	± 0,097	
				2	0,599			0,577			0,505			
				3	0,631					0,311				
				4	0,649			0,528		0,381				

Tabla 21: Tamaño de partícula e índice de polidispersidad obtenidos por DLS, media y desviación estándar (Los valores de tamaño resaltados en color rojo no se han tenido en cuenta para la media ni para la desviación estándar, ya que se consideran outliers (valores muy distantes del resto). En consecuencia, tampoco se tiene en cuenta su Pdl (en gris))

Se observa cómo el índice de polidispersidad (Pdl) en este medio, a 4°C es del orden de la unidad, las partículas no han formado estructuras tipo micelas, pues no se ha alcanzado la temperatura de transición. A 37°C es próximo a cero, lo que indica que las partículas forman ya estructuras de tamaño similar.

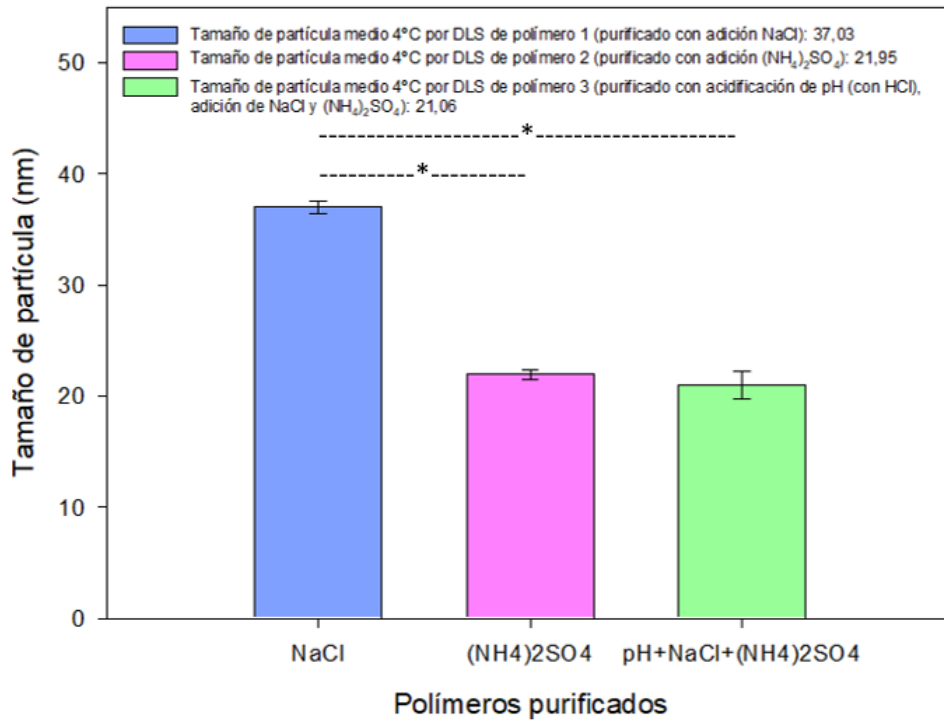


Figura 44. Tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS1X 5mg/mL

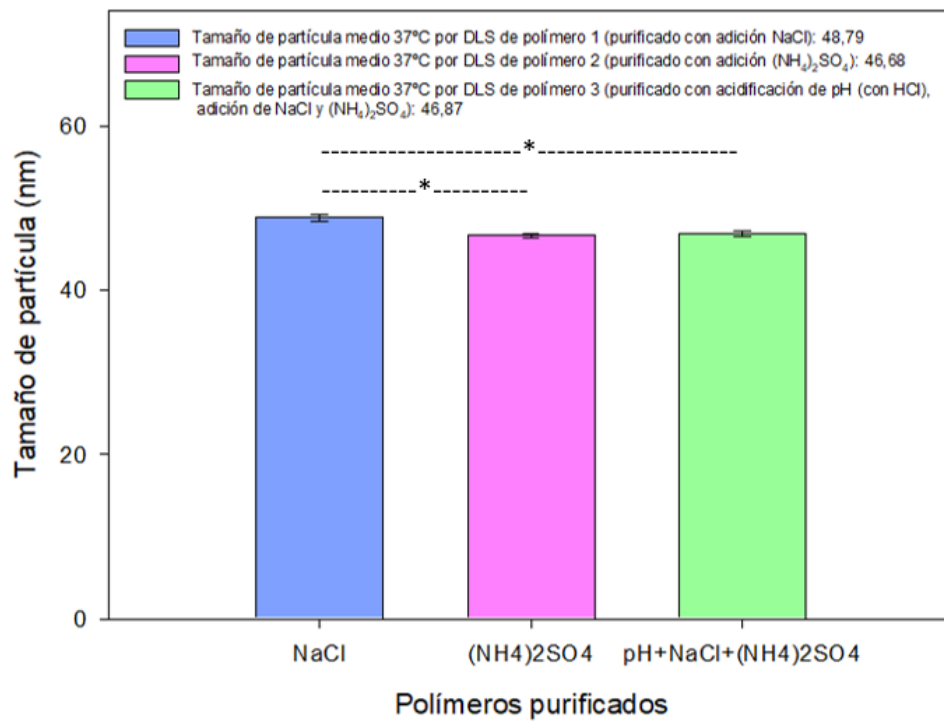


Figura 45. Tamaño de partícula por DLS a 37°C en PBS1X 5mg/mL

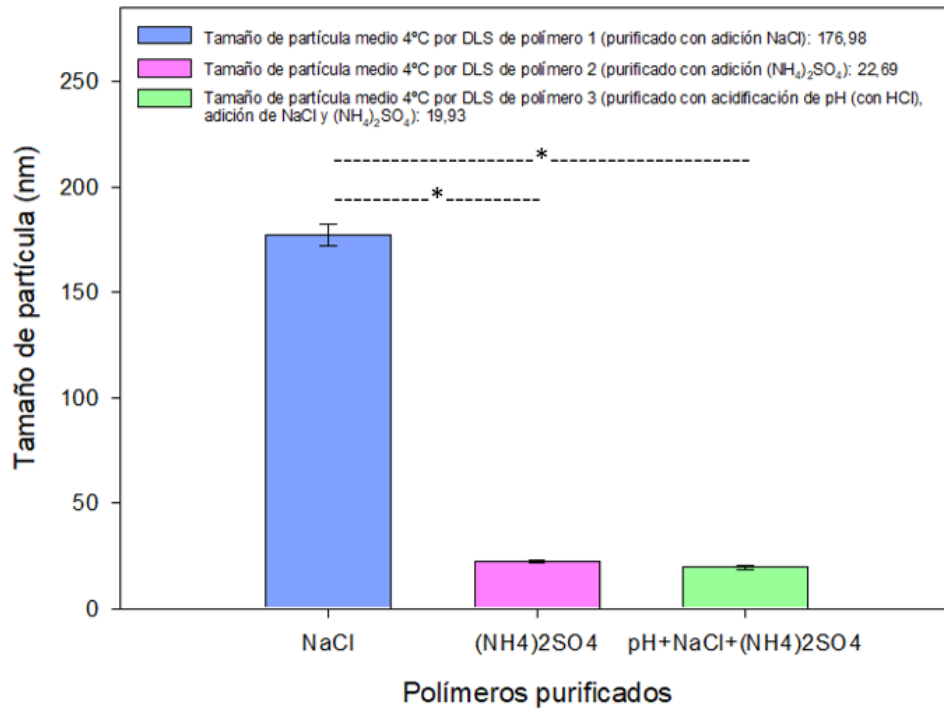


Figura 46. Tamaño de partícula por DLS a 4°C en mQ 5mg/mL

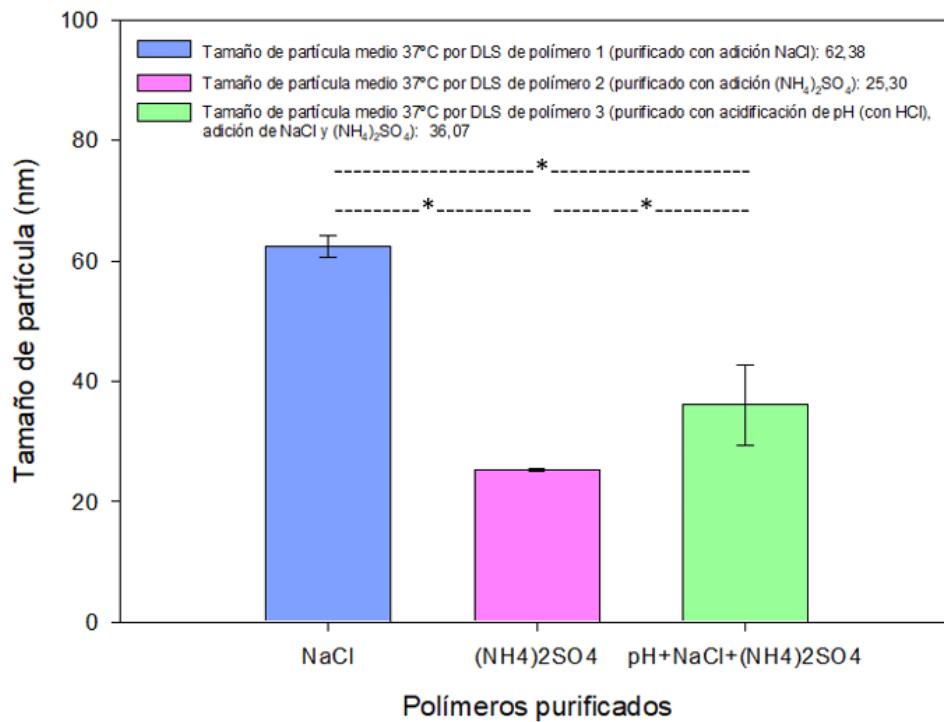


Figura 47. Tamaño de partícula por DLS a 37°C en mQ 5mg/mL

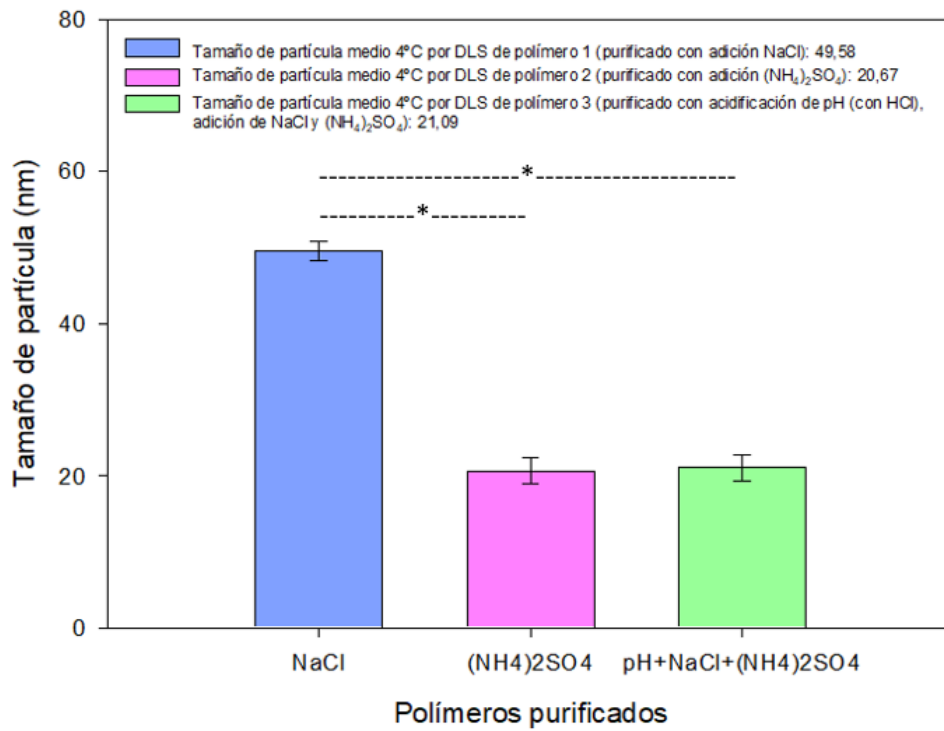


Figura 48. Tamaño de partícula por DLS a 4°C en mQ 1mg/mL

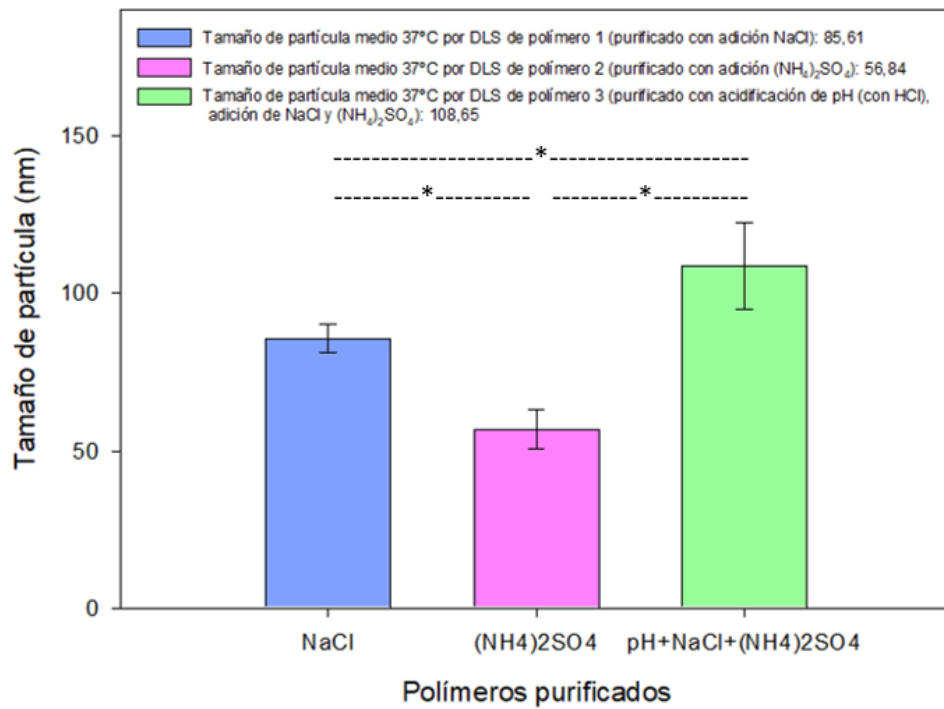


Figura 49. Tamaño de partícula por DLS a 37°C en mQ 1mg/mL

Se realizan los ANOVA de una vía, solo para los resultados obtenidos de los polímeros disueltos en PBS 1X con concentración 5 mg/mL, por ser el medio más similar al de nuestro organismo.

Para el análisis, se considera que la variable dependiente tanto a 4°C como a 37°C es el tamaño de partícula y el factor es la muestra (los polímeros).

- Tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X (concentración de los polímeros 5mg/mL):

Análisis de la varianza:

El software crea la tabla ANOVA descomponiendo la varianza de tamaño de partícula en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	483,54	2	241,77	346,00	0,00
Intra grupos	4,19	6	0,70		
Total (Corr.)	487,73	8			

Tabla 22: Tabla AVOVA para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X

La variación entre las medias de las muestras entre grupos es significativamente mayor que la de dentro de grupos (razón-F >> $F_{\text{crít}(0,05;2;6)}=5,14$), las medias entre los grupos no son similares. También se observa que el valor-P (0,00) de la prueba-F es menor que 0,05, por lo que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de tamaño de partícula de un nivel de muestra y otro, con un 5% de significación, lo cual confirma la diferencia del tamaño de partículas a 4°C.

Esta apreciación se pone de manifiesto en la representación de los resultados por el modelo ANOVA en formato gráfico. (Fig. 50)

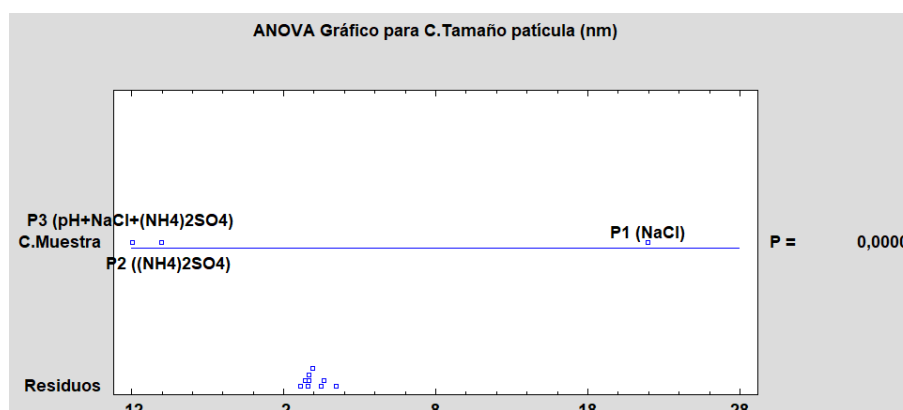


Figura 50. ANOVA gráfico para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X

Comparación de medias:

El valor-P reflejado en la en la tabla AVOVA anterior es 0,00, como se ha indicado anteriormente las medias entre los grupos son distintas, por lo que se debe determinar cuáles son significativamente diferentes entre pares, realizando para ello “Pruebas de Múltiples Rangos”. Los resultados se indican en las tablas 23 y 24.

C.Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	3	21,06	X
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	3	21,95	X
P1 (NaCl)	3	37,03	X

Tabla 23: Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X

Contraste	Sig.	Diferencia	± Límites
P1 (NaCl) - P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	*	15,09	1,67
P1 (NaCl) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	*	15,97	1,67
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)		0,89	1,67

Tabla 24: Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X

En la tabla 24, el asterisco en la columna *Sig.* indica que los pares de grupos P1 con P2 y P1 con P3 muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la tabla 24, en *Grupos Homogéneos*, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten la misma posición de X dentro de la columna.

El mismo análisis puede ser mostrado en forma de gráfico de medias (Fig. 51):

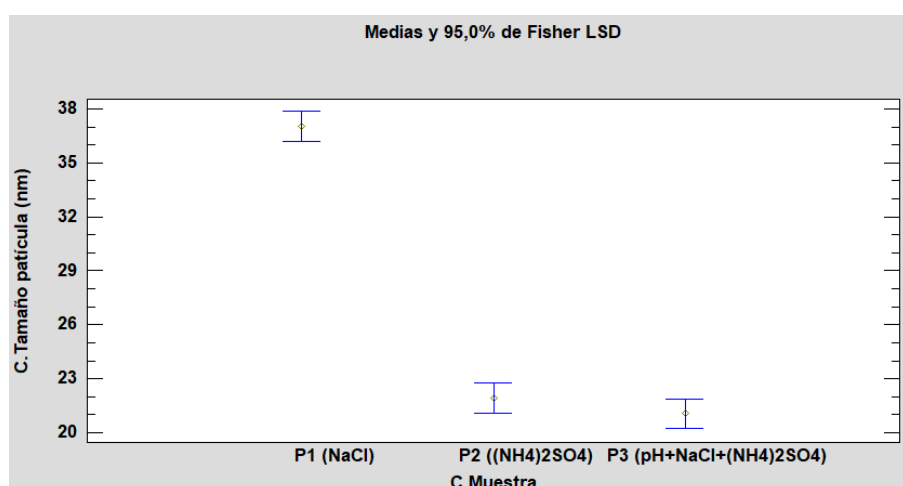


Figura 51. Gráfico de medias para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD

Se han empleado intervalos de Fisher LSD, llegando a la misma conclusión de que hay diferencias significativas entre el tamaño de partícula del polímero 1 con respecto al de los polímeros 2 y 3.

Gráfico de residuos:

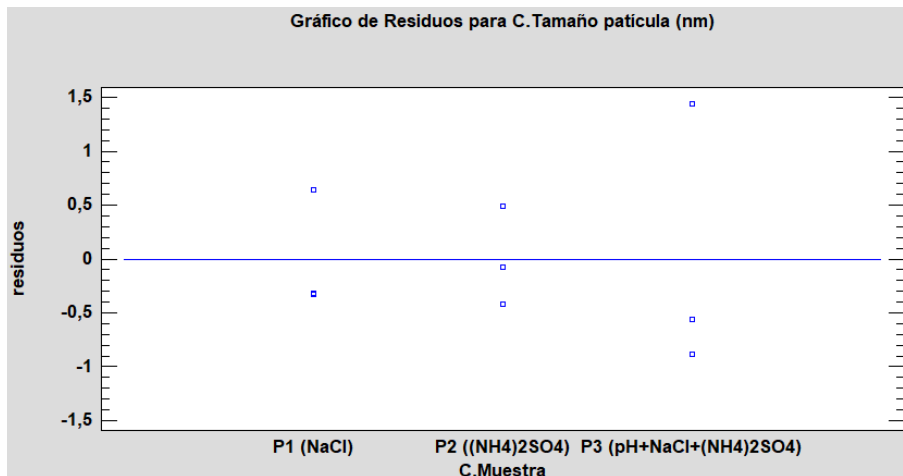


Figura 52. Gráfico de residuos DLS a 4°C en PBS 1X

Como se demuestra en la fig. 52, los residuos están distribuidos aleatoriamente a ambos lados de la línea cero de abscisas sin seguir ninguna tendencia, es decir, los errores de medida son aleatorios.

- Tamaño de partícula por DLS a 37°C en PBS 1X (concentración de los polímeros 5mg/mL):

Análisis de la varianza:

El software Statgraphics crea la tabla ANOVA descomponiendo la varianza de tamaño de partícula en dos componentes: uno entre-grupos y otro dentro-de-grupos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8,20	2	4,10	50,90	0,00
Intra grupos	0,48	6	0,08		
Total (Corr.)	8,68	8			

Tabla 25: Tabla AVOVA para tamaño de partícula por DLS a 37°C en PBS 1X

La variación entre las medias de las muestras entre grupos es significativamente mayor que la de dentro de grupos ($\text{razón-F} \gg F_{\text{crít}(0,05;2;6)}=5,14$), las medias entre los grupos no son similares.

Puesto que el valor-P (0,00) de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de tamaño de partícula de un polímero y otro, con un nivel del 5% de significación.

Mostrando los resultados del modelo ANOVA en formato gráfico:

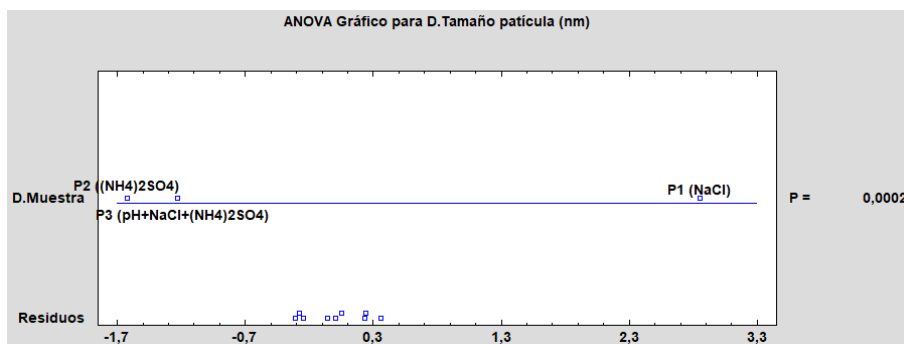


Figura 53. ANOVA gráfico para tamaño de partícula por DLS a 37°C en PBS 1X

En la fig. 53, el grupo P1 se encuentra bastante separado de los otros dos.

Comparación de medias:

El valor-P en la tabla AVOVA anterior es 0,00, menor que 0,05, lo que confirma que las medias entre los grupos son distintas. A continuación, se determina qué medias son significativamente diferentes entre pares realizando “Pruebas de Múltiples Rangos”.

D. Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	3	46,69	X
P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	3	46,87	X
P1 (NaCl)	3	48,80	X

Tabla 26: Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X

Contraste	Sig.	Diferencia	± Límites
P1 (NaCl) - P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	*	2,11	0,57
P1 (NaCl) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	*	1,93	0,57
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)		-0,18	0,57

Tabla 27: Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X

En la tabla 27, el asterisco en la columna Sig. indica que los pares de grupos P1 con P2 y P1 con P3 muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la tabla 26, en Grupos Homogéneos, se observa no existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten la misma posición de X dentro de la columna.

El mismo análisis puede ser mostrado en forma de gráfico de medias (Fig. 54):

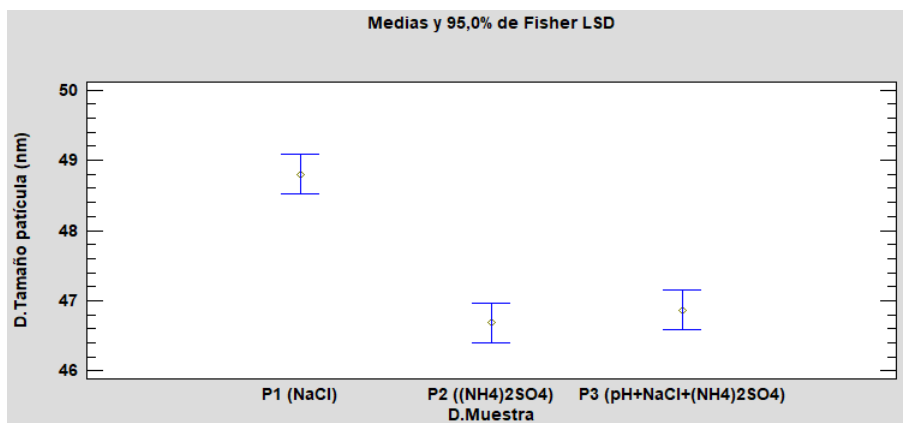


Figura 54. Gráfico de medias para tamaño de partícula por DLS a 37°C en PBS 1X con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD

Se han empleado intervalos de Fisher LSD, llegando a la misma conclusión de que hay diferencias significativas entre el tamaño medio de partícula del polímero 1 con respecto al de los polímeros 2 y 3.

Gráfico de residuos:

Como se puede ver en la fig. 55, los residuos están distribuidos aleatoriamente a ambos lados de la línea considerada como cero para las abscisas sin seguir ninguna tendencia, es decir, los errores son aleatorios.

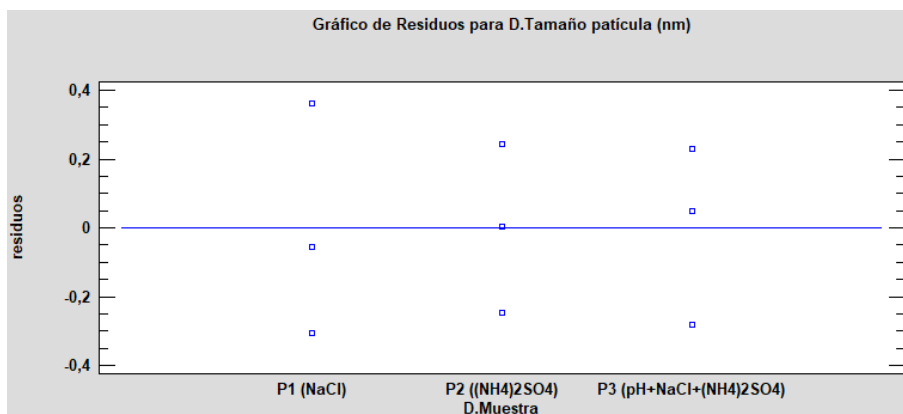


Figura 55. Gráfico de residuos DLS a 37°C en PBS 1X

6.4.b. Dispersión de luz electroforética (ELS)

Para determinar el potencial Z, se realizan tres medidas para cada una de las disoluciones del polímero. Del mismo modo que en el caso anterior, se miden disoluciones de 5 mg/mL en PBS 1X a 4 y a 37°C y en agua a 1 mg/mL y 5 mg/mL. Los resultados se muestran en la tabla 28.

Técnica analítica	Qué se mide	Disolvente	Concent. polímero	Rep.	Polímero 1			Polímero 2			Polímero 3			
					Respuesta	Media	Desviación estándar	Respuesta	Media	Desviación estándar	Respuesta	Media	Desviación estándar	
ELS	Potencial Z a 4 °C (mV)	PBS 1X	5 mg/mL	1	-8,04	-7,19	± 1,10	-6,48	-5,93	± 0,54	-6,27	-4,77	± 1,31	
				2	-5,95			-5,40			-4,18			
				3	-7,58			-5,91			-3,85			
		Agua mQ	5 mg/mL	1	-16,50	-15,88	± 0,63	-9,81	-11,99	± 1,66	-11,30	-11,69	± 0,73	
				2	-15,07			-13,53			-12,52			
				3	-15,70			-11,63			-5,22			
			1 mg/mL	4	-16,23	-22,89	± 0,99	-13,00	-15,29	± 3,53	-11,23	-14,12	± 3,23	
				1	-24,03			-19,80			-12,53			
				2	-22,37			-11,38			-17,37			
		Potencial Z a 37 °C (mV)	PBS 1X	5 mg/mL	1	-6,45	-7,46	± 1,11	-8,57	-7,42	± 1,02	-7,62	-6,69	± 1,17
					2	-7,28			-6,63			-7,06		
					3	-8,66			-7,05			-5,38		
	Agua mQ		5 mg/mL	1	-21,40	-20,90	± 0,39	-12,43	-17,22	± 0,95	-17,97	-20,64	± 1,98	
				2	-20,77			-17,40			-22,60			
				3	-20,47			-16,20			-20,50			
				4	-20,97			-18,07			-21,50			
			1 mg/mL	1	-29,4	-26,90	± 2,89	-26,1	-22,28	± 4,70	-24,2	-22,68	± 5,07	
	2	-30,6	-27,4	-26,0										
	3	-30,3	-22,6	-28,7										
	4	-24,1	-23,5	-29,9										

Tabla 28: Potencial Z obtenido por ELS, media y desviación estándar correspondiente.

(Los valores resaltados en color rojo no se han tenido en cuenta para la media ni para la desviación estándar ya que se consideran outliers o valores muy distantes del resto.)

A la vista de los resultados, se comprueba que el polímero presenta carga negativa, lo cual se justifica por el carácter ligeramente básico del medio (pH en torno a 7 y 7,4) donde se encuentran el ácido glutámico (E) y la isoleucina (I).

Para una mejor visualización de los resultados obtenidos para el potencial Z y su desviación en cada caso, se representa mediante un diagrama de barras el potencial Z para cada polímero en los diferentes medios, concentraciones y temperaturas (Fig. 56...61).

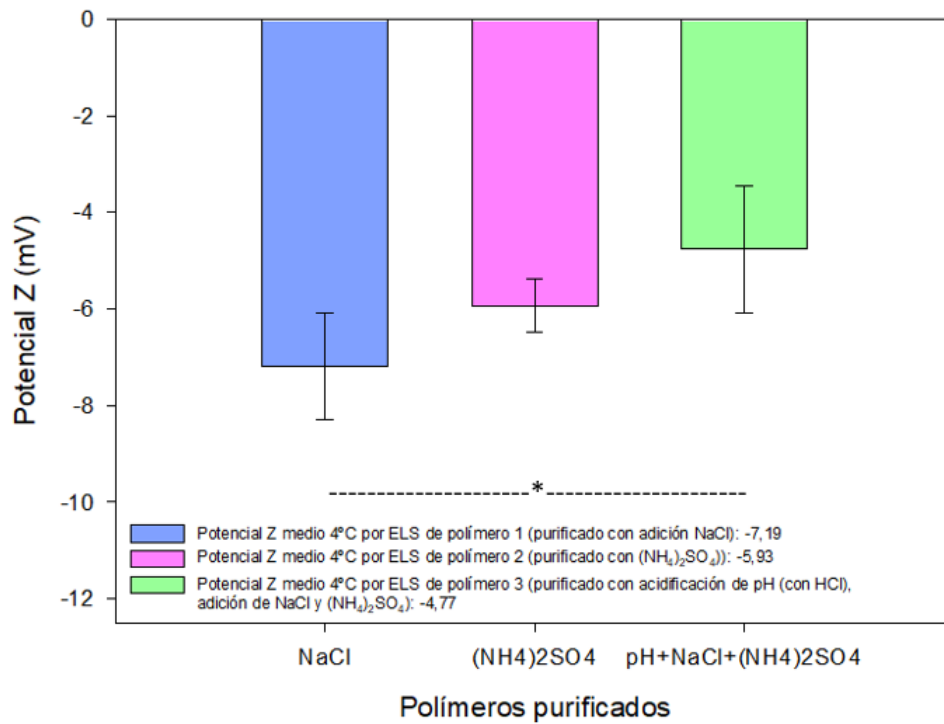


Figura 56. Potencial Z por ELS a 4°C en PBS1X 5mg/mL

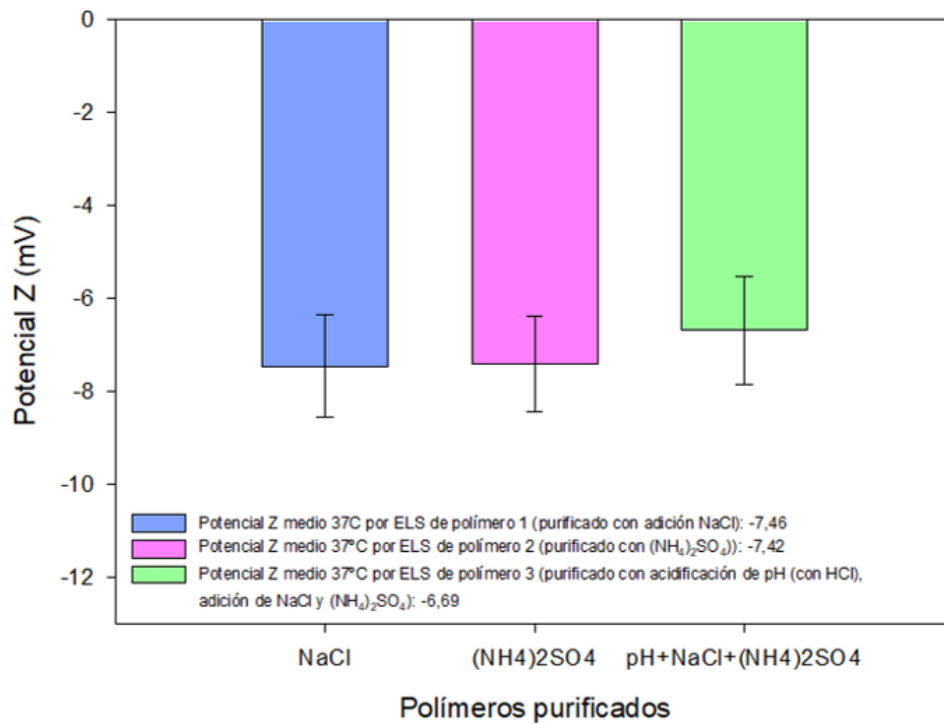


Figura 57. Potencial Z por ELS a 37°C en PBS1X 5mg/mL

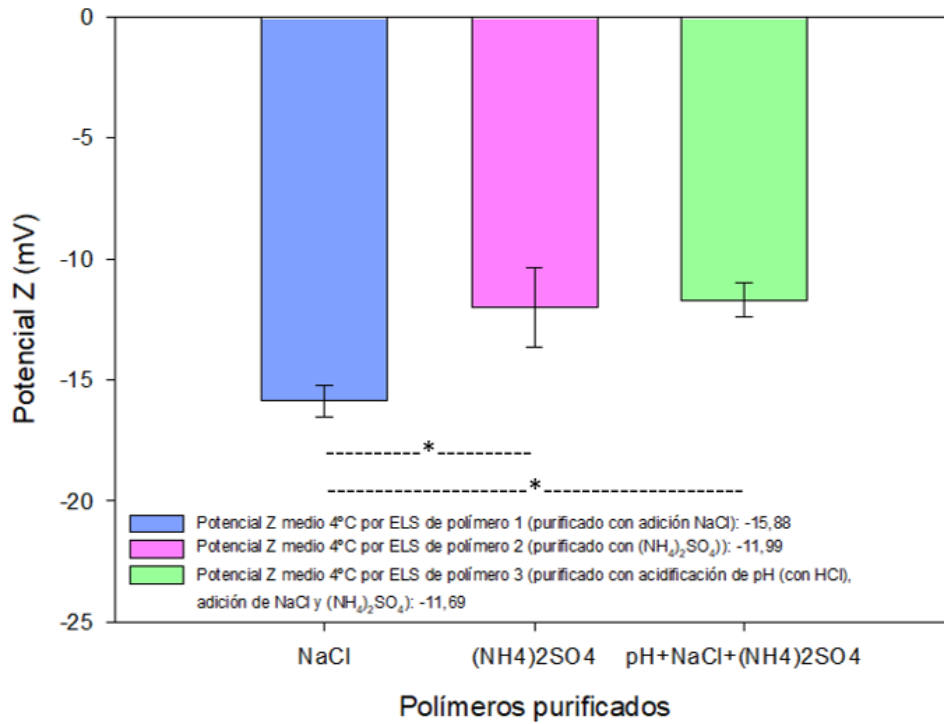


Figura 58. Potencial Z por ELS a 4°C en mQ 5mg/mL

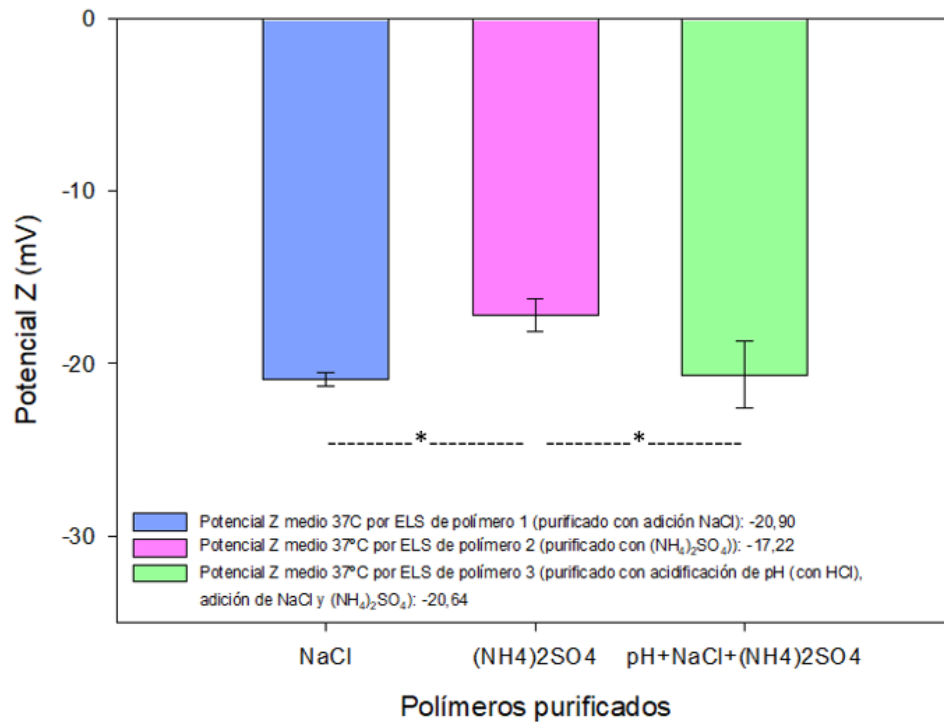


Figura 59. Potencial Z por ELS a 37°C en mQ 5mg/mL

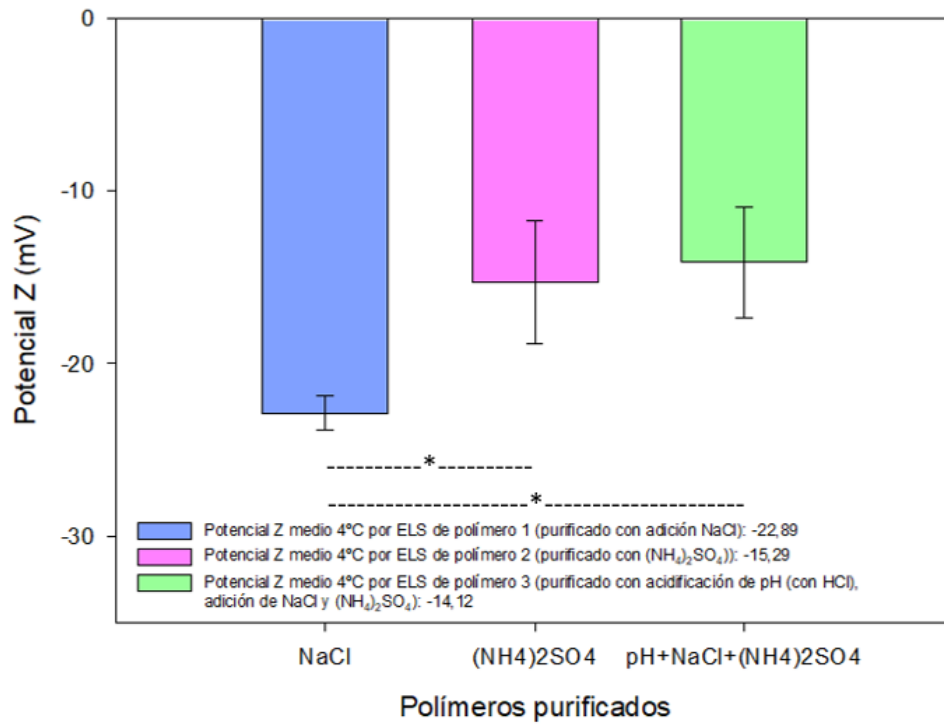


Figura 60. Potencial Z por ELS a 4°C en mQ 1mg/mL

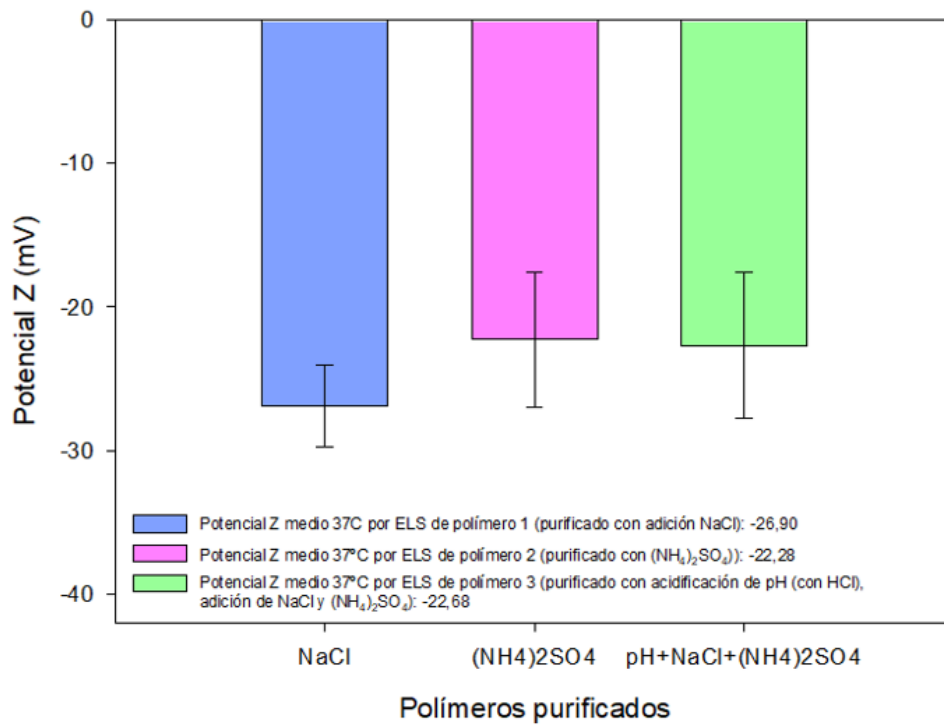


Figura 61. Potencial Z por ELS a 37°C en mQ 1mg/mL

De nuevo, se realizan con Statgraphics los ANOVA de una vía. Solo se tratarán los resultados obtenidos para los polímeros disueltos en agua mQ con concentración 5 mg/mL, ya que en PBS no detectaríamos las cargas negativas de la partícula, sino del fosfato. Al poner las partículas de polímero (cargado negativamente) en contacto con esta sal, la partícula se rodea de las cargas positivas, pero al estar también presente el contraión, estos aniones rodearán de nuevo a las cargas positivas.

La variable dependiente tanto a 4°C como a 37°C es el potencial Z y el factor es la muestra, los polímeros.

- Potencial Z por ELS a 4°C en mQ (concentración de los polímeros 5mg/mL):

Análisis de la varianza:

El software crea la tabla ANOVA descomponiendo la varianza de tamaño de partícula (nm) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	41,20	2	20,60	15,66	0,00
Intra grupos	10,52	8	1,32		
Total (Corr.)	51,72	10			

Tabla 29: Tabla AVOVA para potencial Z por ELS a 4°C en mQ

La variación entre las medias de las muestras entre grupos es mayor que la de dentro de grupos ($\text{razón-F} > F_{\text{crít}(0,05;2;8)}=4,46$), las medias entre los grupos no son similares.

El valor-P (0,00) de la prueba-F es menor que 0,05, luego existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de potencial Z (mV) de un polímero y otro, con un nivel del 5% de significación.

Mostrando los resultados del modelo ANOVA en formato gráfico:

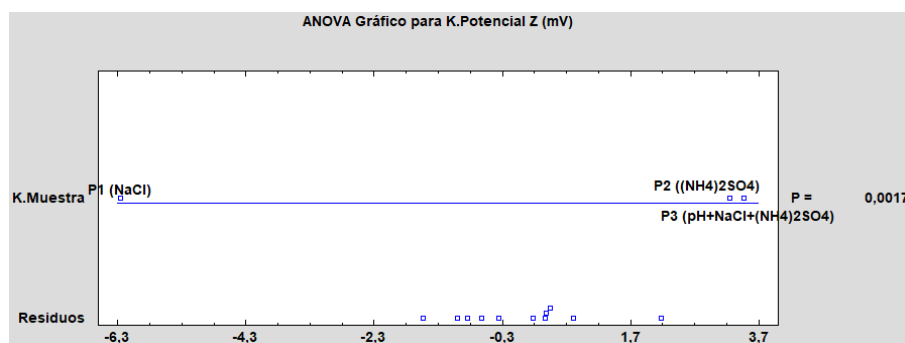


Figura 62. ANOVA gráfico para potencial Z por ELS a 4°C en mQ

En la fig. 62, el grupo P1 se encuentra bastante separado de los otros dos.

Comparación de medias:

Para corroborar lo anterior se aplican “Pruebas de Múltiples Rangos”. Los resultados se reflejan en las tablas 30 y 31.

K. Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P1 (NaCl)	4	-15,88	X
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	4	-11,99	X
P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	3	-11,68	X

Tabla 30: Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para potencial Z por ELS a 4°C en mQ

Contraste	Sig.	Diferencia	± Límites
P1 (NaCl) - P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	*	-3,88	1,87
P1 (NaCl) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	*	-4,19	2,02
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)		-0,31	2,02

Tabla 31: Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para potencial Z por ELS a 4°C en mQ

La tabla 31 muestra que hay diferencias estadísticamente significativas (con un nivel del 95,0% de confianza) entre las medias de potencial Z obtenidas para el polímero 1 respecto al 2 y al 3, ya que se observa un asterisco en la columna Sig. En la tabla 30, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los niveles que comparten la misma posición de X dentro de la columna *Grupos Homogéneos*.

El mismo análisis puede ser mostrado en forma de gráfico de medias (Fig. 63):

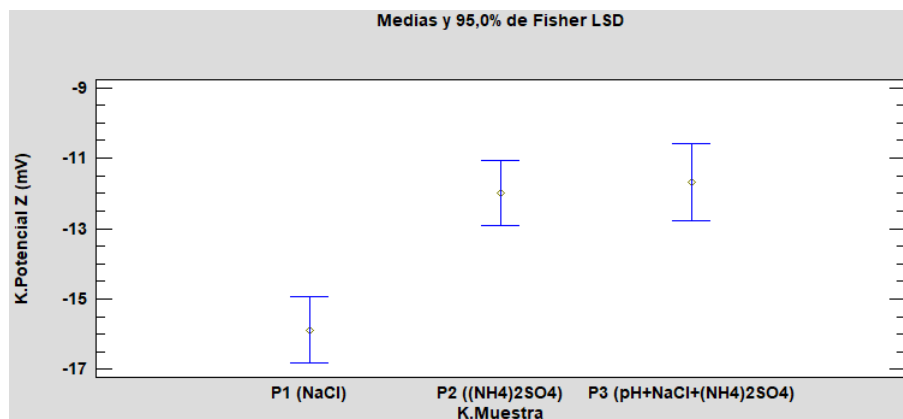


Figura 63. Gráfico de medias para potencial Z por ELS a 4°C en mQ con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD

Se han empleado intervalos de Fisher LSD, llegando de nuevo a la conclusión de que hay diferencias significativas entre el potencial Z medio del polímero 1 y el de los polímeros 2 y 3.

Gráfico de residuos:

Se realiza a efectos de comprobar el error aleatorio o sistemático en las medidas. Los resultados se indican en la fig. 64.

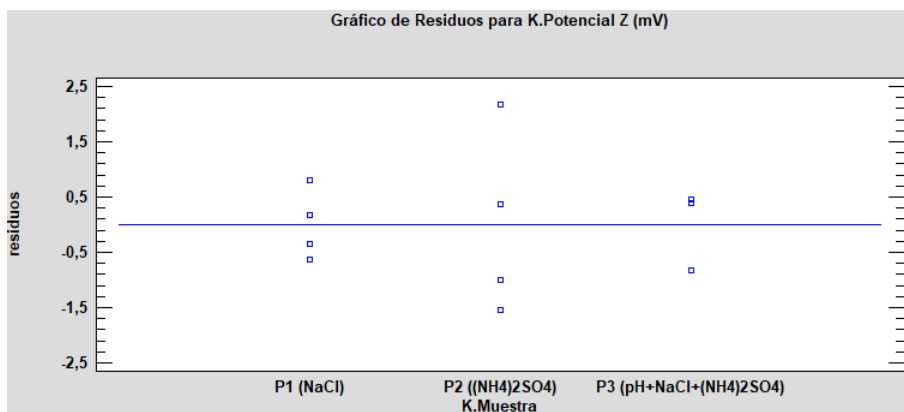


Figura 64. Gráfico de residuos ELS a 4°C en mQ

Como se puede apreciar, los residuos están distribuidos aleatoriamente a ambos lados de la línea cero de abscisas sin seguir ninguna tendencia, luego el error es aleatorio.

- Tamaño de partícula por ELS a 37°C en mQ (concentración de los polímeros 5mg/mL):

Todo el tratamiento estadístico anterior (tablas 29...31 y fig. 62...64), se repite para las mismas muestras a 37°C, temperatura superior a la de transición, análoga a la del cuerpo humano.

Análisis de la varianza:

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	27,62	2	13,81	7,90	0,01
Intra grupos	13,98	8	1,75		
Total (Corr.)	41,60	10			

Tabla 32: Tabla AVOVA para potencial Z por ELS a 37°C en mQ

La variación entre las medias de las muestras entre grupos es mayor que la de dentro de grupos (razón-F > $F_{crit}(0,05;2;8)=4,46$), las medias entre los grupos no son similares.

El valor-P (0,01) de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de potencial Z (mV) de un polímero y otro, con un nivel del 5% de significación.

Mostrando los resultados del ANOVA en formato gráfico:

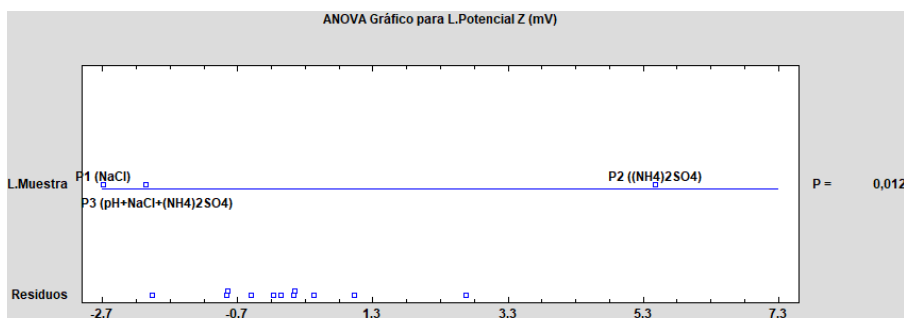


Figura 65. ANOVA gráfico para potencial Z por ELS a 4°C en mQ

En la fig. 65, el grupo P2 se encuentra bastante separado de los otros dos.

Comparación de medias:

Se realizan “Pruebas de Múltiples Rangos”.

J. Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
P1 (NaCl)	4	-20,90	X
P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	4	-20,64	X
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	3	-17,22	X

Tabla 33: Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para potencial Z por ELS a 37°C en mQ

Contraste	Sig.	Diferencia	± Límites
P1 (NaCl) - P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄)	*	-3,68	2,33
P1 (NaCl) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)		-0,26	2,16
P2 ((NH ₄) ₂ SO ₄) - P3 (pH+NaCl+(NH ₄) ₂ SO ₄)	*	3,42	2,33

Tabla 34: Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para potencial Z por ELS a 37°C en mQ

En la tabla 34, el asterisco en la columna *Sig.*, indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre el par de medias, con un nivel del 95,0% de confianza. En la tabla 33, en la columna *Grupos Homogéneos*, no existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten la misma posición de X.

Se muestra el mismo análisis en forma de gráfico de medias (Fig. 65):

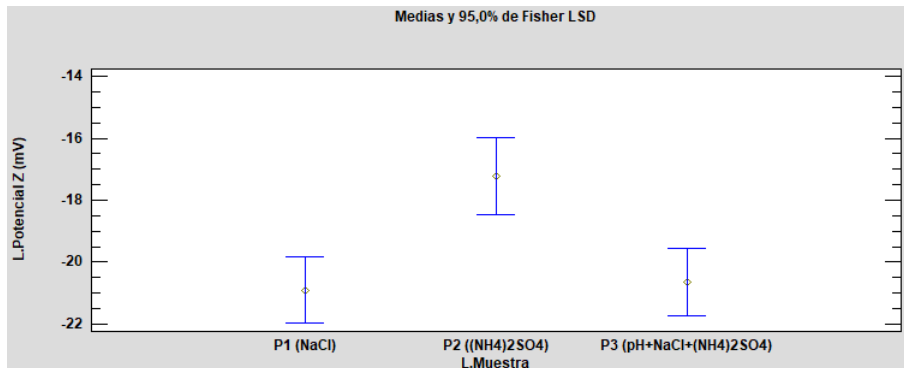


Figura 65. Gráfico de medias para potencial Z por ELS a 37°C en mQ con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD

No se aprecian diferencias significativas entre el potencial Z medio del polímero 2 y el de los polímeros 1 y 3.

Gráfico de residuos:

Como se puede ver en la fig. 66, los residuos no están distribuidos aleatoriamente a ambos lados de la línea cero de abscisas, sino que siguen una tendencia (forma cónica), lo que podría indicar la presencia de error sistemático.

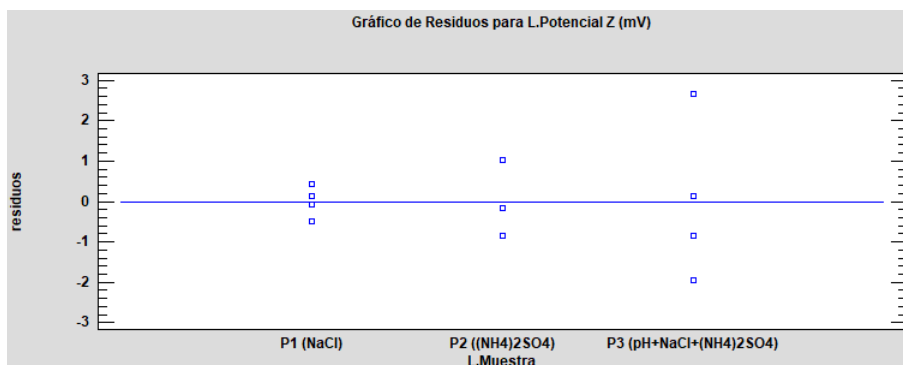


Figura 66. Gráfico de residuos ELS a 37°C en mQ

De los resultados obtenidos, se observa que:

- La mayor pureza corresponde a los dos polímeros tratados con sales de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, no existiendo diferencias significativas en la cantidad de impurezas presentes en ambos, pero sí las hay con el polímero tratado con NaCl.
- Respecto al tamaño de partícula en PBS 1X a concentración 5 mg/mL y 37°C (temperatura corporal, superior a la de transición, por lo que las partículas ya han formado estructuras en forma de nanopartículas), tampoco hay diferencias significativas en los resultados obtenidos para los polímeros tratados con sales de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pero al igual que en el apartado anterior, sí las hay con respecto al polímero tratado con NaCl. Se llega a la conclusión de que si hay una cantidad pequeña de impurezas [como ocurre en el caso de los dos polímeros tratados con sales de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], no hay una diferencia notable en el tamaño de partícula. Sin embargo, al aumentar la cantidad de estas (como ocurre en el polímero tratado con NaCl), se comienzan a apreciar diferencias estadísticamente significativas.

Tanto en el medio mencionado como en agua a 5 mg/mL y 37°C (mismas condiciones que se utilizan para el potencial Z), se observa un aumento del tamaño de las nanopartículas con la presencia de NaCl y se aprecian diferencias significativas entre las de los polímeros tratados con NaCl y el polímero tratado solamente con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

- En cuanto al potencial Z en agua a concentración 5 mg/mL y 37°C, cuando el polímero ha sido tratado solo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se obtiene un potencial Z más bajo (en valor absoluto) que cuando lo ha sido con NaCl, lo que podría deberse a que los iones sodio favorezcan la formación de una doble capa con los cloruros alrededor del polímero.

- Comparando los resultados obtenidos a través de DSC y de turbidimetría, se puede ver cómo al disminuir la concentración de polímero, aumenta la temperatura de transición. Además, al haber menos cantidad de polímero, las diferencias son más pequeñas. Para turbidimetría (10 mg/mL) no hay diferencias significativas (temperatura de transición en torno a 19°C), mientras que para DSC (50 mg/ml) sí que las hay del polímero tratado con NaCl y (NH₄)₂SO₄ con respecto a los tratados solamente con NaCl o con (NH₄)₂SO₄ (en todos los casos la temperatura de transición se encuentra en torno a los 15°C), lo que podría deberse a la combinación de las dos sales.

7. CONCLUSIONES

- a) Se ha realizado sobre el polímero (E_{50l60})₂RGD la determinación de impurezas inorgánicas mediante las técnicas: TGA, DSC, turbidimetría, DLS y ELS. Correspondiendo la mayor pureza al polímero tratado con sales de (NH₄)₂SO₄ y la menor al tratado con NaCl.
- b) La temperatura de transición característica de cada ELR, se ve afectada por:
 - La cadena de aminoácidos que lo componen. La temperatura de transición es más baja con aminoácidos hidrofóbicos que con hidrofílicos.
 - La concentración de polímero. Al aumentar esta, disminuye la temperatura de transición.
 - La pureza del polímero. Mayor número de sales inorgánicas menor temperatura de transición.
- c) El análisis termogravimétrico (TGA), determina de forma directa la pureza de los polímeros, lo que permite establecer una relación con la temperatura de transición obtenida por DSC y por turbidimetría.

El empleo de estas técnicas abarca el amplio rango de concentraciones que se utilizan en aplicaciones biomédicas del tipo ingeniería de tejidos y dosificación de fármacos, lo que permite conocer el comportamiento termosensible que van a tener los ELRs en cada caso.
- d) Los análisis por DLS y ELS, permiten determinar el tamaño de partícula y el tipo de carga asociado a las mismas. El tamaño de partícula está relacionado inversamente con la concentración de sales inorgánicas y la carga con el tipo de aminoácidos que la forman.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.C Rodríguez-Cabello, I. González de Torre and G. Pinedo “Chapter 19: Elastin-like Hydrogels and Self-assembled Nanostructures for Drug Delivery”, *Smart Materials for Drug Delivery*, Vol. 2, pp. 180-198, edited by Carmen Álvarez Lorenzo and Ángel Concheiro, published by The Royal Society of Chemistry, 2013, doi: 10.1039/9781849734318-00180
- [2] J.C. Rodríguez-Cabello, A. Ibáñez Fonseca, M. Alonso, L. Poocha, F. Cipriani and I. González de Torre “Elastin-like Polymers: Propertyes, synthesis and applications”, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Aug. 2017, doi: 10.1002/0471440264.pst656.
- [3] S. Roberts, M. Dzuricky, A. Chilkoty, “Elastin-like polypeptides as models of intrinsically disordered proteins”, *Federation of European Biochemical Societies (FEBS)*, Vol. 589, No. 19, pp. 2477-2486, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.029
- [4] L. Tan, Y. Pu, S. Pattathil, U. Avci, J. Qian, A. Arter, L. Chen, M. G.Hahn, A. J. Ragauskas, M. J. Kieliszewski, “Changes in cell wall properties coincide with overexpression of extensin fusion proteins in suspension cultured tobacco cells”. *PLoS One*, Dec. 2014, Vol. 9 No. 12, doi: 10.1371/journal.pone.0115906
- [5] W. R. Gray, L. B. Sandberg, J.A. Foster, “Molecular Model for Elastin Structure and Function”, *Nature*, 1973, Vol. 246 (5434), pp. 461-466 doi:10.1038/246461a0
- [6] A. Fernández-Colino, A. Girotti, M.I. López, F.J. Arias, J.C. Rodríguez- Cabello, “Los polímeros tipo elatina y su utilización como tags para la purificación de proteínas”, *Biomecánica*, Vol.19, pp. 8-16, Nov. 2011
- [7] J.C. Rodríguez-Cabello, L. Martín, M. Alonso, F.J. Arias, A.M. Testera, ““Recombinamers” as advanced materials for the post-oil age”, *Polymer*, Aug. 2009, Vol.50, pp. 5159-5169, doi: 10.1016/j.polymer.2009.08.032
- [8] D.W. Urry “What sustains life? Consilient mechanisms for protein-based machines and materials”, *Springer-Verlag*, Jan. 2006, doi: 10.1007/978-0-8176-4562-5
- [9] D.W. Urry, T.M. Parker, M.C. Reid, D.C. Gowda, “Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(GVGVP) and its Gamma-Irradiation Cross-Linked Matrix – Summary of Generic Biological Test-Results”, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 1991, Vol. 6, pp. 263-282
- [10] H. Betre, W. Liu, M.R. Zalutsky, A. Chilkoti et al., “A thermally responsive biopolymer for intra-articular drug delivery”, *Journal of Controlled Release*, Oct. 2006, Vol. 115, pp. 175-182, doi: 10.1016/j.jconrel.2006.07.022
- [11] S. M. Mithieux, J.E. Rasko, A.S. Weiss, “Synthetic elastin hydrogels derived from massive elastic assemblies of self-organized human protein monomers”, *Biomaterials*, 2004, Vol. 25, pp. 4921-4927, doi:10.1016/j.bbadis.2012.11.022
- [12] R. E. Sallach, W. Cui, F. Balderrama, A.W. Martínez et al., “Long-term biostability of self-assembling protein polymers in the absence of covalent crosslinking”, *Biomaterials*, Feb. 2010, Vol. 31, pp.779-791, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.082

- [13] F. W. Keeley, C. M. Bellingham, K. A. Woodhouse, "Elastin as a self organizing biomaterial: use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin", *Philosophical Transactions of Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, Feb. 2002, Vol. 357, pp. 185-189, doi: 10.1098/rstb.2001.1027
- [14] D. W. Urry, T. L. Trapane, K. U. Prasad, "Phase structure transitions of the elastin polypentapeptide -water system within the framework of composition-temperature studies", *Biopolymers*, Dec. 1985, Vol. 24, pp. 2345-2356, doi: 10.1002/bip.360241212
- [15] I. González de Torre, "Biofunctional hydrogels based on elastin-like recombinamers as extracellular matrix analogues", Tesis doctoral realizada en BIOFORGE, Universidad de Valladolid
- [16] P. L. San Biagio, F. Madonia, T. L. Trapane, D. W. Urry, "The Overlap of elastomeric Polypeptide Coils in Solution Required for Single-Phase Initiation of Elastogenesis", *Chemical Physics Letters*, 1998, Vol. 145, pp. 571-574, doi: 10.1016/0009-2614(88)87422-0
- [17] J. Reguera Gómez, "Estudio de la transición inversa con la temperatura en polímeros tipo elastina con creciente funcionalidad", Tesis doctoral realizada en Bioforge, Universidad de Valladolid.
- [18] L. Martín, F. J. Arias, M. Alonso, C. García-Arévalo, J. C. Rodríguez-Cabello, "Rapid micropatterning by temperature-tiggered reversible gelation of recombinant smart elastin-like tetrablock-copolymer", *Soft Matter*, 2010, Vol. 6, pp.1121-1124
- [19] A. Ribeiro, F. J. Arias, J. Reguera, M. Alonso, J. C. Rodríguez-Cabello, "Influence of the amino-acid sequence on the inverse temperature transition of elastin-like polymers", *Biophys J*, 2009, Vol. 97, pp. 312-320, doi: 10.1016/j.bpj.2009.03.030
- [20] J. Reguera, A. Fahmi, P. Moriarty, A. Girotti, J. C. Rodríguez-Cabello, "Nanopore formation by self-assembly of the model genetically engineered elastin-like polymer [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]₁₅", *Journal of the American Chemical Society*, 2004, Vol. 126, pp.13212-13213, doi: 10.1021/ja047417f
- [21] J. Reguera, D. W. Urry, T. M. Parker, D. T. McPherson, J. C. Rodríguez-Cabello, "Effect of NaCl on the Exothermic and Endothermic Components of the Inverse Temperature Transition of a Model Elastin-like Polymer", *Biomacromolecules*, 2007, Vol. 8, pp. 354-358, doi: 10.1021/bm060936l
- [22] D. W. Urry, "Molecular Machines - How Motion and Other Functions of Living Organisms Can Result from Reversible Chemical-Changes", *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 1993, Vol. 32, pp.819-841, doi:10.1002/chin.199339358
- [23] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, "Principios de análisis instrumental", 2008.
- [24] Servicios técnicos de investigación, Universidad de Alicante, "Calorimetría Diferencial de Barrido" (accessed Mar. 26, 2022)
<https://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-analisis-termico/calorimetria-diferencial-de-barrido.html>

- [25] A. Antony, J. Mitra, "Refractive index-assisted UV/Vis spectrophotometry to overcome spectral interference by impurities", *Anal. Chim. Acta*, Vol. 1149, p. 238186, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.aca.2020.12.061
- [26] B. A. McGaw, "Basic concepts of analytical chemistry: S.M.Khopkar, Wiley Eastern, New Delhi", 1994, Vol. 41, pp. 1611, doi: 10.1016/0039-9140(94)80101-0
- [27] Servicio de Apoyo Técnico a la Docencia y a la Investigación, Universitas Miguel Hernández, "Analizador de tamaño de partículas y potencial Z (Malvern Instruments, ZETASIZER NANO ZSP)" (accessed Apr. 2, 2022)
<https://satdi.umh.es/2019/04/24/analizador-de-tamano-de-particulas-y-potencial-z-malvern-instruments-zetasizer-nano-zsp/>
- [28] J. M. Schurr, "Theory of dynamic light scattering by polymers and gels", *Chemical Physics*, May 1978, Vol. 30, No. 2, pp. 243-247, doi: 10.1016/0301-0104(78)85122-2
- [29] IESMAT – Instrumentación Específica de Materiales, "Dynamic Light Scattering (DLS), Dispersión de luz dinámica DLS para la caracterización de tamaño de partícula de proteínas, polímeros y dispersiones coloidales" (accessed Apr. 2, 2022)
https://iesmat.com/catalogos/WC_TECDLs/dynamic-light-scattering-dls-/
- [30] J. Batalla Mayoral, A. Cuadros Moreno, E. San Martín-Martínez, "Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas", *Latin-American Journal of Physics Education*, Dec. 2014, Vol. 8, No. 4
- [31] Malvern Panalytical, "Potencial zeta" (accessed Apr. 3, 2022)
<https://www.malvernpanalytical.com/es/products/measurement-type/zeta-potential>
- [32] IESMAT – Instrumentación Específica de Materiales, "Zetasizer Nano Z. Analizador de potencial Z" (accessed Apr. 3, 2022)
<https://iesmat.com/productos/583/malvern-panalytical-ltd-zetasizer-nano-z/>
- [33] Medical Expo, Malvern Panalytical, "Electrophoretic Light Scattering (ELS) for Zeta potential measurements" (accessed Apr. 3, 2022)
<https://trends.medicaexpo.es/malvern-panalytical/project-94317-434802.html>
- [34] G. Wilemski, "On the derivation of Smoluchowski equations with corrections in the classical theory of Brownian motion", *Journal of Statistical Physics*, Feb. 1976, Vol.14, No. 2, pp. 153-169, doi: 10.1007/BF01011764

9. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

- Tabla 1.** Técnicas de análisis térmico.
- Tabla 2.** Resumen tipos de aminoácidos, abreviaturas y datos de pK_a del ácido carboxílico y de la amina si estuviesen libres, pK_a del radical correspondiente y punto isoeléctrico en el que se compensan las cargas del aminoácido.
- Tabla 3.** Preparación de las disoluciones de polímero de concentración 50 mg/mL para DSC.
- Tabla 4.** Preparación de las disoluciones de polímero de concentración 5 mg/mL para turbidimetría y Zetasizer.
- Tabla 5.** Preparación de las disoluciones de polímero de concentración 10 mg/mL para turbidimetría.
- Tabla 6.** Preparación de las disoluciones de polímero de concentración 5 mg/mL para turbidimetría y Zetasizer.
- Tabla 7.** Preparación de las disoluciones de polímero de concentración 5 mg/mL en agua mQ para Zetasizer.
- Tabla 8.** *Preparación de las disoluciones de polímero de concentración 1 mg/mL en agua mQ para Zetasizer.*
- Tabla 9.** Porcentaje de impurezas inorgánicas obtenidas en cada uno de los análisis por TGA, media y desviación estándar.
- Tabla 10.** Tabla AVOVA para TGA.
- Tabla 11.** Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para TGA.
- Tabla 12.** Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para TGA.
- Tabla 13.** Temperaturas de transición obtenidas en cada uno de los análisis por DSC.
- Tabla 14.** Tabla AVOVA para DSC.
- Tabla 15.** Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para DSC.

- Tabla 16.** Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para DSC.
- Tabla 17.** Temperaturas de transición obtenidas en cada uno de los análisis por turbidimetría, media y desviación estándar.
- Tabla 18.** Tabla ANOVA para turbidimetría.
- Tabla 19.** Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para turbidimetría.
- Tabla 20.** Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para turbidimetría.
- Tabla 21.** Tamaño de partícula e índice de polidispersidad obtenidos por DLS, media y desviación estándar (Los valores de tamaño resaltados en color rojo no se han tenido en cuenta para la media ni para la desviación estándar, ya que se consideran outliers (valores muy distantes del resto). En consecuencia, tampoco se tiene en cuenta su Pdl (en gris)).
- Tabla 22.** Tabla AVOVA para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X.
- Tabla 23.** Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X.
- Tabla 24.** Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X.
- Tabla 25.** Tabla AVOVA para tamaño de partícula por DLS a 37°C en PBS 1X.
- Tabla 26.** Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X.
- Tabla 27.** Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X.
- Tabla 28.** Valores de potencial Z obtenidos por ELS, media y desviación estándar correspondiente. (Los valores resaltados en color rojo no se han tenido en cuenta para la media ni para la desviación estándar ya que se consideran outliers o valores muy distantes del resto.)
- Tabla 29.** Tabla AVOVA para potencial Z por ELS a 4°C en mQ.
- Tabla 30.** Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para potencial Z por ELS a 4°C en mQ.

- Tabla 31.** Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para potencial Z por ELS a 4°C en mQ.
- Tabla 32.** Tabla AVOVA para potencial Z por ELS a 37°C en mQ.
- Tabla 33.** Tabla 1 pruebas de múltiples rangos para potencial Z por ELS a 37°C en mQ.
- Tabla 34.** Tabla 2 pruebas de múltiples rangos para potencial Z por ELS a 37°C en mQ.

FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de la piel
- Figura 2.** Comportamiento elástico de las moléculas de elastina
- Figura 3.** Cambio en la estructura de los ELR en la transición inversa. Por debajo de la temperatura de transición (izquierda), cadena extendida con estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de los restos apolares de la cadena del polímero. Por encima de la temperatura de transición (derecha), cadena plegada en conformación de horquilla β que forman los aminoácidos.
- Figura 4.** Termogramas de descomposición de: PVC: policloruro de vinilo; PMMA: metacrilato de polimetilo; LDPE: polietileno de baja densidad; PTFE: politetrafluoroetileno; PI: polipirometiltimida aromática.
- Figura 5.** DSC de flujo de calor.
- Figura 6.** Funcionamiento turbidimetría y componentes: Fuente de luz, sistema óptico (colimador + selector de longitud de onda), cubeta con muestra y detector en la misma dirección que la luz incidente.
- Figura 7.** Forma del pentabloque.
- Figura 8.** Formación de estructuras tipo micelas para encapsular fármacos.
- Figura 9.** Fotografías de cubetas semimicro de poliestireno (DLS) y de capilar plegado (potencial Z).
- Figura 10.** Fotografía de los crisoles de aluminio y soporte.
- Figura 11.** Fotografía del cierracrisoles.

- Figura 12.** Fotografía de los crisoles de alúmina.
- Figura 13.** Fotografía de la campana esterilizada con los polímeros.
- Figura 14.** Fotografía de la balanza analítica.
- Figura 15.** Fotografía del pHmetro.
- Figura 16.** Fotografía del DSC.
- Figura 17.** Fotografía del interior del horno.
- Figura 18.** Fotografía de TGA.
- Figura 19.** Fotografía del espectrofotómetro.
- Figura 20.** Fotografía de Zetasizer.
- Figura 21.** Termograma del polímero 3 (Repetición 1), purificado con acidificación hasta pH 3, NaCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, masa perdida: 97,81% (~ 320°C)
- Figura 22.** Media del porcentaje de impurezas inorgánicas obtenidas por TGA y su desviación estándar.
- Figura 23.** ANOVA gráfico para temperatura de transición por TGA.
- Figura 24.** Gráfico de medias para TGA con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD.
- Figura 25.** Gráfico de residuos TGA.
- Figura 26.** DSC del polímero 1 (repetición 1), purificado con NaCl, temperatura de transición: 15,34°C.
- Figura 27.** Temperaturas de transición medias obtenidas por DSC y su desviación estándar.
- Figura 28.** ANOVA gráfico para temperatura de transición por DSC.
- Figura 29.** Gráfico de medias para DSC con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD.
- Figura 30.** Gráfico de residuos DSC.
- Figura 31.** Barrido de 800 a 200 nm a 25°C del polímero 3 en PBS 1X y el blanco en cubetas de cuarzo.
- Figura 32.** Barrido de 800 a 200 nm a 25°C de los polímeros en PBS 1X y el PBS 1X en cubetas de plástico.
- Figura 33.** Representación de absorbancia frente a temperatura para turbidimetría de polímeros a 5 mg/mL en PBS 1X y blanco.

- Figura 34.** Gráfica de la primera derivada del polímero 1 a 5 mg/mL en PBS 1X para turbidimetría.
- Figura 35.** Representación de absorbancia frente a temperatura para turbidimetría de polímeros a 10 mg/mL en PBS 1X y blanco.
- Figura 36.** Gráfica de la primera derivada del polímero 1 a 10 mg/mL en PBS 1X, repetición 1 para turbidimetría.
- Figura 37.** Temperaturas de transición medias obtenidas por turbidimetría y su desviación estándar.
- Figura 38.** ANOVA gráfico para temperatura de transición por turbidimetría.
- Figura 39.** Gráfico de medias para turbidimetría con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD.
- Figura 40.** Gráfico de residuos turbidimetría.
- Figura 41.** Correlogramas del polímero 1 a 5 mg/mL en PBS 1X (repetición 1) a 4 y 37°C.
- Figura 42.** Distribución de tamaño de partícula por intensidad de polímero 1 a 5 mg/mL en PBS 1X (repetición 1) a 4 y 37°C.
- Figura 43.** Distribución de tamaño de partícula por volumen del polímero 1 a 5 mg/mL en PBS 1X (repetición 1) a 4 y 37°C.
- Figura 44.** Tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS1X 5mg/mL.
- Figura 45.** Tamaño de partícula por DLS a 37°C en PBS1X 5mg/mL.
- Figura 46.** Tamaño de partícula por DLS a 4°C en mQ 5mg/mL.
- Figura 47.** Tamaño de partícula por DLS a 37°C en mQ 5mg/mL.
- Figura 48.** Tamaño de partícula por DLS a 4°C en mQ 1mg/mL.
- Figura 49.** Tamaño de partícula por DLS a 37°C en mQ 1mg/mL.
- Figura 50.** ANOVA gráfico para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X.
- Figura 51.** Gráfico de medias para tamaño de partícula por DLS a 4°C en PBS 1X con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD
- Figura 52.** Gráfico de residuos DLS a 4°C en PBS 1X.
- Figura 53.** ANOVA gráfico para tamaño de partícula por DLS a 37°C en PBS 1X
- Figura 54.** Gráfico de medias para tamaño de partícula por DLS a 37°C en PBS 1X con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD.

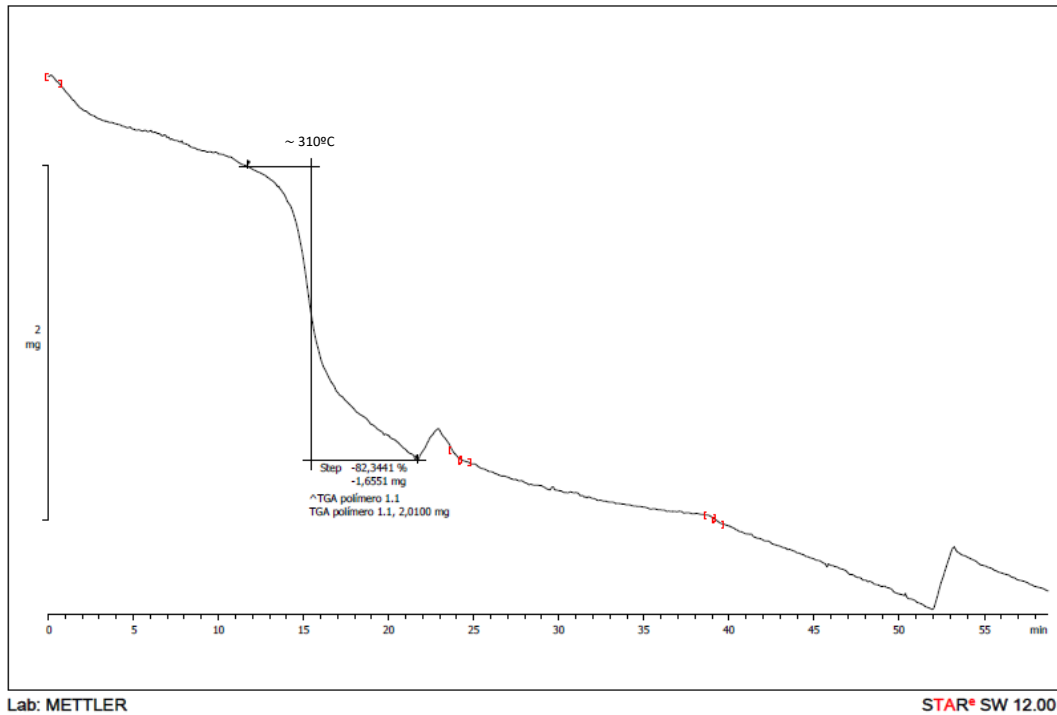
- Figura 55.** Gráfico de residuos DLS a 37°C en PBS 1X.
- Figura 56.** Potencial Z por ELS a 4°C en PBS1X 5mg/mL.
- Figura 57.** Potencial Z por ELS a 37°C en PBS1X 5mg/mL.
- Figura 58.** Potencial Z por ELS a 4°C en mQ 5mg/mL.
- Figura 59.** Potencial Z por ELS a 37°C en mQ 5mg/mL.
- Figura 60.** Potencial Z por ELS a 4°C en mQ 1mg/mL.
- Figura 61.** Potencial Z por ELS a 37°C en mQ 1mg/mL.
- Figura 62.** ANOVA gráfico para potencial Z por ELS a 4°C en mQ.
- Figura 63.** Gráfico de medias para potencial Z por ELS a 4°C en mQ con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD.
- Figura 64.** Gráfico de residuos ELS a 4°C en mQ.
- Figura 65.** ANOVA gráfico para potencial Z por ELS a 4°C en mQ.
- Figura 66.** Gráfico de medias para potencial Z por ELS a 37°C en mQ con nivel de confianza 95% e intervalos de Fisher LSD.
- Figura 67.** Gráfico de residuos ELS a 37°C en mQ.

10. ANEXOS

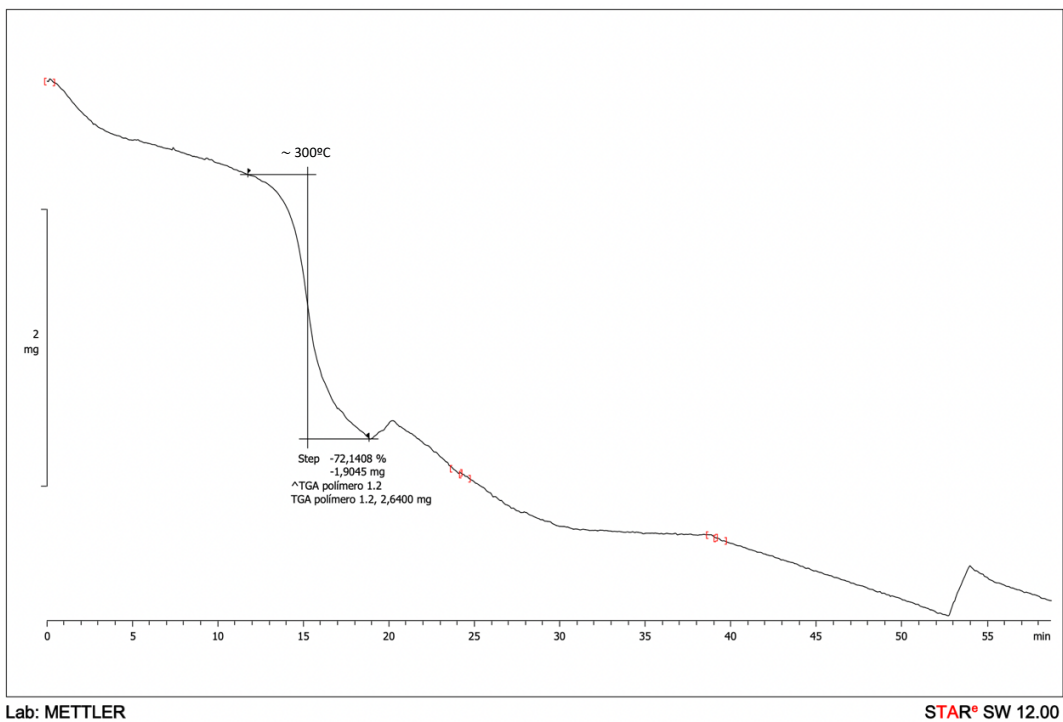
10.1. Termogravimetría (TGA)

Polímero 1 (purificado con NaCl).

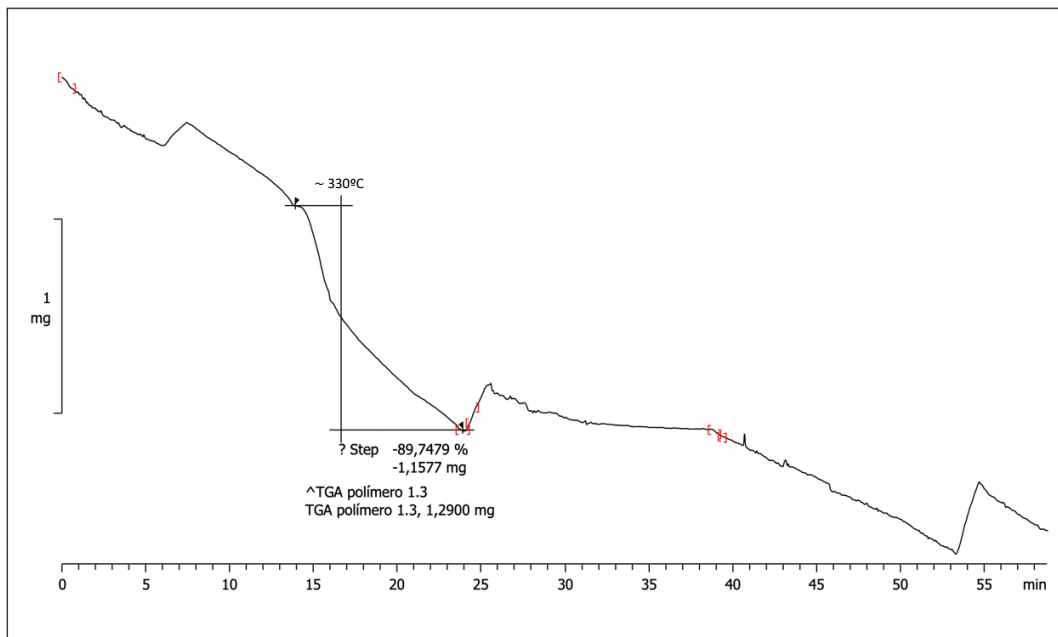
- Repetición 1:



- Repetición 2:



- Repetición 3:

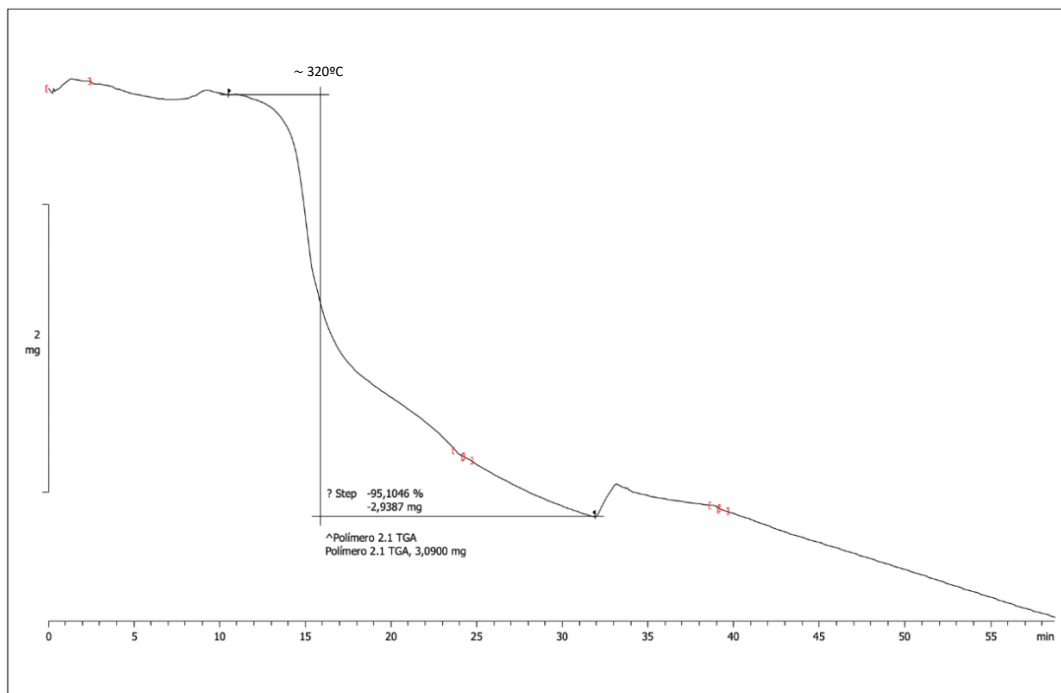


Lab: METTLER

STAR^e SW 12.00

Polímero 2 (purificado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

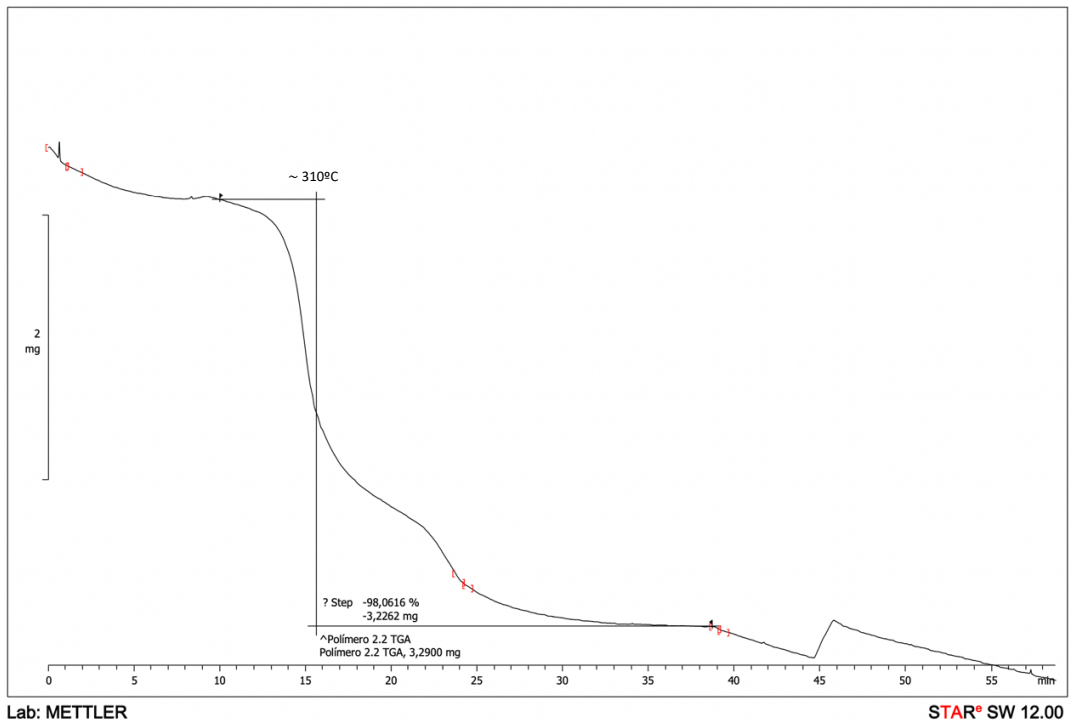
- Repetición 1:



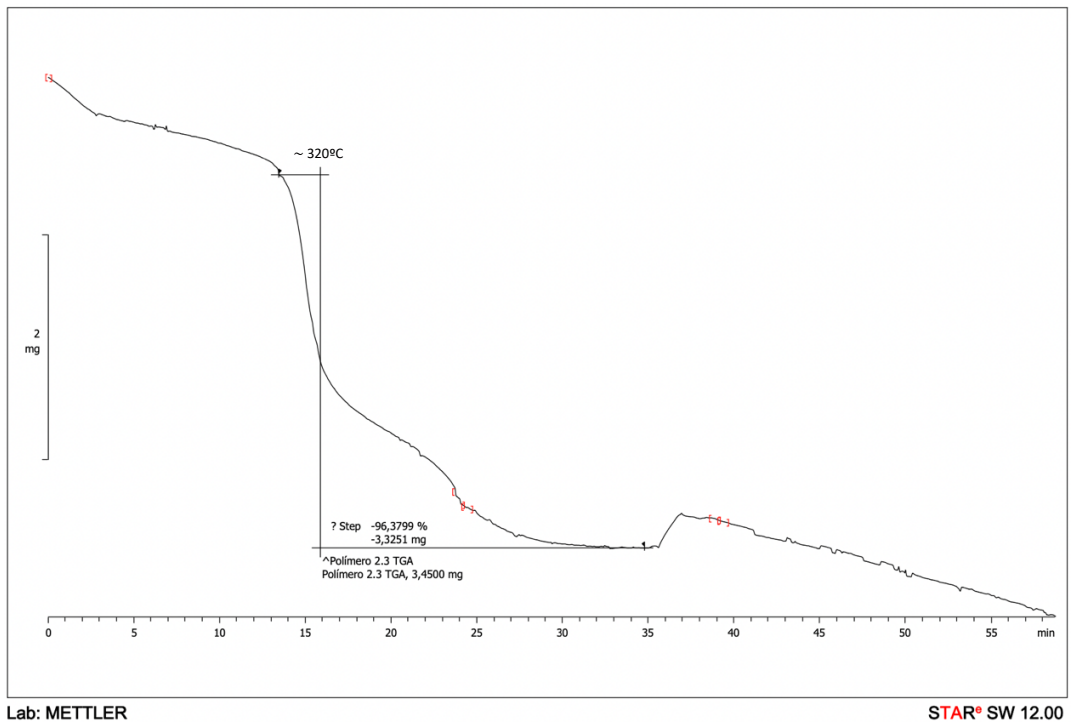
Lab: METTLER

STAR^e SW 12.00

- Repetición 2:

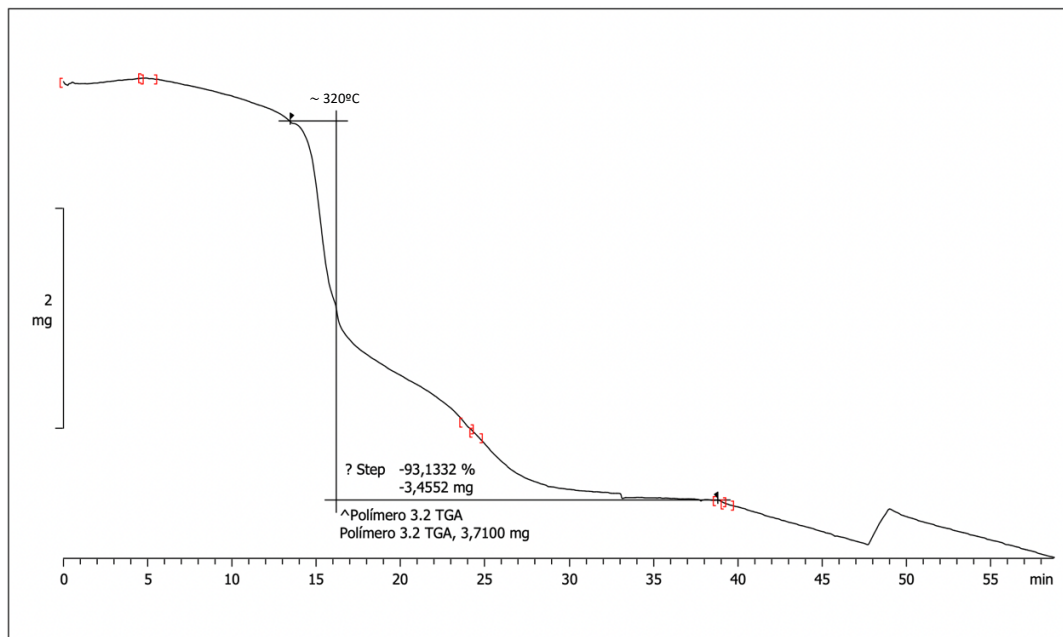


- Repetición 3:



Polímero 3 (purificado con acidificación de pH (HCl), NaCl y (NH₄)₂SO₄).

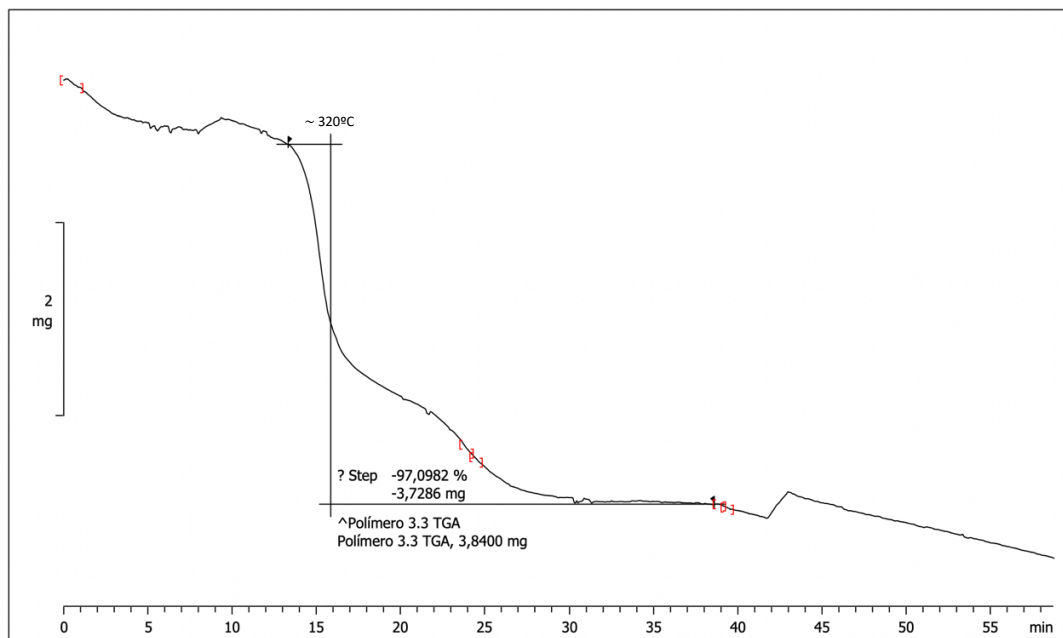
- Repetición 2:



Lab: METTLER

STAR^e SW 12.00

- Repetición 3:



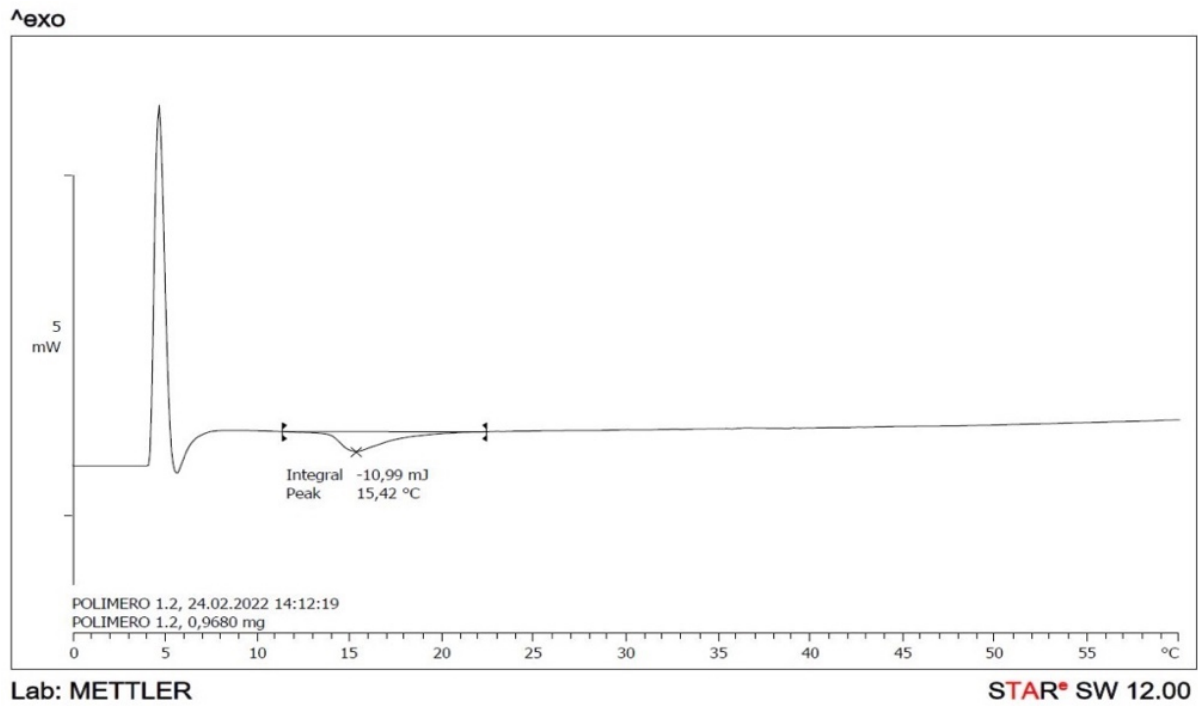
Lab: METTLER

STAR^e SW 12.00

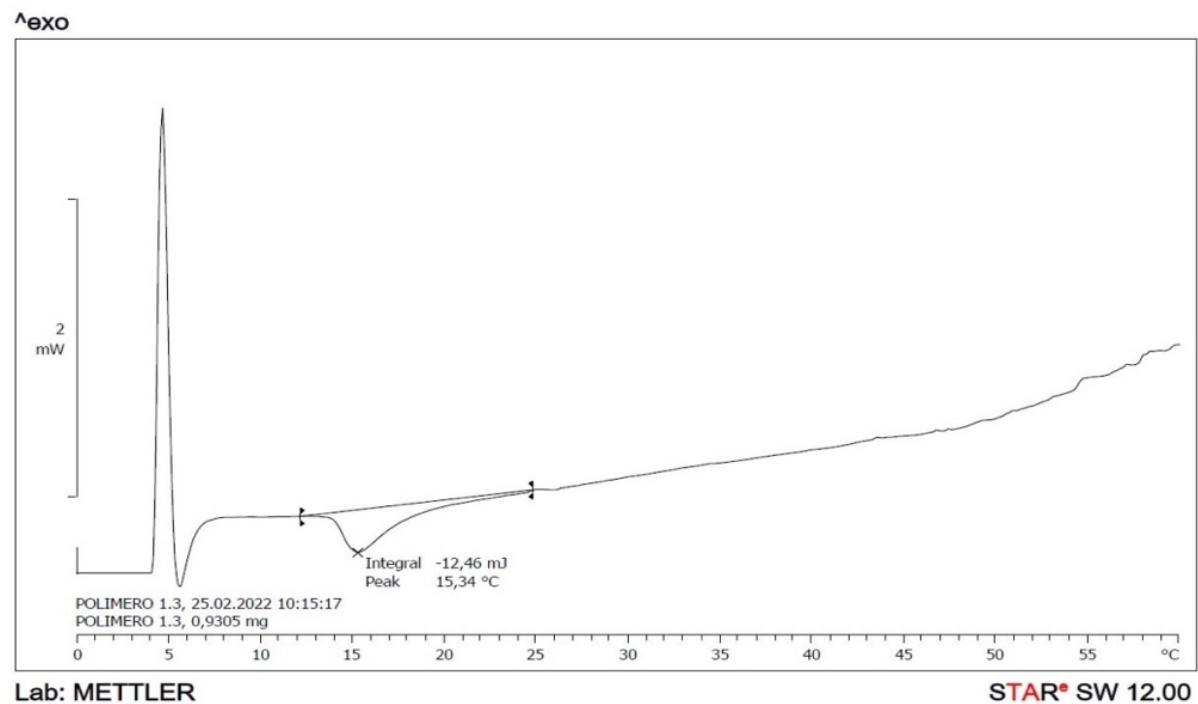
10.2. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

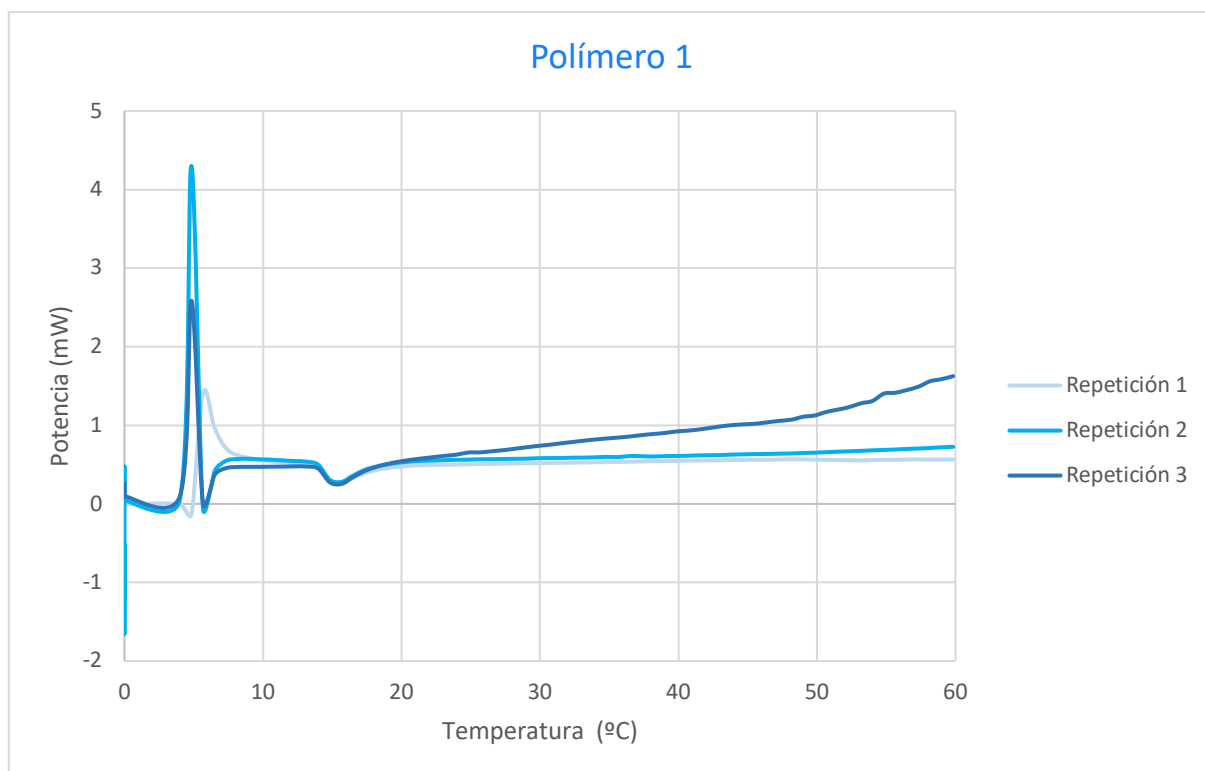
Polímero 1 (purificado con NaCl), concentración 50 mg/mL.

- Repetición 2:



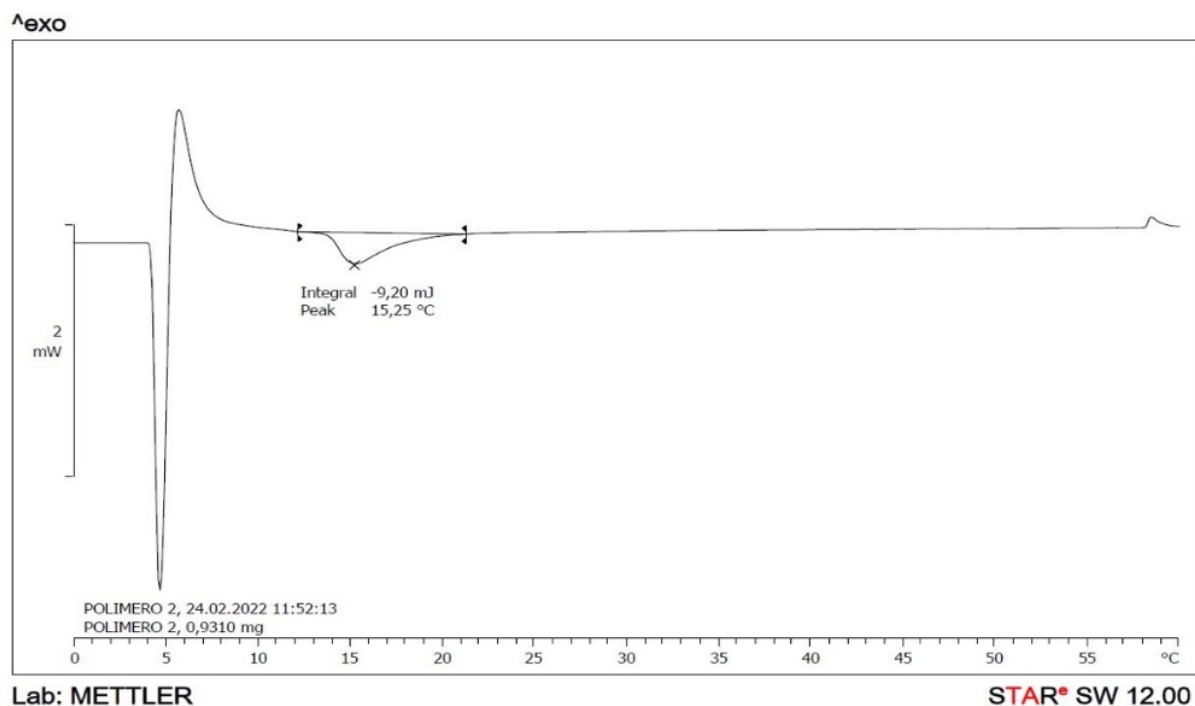
- Repetición 3:



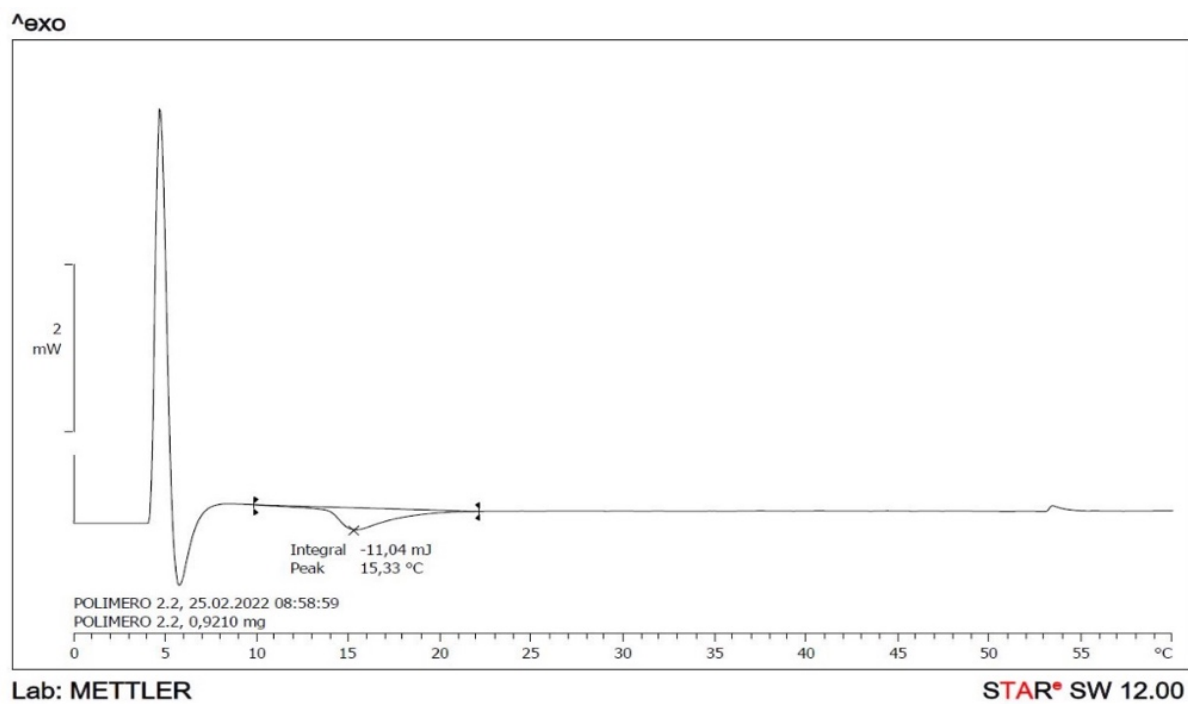


Polímero 2 (purificado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), concentración 50 mg/mL.

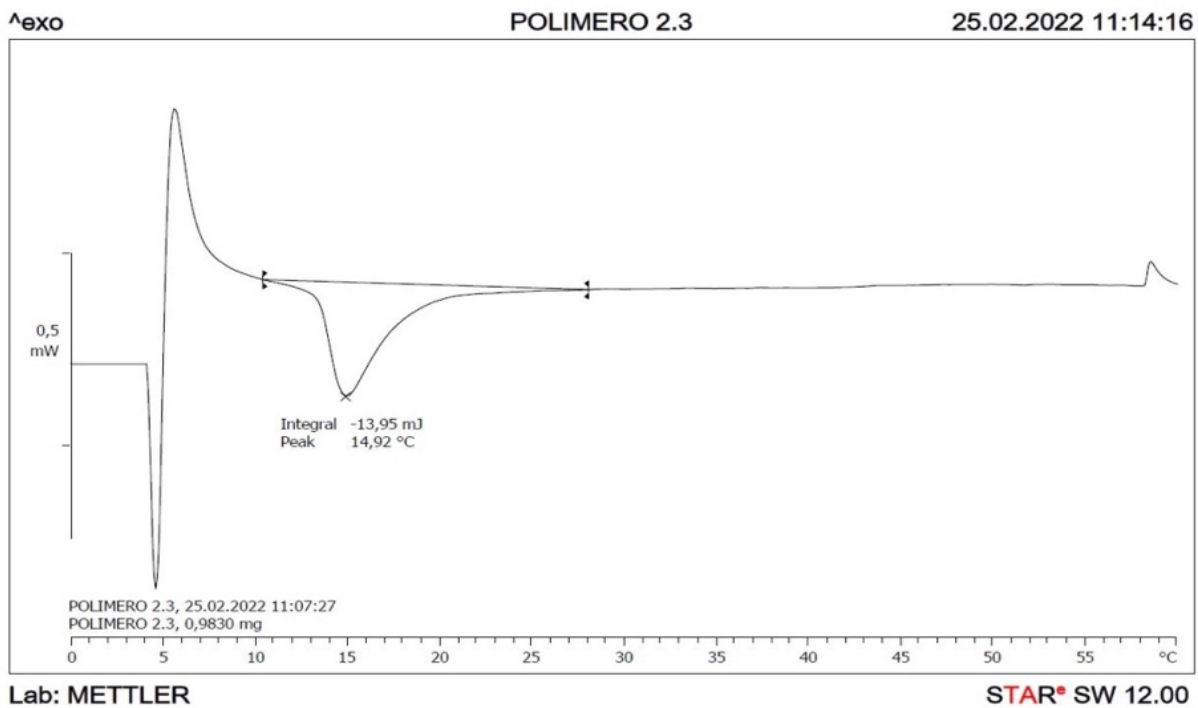
- Repetición 1:

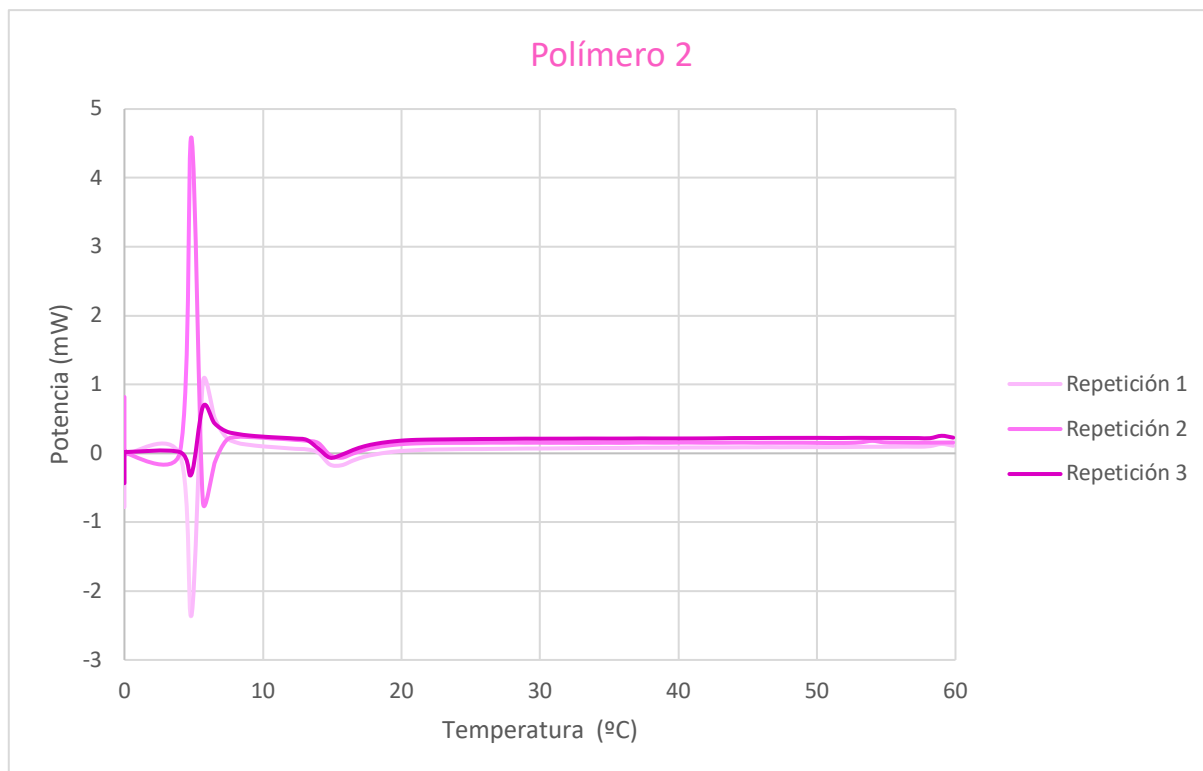


- Repetición 2:



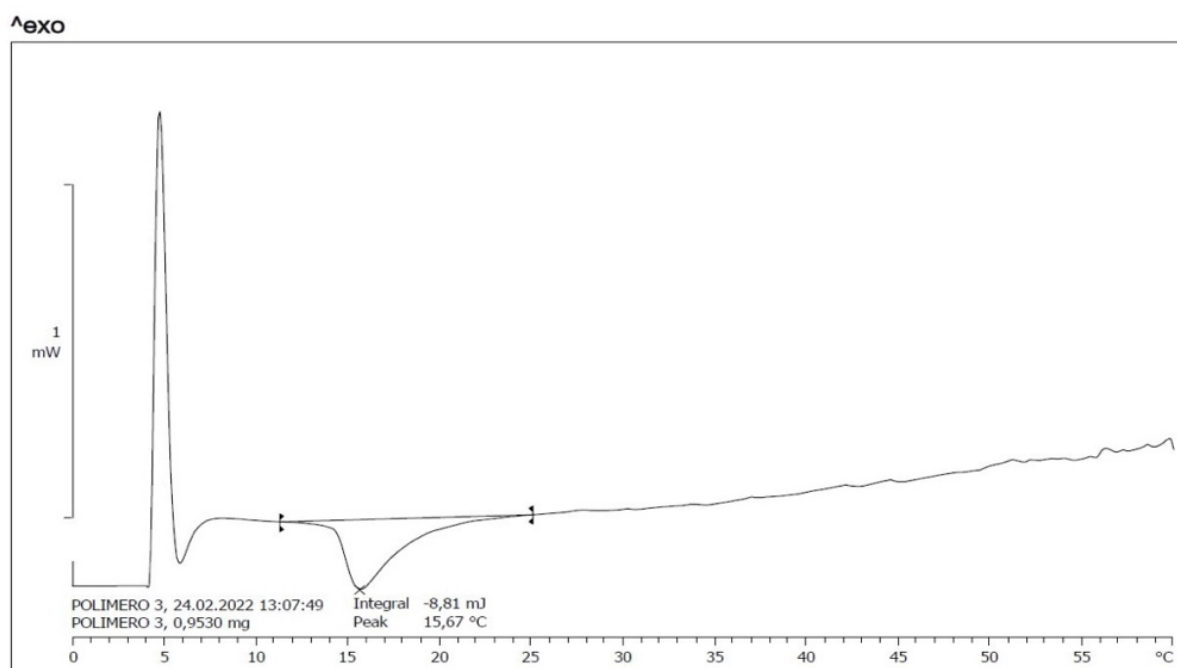
- Repetición 3:





Polímero 3 (purificado con acidificación de pH (HCl), NaCl y (NH₄)₂SO₄), concentración 50 mg/mL.

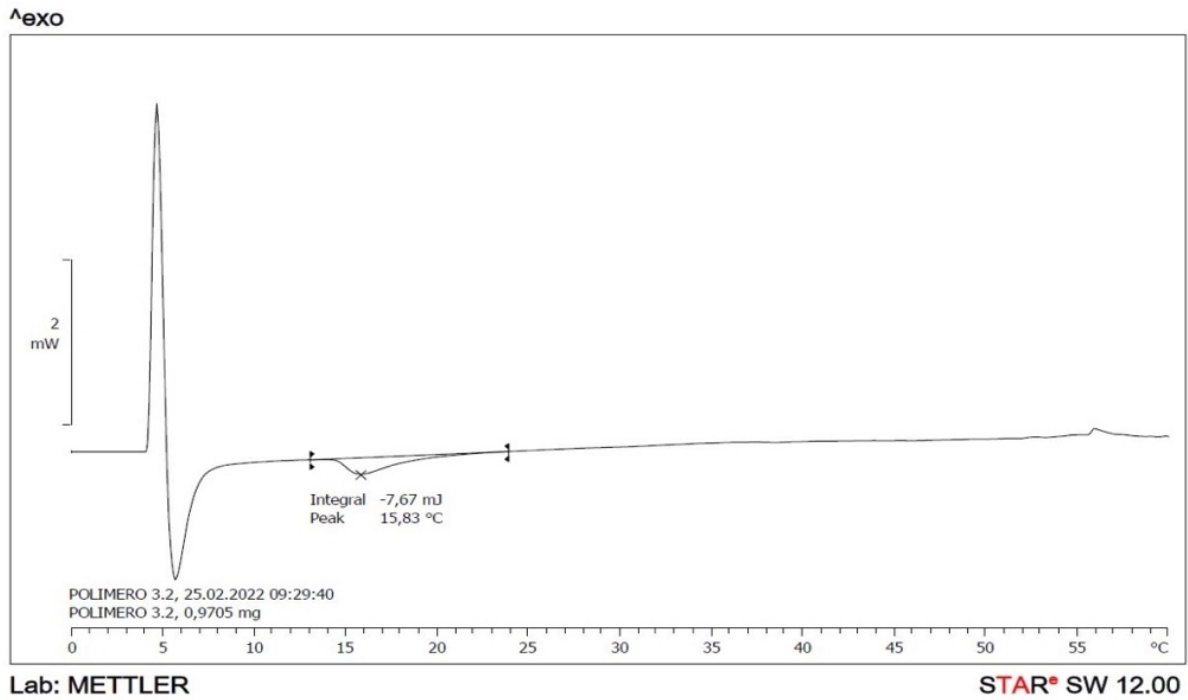
- Repetición 1:



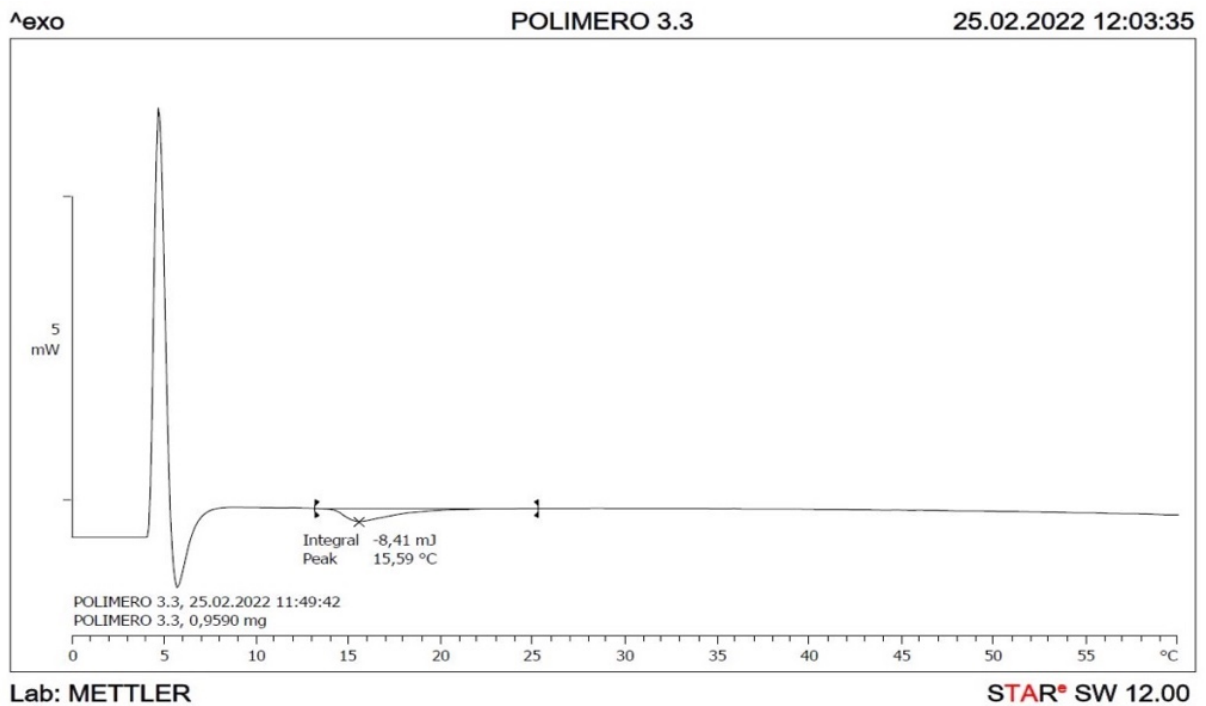
Lab: METTLER

STAR® SW 12.00

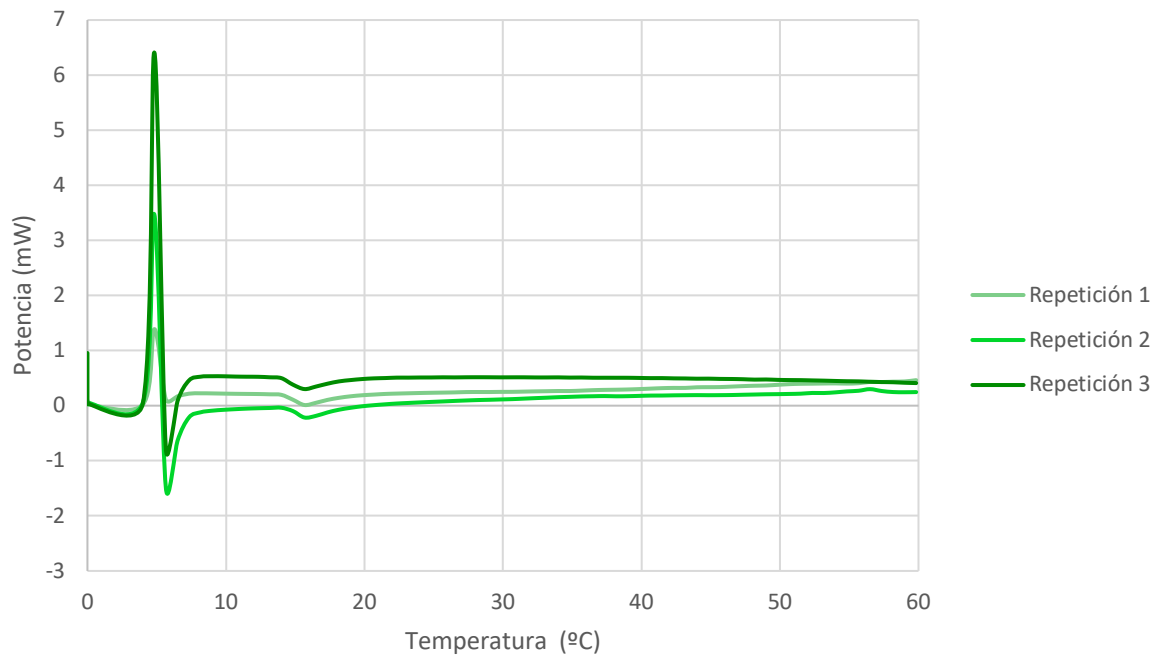
- Repetición 2:



- Repetición 3:



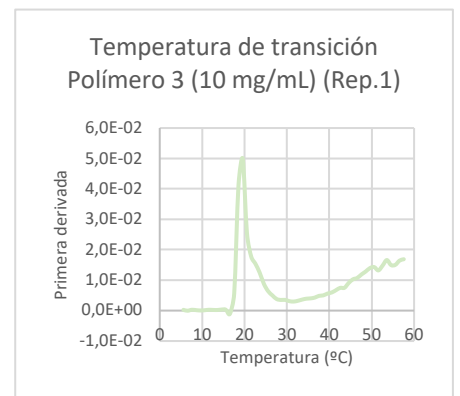
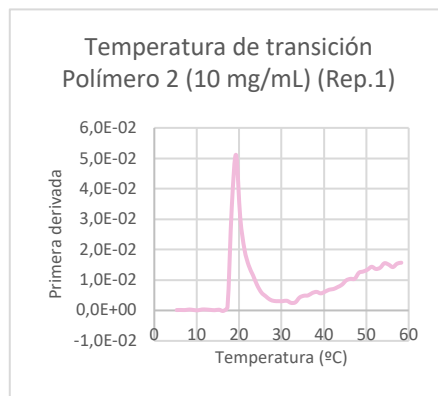
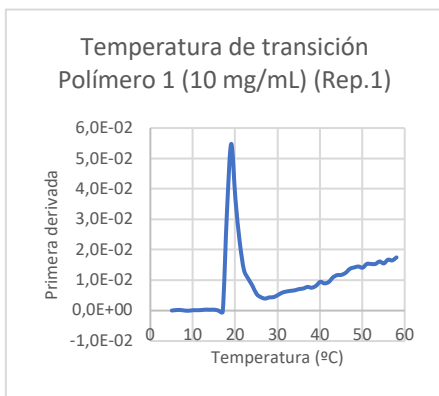
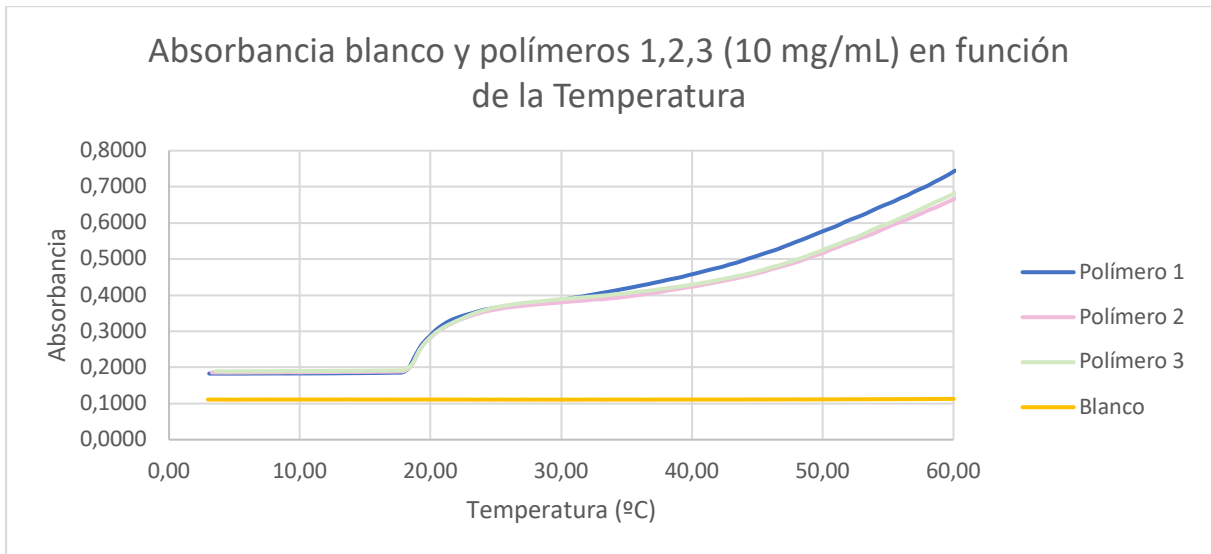
Polímero 3



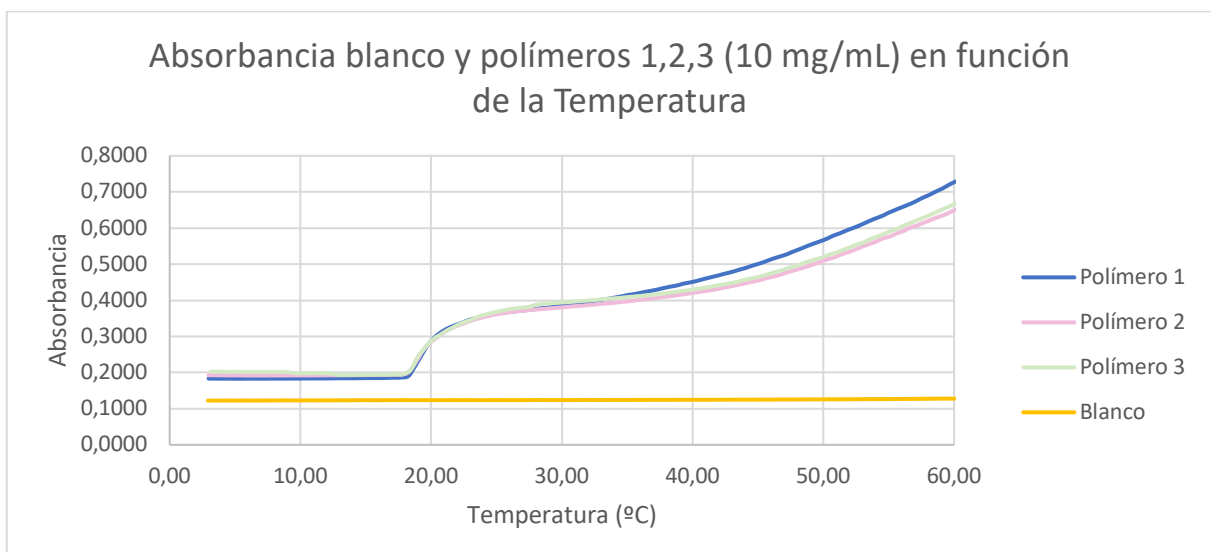
10.3. Turbidimetría

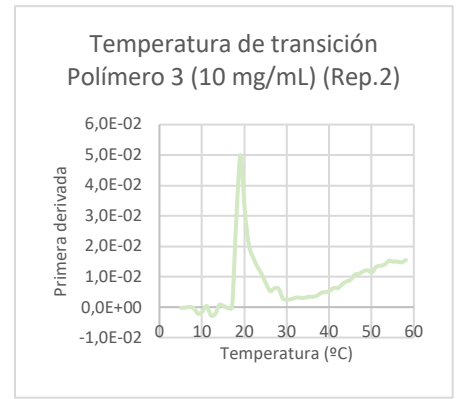
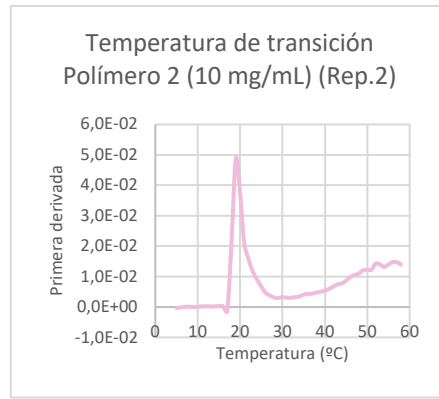
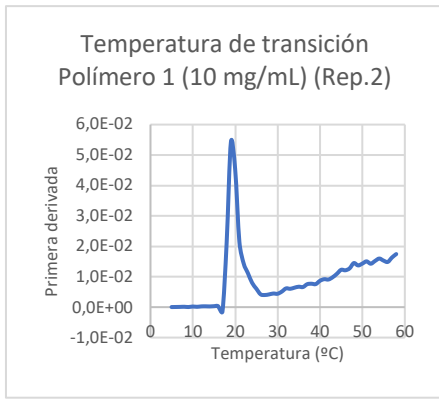
Turbidimetría de los polímeros a 1 mg/mL a 350 nm de 3 a 60°C.

- Repetición 1:

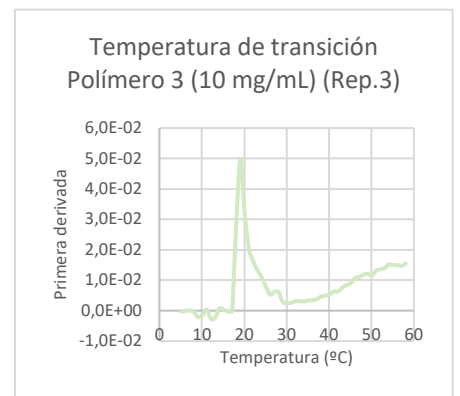
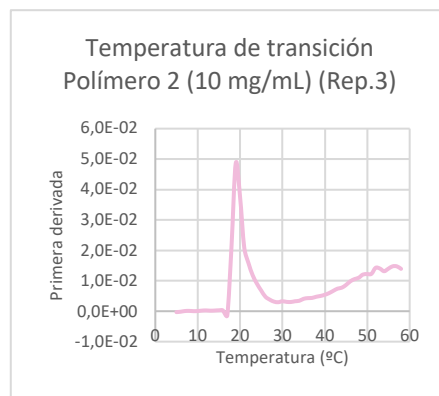
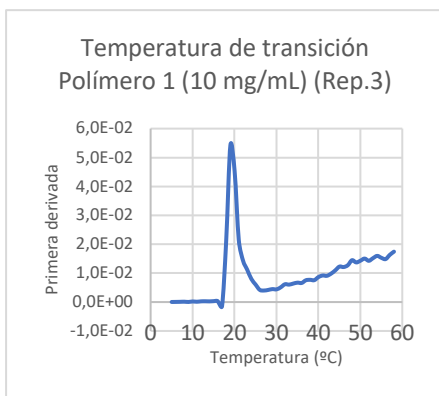
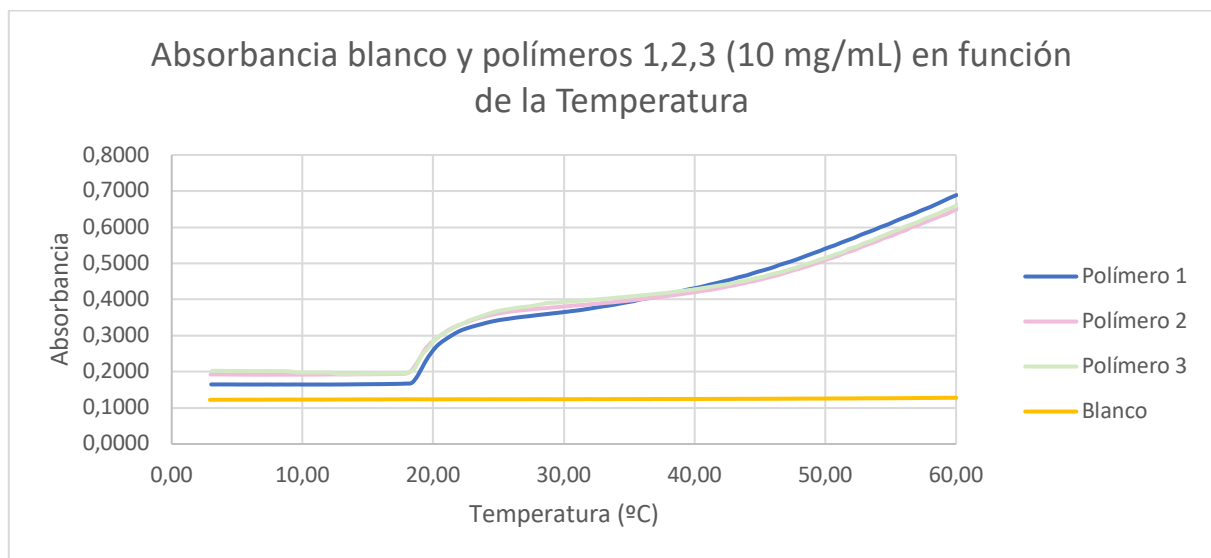


- Repetición 2:





- Repetición 3:

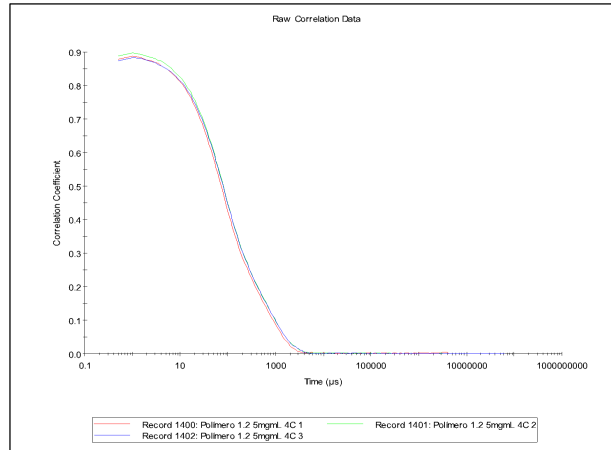


10.4. Zetasizer: DLS (tamaño de partícula)

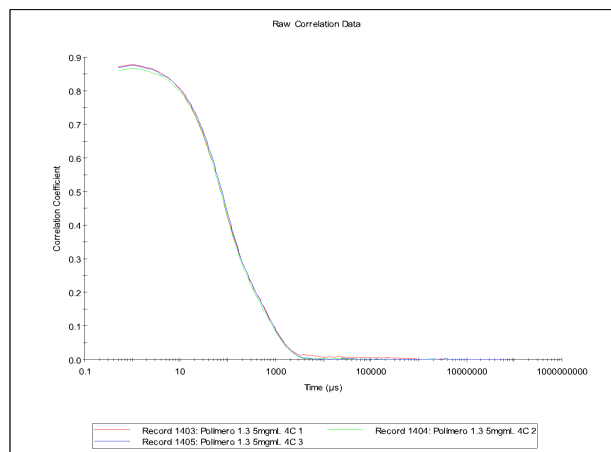
Polímero 1 (purificado con NaCl), concentración 5 mg/mL en PBS 1X.

○ Correlogramas 4°C:

- Repetición 2:

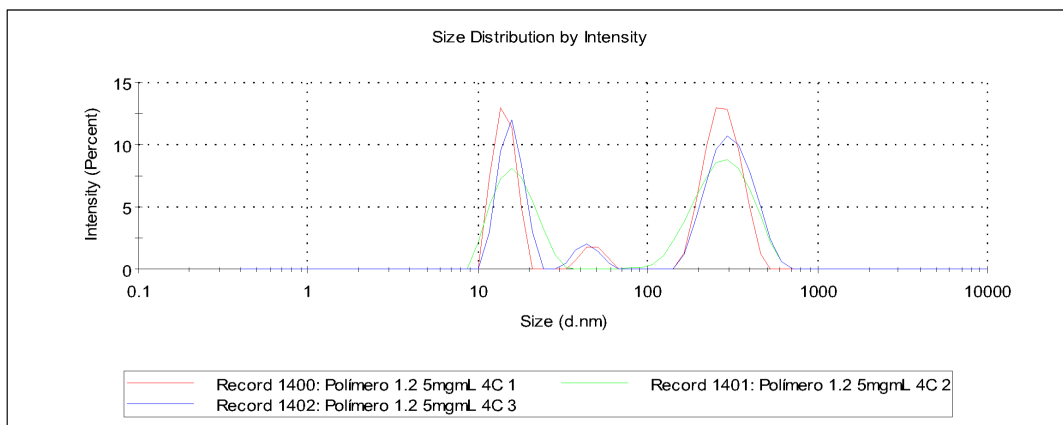


- Repetición 3:

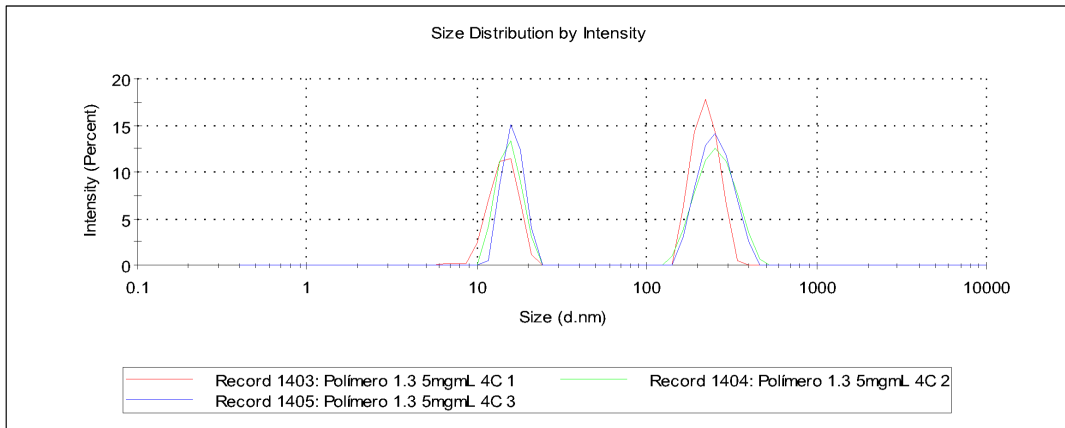


○ Intensidad 4°C:

- Repetición 2:

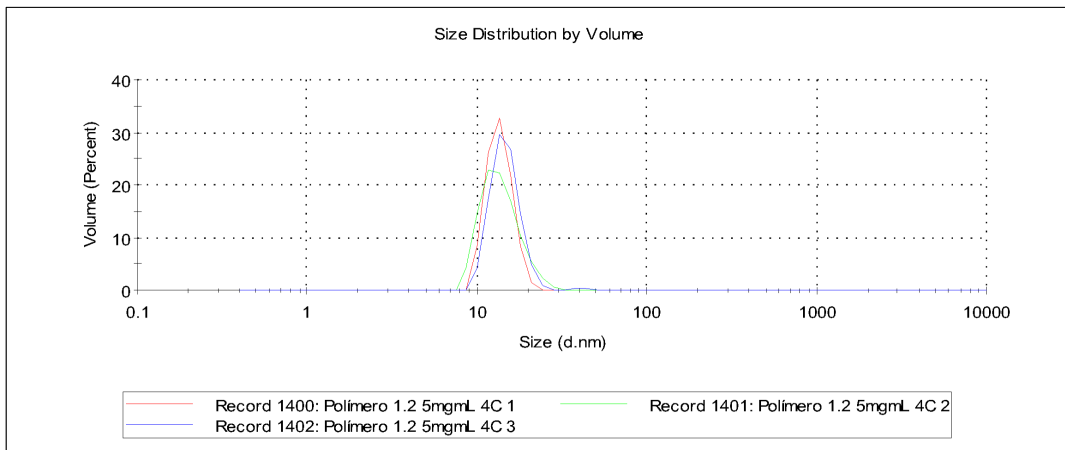


- Repetición 3:

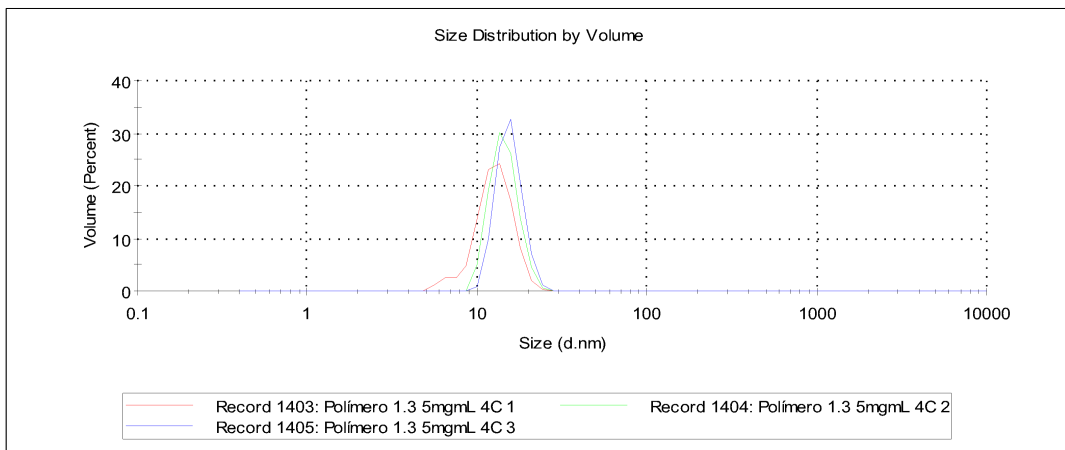


o Volumen 4°C:

- Repetición 2:

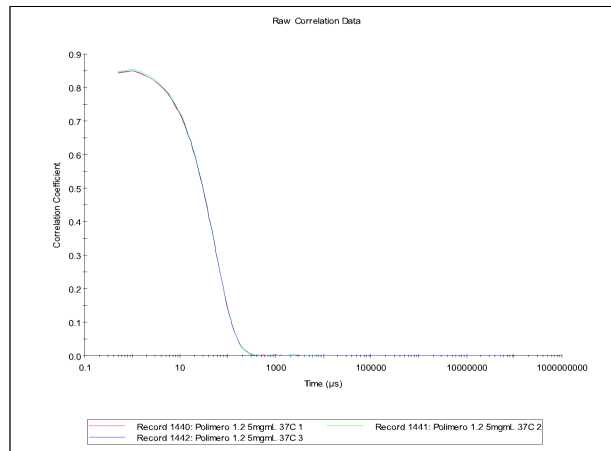


- Repetición 3:

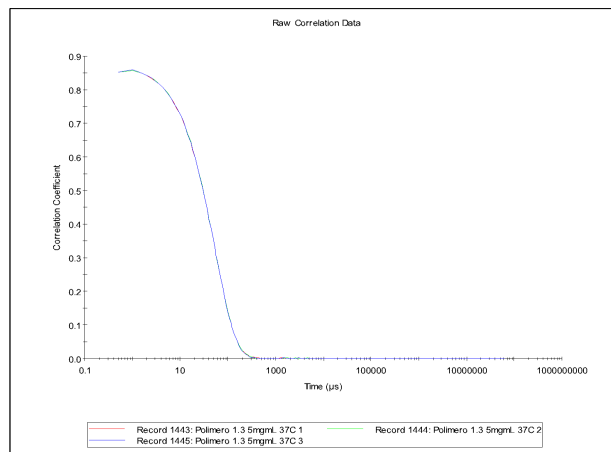


○ Correlogramas 37°C:

- Repetición 2:

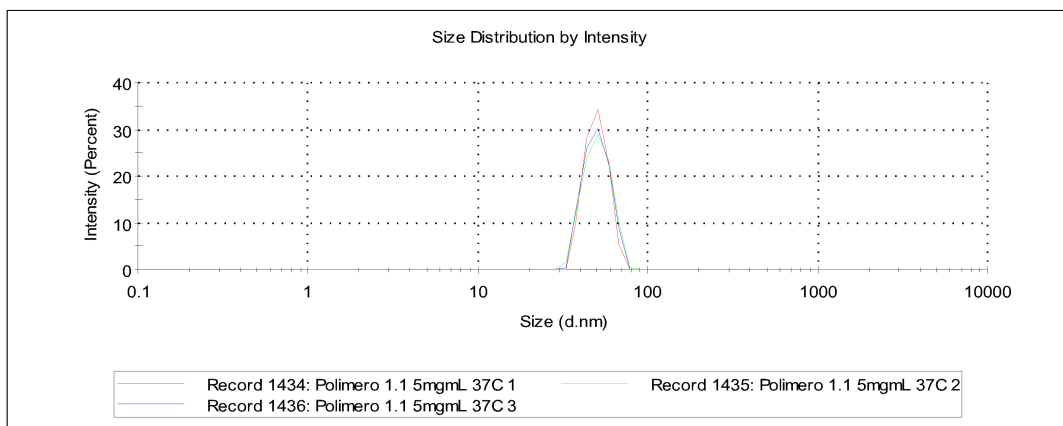


- Repetición 3:

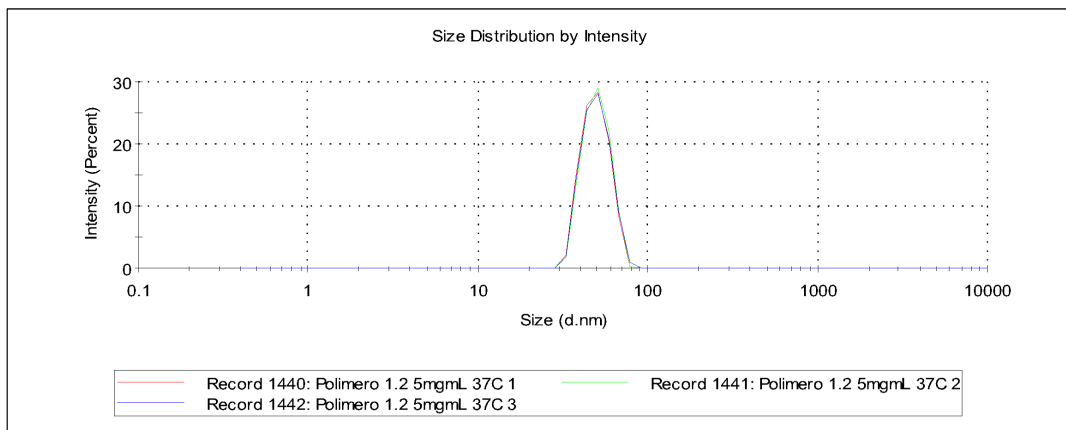


○ Intensidad 37°C:

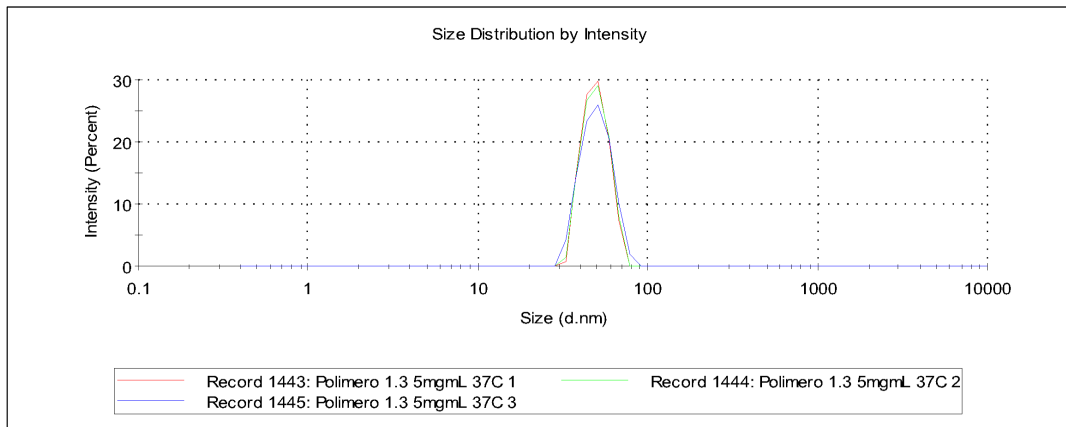
- Repetición 1:



- Repetición 2:

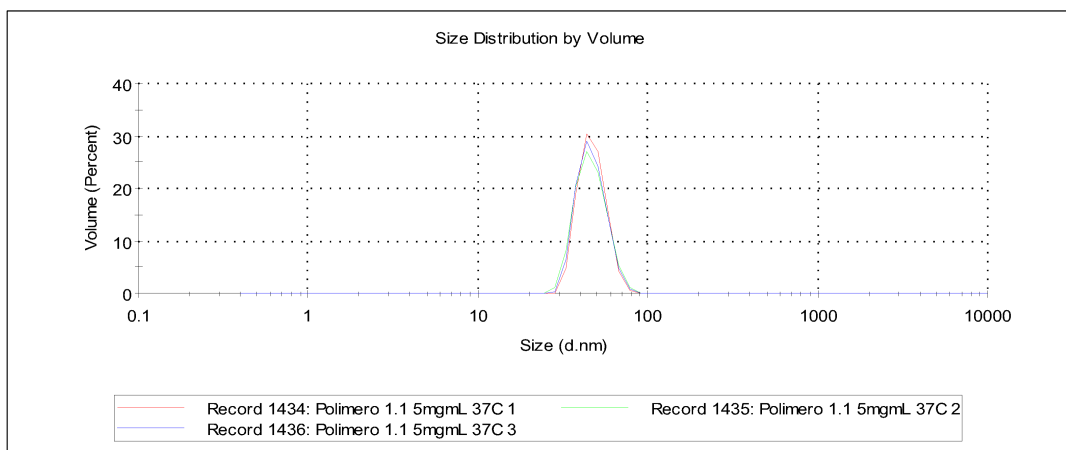


- Repetición 3:

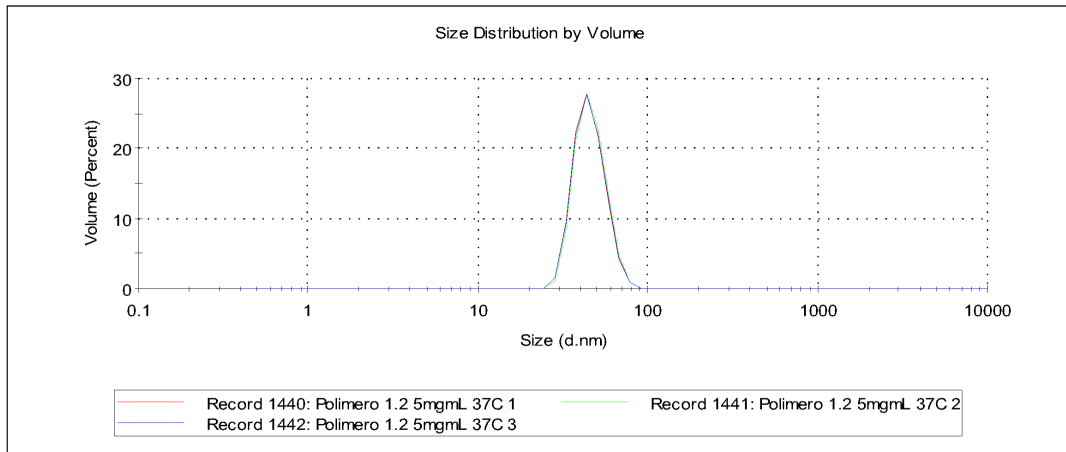


o Volumen 37°C:

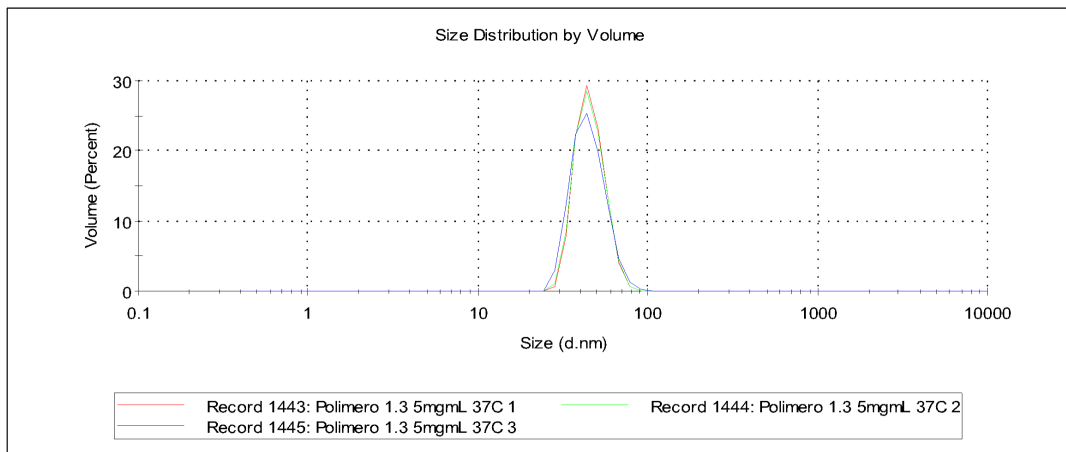
- Repetición 1:



- Repetición 2:



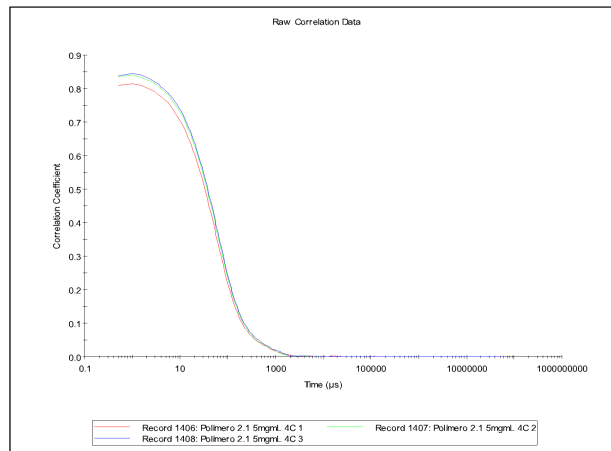
- Repetición 3:



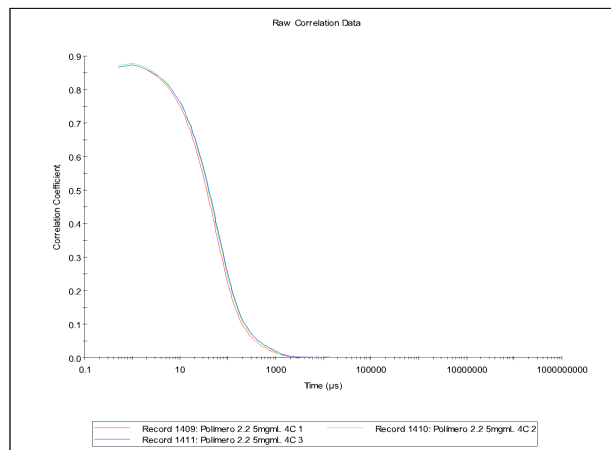
Polímero 2 (purificado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), concentración 5 mg/mL en PBS 1X.

○ Correlogramas 4°C:

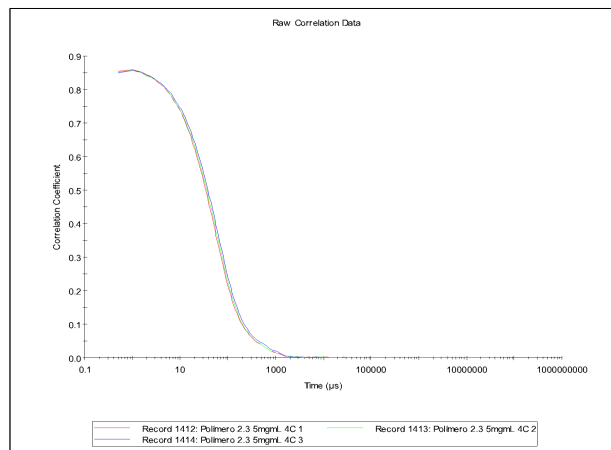
- Repetición 1:



- Repetición 2:

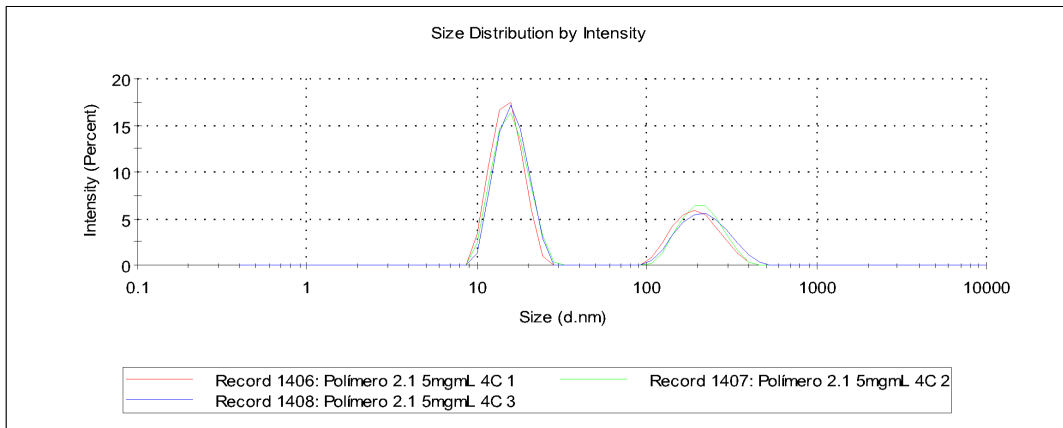


- Repetición 3:

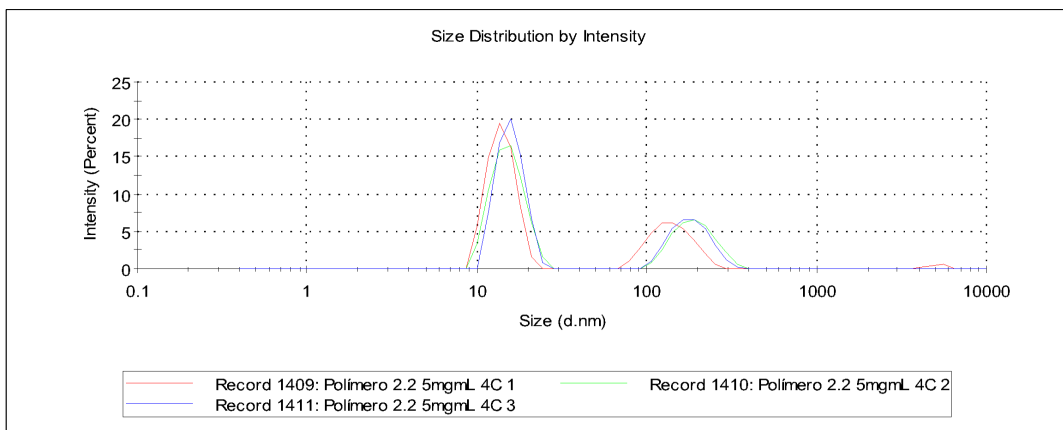


○ Intensidad 4°C:

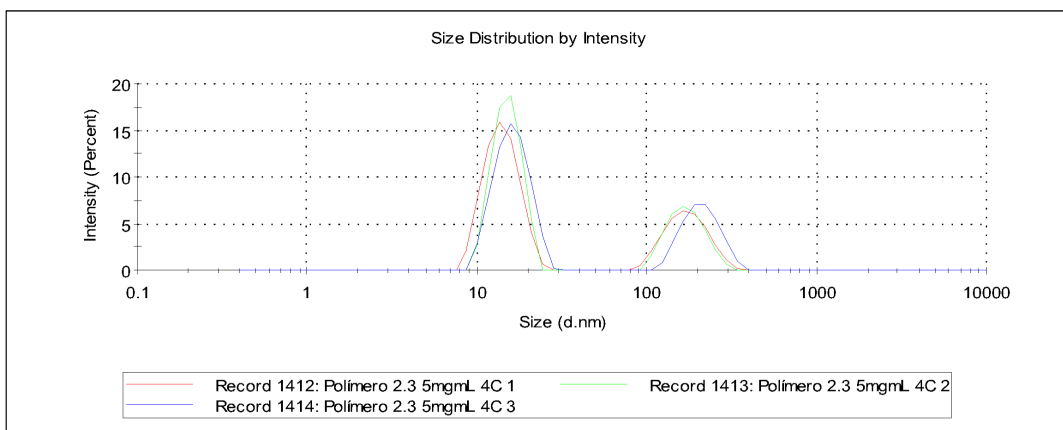
- Repetición 1:



- Repetición 2:

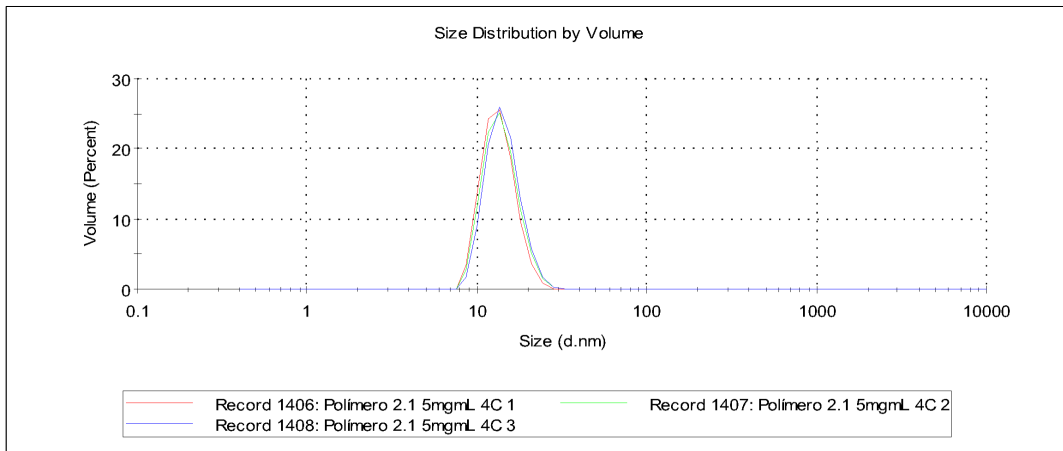


- Repetición 3:

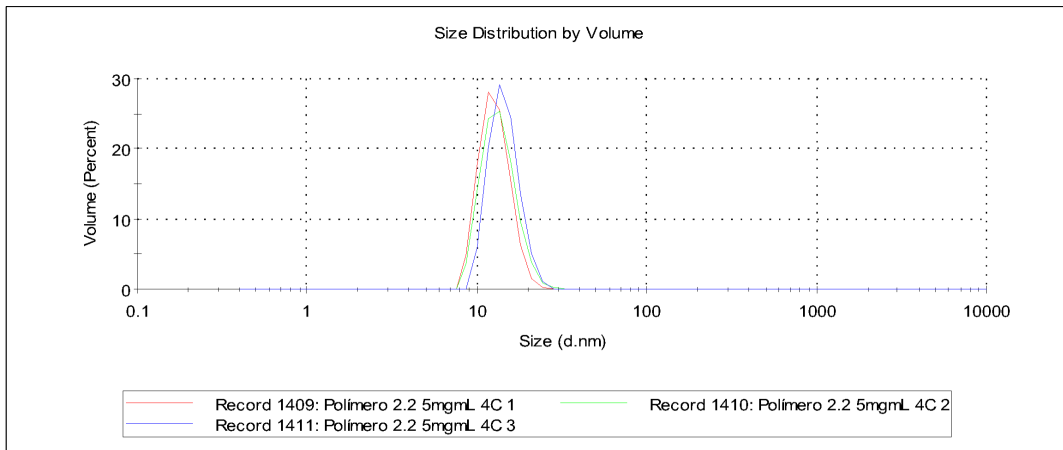


○ Volumen 4°C:

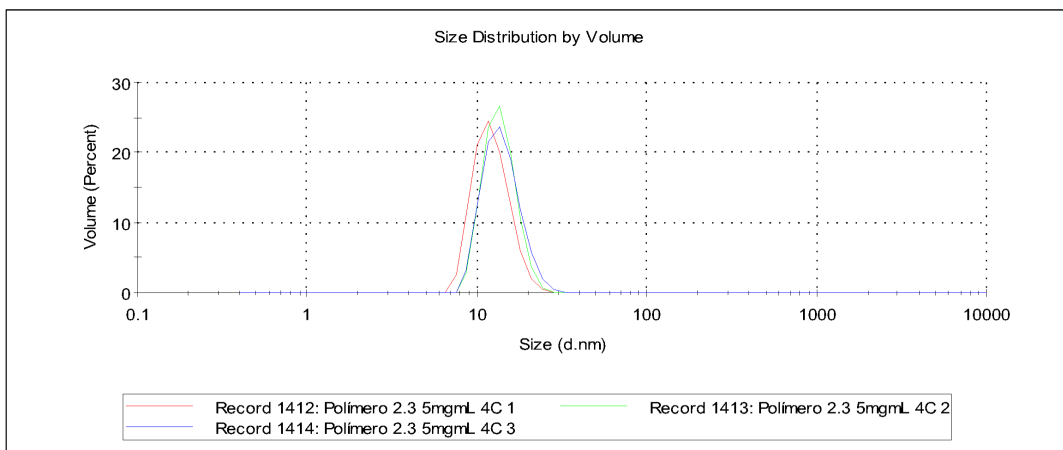
- Repetición 1:



- Repetición 2:

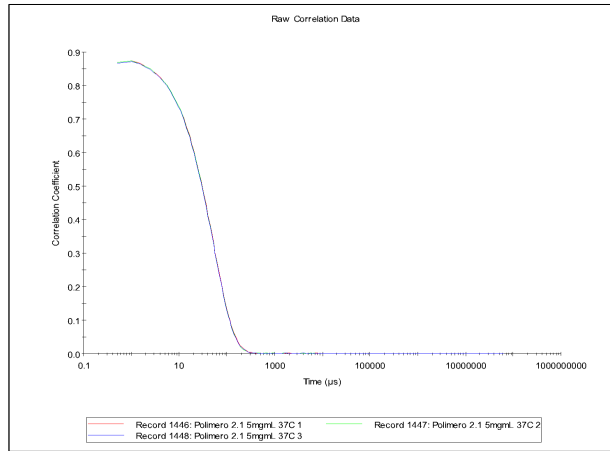


- Repetición 3:

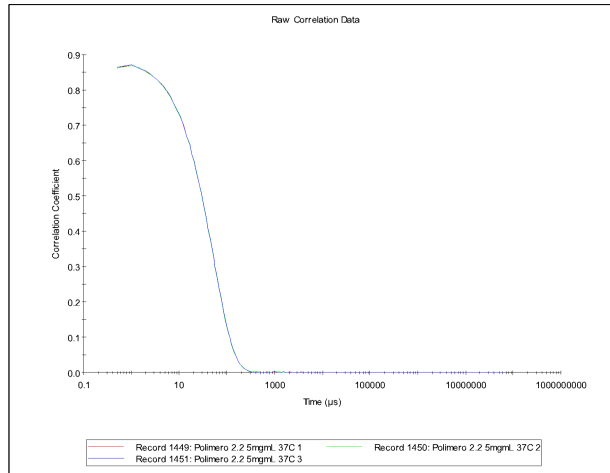


○ Correlogramas 37°C:

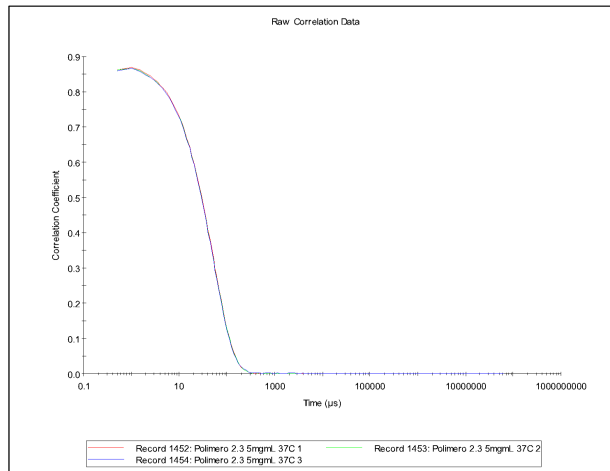
- Repetición 1:



- Repetición 2:

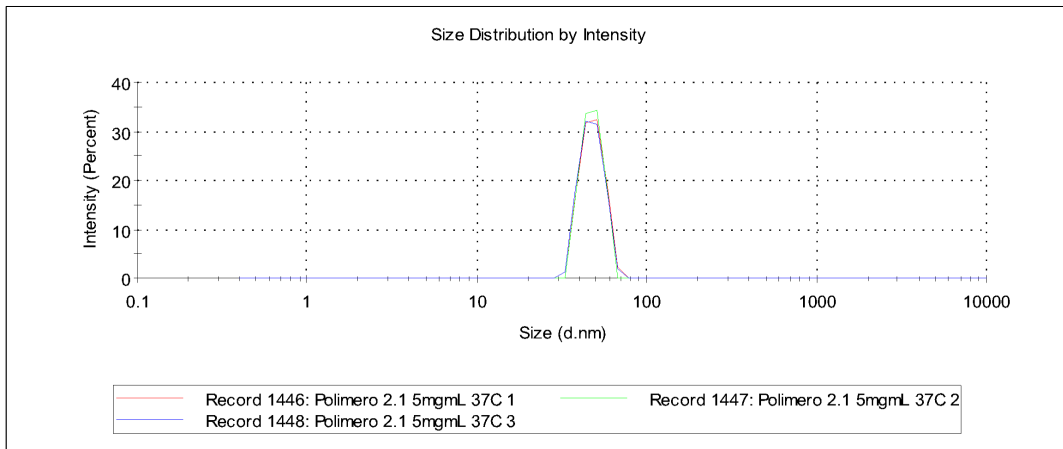


- Repetición 3:

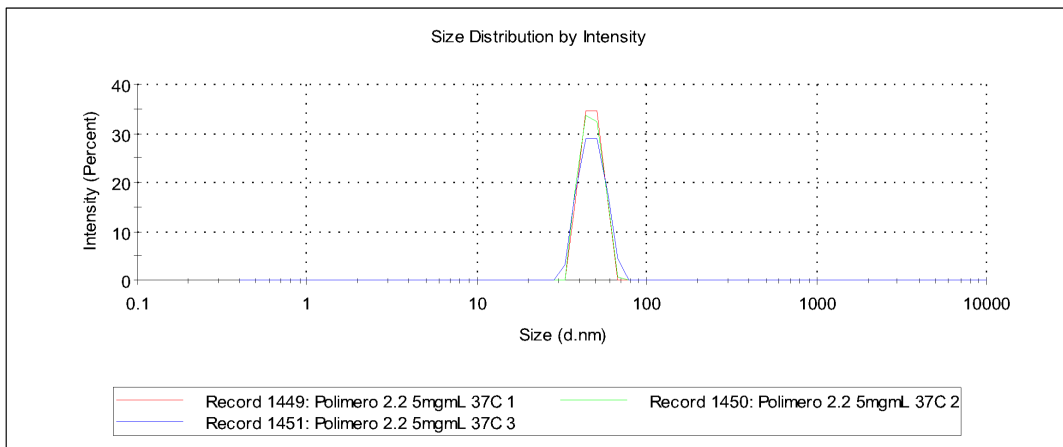


○ Intensidad 37°C:

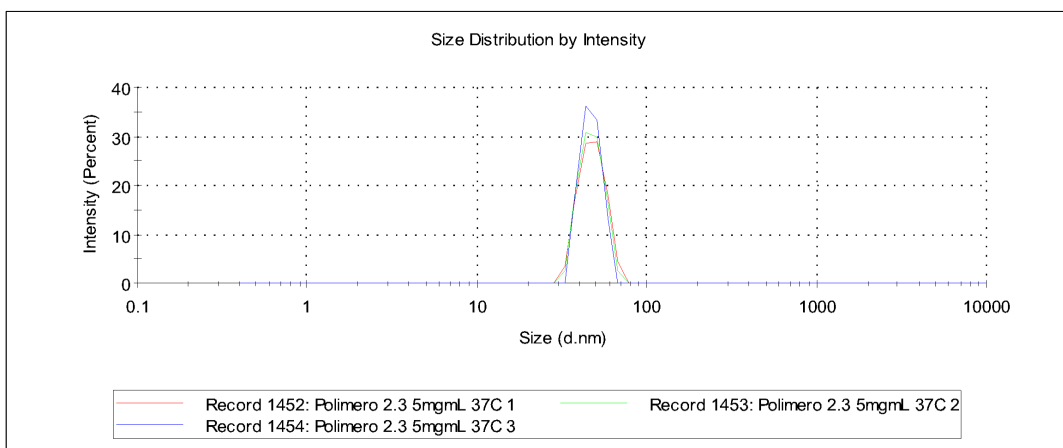
- Repetición 1:



- Repetición 2:

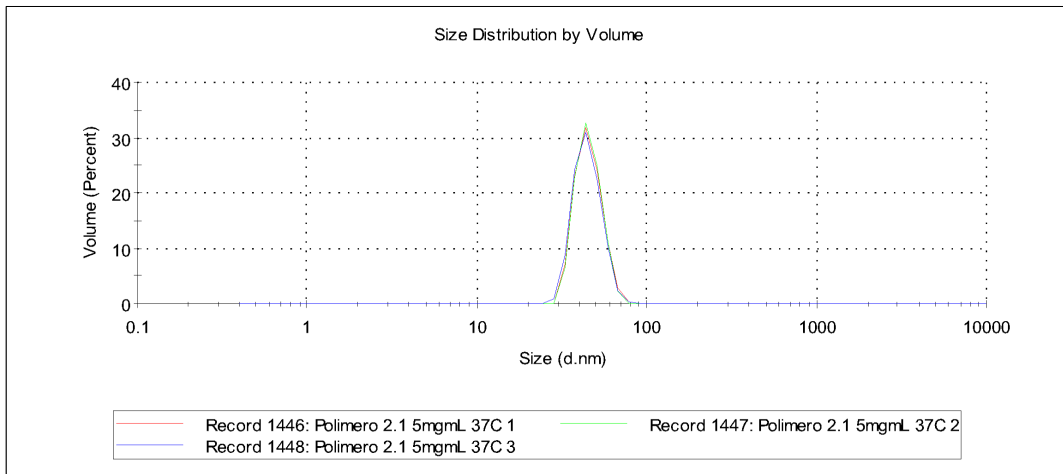


- Repetición 3:

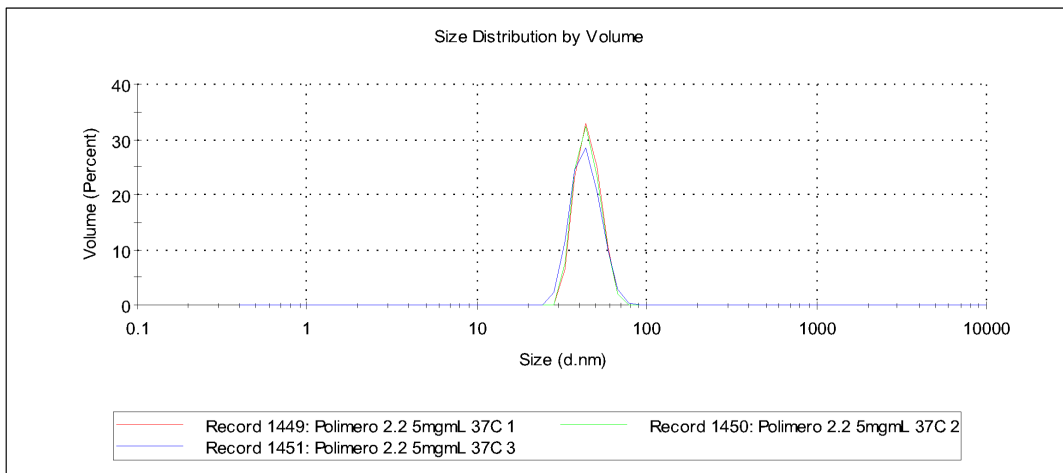


○ Volumen 37°C:

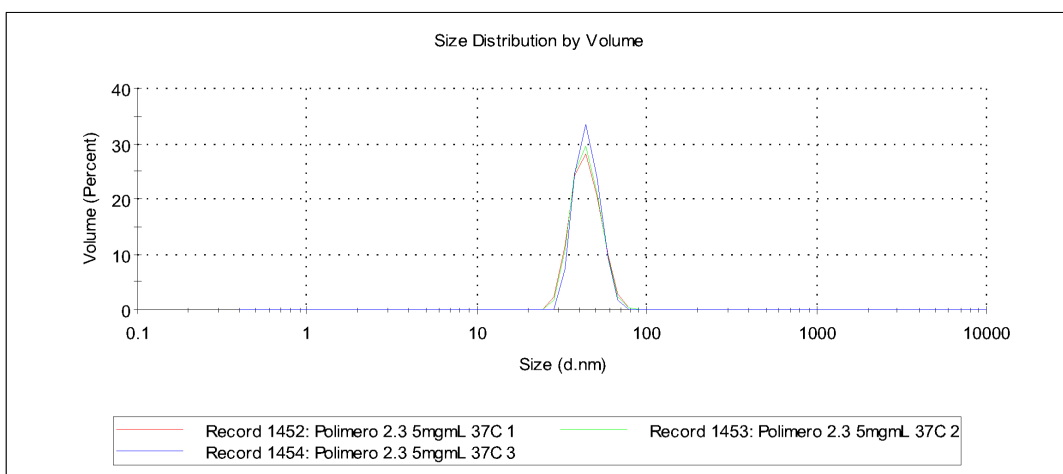
- Repetición 1:



- Repetición 2:



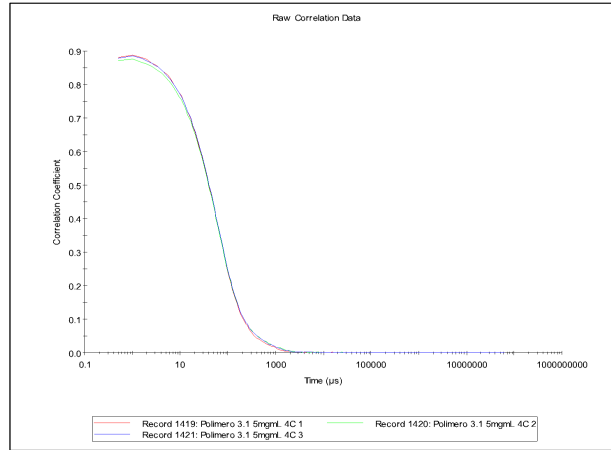
- Repetición 3:



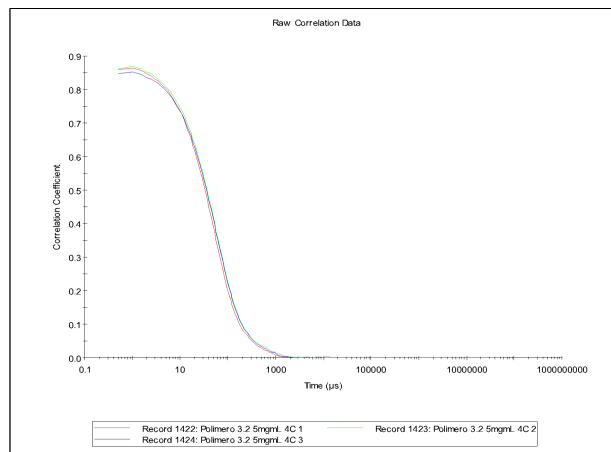
Polímero 3 (purificado con acidificación de pH (HCl), NaCl y (NH₄)₂SO₄), concentración 5 mg/mL en PBS 1X.

○ **Correlogramas 4°C:**

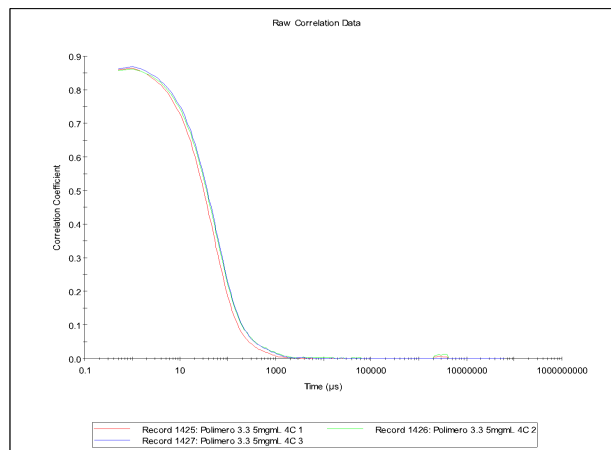
- **Repetición 1:**



- **Repetición 2:**

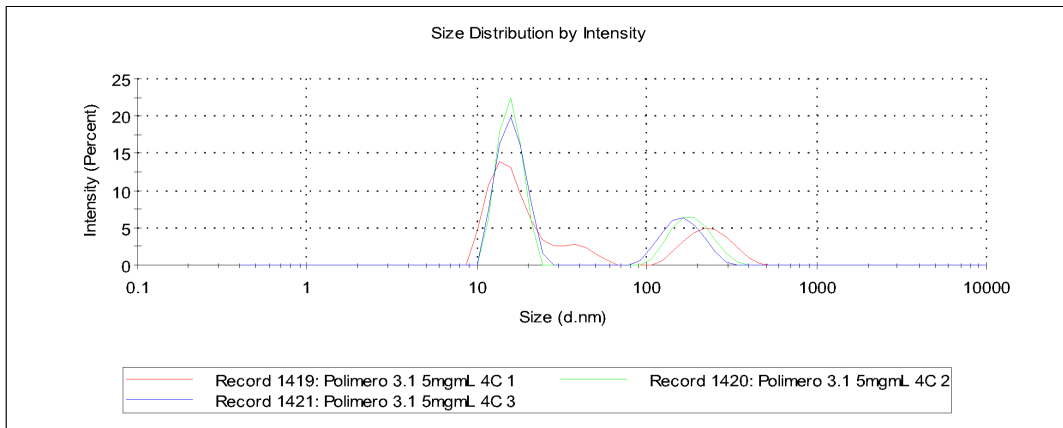


- **Repetición 3:**

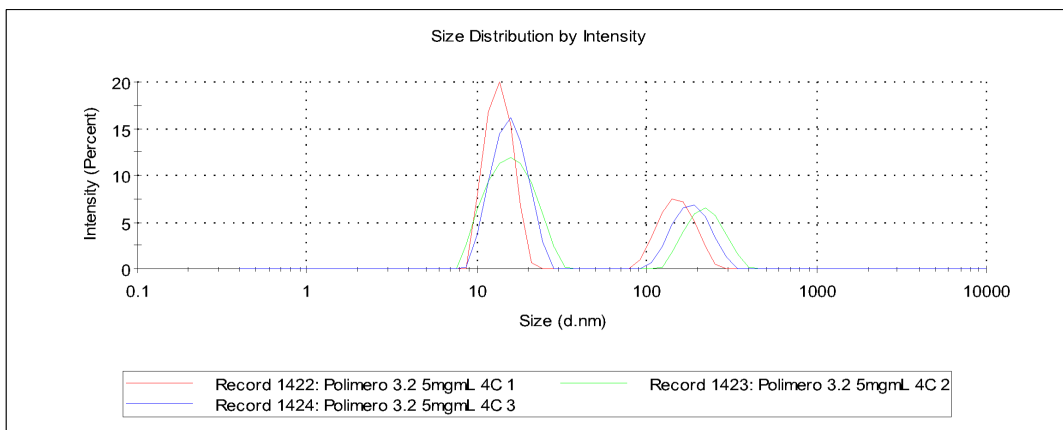


○ Intensidad 4°C:

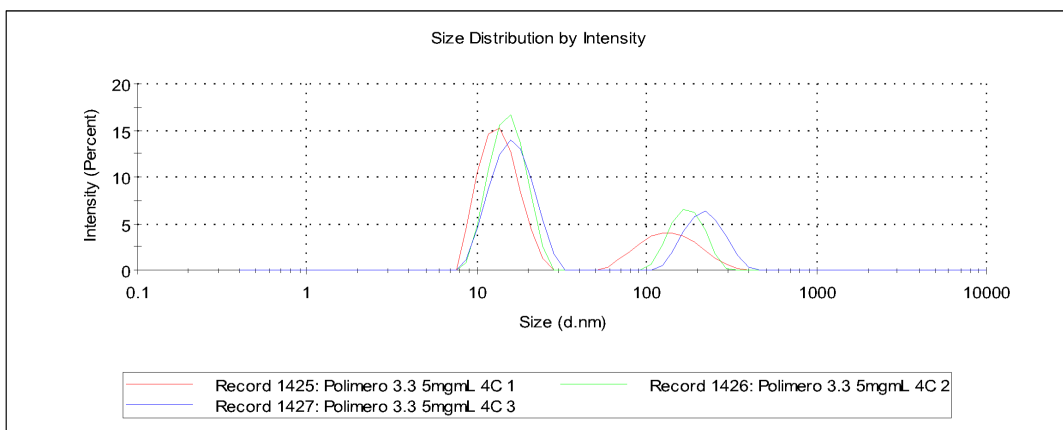
- Repetición 1:



- Repetición 2:

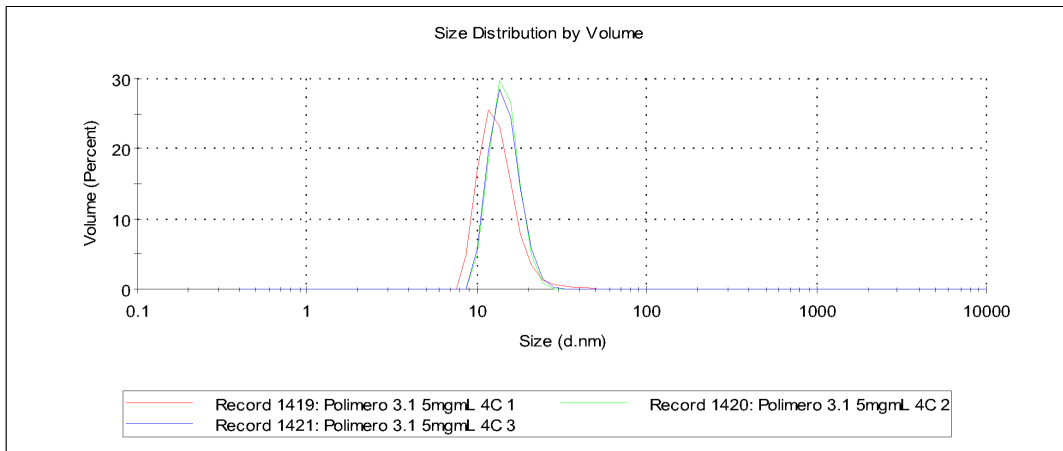


- Repetición 3:

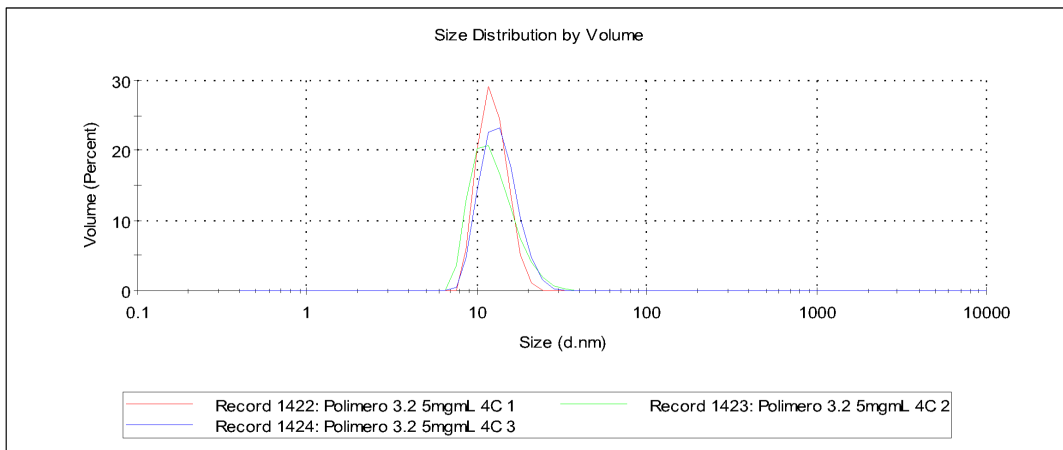


○ Volumen 4°C:

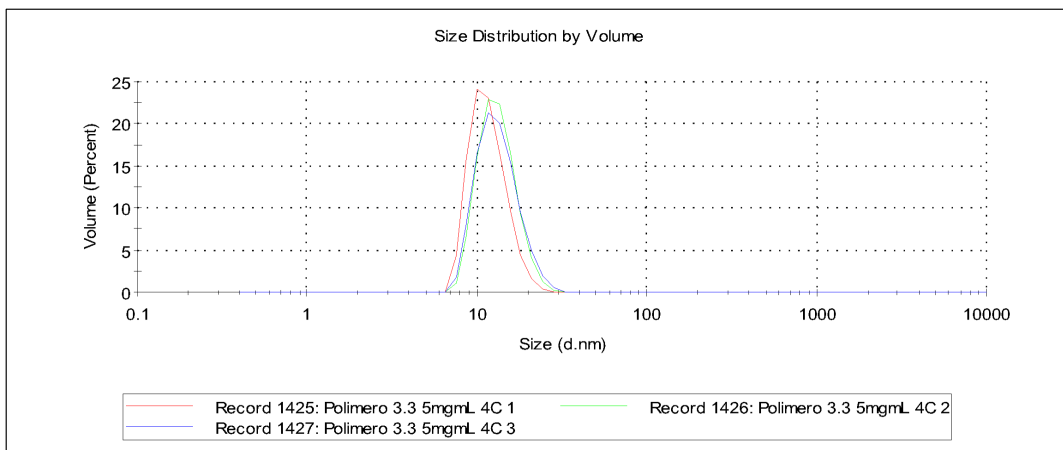
- Repetición 1:



- Repetición 2:

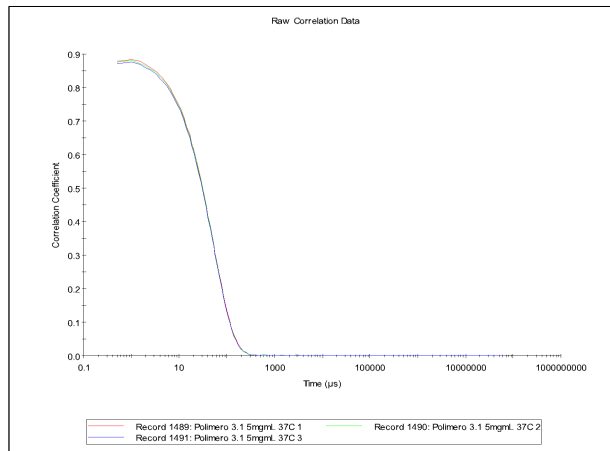


- Repetición 3:

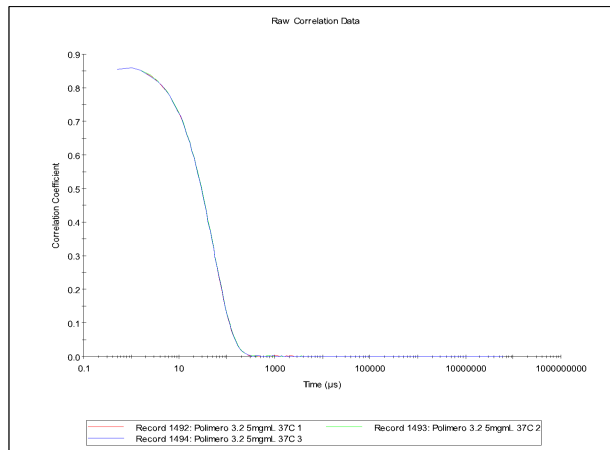


○ Correlogramas 37°C:

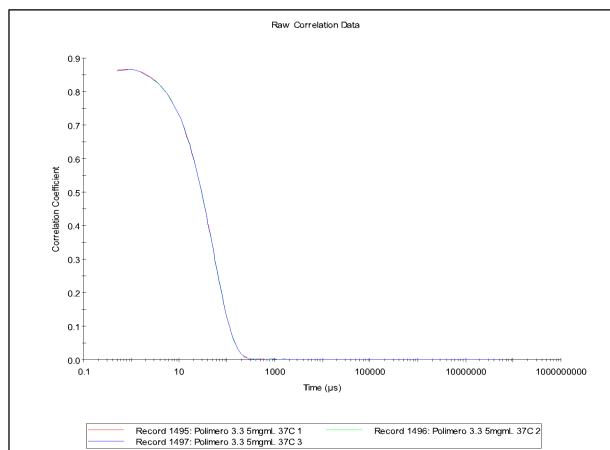
- Repetición 1:



- Repetición 2:

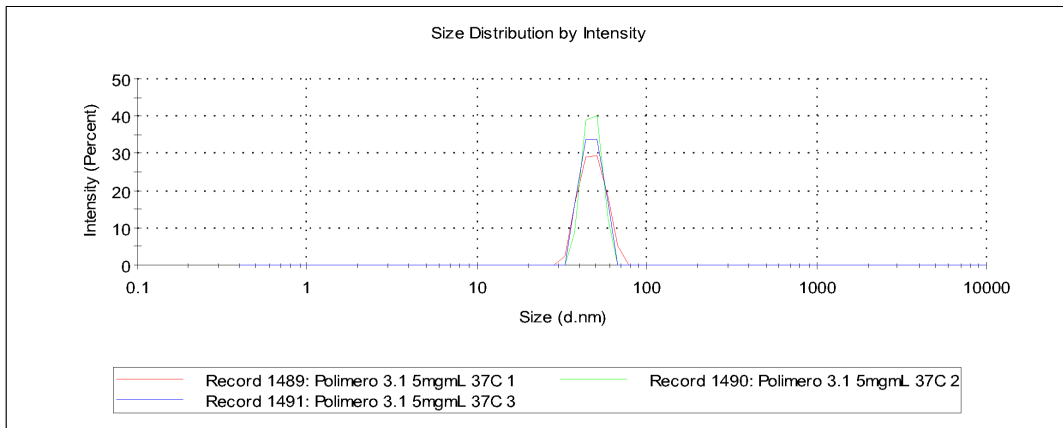


- Repetición 3:

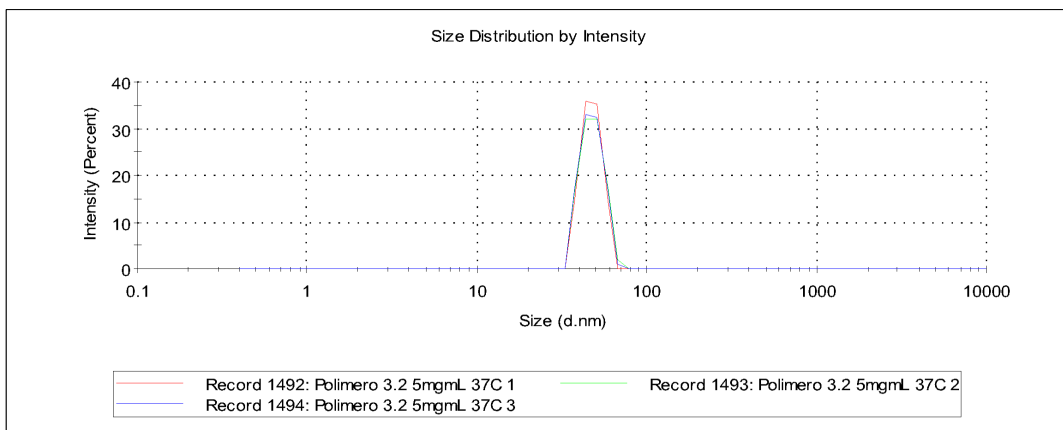


○ Intensidad 37°C:

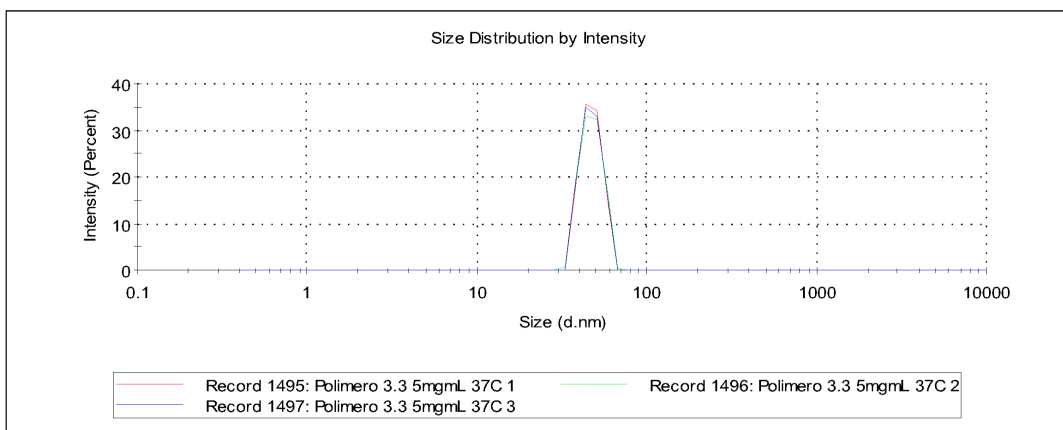
- Repetición 1:



- Repetición 2:

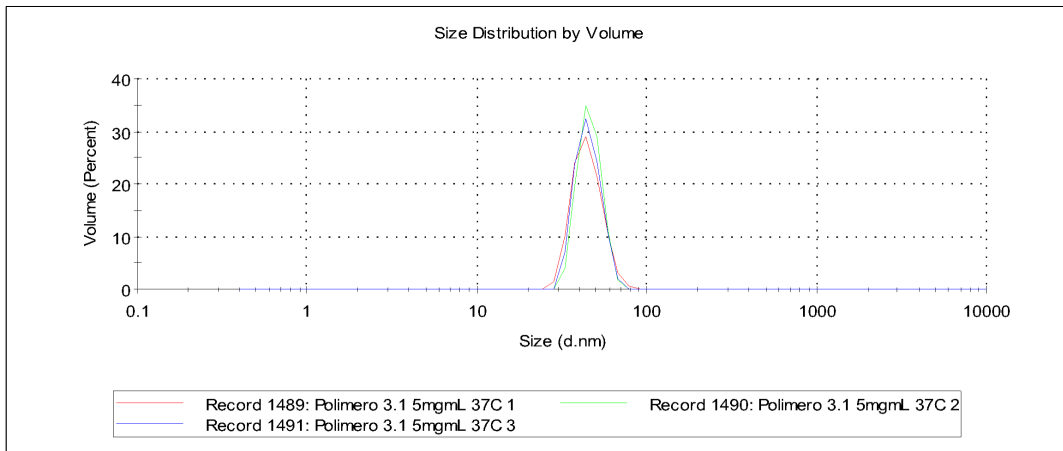


- Repetición 3:

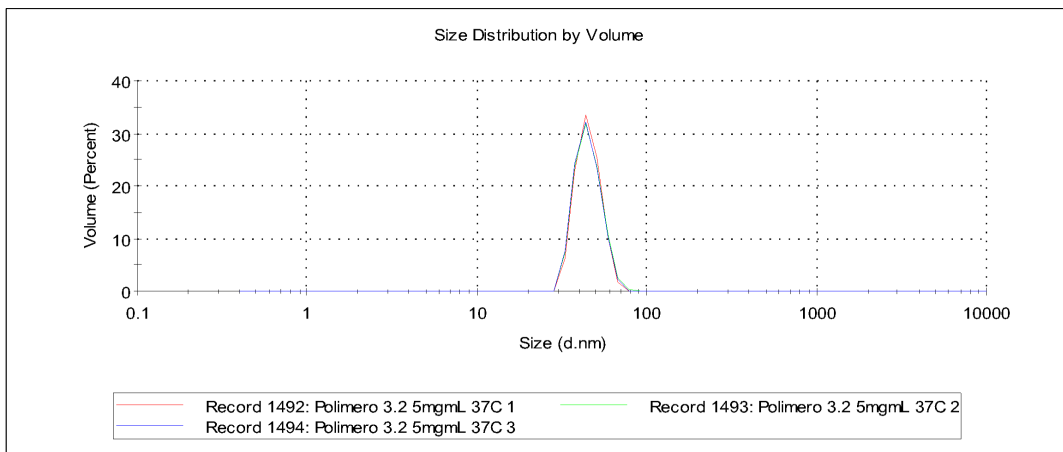


○ Volumen 37°C:

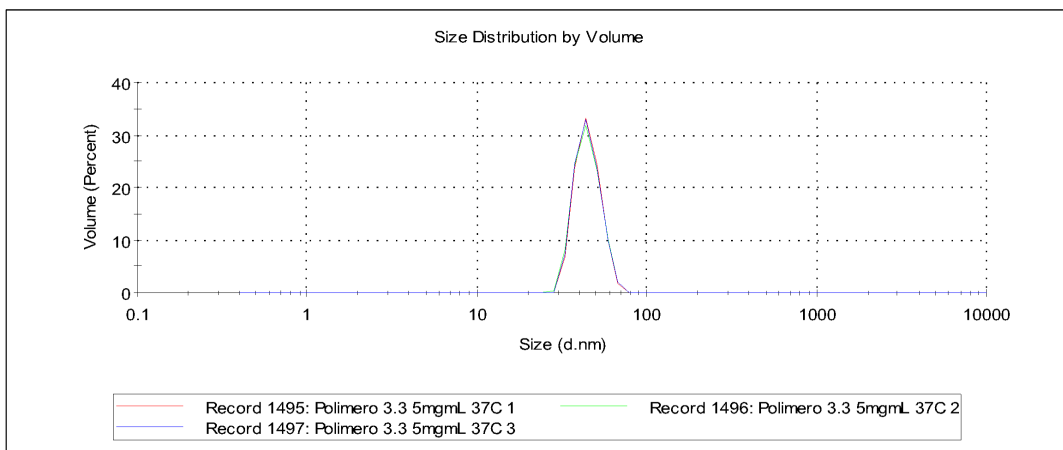
- Repetición 1:



- Repetición 2:



- Repetición 3:



10.5. Valores críticos de F para pruebas de una cola ($p = 0,05$)

g.d.l. 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	40	60	120	∞
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,0	243,9	244,7	245,4	245,9	246,5	246,9	247,3	247,7	248,0	251,1	252,2	253,3	254,3
2	18,513	19,000	19,164	19,247	19,296	19,330	19,353	19,371	19,385	19,396	19,405	19,413	19,419	19,424	19,429	19,433	19,437	19,440	19,443	19,446	19,471	19,479	19,487	19,496
3	10,128	9,552	9,277	9,117	9,013	8,941	8,887	8,845	8,812	8,786	8,763	8,745	8,729	8,715	8,703	8,692	8,683	8,675	8,667	8,660	8,594	8,572	8,549	8,526
4	7,709	6,944	6,591	6,388	6,256	6,163	6,094	6,041	5,999	5,964	5,936	5,912	5,891	5,873	5,858	5,844	5,832	5,821	5,811	5,803	5,717	5,688	5,658	5,628
5	6,608	5,786	5,409	5,192	5,050	4,950	4,876	4,818	4,772	4,735	4,704	4,678	4,655	4,636	4,619	4,604	4,590	4,579	4,568	4,558	4,464	4,431	4,398	4,365
6	5,987	5,143	4,757	4,534	4,387	4,284	4,207	4,147	4,099	4,060	4,027	4,000	3,976	3,956	3,938	3,922	3,908	3,896	3,884	3,874	3,774	3,740	3,705	3,669
7	5,591	4,737	4,347	4,120	3,972	3,866	3,787	3,726	3,677	3,637	3,603	3,575	3,550	3,529	3,511	3,494	3,480	3,467	3,455	3,445	3,340	3,304	3,267	3,230
8	5,318	4,459	4,066	3,838	3,687	3,581	3,500	3,438	3,388	3,347	3,313	3,284	3,259	3,237	3,218	3,202	3,187	3,173	3,161	3,150	3,043	3,005	2,967	2,928
9	5,117	4,256	3,863	3,633	3,482	3,374	3,293	3,230	3,179	3,137	3,102	3,073	3,048	3,025	3,006	2,989	2,974	2,960	2,948	2,936	2,826	2,787	2,748	2,707
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,135	3,072	3,020	2,978	2,943	2,913	2,887	2,865	2,845	2,828	2,812	2,798	2,785	2,774	2,661	2,621	2,580	2,538
11	4,844	3,982	3,587	3,357	3,204	3,095	3,012	2,948	2,896	2,854	2,818	2,788	2,761	2,739	2,719	2,701	2,685	2,671	2,658	2,646	2,531	2,490	2,448	2,404
12	4,747	3,885	3,490	3,259	3,106	2,996	2,912	2,848	2,796	2,753	2,717	2,687	2,660	2,637	2,617	2,599	2,583	2,568	2,555	2,544	2,426	2,384	2,341	2,296
13	4,667	3,806	3,411	3,179	3,025	2,915	2,832	2,767	2,714	2,671	2,635	2,604	2,577	2,554	2,533	2,515	2,499	2,484	2,471	2,459	2,339	2,297	2,252	2,206
14	4,600	3,739	3,344	3,112	2,958	2,848	2,764	2,699	2,646	2,602	2,565	2,534	2,507	2,484	2,463	2,445	2,428	2,413	2,400	2,388	2,266	2,223	2,178	2,131
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,707	2,641	2,588	2,544	2,507	2,475	2,448	2,424	2,403	2,385	2,368	2,353	2,340	2,328	2,204	2,160	2,114	2,066
16	4,494	3,634	3,239	3,007	2,852	2,741	2,657	2,591	2,538	2,494	2,456	2,425	2,397	2,373	2,352	2,333	2,317	2,302	2,288	2,276	2,151	2,106	2,059	2,010
17	4,451	3,592	3,197	2,965	2,810	2,699	2,614	2,548	2,494	2,450	2,413	2,381	2,353	2,329	2,308	2,289	2,272	2,257	2,243	2,230	2,104	2,058	2,011	1,960
18	4,414	3,555	3,160	2,928	2,773	2,661	2,577	2,510	2,456	2,412	2,374	2,342	2,314	2,290	2,269	2,250	2,233	2,217	2,203	2,191	2,063	2,017	1,968	1,917
19	4,381	3,522	3,127	2,895	2,740	2,628	2,544	2,477	2,423	2,378	2,340	2,308	2,280	2,256	2,234	2,215	2,198	2,182	2,168	2,155	2,026	1,980	1,930	1,878
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,514	2,447	2,393	2,348	2,310	2,278	2,250	2,225	2,203	2,184	2,167	2,151	2,137	2,124	1,994	1,946	1,896	1,843
30	4,171	3,316	2,922	2,690	2,534	2,421	2,334	2,266	2,211	2,165	2,126	2,092	2,063	2,037	2,015	1,995	1,976	1,960	1,945	1,932	1,792	1,740	1,683	1,622
40	4,085	3,232	2,839	2,606	2,449	2,336	2,249	2,180	2,124	2,077	2,038	2,003	1,974	1,948	1,924	1,904	1,885	1,868	1,853	1,839	1,693	1,637	1,577	1,509
50	4,034	3,183	2,790	2,557	2,400	2,286	2,199	2,130	2,073	2,026	1,986	1,952	1,921	1,895	1,871	1,850	1,831	1,814	1,798	1,784	1,634	1,576	1,511	1,438
60	4,001	3,150	2,758	2,525	2,368	2,254	2,167	2,097	2,040	1,993	1,952	1,917	1,887	1,860	1,836	1,815	1,796	1,778	1,763	1,748	1,594	1,534	1,467	1,389
80	3,960	3,111	2,719	2,486	2,329	2,214	2,126	2,056	1,999	1,951	1,910	1,875	1,845	1,817	1,793	1,772	1,752	1,734	1,718	1,703	1,545	1,482	1,411	1,325
100	3,936	3,087	2,696	2,463	2,305	2,191	2,103	2,032	1,975	1,927	1,886	1,850	1,819	1,792	1,768	1,746	1,726	1,708	1,691	1,676	1,515	1,450	1,376	1,283
120	3,920	3,072	2,680	2,447	2,289	2,175	2,087	2,016	1,959	1,910	1,869	1,834	1,803	1,775	1,750	1,728	1,709	1,690	1,674	1,659	1,495	1,429	1,352	1,254
∞	3,841	2,996	2,605	2,372	2,214	2,099	2,010	1,938	1,880	1,831	1,789	1,752	1,720	1,692	1,666	1,644	1,623	1,604	1,587	1,571	1,394	1,318	1,221	1,000