



Universidad de Valladolid

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química.

Análisis y Control de Calidad Químicos.

PREPARACIÓN DE HIDROGELES FOTOSENSIBLES VÍA QUÍMICA CLICK A PARTIR DE POLÍMEROS TIPO ELASTINA.

Autor/a: Ana Isabel Montero Toquero

Tutor/es/as: Mercedes Santos

Israel González de Torre

Año: 2023



ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	5
1. INTRODUCCIÓN.	6
1.1. ELR'S.	6
1.2. HIDROGELES.....	8
1.2.1. HIDROGELES POR REACCIÓN TIPO CLICK.	8
1.2.2. HIDROGELES FOTOSENSIBLES.....	9
1.3. PROPUESTA DE TRABAJO.....	10
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. MATERIALES.....	12
3.2. EQUIPAMIENTO.....	12
3.3. POLÍMEROS.....	13
3.4. TÉCNICAS INSTRUMENTALES.....	14
3.4.1. ELECTROFORESIS.	14
3.4.2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	14
3.4.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (FTIR).....	15
3.4.4. ESPECTROSCOPIA DE MASAS.....	16
3.4.5. REOLOGÍA.....	16
3.5. METODOLOGÍA.....	18
3.5.1. PRODUCCIÓN DE POLÍMEROS.....	18
3.5.2. CARACTERIZACIÓN.....	19
3.5.3. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE POLÍMEROS.....	19
3.5.4. DEGRADACIÓN POR LUZ DEL POLÍMERO.....	22
3.5.5. FORMACIÓN DE HIDROGELES.....	23
3.5.6. CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES.....	24
3.5.7. DEGRADACIÓN POR LUZ DE LOS HIDROGELES.....	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26



4.1. MODIFICACIÓN QUÍMICA DEL POLÍMERO VKV CON CICLOOCTINO.	26
4.2. MODIFICACIÓN DEL POLÍMERO RGD CON GRUPOS AZIDO.	28
4.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO RGD-N ₃	28
4.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO RGD-L ₃	29
4.2.3. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO RGD-N ₃ -L ₃	31
4.3. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DEL POLÍMERO AL IRRADIARLO CON LUZ UV....	33
4.4. FORMACIÓN DE HIDROGELES.	39
4.5. DEGRADACIÓN POR LUZ DE HIDROGELES.	40
4.6. MEDIDAS REOLOGICAS EN HIDROGELES.	43
4.7. SEM.	46
5. CONCLUSIONES.	48
6. BIBLIOGRAFÍA.	49
ANEXOS.	51

RESUMEN.

En este Trabajo de Fin de Máster se ha llevado a cabo un estudio sobre la preparación de hidrogeles fotosensibles basados en polímeros recombinantes tipo elastina (ELRs). Los hidrogeles químicos se entrecruzan vía química click, a partir de biopolímeros previamente modificados con grupos azida y grupos ciclooctino. Su fotosensibilidad proviene de la utilización de azidas unidas al biopolímero a través de un enlace lábil tipo NB-carbamato. Una vez obtenido dichos geles se han caracterizado y analizado su posterior degradación en presencia de luz ultravioleta. Este trabajo tiene una finalidad última de poder analizar el comportamiento celular en diferentes entornos y en función de un estímulo determinado.

El trabajo ha comenzado con la preparación del biopolímero modificado con grupos azido fotolábiles y la comprobación de su degradación en presencia de luz UV-Vis. Posteriormente se han preparado los biopolímeros modificados tanto con azidas lábiles como con azidas estables a la luz e, igualmente, se ha comprobado su degradación. Los polímeros modificados se caracterizaron por $^1\text{H-RMN}$, espectrometría de masas y FTIR.

Posteriormente se han preparado hidrogeles fotosensibles con uno de los biopolímeros modificados con azidas lábiles y un biopolímero portador de grupos ciclooctino. El entrecruzamiento del gel se produce por medio de la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen según metodología click. Se han estudiado las propiedades mecánicas y físicas de los hidrogeles preparados, así como su comportamiento ante la irradiación con luz UV-Vis. Se han llevado a cabo estudios de la degradación de dichos geles, observando su degradación total para los que poseen todos sus entrecruzamientos mediados por azidas fotolábiles y, sin embargo, se observa una degradación parcial de aquellos hidrogeles que, además de azidas fotolábiles, poseen azidas estables a la luz. En estos hidrogeles se analizan las propiedades mecánicas con distintos tiempos de irradiación y se observa la ruptura progresiva de los enlaces lábiles conducente a propiedades mecánicas elásticas menores a medida que el tiempo de irradiación aumenta.

En este trabajo, por tanto, se han preparado geles fotosensibles y se ha comprobado su degradación por acción de la luz. La variación de las propiedades mecánicas controlada por los tiempos de irradiación pone las bases de estudios posteriores del comportamiento celular bajo entornos con propiedades mecánicas diferentes de utilidad en Biomedicina.

ABSTRACT.

In this Master Thesis, a study has been carried out on the preparation of photosensitive hydrogels based on elastin-like recombinant polymers (ELRs). The chemical hydrogels are crosslinked via click chemistry, from biopolymers previously modified with azide and cyclooctyne groups. Their photosensitivity comes from the use of azides attached to the biopolymer through a labile NB-carbamate bond. Once these gels have been obtained, their subsequent degradation in the presence of ultraviolet light has been characterized and analyzed. The ultimate aim of this work is to be able to analyze cell behavior in different environments and in function of a given stimulus.

The work has started with the preparation of the biopolymer modified with photolabile azide groups and the verification of its degradation in the presence of UV-Vis light. Subsequently, the biopolymers modified with both labile azides and light stable azides were prepared and their degradation was also tested. The modified polymers were characterized by $^1\text{H-NMR}$, mass spectrometry and FTIR.

Subsequently, photosensitive hydrogels have been prepared with one of the labile azide modified biopolymers and a biopolymer carrying cyclooctene groups. The crosslinking of the gel is produced by 1,3-dipolar Huisgen cycloaddition according to click methodology. The mechanical and physical properties of the prepared hydrogels have been studied, as well as their behavior under UV-Vis light irradiation. Degradation studies of these gels have been carried out, observing their total degradation for those that have all their crosslinks mediated by photolabile azides and, however, a partial degradation is observed for those hydrogels that, in addition to photolabile azides, have light-stable azides. In these hydrogels the mechanical properties are analyzed with different irradiation times and the progressive breakdown of the labile bonds leading to lower elastic mechanical properties is observed as the irradiation time increases.

In this work, therefore, photosensitive gels have been prepared and their degradation under the action of light has been tested. The variation of mechanical properties controlled by irradiation times lays the foundation for further studies of cell behavior under environments with different mechanical properties useful in biomedicine.



LISTADO DE ABREVIATURAS.

DMSO	Dimetilsulfóxido.
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado.
ECM	Matriz extracelular.
ELP	Polímeros tipo elastina (Elastin Like Polymers).
ELR	Recombinameros tipo elastina (Elastin Like Recombinamers).
Tt	Temperatura de transición.
ITT	Transición Inversa con la Temperatura (Inverse Temperature Transition)
NB	Grupos nitrobencilo.
¹H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón.
FTIR	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier.
MALDI-TOF	Espectrometría de masas con ionización asistida por láser y analizador de tiempo de vuelo.
VKV-CC	Polímero VKVx24 modificado con grupos ciclooctinilo.
RGD-N₃	Polímero RGD modificado con la azida convencional: 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato.
RGD-L₃	Polímero RGD modificado con la azida fotolábil: PC-azido-PEG-3-NHS carbonatoester.
RGD-N₃-L₃	Polímero RGD modificado con la azida convencional y la azida con enlace fotolábil.
DMF	Dimetilformamida.
mL	Mililitros.
mg	Miligramos.
μL	Microlitros.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. ELR'S.

La matriz extracelular (ECM) es el microambiente que rodea las células y que además sirve como soporte físico y proporciona la mayoría de las propiedades mecánicas de los tejidos. Está formada por diferentes moléculas secretadas por la célula y es parte de los tejidos y órganos. La matriz extracelular se compone de forma general por agua, polisacáridos y proteínas, aunque cada tejido presenta componentes específicos de esta matriz.

Una de las proteínas más abundantes en la matriz extracelular es la elastina, cuya principal función es proporcionar elasticidad a los tejidos [1]. Además, tiene también un papel importante en la modulación del comportamiento celular y la promoción para la reparación de tejidos.

La estructura primaria de aminoácidos de la elastina se compone por secuencias repetitivas como VPGG, VPGVG, APGVG y VGVAPG denominados *dominios elastoméricos*, cuya estructura les permite sufrir deformaciones sin romperse y volver a su conformación original una vez desaparece la tensión. Por otro lado existe una zona gobernada por la secuencia VPGKG llamada *dominio de entrecruzamiento*, donde tienen lugar las uniones intermoleculares covalentes catalizadas por enzimas. Como resultado, esta combinación da lugar a fibras elásticas capaces de sufrir millones de ciclos de relajación y estiramiento sin sufrir daños [2] (ANEXO 1 para código de los diferentes aminoácidos).

Estas propiedades de la elastina natural han dado lugar al desarrollo de polímeros tipo elastina (ELPs) cuya composición está inspirada en el motivo $(VPGXG)_n$ repetido en la elastina natural, donde X es cualquier aminoácido excepto la L-prolina y n el número de repeticiones de la secuencia [3].

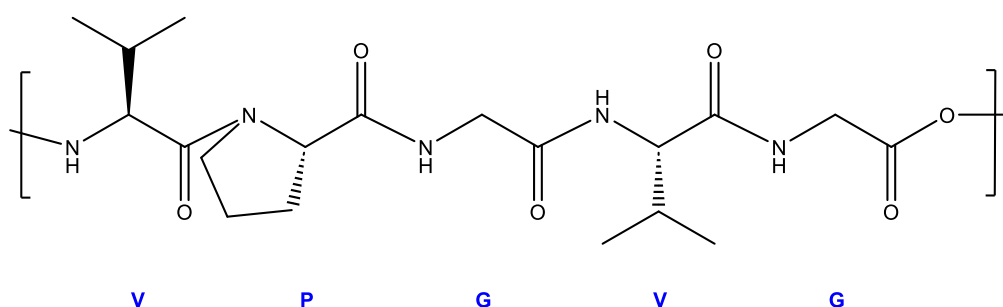


Figura 1. Secuencia repetitiva de aminoácidos presentes en la elastina natural y característica de los biopolímeros tipo elastina VKVx24.

La maduración de las tecnologías de ADN recombinante ha permitido que aparezca un nuevo término, ELR (*Elastin Like Recombinamer*), para designar a los polímeros tipo

elastina obtenidos a través de técnicas recombinantes. Esto implica que, mediante ingeniería genética, es posible aislar una pieza de ADN y clonarlo en un vector que sirva para facilitar la expresión exclusiva de la proteína codificada por el gen. El resultado es un polímero recombinante con secuencias de aminoácidos bien definidas, complejas y controladas [4]. Estos ELRs pueden tener así diferentes secuencias bioactivas en su estructura, como la de adhesión o sensibles a enzimas, a parte de las propiedades inherentes a la elastina, como es la naturaleza inteligente, sus propiedades mecánicas, la biocompatibilidad [5] y su comportamiento autoensamblable [6]. Esta última propiedad es especialmente importante, ya que el sistema inmunitario del organismo huésped es incapaz de distinguir entre la elastina endógena y un biopolímero ELR.

Además, los ELRs presentan un comportamiento termosensible en medio acuoso, caracterizado por una temperatura crítica, la temperatura de transición (T_t), por debajo de la cual el polímero es soluble ya que la cadena polimérica permanece hidratada y rodeada por moléculas de agua que forman una estructura tipo clatrato, donde el agua queda alrededor de los residuos apolares del polímero. Por el contrario, por encima de esa T_t , los clatratos se rompen por agitación térmica y esa organización compleja finalmente desaparece [7]. El ELR se pliega hidrofóbicamente para formar una fase separada en la que las cadenas adoptan una estructura regular, dinámica y no aleatoria identificada como espiral β [8]. Los residuos apolares quedan así en el exterior de la hélice mientras que en el interior quedan los polares, que retienen moléculas de agua cuando se transiciona de una conformación a otra. En estas condiciones el polímero se vuelve insoluble en un proceso completamente reversible. El proceso general se denomina transición inversa con la temperatura (ITT).

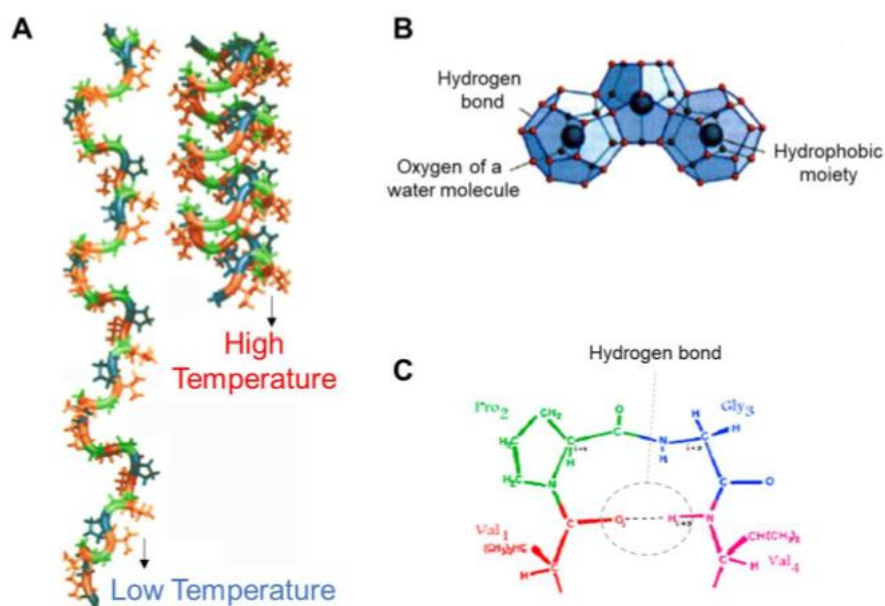


Figura 2. A) Representación de la cadena de aminoácidos de los ELRs a baja y alta temperatura. B) Estructuras tipo clatrato que forma el agua por debajo de la T_t . C) Esquema de la espiral β que aparece por encima de la T_t .

1.2. HIDROGELES.

Los hidrogeles se pueden definir como redes poliméricas capaces de absorber una cantidad significativa de agua (>20% de su peso seco) sin disolverse o perder su estructura. Algunas de las características de este tipo de materiales son:

- Presentan un carácter hidrofílico, debido a la presencia de grupos como alcoholes, amidas o ácidos carboxílicos.
- Son insolubles en agua cuando están en su forma de red tridimensional entrecruzada.
- Tienen una consistencia blanda y elástica.
- Son capaces de hincharse aumentando su volumen y manteniendo su consistencia hasta llegar a un equilibrio fisicoquímico. Este equilibrio es el resultado del balance entre las fuerzas osmóticas originadas por el agua cuando entra en el polímero y las fuerzas cohesivas de las cadenas poliméricas que se resisten a la expansión.

En los últimos años, el uso de hidrogeles ha ido creciendo gracias a su utilidad en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas. Esto es posible debido a su biocompatibilidad y a su parecido con algunos tejidos naturales.

Dependiendo de la manera en la que se forma la red tridimensional que los caracteriza, los hidrogeles se pueden clasificar en dos grupos: hidrogeles físicos y reversibles o químicos y permanentes.

- *Hidrogeles físicos*. Presentan una red tridimensional que se mantiene unida por medio de interacciones intermoleculares como fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o uniones hidrofóbicas. Este tipo de geles comúnmente no son homogéneos y presentan zonas donde las interacciones moleculares son más fuertes.
- *Hidrogeles químicos*. La red tridimensional del gel está estabilizada mediante enlaces covalentes entre las cadenas poliméricas, por lo que su ruptura da lugar a su degradación.

Para los hidrogeles que se han obtenido en este trabajo, se llevó a cabo una modificación química previa de dos polímeros ELRs diferentes. Esta modificación es necesaria para introducir en el polímero los grupos funcionales azido y ciclooctinilo que permiten crear el hidrogel y sus entrecruzamientos a partir de las tecnologías de química “click”.

1.2.1. HIDROGELES POR REACCIÓN TIPO CLICK.

El concepto de la “química click” fue presentado por Kolb, Sharpless y col. en 2001 para referirse a una metodología que permite, a partir de moléculas más pequeñas, la

obtención de estructuras complejas mediante reacciones altamente eficientes [9]. Este tipo de metodología tiene una serie de características comunes:

- Facilidad experimental.
- Compatibilidad con una elevada variedad de grupos funcionales.
- Estereoespecificidad.
- Fácil purificación del producto final.
- Elevado rendimiento.

Una de las reacciones click más conocidas es la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen entre azidas y alquinos [10]. Esta metodología combina su alta especificidad con un rendimiento prácticamente cuantitativo y ausencia de reacciones secundarias y subproductos tóxicos. Típicamente, esta reacción requiere un ión metálico como catalizador para iniciar la reacción, generalmente Cu^+ . Dado que esto puede llegar a dar algunos problemas de citotoxicidad [11], posteriormente se implementó el uso de grupos alquínico activados, como los derivados del ciclooctino, para evitar el uso de un catalizador metálico [12].

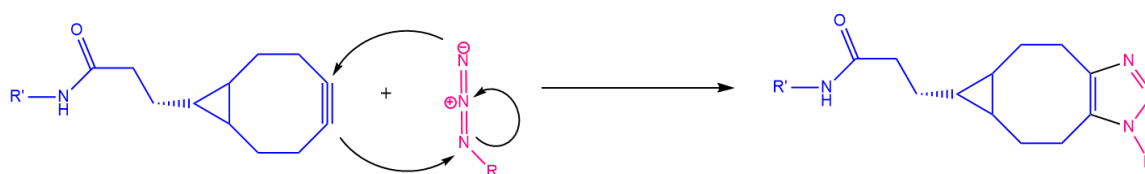


Figura 3. Esquema general para la reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre azida y alquino (derivado de ciclooctino) en ausencia de catalizador.

Los grupos alquínico y azido son además grupos especialmente estables dentro de sistemas biológicos, lo que hace que este tipo de reacción click sea muy utilizada en la preparación de dispositivos para liberación controlada de fármacos, la bioconjugación con proteínas y ADN, el marcaje de superficies celulares y la síntesis de hidrogeles [13]

En este trabajo se han obtenido hidrogeles por entrecruzamiento químico de las cadenas de los ELRs mediante dicha reacción de cicloadición 1,3-dipolar. Para ello, se hace necesario modificar químicamente los ELRs, polímeros VKVx24 y RGD, mediante la transformación química de los grupos amino de las lisinas presentes a lo largo de las cadenas laterales, en grupos ciclooctinilo y azido, respectivamente.

1.2.2. HIDROGELES FOTOSENSIBLES.

Los hidrogeles fotosensibles son materiales que responden a la luz como estímulo, que pueden llegar a ser muy útiles en diversas aplicaciones como la autocuración, la biodetección, la administración de fármacos o la ingeniería de tejidos. Es por eso que los

grupos fotolábiles han sido ampliamente utilizados. Algunos, como los basados en grupos nitrobenzilo (NB), es posible modificarlos para que sean capaces de responder a dosis de luz citocompatibles, lo que les hace especialmente populares en el campo de la biotecnología.

Estudios previos han demostrado que la cinética de fotoescisión del grupo nitrobenzilo puede variar en función del sustituyente en posición benzílica, de manera que la elección de este sustituyente permite controlar tanto las cinéticas de degradación como los subproductos generados. Este tipo de estrategias han dado lugar a diferentes derivados de NB que actúan como entrecruzantes en hidrogeles y permiten la degradación de dichos hidrogeles de manera selectiva debido a sus propiedades variables en diferentes microambientes.

En el grupo de Kloxin y colaboradores se aborda el estudio de diferentes derivados nitrobenzilos para ajustar las tasas de fotólisis de hidrogeles químicos con entrecruzantes lábiles. Para ello, comparan cuatro tipos de derivados que poseen, simultáneamente, enlaces fotolábiles y enlaces hidrolizables como son los derivados de NB: NB-éster, NB-amida, NB-carbonato y NB-carbamato. Se ha observado que, al irradiar con luz ultravioleta de 365 nm, los hidrogeles con restos NB-carbamato dieron una cinética de fotodegradación rápida y presentaron estabilidad hidrolítica, mientras que el correspondiente derivado NB-éster se degrada hidrolíticamente en menos de una hora. Para el derivado NB-amida se observó que la degradación en disolución y formando parte del hidrogel diferían, lo que muestra la importancia de caracterizar el proceso de degradación en diferentes microambientes. [14] Este enfoque proporciona diversas oportunidades para el diseño de materiales degradables con propiedades ajustables y controladas para aplicaciones como la funcionalización superficial o la ingeniería de tejidos.

1.3. PROPUESTA DE TRABAJO.

A la vista de los resultados obtenidos por Kloxin y colaboradores, en lo referente a la degradación, foto e hidrolítica, de los diferentes derivados de nitrobenzilo, NB, en este trabajo se pretende aplicar estos conocimientos para estudiar la dinámica de degradación de hidrogeles químicos formados por medio de química click y con grupos nitrobenzilo fotolábiles como parte de la estructura del entrecruzamiento de las cadenas biopoliméricas.

De entre los derivados nitrobenzilos estudiados previamente, el que incluye un grupo NB-carbamato proporciona los mejores resultados en cuanto a capacidad de fotodegradación y a mayor estabilidad hidrolítica. Se propone utilizar un reactivo que posea un grupo azido terminal, que porte el grupo fotolábil NB-carbonato y que posea en el otro extremo un grupo N-succinimidil éster, el cual será capaz de reaccionar con los grupos amino de las lisinas presentes en los biopolímeros tipo elastina, generando el

correspondiente polímero modificado con azidas. La reacción posterior con otro biopolímero modificado con grupos ciclooctinilo permitirá la preparación de hidrogeles vía química click, tal y como se ha visto anteriormente.

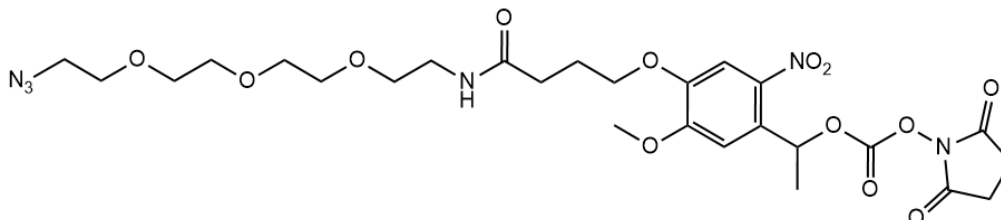


Figura 4. Estructura química del PC-azido-PEG-3-NHS carbonatoester, utilizado en este trabajo como derivado fotolábil.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

El propósito de este trabajo es la producción, siguiendo la metodología click, de hidrogeles a partir de biopolímeros recombinantes que contengan enlaces fotolábiles, con el fin de estudiar la variación de sus propiedades mecánicas al irradiarlos con luz ultravioleta.

Este objetivo se engloba dentro de uno más general y ambicioso propuesto en el grupo de investigación Bioforge, relacionado con el estudio del comportamiento celular ante variaciones en la presión ejercida por su entorno y teniendo en cuenta como la matriz extracelular varía sus propiedades mecánicas en función de un estímulo, que para este caso sería la luz ultravioleta, transmitiendo a su vez diferente.

Para realizar este objetivo se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

1. Preparación de biopolímeros tipo elastina, ELRs, modificados químicamente con grupos ciclooctinilo, VKVx24, y su caracterización.
2. Preparación de ELRs modificados químicamente con grupos azido y su caracterización. Inicialmente se preparará un biopolímero modificado con grupos azido unidos a la cadena polimérica a través de un enlace fotolábil, RGD-L₃. Posteriormente, se preparará el mismo biopolímero modificado con dos tipos de grupos azido: los llamados convencionales (utilizados previamente en el grupo para preparar hidrogeles químicos vía química click, que no poseen enlaces fotolábiles) y los mismos grupos azido que poseen enlaces fotolábiles, RGD-L₃N₃.
3. Caracterización de la degradación por el efecto de la luz ultravioleta de los polímeros de tipo RGD modificados químicamente, RGD-L₃ y RGD-L₃N₃.
4. Preparación de hidrogeles químicos con los diferentes tipos de RGDs modificados previamente y en diferentes concentraciones.

5. Caracterización los hidrogeles mediante la medición de sus propiedades mecánicas por reología.
6. Estudio de la degradación de los hidrogeles formados cuando estos son expuestos a luz ultravioleta.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIALES.

En la parte experimental de este trabajo, todos los reactivos han sido adquiridos de fuentes comerciales y empleados sin ninguna purificación previa. Todos los disolventes utilizados han sido adquiridos de casas comerciales de calidad síntesis o analítica.

Tabla 1. Reactivos y disolventes utilizados junto con las casas comerciales en las que se han adquirido.

REACTIVO	CASA COMERCIAL
2-(Azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato	GalChimia
(1R, 8S, 9S)-biciclo (6.1.0.) non-4-yn-9-ilmetil succinidimil carbonato	GalChimia
Acetona	Sigma-Aldrich
Dietiléter	Scharlau
Dimetilformamida (DMF)	Sigma-Aldrich
Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆)	Apollo Scientific
PC-azido-PEG-3-NHS carbonatoester	Broadpharm

3.2. EQUIPAMIENTO.

Todo los equipos utilizados para llevar a cabo las modificaciones, la caracterización y las pruebas experimentales pertenecen al grupo Bioforge excepto el equipo de Resonancia Magnética Nuclear y el de espectrometría de masas que pertenecen al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid y el microscopio electrónico de barrido que pertenece a la Universidad de Salamanca.

Tabla 2. Relación de técnicas instrumentales empleadas con el equipo y la casa comercial.

TÉCNICA INSTRUMENTAL	EQUIPO	CASA COMERCIAL
Centrifugación	Centrifuga ST 16R Centrifuga Avanti	Thermo-Scientific Beckman
Espectrometría de masas MALDI-TOF	Espectrómetro de masas Bruker Autoflex	Bruker
Espectrometría infrarroja (FTIR)	Espectrofotómetro FT-IR Tensor27	Bruker
Irradiación UV	Lampara UV-LED L11921	Hamamatsu
Reología	Reómetro AR 2000ex	TA Instruments
Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	RMN 400	Agilent Technologies
Microscopio electrónico de barrido (SEM)	JSM-IT500 con detector EDX	Jeol

3.3. POLÍMEROS.

Los dos ELRs utilizados en este trabajo fueron los llamados VKVx24 y RGD. Se sintetizaron empleando técnicas estándar de ingeniería genética.

Tabla 3. Abreviatura, estructura y peso moleculares de los polímeros empleados.

Polímero	Secuencia de aminoácidos abreviada	Pm (Da)
RGD	MGSSHHHHHSSGLVPRGSH-MESLLP- $\{[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2-AVTG$ RGD $SPASS-$ $[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2\}_6-V$	60661
VKVx24	MESLLP VG VPGVG [VPG KG (VPGVG)5]23 VPG KG (VPGVG) ₃ VPGV	60451

○ VKVx24.

Se trata de un polímero estructural caracterizado por la repetición del pentapéptido VPGVG, un bloque hidrofóbico que proporciona al polímero cierto comportamiento termosensible además de biocompatibilidad. Por otro lado, contiene la secuencia VPGKG, con un carácter hidrofílico, que contiene lisina como aminoácido invitado. La lisina posee un grupo amino terminal, que es el que permite que se lleven a cabo modificaciones químicas en el polímero y le

confiere algunas características como la sensibilidad al pH del medio o una carga positiva en condiciones fisiológicas.

- RGD.
Este polímero está basado en la repetición del monómero VPGIG, formando un bloque hidrofóbico que proporciona al polímero su comportamiento termosensible y su biocompatibilidad. Así mismo, contiene la misma secuencia VPGKG, presente en el biopolímero anterior, que permite su modificación química posterior y le confiere las mismas características. Este polímero, además, se caracteriza por poseer una secuencia bioactiva formada por arginina, glicina y ácido aspártico, RGD, que promueve la adhesión celular.

3.4. TÉCNICAS INSTRUMENTALES.

3.4.1. ELECTROFORESIS.

La electroforesis es una técnica empleada para la separación de moléculas en función de su tamaño y su carga. Se basa en la diferente movilidad que tienen las moléculas frente a un campo eléctrico inducido alrededor del gel en el que previamente se han depositado las muestras. Este campo eléctrico se genera dentro de una cámara llena de una disolución amortiguadora en la que está sumergido el gel. El alto contenido en electrolitos de la disolución amortiguadora permite la transmisión de la corriente eléctrica manteniendo estable el pH con el paso de la corriente.

En el gel, preparado previamente en función del peso molecular del polímero que se vaya a emplear, se inyectan en los diferentes carriles las muestras y un marcador que sirve de referencia a la hora de analizar el peso de las muestras. Antes de inyectarlas, las muestras han de ser tratadas con un tampón de carga (azul de bromofenol) para poder visualizar el recorrido de las proteínas en el gel tras teñirlo al acabar la descarga con una disolución de azul Coomassie, metanol y acético.

Esta técnica nos ha permitido visualizar la muestra proteica producida después de la degradación del gel, por lo que en este caso se emplea para el análisis de los polímeros generados.

3.4.2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se basa en las propiedades magnéticas de los núcleos de los elementos. Con esta técnica se puede obtener información sobre el entorno de estos núcleos dentro de la molécula en la que se encuentran. Para que esto sea posible es necesario que los núcleos sean magnéticamente activos, es decir, que tengan un número cuántico de espín diferente de cero, lo que hace que se comporten como pequeños imanes con sus correspondientes momentos magnéticos. Es lo que sucede en átomos como ^1_1H , $^{13}_6\text{C}$ o $^{19}_9\text{F}$.

De esta forma se aplica un campo magnético sobre la muestra que produce un desdoblamiento de los niveles de energía del espín nuclear, induciendo transiciones entre los diferentes niveles de energía. Para cada núcleo de una molécula el entorno químico es diferente, por lo que el campo magnético al que resuena en cada caso, a este efecto se le denomina apantallamiento. Por lo general, el apantallamiento para cada protón de una molécula es diferente, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión y como resultado da un espectro donde cada conjunto de núcleos específicos da lugar a una señal única en el RMN a un desplazamiento químico diferente. En función de los protones que contribuyen a una misma señal esta se representa con mayor o menor intensidad. Esto se representa con una curva superpuesta en las señales denominada integral, que es proporcional al número de protones presentes en la molécula.

Para caracterizar las muestras de polímero, tanto puro como modificado con esta técnica es necesario disolverlas. Para ello se pesan 5-6 mg de polímero y se disuelven en 0,6 mL de DMSO- d_6 . A continuación, la disolución se pasa a un tubo de RMN que es el que se introducirá en el equipo para realizar el análisis. Los disolventes empleados son deuterados, en los que 99% de sus protones están sustituidos por deuterio para evitar que den señales que interfieran en el espectro.

El equipo utilizado en todos los RMN hechos ha sido el espectrómetro automático Agilent MR 400 del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la UVa.

3.4.3. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA (FTIR).

La espectroscopía infrarroja permite obtener información, mediante el estudio de las vibraciones moleculares, sobre la presencia de grupos funcionales y determinados agrupamientos.

Sobre la muestra incide un haz de radiación monocromática que hace un barrido de frecuencia entre 600-4000 cm^{-1} , produciendo modificaciones en el estado de vibración de los enlaces. Así, los enlaces absorben energía cuando la frecuencia de radiación coincide con la suya de vibración, dando lugar a una banda en el espectro.

Se ha utilizado la técnica FTIR-ATR (Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada). La técnica permite que se dé una reflexión interna total cuando la radiación infrarroja llega al cristal ATR (transmisor con alto índice de refracción) creando así una onda que mantiene el contacto con el cristal registrando el espectro infrarrojo. Con la Transformada de Fourier es posible, además, convertir el espectro del dominio del tiempo a un dominio de frecuencia, obteniéndose espectros más rápidos, con menos ruido y, por ello, más precisos.

El equipo utilizado es un espectrómetro de Infrarrojo Bruker TENSOR 27.

3.4.4. ESPECTROSCOPÍA DE MASAS.

La espectroscopía de masas es una técnica analítica con la capacidad de estudiar compuestos de diferente naturaleza obteniendo información tanto cualitativa como cuantitativa sobre su masa molecular y estructura.

En el caso de la espectroscopía de masas MALDI-ToF (Desorción Láser Asistida por Matriz con analizador de Tiempo de Vuelo), inicialmente la muestra se ioniza, ya que no detecta formas neutras y, a continuación, los iones se aceleran desde la fuente de iones hasta el analizador del espectrómetro. En el analizador, los diferentes iones se separan en función de su relación masa/carga mediante la acción de un campo eléctrico o magnético y, por último, los iones seleccionados llegan al detector.

El equipo utilizado para analizar las muestras es un MALDI-TOF modelo Bruker Autoflex que se encuentra en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la UVA. En este caso, está compuesto por una fuente de ionización por láser asistida por una matriz (MALDI) y un analizador de tiempo de vuelo (ToF). La técnica permite determinar así el peso molecular del polímero.

3.4.5. REOLOGÍA.

La reología es una ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia tanto en estado sólido como en estado líquido.

Desde el punto de vista del comportamiento mecánico existen dos propiedades principales para caracterizar los materiales, la elasticidad y la viscosidad. La primera, fundamentada en la Ley de Hooke, muestra que en los sólidos ideales la fuerza aplicada sobre el material es directamente proporcional a la deformación que este presenta a dicha fuerza y la energía necesaria para esta deformación se recupera totalmente en cuanto se elimina la tensión. Por el contrario, en el caso de los fluidos ideales o fluidos Newtonianos, la fuerza aplicada es proporcional a la velocidad de deformación. Así, al dejar de aplicar fuerza al material éste no revierte a su estado inicial y la energía empleada se disipa dentro del fluido.

Los hidrogeles descritos en este trabajo se consideran materiales viscoelásticos y tienen un comportamiento intermedio entre un sólido de Hooke y un fluido viscoso. De esta forma, la relación entre la tensión y la deformación en este caso no es constante en el tiempo. Al retirar la fuerza, el material puede volver a su estado original en un tiempo que dependerá del tipo de moléculas que constituyen el material.

Las dos magnitudes clave que hay que tener en cuenta en reología son la fuerza por unidad de sección (*stress*) y el desplazamiento (*strain*). Representando *stress* frente a *strain*, se obtiene la curva fundamental que permite la caracterización del material y a partir de la cual se puede obtener la métrica que permite determinar las propiedades mecánicas de este.

A la hora de interpretar los datos obtenidos es importante conocer los parámetros que aparecen en las gráficas. Por un lado se obtendrá el *Módulo Elástico* (G') y por otro el *Módulo Viscoso* (G''). El módulo elástico, o de almacenamiento, va indicando la parte elástica que tiene el material hasta llegar a un máximo en el que este es puramente elástico. Por otro lado el módulo viscoso o de pérdida indica la energía que se va disipando dentro del material durante el proceso de deformación. Estos dos módulos están relacionados por medio de la tangente de *pérdida*, cuyo valor permite determinar la energía perdida en relación con la almacenada. Cuanto mayor es el valor de la tangente, menor comportamiento elástico presenta el material en ese punto, mientras que valores pequeños caracterizan materiales con un comportamiento enteramente elástico.

$$\tan \delta = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)}$$

Figura 5: Ecuación para la tangente de pérdida.

Las medidas reológicas para los hidrogeles elaborados se han llevado a cabo con un reómetro AR2000ex que actúa a tensión (*stress*) controlada y plato termostatado.

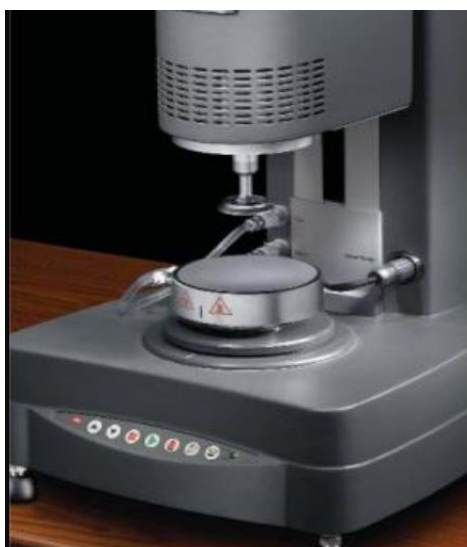


Figura 6. Reómetro con geometría y plato termostatado donde se llevan a cabo las mediciones de los geles.

Los hidrogeles han sido elaborados previamente en moldes cilíndricos de 12 mm de diámetro y con un volumen de 400 μL . Las medidas se han llevado a cabo sobre el plato termostatado a 37 $^{\circ}\text{C}$.

3.5. METODOLOGÍA.

3.5.1. PRODUCCIÓN DE POLÍMEROS.

La síntesis de los polímeros que se han utilizado en este trabajo, HRGD₆ y VKVx24, sigue una metodología que consiste en su diseño a través de tecnología de ADN recombinante y posterior bioproducción en la bacteria *Escherichia coli* [15].

3.5.1.1. Siembra de la bacteria y selección de la colonia.

Este proceso de bioproducción comienza con la siembra de la bacteria *Escherichia coli* en una placa Petri que contiene el medio de cultivo. Esta bacteria ha sido previamente modificada, introduciéndose en ella un plásmido que contiene un gen que codifica la secuencia del polímero. La placa se incuba durante 24 horas a 37 °C. Pasado este tiempo se lleva a cabo un screening y se seleccionan las colonias que mayor producción dan. Tras ser incubadas de nuevo, se someten a una electroforesis con el fin de separar las bacterias en función de su tamaño y analizar su crecimiento celular y su capacidad de producción.

3.5.1.2. Producción de la bacteria.

La colonia seleccionada se introduce durante 20 horas a 37 °C y a un pH de 6.6 en un fermentador con el medio TB estéril que favorece su crecimiento. Cada 30 minutos se toman muestras y se mide la absorbancia a 600 nm, de forma que, cuando esta deja de aumentar indica el punto en el que la bacteria ha llegado a su máximo crecimiento, consumiendo todo el medio de cultivo y dejando de reproducirse.

3.5.1.3. Lavado y ruptura celular.

Terminada la fermentación, se recoge la bacteria y se centrifuga a 4 °C y 3500 rpm durante 15 minutos con el fin de separar el pellet (bacteria) del sobrenadante (medio de cultivo). El pellet se resuspende en un tampón de lavado y se centrifuga de nuevo. Este proceso se repite hasta que el sobrenadante quede transparente.

Por último las bacterias se suspenden en un tampón de sonicación. Este, junto con un inhibidor de proteasas (PMSF100), se encargan de evitar la degradación del polímero y la ruptura enzimática.

Las bacterias resultantes, tras el proceso de lavado se someten a una ruptura celular utilizando un disruptor de células. Este equipo opera a una temperatura de 4 °C y con una presión de unos 1500 bar y consigue fracturar la pared celular mediante un cambio de presión, liberando así las proteínas. Este proceso se lleva a cabo por triplicado.

3.5.1.4. Purificación del polímero.

El polímero obtenido se purifica mediante ciclos de transición inversa (ITC). Esta técnica emplea un protocolo que depende de los parámetros del polímero (composición del residuo, longitud, temperatura de transición...) y consta de una secuencia de calentamiento, centrifugación, enfriamiento y solubilización. El sobrenadante obtenido

es el extracto crudo al que se le siguen aplicando cambios de pH y temperatura, a los que será sensible el polímero, facilitando así su separación de las impurezas que puedan quedar.

Por último, se procede a diálisis y liofilización del polímero. Para ello, el sobrenadante frío resultante de la etapa anterior se introduce en tripas de diálisis y estas a su vez en recipientes con agua ultrapura a 4°C, realizando cambios del agua cada 24 horas hasta un total de tres veces. Las tripas están formadas por una membrana de celulosa porosa que permite que tenga lugar un proceso de ósmosis en el que las impurezas que pueda tener el polímero con tamaño menor al del poro de la tripa sean eliminadas.

Tras la diálisis, el polímero disuelto se congela a -20 °C y finalmente se liofiliza. En este proceso la muestra, a baja presión, se deshidrata y el agua contenido en el material se sublima, es decir, pasa de fase sólida a gaseosa directamente sin pasar por el estado líquido.

3.5.2. CARACTERIZACIÓN.


El polímero puro obtenido se caracterizó empleando diferentes técnicas: Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría de Masas (MALDI-TOF), Espectroscopía Infrarroja (FTIR), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y electroforesis.

3.5.3. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE POLÍMEROS.

Para poder utilizar los polímeros en reacciones click y formar hidrogeles, es necesario realizar una serie de modificaciones químicas previas que permitan introducir el grupo azido y el grupo ciclooctinilo responsables del entrecruzamiento químico de las cadenas vía cicloadición 1,3-dipolar. Se modificará así el biopolímero VKVx24 con grupos ciclooctinilo y se modificará el polímero HRGD₆ con grupos azido.

Se van a realizar tres modificaciones químicas del biopolímero HRGD₆ para introducir en él diferentes grupos azido: en la primera se introducirán grupos azido estables a la luz, en la segunda grupos azido fotolábiles (portadores de grupos nitrosobencilcarbamato, NB) y en la tercera modificación química se introducirán grupos azido fotolábiles y grupos azido estables a la luz, en proporción 1:1.

Tabla 4. Abreviaturas para los ELRs y los diferentes grupos sustituyentes que participan en las modificaciones químicas.

Símbolo	Grupo
	MGSSHHHHHSSGLVPRGSH-MESLLP- $\{[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2-$ AVTGRGDSPASS- $[(VPGIG)_2(VPGKG)(VPGIG)_2]_2\}_6-V$ o MESLLP VG VPGVG $[VPGKG (VPGVG)_5]_{23}$ VPGKG $(VPGVG)_3$ VPGV

R²	
R³	
R⁴	

3.5.3.1. Modificación de VKV con ciclooctino.

Se disuelve el polímero VKVx24 (1154,7 mg, 0,458 mmol, PM 60451) en DMF (53 mL) en atmosfera de nitrógeno a temperatura ambiente. A continuación se añade vía jeringa una disolución de (1R, 8S, 9S)-bicyclo (6.1.0.) non-4-yn-9-ilmetil succinidimil carbonato (80,13 mg, 0,28 mmol, 0,6 eq, PM 291,30) en DMF (1 mL) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, la disolución se deposita en falcons, llenándolos hasta un máximo de 7 mL, y el polímero se precipita por adición de 45 mL de Et₂O, tras lo cual, se centrifugan a 17000 G durante 40 minutos. El sobrenadante se elimina y el sólido se lava con acetona, que se elimina por centrifugación a 17500 G durante 30 minutos (3x30 mL). El sólido resultante se seca a presión reducida durante la noche y, posteriormente, se redissuelve el 15 mL de agua Mili-Q a 4°C. Disuelto el sólido, se dializa en agua Mili-Q (3x25 mL). Finalmente, se liofiliza para obtener el polímero modificado VKV-CC.

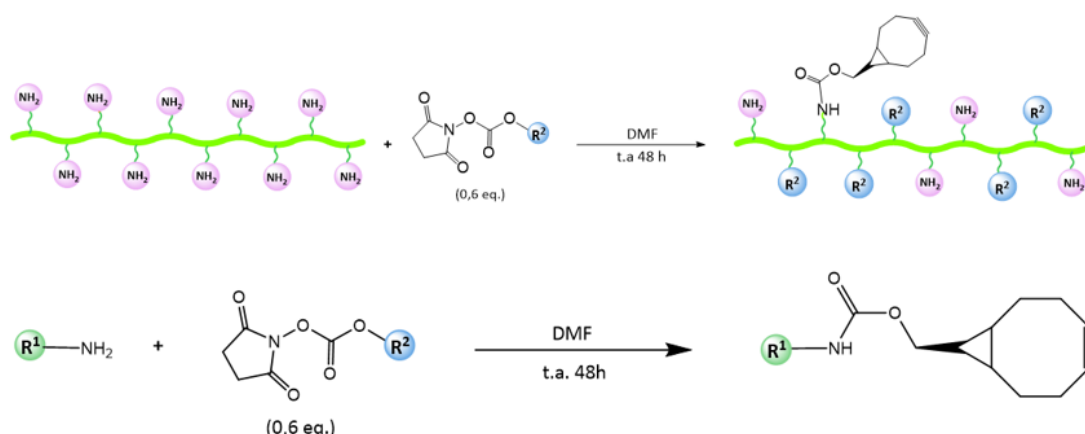


Figura 7. Esquemas de la modificación química del polímero VKVx24 con el grupo ciclooctino.

3.5.3.2. Modificación de RGD con azida, RGD-N₃.

Se disuelve el polímero HRGD₆ (2650,4 mg, 1,05 mmol, PM 60661) en DMF (53 mL) en atmósfera de nitrógeno. Una vez disuelto se adiciona vía jeringa una disolución de 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (143,6 mg, 0,63 mmol, 0,6 eq, PM 228,17) en DMF (1 mL) y se deja agitando a temperatura ambiente durante 48 horas. El procesamiento de la reacción sigue el mismo protocolo que la modificación del VKV-CC, descrito en el apartado 3.5.3.1.

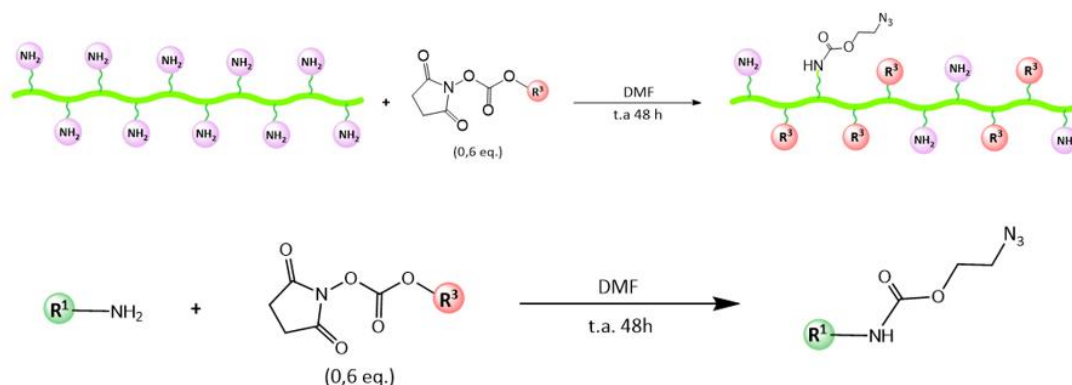


Figura 8. Esquemas de la modificación del polímero RGD con un grupo azido.

3.5.3.3. Modificación de RGD con azida con enlace fotolábil, RGD-L₃.

Se disuelve HRGD₆ (250 mg, 0,099 mmol, PM 60661) en DMF (5 mL) en un matraz en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Una vez todo está disuelto se adiciona una disolución previamente preparada de PC-azido-PEG-3-NHS carbonatoester (38,00 mg, 0,0989 mmol, 0,6 eq, PM 640,6) en DMF (1 mL). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 48 horas. El procesamiento de la reacción se efectúa siguiendo el mismo protocolo utilizado en la modificación del VKV-CC (apartado 3.5.3.1).

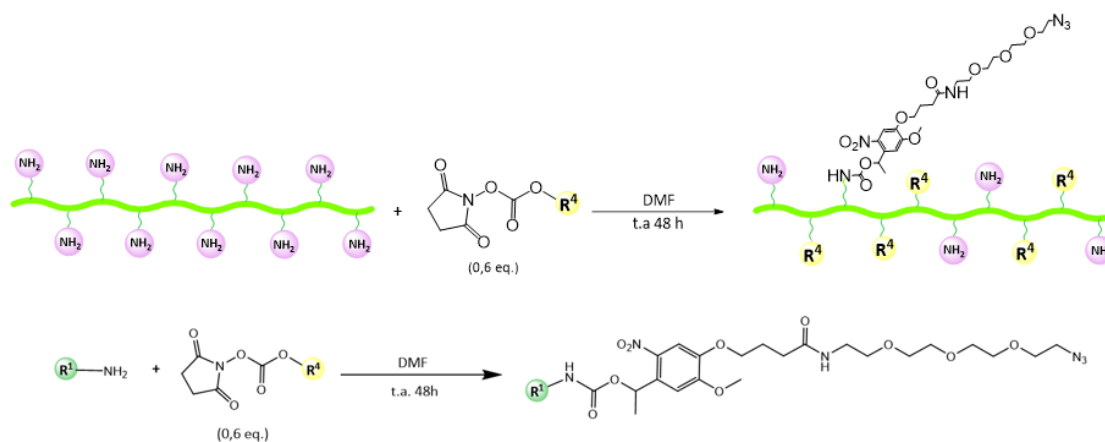


Figura 7. Esquemas de la reacción de modificación del polímero RGD con un grupo azida lábil.

3.5.3.4. Modificación de RGD con azida estable a la luz y azida con enlace fotolábil, RGD-N₃L₃.

Se disuelve el polímero HRGD₆ (403,2 mg, 0,1595 mmol, PM 60661) en DMF (8 mL) en atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente. Una vez comprobado que esta disuelto se añaden vía jeringa, y de forma simultánea, las disoluciones de 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (10,92 mg, 0,0479 mmol, 0,3 eq, PM 228,17) y de PC-azido-PEG-3-NHS carbonatoéster (30,66 mg, 0,0479 mmol, 0,3 eq, PM 640,6) en DMF (0,5 mL en cada una). Se deja agitando en ausencia de luz a temperatura ambiente durante 48 horas. El procesado de la reacción se efectúa siguiendo el mismo protocolo utilizado en la modificación de VKV-CC (apartado 3.5.3.1).

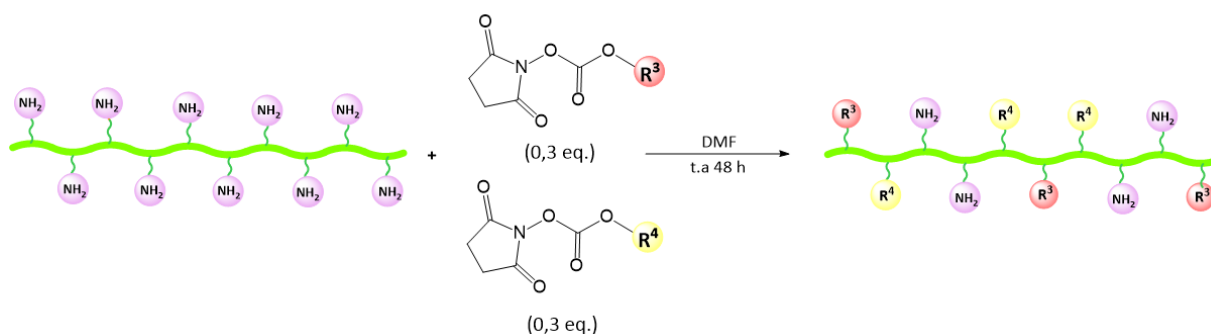


Figura 8. Esquema de la modificación de polímero RGD con un grupo azida convencional y un grupo azida fotolábil.

3.5.4. DEGRADACIÓN POR LUZ DEL POLÍMERO.

Una vez modificado el polímero RGD, tanto con azida estable y azida lábil, RGD-N₃-L₃, como sólo con azida lábil, RGD-L₃, se pretende estudiar la degradación de estos polímeros al irradiarlos con luz ultravioleta.

Para ello se preparan una disolución del polímero en DMSO deuterado a una concentración de 75 mg/mL (60 mg de RGD modificado en 0,8 mL de DMSO-d₆). Esta disolución se deposita en una cubeta de cuarzo con un imán y, en agitación, se irradia de forma perpendicular con una luz UV-Vis de 365 nm. Se van tomando alícuotas a determinados tiempos de exposición a la luz UV y se analiza la degradación del polímero por ¹H-RMN.

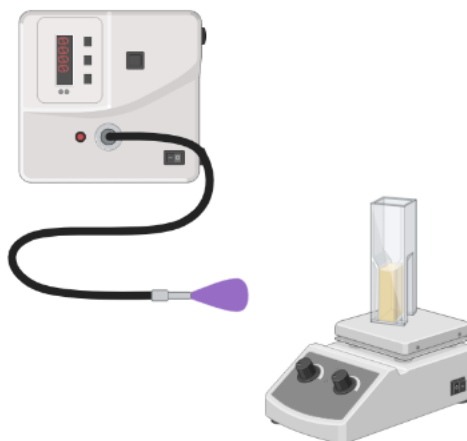


Figura 9. Esquema de la metodología para la irradiación de los polímeros disueltos en DMSO-d₆.

En el caso del polímero en el que se han modificado únicamente con 0,3 equivalentes de la azida fotolábil, RGD-N₃-L₃, se irradia la muestra y se coge una alícuota cada 15 minutos hasta llegar a un tiempo total de exposición de 1 hora. En el caso del RGD modificado con 0,6 equivalentes de la azida con enlace fotolábil, RGD-L₃, se cogen alícuotas cada 5 minutos hasta llegar a un tiempo total de exposición de 25 minutos.

Las muestras recogidas se analizan por ¹H-RMN para determinar en qué medida se ha producido la ruptura de los enlaces lábiles de la azida con la luz ultravioleta en función del tiempo.

3.5.5. FORMACIÓN DE HIDROGELES.

La preparación de hidrogeles siguiendo la metodología click sin catalizador comienza con la preparación de la disolución de los polímeros en agua. Así, el primer paso es dejar disolviendo durante la noche cada polímero por separado en agua Mili-Q a 4°C, en este caso VKV-CC y RGD (RGD-N₃-L₃ o RGD-L₃). Los geles se van a preparar a partir de disoluciones de ambos polímeros a concentraciones de 75 mg/mL y 100 mg/mL. Una vez disueltos los polímeros modificados, para preparar el gel a una concentración de 75 mg/mL se mezclan 200 µL de VKV-CC a concentración 75 mg/mL y la misma cantidad del RGD con el que se vaya a hacer el gel, a una concentración de 75 mg/mL, en un eppendorf y, una vez juntos, la mezcla se deposita en moldes cilíndricos de 12 mm de diámetro. Durante todo este proceso es necesario mantener la temperatura a 4°C. Se deja gelificar durante 1 hora a esa temperatura y, posteriormente, 2 horas más a temperatura ambiente.

Se preparan dos tipos diferentes de hidrogeles, Gel-L₃ y Gel-N₃L₃, con concentraciones de 75 y 100 mg/mL:

- VKV-CC + RGD-L₃: Gel-L₃.
- VKV-CC + RGD-N₃-L₃: Gel-N₃L₃.

3.5.6. CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES.

3.5.6.1. *Reología.*

Una vez preparados los hidrogeles se miden sus propiedades mecánicas mediante reología, tanto en las condiciones iniciales como tras diferentes tiempos de irradiación.

Previo a las medidas, el gel se mantiene en agua Mili-Q en las condiciones en las que lo vamos a querer probar para atemperarlo. En este trabajo, las medidas se llevaron a cabo a 37 °C.

Una vez se calibra el equipo, el hidrogel se coloca en el plato termostatado y se ajusta la distancia entre este y la geometría del equipo, que es de 12 mm al igual que el diámetro del gel. Se ajusta esta altura (GAP) de manera que la fuerza normal que ejerce el instrumento sobre el gel sea de 0,01 N aproximadamente.

Fijados estos parámetros se hacen las medidas de los geles. Inicialmente tiene lugar un barrido de deformación (strain). Este se realiza para establecer en qué rango de strain el módulo de almacenamiento (G') presenta un comportamiento viscoelástico lineal. Este barrido de deformación se realiza entre 0,01 y 20 % de strain, a la temperatura que se requiera en la medida y con una frecuencia constante de 1 Hz.

Una vez establecido el rango lineal de comportamiento viscoelástico, se realiza el barrido de frecuencia. Para ello se fija la deformación en un 1%, a la temperatura deseada y en un rango de barrido entre 0,1 y 10 Hz, que corresponde con el rango lineal que ha seguido G' en el barrido de deformación.

3.5.6.2. *SEM.*

La microscopía electrónica de barrido hace incidir un haz de electrones sobre la muestra, que interaccionan con la misma dando lugar a diferentes señales que son recogidas por detectores y transformadas en imágenes de alta resolución que permiten conocer la topografía de la superficie de la muestra.

Para poder emplear esta técnica es necesaria una previa preparación de la muestra. Para ello se sumerge el hidrogel en nitrógeno líquido para congelarlo de forma rápida. Mientras está congelado, se parte el hidrogel con unas pinzas y con el corte más limpio posible y se liofiliza.

En este trabajo, el uso de esta técnica permitirá ver la diferencia de porosidad y compactación de dos hidrogeles, Gel-N₃-L₃ formados por VKV-CC y RGD-N₃-L₃ a diferentes concentraciones.

El equipo utilizado ha sido un Joel JSM-IT500 con detectores de electrones secundarios y retrodispersados y detector EDX perteneciente a la Universidad de Salamanca.

3.5.7. DEGRADACIÓN POR LUZ DE LOS HIDROGELES.

Con el fin de estudiar la degradación de los diferentes hidrogeles se llevan a cabo distintas pruebas en las que se irradian con luz ultravioleta de 365 nm tanto los geles N_3L_3 de ambas concentraciones como los geles L_3 de concentración 75 mg/mL. Para evitar que se sequen durante el tiempo en el que se les aplica la luz, la irradiación tiene lugar de forma vertical y con los geles contenidos en viales y sumergidos en 1 mL de agua Mili-Q.



Figura 10. Esquema de la metodología de irradiación de los hidrogeles.

Se llevan a cabo cuatro pruebas diferentes:

- Hidrogel Gel- L_3 de 75 mg/mL formado por VKV-CC + RGD- L_3 . Estudio de la degradación del gel por iluminación con luz ultravioleta. Se realizan exposiciones del gel a luz UV-Vis de 5 minutos. Transcurrido este tiempo se seca y se pesa el gel, efectuando el proceso repetidamente hasta su desaparición completa.
- Hidrogel Gel- L_3 de 75 mg/mL formado por VKV-CC + RGD- L_3 . Estudio de los productos de degradación obtenidos tras la aplicación de radiación UV-Vis al gel. Se realizan exposiciones del gel a la luz ultravioleta y cada 5 minutos de exposición se extrae del vial una alícuota de 100 μ L del agua de alrededor y se añaden 100 μ L de agua Mili-Q. Las alícuotas se analizan por medio de electroforesis para determinar el peso aproximado de las moléculas obtenidas por la degradación con la luz.
- Hidrogel Gel- L_3N_3 de 75 mg/mL formado por VKV-CC y RGD- N_3-L_3 . Se irradia en gel durante 5 minutos por cada una de sus caras. A continuación se miden sus propiedades mecánicas mediante reología.
- Hidrogel Gel- L_3N_3 de 100 mg/mL formado por VKV-CC y RGD- N_3-L_3 . Se irradia el gel por una sola de sus caras durante 5, 10 y 15 minutos, sucesivamente midiendo las propiedades mecánicas por reología después de cada una de las exposiciones.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. MODIFICACIÓN QUÍMICA DEL POLÍMERO VKV CON CICLOOCTINO.

El polímero VKVx24 se ha sometido a una modificación química con (1R, 8S, 9S)-bicyclo (6.1.0.) non-4-in-9-ilmetil succinimidil carbonato. De esta forma, los grupos amino presentes en la cadena lateral de los aminoácidos lisina sufren una reacción de amidación con el derivado de NHS-éster portador de un anillo de ciclooctino. La reacción de modificación se realiza en medio orgánico, en atmósfera de nitrógeno y, tras liofilización, el rendimiento del producto aislado fue del 65%.

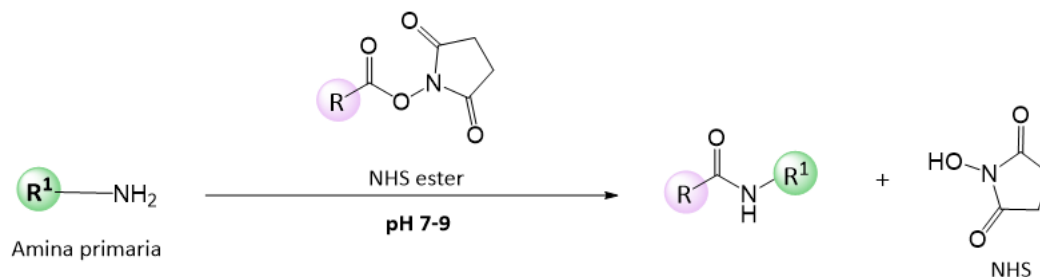


Figura 11. Esquema de la química del NHS-succinimidil ester presente en las reacciones de modificación química de los ELRs.

El VKV-CC es caracterizado por FTIR, NMR y MALDI-ToF.

- FTIR.

El polímero modificado con grupos ciclooctinilo da lugar a un espectro de infrarrojo similar al del polímero sin modificar. Es por esto que mediante esta técnica no se puede verificar si ha tenido lugar la modificación química del polímero. Esto se debe a que el ciclooctino es simétrico y hace que la absorción sea inactiva y no se vea el triple enlace sobre 2200 cm⁻¹.

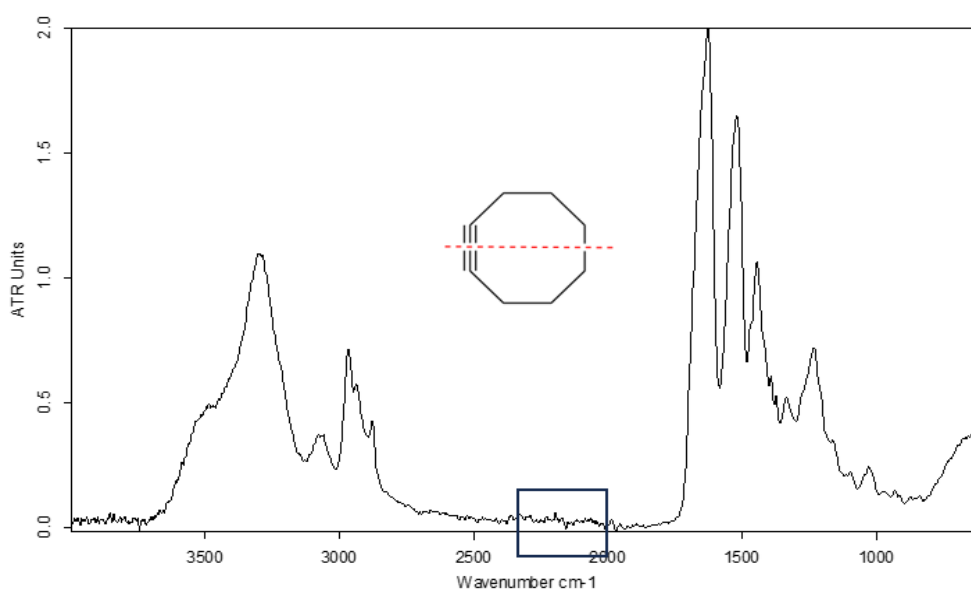


Figura 12. Espectro de infrarrojo para el VKV-CC.

○ Resonancia Magnética Nuclear.

El espectro de ^1H -RMN de VKV-CC posee las señales características del biopolímero de partida y, además, muestra nuevas señales características del polímero modificado a 7.1, 4.0 y 3.0 ppm. A partir de la integración del espectro de ^1H -RMN obtenido, se puede ver el número de lisinas del polímero que han sido modificadas.

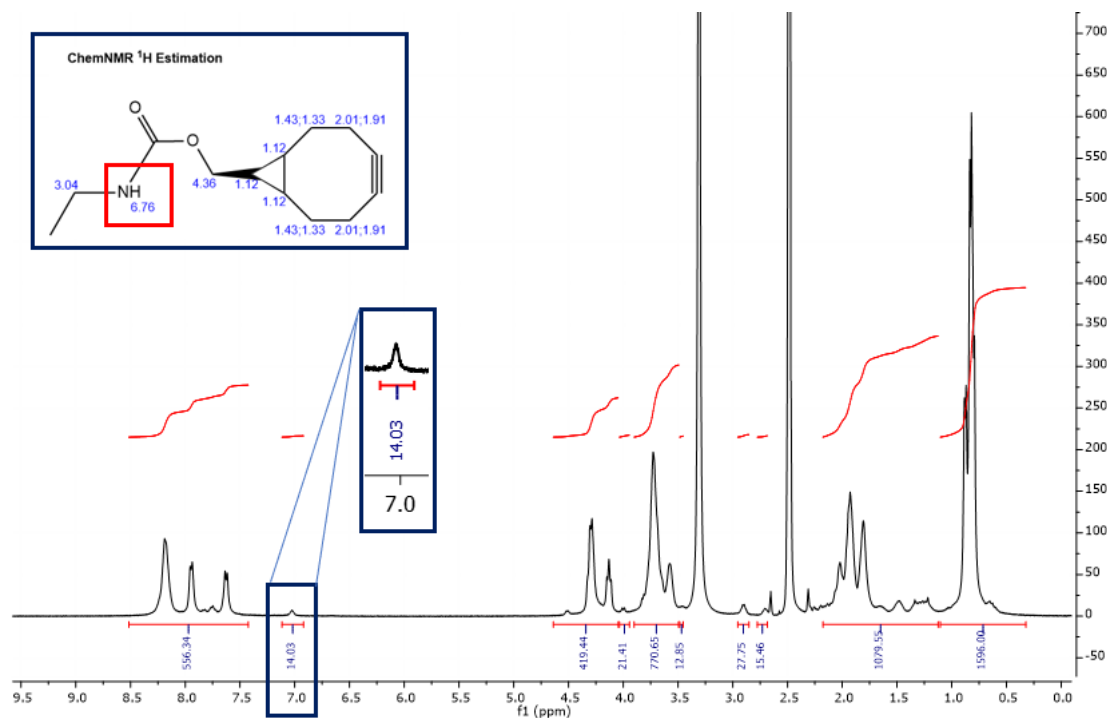


Figura 13. Espectro de ^1H -RMN del polímero de VKV-CC en que se presenta el valor de las integrales y el desplazamiento químico. Comparación del desplazamiento químico del protón del grupo amino con la predicción hecha por el programa Chemdraw.

Si se compara el espectro con el del VKVx24 de partida (ANEXO 2), se comprueba que hay varios grupos nuevos de señales. La más representativa, y que mejor nos permite ver las integrales al ser una señal aislada, es la que aparece en torno a 7 ppm. Al producirse la modificación se forma un carbamato en el lugar en el que estaba el grupo amino, haciendo que el protón de esa posición aparezca a un desplazamiento mayor. En este caso, el pico integra como 14,03 protones, lo que indica que de las 24 lisinas presentes en el polímero puro, se han modificado aproximadamente 14.

Teniendo en cuenta que se pretendía una modificación de 0,6 equivalentes, es decir, solo se puede modificar un 60% de las lisinas del polímero (14 lisinas), la conversión de esta reacción es prácticamente de un 100%.

○ MALDI-TOF.

A partir del espectro de masas (ANEXO 3) se puede conocer que el peso molecular del polímero modificado VKV-CC es de 62845 Da. Si se compara con el peso inicial del VKVx24 (60450 Da) se obtiene una diferencia de peso de 2394 Da. Conociendo que el incremento de la masa del grupo ciclooctinilo que se está introduciendo con la modificación química es de 174 Da por lisina modificada, por diferencia de pesos se puede calcular el número de lisinas que se han modificado de la siguiente forma:

$$n^{\circ} \text{ lisinas modificadas} = \frac{Pm \text{ VKVcc} - Pm \text{ VKVx24}}{Pm \text{ producto}} = \frac{62845 \text{ Da} - 60450 \text{ Da}}{176 \text{ Da}} = 13,6$$

Se han modificado aproximadamente 14 lisinas de 24, es decir, el porcentaje de sustitución ha sido casi del 100% teniendo en cuenta los equivalentes utilizados en la reacción. El resultado obtenido concuerda con el de RMN.

4.2. MODIFICACIÓN DEL POLÍMERO RGD CON GRUPOS AZIDO.

Este ELR se modifica químicamente de igual forma que el VKVx24, sustituyendo los grupos amino presentes en la cadena lateral de las lisinas por grupos azido. En este caso, se realizan tres transformaciones químicas diferentes.

En todos los casos una vez hecha la sustitución, se caracteriza el polímero por ¹H-RMN y espectrometría de masas, determinando así mismo tanto el rendimiento como el grado de modificación.

4.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO RGD-N₃.

Se modifica el polímero RGD con 0,6 equivalentes de 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato, a temperatura ambiente y atmosfera de nitrógeno, y se obtiene el biopolímero modificado en un 89% de rendimiento aislado.

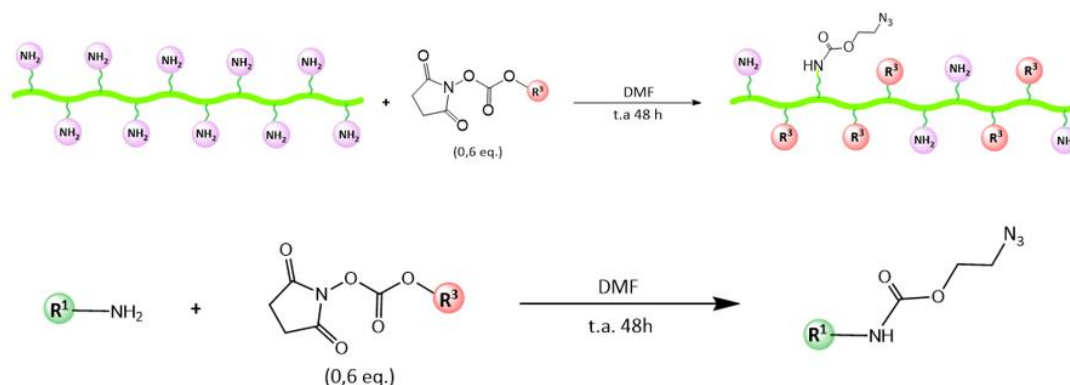


Figura 14. Esquemas de la modificación del polímero RGD con 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato

- Resonancia Magnética Nuclear.
La modificación con el grupo azido introduce tres señales nuevas respecto del espectro que se espera de un RGD sin modificar, estas aparecen a 3, 4 y 7 ppm. La señal a 3ppm se corresponde con los hidrógenos del grupo metileno contiguo al grupo amino de la cadena lateral de la lisina modificada. La señal que aparece sobre 7 ppm corresponde al H del carbamato formado. Integrando el espectro de protón y analizando esta última señal se conoce el número de lisinas del polímero que se han modificado.

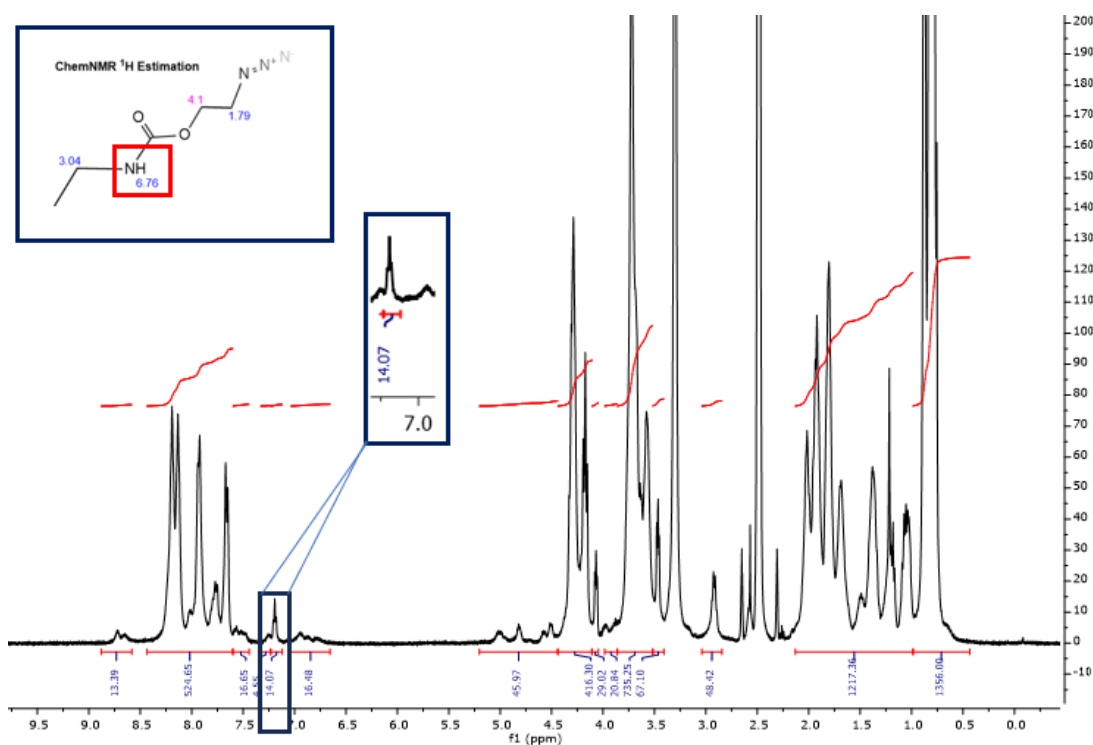


Figura 15. Espectro de ^1H -RMN del polímero de RGD- N_3 en que se presenta el valor de las integrales y el desplazamiento químico. Comparación del desplazamiento químico del protón del grupo amino con la predicción hecha por el programa Chemdraw.

Se observa que la señal que aparece sobre 7,2 ppm integra como 14,07, es decir, se han modificado 14 lisinas de 24 presentes en el polímero. Dado que con 0,6 equivalentes solo se pueden modificar un 60% de las lisinas, se puede considerar que se ha producido una conversión del 100%.

4.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO RGD- L_3 .

La modificación química del polímero RGD con 0,6 equivalentes de la azida PC-azido-PEG-3-NHS carbonatoéster se lleva a cabo a temperatura ambiente y atmósfera de nitrógeno y se obtiene el biopolímero modificado en un 90% de rendimiento aislado.

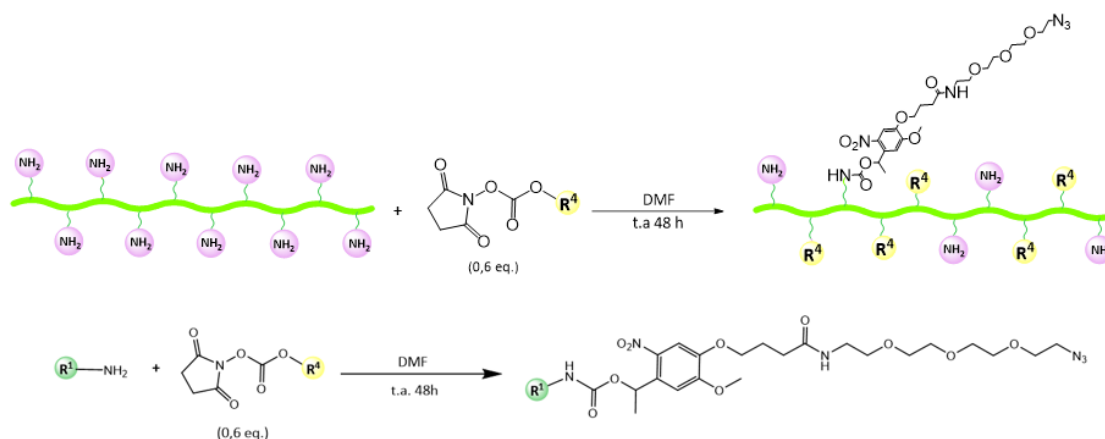


Figura 16. Esquemas de la reacción de modificación del polímero RGD con un grupo azida lábil.

○ FTIR.

Mediante espectroscopía infrarroja se ha podido observar la modificación del RGD con grupos azido, ya que este presenta la banda característica de las azidas sobre 2100 cm^{-1} que no se observa en el espectro del polímero sin modificar.

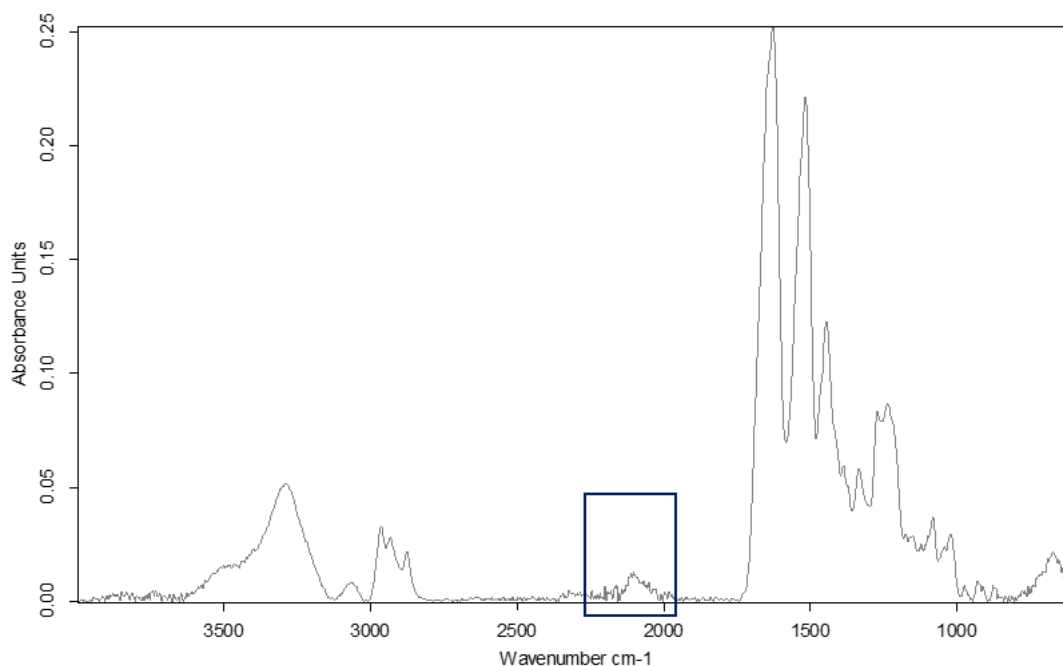


Figura 17. Espectro de infrarrojo en el que se puede apreciar la banda característica del grupo azido a 2100 cm^{-1} .

○ Resonancia Magnética Nuclear.

La señal característica en la que nos fijamos para analizar la sustitución corresponde al protón metínico adyacente al grupo carbamato y aparece aproximadamente a 6,1 ppm. En este caso, se han utilizado 0,6 equivalentes de azida fotolábil, por lo que el número máximo de lisinas modificables sería 14.

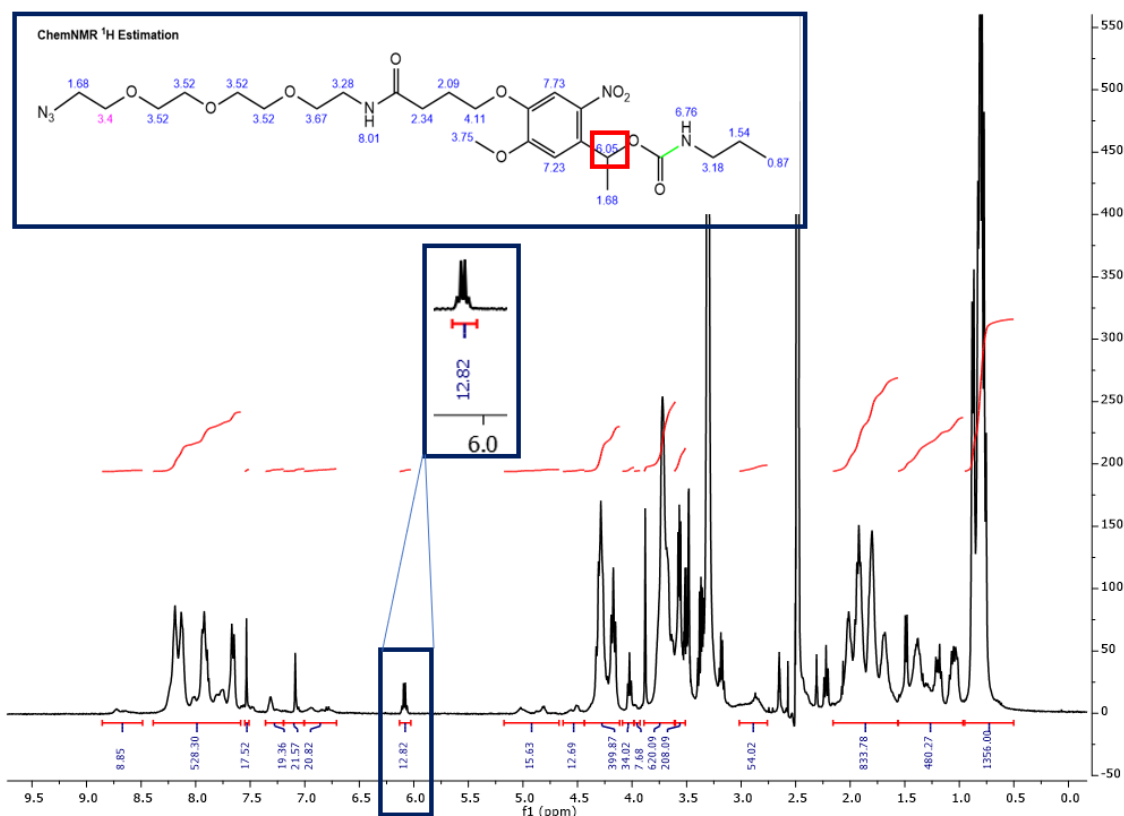


Figura 18. Espectro de ^1H -RMN del polímero de RGD- L_3 . Comparación del desplazamiento químico del protón del grupo CH adyacente al carbamato con la predicción hecha por el programa Chemdraw.

Analizando el ^1H -RMN obtenido se comprueba que la modificación química no ha tenido lugar de forma completa, ya que la señal integra por 13 protones, indicando que una de las 14 lisinas derivatizables no ha sido modificada. Por tanto la conversión para la reacción en este caso es del 93%.

4.2.3. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO RGD- N_3 - L_3 .

En este caso, la modificación química se lleva a cabo adicionando simultáneamente 0,3 equivalentes de cada una de las dos azidas 2-(azidoetil) (2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato y PC-azido-PEG-3-NHS carbonatoéster, a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno, y se obtiene el biopolímero modificado en un 93% de rendimiento aislado.

- Resonancia Magnética Nuclear.

Tras esta modificación química, el espectro obtenido por ^1H -NMR, muestra, como era de esperar, las mismas señales características del biopolímero RGD- L_3 del apartado anterior (4.2.2) pero con una menor intensidad de las mismas, ya que se han utilizado únicamente 0,3 equivalentes de esa azida. Sin embargo, cabe esperar señales nuevas correspondientes a la azida con el enlace fotolábil. La más

característica aparece sobre los 6,1 ppm y corresponde con el grupo metino adyacente al carbamato de dicha azida lábil.

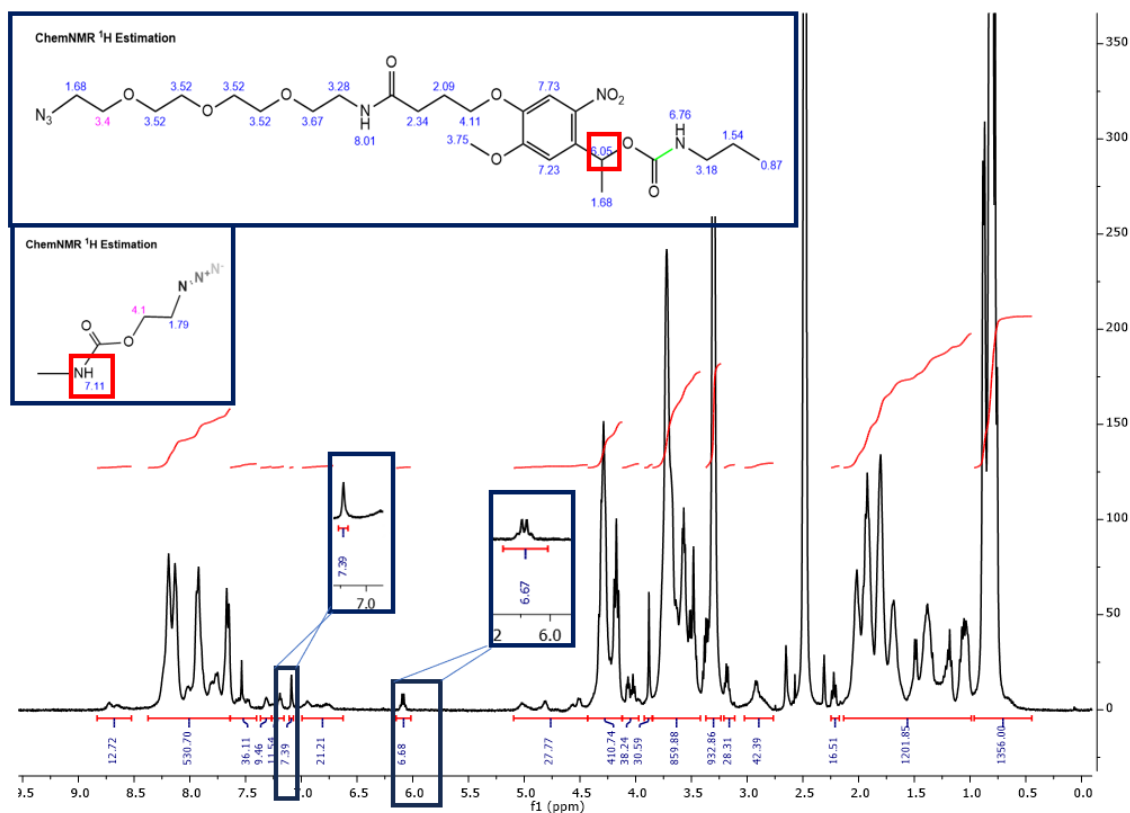


Figura 19. Espectro de ¹H-RMN del polímero de RGD-N₃-L₃. Comparación de los desplazamientos químicos obtenidos con la predicción hecha por el programa Chemdraw.

Se observan en el espectro recuadradas las señales representativas del polímero modificado. La señal a 7.2 ppm corresponde al protón amídico de la azida estable a la luz e integra como 7 protones (I= 7.39). La señal a 6.1 ppm corresponde al metino adyacente al carbamato de la azida fotolábil, que integra como 7 protones (I= 6,67). Del valor de las integrales deducimos que en el polímero se han modificado un total de 14 lisinas, en igual proporción de ambas, como era deseado. La conversión de esta reacción es, por tanto, de aproximadamente un 100 %.

○ MALDI-TOF.

Mediante espectrometría de masas (ANEXO 4) se ha determinado que el peso molecular del RGD-N₃-L₃ es de 64421 Da. Teniendo en cuenta el peso del RGD inicial sin modificar (60600 Da), se observa un aumento de 3821 Da. Dado que en este caso el polímero ha sido modificado químicamente con dos tipos de azida diferentes, como hemos visto anteriormente, se esperan dos fragmentos

diferentes que contribuyen al aumento del peso molecular con diferentes masas, 113 Da para la incorporación de la azida convencional y 525 Da para la incorporación de la azida fotolábil. De esta forma, y confirmando con el RMN, suponemos que 7 de las 14 lisinas se han modificado con la azida convencional, aportando un peso de 791 Da. El peso restante será, por tanto, de las lisinas modificadas con azida fotolábil, dando un total de 6 lisinas sobre 14 modificadas con este grupo. Se observa, por tanto, una pequeña discrepancia en la determinación de la modificación de las lisinas por ambos métodos espectroscópicos, propia de la naturaleza diferente de los análisis.

4.3. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DEL POLÍMERO AL IRRADIARLO CON LUZ UV.

Una vez modificado el polímero RGD, tanto con azida estable y azida lábil, RGD-N₃-L₃, como sólo con azida lábil, RGD-L₃, se estudia la degradación de estos polímeros al irradiarlos con luz ultravioleta.

El procedimiento utilizado consistió en la irradiación, con una luz UV-Vis de 365 nm, de una disolución del polímero en un disolvente deuterado como el DMSO. La disolución del polímero, en agitación, se irradia durante un determinado periodo de tiempo, tras el cual, se toma una alícuota del mismo y se analiza por ¹H-RMN (apartado 3.5.4 de materiales y métodos. En la *Figura 9* se muestra una representación del montaje diseñado.)

La exposición de los ELRs a la luz ultravioleta provoca la ruptura de los enlaces lábiles de la azida. El análisis de las alícuotas de los diferentes tiempos de exposición a la luz por ¹H-RMN permitió observar la evolución de los fragmentos de la azida fotolábil.

Como se muestra en la *Figura 20* tras irradiación con luz UV-Vis, la azida lábil rompe generando un grupo carbonilo por oxidación del metino inicial adyacente al carbamato, por lo que esta señal del metino desaparece a medida que se produce la degradación del biopolímero. Es, por tanto, esta señal del metino a 6.2 ppm la que tomaremos de referencia para analizar la degradación del polímero por ¹H-RMN.

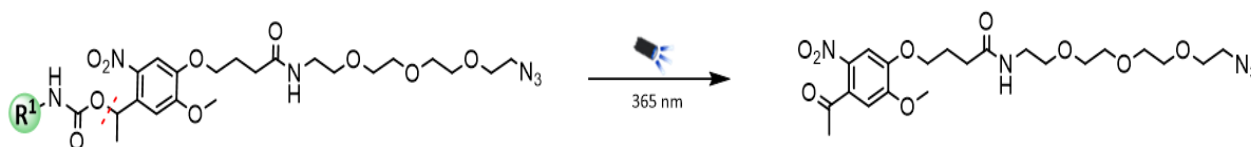


Figura 20. Esquema general de la ruptura de la azida lábil al ser irradiada con luz ultravioleta.

- Comportamiento de RGD-L₃ frente a la irradiación con luz UV-Vis.

Con objeto de estudiar el comportamiento de la azida fotolábil frente a la irradiación UV-Vis, llevamos a cabo en primer lugar el análisis de la degradación del biopolímero RGD-L₃ en donde todos los grupos azido presentan enlace lábil.

En el caso del RGD-L₃ se toman muestras a cinco tiempos diferentes y se va observando el oscurecimiento de la disolución del polímero al aumentar el tiempo de irradiación.

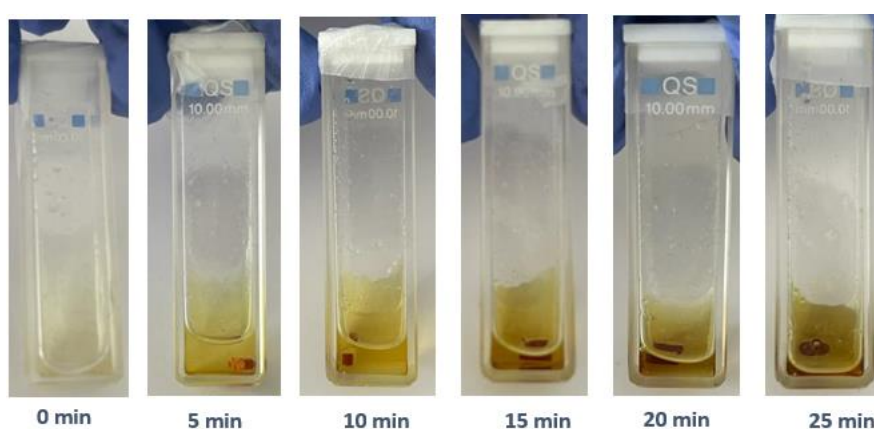


Figura 21. Cambio de color de la disolución del polímero RGD-L₃ en DMSO-d₆ a los diferentes tiempos de exposición a la luz ultravioleta.

Inicialmente este ELR poseía 13 lisinas modificadas tal y como se ve en el apartado 4.2.2. A partir de los ¹H-RMN se comprueba que tras 5 minutos de exposición a la luz, la integral de la señal del grupo metino a 6,2 ppm disminuye de 13 a 11,2, lo que significa que se han degradado dos de los enlaces fotolábiles de dos de las lisinas modificadas.

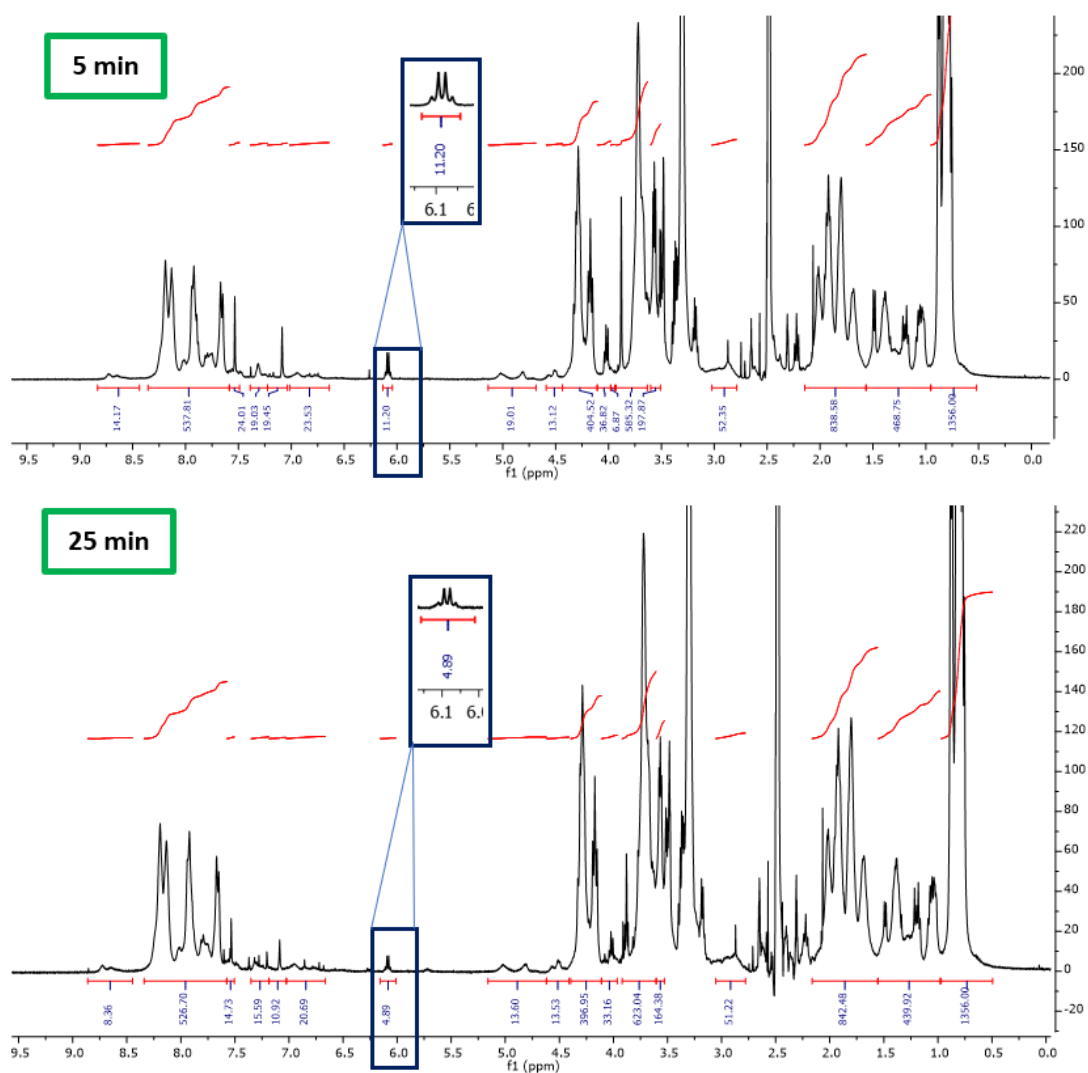


Figura 22. Comparación de la integral de la señal característica de la azida fotolábil tras 5 y 25 minutos de irradiación con luz ultravioleta.

Según los tiempos de irradiación aplicados, la señal a 6,1 ppm que nos indica el número de lisinas que siguen teniendo enlace con la azida fotolábil varía de la siguiente forma:

Tabla 5. Número de lisinas modificadas con azida fotolábil que se detectan por ^1H -RMN a diferentes tiempos de irradiación con luz ultravioleta.

t (minutos)	N ° Lisinas modificadas
0	13
5	11
10	9
15	7
20	5

25

4-5

Se comprueba de esta forma que, en este polímero en el que hay modificadas químicamente 13 de 24 lisinas con una azida fotosensible, cada 5 minutos se rompen aproximadamente dos de estos enlaces fotolábiles hasta llegar a los 20 minutos de exposición, donde se estabiliza el número de lisinas no degradadas, probablemente debido a un problema en la experimentación, ya que la disolución se encuentra muy densa (ANEXO 5, 6 y 7).

- Comportamiento de RGD-N₃L₃ frente a la irradiación con luz UV-Vis.

Una vez comprobada la capacidad del grupo NB-carbamato para ser degradado por irradiación con UV-Vis, llevamos a cabo el estudio de la degradación del biopolímero RGD-N₃-L₃ utilizando la misma metodología que en el apartado anterior para RGD-L₃. Se observa de igual forma el cambio de color, a medida que aumenta la exposición a la luz ultravioleta, que va desde un amarillo pálido característico de la azida PC-azido-PEG-3-NHS carbonatoéster a un marrón-amarillo intenso.

En el caso de del RGD-N₃L₃ se toman muestras a cuatro tiempos diferentes, que se analizan por NMR y se va observando el oscurecimiento de la disolución del polímero al aumentar el tiempo de irradiación.

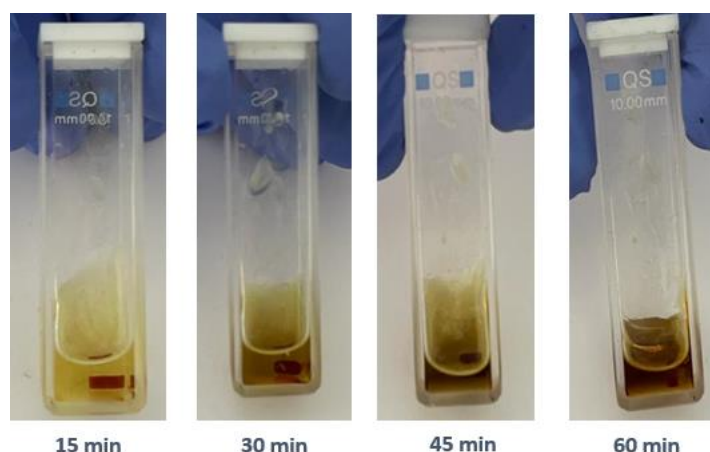


Figura 23. Progresión del color de la disolución de RGD-N₃-L₃ en DMSO-d₆ al aumentar el tiempo de irradiación.

Tal y como se ve en la *Figura 19* del apartado 4.4.3 el espectro de ¹H-RMN del biopolímero RGD-N₃-L₃ cuenta con 7 lisinas modificadas con la azida fotolábil como muestra la integral de su señal a 6.2 ppm correspondiente al metino adyacente al carbamato que tomamos de referencia. Si se comparan los



espectros de ^1H -RMN tras la irradiación, se puede observar que a los 15 minutos de exposición la integral del metino prácticamente no ha variado, es decir, que los enlaces fotolábiles aún no se han roto. Sin embargo, tras 30 minutos de exposición se comprueba que la señal característica ya sólo integra por 2 protones (*Figura 24*), tras 45 minutos de irradiación, la señal correspondiente al metino prácticamente ha desaparecido, por lo que todos los enlaces de la azida fotosensible ya se han roto. Por tanto, comprobamos que la irradiación con UV-vis es eficaz para degradar el enlace fotolábil propuesto, NB-carbamato, cuando se encuentra unido a la cadena biopolimérica, tanto en el polímero RGD-L₃ como en RGD-N₃L₃.

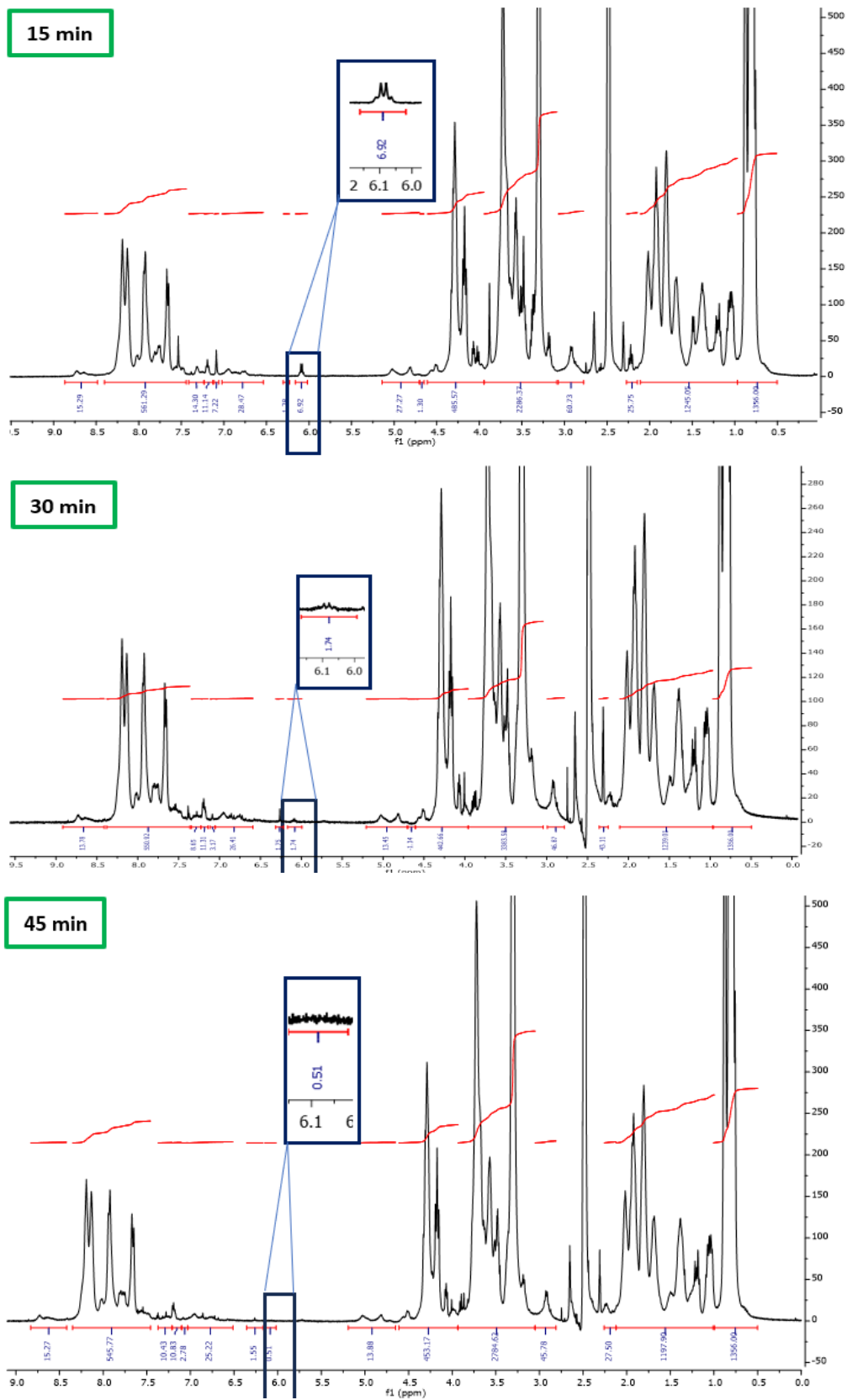


Figura 24. Comparación de la integral de señal característica de la azida fotolábil a los 15, 30 y los 45 minutos tras la irradiación con luz ultravioleta.

4.4. FORMACIÓN DE HIDROGELES.

Una vez comprobada la eficacia de la irradiación UV-vis para degradar los enlaces NB-carbamato presentes en los biopolímeros tipo elastina modificados con grupos azida fotolábiles, nuestro siguiente objetivo fue la preparación de los hidrogeles fotosensibles. Los hidrogeles que se obtuvieron en este trabajo fueron formados a partir de los polímeros modificados químicamente VKV-CC, RGD-N₃L₃ y RGD-L₃, por entrecruzamiento vía química click sin catalizador. Como se ha comentado anteriormente, esta metodología se basa en la cicloadición de Huisgen de los grupos azido y ciclooctino que dan lugar a la formación de un anillo de 1,2,3-triazol, a través del cual ambos polímeros quedan enlazados.

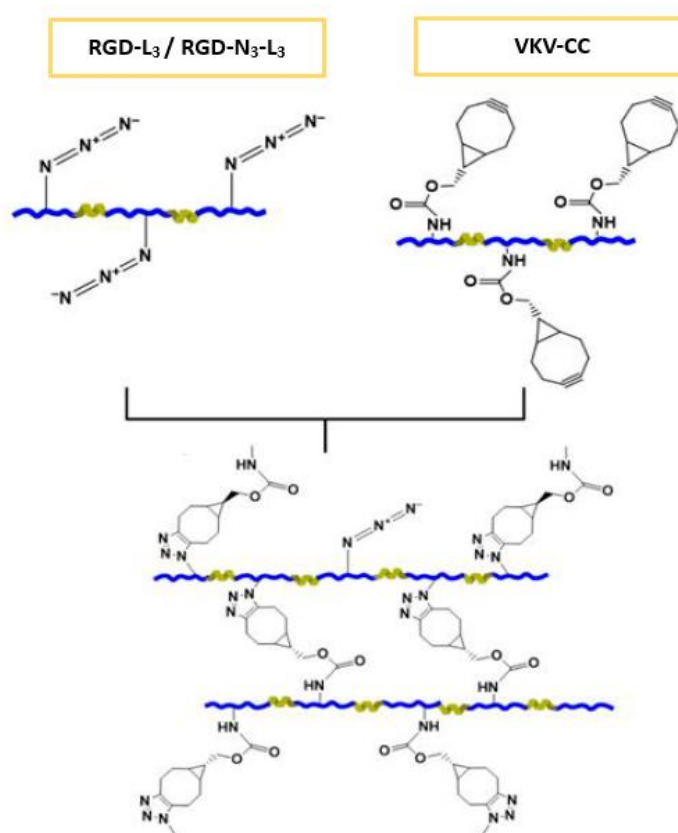


Figura 25. Esquema de la formación del hidrogel por el entrecruzamiento de las cadenas laterales de los polímeros que han sido previamente modificados químicamente con grupos azida y ciclooctino.

Siguiendo la metodología comentada en el apartado 3.5.5. se obtienen diferentes hidrogeles con concentraciones de 75 y 100 mg/mL, en moldes cilíndricos y con un diámetro de 12 mm. Los hidrogeles Gel-L₃ de concentración 75 mg/mL se preparan a partir de las disoluciones de VKV-CC y de RGD-L₃ de concentración 75 mg/mL y mezclando volúmenes iguales de ambas concentraciones (200 uL de cada uno) en el molde de 12 mm de diámetro.

Los geles Gel-N₃-L₃ de 75 mg/mL se preparan de manera similar al Gel-L₃, si bien utilizando disoluciones de RGD-N₃L₃ y de VKV-CC a 75 mg/mL. Finalmente, los Gel-N₃L₃ de 100 mg/mL de concentración se obtienen con la misma metodología pero utilizando en esta ocasión disoluciones de VKV-CC y de RGD-N₃L₃, ambas, de concentración 100 mg/mL y utilizando volúmenes iguales en la mezcla depositada en el molde de 12 mm de diámetro. En la *Figura 26* se muestra una imagen del Gel-N₃-L₃ a una concentración de 100 mg/mL.

- VKV-CC + RGD-L₃.
- VKV-CC + RGD-N₃L₃.



Figura 26. Fotografía del hidrogel Gel-N₃L₃ de concentración 100 mg/mL obtenido por entrecruzamiento de VKV-CC y RGD-N₃-L₃

4.5. DEGRADACIÓN POR LUZ DE HIDROGELES.

Una vez obtenidos los hidrogeles, el siguiente objetivo consistió en estudiar su degradación vía exposición a luz ultravioleta. Para ello, los hidrogeles se irradian con luz UV-Vis en un vial donde se encuentran sumergidos en agua. La exposición a la luz se da en diferentes condiciones y se obtienen así los siguientes resultados.

- Hidrogel Gel-L₃ de 75 mg/mL formado por VKV-CC + RGD-L₃.
Se aplica luz ultravioleta sobre el hidrogel y cada 5 minutos, este se seca y se pesa con el fin de ver la evolución de su pérdida de peso y su consistencia, en relación a su degradación fotosensible. Se obtiene así la siguiente gráfica:

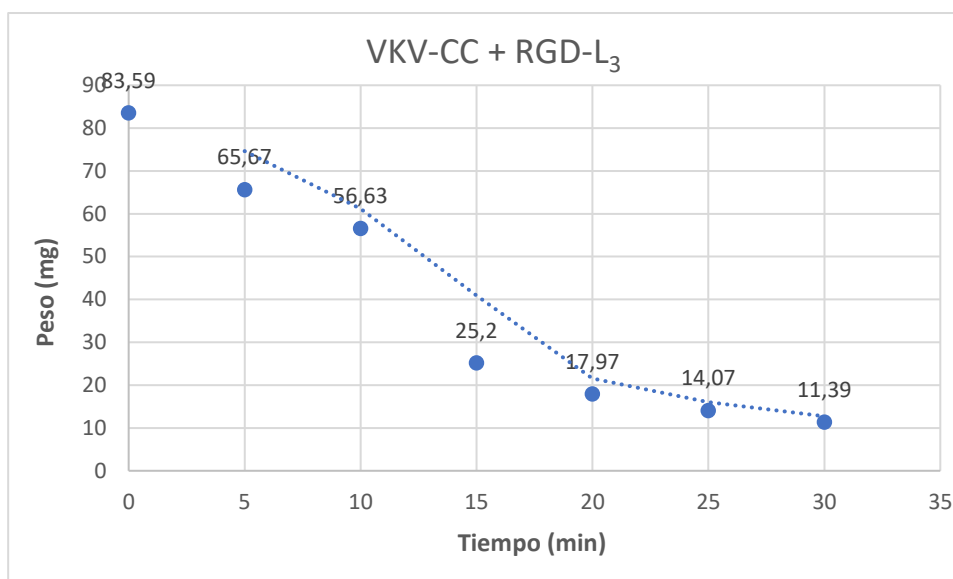


Figura 27. Representación de la variación en el peso del hidrogel con su exposición a la luz ultravioleta.

Como se puede observar en la gráfica, cuanto mayor es el tiempo de exposición el peso va disminuyendo, la consistencia del gel va siendo cada vez menos compacta y el color cada vez es más amarillento, hasta llegar a los 35 minutos de irradiación. En este punto el hidrogel ha perdido su consistencia por completo y queda en forma de pequeños fragmentos.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la degradación del polímero modificado RGD-L₃, del que está compuesto el hidrogel, con el mismo procedimiento, donde se observa la casi total desaparición de los enlaces fotolábiles tras 25 minutos de exposición a la radiación UV. Por tanto, podemos decir que los hidrogeles fotosensibles preparados son, efectivamente, degradados totalmente por radiación UV.

- Hidrogel Gel-L₃ de 75 mg/mL formado por VKV-CC + RGD-L₃.
Comprobado que el gel fotosensible, efectivamente, es degradable por la luz UV, analizamos los productos de degradación del mismo en el siguiente experimento. De igual forma que en la prueba anterior, se aplica luz ultravioleta sobre el gel sumergido en agua y en este caso cada 5 minutos se extrae de la disolución del vial una alícuota, a partir de la cual se hará una electroforesis para analizar la presencia o no de material polimérico proteico. Esto sirve para evaluar la degradación del hidrogel a partir de los restos de polímero que quedan en disolución durante la irradiación.

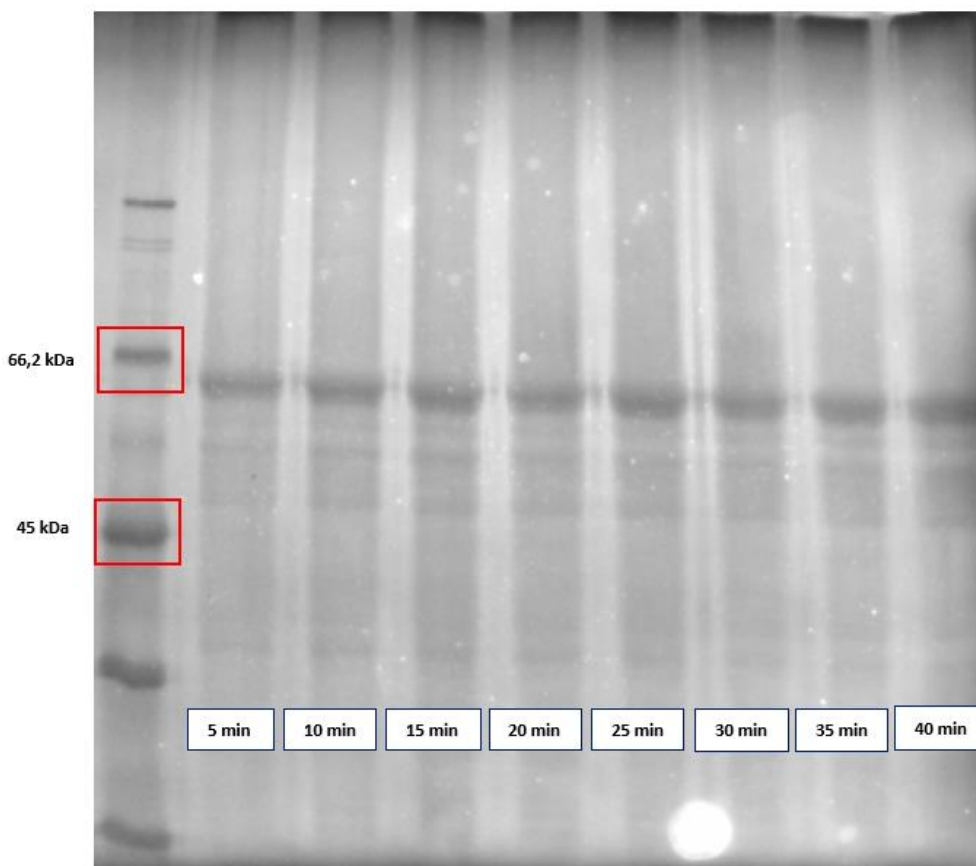


Figura 28. Electroforesis de la descomposición del hidrogel Gel-L₃.

La electroforesis realizada con las alícuotas tomadas cada 5 minutos de exposición a UV, junto con el marker correspondiente a la primera calle, muestra las bandas observadas en la *Figura 28*. Analizando el rango en el que han aparecido las bandas de las alícuotas se comprueba que, para todas ellas, aparece una banda entre el marcador con peso molecular de 45 kDa y el de 66,2 kDa (remarcados en rojo), estando más cerca de este último.

Dado que los ELRs, RGD y VKVx24, de los que está compuesto el hidrogel que se está degradando, presentan un peso molecular de 60661 y 60451 Da, respectivamente, se puede comprobar que la señal que se obtiene a los diferentes tiempos aparece a una altura en la que podría corresponderse en peso con estos biopolímeros. Además, se puede ver como cuanto mayor es el tiempo de exposición a la luz ultravioleta, más ancha es la línea, es decir, se encuentra en disolución más cantidad de biopolímero.

Por tanto, el estudio de los resultados de la electroforesis nos permite confirmar que al aplicar luz ultravioleta al hidrogel, los enlaces fotosensibles de los grupos azido van desapareciendo, ocasionando que el gel pierda su consistencia al romperse el entrecruzamiento de las cadenas del gel y haciendo que los restos de los polímeros pasen a formar parte de la disolución. El peso obtenido para las alícuotas muestra la ruptura de todos los enlaces fotolábiles hasta formar

polímeros proteicos de peso molecular análogo a los de los ELRs utilizados en la formación del gel, alrededor de 60000 Da, como muestra la altura de la banda obtenida.

Por tanto, hemos comprobado con los dos experimentos anteriores que, los hidrogeles fotosensibles preparados, efectivamente, pueden ser degradados por irradiación con luz UV-Vis. Además, la degradación se produce de manera gradual en el tiempo, por lo que nos podría servir para cumplir con el objetivo propuesto de estudiar la variación de las propiedades mecánicas de los hidrogeles al irradiarlos con luz ultravioleta.

- Hidrogel Gel-N₃-L₃ de 75 mg/mL formado por VKV-CC y RGD-N₃-L₃.
Una vez comprobada la degradación de los hidrogeles que poseen todos sus entrecruzamientos con enlaces fotolábiles, nos propusimos estudiar el comportamiento ante la irradiación con UV de los hidrogeles Gel-L3N3, que poseen entrecruzamientos con enlaces fotolábiles y con enlaces estables a la luz. El siguiente experimento realizado consistió en irradiar el gel durante 5 minutos con luz UV por cada una de sus caras y, posteriormente, medir sus propiedades mecánicas por reología. Los resultados obtenidos se presentan en función del módulo elástico G' y módulo de pérdida G'' medidos para los geles "*Gel-N₃-L₃ irradiado 5-5 min*" y se explica en el apartado 4.6.
- Hidrogel Gel-N₃-L₃ de 100 mg/mL formado por VKV-CC y RGD-N₃-L₃.
Con el fin de comprobar si la luz ultravioleta aplicada únicamente por una cara afecta a las propiedades mecánicas de todo el hidrogel, este se irradia durante 5 minutos sólo por una cara y se miden sus propiedades mecánicas mediante reología. Dado que el gel sigue manteniendo su consistencia se aplican 10 minutos más de luz ultravioleta por la misma cara y, finalmente, 15 minutos adicionales, midiendo de nuevo la variación de las propiedades mecánicas del hidrogel mediante reología. Los resultados obtenidos para los diferentes tiempo de exposición se presentan en el apartado 4.6 como "*Gel-N₃-L₃ irradiado 5 min, 15 min y 30 min*".

4.6. MEDIDAS REOLOGICAS EN HIDROGELES.

La reología, tal como se ha comentado anteriormente, es la ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia. Podemos, así, a partir de esta técnica medir las propiedades mecánicas de los hidrogeles, caracterizadas por los valores de los módulos elástico (G') y de pérdida (G'').

Una vez preparados los geles, fueron caracterizadas sus propiedades siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 3.5.6.1. En todos los casos, los geles preparados

han sido de 12 mm de diámetro, como corresponde para la geometría del reómetro utilizada para su análisis. Se han obtenido así los siguientes resultados para los diferentes hidrogeles medidos.

En la *Figura 29* se muestran los valores de los módulos elástico y de pérdida obtenidos para los geles preparados a 75 y 100 mg/mL. Así, para una frecuencia de 1 Hz se observa un G' promedio de 1650 Pa para el gel de 75 mg/mL y un G' de 2128 para el de 100 mg/mL. Al comparar los módulos elásticos para los geles de distinta concentración, se comprueba que cuanto mayor es la concentración, mayor es también el comportamiento elástico.

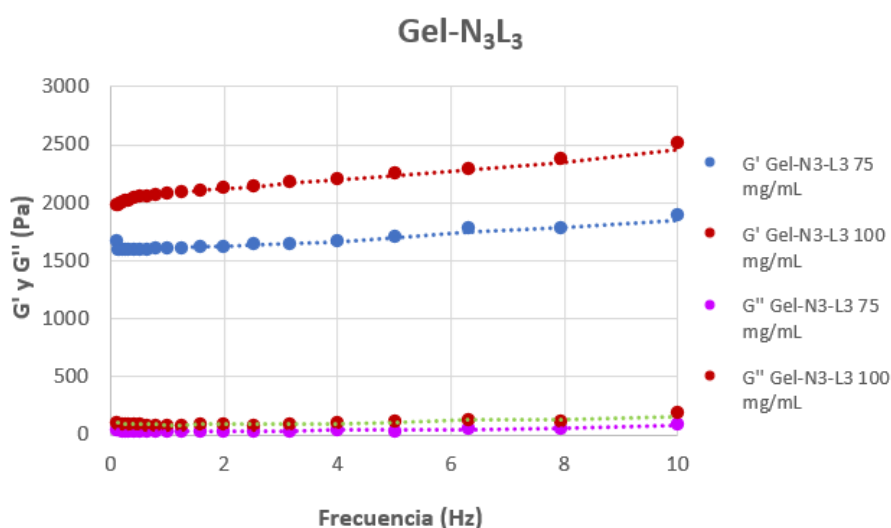


Figura 29. Representación gráfica de la variación del módulo elástico (G') y el módulo de pérdidas (G'') de dos hidrogeles a concentraciones de 75 y 100 mg/mL y medidas a 37 °C.

En ambos casos se puede ver que, el módulo elástico o de almacenamiento (G') es siempre mayor que el módulo viscoso o de pérdida (G''). Esto nos confirma, que en las condiciones propuestas, los hidrogeles medidos tienen un comportamiento esencialmente elástico.

En cuanto a la dependencia de la concentración, el hidrogel de 100 mg/mL presenta un módulo de almacenamiento más elevado, es decir, la capacidad del material para reestablecerse tras serle aplicado una energía mecánica es mayor haciéndolo más elástico y consistente.

El estudio de las propiedades mecánicas del gel tipo Gel-N₃L₃ de concentración 75 mg/mL muestran un módulo elástico (G') que oscila entre 1596 y 1897 Pa para frecuencias entre 0,1 y 10 Hz y unos valores de G'' entre 48 y 94 Pa. Las propiedades mecánicas del Gel-N₃L₃ son similares a las de los hidrogeles obtenidos en estudios previos del grupo cuando los enlaces de las azidas eran estables a la luz, en los que para concentraciones de 50 mg/mL y 100 mg/mL, a 37 °C, los geles poseen valores medios de G' de 1600 Pa y 4500 Pa respectivamente [16]

A continuación, llevamos a cabo las medidas reológicas del Gel-N₃L₃ irradiado durante 5 minutos por cada una de sus caras con luz ultravioleta, medido en las mismas condiciones de temperatura, 37 °C. El análisis reológico muestra módulos mucho más pequeños con valores de G' entre 225 y 448 Pa y G'' entre 5 y 44 Pa, lo que indica que el gel ha variado sus propiedades mecánicas en gran proporción tras la irradiación (*Figura 30*). Este resultado corrobora la pérdida parcial de entrecruzamiento químico de las cadenas del hidrogel, materializado en módulo G' y G'' mucho más bajos. La siguiente irradiación de 5 minutos en ambas caras del gel llevada a cabo en la muestra dio lugar a un gel “roto” al cual ya no se le pudieron siquiera medir sus propiedades reológicas.

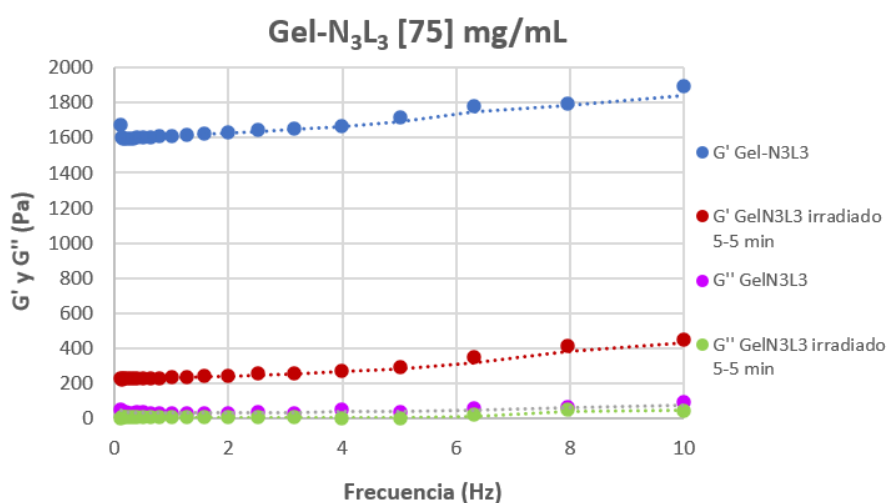


Figura 30. Representación gráfica de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') frente a la frecuencia para dos geles de tipo Gel-N₃-L, uno de ellos irradiado durante 5 minutos por cada una de sus caras y medidas a 37 °C.

Por lo que respecta a los hidrogeles tipo Gel-N₃L₃ de concentración 100 mg/mL, se llevaron a cabo diferentes medidas. En el caso del gel sin irradiar el módulo de almacenamiento se encuentra en un rango entre 1986 y 2523 Pa (*Figura 31*). Cuando se analiza en las mismas condiciones el gel irradiado con luz ultravioleta durante 5 minutos por una de sus caras, se comprueba que el módulo elástico disminuye hasta una media de unos 1600 Pa. Con las siguientes exposiciones a la luz ultravioleta los valores para el módulo de almacenamiento siguen disminuyendo hasta una media de 1400 y 1100 Pa después de los 15 y 30 minutos de irradiación, respectivamente.

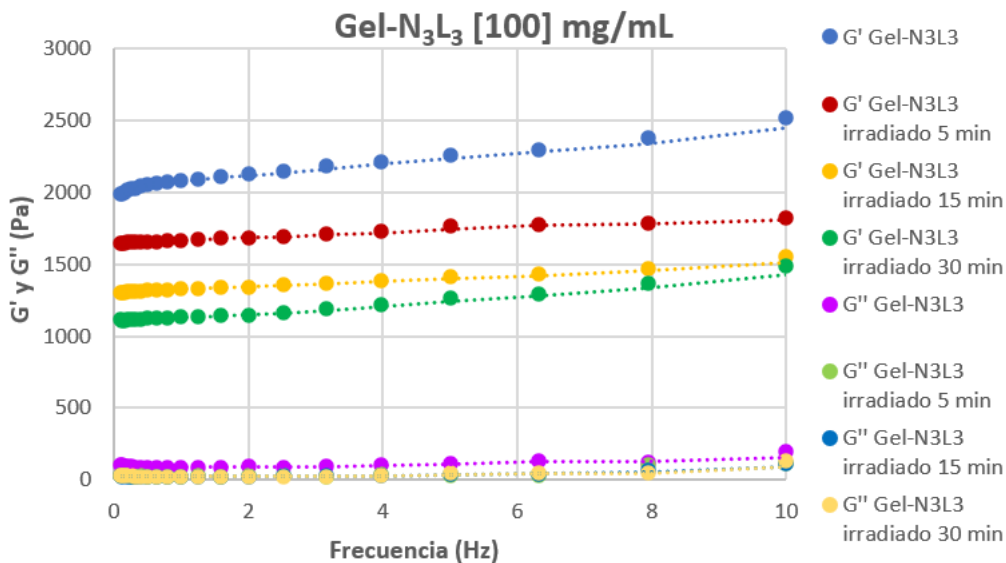


Figura 31. Representación gráfica de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') frente a la frecuencia para dos gels de tipo $Gel-N_3L_3$ con concentración 100 mg/mL , uno de ellos irradiado durante 5, 15 y 30 minutos por una de sus caras y a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Por tanto, vamos observando cómo los entrecruzamientos de las cadenas van degradándose progresivamente en el tiempo y el gel va perdiendo sus propiedades mecánicas.

El hecho de haberlo irradiado sólo por una cara, y su mayor concentración respecto al de 75 mg/mL previamente ensayado, ha hecho que las propiedades mecánicas del gel varíen más lentamente que para el gel irradiado por ambas caras. Estos estudios previos nos permiten afirmar que la degradación por UV es gradual con el tiempo de exposición y abren la puerta a nuevos estudios para determinar con mayor rigor el comportamiento de los hidrogeles fotosensibles frente a la radiación UV.

Los experimentos realizados en este trabajo fin de Master han permitido preparar los hidrogeles y realizar los estudios previos de su degradabilidad gradual con la luz UV-Vis, poniendo las bases para estudios posteriores, si bien parecen resultados prometedores en sí mismo.

4.7. SEM.

En este trabajo, el uso de la microscopía electrónica de barrido permite la obtención de las micrografías que se muestran en la *Figura 32*. Con estas imágenes se puede realizar un análisis cualitativo a partir de los de los parámetros morfológicos del hidrogel. Se han utilizado para ello muestras de $Gel-N_3L_3$ a las concentraciones de 75 mg/mL y 100 mg/mL .

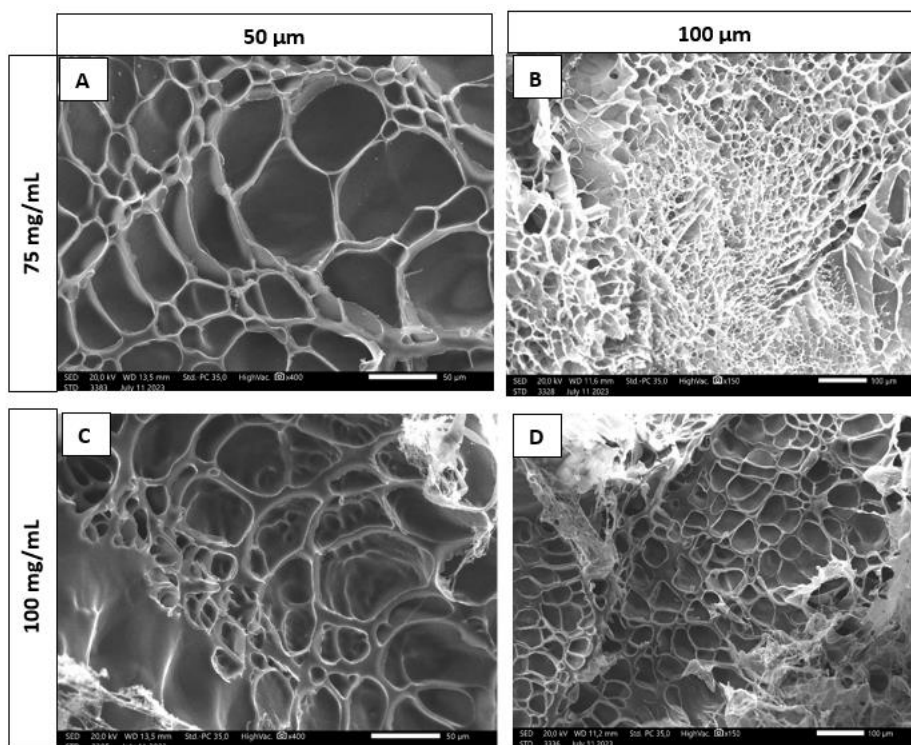


Figura 32. Micrografías SEM representativas del Gel- N_3L_3 a concentraciones de a) y b) 75 mg/mL y c) y d) 100 mg/mL

Las micrografías de SEM muestran geles porosos, con tamaño de poro mayor para los geles de 75 mg/mL. Como se puede observar, al aumentar la concentración del hidrogel, la estructura se vuelve más densa y compacta y presenta una pared un poco más gruesa. El aumento de concentración provoca que el tamaño de poro disminuya, al contrario que lo hace el espesor de la pared.

Se aprecia para ambos geles una geometría de los poros mayormente circular o elipsoidal. La morfología de los geles es similar a la de los hidrogeles obtenidos vía click previamente en el grupo para azidas estables a la luz, como consecuencia de la naturaleza similar de los biopolímeros utilizados.

5. CONCLUSIONES.

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio para la preparación de hidrogeles químicos fotosensibles, vía reacciones click, utilizando para ello biopolímeros tipo elastina, ELRs, que hemos modificado químicamente con azidas con enlace lábil NB-carbamato sensible a la luz. Se han preparado geles fotosensibles de diferentes concentraciones, se han caracterizado y se ha estudiado su degradación por irradiación con luz UV-Vis.

Destacamos las siguientes conclusiones:

- El biopolímero RGD se ha modificado químicamente y se ha caracterizado satisfactoriamente tanto cuando se han introducido 0,6 equivalentes de la azida fotolábil como cuando se han introducido 0,3 equivalentes de azida fotolábil y 0.3 equivalentes de azida estable a la luz.
- Se ha estudiado la cinética de degradación de los polímeros modificados, RGD-N₃-L₃ y RGD-L₃, tras ser irradiados con luz ultravioleta, observándose la degradación de ambos y siendo ligeramente más rápida dicha degradación en el caso del biopolímero con todas sus azidas lábiles, RGD-L₃.
- Se han preparado hidrogeles vía metodología click a partir de los polímeros RGD modificados con azidas lábiles junto con otro polímero modificado con ciclooctino, VKV-CC.
- Se ha estudiado la degradación del Gel-L₃ bajo luz UV-Vis observándose su total desaparición y la generación como residuos de polímeros proteicos de pesos similares a los biopolímeros de partida, tras la ruptura de todos los enlaces lábiles NB-carbamato.
- Se ha estudiado la degradación del Gel-N₃L₃ bajo luz UV-Vis observándose la variación progresiva de sus propiedades mecánicas debida a la ruptura de enlaces lábiles NB-carbamato. El análisis reológico muestra la pérdida de entrecruzamientos de las cadenas que dan la consistencia elástica al hidrogel con el tiempo de exposición a la luz.

Por tanto, en este trabajo fin de Master, se han puesto a punto las bases para la obtención de hidrogeles fotosensibles con propiedades mecánicas regulables con la exposición a la luz UV-Vis. Se ha cumplido, por tanto, con el objetivo del trabajo y se prevén futuras investigaciones que puedan analizar el comportamiento celular en geles diferentemente irradiados y, por tanto, con propiedades mecánicas diferentes. Estos resultados tendrán gran aplicación en el área de la Ingeniería de tejidos.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] B. Bochicchio, A. Pepe, y A. M. Tamburro, «Investigating by CD the molecular mechanism of elasticity of elastomeric proteins», en *Chirality*, 2008, pp. 985-994. doi: 10.1002/chir.20541.
- [2] F. J. Arias, V. Reboto, S. Martín, I. López, y J. C. Rodríguez-Cabello, «Tailored recombinant elastin-like polymers for advanced biomedical and nano(bio)technological applications», en *Biotechnology Letters*, may 2006, pp. 687-695. doi: 10.1007/s10529-006-9045-3.
- [3] S. M. Mithieux y A. S. Weiss, «ELASTIN», 2005, doi: 10.1016/S0065-3233(04)70013-3.
- [4] J. C. Rodríguez-Cabello, L. Martín, M. Alonso, F. J. Arias, y A. M. Testera, «“Recombinamers” as advanced materials for the post-oil age», *Polymer*, vol. 50, n.º 22. Elsevier BV, pp. 5159-5169, 20 de octubre de 2009. doi: 10.1016/j.polymer.2009.08.032.
- [5] R. E. Sallach *et al.*, «Long-term biostability of self-assembling protein polymers in the absence of covalent crosslinking», *Biomaterials*, vol. 31, n.º 4, pp. 779-791, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.082.
- [6] F. W. Keeley, C. M. Bellingham, y K. A. Woodhouse, «Elastin as a self-organizing biomaterial: Use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin», *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 357, n.º 1418. pp. 185-189, 28 de febrero de 2002. doi: 10.1098/rstb.2001.1027.
- [7] A. Ibáñez-Fonseca, T. Flora, S. Acosta, y J. C. Rodríguez-Cabello, «Trends in the design and use of elastin-like recombinamers as biomaterials», *Matrix Biology*, vol. 84. Elsevier B.V., pp. 111-126, 1 de noviembre de 2019. doi: 10.1016/j.matbio.2019.07.003.
- [8] A. Girotti, A. Fernández-Colino, I. M. López, J. C. Rodríguez-Cabello, y F. J. Arias, «Elastin-like recombinamers: Biosynthetic strategies and biotechnological applications», oct. 2011. doi: 10.1002/biot.201100116.
- [9] «kolb2001».
- [10] B. D. Prof Rolf Huisgen, «Chemischen Industrie, Dusseldorf», 1961.
- [11] D. C. Kennedy *et al.*, «Cellular consequences of copper complexes used to catalyze bioorthogonal click reactions», *J Am Chem Soc*, vol. 133, n.º 44, pp. 17993-18001, nov. 2011, doi: 10.1021/ja2083027.
- [12] Z. Shao *et al.*, «Bioorthogonal release of sulfonamides and mutually orthogonal liberation of two drugs», *Chemical Communications*, vol. 54, n.º 100, pp. 14089-14092, 2018, doi: 10.1039/c8cc08533a.



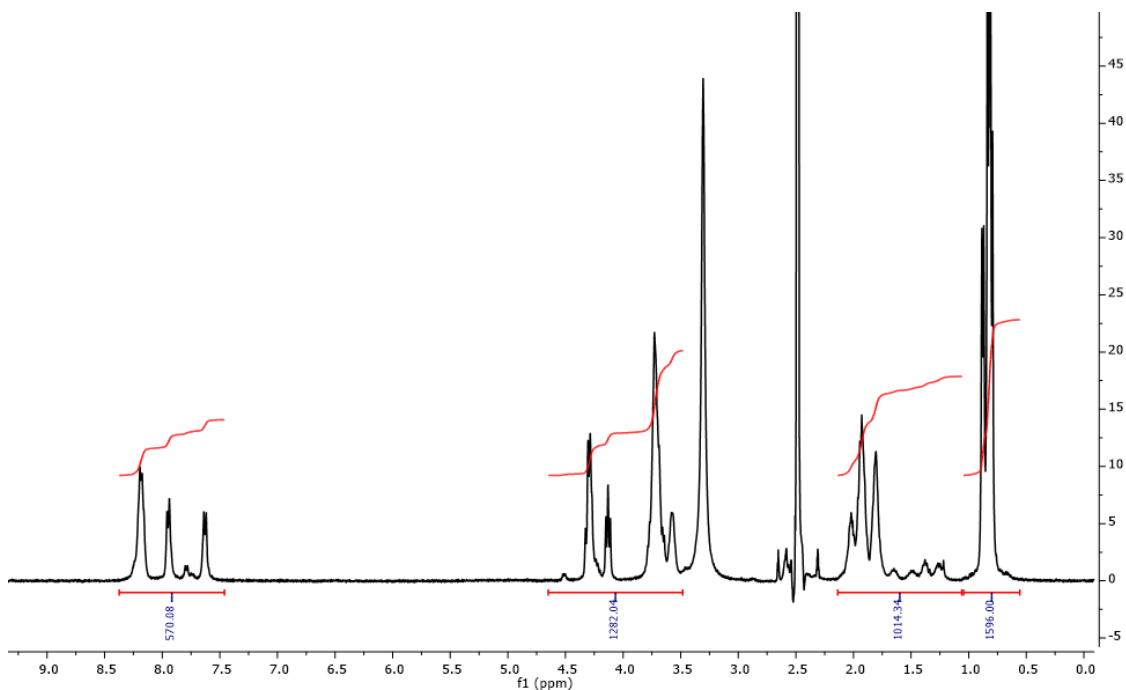
- [13] I. González De Torre, M. Santos, L. Quintanilla, A. Testera, M. Alonso, y J. C. Rodríguez Cabello, «Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties», *Acta Biomater*, vol. 10, n.º 6, pp. 2495-2505, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.006.
- [14] P. J. Levalley, R. Neelapapu, B. P. Sutherland, S. Dasgupta, C. J. Kloxin, y A. M. Kloxin, «Photolabile Linkers: Exploiting Labile Bond Chemistry to Control Mode and Rate of Hydrogel Degradation and Protein Release», *J Am Chem Soc*, vol. 142, n.º 10, pp. 4671-4679, mar. 2020, doi: 10.1021/jacs.9b11564.
- [15] González, Andrés & Fillat, María. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica*. 37. 14-27.
- [16] I. González De Torre, M. Santos, L. Quintanilla, A. Testera, M. Alonso, y J. C. Rodríguez Cabello, «Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties», *Acta Biomater*, vol. 10, n.º 6, pp. 2495-2505, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.006.

ANEXOS.

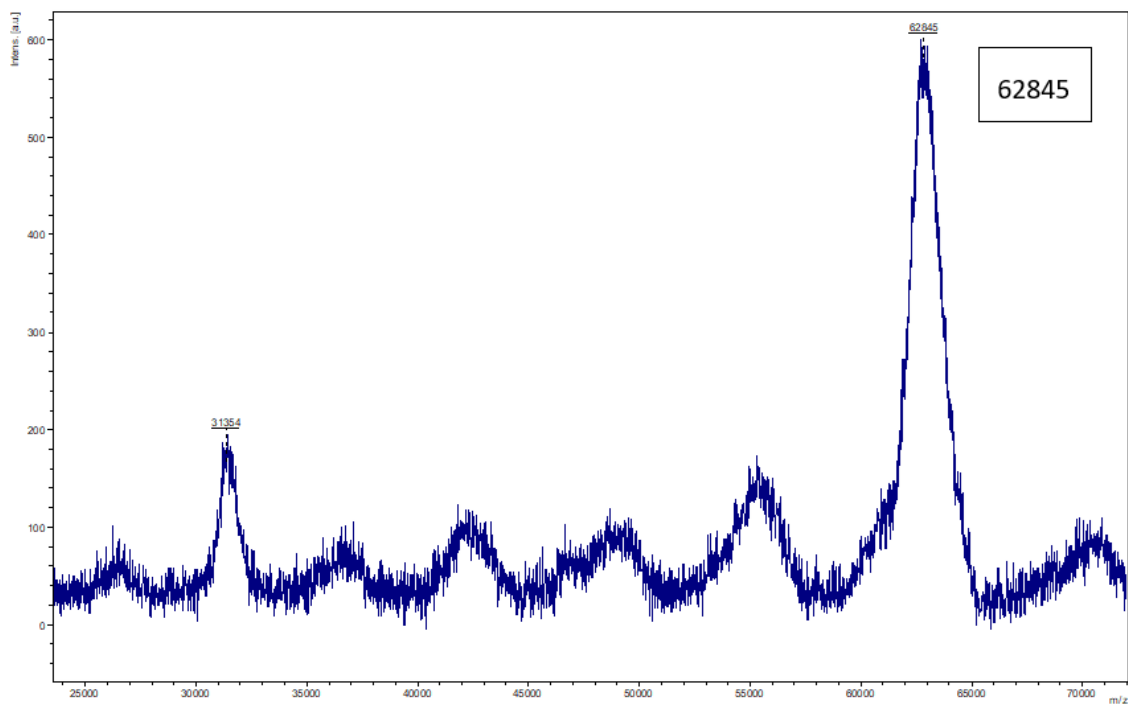
1. Código de 1 y 3 letras para los aminoácidos.

Abreviatura	Aminoácido
A	<i>Ala</i> Alanina
C	<i>Cys</i> Cisteina
D	<i>Asp</i> Ac Aspártico
E	<i>Glu</i> Ac Glutámico
F	<i>Phe</i> Fenilalanina
G	<i>Gly</i> Glicina
H	<i>His</i> Histidina
I	<i>Ile</i> Isoleucina
K	<i>Lys</i> Lisina
L	<i>Leu</i> Leucina
M	<i>Met</i> Metionina
N	<i>Asn</i> Asparragina
P	<i>Pro</i> Prolina
Q	<i>Gln</i> Glutamina
R	<i>Arg</i> Arginina
S	<i>Ser</i> Serina
T	<i>Thr</i> Treonina
V	<i>Val</i> Valina
W	<i>Trp</i> Triptofano
Y	<i>Tyr</i> Tirosina

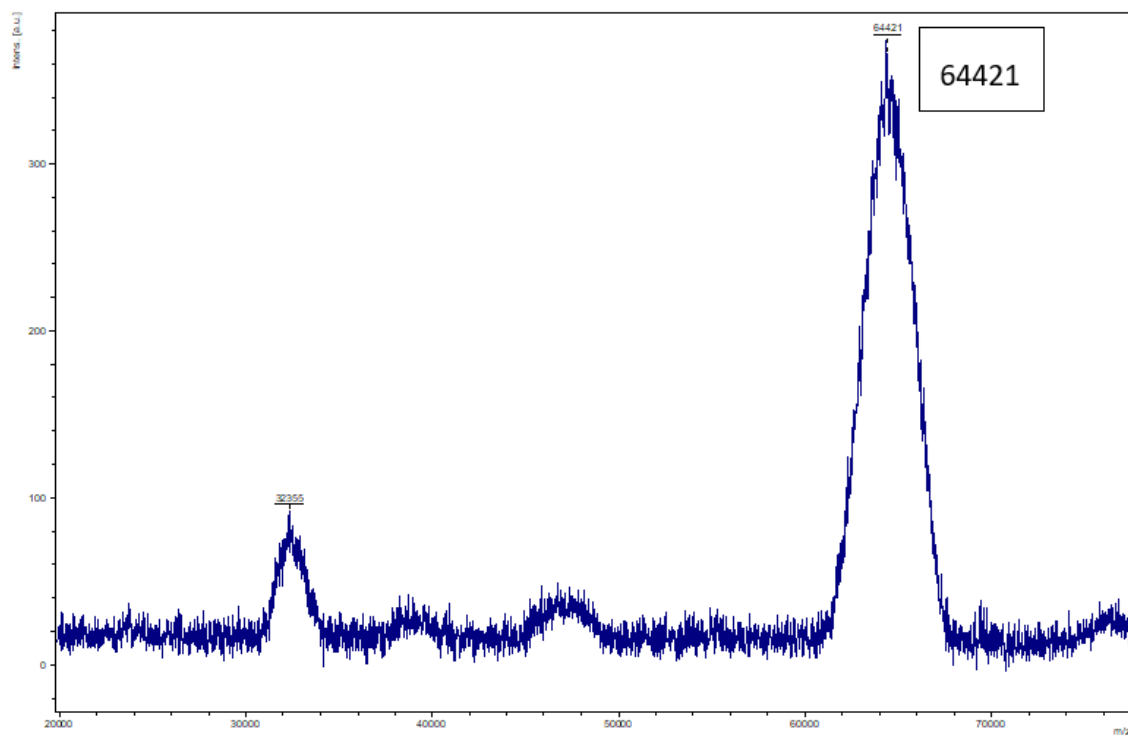
2. ¹H-RMN VKVx24.



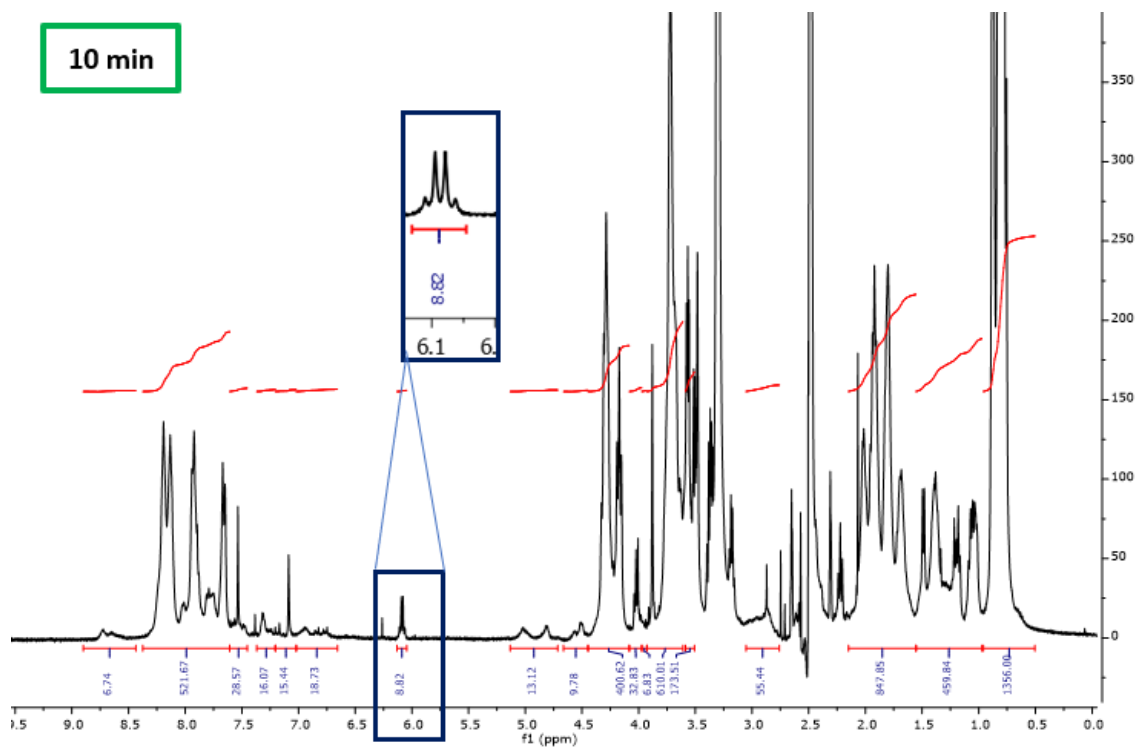
3. MALDI-ToF VKV-CC.



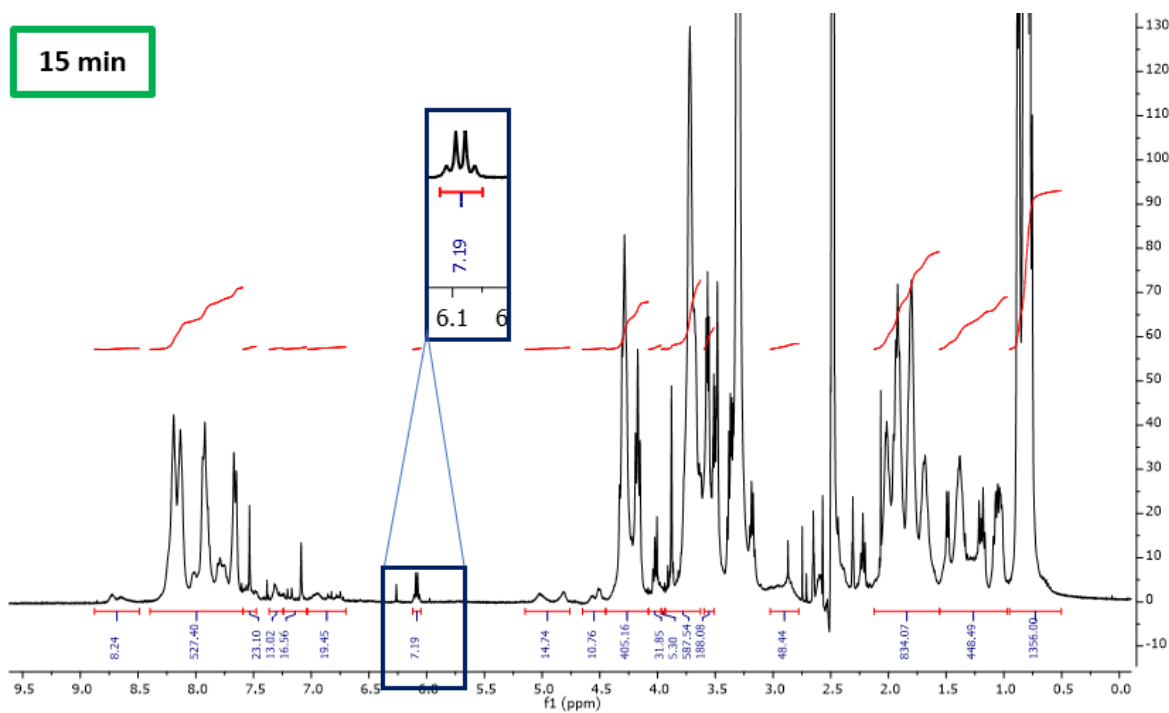
4. MALDI-ToF RGD-N₃-L₃.



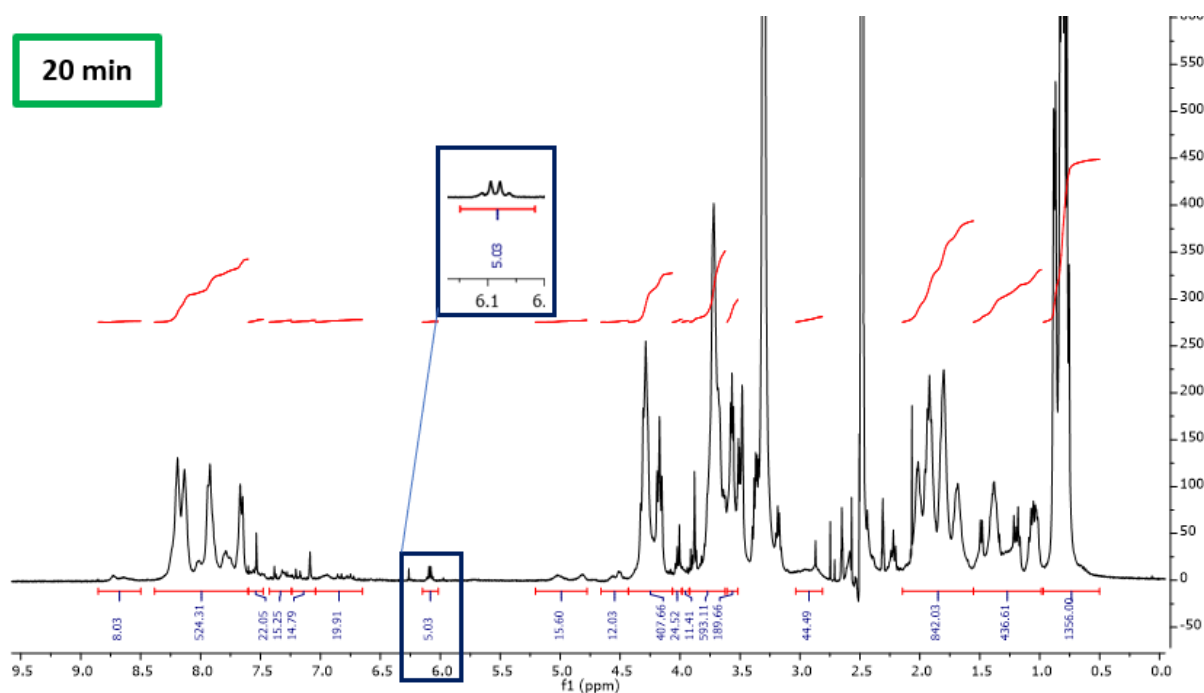
5. ^1H -RMN RGD-L₃ tras irradiarlo con luz UV durante 10 minutos.



6. ^1H -RMN RGD-L₃ tras irradiarlo con luz UV durante 15 minutos.



7. ^1H -RMN RGD-L₃ tras irradiarlo con luz UV durante 20 minutos.



8. ^1H -RMN RGD-N₃-L₃ tras irradiarlo con luz UV durante 60 minutos.

