

INFLUENCIA DE LA RADIACIÓN UV EN LAS PROPIEDADES MECÁNICAS Y EN EL COMPORTAMIENTO EN FRACTURA DE UN POLÍMERO ARTIFICIAL BIOINSPIRADO EN LA SEDA DE ARAÑA

G. B. Perea¹, G. V. Guinea¹, J. Pérez-Rigueiro¹, G. R. Plaza¹, C. Karatzas², M. Elices¹

¹Departamento de Ciencia de Materiales. ETSI Caminos, Canales y Puertos. Universidad Politécnica de Madrid. 28040. Madrid, España.
E-mail: bperea@mater.upm.es
Teléfono: 913365238

²Nexia Biotechnologies Inc., Present address: The Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, H3H 2R9, Canada

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la influencia de la radiación UV sobre las propiedades mecánicas y las superficies de fractura de un polímero artificial bioinspirado en la seda de araña. Las fibras de seda de araña constituyen un material enormemente atractivo ya que su elevada resistencia y deformabilidad lo convierten en el material con mayor trabajo hasta rotura de los conocidos hasta el momento. Además se ha encontrado que posee una elevada biocompatibilidad y un comportamiento biodegradable. Debido a estas excelentes propiedades se han dedicado importantes esfuerzos a intentar producir fibras inspiradas en la seda de araña. Fruto de estos esfuerzos es el polímero artificial estudiado en este trabajo. Dicho polímero presenta una secuencia de aminoácidos inspirada en la spidroína 1, que es una de las dos proteínas que conforman la seda de araña natural.

Uno de los factores más perjudiciales para los polímeros es la radiación ultravioleta (UV), de presencia ubicua en aplicaciones al aire libre, ya que puede provocar la modificación de sus enlaces covalentes y, como consecuencia, modificar sus propiedades mecánicas. Para evaluar el efecto de la radiación UV sobre el material bioinspirado se ha estudiado el comportamiento a tracción simple de fibras sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz UV de longitud de onda de 254 nm. Se ha observado que la radiación UV de 254 nm modifica considerablemente las propiedades mecánicas de este material a tiempos de exposición elevados (a partir de 3 días de irradiación). Además se ha estudiado el comportamiento a fractura de este material cuando es irradiado con luz UV. Se ha observado que a medida que aumenta el tiempo de irradiación las superficies de fractura comienzan a ser cada vez más planas, obteniéndose un aspecto extremadamente especular para muestras irradiadas durante 16 días.

ABSTRACT

The present work studies the influence of UV radiation on the mechanical properties and the fracture surfaces of an artificial polymer bioinspired in spider silk. Spider silk is an enormously attractive material. Its high tensile strength and strain to break yield the highest work to fracture of all known materials. Besides it has been found that it has a high biocompatibility and biodegradable behaviour. These singular properties have justified significant efforts devoted to produce fibers inspired in the spider silk. The result of these efforts is the artificial polymer studied in this work. This polymer presents an aminoacid sequence bioinspired in spidroin 1, one of the constituent proteins of silk.

Once of the main damaging agents of polymer is UV radiation, which is always present in open air applications. UV radiation can produce the modification of the bonding organization in the material and, consequently, can modify their mechanical properties. To evaluate the effect of UV radiation in bioinspired material we have studied the tensile behaviour of fibers. These fibers have been subjected to different irradiation times with UV light wavelength of 254 nm. It has been observed that exposure to 254 nm UV radiation modifies the mechanical properties of this material for long exposure times (more of 3 days). In addition, the fracture surfaces after irradiation have been studied: it has been observed that the surfaces become flatter with the irradiation time, and they are mirror like after 16 days of irradiation.

PALABRAS CLAVE: Radiación UV, polímero, fractura.

1. INTRODUCCIÓN

Debido a las magníficas propiedades que posee la seda de araña, tales como el gran trabajo hasta rotura que presenta [1], [2], su elevada resistencia y ligereza, además de ser un material biodegradable y biocompatible, se han dedicado importantes esfuerzos para producirla de forma artificial.

Las singulares características de la seda de araña están impulsando toda una serie de estudios con el objetivo de comprender y explotar sus propiedades en la fabricación de nuevos materiales. La producción de dichos materiales se basa en la síntesis mediante técnicas de Ingeniería Genética de proteínas inspiradas en las naturales producidas por la araña. La seda de araña está compuesta por dos proteínas de unos 300 kDa [3], [4], spidroína 1 y spidroína 2. Hasta el momento no se han podido sintetizar proteínas de un tamaño tan elevado, seleccionando fragmentos de dichas proteínas para su expresión en diferentes organismos. Se han empleado diversos sistemas de expresión de proteínas tales como plantas transgénicas y células mamarias modificadas [1], [5] habiéndose expresado en ellas fragmentos de las spidroínas de las especies de arañas *Nephila clavipes* y *Araneus diadematus*.

En particular, científicos de la empresa canadiense de biotecnología Nexia [5], transfiriendo genes de araña a células mamarias de cabras, han obtenido un material bioinspirado que es analizado en este trabajo.

El método de producción consiste en expresar el gen de las spidroínas en células mamarias de cabra que sintetizan esta proteína de la seda y la secretan en la leche. Esto facilita la extracción y la purificación de la proteína. La seda recombinante resultante y el proceso de obtención están patentados bajo el nombre Biosteel® (literalmente, "bioacero").

Pese a los esfuerzos dedicados a intentar producir de forma artificial proteínas bioinspiradas en la seda de araña hasta el momento no ha sido posible igualar las propiedades de la fibras producidas por las propias arañas [9].

Se ha comprobado que uno de los factores más perjudiciales para las fibras de seda de araña es la radiación UV ya que puede provocar la modificación de sus enlaces covalentes y, como consecuencia modificar sus propiedades mecánicas [10]. Por tanto se hace necesario el estudio del efecto de la radiación UV sobre el polímero artificial bioinspirado en la seda de araña con vistas a sus futuras aplicaciones.

Basándonos en estudios previos sobre el efecto de la radiación UV en las fibras de seda de araña natural [10], [11], [12] hemos caracterizado la influencia de la radiación UV sobre las propiedades mecánicas de este polímero artificial. Para ello se han sometido las fibras artificiales a diferentes tiempos de irradiación con luz UV de 254 nm y se han realizado ensayos de tracción

simple estudiándose la variación de las curvas tensión-deformación en función del tiempo de exposición de la muestra a la luz UV. El hecho de utilizar esta longitud de onda es debido a que en trabajos anteriores sobre la seda de araña se ha comprobado que es la que produce un efecto significativo sobre las propiedades mecánicas del material [10], [11], [12]. Además se han estudiado las superficies de fractura de este polímero artificial y se ha evaluado el efecto de la radiación UV en el comportamiento a fractura de este polímero.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se han utilizado fibras de un polímero artificial bioinspirado en la seda de araña natural. Estas fibras han sido obtenidas por Nexia a partir de la clonación de diferentes fragmentos de una de las proteínas sintetizadas en la glándula ampollácea mayor, la spidroína 1, de la especie de araña *Nephila clavipes*. La secuencia de aminoácidos de este fragmento se presenta en la figura 1.

```

QGAGAAAAAA GGAGQ GYGGL GSQAGR GGG
GAGAAAAAA GGAGQ GYGGL GSQAGRGLGGQ
GAGAAAAAA GGVGQ GGL GGQAGQ
GAGAAAAAA GGAGQ GYGGL GSQAGRGGSGGQ
GAGAAAAAA GGAGQ GYGGL GSQAGRGLGGQ
GAGAAAAAA GGAGQ GYGGL GGQAGQGGYGGLGSQAGRGLGGQ
GAGAAAAAA GGAGQ GGL GGQAGQ
GAGAAAAAA GGAGQ GYGGL GSQAGRGGQ
GAGAAAAAA VGAGQ GGY GGQAGQGGYGGLGSQAGRGLGGQ
GAGAAAAAA GGAGQ GGL GGQAGQ
GAGAAAAAA GGAGQ GYGGL GNQAGRGGQ
GAGAAAAAA GGAGQ GYGGL GSQAGRGLGGQ
GAGAAAAAA GGAGQ GYGGL GGQAGQGGYGGLGSQAGRGLGGQ
GAGAAAAAA GGAGQ GGL GGQAGQ
GAGAAAAAA GGVGQ GYGGL GSQAGRGGQ
    
```

Figura 1. Secuencia de aminoácidos del fragmento clonado de la spidroína 1. Donde G: Glicina, A: Alanina, L: Leucina, Y: Tirosina, Q: Glutamina, V: Valina, R: Arginina .

Para la producción de fibras artificiales a partir de la solución de proteínas se usó un proceso de hilado denominado hilado húmedo (wet spinning) [6] en el cual las fibras solidificaban en un baño coagulante de isopropanol [7], [8].

Para la ejecución del trabajo se ha estudiado el comportamiento a tracción simple de estas fibras sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz UV de 254 nm y se han comparado con fibras sin irradiar (muestras control).

Para la irradiación de las muestras se utilizó una lámpara ultravioleta modelo Vilmer Lourmat 215 LC de 15 W de potencia que emitía a 254 nm.

Los ensayos mecánicos de tracción simple se realizaron en una máquina Instron 4411 en la que se sustituyó la mordaza inferior por una balanza de precisión modelo PRECISA XT 220 A con una resolución de 0.1mg (1µN). A partir de los datos obtenidos del ensayo de tracción y mediante la medida de la sección transversal de estas fibras en el microscopio electrónico de barrido

(SEM) se determinaron las curvas tensión-deformación ingenieriles. Todos los ensayos mecánicos se han hecho en condiciones nominales de 25°C y 35% de humedad relativa.

Las superficies de fractura se obtuvieron a partir de los extremos del hilo que quedan después de realizar el ensayo de tracción. Las muestras fueron recubiertas con grafito para aumentar su resistencia frente al haz electrónico, permitiendo su mejor observación en el microscopio electrónico de barrido. Una vez depositado el grafito se metalizaron las muestras con oro durante 2 minutos. Posteriormente fueron observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL 6300. Las condiciones típicas de observación han sido un voltaje de 10kV y una intensidad de 6.10^{-8} A. Las imágenes se han obtenido con aumentos de x2000.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 2 se presentan las curvas tensión-deformación ingenieriles obtenidas mediante ensayos de tracción simple sobre muestras del polímero artificial bioinspirado en la seda de araña. Estas muestras han sido sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz UV de 254 nm.

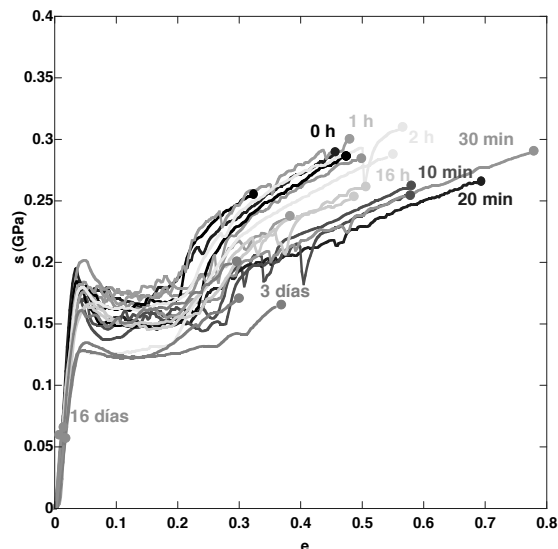


Figura 2. Curvas tensión-deformación ingenieriles de fibras de un polímero artificial bioinspirado en la seda de araña. Estas fibras han sido sometidas a diferentes tiempos de irradiación con luz ultravioleta de 254nm.

La figura 2 pone de manifiesto la moderada variabilidad de las propiedades mecánicas que presenta este polímero artificial. Este hecho puede ser debido al proceso de hilado mediante el que se obtienen las fibras a partir de la solución de proteínas. Hemos de destacar que se ha observado una variabilidad en las propiedades mecánicas muy superior en la seda de araña natural [13-

19]. Si bien, se han producido grandes avances en el control de dicha variabilidad mediante el desarrollo de diferentes procedimientos de hilado [20], [21].

Del análisis de las curvas tensión-deformación obtenidas tras la irradiación de las muestras con luz UV vemos que para tiempos de irradiación cortos (tiempos inferiores a 3 días) la luz UV produce poca variación en las propiedades mecánicas del material. Sin embargo, para tiempos de irradiación más largos (tiempos superiores a 3 días) se produce una disminución significativa en las propiedades mecánicas del material.

Como se puede apreciar en la figura 2, para tiempos largos de irradiación se produce una disminución en los valores de tensión y deformación de rotura. Observándose, en el caso concreto de 16 días de irradiación, que la rotura del material se produce en la zona lineal inicial.

Las superficies de fractura de muestras irradiadas han sido observadas por microscopía electrónica de barrido. En las figuras 3, 4 y 5 se recogen algunas superficies de fractura representativas obtenidas durante la realización de este trabajo.

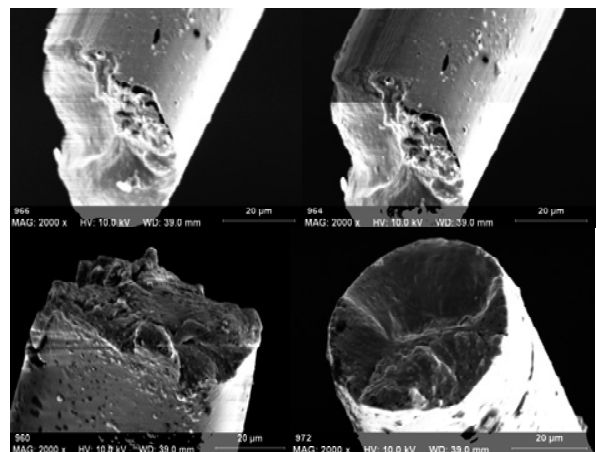


Figura 3. Superficies de fractura de fibras del polímero artificial sin irradiar (Muestras Control).

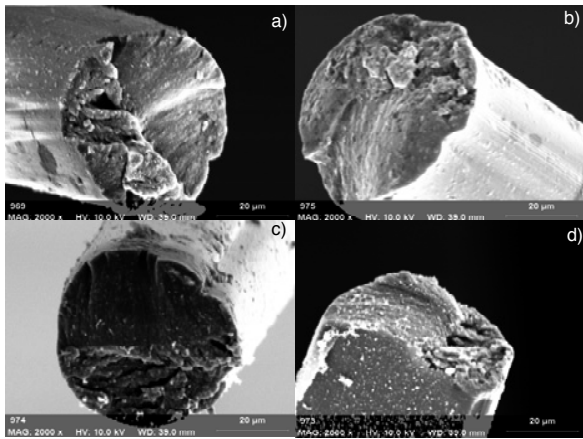


Figura 4. Superficies de fractura de fibras del polímero artificial irradiadas, expuestas a tiempos de irradiación de a) 10 min, b) 20 min, c) 30 min y d) 1 h.

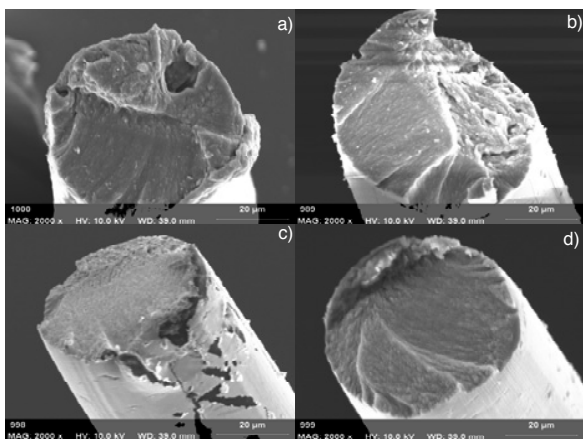


Figura 5. Superficies de fractura de fibras del polímero artificial irradiadas, expuestas a tiempos de irradiación de a) y b) 16 h, c) y d) 3 días.

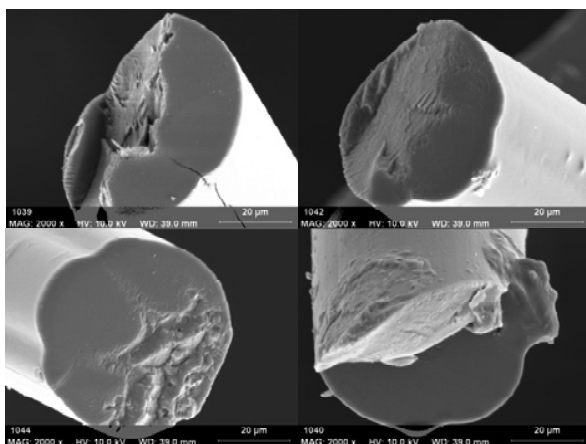


Figura 5. Superficies de fractura de fibras del polímero artificial irradiadas, expuestas a 16 días de irradiación.

Se observa que las muestras control (tiempo de irradiación de 0 h) muestran una superficie de fractura rugosa. Para tiempos de irradiación cortos (hasta 16 horas) la fractura sigue presentando un aspecto rugoso, aunque a 16 horas de irradiación se observa una fractura más plana. Para tiempos de irradiación elevados (3 y 16 días) la superficie de fractura se hace muy plana, siendo casi especular para un tiempo de irradiación de 16 días.

4. CONCLUSIONES

A partir del análisis de las curvas tensión-deformación obtenidas se observa que la radiación UV de longitud de onda de 254 nm no produce ningún efecto significativo en las propiedades mecánicas del polímero artificial bioinspirado en las fibras de seda de araña para tiempos de irradiación cortos. Mientras que para tiempos de irradiación superiores a 3 días se observa una modificación acusada de sus propiedades mecánicas. En particular se produce una disminución en los valores de tensión y deformación de rotura. A 16 días de irradiación las muestras rompen en la zona elástica lineal, y para este tiempo de exposición a la radiación UV las propiedades mecánicas de este material están muy degradadas.

Del análisis fractográfico realizado podemos observar que las superficies de fractura presentan un aspecto rugoso y que para tiempos de irradiación altos (a partir de 3 días) las superficies de fractura se vuelven más planas y especulares indicando un comportamiento en fractura localmente frágil de este material.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Dr. Andrew Rodenhiser la producción de fibras recombinantes. El trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (España) a través del proyecto CIT-420000-2008-30, por el Ministerio de Ciencia e Innovación (España) a través del proyecto MAT2009-10258, por la Comunidad de Madrid (España) a través del programa MADR.IB-CM/S-SAL/0312/2006 y por la Fundación Marcelo Botín.

Los autores también desean expresar su agradecimiento a los alumnos del Master de Ingeniería Biomédica de la UPM Evelyn García, Andrés Navarro, Patricia Anaya y Noé Jiménez por sus diversas tareas de colaboración en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] Kaplan, D.L., Lombardi, S.J., Muller, W.S y Fossey, S.A., *Silks, Biomaterials*, Byrom, D. (Ed.), Stockton Press, New York, 1-53. 1991.
- [2] Elices, M., Pérez-Rigueiro, J., Plaza, G. and Guinea, G.V., *Recovery in spider silk fibers*, J. Appl. Polym. Sci. 92, 3537-3541. 2004.
- [3] Casem, M. L., Turner, D., Houchin, K. *Protein and amino acid composition of silks from the cob weaver, Latrodectus hesperus (black widow)*. International Journal of Biological Macromolecules, 24, 103-108. 1999.
- [4] Spenner, A., Schlott, B., Vollrath, F., Unger, E., Grosse, F., Weisshart, K. *Characterization of the protein components of Nephila clavipes dragline silk*. Biochemistry 44, 4727-4736. 2005.
- [5] Lazaris, A., Arcidiacono, S., Huang, Y., Zhou, J.F., Duguay, F., Chretien, N., Welsh, E.A., Soares, J.W., Karatzas, C.N. *Spider Silk Fibers Spun from Soluble Recombinant Silk Produced in Mammalian Cells*. Science 295, 472-476. 2002.
- [6] Chawla, K. K. *Fibrous Materials*; Cambridge University Press: Cambridge, U.K. 1998.
- [7] Matsumoto, K.; Uejima, H.; Iwasaki, T.; Sano, Y.; Sumino, H. J Appl Polym Sci 1996, 4, 503-511.
- [9] Elices, M., Guinea, G. V., Plaza, G. R., Karatzas, C., Riekel, C., Agulló-Rueda, F., Daza, R., Pérez-Rigueiro, J., *Bioinspired fiber follow the track of natural spider silk*, en prensa.
- [10] Perea, G. B., Pérez-Rigueiro, J., Plaza, G. R., Guinea, G. V., Elices, M., *Efecto de la longitud de onda de la radiación UV sobre la seda de araña*. Anales de Mecánica de la Fractura 27, 41-43. 2010.
- [11] Pérez Rigueiro J., Elices M., Plaza G. R. y Guinea G.V., *El efecto de la irradiación ultravioleta sobre la seda de araña*, Anales de Mecánica de la Fractura, 593-598. 2006.
- [12] Rueda J., Pérez Rigueiro J., Elices M. y Guinea G.V., *Influencia de la radiación UV en el comportamiento a fractura del hilo de araña*. Anales de Mecánica de la Fractura, 343-348. 2002.
- [13] Work, R.W. *The force-elongation behavior of web fibers and silks forcibly obtained from orb-web-spinning spiders*. Textile Res. J. 46, 485-492. 1976.
- [14] Griffiths, J.R., Salinatri, V.R. *The strength of spider silk*. Journal of Materials Science. 15, 491-496. 1980.
- [15] Cunniff, P.M., Fossey, S.A., Auerbach, M.A., Song, J.W. *Mechanical Properties of Major Ampullate Gland Silk Fibers Extracted from Nephila Clavipes Spiders*. Chapter 21 in *Silk polymers: Materials Science and Biotechnology*. American Chemical Society, Washington DC. 1994.
- [16] Dunaway, D.L., Thiel, B.L., Viney, C. *Tensile Mechanical Property Evaluation of Natural and Epoxide-Treated Silk Fibers*. Journal of Applied Polymer Science 58, 675-683. 1995.
- [17] Madsen, B., Shao, Z.Z., Vollrath, F. *Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual*. International Journal of Biological Macromolecules 24, 301-306. 1999.
- [18] Viney, C. *Silk Fibres: Origins, Nature and Consequences of Structure*. Chapter 10 in *Structural Biological Materials*—M.Elices (ed), Pergamon. Amsterdam. 2000.
- [19] Garrido, M.A., Elices, M., Viney, C., Pérez-Rigueiro, J. *The variability and interdependence of spider dragline tensile properties*. Polymer 43, 4495-4502. 2002.
- [20] Pérez-Rigueiro, J., Elices, M., Plaza, G., Real, J. I. and Guinea, G. V. *The effect of spinning forces on spider silk properties*. The Journal of Experimental Biology 208, 2633-2639. 2005.
- [21] Elices, M., Guinea, G.V., Plaza, G.R., Real, J.I. and Pérez-Rigueiro, J. *Example of microprocessing in a natural polymeric fiber: Role of reeling stress in spider silk*. Materials Research Society, 1931-1938. 2006.