



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Física

**BIOMINERALIZACIÓN INDUCIDA POR TRANSICIONES LÍQUIDO-LÍQUIDO DE
POLÍMEROS PROTEICOS RECOMBINANTES**

**Autor/a: Laura Juan González
Tutor/es/as: Julio Fernández Fernández
Suset Barroso Solares
Año 2023**

*A mis amigos, que me recuerdan todo lo que
soy cuando se me olvida.
A él, que me enseñó lo bonito de aprender.
A ellos, que me enseñan a ser.
Y sobretodo a ella, que siempre está a la
distancia exacta.*

Índice

1. ABSTRACT/Resumen	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Nanotecnología y biomateriales	2
2.2. Polímeros	5
2.3. Proteínas: estructura y empaquetamiento	5
2.4. Elastina	7
2.5. Polímeros ELR (Elastin-like Recombinamers)	8
2.6. Tecnología del ADN Recombinante	10
2.7. Biomineralización	11
2.7.1. Biomineralización y tejido óseo	11
2.7.2. Mineralización biomimética y ELR con SN _A 15	13
2.8. Objetivos	15
3. SECCIÓN EXPERIMENTAL	16
3.1. Polímeros ELR	16
3.2. Sales	16
3.3. Técnicas experimentales	17
3.3.1. Preparación de disolución de polímeros y mezcla	17
3.3.2. Electroforesis SDS-PAGE	18
3.3.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	19
3.3.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	21
3.3.5. Dispersión dinámica de la luz (DLS)	22
3.3.6. Mineralización	24
3.3.7. Microscopia electrónica de transmisión (TEM):	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.0.1. Electroforesis	26
4.0.2. Espectroscopia inarroja por transformada de Fourier (FTIR)	26
4.0.3. Dispersión dinámica de la luz (DLS):	29
4.0.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry):	30
4.0.5. Mineralización:	32
4.0.6. Microscopia electrónica de transmisión (TEM):	32
5. CONCLUSIONES	36
6. ANEXOS	37
Anexo A. Aminoácidos	37
Anexo B. Estructura de la hidroxiapatita	37
Anexo C. Estructura proteínas	38

Anexo D. Serie Hofmeister	38
Anexo E. Cantidades de muestra y marker en la electroforesis SDS-Page	38
Anexo F. Guía del marker de la electroforesis	39
Anexo G. Cantidades para el protocolo de electroforesis SDS-Page en el laboratorio BIOFORGE	39
Anexo H. Tabla de longitudes de onda FTIR	40
Anexo I. Gráfica agrupación de datos FTIR	41
Anexo J. Datos Z-average obtenidos con DLS	41
Anexo K. Datos DSC utilizados en las gráficas de las T_t obtenidas	42
Anexo L. Datos DSC utilizados en las gráficas de las entalpía (H) obtenidas	42
7. BIBLIOGRAFÍA	43

Listado de abreviaturas

AA	Aminoácidos
ACF	Amorphous Calcium Phosphate
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ATR	Attenuated Total Reflection
CCD	Charged-Coupled Device
C _p	Capacidad calorífica
DLS	Dinamic Light Scattering
DSC	Differential Scanning Calorimetry
ELR	Polímero Recombinante de tipo Elastina
FCA	Fosfato de Calcio Amorfo
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
G	Energía libre de Gibbs
H	Entalpía
HA	Hidroxiapatita
IBM	International Business Machines
IR	Infrarrojo
ISO	International Organization for Standardization
I _t	Induction Time
ITT	Inverse Temperature Transition
MEC	Matriz Extracelular
PBS	Phosphate Buffered Saline
PdI	Polydispersity Index
PMMA	Polimetilmetacrilato
R	Residuo
S	Entropía
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
STM	Scanning Tunneling Microscope
TEM	Transmission Electron Microscopy
T _t	Temperatura de Transición

1. *ABSTRACT*/Resumen

Nanotechnology has undergone significant progress in recent years due to the growing need to create systems with specific functions at the nanometer scale. This discipline has provided sophisticated tools that have revolutionized various fields of knowledge, such as biomedical science, where it has made it possible to improve the efficiency and precision of current diagnostic techniques, as well as the development of more effective and safe therapies.

In many cases, the goal is to replicate nanostructures present in living cells and tissues. Due to their intelligent behavior and their recombinant nature, Recombinamers or recombinant polymers of the Elastin type (ELRs) stand out as ideal candidates in the creation of systems for the replication of the extracellular matrix, with a projection to be applied in the development of treatments for diseases of the connective tissue, such as osteoarthritis.

The self-assembly properties of these thermally sensitive, amphiphilic multiblock polymers combine with the calcium phosphate-binding capabilities of the staterin-inspired SN_{A15} epitope of salivary origin, resulting in an organization that mimics the structure of hydroxyapatite (HA), enabling replication.

This work has focused on the study of the interaction between calcium and phosphate ions in the presence of two hybrid recombinamers simultaneously: $(SN_{A15})_3E_{50}I_{60}$ and $K_{48}I_{60}$. The first is an amphiphilic triblock, made up of the SN_{A15} bioactive domain linked to the hydrophilic end of E50 in a first block that can self-assemble into nanoparticles capable of controlling the transformation of amorphous calcium phosphate (ACF) into a structure similar to HA, which is at the same time linked to the I_{60} residue at the end, which self-assembles hydrophobically and gives rise to an organization similar to the fibrillar structure of HA, generating ordered aggregates. The second ELR is a combination of a hydrophilic domain, K_{48} , and I_{60} , hydrophobic.

Both ELR are chains with opposite charges and similar transition temperatures, which implies an electrostatic interaction between them that could affect, or not, the interaction between $(SN_{A15})_3E_{50}I_{60}$ and the ions. For this reason, this study focuses on carrying out the mineralization between calcium chloride ($CaCl_2$) and sodium hydroxide phosphate (Na_2HPO_4) in a solution resulting from the mixture of both polymers with the aim of analyzing the morphology of the formed aggregates and determine if they present similarities with the crystallization of HA or, failing that, what characteristics they present. These results will allow establishing future research directions in the study of this type of regenerative therapies.

La nanotecnología ha experimentado un significativo avance en los últimos años debido a la creciente necesidad de crear sistemas con funciones específicas a escala nanométrica. Esta disciplina ha brindado herramientas sofisticadas que han revolucionado diversos campos del conocimiento, como la ciencia biomédica, donde ha permitido mejorar la eficiencia y precisión de las técnicas de diagnóstico actuales, así como el desarrollo de terapias más efectivas y seguras.

En muchos casos, el objetivo es replicar nanoestructuras presentes en tejidos y células vivas. Los recombinámeros o polímeros recombinantes del tipo elastina (ELRs) debido a su comportamiento inteligente y su naturaleza recombinante destacan como candidatos ideales en la creación de sistemas para la replicación de la matriz extracelular, con proyección a ser aplicados en el desarrollo de tratamientos para enfermedades del tejido conectivo, como la

artrosis.

Las propiedades de autoensamblaje de estos polímeros multibloque anfífilos y térmicamente sensibles se combinan con las capacidades de unión al fosfato de calcio del epítipo SN_{A15} , inspirado en la proteína estaterina de origen salival, dando lugar a una organización que imita a la estructura de la hidroxiapatita (HA) posibilitando una replicación.

Este trabajo se ha focalizado en el estudio de la interacción entre iones calcio y fosfato en presencia de dos recombinameros híbridos simultáneamente: $(SN_{A15})_3E_{50}I_{60}$ y $K_{48}I_{60}$. El primero es un tribloque anfífilo conformado por el dominio bioactivo SN_{A15} unido con el final hidrofílico de E_{50} en un primer bloque que puede autoensamblarse en nanopartículas capaces de controlar la transformación de fosfato de calcio amorfo (FCA) en una estructura similar a la HA, unido al residuo I_{60} en el extremo que se autoensambla hidrofóbicamente, lo que da lugar a una organización similar a la estructura fibrilar de la HA generando agregados ordenados. El segundo ELR es combinación de un dominio hidrófilo, K_{48} , y del I_{60} , hidrófobo.

Ambos ELRs son cadenas con cargas opuestas y temperaturas de transición similares, lo cual implica una interacción electrostática entre los mismos que podría afectar, o no, a la interacción entre el $(SN_{A15})_3E_{50}I_{60}$ y los iones. Por ello, el estudio realizado se enfoca en llevar a cabo la mineralización entre el cloruro de calcio ($CaCl_2$) y el hidróxido fosfato de sodio (Na_2HPO_4) en una disolución resultado de la mezcla de ambos ELRs con el objetivo de analizar la morfología de los agregados formados y determinar si estos presentan similitudes con la cristalización de la HA o, en su defecto, qué características muestran. Estos resultados permitirán establecer futuras direcciones de investigación en el estudio de este tipo de terapias regenerativas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Nanotecnología y biomateriales

La nanotecnología se define como un ámbito de la investigación centrado en el estudio, diseño, creación y manipulación de materiales a nivel molecular. En esta escala nanométrica, que abarca dimensiones de 1 a 100 nm, las partículas presentan propiedades físicas y químicas particulares que les permiten interactuar con el entorno [1].



Figura 1: La primera imagen corresponde a uno de los primeros nanomateriales, pigmentos para dar color a objetos. La segunda imagen corresponde a una de las primeras aplicaciones de los materiales biocompatibles, refuerzo de una dentadura con alambres.

Los nanomateriales han estado presentes y han sido manipulados desde tiempos remotos

como se evidencia en los pigmentos encontrados en yacimientos arqueológicos o en las vidrieras de algunas iglesias. No obstante, ha sido recientemente cuando se ha tomado conciencia sobre su importancia y alcance científico dando lugar a una historia relativamente breve de la nanotecnología. Esta se caracteriza por su marcado carácter interdisciplinario, su desarrollo es posible gracias a la convergencia de diversas ramas del conocimiento científico como la física, la química, la biología o la ciencia de materiales para dar un enfoque integrado [2].

Fue Feynman, en 1959, quien sugiere que la materia se podría manipular a niveles microscópicos y comenzó el desafío de la nanotecnología [2]. Aunque es un concepto tan nuevo que se define día a día, el profesor Norio Taniguchi lo hizo, en 1974, diciendo: ‘La nanotecnología consiste en el procedimiento de separación, consolidación y deformación de materiales, átomo por átomo o molécula por molécula’. Desde entonces la idea comenzó a crecer con fuerza, hasta que surge la posibilidad de ver y manipular los átomos con la construcción del Microscopio de Túnel de Barrido (Scanning Tunneling Microscope o STM) en el IBM en 1981 cambiando definitivamente la percepción de los materiales [3].

Aunque se ha hecho referencia a la existencia de nanomateriales en algunos ámbitos, no fue hasta 1860 con la implementación de técnicas asépticas en algunas operaciones, que comienzan a utilizarse en el campo de la medicina [2] y se puede empezar a hablar de biomateriales. Fue durante la 2ª Guerra Mundial que se inicia una importante revolución con el uso accidental de fragmentos de PMMA (polimetilmetacrilato) para la reparación de córneas en soldados [4, 5], apareciendo en la década de 1950 los lentes intraoculares, implantes de cadera, injertos vasculares, la revolucionaria diálisis renal y las válvulas cardíacas. Todo ello antes de que se establecieran los principios para los materiales médicos [5].

En el ámbito de la nanotecnología, los biomateriales toman cada vez más protagonismo debido a su versatilidad en aplicaciones biomédicas. De forma que fueron definidos, en la “The European Society for Biomaterials Consensus Conference” de 1986 como ‘... una sustancia o material usado solo o en la fabricación de un aparato médico diseñado para interactuar con los tejidos humanos en el monitoreo de funciones corporales para tratar alguna condición patológica del cuerpo’. Esto se debe a que es fundamental que los biomateriales no sean alterados ni alteren los tejidos circundantes [2].

Los biomateriales se pueden clasificar según diferentes criterios, uno de los cuales es su respuesta al contacto con los tejidos adyacentes. En este sentido, pueden ser categorizados de **tóxicos**, causando la muerte del mismo; **bioinertes**, es decir biológicamente inactivo, pudiendo producir fallos en implantes o la encapsulación de tejidos; **bioactivos**, que generan una serie de reacciones biofísicas y bioquímicas que promueven la unión con los tejidos, como es el caso de muchos polímeros; y, por último, **bioreabsorbibles**, se disuelven in vivo en un material no tóxico tal que, en algún momento, el tejido cercano pueda remplazarlo [6, 7].

Basándonos en estas características y en el ritmo de desarrollo de las mismas, la evolución de los biomateriales los clasifica en cuatro generaciones.

- La **primera generación** se caracteriza por abordar el tratamiento de enfermedades infecciosas y lesiones menores. Al principio el conocimiento era limitado y los biomateriales disponibles de origen natural se seleccionaban por tener propiedades físicas similares a las del tejido reemplazado siendo suficiente que fueran no tóxicos e inertes para evitar el rechazo [8]. Los metales clásicos y sus aleaciones así como los implantes poliméricos no degradables se consideran bioinertes. Algunos siguen utilizándose en la actualidad

en tejidos que no pueden regenerarse debido a pérdidas significativas o pacientes con menor capacidad de autoreparación de tejidos dañados [5].

- Con el incremento en la esperanza de vida, aparece la **segunda generación** donde surgen materiales bioactivos, biocompatibles y biodegradables capaces de interactuar con el entorno para obtener una respuesta. Esta tiene como propósito fomentar la adhesión al tejido del hospedador y mejorar su integración al promover respuestas específicas así como estimular el crecimiento de tejido nuevo o, en su defecto, generar una respuesta de degradación [5, 9].

Se descubrió que las cerámicas bioactivas como la hidroxiapatita, ciertos fosfatos de calcio y los vidrios bioactivos se adhieren directamente a los tejidos vivos. Otra estrategia fue el diseño de implantes con recubrimientos y estructuras porosas que logran un anclaje estable con el tejido circundante que facilita su crecimiento. Un gran número de estos biomateriales aún son los protagonistas de aplicaciones clínicas [5].

- Como resultado de un mayor nivel de comprensión, surge la **tercera generación** que busca una interacción más estrecha material-tejido que potencie la regeneración por lo cual se consideran tanto la química como las características de las superficies [10] lo que implica un enfoque altamente interdisciplinario. El objetivo actual es la regeneración y reparación de tejidos basándose en principios biológicos, tal que se emplean biomateriales biodegradables y bioabsorbibles con tasas de degradación y absorción ajustables [5].
- La **cuarta generación** surge con los avances tecnológicos y un mayor conocimiento celular tisular. Destaca el desarrollo de materiales inteligentes basados en la biomimética que, inspirándose en la biología, simulan el entorno extracelular natural y una o más funciones presentes en la naturaleza para desarrollar estructuras heterogéneas con propiedades sobresalientes. Esto se logra imitando la disposición de complejas estructuras biológicas autónomas hasta el nivel molecular mediante autoensamblaje.

De este modo los biomateriales consiguen interactuar con las células y los tejidos circundantes, participar activamente en la regeneración de tejidos dañados y responder a estímulos del entorno permitiendo la liberación controlada de fármacos, ofreciendo nuevas soluciones para el tratamiento de enfermedades [5, 10].

Por otro lado, en relación a su forma y estructura, los biomateriales podrán ser cristalinos, semicristalinos o amorfos, exhibiendo los primeros un mayor orden. Además, según su naturaleza, se agrupan en 3 categorías: polímeros, metales y cerámicos [7]. Los primeros son muy versátiles utilizándose tanto en tejidos blandos o duros, son el grupo más amplio y muy utilizados en la aplicación de fármacos. Los metales, como el titanio (Ti) y sus aleaciones, se aplican principalmente en prótesis dentales y ortopédicas. Por último, los biomateriales cerámicos entre los que se encuentran los fosfatos de calcio o el biovidrio, son protagonistas de la reparación, regeneración y fortalecimiento de tejidos duros especialmente si no se requiere soporte de carga, o en el recubrimiento de implantes metálicos [7, 11].

Es importante tener en cuenta que algunas de sus propiedades entre las que se incluyen aspectos químicos relacionados con su composición, físicos por las microestructuras, densidad o porosidad, mecánicos como la resistencia o dureza y los biológicos por su comportamiento en el medio, cambian con la superficie y el volumen. Además el trato y uso del material manipulado juega también un importante papel [12]. Conocerlas permite seleccionarlo correctamente,

pudiendo combinar diferentes tipos para conseguir las características buscadas. Siendo las combinaciones de tipo polímero-cerámica especialmente destacables donde los materiales cerámicos de naturaleza mineral se unen a polímeros biodegradables y bioinertes que aportan flexibilidad, rigidez y variedad en su fuerza para conseguir la sustitución o regeneración de tejidos óseos [12].

2.2. Polímeros

Los polímeros (de las raíces 'poly', muchos, y 'meros', parte) se definen como macromoléculas de elevada masa molecular que resultan de la repetición de unidades moleculares simples, monómeros, en largas cadenas mediante enlaces covalentes, lo que les confiere propiedades estables y bien definidas [13, 14]. Por otro lado, los polímeros y mezclas poliméricas poseen la capacidad de formar fibras adquiriendo una amplia variedad de aplicaciones [14], que además pueden ser fortalecidas con minerales que se agregan y crecen en la matriz para obtener un tamaño y distribución de cristales similar al de los tejidos duros [15].

Existen dos categorías de polímeros en función de su origen: naturales, como la celulosa o las proteínas, obtenidos de fuentes renovables como plantas o animales resultado de la unión de monómeros diversos y sintéticos, como el nailon, obtenidos por procesos químicos y que suelen consistir en uno o dos monómeros repetidos a lo largo de la cadena. Además, existen los polímeros semisintéticos, modificaciones de los polímeros naturales realizadas en laboratorios para conseguir las propiedades deseadas y una mayor biocompatibilidad [14, 16].

Los polímeros naturales presentan la ventaja de ser fácilmente procesables y sintetizables a un coste razonable [11], además presentan biocompatibilidad, biodegradabilidad y esterilidad. Sin embargo, en muchos casos, no poseen otras propiedades requeridas; por ello es más sencillo el uso de polímeros sintéticos, los cuales ofrecen buenas propiedades mecánicas y estabilidad térmica. A su vez, estos pueden contener residuos que inhiben el crecimiento celular y adoptar una mayor variedad de formas que los naturales que se desnaturalizan a altas temperaturas. En base a estas consideraciones, los polímeros semisintéticos representan una opción en crecimiento ya que combinan las ventajas de ambos [7].

Entre los polímeros naturales más destacados se encuentran el almidón y la celulosa, derivados de las plantas, así como el colágeno, la queratina y la elastina, derivados de los animales [17]. Cabe destacar que generalmente son insolubles en agua y en disolventes orgánicos, a excepción del colágeno, soluble en ácido acético y muy empleado en el desarrollo de nuevos polímeros. Por otro lado, la elastina es muy insoluble dificultando su manipulación, aunque puede ser hidrolizada. Además es utilizada en la preparación de biomateriales pero no en mezclas con polímeros de otro tipo [15, 18], teniendo en el campo de la biomedicina un papel muy relevante los polímeros de elastina recombinantes (ELR) [19].

2.3. Proteínas: estructura y empaquetamiento

Las cadenas de aminoácidos reciben el nombre de polímeros, los cuales se diferencian por el peso molecular y el número de residuos que contienen en: péptidos, de peso molecular bajo (<50 kDa) y polipéptidos de peso molecular alto (>50 kDa) [20]. Como resultado de una o de varias cadenas polipeptídicas se obtienen las proteínas, polímeros lineales constituidos por la combinación de más de 50 AA [21].

Los péptidos pese a ser de menor tamaño y tener estructuras menos complejas cumplen funciones biológicamente significativas, sobretodo en la regulación de procesos como la presión sanguínea, manteniendo estable el ambiente interno de organismos multicelulares. Por otro lado, las proteínas presentan una diversidad enorme de tamaños y formas por que le otorgan gran diversidad de funciones [20].

Los aminoácidos son moléculas orgánicas formadas por un α -carbono unido a un grupo amino, un grupo carboxilo, un átomo de hidrógeno y una cadena lateral (R) que determina la polaridad y carga de la molécula diferenciando unos AA de otros, existen así 20 diferentes (anexo A) [22, 23].

Su unión resulta en proteínas de diversas longitudes y secuencias. No obstante, no todas las secuencias posibles resultan funcionales y útiles. Esta disparidad se debe al complejo conjunto de propiedades estructurales y funcionales que presentan y que contribuyen a la estabilidad y funcionalidad en su entorno biológico. Las características estructurales son las responsables del plegamiento, los lugares de unión específicos, equilibrio entre flexibilidad y rigidez, estructura superficial adecuada y vulnerabilidad a reacciones de degradación. Su estudio y comprensión son fundamentales para descifrar los mecanismos biológicos que sustentan la vida [20].

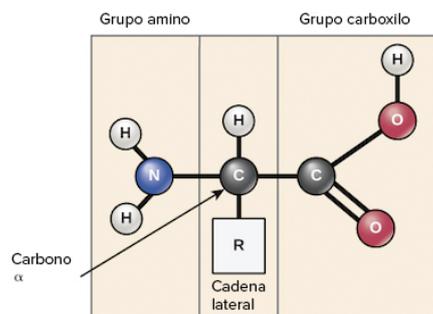


Figura 2: Estructura general de un aminoácido.

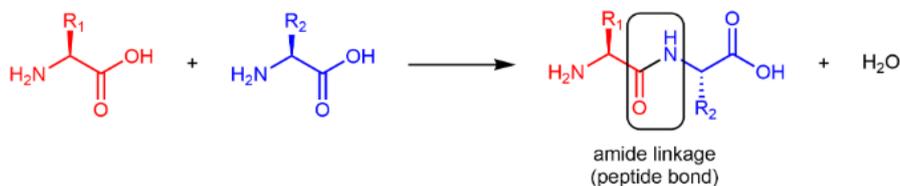


Figura 3: Esquema del enlace polipeptídico con la liberación de una molécula de agua.

Las proteínas son el resultado de la unión de AA en enlaces covalentes llamados **enlaces peptídicos** (figura 3). Este implica la interacción entre el grupo carboxilo de una molécula y el amino de la siguiente con la liberación una molécula de agua, recibiendo entonces cada molécula el nombre de residuo. Como resultado, se forma una cadena principal que actúa como esqueleto, conocida como **estructura primaria**. A lo largo de esta, quedan disponibles para la interacción los hidrógenos, oxígenos y radicales diferenciadores contribuyendo a la complejidad y diversidad de la estructura del polímero [24].

La **estructura secundaria** es la consecuencia de los enlaces no covalentes entre radicales libres: puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, fuerzas de Van der Waals de los electrones de valencia y las interacciones hidrofóbicas con el agua que fuerzan el empaquetamiento entre ellas [24]. Dando lugar a dos tipos de estructuras:

1. α -Hélice (figura 33): cada péptido posee un momento dipolar conectándose entre sí por puentes de hidrógeno hasta formar una hélice [24].

- Horquilla β (figura 31): resultado de segmentos de entre cinco y diez moléculas tornados entre 120° y 140° enfrentándose los grupos libres de uno a los otro. Se distinguen dos modelos: antiparalelo donde los grupo carboxilo coinciden con la posición del grupo amino del otro segmento y el paralelo donde los grupos coinciden [24].



Figura 4: Estructura alfa hélice.

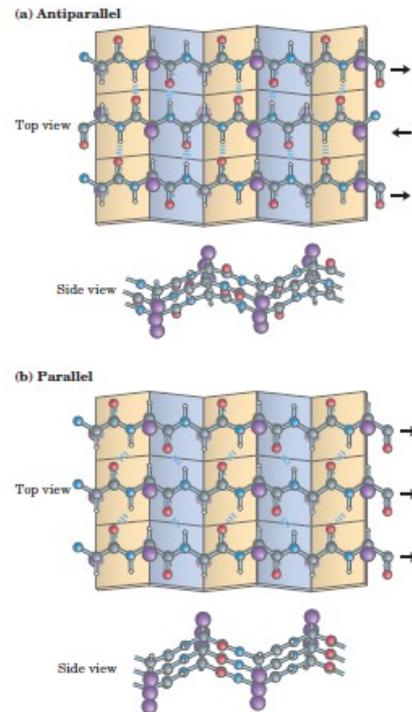


Figura 5: Estructura horquilla beta. a) Antiparalelo, b) Paralelo.

Los últimos niveles son la **estructura terciaria** y **estructura cuaternaria** que suponen un mayor o menor empaquetamiento de la estructura secundaria [24]. Generando las siguientes conformaciones (pueden verse en la figura 6):

- Conformación estirada: la cadena establece interacciones con moléculas de agua a través de la hidratación hidrofóbica dando lugar a estructuras clatrato [25].
- Plegados y ordenados: la estructura secundaria horquilla β se empaqueta disponiendo hacia el exterior los motivos responsables de elasticidad y la hidrofobia, imposibilitando la interacción con el agua, mientras en el interior se quedan las cadenas proteicas y puentes de hidrógeno dándole estabilidad y un comportamiento hidrofílico [25].

2.4. Elastina

La elastina es una proteína compuesta de monómeros que contienen regiones hidrofóbicas con tendencia a agregarse y autoensamblarse, contribuyendo a la organización polimérica. Esta capacidad le confiere un papel fundamental en la matriz extracelular proporcionando integridad estructural, resistencia y elasticidad a diversos órganos y tejidos como la piel, los pulmones, las arterias, los ligamentos o el cartílago. Esta propiedad elástica permite a los

tejidos recuperar su estado inicial tras los procesos de extensión y relajación [26, 27] y, a su vez, es capaz de regular el comportamiento celular y promover la reparación tisular [28] convirtiéndose en una de las proteínas más importante en los organismos vivos.

La estructura de la elastina consta de una matriz de tropoelastina entrecruzada, compuesta por dos dominios principales intrínsecamente desordenados [28]. El primero en forma de hélice α es hidrofílico y reticular, responsable del entrecruzamiento y contiene una alta proporción de residuos de lisina (K) y alanina (A). El segundo dominio es hidrofóbico y elástico, adoptando una conformación espiral β , está compuesto por residuos de valina (V), prolina (P) y glicina (G). Entre ambos dominios se generan secuencias de aminoácidos con motivos repetitivos a lo largo de su cadena como VPGG, VPGVG, APGVG y VGVAPG (anexo A para ver características de cada aminoácido) [29, 30]. Estos adoptan una estructura que permite que la elastina se deforme sin romperse y, al liberar la tensión, recupere su estado original. Durante este proceso no se produce pérdida de energía ya que la utilizada para en el estiramiento de la proteína es recuperada con la vuelta a su estado inicial [31].

2.5. Polímeros ELR (Elastin-like Recombinamers)

Los polímeros de tipo elastina (ELR “Elastin-Like Recombinamers”) son polipéptidos recombinantes cuya secuencia esta inspirada en la proteína tipo elastina natural [32]. Están formados por los motivos de la elastina previamente comentados, aunque los más comunes son los resultan de la repetición de la secuencia (VPGXG) $_n$ donde n es el número de veces que se repite y X cualquier aminoácido excepto la prolina (P). Esto se debe a que P es el único AA cuya α -amina es secundaria pudiendo interferir en los enlaces que surgen a lo lardo de la cadena y, en consecuencia, en sus funciones. El AA introducido en la posición X es el responsable de la modificación de propiedades como la temperatura de transición manteniendo otras inherentes a la elastina (mecánicas, termosensibilidad, comportamiento autoensamblante) y conservando su capacidad de formar estructuras [31].

Las propiedades y características de los ELRs los convierten en moléculas controladas por las características ambiente y, debido a su capacidad de modificarse en función de las mismas, en ‘polímeros inteligentes’ [25]. Todo ello hace que ofrezcan múltiples posibilidades en el campo de la investigación biomédica, convirtiéndolas en un recurso ampliamente utilizado. En este camino, muchos estudios previos ya han demostrado la capacidad de los ELRs anfipáticos de formar nanopartículas (micelas y vesículas) o hidrogeles [27, 33].

Se debe mencionar especialmente, por su papel en este trabajo, el comportamiento de los ELRs ante los cambios de temperatura. Estos poseen una temperatura de transición (T_t) en la que ocurre el cambio de una estructura desordenada a una plegada, ordenada como se representa en la figura 6. Cuando se encuentran en disolución acuosa por debajo de la T_t , las cadenas libres del ELR están desordenadas y completamente hidratadas pero hidrofóbicamente, lo cual implica que las moléculas de agua forman una estructura ordenada tipo clatrato rodeando los residuos apolares del polímero, como las valinas. Por el contrario, por encima de la T_t , las moléculas de agua debido a la agitación térmica dejan de estar ordenadas y la cadena polipeptídica se pliega hidrofóbicamente ensamblándose en estructura hélice β , reduciendo la hidratación. Este proceso en los ELRs recibe el nombre de Transición Inversa con la Temperatura (ITT) ya que gran parte de las proteínas tienen el comportamiento opuesto y un aumento de la temperatura provoca su desplegamiento y desnaturalización [34, 35].

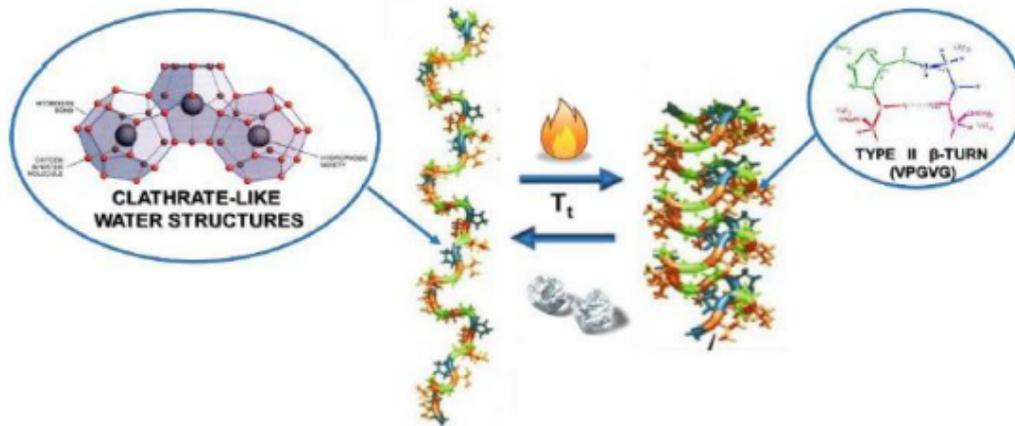


Figura 6: Representación de los cambios estructurales por la ITT. A la izquierda se observa la cadena extendida, con la estructura clatrato que forma el agua alrededor de la cadena y, a la derecha, la plegada tipo horquilla β que se forma [31].

La explicación desde el punto de vista termodinámico de este proceso se obtiene gracias a la ecuación de la Energía Libre de Gibbs (G) [36]:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (1)$$

Donde:

ΔG = energía libre de reacción.

ΔH = variación de entalpía del sistema.

T = temperatura absoluta.

ΔS = variación de entropía del sistema.

Al plegarse el polímero y romperse las estructuras clatrato aumenta el desorden total del sistema, es decir, la entropía (S) del medio y como consecuencia la del sistema ($\Delta S > 0$). Con este aumento la variación de la energía libre será menor que cero, $\Delta G < 0$, lo cual indica estabilidad termodinámica y la espontaneidad del proceso.

La T_t es fácilmente reproducible pero existen factores que influyen en su valor y, en consecuencia, en el autoensamblaje. El papel de estos factores ha sido investigado en estudios previos y se presentan a continuación [36]:

- **Dominios hidrofóbicos y entrecruzados:** en general, se ha demostrado que a medida que aumentan los dominios hidrofóbicos, la T_t disminuye. Por otra parte, no solo la polaridad total es relevante, se ha comprobado que la disposición de los AA en bloques polares y apolares en los pentámeros de elastina también lo es [37, 38].
- **Efecto sinérgico:** en una mezcla de ELR, cada uno mantiene su T_t y se coacerva sin alterar la velocidad ni la T_t a la que lo hacen demás polipéptidos presentes [39].
- **Naturaleza y contenido en sales:** las sales en solución aportan iones que modifican la solubilidad independientemente de la hidrofobicidad del ELR. La influencia de distintos iones se explica con la serie de Hofmeister (consultable en el anexo D), siendo más notables los efectos de los aniones que los de los cationes. En conjunto, se ha demostrado que el aumento del contenido salino reduce la T_t y acelera el paso a la coacervación [40].

- **Concentración del polímero:** existe una relación no lineal observable en la gráfica adjunta (figura 7). Por encima de los 5-10 mg/ml no se observan cambios significativos al igual que ocurre en el extremo opuesto a partir de los 150-200 mg/ml [41].
- **Codisolvente:** el uso de alcoholes fluorados supone una disminución de la T_t ya que promueven los enlaces de hidrógeno y estabilizan la estructura facilitando el autoensamblaje [42].

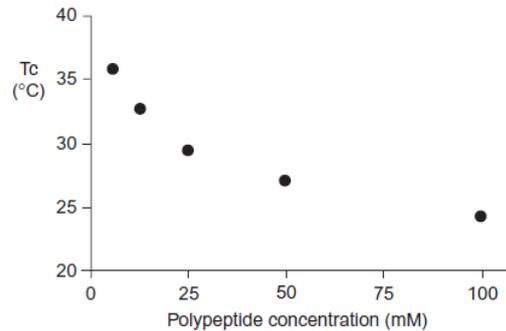


Figura 7: Gráfica que muestra la relación no lineal entre la concentración de polímero en solución y la T_t .

- **pH:** el aminoácido de la posición X en la secuencia de VPGXG produce un cambio en la constante de acidez (pKa) modificando el pH de la disolución, lo que afecta a la polaridad de los grupos ácidos y aminos dando lugar a un cambio en la T_t [43].

Estos polímeros recombinantes 'a la carta' se obtienen gracias al desarrollo de la biología molecular que mediante técnicas de ingeniería genética como la del ADN recombinante, empleada en BIOFORGE, permiten un control absoluto sobre la secuencia de proteínas a sintetizar.

2.6. Tecnología del ADN Recombinante

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es una macromolécula resultado de la unión de muchos nucleótidos encargada de almacenar y transmitir la información genética de los seres vivos, para su correcto funcionamiento [44].

La tecnología del ADN recombinante es capaz de manipular la información genética contenida en las células de un organismo y transferirla a otro, con el propósito de expresar y obtener proteínas producto de esa información modificando las características del huésped. Desde finales de la década de los 70, la ciencia ha desarrollado numerosos avances gracias a esta tecnología que es empleada en la síntesis de ELR [44].

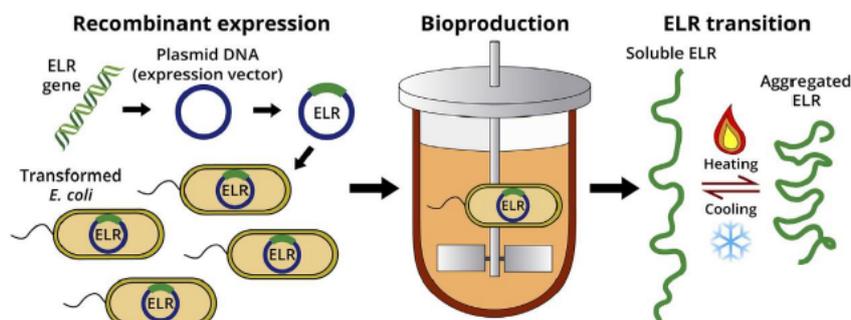


Figura 8: Esquema del proceso de síntesis de ELR por tecnología del ADN recombinante.

La técnica en el laboratorio BIOFORGE se lleva a cabo mediante el protocolo representado en la figura 8 y descrito a continuación [45] donde los vectores son plásmidos.

1. Obtener por medio de enzimas de restricción los fragmentos de proteínas deseados.
2. Ligar estos fragmentos a la molécula de ADN por medio de enzimas de unión como las ligasas.
3. Clonación de estos fragmentos por medio de vectores de clonación. Para la posterior expresión de los diferentes polímeros recombinantes por medio de un vector de expresión mediante un estricto control en la transcripción.
4. Transformación de la célula huésped y comprobación de cepas. Se empleará la bacteria *Escherichia Coli* (E.Coli).
5. Producir en masa las bacterias E.Coli mediante su incubación en un medio controlado.
6. Disrupción de las membranas bacterianas para liberar el ELR y purificación del mismo.

2.7. Biomineralización

La biomineralización es un proceso fisiológico que controla la nucleación y el crecimiento de cristales mediante moléculas bioorgánicas para la formación de minerales inorgánicos de esqueletos, conchas o dientes. Estos precipitados inorgánicos se forman bajo el control de una matriz inorgánica por la acción catalítica de macromoléculas ácidas como proteínas con alto porcentaje de ácido aspártico (K) y fosfoserina (I) en sus secuencias [46].

En el caso del tejido óseo, los cristales de hidroxapatita (HA) se depositan preferentemente en fibrillas de colágeno debido a la interacción entre la matriz de colágeno y las proteínas no colágenas [47]. Este fenómeno ocurre a lo largo de toda la vida gracias a complejos sistemas biológicos que coordinan la interacción entre el tejido y los moduladores de la mineralización, todo bajo la influencia de factores ambientales (entorno, dieta, patologías, medicamentos) y fisiológicos (edad, sexo, propiedades de la matriz, distribución tisular de las proteínas no colágenas) que pueden actuar en contra, inhibidores, o a favor, promotores [48, 49].

2.7.1. Biomineralización y tejido óseo

Histológicamente, el hueso es un tejido conectivo conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado con una compleja matriz osteoide calcificada y estructurada en laminillas y varios tipos de células funcionales (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos) [48].

Gracias a la biomineralización la matriz osteoide secretada por los osteoblastos y no mineralizada, se transforma en la matriz extracelular (MEC) no celular, mineralizada y con funciones de soporte del resto de células del tejido [50].

La disposición de las fibras o laminillas es la que determina el tipo de hueso: cortical o compacto, con las laminillas dispuestas concéntricamente, y esponjoso o trabecular con las laminillas organizadas en una red [51]. Las fibras de la matriz son principalmente proteínas de colágeno cuya estabilidad se debe a los puentes de hidrógeno entre sus AA y a los enlaces entre hidroxilisinas y lisinas; sin embargo carecen de afinidad con el calcio, lo que hace necesarias otras proteínas encargadas de la deposición mineral [50, 52].

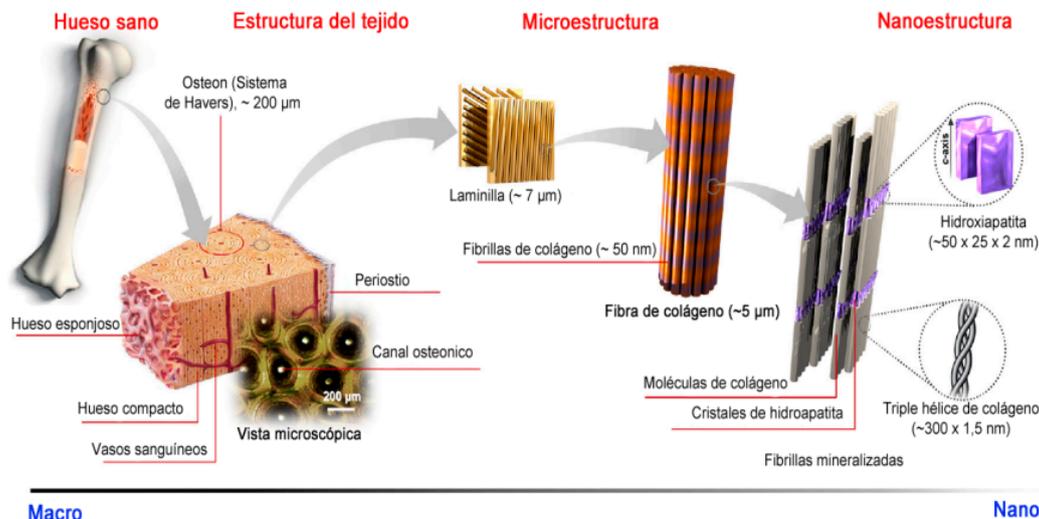


Figura 9: Representación del tejido óseo desde escala macroscópica a la escala nanoscópica donde aparece la HA.

El componente mineral del hueso representa aproximadamente el 65 % su peso. Consta de calcio (Ca^{2+}), fosfato (PO_4^{3-}) y carbonato (CO_3^{2-}) en proporción 10:6:1, en forma de cristales de HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (estructura en anexo 31) y en menor proporción de Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Mn^{2+} y F^- distribuidos por el suero sanguíneo, principal fuente de iones. El plasma se encuentra sobresaturado de calcio (Ca) y fósforo (P) respecto a la HA, de ahí la importancia de inhibidores reguladores de los niveles de fosfato, homeostasis del fosfato, mediante bucles de retroalimentación hueso-riñón-paratiroides (figura 10). Los productos secretados por las células óseas otorgan al hueso un papel importante en la coordinación del proceso pese a que el intercambio de sustancias suero-MEC no está claro [48, 50, 53].

Se han sugerido diferentes ideas para explicar el proceso de biomineralización entre las cuales destaca el modelo in vitro e in vivo donde un precursor mineral amorfo, como el fosfato de calcio amorfo (FCA), se forma transitoriamente y se deposita en las regiones de separación entre las fibrillas de colágeno para continuar con la cristalización de la HA. Este paso es fundamental y ha sido observado en la formación de tejidos mineralizados de invertebrados [54]. Por otro lado, se ha demostrado que este mecanismo tiene lugar en los peces cebra, donde la organización de la HA carbonatada cristalina es la misma que en los mamíferos, pudiendo ser tomado como un modelo simplificado de la formación ósea de los vertebrados [54].

La MEC mineralizada de los vertebrados está directamente relacionada con las propiedades mecánicas del tejido, determinantes en las funciones del esqueleto como soporte de la masa corporal, protección de tejidos blandos, ayuda al movimiento y fuente de minerales para

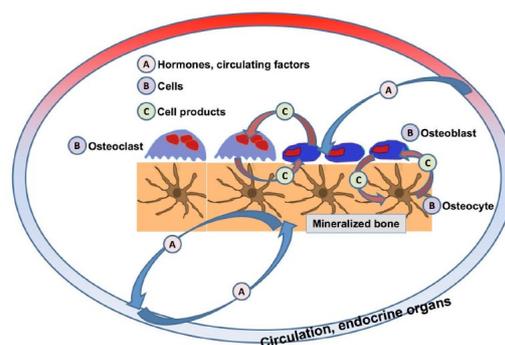


Figura 10: Coordinación matriz celular y sistema circulatorio.

otros procesos del organismo [55]. El proceso de mineralización implica deposición mineral, dependiendo el grado de mineralización del tiempo transcurrido, y su maduración hasta alcanzar una densidad máxima. Esto resulta en un aumento del número, tamaño y calidad de los cristales. Cabe destacar que la remodelación del tejido no está sincronizada entre regiones dando lugar a una distribución heterogénea que otorga mayor resistencia [56].

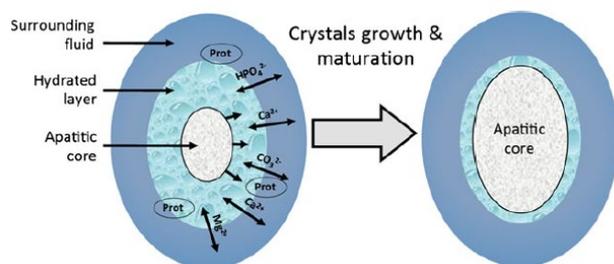


Figura 11: Proceso de mineralización.

El mineral predominante del hueso humano es la apatita poco cristalizada. Pudiendo dividir su cristalización en tres partes: el fluido circundante, la capa hidratada y el núcleo apatítico (figura 11). Los iones presentes en la capa son lábiles y reactivos dando lugar a dominios no apatíticos. Durante la maduración mineral ambos se intercambian aumentando los apatíticos estables.

La fase mineral posee una superficie amplia y muy específica que la hace metabólicamente activa. Esto permite la interacción entre los iones del líquido circundante y los del cristal facilitando tanto la formación inicial como la maduración [57]. La nucleación es desencadenada por proteínas reguladoras. Además los cristales primero crecen en longitud y posteriormente en grosor [58] hasta adquirir forma de plaqueta nanométrica (1-7 nm x 15-200 nm x 10-80nm) [59] dependiendo su organización de las propiedades estructurales de la matriz. La hidratación también es básica, a medida que el nivel de agua disminuye es sustituido por fase mineral, lo que impide la difusión de iones y, en consecuencia, el crecimiento cristalino se detiene, esto normalmente sucede cuando la fase mineral representa en torno al 95 % del total que la matriz orgánica podría contener [57].

Es importante destacar que este tejido es el único capaz de regenerarse tras un trauma, tras colocarse un implante o injerto aumenta el sustrato óseo para la regeneración. Esto sumado a una renovación entre 5 % y 15 % a lo largo del año en condiciones normales, hacen que se considere un tejido dinámico [60].

2.7.2. Mineralización biomimética y ELR con SN_{A15}

La mineralización biomimética es una imitación de los minerales sintéticos mediante el uso de materiales avanzados que tienen formas complejas, organización jerárquica y control de tamaño, forma y polimorfía en las condiciones fisiológicas [61].

En este proceso, las moléculas orgánicas anfífilas con propiedades de autoensamblaje se utilizan en el desarrollo de materiales inorgánicos con características estructurales complejas a escala nanométrica. Entre estas moléculas, tanto sintéticas como naturales, se encuentran tensioactivos, fosfolípidos y polímeros de fase orgánica. Las macromoléculas orgánicas desempeñan numerosas funciones en la modulación de la biomineralización por su intervención la velocidad de la reacción o en la estabilización del FCA [61].

Investigaciones anteriores indican que los ELR biocompatibles podrían utilizarse como material regenerativo óseo si se combinan con un dominio bioactivo, como puede ser el residuo SN_{15} de la estaterina salival (STATH) [62].

La STATH es una proteína de 43 residuos de AA con un alto carácter ácido, además posee gran afinidad por los minerales de fosfato cálcico siendo su función inhibir las cristalizaciones primaria y secundaria de la HA, regulando así su remineralización [61].

Se elijen péptidos inspirados en la STATH porque sus dominios son, en parte, responsables de la protección y recalcificación del esmalte dental. Este es el caso de SN15 (D-pS-pS-E-E-K-F-L-R-R-I-G-K-F-G) correspondiente a la secuencia de los primeros quince AA con N-terminal hidratado de la STATH, o algún análogo. La densidad de carga negativa [61] junto con la conformación helicoidal de estos dominios de proteínas confieren a la cadena alta afinidad por el fosfato de calcio, lo que conlleva una alta absorción en la superficie de la HA [62].

Este dominio se puede modificar como en el caso del SN_A15 (D-D-D-E-E-K-F-L-R-R-I-G-K-F-G) donde los residuos de aminoácido fosfoserina (pS) de las posiciones 2 y 3 han sido sustituidos por el residuo ácido aspártico (D); existiendo alternativas análogas como SN_S15 (D-S-S-E-E-K-F-L-R-R-I-G-R-F-G) donde el sustituto es la serina (S). Estos cambios son responsables en el cambio de propiedades como la la afinidad con los fosfatos o la T_t del polímero, de tal forma que estudios previos han determinado que las propiedades más ventajosas son las que ofrece la cadena SN_A15 [62].

SN_A15 restaura la afinidad de la unión y las propiedades de inhibición del crecimiento cristalino, lo cual indica que la densidad de carga negativa en el N-terminal que caracteriza al aspartano y la estructura helicoidal son importantes para las interacciones superficiales con la HA. De este modo los iones Ca^{2+} se unen a las cargas negativas dando lugar a una carga superficial positiva, entonces los fosfatos del fluido, con carga negativa, se unen a Ca^{2+} dando lugar al núcleo de fosfato cálcico. Por otro lado, ante un grado de sobresaturación de iones se forma una fase de la HA termodinámicamente más estable, con precursores polimorfos intermedios como el FCA que hidrolizan la HA [63].

Por todo ello, SN_A15 se combina con otros motivos para obtener distintos ELR, tal que la posición de los grupos también resulta determinante [62]. El control de la formación de nanoestructuras entre el fosfato de calcio con los ELR híbridos con SN_A15 depende de principalmente de dos parámetros:

- La **presencia de una alta carga local en la superficie** que puede alterar el tiempo de inducción (I_t). Esto dependerá también de la posición del grupo SN_A15 . Se ha observado que cuando SN_A15 se encuentra en un extremo, como ocurre con el ELR $(SN_A15)_3E_{50}I_{60}$, la precipitación del fosfato de calcio se retrasa con un I_t constante frente al aumento de la concentración de ELR mientras que, cuando el motivo se encuentra en medio de la cadena, como ocurre con el ELR $((IK)_2-SN_A15-(IK)_2)_3$, la precipitación se retrasa aumentando I_t con el aumento de la concentración [63].
- Las **propiedades anfífilicas de los ELR**. De esta forma, cuando el SN_A está en el extremo se autoensambla formando nanopartículas de tal forma que los motivos $(SN_A15)_3E_{50}$ quedan expuestos al exterior en el caso de $(SN_A15)_3E_{50}I_{60}$, pudiendo controlar la transformación del FCA en una estructura de HA similar a una fibra mientras que, el I_{60} se autoensambla hidrofólicamente, lo que ayuda a organizar las estructuras de HA a escala mesoscópica, dando lugar a agregados ordenados (visible en la primera imagen de la figura 12). Por otro lado, cuando la secuencia SN_A15 está entre secuencias de otros polipéptidos dependerá de la naturaleza y características de estos. En el caso de $((IK)_2-SN_A15-(IK)_2)_3$, con motivos hidrofílicos (VPGKG) entre hidrofóbicos (VPGIG),

se dificulta la transformación de FCA a fase cristalina, quedando en su lugar una estructura similar a una neurona, con nanoelementos mucho más anisótipos (visible en la segunda imagen de la figura 12) [63].

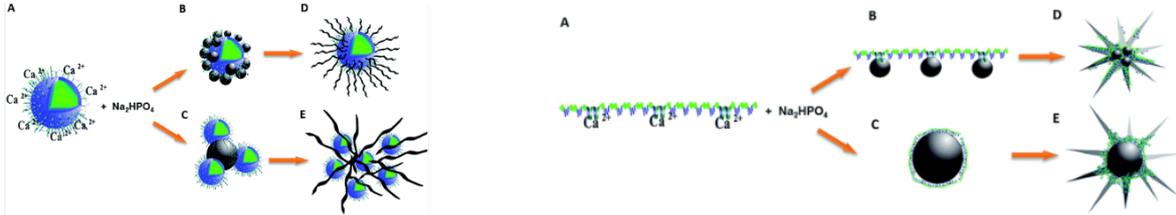


Figura 12: La primera imagen representa la estructura esperadas de la unión de ELR con motivo SN_{A15} en un extremo al interaccionar con iones Ca^{2+} y HPO_4^{-2} y la segunda lo análogo para cuando el motivo SN_{A15} se encuentra en medio de la cadena.

Queda así recogido que los dos parámetros se complementan porque ambos dependen de la secuencia de aminoácidos, principalmente de lo expuestos que estén los bloques SN_{A15} .

2.8. Objetivos

Existen estudios previos sobre las estructuras que resultan de la interacción entre polímeros recombinantes de tipo elastina (ELR) que incluyen el motivo bioactivo SN_{A15} en su cadena y los iones de calcio y fosfato presentes en la hidroxipatita, protagonista de la mineralización ósea. El estudio de estas y otras interacciones, sus resultados y viabilidad es de gran interés por las bases que pueden sentar para futuros estudios enfocados en la terapia regenerativa del tejido óseo por medio de la biomineralización biomimética.

Por ello, en este trabajo se estudia la reacción de mineralización entre el cloruro cálcico ($CaCl_2$), y el hidrógeno fosfato de sodio (Na_2HPO_4) por encima de la temperatura corporal ($40^{\circ}C$), en presencia de dos ELRs híbridos con carga total opuesta, uno de ellos con el bloque SN_{A15} . Previamente se caracterizan para asegurar su correcta síntesis y su pureza, seguido de un análisis de las estructuras que conforman cuando ambos están en la misma disolución y se sobrepasa la temperatura de transición. Obteniendo así una idea de su comportamiento conjunto y de las proporciones que pueden ayudar en la mineralización.

Finalmente se lleva a cabo la mineralización y se analiza la formación de agregados y la morfología resultante que se comparará con resultados previos de otros estudios y con la estructura de la HA. Todo ello con el objetivo de comprobar si existen similitudes entre ellas y si las interacciones que tienen lugar entre los ELRs influyen en el producto final para así establecer las siguientes vías de trabajo.

Este proceso se realizará bajo la hipótesis de que pese a las posibles interacciones entre ELRs la morfología de las estructuras formadas seguirá siendo similar a la de la hidroxipatita o mostrarán otros modelos de interés que abran nuevos caminos de investigación.

3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.1. Polímeros ELR

Los polímeros utilizados en este estudio se obtuvieron por técnicas de ADN recombinante en el laboratorio BIOFORGE y se proporcionaron ya sintetizados. Ambos son el resultado de la unión de los bloques anfífilos de proteínas con capacidad de autoensamblaje presentados a continuación:

$$\begin{aligned}(\text{SN}_A15)_3 &= [\text{DDDEEKFLRRIGRFG}]_3 \\ E_{50} &= [((\text{VPGVG})_2(\text{VPGEG})(\text{VPGVG})_2)_{10}] \\ K_{48} &= [(\text{VGKPG})_{48}] \\ I_{60} &= [(\text{VPGIG})_{60}]\end{aligned}$$

Se puede apreciar que los bloques E_{50} , K_{48} , I_{60} son resultado de los aminoácidos E (ácido glutámico), K (Lisina) e I (Isoleucina) en la posición X respectivamente, mientras que el bloque SN_A15 es resultado de la modificación de la esteatina salival [62].

- $(\text{SN}_A15)_3 E_{50} I_{60}$: resultado de tres bloques (SN_A15), I_{60} hidrofóbico con una temperatura de transición de 19°C, inferior a la temperatura corporal, y el bloque E_{50} , cadena hidrofílica con una T_t superior a los 100 °C cargado negativamente debido al ácido glutámico (E) [61]. El computo de carga de la cadena es de 10 cargas negativas. Su peso molecular teórico, obtenido por la suma de los pesos moleculares de los residuos de la cadena es de 52,970 kDa.

$$\begin{aligned}(\text{SN}_A15)_3 E_{50} I_{60} &= \\ (\text{DDDEEKFLRRIGRFG})_3 [(\text{MESLLP}(\text{VPGVG})_2(\text{VPGEG})(\text{VPGVG})_2)_{10}] (\text{VPGIG})_{60}\end{aligned}$$

- $K_{48} I_{60}$: resultado de un bloque I_{60} , hidrofóbico con el bloque K_{48} , hidrofílico. Posee carácter anfífilo y la lisina (K) es una molécula de carácter básico que provoca una carga total en la cadena de 48 cargas positivas. Su peso molecular teórico, resultado de la suma de los pesos moleculares de los residuos de la cadena es de 46,581 kDa.

$$K_{48} I_{60} = (\text{VGKPG})_{48} (\text{VPGIG})_{60}$$

3.2. Sales

- Cloruro Cálculo (CaCl_2): compuesto inorgánico blanco del grupo de sales binarias y cristalino de gran solubilidad en agua. Esto da lugar a disoluciones muy concentradas con alta densidad que aportan viscosidad tal que las soluciones comerciales son del 30-45 % en masa. Por otro lado es muy higroscópico liberando gran cantidad de energía en forma de calor durante la absorción de agua en disolución [64].

Forma parte de algunos yacimientos minerales y se encuentra en pequeñas cantidades en el agua de mar y manantiales minerales, de tal forma que, por diferentes procedimientos, se puede producir en cantidades comerciales [65].

Sus aplicaciones son muy variadas aunque cabe destacar su uso para el deshielo y estabilización de carreteras; en alimentación, para el aumento la firmeza de frutas y verduras,

fabricación de queso (coagulación del cuajo) o en la elaboración de algunas cervezas y, en el campo médico se emplea en antiespasmódicos, diuréticos o en el tratamiento de la tetania [64].

No se considera tóxico ni malo para el medio ambiente pero, a partir de altos niveles puede ser lo para animales o plantas tal que pueden llegar a provocar exfoliación, ulceración y cicatrización de la piel y, por vía oral, irritar el tracto intestinal [64].

- Fosfato de disodio (Na_2HPO_4): es una sal que, en forma pura, es de color blanco. Se puede encontrar cristalizada en su forma anhidra o junto con 2, 7, 8 y hasta 12 H_2O (siendo la forma anhidra y la de 2 y 12 H_2O las más comunes). La estructura suele estar conformada por aniones $(\text{HPO}_4)^{2-}$ en una estructura hexagonal compacta y los cationes Na^+ en los espacios octaédricos y tetraédricos [66].

Se produce a partir tanto del ácido fosfórico térmico como del húmedo purificado y el hidrato deseado se obtiene con el control de la temperatura en la producción o por deshidratación de la solución en una torre de secado por pulverización [66].

Entre sus aplicaciones es típica la mezcla con el fosfato monosódico (NaH_2PO_4) para las disoluciones tampón, en el tratamiento de agua de alimentación, detergentes y limpiadores o su presencia en suplementos minerales de piensos. Además destaca el papel en la industria alimentaria por su uso en productos lácteos concentrados o postres instantáneos ya que evita la coagulación al calentarse. Por último podemos mencionar su uso para la fabricación de otros fosfatos derivados [66].

3.3. Técnicas experimentales

3.3.1. Preparación de disolución de polímeros y mezcla

Durante las diferentes técnicas experimentales llevadas a cabo, se han empleado principalmente disoluciones de los ELR en concentración 1 mg/ml. No obstante, en determinados procesos han sido necesarias otras concentraciones específicas detalladas cuando sea pertinente. Todas han sido preparadas bajo el mismo protocolo, manteniendo los polímeros y las disoluciones en condiciones de refrigeración, han sido filtradas con filtros de $0,22 \mu\text{m}$ (asegurando que no quedan estructuras ensambladas que interfieran en los resultados finales) y se ha analizado el pH de cada una neutralizando hasta un pH en torno a 7 cuando ha sido necesario.

En alguna de las técnicas utilizadas, se analiza la mezcla de ambos polímeros con el fin de estudiar su interacción. Esta se produce a través de enlaces no covalentes, muchos de los cuales son resultado de las diferencias de carga entre los polímeros. El $(\text{SN}_{A15})_3\text{E}_{50}\text{I}_{60}$ tiene una carga negativa mientras que, $\text{K}_{48}\text{I}_{60}$ presenta una carga positiva en una proporción 48/10.

R.Carga ELR	1:0	1:0,25	1:0,5	1:0,75	1:1	0,75:1	0,5:1	0,25:1	0:1
$(\text{SN}_{A15})_3\text{E}_{50}\text{I}_{60}$	1000	942,29	890,84	844,77	803,21	753,77	671,14	505,05	0,00
$\text{K}_{48}\text{I}_{60}$	0,00	57,71	109,13	155,23	196,79	246,23	328,86	494,95	1000

Tabla 1: Volumen en μl correspondiente a cada ELR para la relación carga (R.Carga) $(\text{SN}_{A15})_3\text{E}_{50}\text{I}_{60} : \text{K}_{48}\text{I}_{60}$ indicada en la parte superior.

De esta forma, las mezclas se realizan en función de la relación de carga y no en función de la cantidad de polímero, utilizando las cantidades proporcionadas en la tabla adjunta 1.

3.3.2. Electroforesis SDS-PAGE

Fundamento teórico:

La electroforesis es una técnica de separación de unidades proteicas, ya sean de ADN, ARN o proteínas en función de su carga eléctrica y tamaño permitiendo estimar su peso molecular y homogeneidad [67].

Esta técnica utiliza una corriente eléctrica para desplazar las moléculas a través de un gel o matriz porosos. Estos poros actúan como un tamiz que permite a las partículas más pequeñas avanzar más rápido que aquellas de mayor tamaño quedando en posiciones diferentes al final del proceso. Para estimar el peso molecular se compara esta posición con una muestra de referencia conocida, marker, que se somete al mismo proceso [68]. Este se trata de una mezcla de diferentes proteínas que al ser desplazadas se separan en diferentes bandas, cada una correspondiente a un peso molecular [69].

En concreto, la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) utiliza un gel de poliacrilamida como matriz y dodecil sulfato sódico (SDS) para desnaturalizar las proteínas y que pierdan su estructura [67]. El SDS es un detergente aniónico de carga negativa en el que se disuelven moléculas hidrófobas desnaturalizandolas tal que solo conservan la estructura primaria y gran carga negativa que provoca una migración por el gel de cátodo a ánodo del campo eléctrico.

La velocidad de migración de la proteína está determinada por su carga, tamaño y forma junto con el tamaño de los poros del gel. Este, a su vez, depende de la concentración de acrilamida, a mayor concentración menor tamaño de poro. El resultado es una migración diferenciada [67].

El gel poroso altamente reticulado es resultado de la copolimerización de la acrilamida con el agente entrecruzador N,N'-metilen bis-acrilamida en presencia de un catalizador de ión persulfato y un iniciador como el TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina). Para la gelificación es importante una ambiente inerte ya que el oxígeno puede neutralizar los radicales libres. La velocidad de gelificación está determinada por la concentración del persulfato de amonio y el TEMED, mientras que la porosidad es consecuencia de la relación entre la cantidad de poliacrilamida y bis-acrilamida. Por ello, los geles reciben su nombre en función del % de acrilamida/bisacrilamida que lo componen [70].

Protocolo de actuación:

Para llevar a cabo esta técnica lo primero es la preparación de las muestras de polímero y marker. Para ello se utilizan las disoluciones realizadas en 3.3.1 de concentración 1mg/ml para mezclar 16 μ l con 4 μ l de un tampón buffer de concentración 5X, obteniendo 20 μ l de muestra teñida.

A continuación, se realiza un gel de poliacrilamida, el cual consta de dos partes: un gel concentrador de muestras, conocido como stacking gel, que se sitúa en la parte superior y un gel separador llamado resolving gel. En este caso, se utiliza un gel al 12 % con las cantidades indicadas en el anexo 18, utilizadas en el laboratorio BIOFORGE para obtener de 7,5 ml de resolving gel y 2,5 ml de stacking gel.

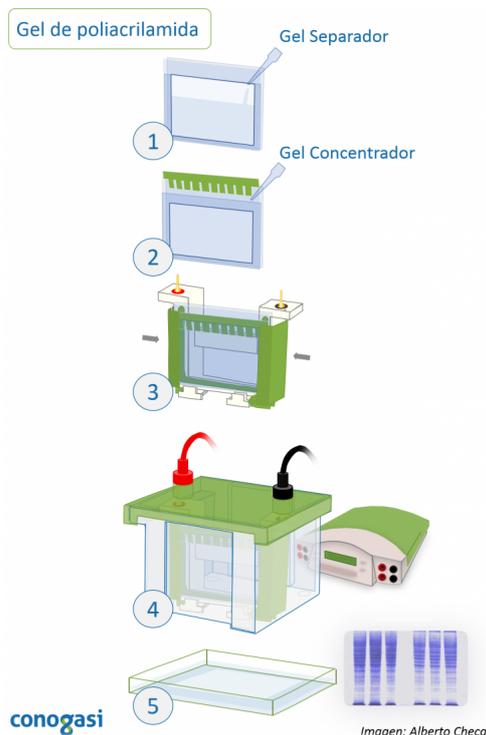


Figura 13: Esquema del proceso de electroforesis SDS-Page

El proceso comienza con la preparación del soporte de las placas donde se vierte el resolving gel. Después de 20/30 minutos gelificando, para evitar la mezcla de ambos, se vierte el stacking hasta que rebose e inmediatamente después se inserta el peine de los pocillos.

Cuando termina la gelificación se depositan las disoluciones de ELR y marker según cantidades indicadas en el anexo G. Seguidamente se sumerge la placa de gel en la cámara de electroforesis con una solución amortiguadora rica en electrolitos que facilita la transmisión de la corriente eléctrica y mantiene estable el pH. Se aplica una corriente de 25 mA y se espera aproximadamente 80 minutos. Para finalizar se retira el gel y se sumerge en una solución de sulfato de cobre que permitirá visualizar los resultados por contraste, en este caso, con el modelo *Image acquisition system Gel Doc Ez Imager BIO RAD* [71]

3.3.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Fundamento teórico:

Se trata una técnica que permite obtener espectros de absorción en la región infrarroja (IR) [72] basada en la excitación de grupos funcionales por un haz de luz IR que provoca movimientos vibracionales en los enlaces de la molécula, generalmente covalentes. Existen las vibraciones de tensión (ν_{A-B}) que provocan estiramiento o estrechamiento del enlace y las de flexión (δ_{ABC}) que provocan una deformación y modifican los ángulos [73].

La radiación es absorbida cuando la frecuencia a la que vibra la onda electromagnética es la misma que la del enlace, asociando así cada uno a un pico de absorción [74]. El resultado es un espectro de absorción de IR donde la intensidad de los picos tiene relación directa con la concentración molecular y su longitud de onda (λ) sobre el tipo de enlace, esto convierte a la espectroscopia en la una herramienta tanto cualitativa como cuantitativa [75].

Así los espectros representan una 'huella dactilar' de identificación molecular donde cada banda de absorción corresponde al conjunto de vibraciones de una molécula. En el caso de las proteínas, las frecuencias vibracionales suelen situarse entre los 4000 los 650 cm^{-1} presentando un espectro específico y predecible que varía ligeramente [74].

Para realizar este análisis, se utiliza un equipo que recibe el nombre de espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier (espectrometro FTIR) cuyo objetivo es la detección y medida de las λ simultáneamente. Además tiene otras ventajas como son su alta velocidad, resolución, sensibilidad, exactitud y precisión, razones por la que es una preferencia respecto

a los instrumentos dispersivos [72].

Este instrumento consta de tres componentes fundamentales: fuente de radiación, interferómetro de Michelson y detector [72]. La fuente de luz es una luz continua que ofrece una amplia gama de λ infrarrojas. La interacción entre esta y las moléculas es resonante, tal que la energía del fotón absorbida corresponde a la diferencia energética entre dos niveles vibracionales o rotacionales de la molécula que pasa al estado excitado. Estos niveles se asocian a cambios en la distancia interatómica de enlace o cambios en los ángulos respecto al equilibrio [76]. Por otro lado, el interferómetro de Michelson está constituido por dos espejos, uno de ellos móvil, y por un divisor de haz (beam splitter) que permite que parte de la radiación incidente se transmita y parte se refleje. Ambas se superponen tras haber recorrido distintas trayectorias formando una figura de interferencia [72, 77].

Esta señal llega al detector y cuando el espejo móvil se desplaza se generan distintas interferencias que son recogidas en un interferograma, el cual representa la intensidad de radiación en función de la diferencia de camino óptico. Estos datos se someten a la transformada de Fourier inversa de tal forma que se obtiene la banda del espectro donde las señales se representan en función de las frecuencias de la radiación que atraviesa la muestra [76].

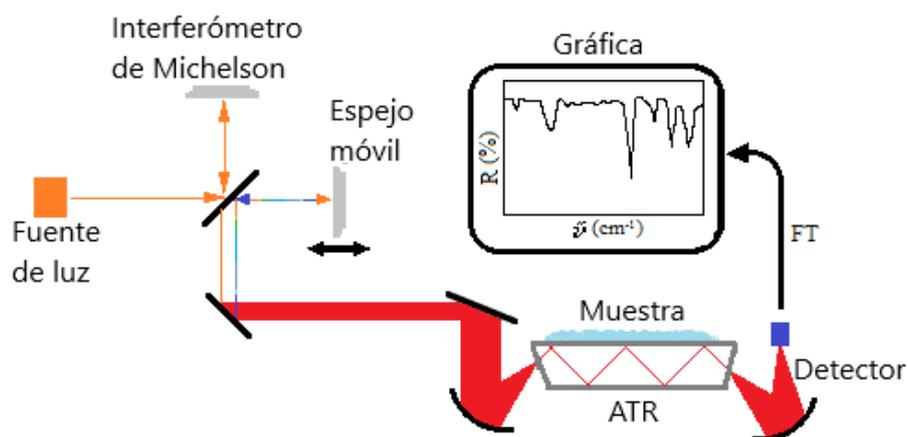


Figura 14: Representación gráfica del espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier.

El modelo de láser más común es el de reflexión total atenuada (ATR, siglas en inglés). En él, el haz de IR es reflejado internamente a través de espejos e incide sobre un cristal ópticamente denso con un alto índice de refracción para un ángulo determinado. Este está en contacto con la muestra tal que el rayo incide a una distancia mínima de esta [78].

Protocolo de actuación:

En este caso el equipo utilizado es *Accident Bunker Tensor 27* [71] que se sirve del software OPUS para la toma y análisis de datos. Este modelo toma mediciones en un rango de λ entre 600 y 4000 cm^{-1} .

El procedimiento consiste en un primer barrido sin muestra en el sensor para calibrar el aparato. Posteriormente se introducen unos 5 mg de ELR liofilizado cubriendo todo el sensor y se configura el tipo de barrido a realizar. Se seleccionó la toma de datos del espectro en 64 medidas a resolución 2 cm^{-1} . Para su lectura se somete a una corrección de la línea de base y la normalización correspondiente

A la hora de analizar los espectros IR no se puede confirmar nada categóricamente, en

ocasiones hay solapamiento de señales, por lo que solo se pueden suponer que los picos y las bandas corresponden a ciertos enlaces y estructuras recogidos en la literatura la cual ayuda en la identificación. Según el espectro se puede conocer el tipo de molécula porque presentará picos característicos pero no la composición exacta, aunque existen bibliotecas con espectros FTIR de compuestos muy recurrentes para poder una identificación inmediata [79].

3.3.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Fundamento teórico:

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se trata de técnica analítica [80] que permite la evaluación de las transformaciones físicas y químicas de la materia en función de la cantidad de calor que se le suministra a lo largo de un tiempo. Esto es resultado del diferencial de entalpía que existe entre una cápsula que contiene la muestra y otra vacía que sirve de referencia [81].

La calorimetría es un proceso sencillo y sus características energéticas muy determinantes. A través de ella se pueden conocer las temperaturas de fusión, cristalización y transición mesomórfica del material de estudio, así como sus cambios de entalpía (H) y entropía (S). Todo ello ayuda a la caracterización de la transición vítrea y otras propiedades relacionadas con la capacidad calorífica (Cp) y el calor latente. [80].

Una de sus ventajas es el amplio rango dinámico de temperaturas, lo cual es muy interesante en polímeros semicristalinos que normalmente están lejos del equilibrio y donde las transiciones de fase dependen de la velocidad de cambio de la temperatura. Además es rápida de realizar, sensible y no requiere de mucha cantidad de muestra [80].

La cápsula sin muestra permite medir la energía extra que necesita la cápsula que sí la tiene, esta es la medida que toma el DSC y representa la información en un termograma, en el cual el área bajo la curva representa la entalpía [81].

Uno de los parámetros que podemos conocer es la Cp relacionando según la ecuación 2 el flujo de calor en unidades de J/s (calor (q) suministrado por unidad de tiempo (t)), y la velocidad de calentamiento (temperatura (T) por unidad de tiempo (t)). De esta forma se puede definir la Cp como la cantidad de calor que se necesita para conseguir un aumento de temperatura [81].

$$\frac{\frac{q}{t}}{\frac{\Delta T}{t}} = \frac{q}{\Delta T} = C_p = \text{Capacidad Calorífica} \quad (2)$$

Otro factor de estudio es la transición vítrea, propia de la fase amorfa de un sólido semicristalino, este cambio sucede en la temperatura de transición vítrea (T_t), que es el punto donde se da la transición en la región amorfa entre la fase vítrea y la fase ordenada. Si varía la temperatura o la humedad en el producto habrá un cambio, es decir, una transición. Por encima de la cual los polímeros adquieren movilidad y, cuando ganan la suficiente energía, se ordenan, al hacerlo liberan calor, lo que convierte la transición en un proceso exotérmico ($\Delta H < 0$). Con esta liberación el calefactor bajo el platillo de la muestra, realiza menos esfuerzo en el suministro del calor. Esta caída en el flujo se representa con una depresión en la gráfica, correspondiendo el punto más bajo a la T_t . El área de depresión proporciona la energía de cristalización u ordenación. Con este cambio de flujo también se produce según la ecuación 2 un cambio en la Cp del polímero [81].

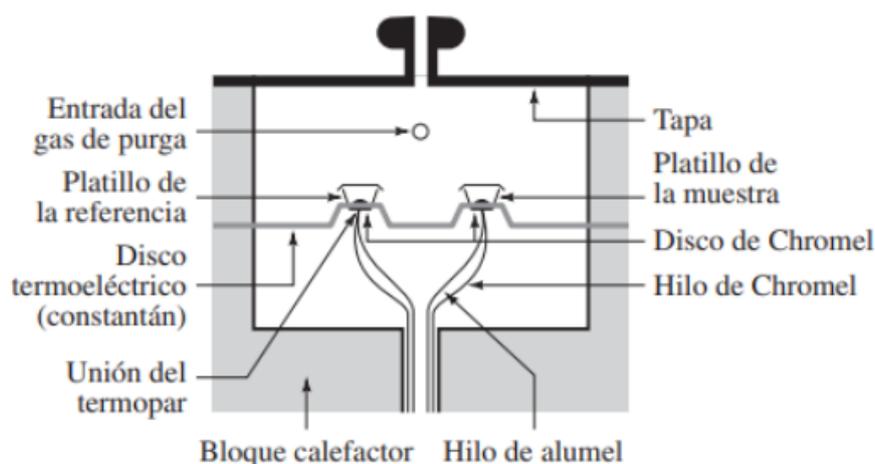


Figura 15: Esquema del equipo DSC por dentro.

Protocolo de actuación:

En este caso es necesaria mayor densidad de la muestra por lo que se emplean disoluciones de 50 mg/ml de ambos ELRs realizadas según la sección 3.3.1 de ambos ELR. El análisis se realiza sobre las mezclas de estos, tal que se realizará de acuerdo con las cantidades indicadas en la tabla 3 de la misma sección antes de introducir la muestra en la cápsula.

Lo primero a saber es que el estudio parte de temperaturas bajas, por lo tanto la preparación de las muestras a introducir en el instrumento de medida siempre será en frío junto con el resto de material de trabajo también en refrigeración.

Se prepara un crisol de aluminio de 40 μl y se añaden aproximadamente 20 μl de disolución. Se anota el peso exacto y se cierra herméticamente. Se repite el proceso con la disolución de referencia PBS 1X hasta que alcance el mismo peso que la anterior.

En este laboratorio se analiza en el modelo *Mettler Toledo DSC822e* [71] controlado con el software (METTLER STARe).

El proceso consta de enfriar la máquina e introducir los crisoles dejándolos a 4°C durante 5 minutos. Después se realiza un barrido desde los 4°C a los 50°C en intervalos de 2°C/minuto. Se analizarán todas las mezclas y de cada una se realizan 3 recogidas de datos.

3.3.5. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Fundamento teórico:

Se trata de una técnica para medir el tamaño de las partículas en suspensión en la región submicrónica a través de su relación con el movimiento browniano [82].

La recogida de datos se hace iluminando la muestra con un rayo láser tal que las partículas dispersan la luz y un fotodetector recoge las señales de estas fluctuaciones en un ángulo conocido recogiendo así la información sobre el movimiento [83].

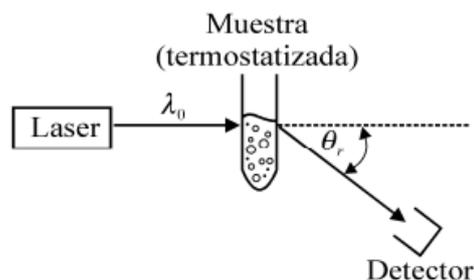


Figura 16: Esquema del sistema de recogida de datos DLS.

El movimiento browniano es el que se observa en las partículas suspendidas en un fluido como resultado de los choques entre moléculas y disolvente [84]. A mayor tamaño de la partícula, más lento el movimiento y viceversa. De tal forma que lo que se mide es la velocidad de difusión de las partículas por este movimiento, mediante la medición de la velocidad a la que fluctúa la intensidad de la luz dispersada cuando se detecta. Es necesario conocer la temperatura con precisión y que esta sea estable para que las corrientes de convección no provoquen movimientos no aleatorios además de por su relación con la viscosidad, en caso contrario la interpretación de los datos no sería correcta. La velocidad de estos movimientos se define por una propiedad conocida como el coeficiente de difusión traslacional (D), a partir de la cual se calcula el tamaño de la partícula con la ecuación de Stokes-Einstein [84]:

$$d(H) = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (3)$$

d(H) = diámetro hidrodinámico
 D = coeficiente de difusión traslacional
 k_B = constante de Boltzman
 T = temperatura absoluta
 μ = viscosidad

Así d(H) recibe el nombre de diámetro hidrodinámico y corresponde al de una partícula esférica con el mismo coeficiente de difusión que la nanopartícula. El parámetro representa el valor de cómo la partícula se difunde en el medio y dependerá del tamaño de su núcleo, de su estructura superficial y de su concentración y tipo de iones en el medio.

Los resultados del tamaño de partículas obtenidos por DLS se expresan a menudo en términos del parámetro Z-average y del parámetro índice de polidispersidad (PdI) que surgen cuando los datos son analizados por la técnica de cumulantes. Este análisis se basa en la existencia de una sola población de partículas que debe tener una distribución gaussiana en torno al tamaño medio de las partículas [85]. Esto conlleva un cálculo matemáticamente estable y complejo insensible al ruido del que se obtienen los cumulantes cuyo cálculo esta recogido en los documentos normativos ISO 133321:1996E e ISO22412:2008 [86], variables utilizadas para el cálculo del resto de parámetros [87].

El Z-Average puede expresarse con la siguiente ecuación [87]:

$$D_z = \frac{\sum S_i}{\sum (S_i/D_i)} \quad (4)$$

S_i = intensidad dispersa de la partícula i
 D_i = diámetro de la partícula i

Debido a que este resultado se obtiene a partir de la distribución de intensidad ponderada se puede afirmar que Z-average es la media aritmética del diámetro de la partícula ponderada por la intensidad armónica [87]. Z-average aumenta a medida que lo hace el tamaño de las partículas, tal que proporciona una medida fiable del tamaño medio de una distribución granulométrica, además es fácil de medir.

Por otro lado es interesante el índice de polidispersidad (PdI), el cual se calcula por medio de dos de los valores obtenidos por el método de cumulantes. Es un índice adimensional y se escala tal que un menor valor indica una muestra menos dispersa. Es extraña la obtención de valores menores de 0,05 salvo patrones muy monodispersos y valores superiores a 0,7 indican una distribución de tamaños muy amplia siendo mejor otra técnica de análisis [86].

Protocolo de actuación: Se realizan disoluciones de 1mg/ml como las indicadas en la sección 3.3.1 y se realizarán las mezclas de ELRs por proporción de carga con los volúmenes indicados en la tabla 3 de la misma sección. Estas mezclas se introducirán posteriormente en una cubeta apta para el aparato DLS, en este caso como queremos medir el Z-average y el PdI se utilizarán cubetas de poliestireno de paredes lisas.

La máquina disponible en el laboratorio es el modelo *ZETASIZER NANO ZSP system* [71]. Se programará un enfriamiento hasta los 4°C y se aumentará hasta los 10°C, temperatura que se mantendrá 2 minutos, para posteriormente aumentar hasta 37°C y mantener 30 minutos y recoger los datos obtenidos para que sean analizados. Repetir la operación 3 veces para que los datos a representar sean una media de todos ellos.

3.3.6. Mineralización

Fundamento teórico: En el caso de los ELR, es el producto de la interacción entre estos y los iones de calcio y fosfato para obtener estructuras semejantes a la HA.

Protocolo de actuación:

Para la realización de esta técnica se prepara la disolución de polímeros como se indica en 3.3.1 pero de 4mg/ml para tener una mayor concentración.

Si la relación de cargas entre ELRs fuese de 1/1, no habría interacción entre los iones de calcio y fosfato con las estructuras ensambladas que forman los ELR o sería casi nula. Como además investigaciones anteriores ya aseguran la interacción con el ELR $(\text{SN}_{A15})_3\text{E}_{50}\text{I}_{60}$, eligiremos un exceso de este y trabajaremos con una relación de carga 1:0,75 a su favor, según la tabla de la sección 3.3.1.

Por otro lado se preparan 15 ml de disolución CaCl_2 0,02 mM y 15 ml Na_2HPO_4 0,012 mM para que la relación entre ellas sea 5:3 como la del calcio y el fosfato en la HA.

Con los ELRs preparados y las disoluciones de sales también se dispone un baño térmico a 40°C sobre un calentador magnético y se introduce un eppendorf con un imán en su interior para una agitación uniforme del medio que favorezca la reacción. A partir de este momento todo el proceso se llevará a cabo bajo un control constante de pH, ya que en la entrada de iones lo modifica y será un indicativo aproximado de la evolución del proceso. Añadir los ELRs y esperar aproximadamente 5 minutos para que, con el aumento de temperatura, se autoensamblen. Posteriormente añadir gota a gota la disolución de CaCl_2 y esperar aproximadamente 15 minutos. A continuación hacer lo mismo con la disolución de Na_2HPO_4 .

Realizar también el mismo proceso pero sin agitación para comprobar las diferencias.

3.3.7. Microscopía electrónica de transmisión (TEM):

Fundamento teórico:

Esta técnica aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con la muestra convenientemente preparada [88].

Al colisionar, en función del grosor y tipo de átomo, se dispersan selectivamente, de tal forma que hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que se desvían por completo. Todos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final, en este caso sobre una cámara CCD (charged-coupled device), obteniendo la información en una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponde al grado de dispersión de los electrones incidentes. Se obtiene información tanto si la muestra es amorfa

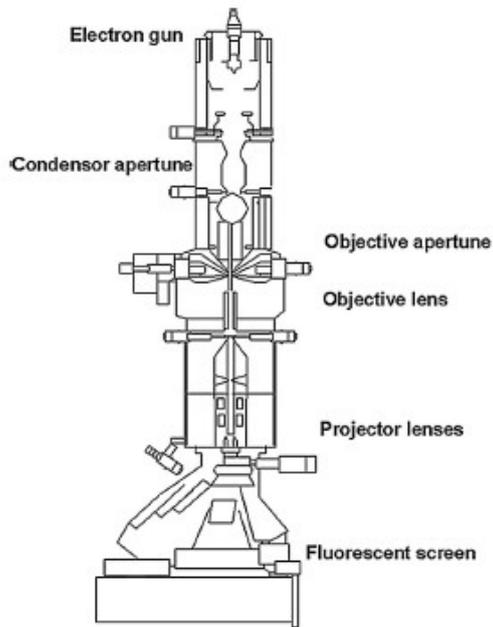


Figura 17: Esquema del microscopio electrónico de transmisión.

Protocolo de actuación:

Una vez termina el proceso de mineralización de 3.3.6, se depositan los eppendorfs con las mezclas en la incubadora de modelo *Incubators, MaxQ Mini 4000 Thermofisher and Certomat R.* [71], para mantener la temperatura hasta la recogida de muestras. Esta se realiza con ayuda de la rejilla de soporte. En este caso se recogen 4 muestras distintas:

1. Muestra de ELRs + sales + agitación de la parte sobrenadante (sales AgS).
2. Muestra de ELRs + sales + agitación de la parte precipitada (sales AgP).
3. Muestra de ELRs + sales + sin agitación de la parte sobrenadante y precipitada (sales SP).
4. Solo ELRs (sobrenadante).

Se toma en cada caso imágenes a distintas ampliaciones para poder apreciar correctamente las estructuras, que además se medirán en algunos casos para recoger más información con el software *Fiji imagej.*

como cristalina [89].

En este estudio se obtuvieron las imágenes con el modelo *TEM JEOL JEM-1011 HR* [90], con voltajes de 40kV a 100kV, filamento de Wolframio, pieza polar HR de alta resolución y cámara CCD 4000x2672 píxeles del centro Innova de la Universidad de Valladolid [89]. Las cámaras CCD reciben este nombre por el tipo de fotodetector que emplean que es de estructura tipo metal-óxido-semiconductor (MOS) [91]. Son especialmente utilizadas para condiciones de bajo nivel de iluminación o si se requiere información espectral cuando se requieren datos cuantitativos del análisis [92].

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.0.1. Electroforesis

En la Figura 9 se presenta el resultado de la electroforesis SDS-PAGE llevada a cabo.

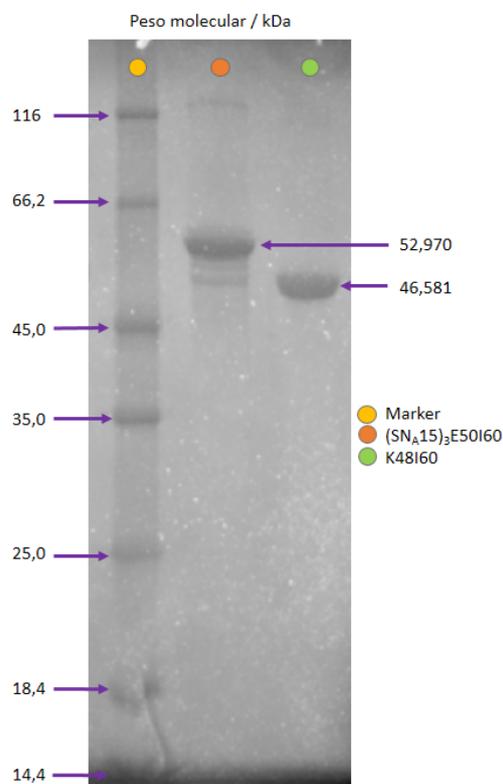


Figura 18: Resultados electroforesis. Guía de color: amarillo es el marker, naranja es $(SN_{A15})_3E_{50}I_{60}$ y verde es $K_{48}I_{60}$. Todos los pesos moleculares en kDa.

La primera columna, resaltada en color amarillo, corresponde a las bandas que deja el marker con los pesos moleculares indicados por el fabricante a la izquierda (anexo F), en kilodaltons (kDa). A continuación se encuentran las bandas correspondientes a los ELR: $(SN_{A15})_3E_{50}I_{60}$, señalado en color naranja, y $K_{48}I_{60}$, en color verde. Se conoce teóricamente el peso de ambos resultado de la suma de los pesos moleculares de los residuos de los aminoácidos que componen las cadenas. En el caso del $(SN_{A15})_3E_{50}I_{60}$ posee un peso molecular teórico de 52,970 kDa, ubicándose entre las bandas de 45 y 66,2 kDa del marcador. Por otro lado, el $K_{48}I_{60}$ tiene un peso molecular de 46,581 kDa, ligeramente más cercano a la banda de 45 kDa. Por lo tanto, se confirma que ambos ELRs corresponden a los polipéptidos objetivo buscados y se concluye que su síntesis ha sido exitosa.

Cabe destacar que las bandas son muy definidas, lo cual es un indicativo de alta pureza de las muestras, todas las masas moléculares quedan concentradas en un punto. En caso contrario los ELRs sintetizados se encontrarían contaminados.

4.0.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En el análisis FTIR como se menciona en la sección 3.3.3 se obtiene un espectro de absorción donde los picos corresponden a la energía del fotón absorbida por distintos enlaces. Esta energía tiene una relación inversa con la longitud de onda por la ecuación de Planck (ecuación 5), lo cual establece que una energía mayor corresponde a una λ menor y al leer la gráfica se observa que los valores de esta van de mayor a menor, es decir en orden creciente de energía.

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda}, \text{ donde } h \text{ es la constante de Planck} \quad (5)$$

Por otro lado, para comprender la lectura de las gráficas hay que tener en cuenta ciertos aspectos. Uno de ellos es que la intensidad de las bandas de absorción depende de la polaridad del enlace, siendo más intensa a mayor polaridad, y del número de enlaces responsables de la absorción, también en relación directa donde más enlaces implican mayor intensidad. Por otro lado, las señales solo se toman hasta la resolución de 400 cm^{-1} esto se debe a que a partir de aquí existen limitaciones de resolución, además se trata de enlaces fuertes y se solapan muchas señales lo que dificulta la asociación del valor con un solo tipo de enlace [93]. Finalmente, se pueden diferenciar dos zonas: entre los 4000 y los 1400 cm^{-1} que es una región de gran utilidad para identificar la mayoría de grupos funcionales de moléculas orgánicas y, la zona entre los 1500 y 600 cm^{-1} , más compleja. Esta complejidad se debe a que es el resultado de la absorción tanto de vibraciones de flexión como de tensión y cada compuesto tiene una absorción característica recibiendo el nombre de 'huella dactilar' [94]. Tanto es así que la diferencia en el espectro entre dos moléculas diferentes con grupos funcionales muy semejantes se refleja en las bandas de esta región.

A continuación se presentan los espectros obtenidos de cada polímero, en color azul en la figura 19 se observa el correspondiente a $(\text{SN}_{A15})_3\text{E}_{50}\text{I}_{60}$ mientras que el $\text{K}_{48}\text{I}_{60}$ está en color naranja en la figura 20

Son conocidas las secuencias de AA que forman los ELR, los enlaces que se establecen y, con ayuda del anexo A, se pueden reconocer los radicales de los AA específicos de cada uno, así se puede establecer una relación entre las señales y los enlaces que deben aparecer reflejados en los espectros. En ambos ELR se trata de información muy semejante al tratarse del mismo tipo de moléculas, permitiendo un análisis análogo.

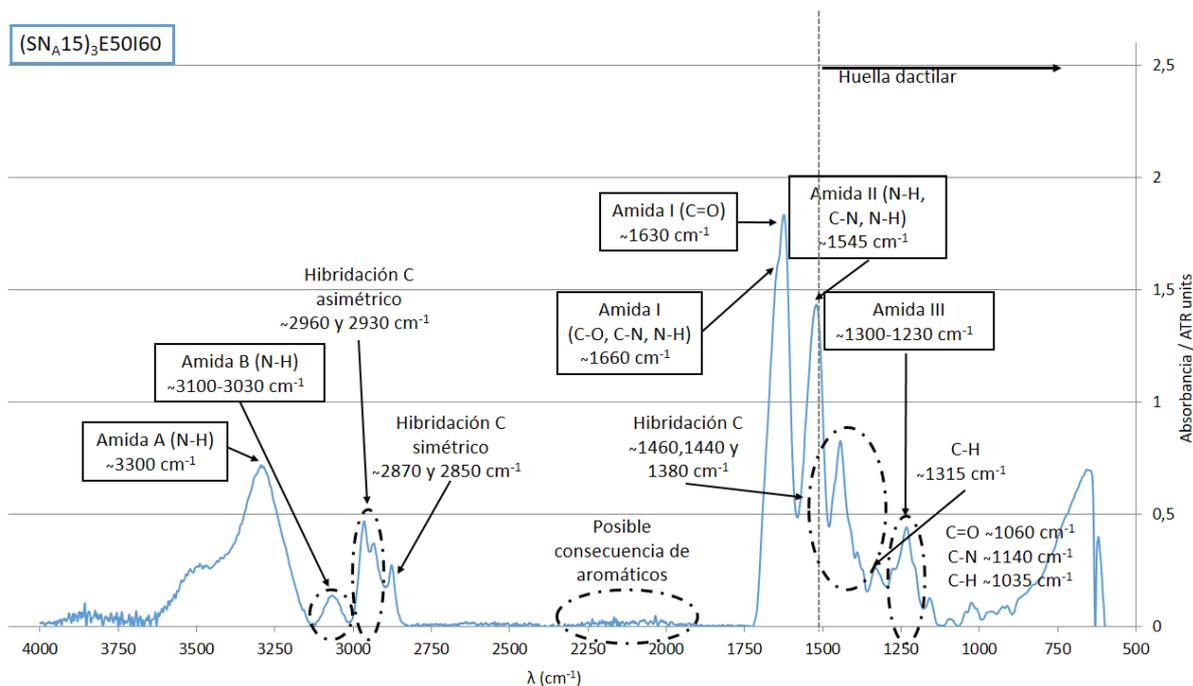


Figura 19: Guía de lectura gráfica FTIR del ELR $(\text{SN}_{A15})_3\text{E}_{50}\text{I}_{60}$.

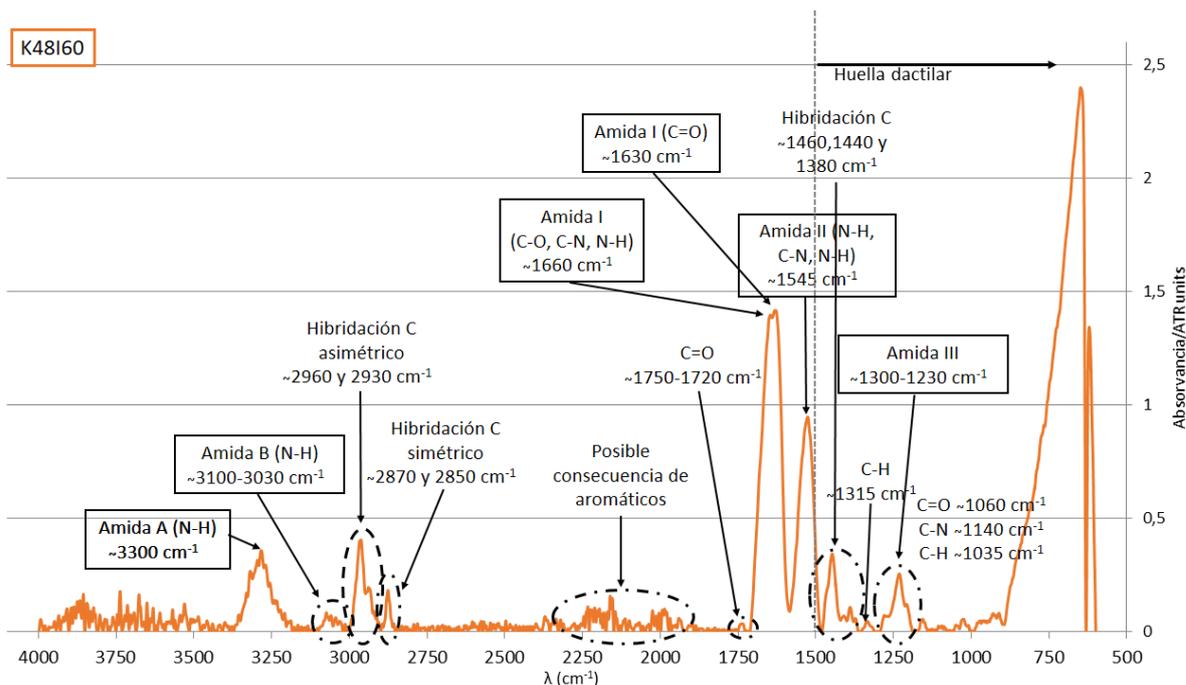


Figura 20: Guía de lectura gráfica FTIR del ELR K₄₈I₆₀.

Se analizarán las bandas de absorción por grupos para simplificar el proceso:

- Amidas: al ser consecuencia del enlace peptídico que da lugar a la cadena de proteínas son los más identificativos de este tipo de moléculas. Reciben diferentes nombres dependiendo del tipo de vibración, las cuales se pueden observar en la siguiente figura:

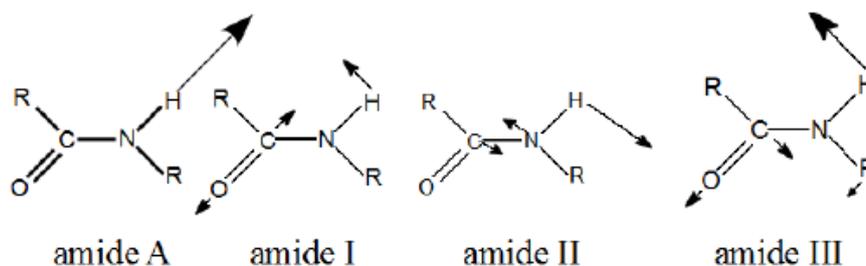


Figura 21: Imagen correspondiente a las vibraciones en cada tipo de amida del enlace peptídico.

A continuación se presentan asociadas a las longitudes de onda:

- La amida A se encuentra en los 3300 cm^{-1} .
- La amida B aparece en el entorno $3100\text{-}3030\text{ cm}^{-1}$.
- La amida I es la responsable del pico de los 1660 cm^{-1} que se solapa con la señal de los 1630 cm^{-1} .
- La amida II es la razón de la señal en los 1545 cm^{-1} .
- La amida III aparece en una banda entre $1300\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$.

Hay señales de otros enlaces consecuencias del enlace peptídico como un enlace doble C=O en los $1750-1720\text{ cm}^{-1}$ o picos en la huella dactilar en torno a los 1100 cm^{-1} correspondientes a uniones C=O, C-N.

- Hibridaciones del carbono: pertenecientes a las cadenas de carbono presentes en los radicales. Se pueden identificar con los picos del entorno de los 2900 y los 2800 cm^{-1} , junto con una señal en la huella dactilar entre los 1450 y los 1360 cm^{-1} .

Se puede apreciar que en general los espectros de ambos ELRs presentan los mismos picos pero con diferente intensidad y amplitud de banda, esto puede deberse a varios factores: los ELRs no se pesó de manera exacta por lo que la cantidad de muestra en el sensor puede diferir entre ambos, además de la diferencia notable en el número de AA de la cadena. La mayor diferencia se aprecia como se mencionó anteriormente en la huella dactilar como se puede observar en el anexo I.

4.0.3. Dispersión dinámica de la luz (DLS):

Tras el análisis de los datos recogidos en el DLS, se obtiene la siguiente gráfica que representa los valores del Z-average para cada relación entre cargas de los ELR.

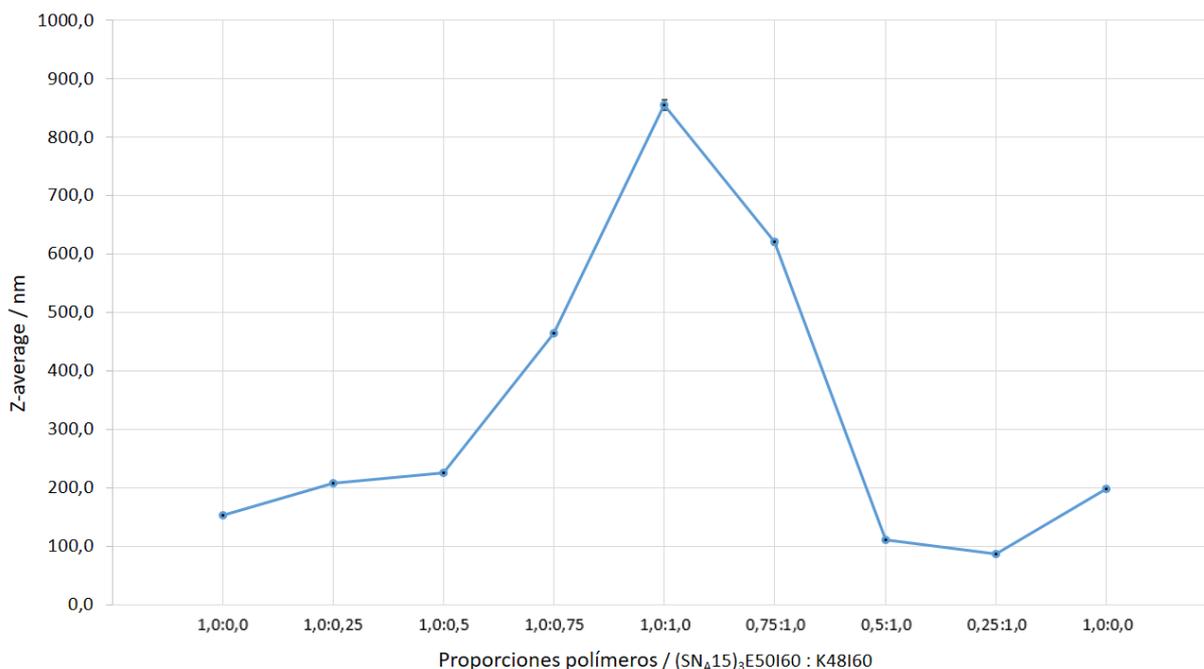


Figura 22: DLS. Gráfica resultados Z-average. En el eje x se pueden observar las proporciones de carga entre polímeros y en el eje y el valor del Z-average asociado a cada una. Gráfica realizada con los datos del anexo J.

Debido a la relación directa que existe entre el aumento de este valor y el tamaño de las partículas que se forman se aprecia que las de mayor tamaño surgen de una relación igual entre cargas, esto probablemente se deba a que pueden establecer más enlaces entre radicales. Por consiguiente a medida que la relación se hace más desigual el tamaño disminuye.

Cabe destacar que las estructuras que conforma el ELR K_4I_6O en solitario son de mayor tamaño que las que se obtienen del $(SN_{A15})_3E_{50}I_{60}$.

Se trata de resultados fiables y representativos debido a lo pequeña que es la desviación típica en todos los resultados.

Por otro lado, están los datos respecto al índice de polidispersión, PdI, el cual cabe recordar que ofrece información sobre la diferencia entre los tamaños de todas las nanopartículas presentes en la muestra. En las proporciones 1:0,25 y 1:0,5 se pueden observar valores menores que 0,05 de lo que se puede deducir que todas eran de un tamaño muy similar. Aunque cabe destacar que en todos los casos los valores son menores de 0,3 por lo que todas las mezclas dan lugar a estructuras de tamaños homogéneos.

Relación $(SN_{A15})_3E_{50}I_{60}:K_{48}I_{60}$	1:0	1:0,25	1:0,5	1:0,75	1:1	0,75:1	0,5:1	0,25:1	0:1
PdI1	0,128	0,021	0,021	0,235	0,236	0,081	0,070	0,268	0,051
PdI2	0,128	0,008	0,032	0,237	0,255	0,120	0,062	0,288	0,051
PdI3	0,138	0,067	0,032	0,243	0,197	0,152	0,067	0,264	0,072
MEDIAS	0,131	0,032	0,028	0,238	0,229	0,118	0,066	0,273	0,058
DESVIACIÓN	0,004	0,022	0,004	0,003	0,021	0,025	0,003	0,009	0,009

Tabla 2: Datos PdI obtenidos con DLS de las diferentes mezclas de polímeros y sus múltiples tomas de datos.

4.0.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry):

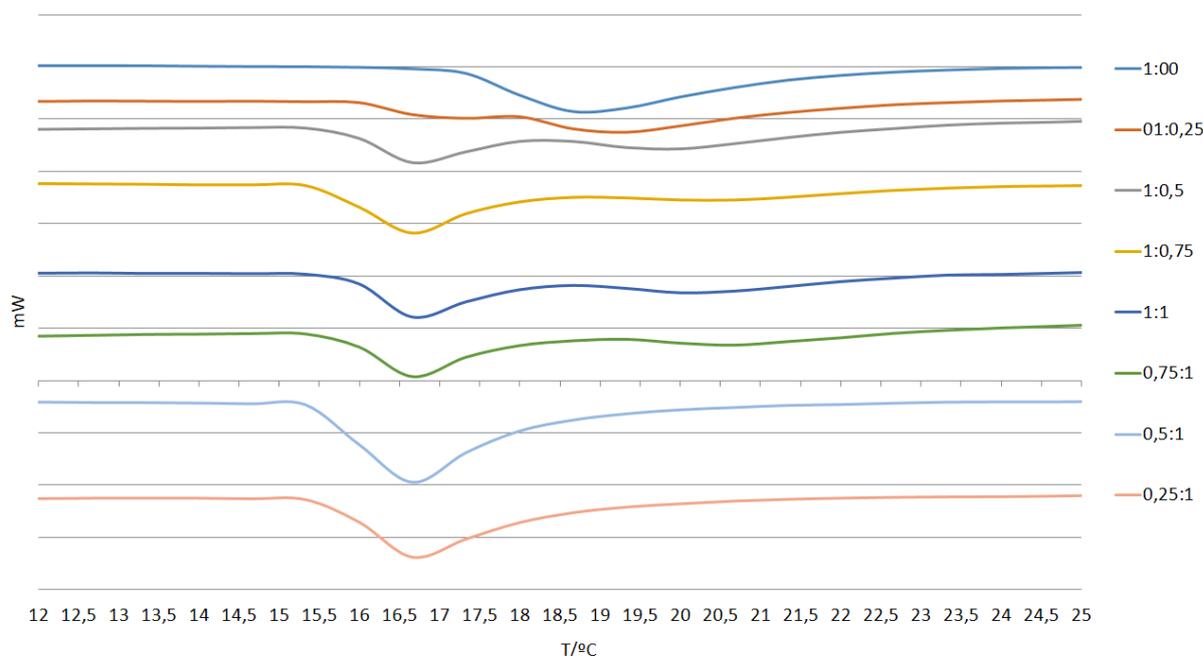


Figura 23: Agrupación de las curvas obtenidas del análisis de cada mezcla de ELRs (relacionadas por la guía de colores). Han sido desplazadas para facilitar su comparación.

Las temperaturas de transición T_t obtenidas se encuentran en la siguiente gráfica de una forma más precisa y ordenada. Se puede apreciar que en algunos casos hay dos temperaturas en las que se observa una depresión de la curva, esto puede ser indicativo de que hay dos temperaturas diferentes en las que se reorganizan y ensamblan, una principal donde se nota el cambio más notable y otra secundaria. Ambas son representativas porque se vuelven a obtener desviaciones pequeñas que implican que los datos recogidos en todas las pruebas son semejantes. Cabe destacar que todas ellas son temperaturas inferiores a 25°C , considerada una temperatura normal de un laboratorio.

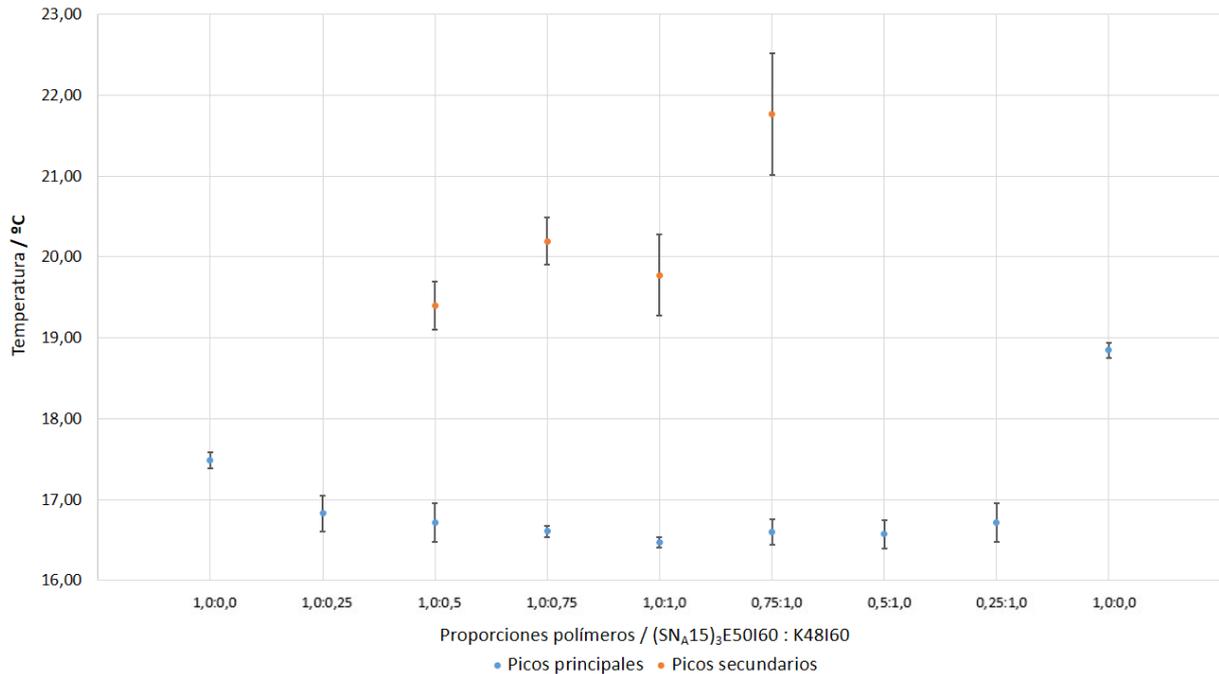


Figura 24: DSC. T_t . El 'eje x' recoge las proporciones de carga entre ELRs y el 'eje y' el valor de T_t asociado a cada una. Gráfica realizada con los datos del anexo K.

Se pueden resaltar tres observaciones:

- En todos los casos donde ambos ELR forman parte de la muestra las T_t son muy semejantes, variando entre los $16,47^{\circ}\text{C}$ y los $16,83^{\circ}\text{C}$, lo que implica menos de medio grado de diferencia.
- La muestra con relación 1:1 entre cargas negativas y positivas es la que presenta una T_t menor. Esto podría ser una confirmación de la hipótesis inicial donde se menciona la interacción entre las distintas cargas de los ELR como uno de los factores que favorece el ensamblaje común siendo necesaria menor agitación térmica.
- El ELR K₄8I60 se desmarca de todas las demás muestras con una T_t de $18,85^{\circ}\text{C}$ casi un grado y medio por encima del $(\text{SN}_{A15})_3\text{E}_{50}\text{I}_{60}$ en solitario que presenta $17,48^{\circ}\text{C}$. Siendo estas las dos temperaturas más altas. Esto puede ser consecuencia del número de cargas de igual signo, que se repelen y dificultan el autoensamblado, como el K₄8I60 presenta un computo mayor también necesita de mayor agitación. Lo cual concuerda con la línea argumental anterior.

Finalmente se presenta la gráfica de las entalpías. Se puede comprobar que los datos representados corresponden a la media del área bajo la curva de los tres ensayos para cada caso. Es importante mencionarlo porque en este caso se aprecian desviaciones más altas, lo que implica datos más dispares unos de otros, pero el cálculo de esas entalpías es manual y puede ser una explicación más que razonable para estos resultados.

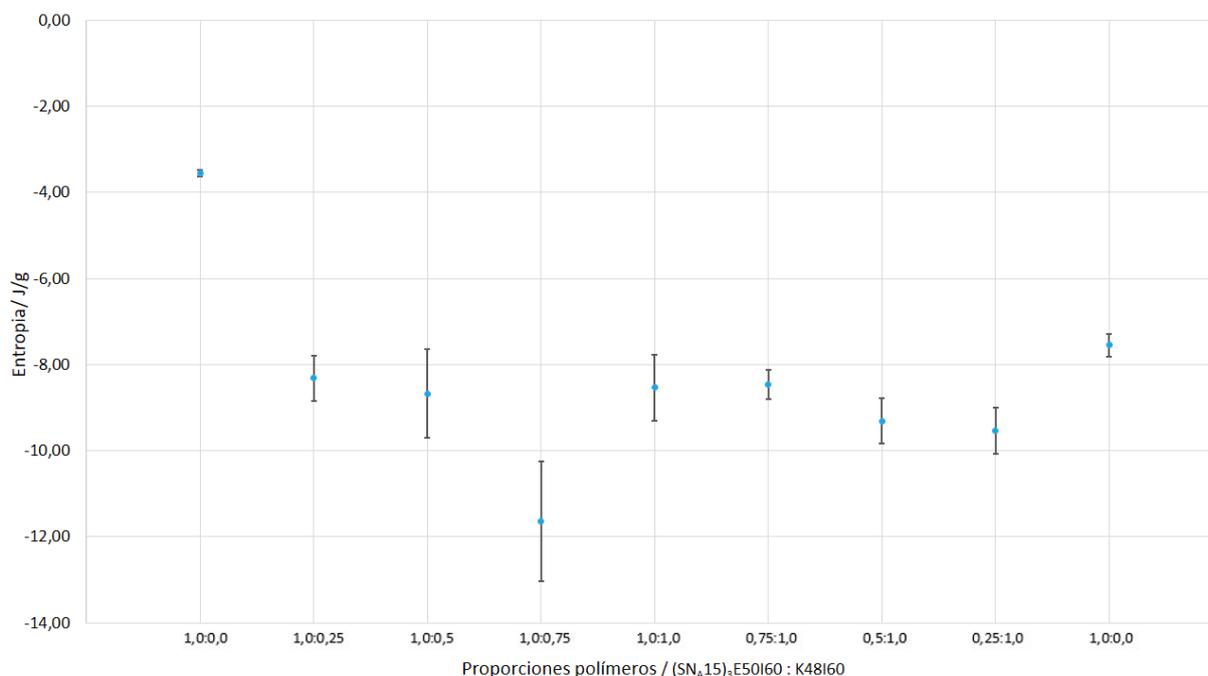


Figura 25: DSC. Resultado entalpías H. El 'eje x' recoge las proporciones de carga entre ELR y el 'eje y' el valor de H asociado a cada una. Gráfica realizada con los datos del anexo L

Lo primero a comentar es que se trata de entalpías negativas porque el ensamblaje de estructuras implica una liberación de energía. Se recoge que el (SN_A15)₃E₅₀I₆₀ puro es el que menos variación de entalpía provoca mientras que la mayor aparece en proporción 1:0,75 asumiendo que es la más energía libera y por ende la que forma una estructura más ordenada. No se aprecia ninguna regularidad que permita establecer una relación modelo entre la relación de las mezclas de ELR y la liberación de energía.

4.0.5. Mineralización:

Los resultados de interés obtenidos durante el proceso de mineralización, específicamente las estructuras a escala nanométrica que se forman, no son observables a nivel macroscópico. Por lo tanto será necesaria la microscopia electrónica de transmisión junto a las imágenes obtenidas adjuntas en la sección 4.0.6 para conocer el resultado integral de esta técnica.

4.0.6. Microscopia electrónica de transmisión (TEM):

Las imágenes adjuntas a continuación son los resultados de un estudio previo (referenciado en [63]) donde la mineralización de fosfato de calcio tiene lugar en presencia del ELR (SN_A15)₃E₅₀I₆₀ en solitario. Compararemos las imágenes obtenidas con estas.

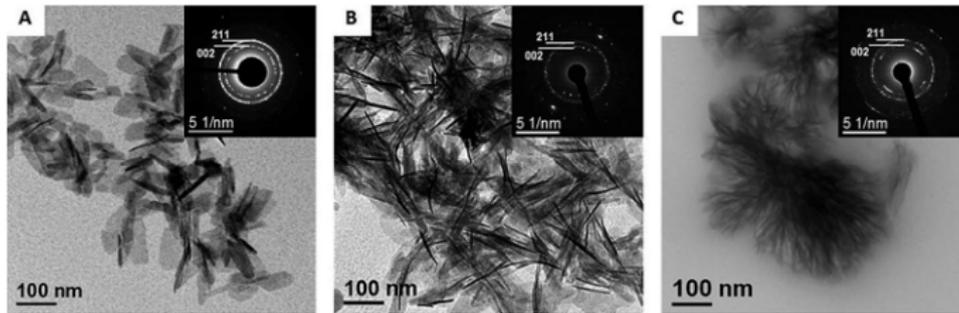


Figura 26: Imagen de los resultados del estudio correspondiente a la referencia [63] sobre la formación de nanoestructuras de fosfato de calcio bajo la influencia de ELR de tipo estaterina. La imagen A son las sales sin ELR, en B con $E_{50}I_{60}$ y en C con $(SN_{A15})_3E_{50}I_{60}$.

La diferencia de estructuras obtenidas en función del ELR verifica lo comentado en la introducción sobre la importancia del dominio SN_{A15} para obtener el resultado buscado. Además de confirmar que durante el protocolo de la mineralización se tomó la decisión correcta al escoger el ELR $(SN_{A15})_3E_{50}I_{60}$ como el de la carga en exceso.

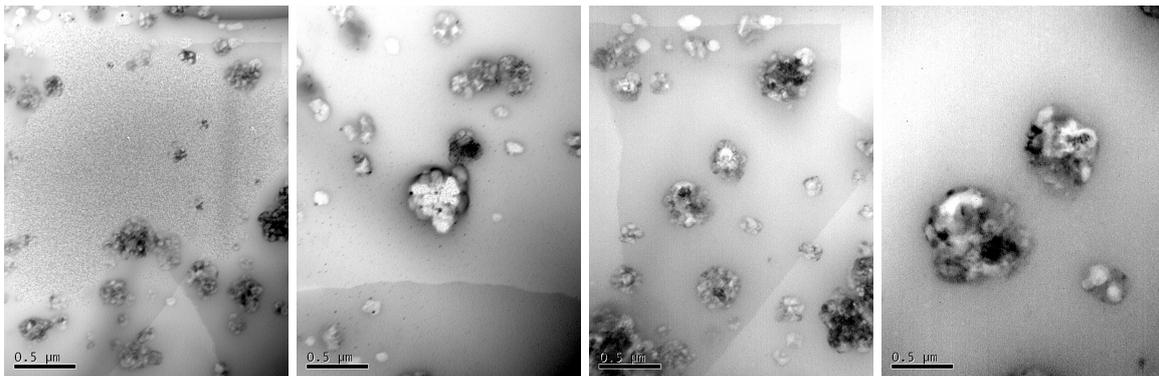


Figura 27: Muestra 4. Mezcla de ELRs sobrenadante

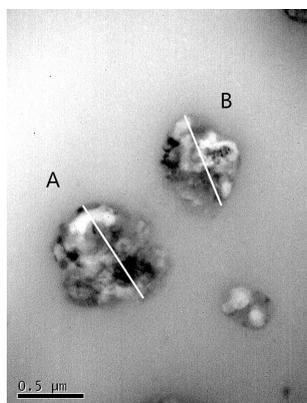


Figura 28: El diámetro A mide $0,84 \mu\text{m}$ aproximadamente y el B $0,74 \mu\text{m}$.

El primer conjunto de imágenes corresponde a la organización adquirida por los ELRs (figura 27).

Se observa que en la mezcla de estos se han formado nanopartículas de los mismos gracias al ensamblaje las cuales están dispersas y no unidas entre sí.

Los tamaños son pequeños incluso comparados con los cristales de la HA pero como se verá más adelante inferiores al resto de estructuras lo cual es debido a que serán el núcleo de la mineralización de una manera semejan-

te a como se muestra en la figura 12 en la sección 2.7.2.

El siguiente conjunto de imágenes corresponde a la visualización de la muestra 1: el sobrenadante de la mineralización en presencia de los ELRs con agitación en el proceso.

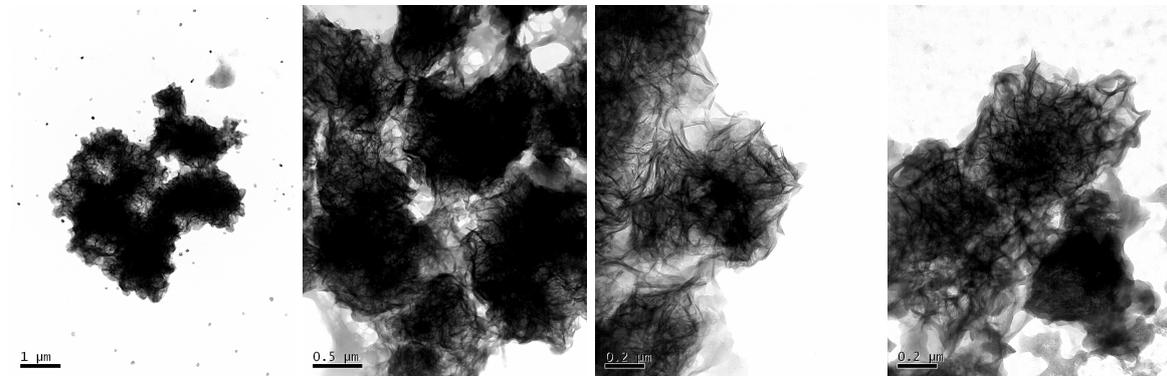


Figura 29: Muestra 1. ELRs + Sales + agitación. Sobrenadante..

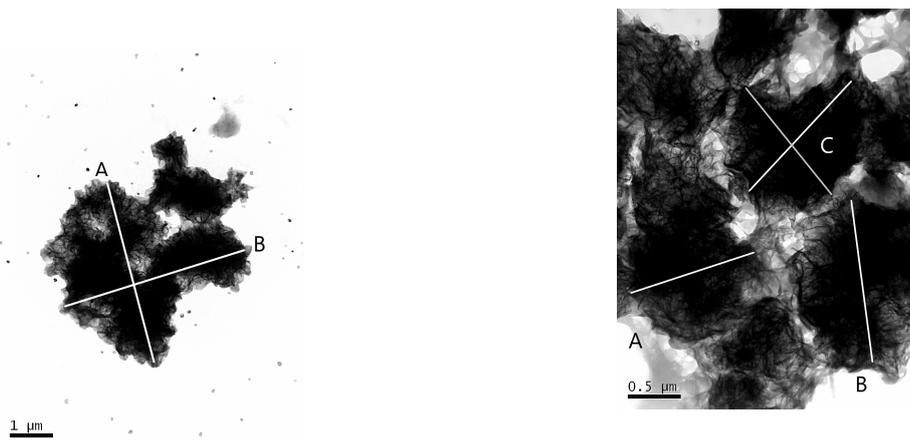


Figura 30: La distancia A mide $4,44 \mu\text{m}$ y la B $4,56 \mu\text{m}$.

Figura 31: La distancia A mide $1,24 \mu\text{m}$, la B mide $1,51$ y la estructura C $1,37 \times 1,53 \mu\text{m}$.

Se observan estructuras muy densas rodeadas de fibrillas, formando estructuras parecidas a las de la primera imagen de la figura 12 y, si las observamos individualmente, también muestran similitud con las de la figura 26 pero, además, están conectadas entre ellas por medio de las fibras tal que forman una especie de redes que dan lugar a una estructura más compleja. Esta diferencia puede deberse a que al interactuar los ELR entre sí los motivos libres se orientan de una manera diferente permitiendo una mineralización con más conexiones.

Los tamaños de las estructuras sencillas son, en algunos casos, casi el doble respecto a las estructuras de ELR ensambladas más pequeñas, lo que implica un aumento considerable del tamaño tras la interacción con los fosfatos de calcio. Además las imágenes junto con las dimensiones de las conformaciones complejas nos dan a entender que es el conjunto de varias estructuras más simples.

Las últimas imágenes que se presentan son las tomadas a la muestra del precipitado de la mezcla de los ELRs con los iones:

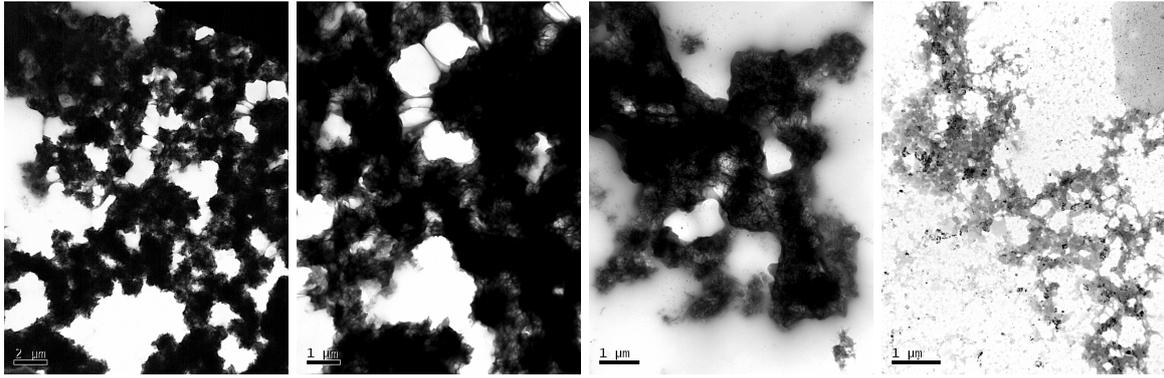


Figura 32: Muestra 2. ELRs + Sales + agitación. Precipitado

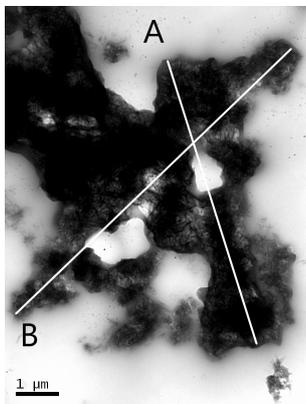


Figura 33: La distancia A mide $6,96 \mu\text{m}$ y la B mide $9,16 \mu\text{m}$.

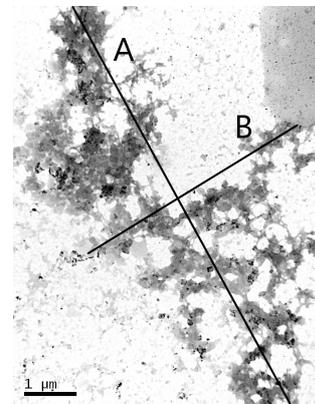


Figura 34: La distancia A mide $8,95 \mu\text{m}$ y la B mide $4,70 \mu\text{m}$.

Se aprecian estructuras semejantes a las anteriores pero con la red más definida, donde los núcleos están más ordenados y unidos por las fibras de unión pero dejando espacios, lo que implica mayor complejidad de las conexiones con un orden más específico.

Por otro lado, ninguna imagen obtenida muestra una estructura al completo, en oposición a lo que ocurría en el sobrenadante, lo que da lugar a pensar que son de grandes dimensiones (en la escala nanométrica). Este mayor tamaño será la razón de que esten en el precipitado, debido a un mayor peso molecular. Si se analiza la segunda imagen de la figura 32 es una ampliación de la anterior que posee una escala de $2 \mu\text{m}$, por lo que mide $16,70 \times 22,20 \mu\text{m}$ y aún así se nota que es parte de una conformación aún más grande. Todo ello nos dice que son estructuras de tamaños a los esperados si tenemos en cuenta las dimensiones de la HA: $1-7 \times 15-200 \times 10-80 \mu\text{m}$.

Hay que recordar que la formación de cristales debe ser heterogénea y no tienen por que tener grandes dimensiones, perdería ductibilidad y se haría más frágil disminuyendo las propiedades mecánicas de la estructura total. Por ello se pueden considerar las dimensiones obtenidas como favorables.

5. CONCLUSIONES

La capacidad de los ELRs para autoensamblarse en complejas nanoestructuras supramoleculares ordenadas los convierte en una alternativa muy interesante en el campo de la investigación biomédica ya que, además, presentan bicompatibilidad y rentabilidad y adquieren funcionalidades específicas.

En este trabajo se ha presentado el estudio de la influencia que ejerce la presencia de dos ELRs con diferente carga total en disolución en la mineralización del fosfato de calcio. Para lo que, previamente, han sido estudiadas las estructuras que conforman entre ellos.

Mediante la prueba de identificación electroforesis SDS-Page se realizó una estimación del peso molecular que coincidía con lo esperado teóricamente en ambos casos a la vez que se aseguró la pureza de las muestras y, con el FTIR, se pudo confirmar la naturaleza proteica de las mismas.

Seguidamente se comprobó el comportamiento de los ELRs cuando se mezclan según diferentes proporciones de carga. Con ayuda del DLS se obtuvo información del tamaño de las conformaciones surgidas, que aumentaba cuando más se asemejaban el número de cargas positivas y negativas pese a que la mayor homogeneidad de tamaños surge cuando la presencia de cargas negativas es mayor. Por otro lado con el análisis DSC se llegó a la conclusión de que la temperatura de transición más baja correspondía a la relación 1:1 de cargas. Estos resultados son consecuencia de la interacción entre las cargas avalando la hipótesis inicial de que, ante diferentes proporciones de las mismas, las estructuras surgidas del ensamblaje varían.

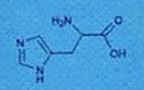
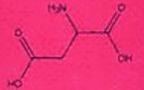
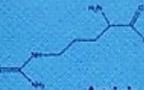
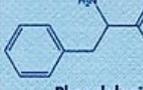
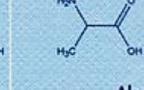
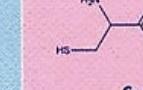
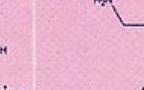
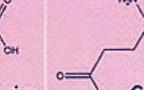
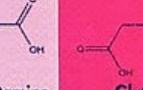
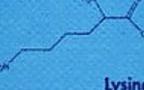
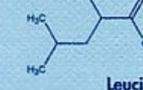
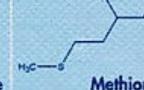
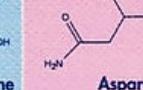
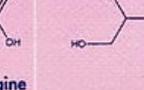
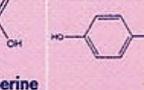
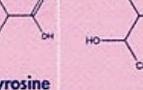
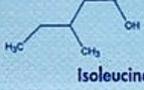
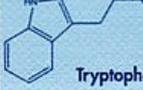
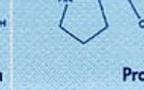
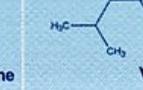
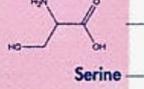
Finalmente, se realizó la mineralización en presencia de ambos ELRs y se analizaron los productos mediante la microscopía TEM. Se observaron estructuras con un núcleo denso del que emergen fibrillas como las imágenes de la bibliografía y similar a imágenes de HA ya mineralizada. En las imágenes, también se observa que estas estructuras nucleadas de menor tamaño se organizan dando lugar a una red de grandes dimensiones. Siendo especialmente interesantes las encontradas en el precipitado por su similitud al objetivo que se intenta imitar, donde se observa una mineralización más compleja resultado de una mayor evolución.

En conclusión, los resultados obtenidos revelan que la proporción de cada polímero en la mezcla es de gran relevancia tanto para la T_t a la que comienzan a organizarse como en el tamaño de las estructuras en las que lo hacen. Por otro lado, la mezcla de polímeros ensamblada en comparación a un ELR en solitario forma nanopartículas más definidas cuya unión, a su vez, da lugar a redes de un tamaño mucho mayor con una organización muy definida que puede suponer un mayor control de la síntesis de los cristales en el futuro.

Con estos resultados se sugiere realizar la mineralización en presencia de otras proporciones de polímeros para intentar encontrar un equilibrio entre su interacción y la de sus conformaciones con los iones, además, siguiendo en esta línea, otra opción es llevar a cabo la reacción en un medio que simule al que se puede encontrar en el cuerpo humano para estudiar posibles aplicaciones a tratamientos. En otro camino, sería interesante probar otros ELRs diferentes al K_48I_60 para estudiar, si al unirse con el $(SN_A15)_3E_{50}I_{60}$, surgen otro tipo de ensamblajes que permitan un mayor control sobre la organización de la cristalización.

6. ANEXOS

Anexo A: Aminoácidos

Periodic Chart of Amino Acids									
H 155.16 137.14 $C_6H_9N_7O_2$  Histidine									D 133.10 115.09 $C_4H_7NO_4$  Aspartic Acid
R 174.20 156.19 $C_6H_{14}N_4O_2$  Arginine	F 165.19 147.18 $C_9H_{11}NO_2$  Phenylalanine	A 89.09 71.08 $C_3H_7NO_2$  Alanine	C 121.16 103.14 $C_3H_7NO_2S$  Cysteine	G 75.07 57.05 $C_2H_5NO_2$  Glycine	Q 146.15 128.13 $C_5H_9N_2O_3$  Glutamine	E 147.13 129.11 $C_5H_9NO_4$  Glutamic Acid			
K 146.19 128.17 $C_6H_{14}N_2O_2$  Lysine	L 131.17 113.16 $C_6H_{13}NO_2$  Leucine	M 149.21 131.20 $C_3H_7NO_2S$  Methionine	N 132.12 114.10 $C_4H_8N_2O_3$  Asparagine	S 105.09 87.08 $C_3H_7NO_3$  Serine	Y 181.19 163.17 $C_9H_9NO_3$  Tyrosine	T 119.12 101.10 $C_4H_9NO_3$  Threonine			
I 131.18 113.16 $C_6H_{13}NO_2$  Isoleucine	W 204.23 186.21 $C_{11}H_{12}N_2O_2$  Tryptophan	P 115.13 97.12 $C_5H_9NO_2$  Proline	V 117.15 99.13 $C_5H_{11}NO_2$  Valine	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <ul style="list-style-type: none"> ■ Basic ■ Acidic Nonpolar (hydrophobic) Polar, uncharged </div> <div> <p>1-Letter Amino Acid Code: S</p> <p>Molecular Weight: 105.09</p> <p>MW\pmH$_2$O: 87.08</p> <p>Molecular Formula: $C_3H_7NO_3$</p> </div> <div> <p>3-Letter Amino Acid Code: Ser</p> <p>Chemical Structure: </p> <p>Chemical Name: Serine</p> </div> </div>					

© Copyright 2003 by Bochem AG, Switzerland. Reproduction forbidden without permission.

Figura 35: Tabla de aminoácidos con información sobre su peso molecular, polaridad y carácter de pH.

Anexo B: Estructura de la hidroxiapatita

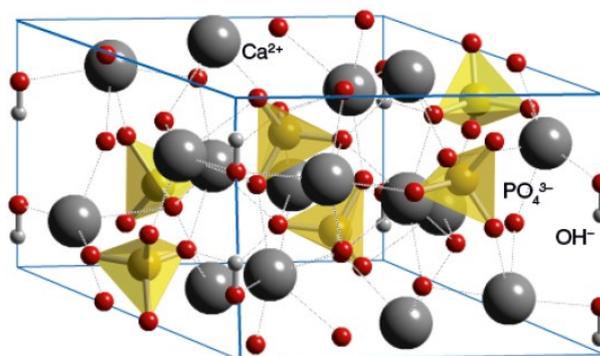


Figura 36: Estructura hidroxiapatita

Anexo C: Estructura proteínas

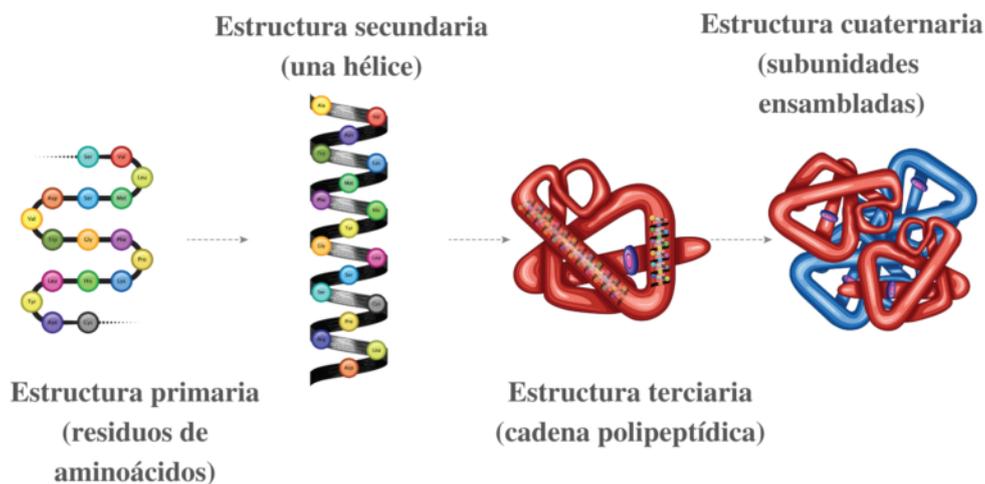


Figura 37: Estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas

Anexo D: Serie Hofmeister

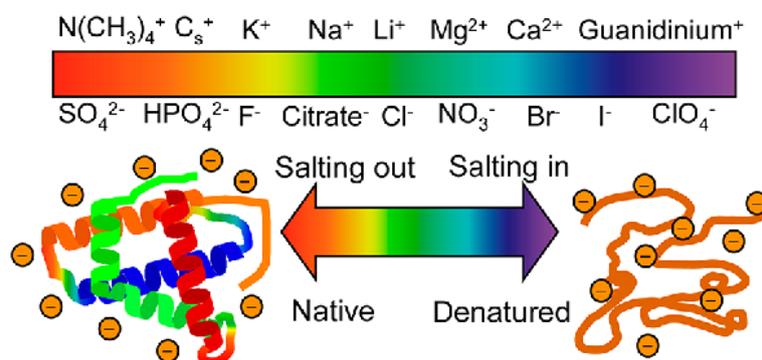


Figura 38: Serie Hofmeister, representación de la influencia de algunos iones en disolución en la conformación de estructuras por parte de los ELRs.

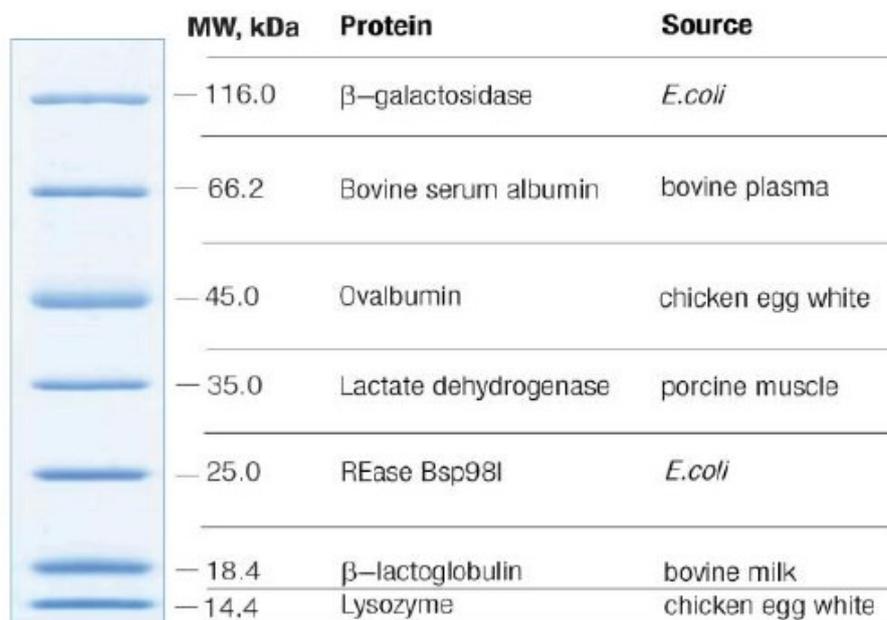
Anexo E: Cantidades de muestra y marker en la electroforesis SDS-Page

	muestra	marker
10 pocillos	5	4
15 pocillos	4	2,4

Tabla 3: Cantidades necesarias, en μl , de disolución de ELR o marker en la electroforesis según el número de pocillos

Anexo F: Guía del marker de la electroforesis

Unstained Protein Molecular Weight Marker



8-16% Tris-glycine SDS-PAGE

Figura 39: Pesos moleculares del marker #26610 de Thermo Fisher [95]

Anexo G: Cantidades para el protocolo de electroforesis SDS-Page en el laboratorio BIOFORGE

	ONE GEL	RESOLVING GEL				STACKIN GEL
		7.5%	10%	12%	15%	4%
1	MQ	4.10 ml	3.63 ml	3.25 ml	2.69 ml	1.585 ml
2	Tris 1.5M pH 8.8	1.88 ml	1.88 ml	1.88 ml	1.88 ml	-
	Tris 0.5 pH 6.8	-	-	-	-	625 ul
3	Acrylamide 40%	1.4 ml	1.875 ml	2.25 ml	2.81 ml	250 ul
4	SDS 10%	75 ul	75 ul	75 ul	75 ul	18.75 ul
5	Persulfate 10%	37.5 ul	37.5 ul	37.5 ul	37.5 ul	18.75 ul
6	TEMED	3.75 ul	3.75 ul	3.75 ul	3.75 ul	2.35 ul

Figura 40: Componentes y sus cantidades para la realización del gel de poliacrilamida para la Electroforesis SDS-PAGE (Datos obtenidos del laboratorio BIOFORGE)

Anexo H: Tabla de longitudes de onda FTIR

Moléculas	Número de onda (cm^{-1})	Tipo de enlace	Tipo de vibración
Proteínas	3300	N-H (Amida A)	Tensión del enlace
	3100-3030	N-H (Amida B)	Tensión del enlace
	1660	C-O (Amida I)	Tensión del enlace
		C-N	Tensión del enlace
		N-H	Flexión del enlace
	1630	C=O (Amida I)	Tensión del enlace
	1545	N-H (Amida II)	Flexión del enlace
		C-N	Tensión del enlace
	1315	C-H	Vibraciones del esqueleto proteico
	1300-1230	Amida III	Mezcla compleja de desplazamientos
1140	C-N	Tensión del enlace	
Lípidos	2960	CH_a Asimétrico	Tensión asimétrica del enlace
	2930	CH_2 Asimétrico	Tensión asimétrica del enlace
	2870	CH_2 Simétrico	Tensión asimétrica del enlace
	2850	CH_2 Simétrico	Tensión simétrica del enlace
	1750-1720	C=O	Tensión del enlace
	1460	CH_a Asimétrico	Flexión asimétrica del enlace
	1440	CH_2 Simétrico	Flexión simétrica del enlace
	1380	CH_2 Simétrico	Flexión simétrica del enlace
	1170	COC	Flexión asimétrica del enlace
	1060	C=O	Tensión del enlace
1035	C-H	Tensión del enlace	
Ácidos nucleicos	1240	P=O Asimétrico	Tensión asimétrica del enlace
	1080	P=O Simétrico	Tensión simétrica del enlace
Carbohidratos	1170	COC	Flexión asimétrica del enlace
	1155	C-O	Tensión y flexión del enlace

Tabla 4: Valores de bandas de absorción de IR y movimientos vibracionales que las provocan en los enlaces moleculares de mayor interés biológicos [74]

Anexo I: Gráfica agrupación de datos FTIR

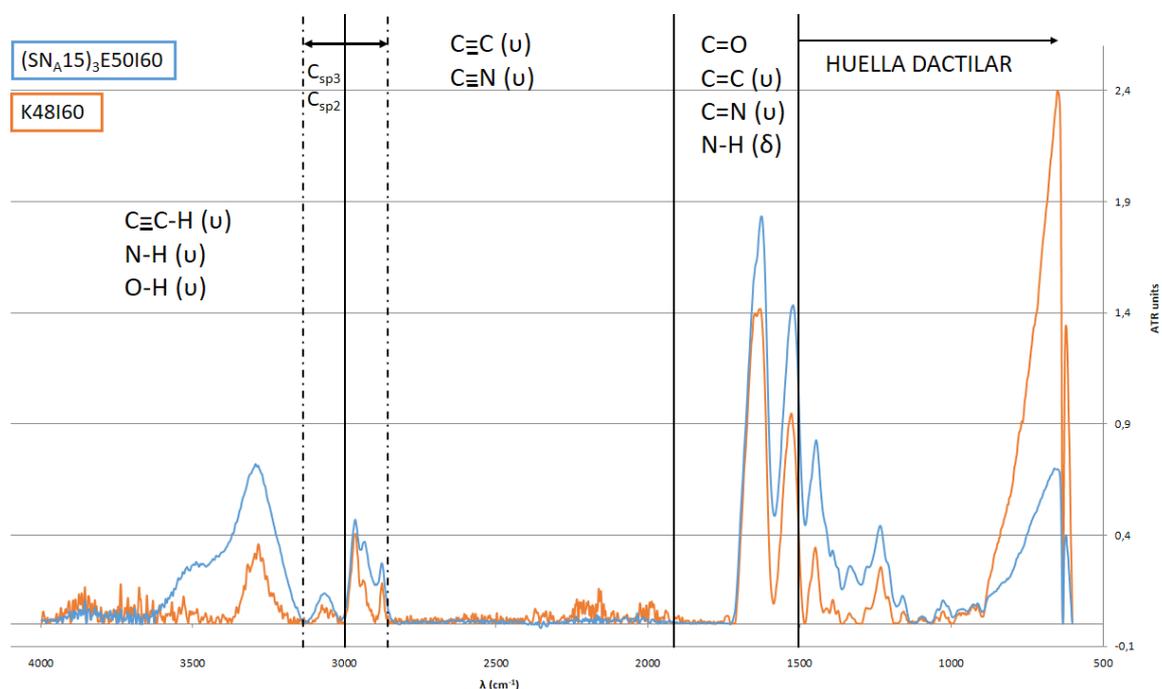


Figura 41: Gráfica comparativa de los resultados del FTIR de ambos polímeros. Guía de color: $(\text{SN}_{A15})_3\text{E}_{50}\text{I}_{60}$ en azul y $\text{K}_{48}\text{I}_{60}$ en naranja.

Anexo J: Datos Z-average obtenidos con DLS

Relación $(\text{SN}_{A15})_3\text{E}_{50}\text{I}_{60}:\text{K}_{48}\text{I}_{60}$	1:0	1:0,25	1:0,5	1:0,75	1:1	0,75:1	0,5:1	0,25:1	0:1
Z-Ave1 (nm)	152,5	207,7	225,7	467,0	851,5	629,4	111,8	87,8	191,4
Z-Ave2 (nm)	152,7	209,0	222,6	460,2	845,8	616,2	111,5	86,2	201,5
Z-Ave3 (nm)	152,0	206,9	228,2	465,1	868,3	615,5	111,3	87,4	202,4
MEDIAS	152,4	207,9	225,5	464,1	855,2	620,4	111,5	87,1	198,4
DESVIACIÓN	0,3	0,8	2,0	2,5	8,3	5,5	0,2	0,6	4,3

Tabla 5: Datos Z-average obtenidos con DLS de las diferentes mezclas de polímeros

Anexo K: Datos DSC utilizados en las gráficas de las T_t obtenidas

Relación (SN_A15) ₃ E ₅₀ I ₆₀ :K ₄₈ I ₆₀	1:0	1:0,25	1:0,5	1:0,75	1:1	0,75:1	0,5:1	0,25:1	0:1
T_t1 (°C)	17,57	17,04	17,07	16,68	16,57	16,57	16,37	16,47	18,90
T_t2 (°C)	17,32	16,47	16,40	16,64	16,43	16,84	16,84	17,10	18,70
T_t3 (°C)	17,56	16,97	16,67	16,50	16,40	16,40	16,50	16,57	18,94
MEDIAS	17,48	16,83	16,71	16,61	16,47	16,60	16,57	16,71	18,85
DESVIACIÓN	0,10	0,22	0,24	0,07	0,06	0,16	0,17	0,24	0,09

Tabla 6: Datos Temperatura de Transición (T_t) principales obtenidas con DSC de las diferentes mezclas de polímeros

Relación (SN_A15) ₃ E ₅₀ I ₆₀ :K ₄₈ I ₆₀	1:0	1:0,25	1:0,5	1:0,75	1:1	0,75:1	0,5:1	0,25:1	0:1
T1 (°C)	-	-	19,24	19,88	20,31	20,71	-	-	-
T2 (°C)	-	-	19,07	20,04	20,04	21,74	-	-	-
T3 (°C)	-	-	19,87	20,67	18,97	22,84	-	-	-
MEDIAS	-	-	19,39	20,20	19,77	22,84	-	-	-
DESVIACIÓN	-	-	0,30	0,30	0,50	0,75	-	-	-

Tabla 7: Datos Temperatura de Transición (T_t) secundarias obtenidas con DSC de las diferentes mezclas de polímeros

Anexo L: Datos DSC utilizados en las gráficas de las entalpía (H) obtenidas

Relación (SN_A15) ₃ E ₅₀ I ₆₀ :K ₄₈ I ₆₀	1:0	1:0,25	1:0,5	1:0,75	1:1	0,75:1	0,5:1	0,25:1	0:1
H1 (J/g)	-3,50	-9,06	-8,40	-12,62	-7,29	-7,93	-10,13	-9,34	-7,87
H2 (J/g)	-3,69	-8,31	-10,26	-	-9,01	-8,66	-8,71	-8,90	-7,13
H3 (J/g)	-3,49	-7,57	-7,36	-10,66	-9,31	-8,80	-9,09	-10,39	-7,65
MEDIAS	-3,56	-8,31	-8,67	-11,64	-8,54	-8,46	-9,31	-9,54	-7,55
DESVIACIÓN	0,08	0,53	1,04	1,39	0,77	0,33	0,52	0,54	0,27

Tabla 8: Datos Entalpía (H) obtenidas con DSC de las diferentes mezclas de polímeros

7. BIBLIOGRAFÍA

Referencias

- [1] CDC - Publicaciones de NIOSH - Prácticas de seguridad para el uso de la nanotecnología en el lugar de trabajo (2008-112). URL: https://www.cdc.gov/spanish/NIOSH/docs/2008-112_sp/.
- [2] La historia de los nanomateriales y la nanotecnología - European Observatory for Nanomaterials. URL: <https://euon.echa.europa.eu/es/history-of-nanomaterials-and-nanotechnology>.
- [3] Fiona Macarena Britto y Guillermo Raúl Castro. Nanotecnología, hacia un nuevo portal científico-tecnológico. Vol. año 11, no. 3.
- [4] N K Tolochko. HISTORY OF NANOTECHNOLOGY.
- [5] Bogdan C. Simionescu y Daniela Ivanov. Natural and synthetic polymers for designing composite materials. Springer International Publishing, págs. 233-286. ISBN: 9783319124605. DOI: 10.1007/978-3-319-12460-5_11/TABLES/1.
- [6] Wanpeng Cao y Larry L. Hench. "Bioactive materials". En: *Ceramics International* 22 (6 ene. de 1996), págs. 493-507. ISSN: 0272-8842. DOI: 10.1016/0272-8842(95)00126-3.
- [7] Amit Bandyopadhyay y Susmita Bose. "Characterization of Biomaterials". En: *Characterization of Biomaterials* (ene. de 2013), págs. 1-437. DOI: 10.1016/C2011-0-04481-2.
- [8] *Generación de biomateriales*. URL: <http://biomaterialesucm.blogspot.com/2017/05/generaciones.html>.
- [9] H. Reyes-Blas et al. "Uso de Biomateriales Funcionalizados con Moléculas Bioactivas en la Ingeniería Biomédica". En: *Revista mexicana de ingeniería biomédica* 40 (3), págs. 1-20. ISSN: 0188-9532. DOI: 10.17488/RMIB.40.3.9.
- [10] H. C. López. Biomateriales: calidad de vida H. C. López Biomateriales: calidad de vida.
- [11] Patitapabana Parida, Ajit Behera y Subash Chandra Mishra. "Classification of Biomaterials used in Medicine". En: *International Journal of Advances in Applied Sciences (IJAAS)* 1 (3 2012), págs. 31-35. ISSN: 2252-8814.
- [12] "Chapter 1 - Introduction to Biomaterials". En: *Characterization of Biomaterials*. Ed. por A. Bandyopadhyay y S. Bose. Oxford: Academic Press, 2013, págs. 1-9. ISBN: 978-0-12-415800-9. DOI: 10.1016/B978-0-12-415800-9.00001-2.
- [13] *polímero* / Definición / Diccionario de la lengua española / RAE - ASALE. URL: <https://dle.rae.es/pol%C3%ADmero>.
- [14] A. Marcilla M. Beltrán. TEMA 1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS POLÍMEROS. URL: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/16883/1/Tema_1._Estructura_y_propiedades_de_los_polimeros.pdf.
- [15] Jang Kyoung Kim et al. "Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery". En: *Archives of Pharmacal Research* 37 (1), págs. 60-68. ISSN: 02536269. DOI: 10.1007/S12272-013-0280-6/FIGURES/1.

- [16] John W. Nicholson. *Polímeros: origen, tipos, usos, ejemplos y características*. 2006. URL: <https://humanidades.com/polimeros/>.
- [17] *Péptido*. URL: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Peptido>.
- [18] Julia Will, Rainer Detsch y Aldo R. Boccaccini. Structural and Biological Characterization of Scaffolds. Elsevier Inc., págs. 299-310. ISBN: 9780124158009. DOI: 10.1016/B978-0-12-415800-9.00008-5.
- [19] Manuel Fernando Valero-Valdivieso, Yamileth Ortegón y Yomaira Uscategui. “BIO-POLÍMEROS: AVANCES Y PERSPECTIVAS BIOPOLYMERS: PROGRESS AND PROSPECTS”. En: 80 (2013), págs. 171-180. ISSN: 0012-7353.
- [20] Trudy McKee y James R. McKee. “Aminoácidos, péptidos y proteínas”. En: *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida, 7e*. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2020. URL: accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1177256228.
- [21] *10.1: Polimerización - Hacer Grandes con los Pequeños - LibreTexts Español*. URL: [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Introductoria%2C_Conceptual_y_GOB/Qu%C3%ADmica_para_Tiempos_Cambiantes_\(Hill_y_McCreary\)/10%3A_Pol%C3%ADmeros/10.01%3A_Polimerizaci%C3%B3n_-_Hacer_Grandes_con_los_Peque%C3%B1os](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Introductoria%2C_Conceptual_y_GOB/Qu%C3%ADmica_para_Tiempos_Cambiantes_(Hill_y_McCreary)/10%3A_Pol%C3%ADmeros/10.01%3A_Polimerizaci%C3%B3n_-_Hacer_Grandes_con_los_Peque%C3%B1os).
- [22] Arthur L. Weber y Stanley L. Miller. “Reasons for the occurrence of the twenty coded protein amino acids”. En: *Journal of molecular evolution* 17 (5), págs. 273-284. ISSN: 0022-2844. DOI: 10.1007/BF01795749.
- [23] Yi Lu y Stephen Freeland. “On the evolution of the standard amino-acid alphabet”. En: *Genome Biology* 7 (1), págs. 1-6. ISSN: 1474760X. DOI: 10.1186/GB-2006-7-1-102/FIGURES/1.
- [24] David L Nelson y Michael M Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th Edition.
- [25] Fernando Pérez Yágüez y Francisco Javier Arias Vallejo Valladolid. Producción y caracterización de nuevos polímeros derivados de la elastina para ingeniería cardiovascular.
- [26] J. Carlos Rodríguez-Cabello, I. González de Torre y G. Pinedo. Elastin-like Hydrogels and Self-assembled Nanostructures for Drug Delivery. The Royal Society of Chemistry, págs. 180-198. DOI: 10.1039/9781849734318-00180.
- [27] J. Carlos Rodriguez-Cabello et al. Elastin-Like Polymers: Properties, Synthesis, and Applications. John Wiley Sons, Ltd, págs. 1-36. DOI: 10.1002/0471440264.PST656.
- [28] Stefan Roberts, Michael Dzuricky y Ashutosh Chilkoti. “Elastin-like polypeptides as models of intrinsically disordered proteins”. En: *FEBS letters* 589 (19 Pt A), págs. 2477-2486. ISSN: 1873-3468. DOI: 10.1016/J.FEBSLET.2015.08.029.
- [29] Li Tan et al. “Changes in cell wall properties coincide with overexpression of extensin fusion proteins in suspension cultured tobacco cells”. En: *PloS one* 9 (12). ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0115906.
- [30] William R. Gray, Lawrence B. Sandberg y Judith A. Foster. “Molecular Model for Elastin Structure and Function”. En: *Nature* 1973 246:5434 246 (5434), págs. 461-466. ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/246461a0.

- [31] A. Fernández-Colino et al. “Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas”. En: *Biomecánica* 19 (1 dic. de 2011), págs. 8-16. DOI: 10.5821/SIBB.V19I1.1811.
- [32] F. Javier Arias et al. “Tailored recombinant elastin-like polymers for advanced biomedical and nano(bio)technological applications”. En: *Biotechnology Letters* 28 (10), págs. 687-695. ISSN: 01415492. DOI: 10.1007/S10529-006-9045-3/METRICS.
- [33] J. Carlos Rodríguez-Cabello et al. ““Recombinamers” as advanced materials for the post-oil age”. En: *Polymer* 50 (22 oct. de 2009), págs. 5159-5169. ISSN: 0032-3861. DOI: 10.1016/J.POLYMER.2009.08.032.
- [34] Nan K Li et al. Molecular Description of the LCST Behavior of an Elastin-Like Polypeptide. DOI: 10.1021/bm500658w.
- [35] Javier Reguera Gómez. Estudio de la transición inversa con la temperatura en polímeros tipo elastina con creciente funcionalidad. DOI: 10.35376/10324/139.
- [36] Jose C. Rodríguez-Cabello et al. “Elastin-like proteins: Molecular design for self-assembling”. En: *Self-Assembling Biomaterials: Molecular Design, Characterization and Application in Biology and Medicine* (ene. de 2018), págs. 49-78. DOI: 10.1016/B978-0-08-102015-9.00004-6.
- [37] C. M. Bellingham et al. “Self-aggregation characteristics of recombinantly expressed human elastin polypeptides”. En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1550 (1 nov. de 2001), págs. 6-19. ISSN: 0167-4838. DOI: 10.1016/S0167-4838(01)00262-X.
- [38] Artur Ribeiro et al. “Influence of the Amino-Acid Sequence on the Inverse Temperature Transition of Elastin-Like Polymers”. En: *Biophysical Journal* 97 (1 jul. de 2009), págs. 312-320. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1016/J.BPJ.2009.03.030.
- [39] Ming Miao et al. “Sequence and Structure Determinants for the Self-aggregation of Recombinant Polypeptides Modeled after Human Elastin”. En: *Journal of Biological Chemistry* 278 (49 dic. de 2003), págs. 48553-48562. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/JBC.M308465200.
- [40] Younhee Cho et al. “Effects of Hofmeister anions on the phase transition temperature of elastin-like polypeptides”. En: *Journal of Physical Chemistry B* 112 (44), págs. 13765-13771. ISSN: 15206106. DOI: 10.1021/JP8062977/SUPPL_FILE/JP8062977_SI_001.PDF.
- [41] J Carlos Rodríguez-Cabello et al. “Differential Scanning Calorimetry Study of the Hydrophobic Hydration of the Elastin-Based Polypentapeptide, Poly(VPGVG), from Deficiency to Excess of Water”. En: *Inc. Biopoly* 54 (), págs. 282-288. DOI: 10.1002/1097-0282(20001005)54:4<282::AID-BIP50>3.0.CO;2-F.
- [42] Danilo Roccatano et al. “Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study”. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19 sep. de 2002), págs. 12179-12184. ISSN: 00278424. DOI: 10.1073/PNAS.182199699.
- [43] D. W. Urry et al. “Mechanochemical coupling in synthetic polypeptides by modulation of an inverse temperature transition.” En: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (10), págs. 3407-3411. ISSN: 00278424. DOI: 10.1073/PNAS.85.10.3407.

- [44] *Vista de TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE*. URL: <https://revistas.ujat.mx/index.php/kuxulkab/article/view/2627/2062>.
- [45] Sergio Acosta Rodríguez, José Carlos y Rodríguez Cabello. Synthesis and characterization of amphiphilic elastin-like recombinamers: development of self-assembling nanoparticles and hydrogels.
- [46] An Wu Xu, Yurong Ma y Helmut Cölfen. "Biomimetic mineralization". En: *Journal of Materials Chemistry* 17 (5 ene. de 2007), págs. 415-449. ISSN: 13645501. DOI: 10.1039/B611918M. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2007/jm/b611918m>.
- [47] Yuping Li, J. Carlos Rodríguez-Cabello y C. Aparicio. Intrafibrillar Mineralization of Self-Assembled Elastin-Like Recombinamer Fibrils. DOI: 10.1021/acsami.6b15285.
- [48] Rony Sapir-Koren y Gregory Livshits. "Bone mineralization and regulation of phosphate homeostasis". En: *IBMS BoneKEy* 8 (6 jun. de 2011), págs. 286-300. DOI: 10.1138/20110516.
- [49] Adele Boskey. "Bone mineral crystal size." En: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 14 Suppl 5 (5), págs. 16-21. ISSN: 14332965. DOI: 10.1007/S00198-003-1468-2/TABLES/2.
- [50] Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al. "Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo". En: *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)* 11 (1), págs. 47-51. ISSN: 1698-6946.
- [51] P. R. Wheater, H. G. Burkitt y V. G. Daniels. "Functional histology. A text and colour atlas." En: *Functional histology. A text and colour atlas*. (1979).
- [52] Eckhard Schönau y F. Rauch. "Markers of bone and collagen metabolism-problems and perspectives in paediatrics". En: *Hormone research* 48 Suppl 5 (5), págs. 50-59. ISSN: 0301-0163. DOI: 10.1159/000191329.
- [53] Julia Mahamid et al. "Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study". En: *Journal of Structural Biology* 174 (3 jun. de 2011), págs. 527-535. ISSN: 10478477. DOI: 10.1016/J.JSB.2011.03.014.
- [54] Julia Mahamid et al. "Mapping amorphous calcium phosphate transformation into crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays". En: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (14), pág. 6316. ISSN: 00278424. DOI: 10.1073/PNAS.0914218107.
- [55] Monzur Murshed. "Mechanism of Bone Mineralization". En: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8 (12). ISSN: 21571422. DOI: 10.1101/CSHPERSPECT.A031229.
- [56] Y. Bala, D. Farlay y G. Boivin. "Bone mineralization: from tissue to crystal in normal and pathological contexts". En: *Osteoporosis International* 24:8 24 (8), págs. 2153-2166. ISSN: 1433-2965. DOI: 10.1007/S00198-012-2228-Y.
- [57] G. Boivin, C. Bernard y University Lyon. The hydroxyapatite crystal: A closer look Osteoporosis and osteodystrophia View project Ultrastructural determinants of biomechanical properties of bone View project. URL: <https://www.researchgate.net/publication/284904111>.

- [58] P. Fratzl et al. "Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone". En: *Journal of Materials Chemistry* 14 (14), págs. 2115-2123. ISSN: 1364-5501. DOI: 10.1039/B402005G.
- [59] Peter Fratzl et al. "Nucleation and growth of mineral crystals in bone studied by small-angle X-ray scattering". En: *Calcified tissue international* 48 (6), págs. 407-413. ISSN: 0171-967X. DOI: 10.1007/BF02556454.
- [60] John E Davies y J E Davies. "Understanding Peri-Implant Endosseous Healing Address for Correspondence". En: *Journal of Dental Education* 67 (8 2003).
- [61] M. Hamed Misbah. "Templated Hydroxyapatite Nucleation and Growth at Physiological Conditions onto Self-assembled Elastin-Like Nanoparticles." Tesis doct. Citeseer, 2013.
- [62] P. A. Raj et al. "Salivary statherin. Dependence on sequence, charge, hydrogen bonding potency, and helical conformation for adsorption to hydroxyapatite and inhibition of mineralization". En: *Journal of Biological Chemistry* 267 (9), págs. 5968-5976. ISSN: 00219258. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)42650-6.
- [63] M. Hamed Misbah et al. "Formation of calcium phosphate nanostructures under the influence of self-assembling hybrid elastin-like-statherin recombinamers". En: *RSC Advances* 6 (37), págs. 31225-31234. ISSN: 2046-2069. DOI: 10.1039/C6RA01100D.
- [64] Kenneth I. G. Reid y Roger Kust. Calcium Chloride. John Wiley Sons, Ltd. DOI: 10.1002/0471238961.0301120318050904.A01.
- [65] Lisa M. Vrana y Updated by Staff. "Calcium Chloride". En: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (abr. de 2014), págs. 1-13. DOI: 10.1002/0471238961.0301120318050904.A01..
- [66] Klaus Schrödter et al. Phosphoric Acid and Phosphates. John Wiley Sons, Ltd. DOI: 10.1002/14356007.A19_465.PUB3.
- [67] Joanne M. Manns. "SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins". En: *Current Protocols in Microbiology* 22 (1), A.3M.1-A.3M.13. ISSN: 1934-8533. DOI: 10.1002/9780471729259.MCA03MS22.
- [68] *Electroforesis*. URL: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis>.
- [69] *Marcadores de proteínas*. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/products/protein-biology/protein-electrophoresis-and-western-blotting/protein-markers>.
- [70] *Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida*. URL: <https://bioquibi.webs.ull.es/practicas/4.pdf>.
- [71] *Labs Equipment - BIOFORGE - GRUPO DE MATERIALES AVANZADOS Y NANOBOTECNOLOGÍA*. URL: <http://www.bioforge.uva.es/equipment/>.
- [72] Beatriz Martín Bote María Jesús Nicolás Ruiz y Beatriz López Ruiz. "Espectrometría de absorción en el infrarrojo por transformada de Fourier". En: *Reduca (Recursos Educativos)*. Serie Congresos Alumnos 4 (10 2012), pág. 53. ISSN: 1989-5003.
- [73] *La Mecánica Cuántica. La Espectroscopía Infrarroja*. URL: https://ocw.uma.es/pluginfile.php/1327/mod_resource/content/0/Tema3_04_doc.pdf.

- [74] Guillermo Barraza-Garza et al. La microscopia de infrarrojo con la transformada de Fourier (FTIR) en el estudio de sistemas biológicos.
- [75] Christian Matthäus et al. “Chapter 10 Infrared and Raman Microscopy in Cell Biology”. En: *Methods in Cell Biology* 89 (ene. de 2008), págs. 275-308. ISSN: 0091-679X. DOI: 10.1016/S0091-679X(08)00610-9.
- [76] J. R. González-Castillo. “Fabricación y Caracterización de Sistemas Nanoestructurados (Ag-Cu) y (Ag-Au) Para Aplicaciones Biológicas”. Tesis doct. Dic. de 2017.
- [77] *Determination of Secondary Structure in Proteins by FTIR Spectroscopy - JenaLib*. URL: http://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html#fourier.
- [78] *Vista de Identificación de polímeros por espectroscopía infrarroja*. URL: <https://journal.universidadean.edu.co/index.php/Revistao/article/view/2005/1776>.
- [79] Ernő Pretsch, Philippe Bühlmann y Martin Badertscher. “Structure determination of organic compounds: Tables of spectral data”. En: *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data* (2009), págs. 1-433. DOI: 10.1007/978-3-540-93810-1/COVER.
- [80] C. Schick. “Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers”. En: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009 395:6 395 (6), págs. 1589-1611. ISSN: 1618-2650. DOI: 10.1007/S00216-009-3169-Y.
- [81] Victoria Coello Ortiz y Cecilia Garces Barcia. “Análisis de propiedades térmicas durante gelatinización en tres variedades de arroz iniap aplicando el calorímetro diferencial de barrido (dsc)”. En: (nov. de 2015). URL: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/31046>.
- [82] *An Introduction to Dynamic Light Scattering (DLS) | Malvern Panalytical*.
- [83] *Dispersión de luz dinámica*. URL: <https://www.beckman.es/resources/technologies/dynamic-light-scatter>.
- [84] Richard P. Feynman. *The Feynman lectures on physics : Quantum mechanics*. Ed. por Robert B. Leighton y Matthew Sands. Addison-Wesley, 1969.
- [85] *LS Instruments | DLS Data Analysis: CUMULANT Method*. URL: <https://lsinstruments.ch/en/theory/dynamic-light-scattering-dls/dls-data-analysis-cumulant-method>.
- [86] *Dynamic Light Scattering (DLS) - Definition Terms | Malvern Panalytical*. URL: <https://www.malvernpanalytical.com/es/learn/knowledge-center/whitepapers/wp111214dlstermsdefined>.
- [87] “Z-Average Size Determined by DLS TN171 Explore the future”. En: (2021). URL: www.horiba.com/scientific.
- [88] *Microscopia electrónica de transmisión : Servicio de Microscopía Electrónica : UPV*. URL: <https://www.upv.es/entidades/SME/info/753329normalc.html>.
- [89] Parque científico UVa. *TEM reference*. https://www.parquecientificouva.es/Upload/SERVICIOS/UMA/TEM100_nuevo.pdf. 2011.
- [90] *Parque Científico UVa-Unidad de Microscopía*. URL: <https://www.parquecientificouva.es/servicios/unidad-de-microscopa>.

- [91] Rongqing Hui. "Photodetectors". En: *Introduction to Fiber-Optic Communications* (ene. de 2020), págs. 125-154. DOI: 10.1016/B978-0-12-805345-4.00004-4.
- [92] M. Lesser. "Charge coupled device (CCD) image sensors". En: *High Performance Silicon Imaging: Fundamentals and Applications of CMOS and CCD sensors* (ene. de 2014), págs. 78-97. DOI: 10.1533/9780857097521.1.78.
- [93] 6.3: *Espectro IR y bandas de absorción características - LibreTexts Español*. URL: [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Org%C3%A1nica/Qu%C3%ADmica_Org%C3%A1nica_I_\(Liu\)/06%3A_Identificaci%C3%B3n_Estructural_de_Compuestos_Org%C3%A1nicos_-_Espectroscopia_IR_y_RMN/6.03%3A_Espectro_IR_y_bandas_de_absorci%C3%B3n_caracter%C3%ADsticas](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Org%C3%A1nica/Qu%C3%ADmica_Org%C3%A1nica_I_(Liu)/06%3A_Identificaci%C3%B3n_Estructural_de_Compuestos_Org%C3%A1nicos_-_Espectroscopia_IR_y_RMN/6.03%3A_Espectro_IR_y_bandas_de_absorci%C3%B3n_caracter%C3%ADsticas).
- [94] Pedro Mondragón Cortez. "ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO PARA TODOS ...y 51 espectros de alimentos consumidos en México". En: ().
- [95] *Thermo Fisher Scientific*, "Pierce Unstained Protein Molecular Weight Marker". 2007. URL: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html>.