

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Orgánica



Programa oficial de Doctorado en Química

TESIS DOCTORAL

**Hidrogeles supramoleculares constituidos
por pequeños péptidos como medio para
la obtención de materiales compuestos**

Rafael Contreras Montoya

Granada, 2019

Hidrogeles supramoleculares constituidos por pequeños péptidos como medio para la obtención de materiales compuestos

Memoria de Tesis Doctoral presentada por
Rafael Contreras Montoya
Para aspirar al título de Doctor por la
Universidad de Granada

Fdo. Rafael Contreras Montoya

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Dr. Luis Álvarez de Cienfuegos Rodríguez

Profesor titular del Departamento de Química Orgánica de la
Universidad de Granada

y

Dr. Juan José Díaz Mochón

Profesor titular del Departamento de Química Farmacéutica y
Orgánica de la
Universidad de Granada

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Rafael Contreras Montoya
ISBN: 978-84-1306-198-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/55749>

El doctorando Rafael Contreras Montoya y los directores de la tesis Dr. Luis Álvarez de Cienfuegos Rodríguez y Dr. Juan José Díaz Mochón garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, febrero de 2019

El Doctorando

Fdo. Rafael Contreras Montoya

Los Directores de la Tesis

Fdo. Dr. Luis Álvarez de Cienfuegos Rodríguez

Fdo. Dr. Juan José Díaz Mochón

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada, en el grupo “MATERIALES ORGÁNICOS FUNCIONALES” (MOREFUN) (FQM-367). Gracias a la Junta de Andalucía por la concesión de mi contrato predoctoral asociado al Proyecto de Excelencia P12-FQM-790 y por el Proyecto de Excelencia P12-FQM-2721. Gracias a la Unidad de Excelencia de Química Aplicada a Biomedicina y Medioambiente por la financiación y por haber servido de marco para el trabajo multidisciplinar realizado en esta Tesis Doctoral.

Quisiera dar las gracias a todas las personas que han participado activamente en el desarrollo de esta Tesis. Sin su contribución, el trabajo recogido en esta memoria no habría sido posible. Gracias al Dr. José A. Gavira, a Guillermo Escolano y a la Dra. Mayte Conejero del Laboratorio de Estudios Cristalográficos, Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC, Armilla, Granada) por su ayuda en la cristalización de proteínas. Gracias a Albert Castellvi y a la Dra. Judith Juanhuix del Sincrotrón ALBA (Barcelona) por las medidas de daño por radiación. Gracias a los Dres. Modesto T. López López y Juan de Dios García López Durán, Ana Belén Bonhome y a Cristina Gila del Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias (Universidad de Granada) por su ayuda en los experimentos de reología, magnetismo y movilidad electroforética. Gracias a los Dres. Ángel Orte y Delia Miguel del Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Farmacia (Universidad de Granada) por su ayuda en los estudios de FLCS. Gracias al Dr. José Manuel Delgado del Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias (Universidad de Granada) por su colaboración en los experimentos de difracción de rayos X y microscopía Raman. Gracias a los Dres. Nurit Ashkenasy y Shubhashish Roy del *Department of Materials Engineering and The Ilse Katz Institute for Nanoscale Science and Technology (Ben-Gurion University of the Negev, Israel)* por las medidas de conductividad en cristales de proteína. Gracias a la Dra. Concepción Jiménez López, a Ylenia Jabalera y a Ana Peigneux del Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias (Universidad de Granada) por su participación en los experimentos de mineralización de magnetita y su caracterización.

Gracias al Dr. Asier Unciti Broceta y a las personas de su grupo de investigación por haberme acogido durante mi estancia predoctoral en Edimburgo (Reino Unido). Así mismo también me gustaría dar las gracias a la *Edinburgh University* y al *Cancer Research UK Edinburgh Centre* por haberme permitido realizar la estancia y hacer uso de sus instalaciones y recursos.

Quisiera dar las gracias al personal del Centro de Instrumentación Científica por su profesionalidad, disposición e inestimable ayuda.



RESUMEN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL

Los resultados experimentales obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, así como la discusión de los mismos, se presentan en esta memoria divididos en 5 capítulos. En los cuatro primeros capítulos se exponen los resultados obtenidos en la consecución de objetivos diferentes, sin bien toda la investigación realizada está enmarcada en el estudio de hidrogeles supramoleculares basados en péptidos cortos y su aplicación como medio para la obtención de materiales híbridos y compuestos. Estos capítulos constan de: introducción, planteamiento y objetivos, materiales y métodos, resultados y discusión, y conclusiones. El último capítulo (Capítulo 5) es un compendio de resultados obtenidos en colaboración con otros grupos de investigación que no están englobados en el eje central de la tesis doctoral.

El contenido de los diferentes capítulos se resume a continuación:

En el **Capítulo 1**, titulado “Hidrogeles supramoleculares anisótropos mediados por nanopartículas de hierro con mejores propiedades mecánicas” se plantea la posibilidad de modificar las propiedades mecánicas de un hidrogel supramolecular mediante la inclusión de nanopartículas magnéticas. En este sentido se propone el diseño y síntesis de hidrogeles supramoleculares basados en Fmoc-difenilalanina (FmocFF) que alberguen nanopartículas de hierro (FeNPs) en su interior, formados en presencia y ausencia de un campo magnético externo y el posterior estudio de las propiedades micro y macroestructurales.

En la Introducción del Capítulo 1 se presentan los conceptos de material híbrido y material compuesto, así como de gel, haciéndose especial hincapié en los hidrogeles supramoleculares. Se detallan los aspectos más relevantes de los hidrogeles supramoleculares basados en péptidos cortos respecto a sus características, versatilidad y su aplicación como medio para la obtención de materiales híbridos y compuestos, definiendo de esta forma el marco global de la tesis doctoral.

En lo referente a los resultados obtenidos, en el Capítulo 1 se presenta la síntesis y caracterización estructural de nuevos hidrogeles supramoleculares basados en péptidos cortos (FmocFF) híbridos con FeNPs. Estos hidrogeles híbridos se han preparado a través de la autoasociación de FmocFF en una suspensión que contenía FeNPs en presencia y en ausencia de un campo magnético externo. Estos hidrogeles en presencia de un campo magnético originaban agregados en forma de columnas de FeNPs observables mediante microscopía óptica. Las FeNPs fueron englobadas por las fibras peptídicas originando un material anisótropo en presencia de un campo magnético externo. Estos hidrogeles eran más rígidos frente a la aplicación de fuerzas de cizalladura aplicadas perpendicularmente que en paralelo, presentando valores de G' (módulo de almacenamiento) hasta 7 veces superiores a los correspondiente a hidrogeles sin partículas. Este es el primer ejemplo en el que las propiedades mecánicas de hidrogeles peptídicos se ven

modificadas sustancialmente por la presencia de FeNPs. Un estudio a nivel microscópico de las fibras mostró que la estructura secundaria peptídica apenas se modificaba por la presencia de las nanopartículas, demostrando la versatilidad de las interacciones supramoleculares para adaptarse a nuevos entornos y generar nuevos materiales. Por último, la difusión de un soluto por el entramado fibrilar apenas varió por la incorporación de las partículas, siendo este un escaso ejemplo en el que se consigue aumentar significativamente la dureza de un gel sin disminuir el tamaño de poro de la red reticular.

En el **Capítulo 2** titulado “Cristales de lisozima crecidos en hidrogeles de FmocCF presentan una mayor estabilidad frente al daño causado por radiación de rayos X” se plantea el objetivo de mitigar el daño por radiación sufrido por los cristales de proteína durante los experimentos de difracción de rayos X en sincrotrón, mediante la inclusión de fibras de hidrogeles supramoleculares con aminoácidos reductores a través de su cristalización en ellos. En este capítulo se hace una Introducción a la cristalización de proteínas, destacando la obtención de cristales de proteína compuestos mediante la cristalización en hidrogeles y, en particular, en hidrogeles supramoleculares basados en péptidos remarcando las ventajas que ofrecen estos a la hora de conferir nuevas propiedades a los cristales compuestos.

Se han preparado y caracterizado hidrogeles de Fmoc-cisteína-fenilalanina (FmocCF), Fmoc-metionina-fenilalanina (FmocMF) y Fmoc-tirosina (FmocY). En ellos se ha ensayado la cristalización de las proteínas lisozima, glucosa isomerasa y taumatina, consiguiéndose cristales de gran calidad en todos los casos. Tras estudiar el efecto de la radiación sobre los cristales de lisozima crecidos en los hidrogeles más concentrados de FmocCF, y en comparación con cristales crecidos en agarosa, se pudo comprobar que dichos cristales presentaban una mayor resistencia frente al daño por radiación difractados a temperatura ambiente. Este es el primer ejemplo en el que se emplea un hidrogel con este fin y pone de manifiesto la utilidad de obtener cristales compuestos para dotarlos de nuevas propiedades. Hay que indicar que la cisteína es capaz de llevar su efecto al estar en estado gel ya que los grupos cisteína están anclados en las fibras peptídicas evitando posibles reacciones cruzadas con la proteína. La cisteína empleada en solución no es capaz de proteger a los cristales frente al daño por radiación.

En el **Capítulo 3** titulado “Obtención de cristales de lisozima reforzados con nanotubos de carbono catalíticos y conductores de la electricidad” se plantea diseñar, sintetizar y caracterizar hidrogeles supramoleculares híbridos de FmocFF con nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs), ensayar la cristalización de lisozima en los hidrogeles obtenidos, y estudiar los efectos de la incorporación de los SWCNTs en las propiedades mecánicas, catalíticas y eléctricas de los cristales de lisozima híbridos.

Se ha desarrollado una metodología con la que preparar hidrogeles híbridos de FmocFF con SWCNTs que ha servido para dispersar homogéneamente agregados de SWCNTs hidrófobos en un medio acuoso compatible con la cristalización de lisozima. Con la posterior cristalización de lisozima en dichos hidrogeles se consiguió la incorporación efectiva de los nanotubos en el interior de los cristales sin alterar la calidad de los cristales ni su morfología. El estudio de las propiedades de los cristales entrecruzados de lisozima (CLLCs) con SWCNTs reveló que estos nuevos materiales híbridos presentaban mayor resistencia mecánica, actividad catalítica mejorada a altas temperaturas y conductividad eléctrica. Se ha demostrado que la conductividad eléctrica a través de los cristales era isotrópica y muy eficiente, presentando valores de conductividad superiores a 600 nS a muy bajas concentraciones de SWCNTs (inferior a 0.05% en peso). Los resultados obtenidos en este capítulo ponen de manifiesto las oportunidades que ofrecen los hidrogeles supramoleculares basados en péptidos como medio para la obtención de materiales híbridos actuando como estabilizadores de nanotubos de carbono hidrófobos en un medio acuoso que ha posibilitado, por primera vez, la incorporación de nanotubos de carbono en cristales de proteína.

En el **Capítulo 4** titulado “De la mineralización biomimética de magnetita en hidrogeles supramoleculares a nanopartículas híbridas magnetita-lisina” se plantea la posibilidad de utilizar hidrogeles supramoleculares basados en péptidos como medio para la obtención de nanopartículas de magnetita (MNPs) mediante un proceso de mineralización biomimética (en agua, a temperatura ambiente). Como primera aproximación a este proyecto se ha estudiado el efecto de aminoácidos en disolución sobre el proceso de mineralización.

En este estudio se ha podido comprobar que la lisina es capaz de ejercer un control sobre el tamaño de las MNPs producidas en agua a temperatura ambiente. Las MNPs obtenidas por este protocolo mostraron un tamaño promedio de 30 nm, alta magnetización de saturación, temperatura de bloqueo de 290 K y carga superficial negativa a pH fisiológico gracias a su recubrimiento con lisina. Además, este protocolo es respetuoso con el medio ambiente, de bajo coste y potencialmente escalable a nivel industrial. Las MNPs híbridas así obtenidas reúnen las características necesarias para poder ser usadas en aplicaciones biomédicas.

El **Capítulo 5** se ha titulado “Participación en otros proyectos” se describen los siguientes resultados más relevantes obtenidos en colaboración con otros grupos de investigación. A continuación, se resume el contenido de los distintos apartados de este capítulo:

A) Se ha ensayado por primera vez el efecto *in vivo* de cristales de insulina crecidos en Fmoc-dialanina (FmocAA) y en agarosa. Se ha demostrado que estos cristales compuestos son físicamente estables al seguir siendo bioactivos después de haberlos mantenido a 50 °C durante 7 días. Además la insulina crecida en FmocAA presenta una velocidad de disolución más lenta traduciéndose en un perfil de liberación retardada una vez administrada *in vivo*.

B) Se ha llevado a cabo un estudio sistemático de las propiedades fisicoquímicas requeridas para la autoasociación bidimensional en la interfase agua/aire de una familia de Fmoc-dipeptidos. La capacidad de estos péptidos de autoasociarse en la interfase se ha relacionado por primera vez con los valores del $\log P$ y $-\log S$.

D) Se han producido *quantum dots* (QDs) recubiertos con ácido mercaptopropiónico (MPA) y con los oligopéptidos SS02, SS20 y SS31 funcionalizados con ácido 11-mercaptopundecanoico (MUA). El MPA ha servido como grupo sensible al pH y los oligopéptidos con MUA (MUA-SS02, MUA-SS20 y MUA-SS31) han servido para vehiculizar los QDs modificados al interior de las mitocondrias de diversas líneas tumorales de cáncer de mama. Con esta estrategia se ha podido medir el pH intramitocondrial de dichas células.

E) Se han producido hidrogeles de agarosa con nanopartículas de paladio coloidales (PdNPs) ocluidas en su interior, de modo que se ha conseguido retener la difusión libre de las partículas y disminuir su toxicidad, a la vez que se ha mantenido su capacidad catalítica



The experimental results obtained during the development of this doctoral thesis, as the discussion of them, are presented in this memorandum divided in 5 chapters. Each first four chapters presents the results obtained in the achievement of different objectives, although all the research can be framed within the study of short-peptide supramolecular hydrogels and their application as media to obtain hybrid and composite materials. These chapters contain the following: introduction, hypothesis and objectives, materials and methods, results and discussion, and conclusions. The last chapter (Chapter 5) is a compendium of results obtained in collaboration with other investigation groups and they are not included in the central topic of this doctoral thesis.

Below, the content of chapters is summarized:

In Chapter 1, titled “Iron nanoparticles-based supramolecular anisotropic hydrogels with enhanced mechanical strength” poses the possibility of modifying the mechanical properties of a supramolecular hydrogel through the incorporation of magnetic nanoparticles. The design and synthesis of Fmoc-diphenylalanine (FmocFF)-based supramolecular hydrogels, which contain iron nanoparticles (FeNPs), prepared in the presence and absence of an external magnetic field and the subsequent study of its micro and macrostructural properties have been proposed.

In Chapter 1, the concepts of hybrid material and composite material are presented, as well as gel, paying special attention to supramolecular hydrogels. The most relevant details of short-peptide supramolecular hydrogels have been highlighted, according to its characteristics, versatility and its application as media for obtaining hybrid and composite materials, this way defining the overall context of the doctoral thesis.

Regarding the obtained results, in Chapter 1 the synthesis and structural characterization of novel short peptide-based supramolecular hydrogels (FmocFF) hybridized with FeNPs are presented. These hybrid hydrogels have been prepared through the self-association of FmocFF in a suspension containing FeNPs in the presence and absence of an external magnetic field. When these hydrogels were prepared under an applied magnetic field, column-like aggregates of FeNPs were observed by optical microscopy. The FeNPs were engulfed by the peptide fibrils resulting in an anisotropic material under an applied magnetic field. These hydrogels were more rigid under shear forces applied perpendicularly to the direction than parallel to the aggregates, presenting values of G' (storage modulus) about 7 times higher to those of the native hydrogel. This is the first example in which the mechanical properties of peptide hydrogels were strongly enhanced due to the presence of FeNPs. A study at microscopical level showed that the peptide secondary structure was highly conserved for the presence of nanoparticles, demonstrating the versatility of the supramolecular interactions in adapting to new environments and generating new materials.

Finally, the diffusion of a small solute through the hydrogel network was hardly changed by the presence of nanoparticles, making this one of the few examples in which the mechanical strength of the gel is enhanced without significantly altering the pore size of the gel network.

Chapter 2, titled “Lysozyme crystals grown in FmocCF hydrogels show an enhanced stability against radiation damage” poses the goal of mitigating the radiation damage suffered by the protein crystals during X ray diffraction experiments in synchrotron, via the entrapment of reductive amino acids-based supramolecular hydrogels fibrils during the crystallization process. This chapter begins with an introduction about the topic of protein crystallization, paying special attention to the production of composite protein crystals by crystallization in hydrogels, especially in peptide-based supramolecular hydrogels, highlighting the benefits that these materials offer when conferring new properties to the composite crystals.

Fmoc-cysteine-phenylalanine (FmocCF), Fmoc-methionine-phenylalanine (FmocMF) and Fmoc-tyrosine (FmocY) hydrogels have been prepared and characterized. The crystallization of the proteins lysozyme, glucose isomerase and thaumatin has been tested on them, obtaining high quality crystals in each case. After studying the radiation damage effect on the lysozyme crystals grown in the most concentrated FmocCF hydrogels, in comparison with crystals grown in agarose hydrogels, it was found that those crystals had an enhanced resistance against radiation damage by irradiation at room temperature. This is the first time that a hydrogel is used for this purpose and shows the benefits of composite crystals having new properties. It should be noted, that the cysteine is able to exert its effect thanks to being in gel state due to cysteine groups are locked within the rigid peptide fibers, minimizing cross-reactions with the proteins. Cysteine in solution is not able to protect the crystals against the radiation damage.

In Chapter 3 titled “Catalytic and Electron Conducting Carbon Nanotube-Reinforced Lysozyme Crystals”, the synthesis and characterization of hybrid supramolecular hydrogels of FmocFF with single walled carbon nanotubes (SWCNTs), testing of the crystallization of lysozyme inside the obtained hydrogels, and the study of the effects of SWCNTs incorporation in the mechanical, catalytical and electrical properties of the hybrid lysozyme crystals obtained is commented.

A methodology for the preparation of hybrid hydrogels of FmocFF with SWCNTs has been developed, which has been useful to disperse homogeneously bundles of hydrophobic SWCNTs in an aqueous media compatible with lysozyme crystallization. Lysozyme crystallization in these hydrogels showed the effective incorporation of nanotubes into the crystals lattice without altering its quality nor morphology. The investigation of the new properties of cross-linked lysozyme crystals (CLLCs) with SWCNTs showed that these new hybrid materials had higher mechanical

strength, increased catalytic activity at high temperatures and electron conductivity. The electron transport through the crystals was isotropic and very efficient, presenting high conductivity values up to 600 nS at very low (less than 0.05 wt%) SWCNTs concentration. The results obtained proved the benefits that short peptide-based supramolecular hydrogels offer as media for obtaining hybrid materials, acting as stabilizers of hydrophobic carbon nanotubes in aqueous media which has allowed the incorporation of carbon nanotubes within crystal proteins for the first time.

Chapter 4, titled “From biomimetic mineralization of magnetite within supramolecular hydrogels to magnetite-lysine hybrid nanoparticles” poses the possibility of using short peptide-based supramolecular hydrogels as media to obtain magnetite nanoparticles (MNPs) via a biomimetic mineralization process (in water, at room temperature). As first approach in this project, the effect of single amino acids in solution has been explored.

In this study we have shown that lysine is able to exert a control over the size of MNPs produced in water at room temperature. In fact, MNPs obtained by this protocol showed an average size of 30 nm, high magnetization saturation, blocking temperature of 290 K and negative surface charge at physiological pH thanks to their lysine coating. Moreover, this protocol is eco-friendly, economical and suitable for large scale production. The hybrid MNPs obtained, meet the necessary criteria to be useful in biomedical applications.

Chapter 5, titled “Participation in other projects” poses the most relevant results obtained in collaboration with other research groups. Below, the content of this chapter is summarized:

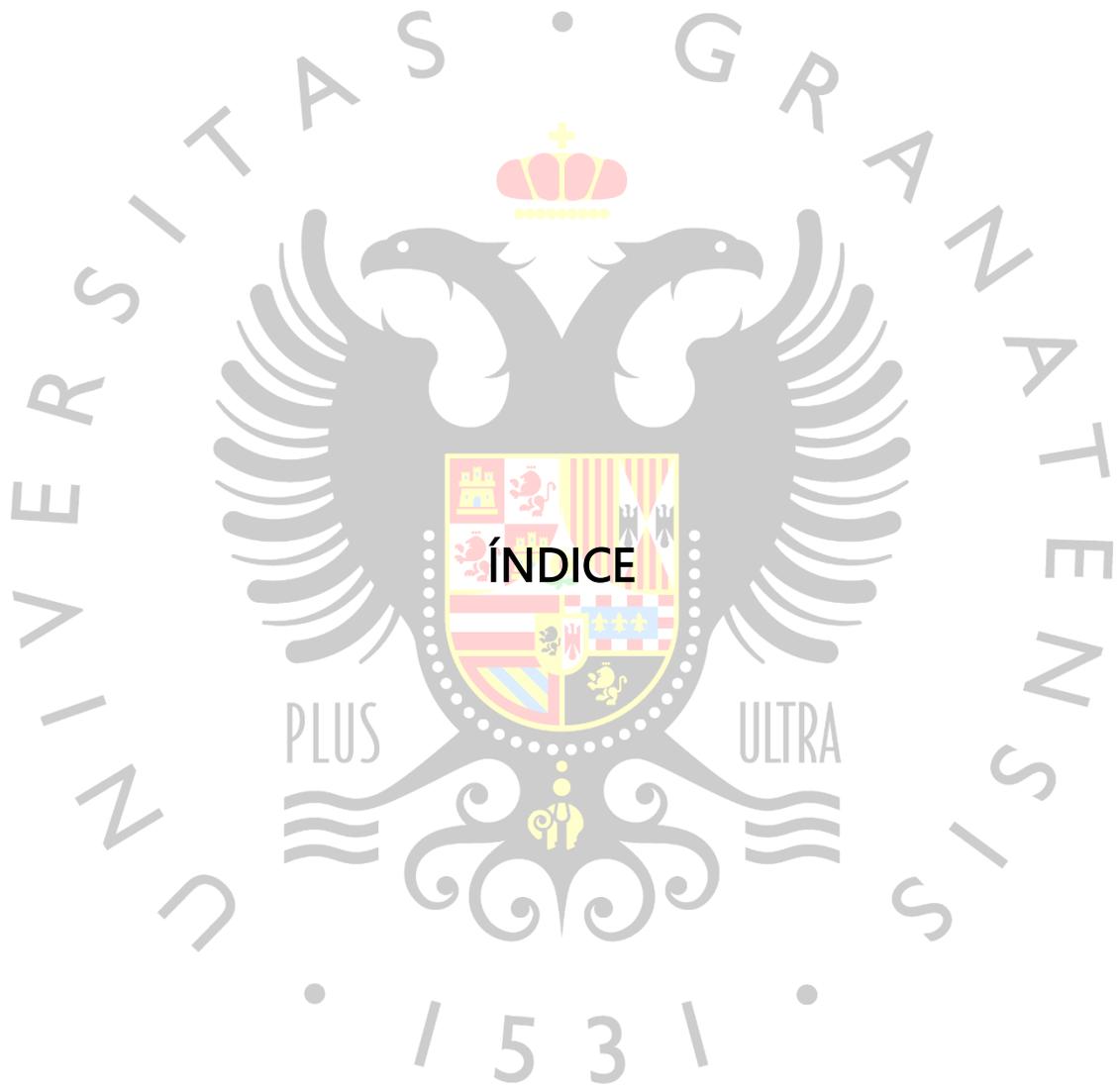
A) The *in vivo* effect of insulin crystals grown inside Fmoc-dialanine (FmocAA) and agarose hydrogels has been tested. It has been demonstrated that these composite crystals are physically stable being bioactive after maintaining them at 50 °C for 7 days. Moreover, insulin crystals grown in FmocAA presented slower dissolution rate and a slow release profile *in vivo*.

B) A systematic study of the physicochemical properties required for the bidimensional self-assembly at the air/water interface of Fmoc-dipeptides has been developed. The ability of these peptides to self-assemble at the air/water interface has been related for first time with the log *P* and -log *S* values.

D) Quantum dots (QDs) coated with mercaptopropionic acid (MPA) and the oligopeptides SS02, SS20 and SS31 functionalized with 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) have been produced. The MPA has served as pH-sensitive group and the oligopeptides functionalized with MUA

(MUA-SS02, MUA-SS20 y MUA-SS31) drove the modified QDs inside of a number of breast tumour lines cells mitochondria. Using this strategy, the inner pH of mitochondria of that cells has been measured.

E) Palladium nanoparticles (PdNPs) occluded inside agarose hydrogels have been produced. The catalytic activity of the PdNPs have been retained while their toxicity against lung cancer cells have been reduced.



ÍNDICE

PLUS

ULTRA

Capítulo 1: Hidrogeles supramoleculares anisótropos mediados por nanopartículas de hierro con mejores propiedades mecánicas..... 1

1. Introducción.....	3
1.1. Materiales híbridos y compuestos.....	3
1.2. Geles.....	4
1.2.1. Definición de gel y clasificación.....	4
1.2.2. Geles supramoleculares.....	6
1.3. Hidrogeles supramoleculares basados en péptidos.....	7
1.3.1. Métodos de gelificación.....	10
1.3.2. Versatilidad de los hidrogeles supramoleculares.....	13
1.4. Hidrogeles magnéticos (ferrogeles).....	14
2. Planteamiento y objetivos.....	15
3. Materiales y métodos.....	15
3.1. Reactivos, disolventes y equipos.....	15
3.2. Recubrimiento de FeNPs con PEG.....	16
3.3. Caracterización de nanopartículas.....	16
3.3.1. TEM.....	16
3.3.2. Medidas de movilidad electroforética.....	16
3.3.3. Magnetometría.....	17
3.4. Preparación de hidrogel control o hidrogel no magnético.....	17
3.5. Preparación y caracterización de FeNPs@PEG recubiertas con FmocFF.....	18
3.5.1. Determinación espectrofotométrica de FmocFF adsorbido sobre FeNPs@PEG.....	18
3.5.2. Medidas de movilidad electroforética de FeNPs@PEG@FmocFF.....	19
3.6. Preparación de hidrogeles magnéticos.....	19
3.7. Preparación de xerogeles.....	19
3.8. Caracterización de las propiedades magnéticas de hidrogeles.....	19
3.9. Caracterización mesoscópica de hidrogeles magnéticos mediante microscopía óptica.....	20
3.10. Caracterización hidrogeles mediante ESEM.....	20
3.11. Estudio de hidrogeles por CD.....	20
3.12. Estudio de hidrogeles por FTIR.....	20
3.13. Caracterización de xerogeles mediante XRD en polvo.....	21
3.14. Caracterización de xerogeles mediante XRD en sincrotrón.....	21
3.15. Estudio de difusión mediante FLCS.....	21

3.16. Caracterización reológica de hidrogeles.....	23
3.16.1. Cinética de gelificación.....	24
3.16.2. Comportamiento reológico en régimen estacionario.....	24
3.16.3. Comportamiento reológico en régimen oscilatorio.....	24
3.17. Análisis reológico de la anisotropía mecánica de hidrogeles.....	25
4. Discusión y resultados.....	26
4.1. Recubrimiento y caracterización de nanopartículas magnéticas.	
Establecimiento de la metodología de preparación de hidrogeles magnéticos.....	26
4.1.1. Primeras pruebas de gelificación: estudio de la adsorción de FmocFF sobre FeNPs@PEG.....	28
4.2. Caracterización morfológica y magnética de los hidrogeles.....	31
4.3. Estudio de la estructura secundaria de hidrogeles.....	33
4.3.1. Caracterización por CD.....	33
4.3.2. Caracterización por FTIR.....	34
4.3.3. Caracterización por XRD.....	35
4.4. Estudio de la difusión de moléculas a través de hidrogeles.....	36
4.5. Estudios reológicos.....	38
4.5.1. Cinéticas de gelificación.....	38
4.5.2. Comportamiento reológico en régimen estacionario.....	39
4.5.3. Comportamiento reológico en régimen oscilatorio.....	41
5. Conclusiones.....	43

**Capítulo 2: Cristales de lisozima crecidos en hidrogeles de FmocCF
presentan una mayor estabilidad frente al daño causado por radiación
de rayos X.....** 45

1. Introducción.....	47
1.1. Introducción a la cristalización de proteínas.....	47
1.2. Hidrogeles como medio para la cristalización de proteínas.....	48
1.2.1. Cristalización de proteínas en hidrogeles supramoleculares basados en péptidos.....	49
1.3. Radiación de sincrotrón y daño por radiación.....	51
2. Planteamiento y objetivos.....	52
3. Materiales y métodos.....	53
3.1. Reactivos, disolventes y equipos.....	53
3.2. Síntesis y caracterización de geladores.....	53

3.2.1. Síntesis en fase sólida de FmocCF y FmocMF.....	53
3.2.2. Caracterización de productos de síntesis.....	56
3.3. Preparación de hidrogeles.....	57
3.3.1. Preparación de hidrogeles FmocCF y FmocY.....	57
3.3.2. Preparación de hidrogel FmocMF.....	57
3.3.3. Preparación de hidrogeles de agarosa.....	57
3.4. Estudio de hidrogeles por CD.....	58
3.5. Espectroscopía por FTIR.....	58
3.6. Caracterización de xerogeles mediante XRD en polvo.....	58
3.7. Caracterización reológica de hidrogeles.....	58
3.8. Imágenes TEM de xerogeles.....	59
3.9. Cristalización de proteínas.....	59
3.10. Estudios de XRD con radiación de sincrotrón.....	60
3.10.1. Procesado de cristales y análisis de calidad.	60
3.10.2. Recopilación de datos a temperatura ambiente y estudio de daño por radiación.....	61
4. Discusión y resultados.	61
4.1. Diseño y preparación de hidrogeles.....	61
4.2. Caracterización de hidrogeles.....	63
4.2.1. Imágenes TEM.....	63
4.2.2. Caracterización de la estructura secundaria: CD, FTIR y XRD.....	63
4.2.3. Estudio reológico.....	64
4.3. Cristalización de proteínas.....	66
4.4. Estudio del efecto protector de FmocCF frente al daño por radiación.....	68
5. Conclusiones.....	71

Capítulo 3: Obtención de cristales de lisozima reforzados con nanotubos de carbono catalíticos y conductores de la electricidad..... 73

1. Introducción.....	75
1.1. Introducción a los materiales híbridos y compuestos con nanotubos de carbono.....	75
1.2. Hidrogeles con nanotubos de carbono.....	77
1.2.1. Hidrogeles supramoleculares con nanotubos de carbono.....	78
1.3. Cristales de proteína híbridos.....	78
2. Planteamiento y objetivos.....	82

3. Materiales y métodos.....	83
3.1. Reactivos, disolventes y equipos.....	83
3.2. Preparación de hidrogeles FmocFF control.....	83
3.3. Preparación de hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT.....	83
3.4. Preparación de xerogeles.....	84
3.5. Cuantificación de la concentración de SWCNTs en HHs.....	84
3.6. Protocolos de cristalización de lisozima.....	84
3.6.1. Cristalización por contradifusión.....	84
3.6.2. Cristalización por difusión de vapor.....	85
3.7. Protocolo de entrecruzamiento de cristales de lisozima.....	85
3.8. Estudios de actividad enzimática.....	86
3.9. Estudios por FTIR.....	87
3.10. Caracterización de xerogeles mediante XRD en polvo.....	87
3.11. Imágenes ESEM.....	87
3.12. Imágenes TEM de xerogeles y cristales.....	87
3.13. Microscopía Raman de xerogeles y cristales.....	88
3.14. Caracterización reológica de hidrogeles.....	88
3.15. Estudios por AFM de cristales.....	88
3.15.1. Imágenes topográficas.....	89
3.15.2. Propiedades nanomecánicas.....	89
3.15.2. Medidas de conductividad.....	89
3.16. Imágenes SEM.....	90
3.17. Estudio de XRD de cristales de proteína con radiación de sincrotrón.....	90
3.18. Análisis por TGA y por DSC de cristales de proteína.....	91
3.19. Medidas de intensidad-voltaje (I-V) en modo de dos electrodos.....	91
4. Discusión y resultados.....	92
4.1. Preparación de hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT.....	92
4.2. Cálculo de la concentración real de SWCNTs en hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT.....	93
4.3. Caracterización morfológica de hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT.....	95
4.3.1. TEM.....	95
4.3.2. ESEM.....	95
4.4. Estudio de la estructura secundaria de hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT..	96
4.4.1. FTIR.....	96
4.4.2. XRD en polvo.....	97
4.4.3. Estudio por microscopía Raman.....	98

4.5. Estudio reológico de hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT.....	99
4.6. Preparación de cristales de proteína en hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT.	100
4.7. Caracterización morfológica de cristales.....	102
4.7.1. SEM.....	102
4.7.2. TEM.....	103
4.7.3. Análisis topográfico por AFM.....	104
4.8. Estudio de las interacciones entre proteína y FmocFF-SWCNT en cristales híbridos lisozima-FmocFF-SWCNT.....	105
4.8.1. Estudio por FTIR.....	105
4.8.2. Estudio por microscopía Raman.....	106
4.9. Estudio cristalográfico de cristales híbridos.....	107
4.10. Estudio de la estabilidad térmica de CLLCs.....	108
4.11. Estudio de las propiedades mecánicas de CLLCs.....	109
4.12. Estudio de la capacidad catalítica de CLLCs.....	110
4.13. Medida de propiedades eléctricas de CLLCs.....	111
5. Conclusiones.....	114

Capítulo 4: De la mineralización biomimética de magnetita en hidrogeles supramoleculares a nanopartículas híbridas magnetita-lisina..... 115

1. Introducción.....	117
1.1. Nanopartículas de magnetita: descripción y aplicaciones.....	117
1.2. Métodos de producción de nanopartículas de magnetita.....	118
1.2.1. Limitación del escalado en la producción de MNPs para aplicaciones biomédicas.....	121
2. Planteamiento y objetivos.....	122
3. Materiales y métodos.....	123
3.1. Reactivos, disolventes y equipos.....	123
3.2. Precipitación de magnetita control.....	124
3.3. Precipitación de magnetita en presencia de aminoácidos.....	124
3.4. Purificación de sólidos magnéticos.....	125
3.5. Imágenes TEM y cálculo de distribución de tamaño.....	125
3.6. Medidas de potencial- ζ	125
3.7. Estudios por TGA.....	126
3.8. Medida de propiedades magnéticas.....	126

3.9. Estudios por FTIR.....	126
4. Discusión y resultados.....	127
4.1. Experimentos de mineralización biomimética con aminoácidos.....	127
4.2. Imágenes TEM, HRTEM y medidas de tamaño.....	128
4.3. Estudio de la adsorción de Lys sobre cristales de magnetita.....	131
4.4. Estudio de las propiedades magnéticas de MNPs.....	133
5. Conclusiones.....	135
Capítulo 5: Participación en otros proyectos.....	137
A. Cristales de insulina crecidos en hidrogeles de FmocAA muestran alta estabilidad térmica y perfiles de liberación controlada <i>in vivo</i>	139
B. Descifrando la autoasociación bidimensional de Fmoc-dipéptidos en interfases fluidas.....	143
C. Funcionalización de QDs con péptidos SS para medidas de pH intramitocondriales en líneas celulares de cáncer de mama.....	145
D. Inmovilización de nanopartículas de Pd en hidrogeles de agarosa para su empleo en “química BOOM”.....	147
General Conclusions.....	151
Bibliografía.....	157

Capítulo 1

**Hidrogeles supramoleculares
anisótropos mediados por
nanopartículas de hierro con
mejores propiedades mecánicas**

1. Introducción.

1.1. Materiales híbridos y compuestos.

Un material híbrido es aquel que está constituido por varios materiales de naturaleza distinta que interactúan entre sí a nivel molecular o nanométrico, entre los que existe una interacción sinérgica, es decir, el material resultante debe tener mejores o nuevas propiedades que las de los materiales componentes considerados individualmente.¹ La comunidad científica suele considerar como híbridos los materiales resultantes de la combinación de un material orgánico (o biológico) y uno inorgánico (híbridos orgánico-inorgánico).² Dependiendo de la naturaleza química mediante la cual interactúa la fase orgánica con la inorgánica, encontramos dos clases de materiales híbridos: Clase I y Clase II. En la Clase I se engloban los materiales híbridos en los que las partes orgánica e inorgánica interactúan entre sí a través de enlaces débiles como interacciones de Van der Waals, enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas. En la Clase II se encuentran los materiales en los que la interfase se da por enlaces covalentes o ion-covalentes. La naturaleza de esta interacción determina un gran número de propiedades ópticas, mecánicas, catalíticas, de estabilidad quimicofísica, etc. La naturaleza lleva millones de años empleando la estrategia de la hibridación de materiales orgánico-inorgánico (de ambas Clases) como por ejemplo en procesos de biomineralización en los que se producen materiales híbridos altamente eficientes a varias escalas³. El caso más común de estos biominerales es el que se da por la asociación de un biopolímero (quitina, colágeno, proteínas, etc.) con un componente inorgánico como pueden ser los carbonatos, silicatos, óxidos metálicos entre otros.⁴⁻⁸ Casos representativos de biominerales se encuentran en las conchas de los moluscos, los huesos, el marfil, los dientes de los vertebrados, las diatomeas, bacterias magnetotácticas, etc.

Los materiales compuestos (en inglés *composites*) son materiales mixtos en el que los materiales componentes tienen generalmente propiedades distintas y no pierden su identidad individual al unirse. A diferencia de los materiales híbridos, para considerar un material como compuesto no es necesario (pero no excluyente) que la interacción entre componentes se dé a escala molecular o nanométrica, ni que la naturaleza de los materiales que se combinan sea distinta. Lo que sí tienen en común los materiales híbridos y compuestos es que la interacción entre componentes debe ser sinérgica. Esta definición excluye a las disoluciones o a las fusiones de materiales (como las aleaciones) puesto que los componentes pierden su identidad individual y la conjunción pasa a ser un material en sí mismo. La definición también excluye a las mezclas (como caso general de combinación de materiales) ya que la combinación de materiales tiene que “tener sentido”, aunque ésta se dé de forma natural.

La naturaleza lleva haciendo materiales compuestos desde hace millones de años. La madera, por ejemplo, es un material *composite* resultado de la combinación de fibras largas de celulosa que se mantienen unidas entre sí por lignina. Si la celulosa no se combina con lignina, se obtienen materiales muy distintos en cuanto a sus propiedades mecánicas como serían el algodón o el lino. Es la combinación entre celulosa y lignina lo que hace de la madera un material resistente, aun siendo la lignina un material incluso más blando que la celulosa. Los humanos también llevamos mucho tiempo haciendo materiales compuestos para solucionar problemas tecnológicos, como es el caso del hormigón armado en el que se combina el hormigón (también un material compuesto) con barras de acero para obtener un material más resistente y flexible, o más recientemente, la fibra de vidrio en la que una matriz polimérica se refuerza por la inclusión de filamentos de vidrio.

A nivel de investigación a escala de laboratorio también se han logrado numerosos avances con la combinación de materiales ya sean híbridos o compuestos. En relación al tipo de materiales que se van a comentar a lo largo de la presente tesis doctoral, podrían resaltarse algunas estrategias de combinación de materiales como puede ser el empleo de recubrimientos poliméricos biocompatibles para recubrir nanopartículas y convertirlas así en aptas para aplicaciones biotecnológicas o biomédicas.⁹⁻¹¹ También merece la pena resaltar la combinación de nanopartículas metálicas con matrices poliméricas, haciendo posible la utilización de dichas nanopartículas en aplicaciones para las que de otro modo serían demasiado pequeñas o inestables.¹² Otra estrategia interesante, es la combinación de cristales de proteína con partículas metálicas o complejos organometálicos para combinar la selectividad de las proteínas con la capacidad catalítica¹³⁻¹⁵ y óptica de los aditivos.¹⁶⁻¹⁸

En definitiva, la combinación de materiales (tanto híbridos como compuestos) para solucionar problemas tecnológicos o científicos es prácticamente infinita y constituye un nicho de investigación en auge que cada día se encamina más a ser la solución de grandes problemas que afectan a la sociedad.

1.2. Geles.

1.2.1. Definición de gel y clasificación.

Según Paul J. Flory (Premio Nobel de Química en 1974) una sustancia es un gel si está compuesto por un líquido y un sólido en menor proporción, que a la vez tiene una estructura continua con dimensiones macroscópicas que es permanente en la escala de tiempo de un experimento analítico y presenta propiedades reológicas de sólido.¹⁹ También podría definirse un gel como un estado coloidal de la materia constituido por una pequeña cantidad de un sólido capaz de formar una estructura reticular tridimensional que inmoviliza de manera macroscópica el flujo de una mayor

cantidad de líquido.²⁰ En definitiva, un gel es un material compuesto en su mayor parte por un líquido que queda inmovilizado por la red tridimensional de un sólido, en el que el líquido no es capaz de fluir y como resultado, tiene propiedades macroscópicas de sólido. La inmovilización del líquido tiene lugar debido a que este se adhiere a la gran superficie tridimensional generada por el componente sólido. A dicho componente sólido se le llama gelador.

Existen diversas formas de clasificar los geles atendiendo a varios criterios. La primera gran subclasificación se hace en función de la naturaleza de la fase dispersante en la que se forma el gel. De esta forma, se pueden clasificar los geles en organogeles e hidrogeles si el medio en el que se forman es un disolvente orgánico o agua, respectivamente. También existe el caso en el que el componente líquido es sustituido por un gas dando lugar bien a los aerogeles, resultado de la sustitución del líquido por un gas manteniendo intacta la estructura tridimensional del sólido, o bien a los xerogeles, en los que el líquido se deja evaporar, lo que a veces puede provocar un colapso de la estructura reticular. Estos dos tipos de materiales se suelen considerar como geles, aunque su composición no se ajuste totalmente a la definición general.

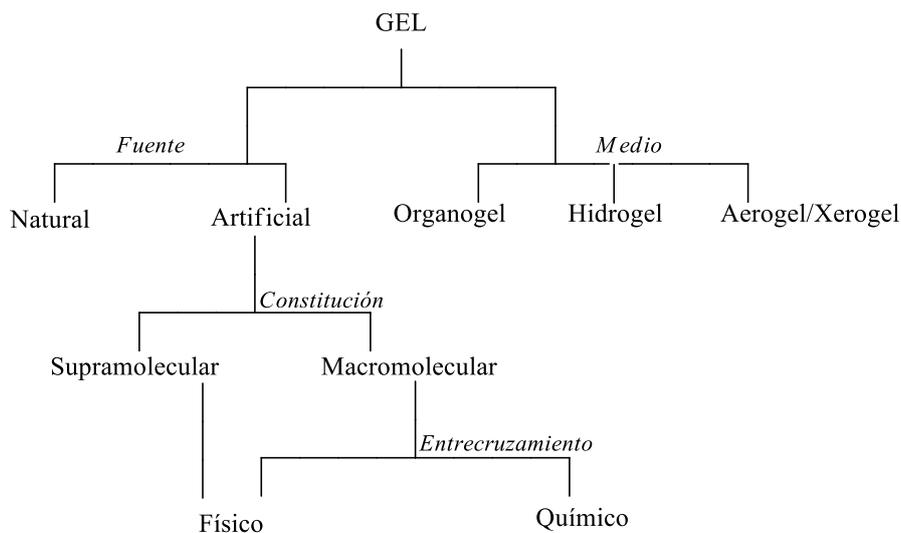


Figura 1. Clasificación de los geles.

Otra gran subclasificación sería la que viene definida por el origen del gel: natural o sintético. La mayoría de los geles de origen natural están constituidos por macromoléculas que forman el gel mediante interacciones físicas, predominantemente enlaces de hidrógeno. Ejemplos ampliamente conocidos de éstos son: la gelatina, el colágeno, la agarosa o el almidón. Los geles que derivan de compuestos de síntesis se pueden clasificar según su constitución en geles macromoleculares constituidos por polímeros, y en geles supramoleculares constituidos por moléculas de bajo peso molecular. A su vez, los geles poliméricos pueden formar la red tridimensional por interacciones físicas (enlaces no covalentes) o por interacciones químicas (enlaces covalentes)²¹, mientras que

los supramoleculares solo pueden formar redes a través de interacciones físicas. En la Figura 1 se detalla la subclasificación de geles en función de los criterios mencionados.

La naturaleza de las interacciones que generan la estructura tridimensional condiciona en gran medida la estabilidad del gel. Por este motivo, los geles macromoleculares químicos (geles poliméricos entrecruzados), en los que las interacciones se dan a través de enlaces covalentes, suelen ser muy estables y térmicamente reversibles. Cuando las interacciones son de tipo supramolecular como ocurre en los geles físicos, los geles suelen ser también muy estables, aunque menos que los geles químicos. Sin embargo, debido a la naturaleza no covalente de las interacciones que generan la estructura tridimensional, en muchos casos son térmicamente reversibles. Los geles físicos constituidos por moléculas de bajo peso molecular son un caso particular de geles físicos en los que todas las interacciones que generan la estructura tridimensional (desde la unión entre moléculas para formar fibras hasta las uniones entre fibras) son no covalentes, lo que les permite, en muchos casos, ser térmicamente reversibles y responder a estímulos. En la presente tesis doctoral, se utilizará el término gel supramolecular para hacer referencia a los hidrogeles físicos constituidos por moléculas de bajo peso molecular.

1.2.2. Geles supramoleculares.

Un gelador supramolecular es un compuesto orgánico de bajo peso molecular que debe tener una estructura química que promueva de manera muy eficiente una autoasociación anisótropa, es decir, que favorezca la formación de estructuras en dos dimensiones que al entrecruzarse formen una red tridimensional que genere un gel. Existen una gran variedad de estructuras químicas que son capaces de autoasociarse de esta manera pero actualmente, esta capacidad de autoasociación no puede anticiparse *a priori* por lo que el descubrimiento de nuevos geladores tradicionalmente ha sido por azar.²²

La aparición de los geles supramoleculares se remonta al descubrimiento de Brenzinger²³ en el año 1892, redescubierto por Hoffman²⁴ casi 20 años después en 1921. Se descubrió que la molécula dibenzoil-L-cistina (Figura 2, **1**) era capaz de formar un gel a una concentración de 0.1%. Tuvieron que pasar más de 100 años desde el descubrimiento de Brenzinger, para que se hiciera un estudio en profundidad de las cualidades que debe poseer una molécula para convertirse en un buen gelador supramolecular.²⁵ Aunque los geles supramoleculares se conozcan desde hace más de 100 años, constituyen un tema muy reciente de investigación, con una producción científica en aumento gracias principalmente a la gran variedad de aplicaciones que están teniendo estos materiales en áreas como la biomedicina, las ciencias de los materiales y la nanotecnología (Tabla 1).²⁶

Tabla 1. Aplicaciones de los geles supramoleculares.

Campos de investigación	Aplicaciones
Biomateriales	Medicina regenerativa e ingeniería tisular Hidrogeles que responden a enzimas Biomineralización
Materiales inteligentes	Agentes terapéuticos y liberación de fármacos Aplicaciones optoelectrónicas Sensores químicos Catálisis
Moldes para nanoestructuras	Materiales inorgánicos nanoporosos Materiales híbridos gel-nanopartícula Polímeros orgánicos modificados

Una de las características de estos geles que los hace destacar frente a los macromoleculares, es su versatilidad. Su composición química puede ser muy variada, lo que permite poder diseñar materiales “a la carta” que reúnan las características químicas necesarias para aplicaciones concretas.²²

1.3. Hidrogeles supramoleculares: hidrogeles basados en péptidos.

Dentro de los geles supramoleculares, un grupo muy importante son los hidrogeles supramoleculares, es decir, aquellos en los que la fase dispersante es agua. Dicha importancia radica en las numerosas aplicaciones que tienen en biomedicina debido a que, al estar constituidos en su mayoría por agua, son más biocompatibles.

Las moléculas capaces de formar hidrogeles supramoleculares son muy numerosas. En la literatura se pueden encontrar varias revisiones bibliográficas sobre hidrogeladores^{18,24-28} en las que se enumeran una gran cantidad de ellos agrupándolos atendiendo a distintos criterios. En la Figura 2 se muestran algunas estructuras de hidrogeladores supramoleculares para resaltar su gran variedad estructural. En la figura se puede observar que los hidrogeladores supramoleculares pueden ser derivados del colesterol³⁰ **2**, compuestos aromáticos polares con cadenas alquílicas³¹ **3**, estructuras polihidroxiladas³² **4**, complejos organometálicos³³ **5**, compuestos poliaromáticos³⁴ **6**, moléculas cíclicas³⁵ **7**, derivados de nucleósidos³⁶ **8**, derivados de azúcares³⁷ **9** y un largo etcétera. De entre todas las “subcategorías” de hidrogeles supramoleculares, los péptidos y sus derivados constituyen el grueso de estos materiales. Se ha descubierto que una gran cantidad de péptidos tienen la capacidad de autoasociarse en agua formando geles, desde dipéptidos (con dos aminoácidos) como FF³⁸ o IF,³⁹ hasta péptidos de 28 aminoácidos como el péptido

KIAALKQKIASLKQEIDALEYENDALEQ.⁴⁰ La singular capacidad de los péptidos para formar hidrogeles supramoleculares radica en su naturaleza anfótera y en la enorme capacidad que tienen para generar interacciones intermoleculares estables (necesarias para la construcción de proteínas funcionales). Al tener aminoácidos en su estructura, muchos de ellos resultan ser biocompatibles y biodegradables, lo que los convierte en materiales idóneos para aplicaciones biomédicas como ingeniería tisular.

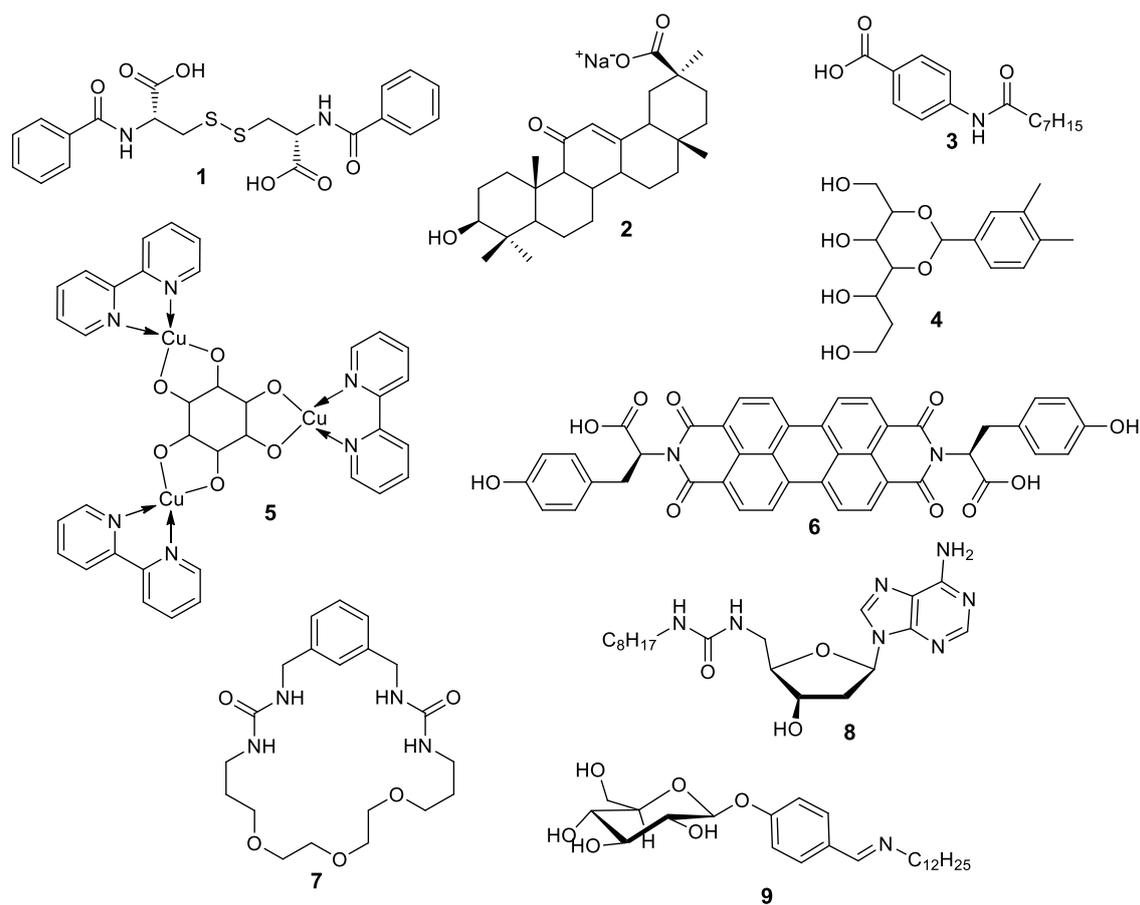


Figura 2. Estructuras de hidrogeladores supramoleculares.

La versatilidad de los péptidos para formar hidrogeles supramoleculares aumenta cuando se modifican químicamente con la intención de variar su solubilidad y/o para mejorar aún más su capacidad de autoasociarse. El caso más representativo es el de péptidos modificados con la unión de grupos aromáticos que cumplen la doble función de, por un lado, aumentar la insolubilidad en agua de los péptidos y, por otro lado, la de favorecer la autoasociación entre varias moléculas a través de apilamiento π . La parte polar de la molécula (los aminoácidos del péptido) mantiene su interacción favorable con el agua y además es capaz de formar enlaces de hidrógeno intermoleculares contribuyendo aún más a la autoasociación. Las estructuras aromáticas más empleadas en este sentido han sido (ejemplos en la Figura 3) el naftaleno⁴¹ **10**, el 2-naftol⁴² **11**, el

anillo pireno⁴³ **12** o el carbobenciloxi (Cbz)⁴⁴ **13**, pero el más destacado ha sido el grupo fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) **14**.⁴⁵

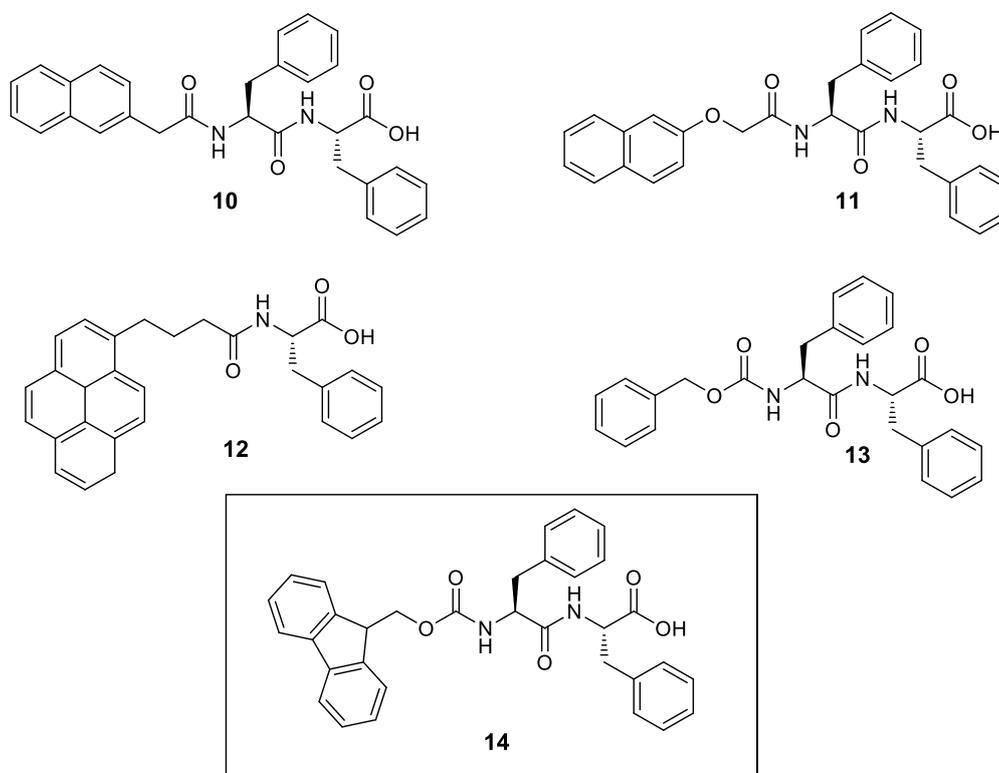


Figura 3. Ejemplos de estructuras de hidrogeladores supramoleculares derivados de péptidos con grupos aromáticos.

Desde que B. Xu y colaboradores los presentaron en 2003,⁴⁶ utilizando el grupo Fmoc como grupo aromático auxiliar se han conseguido obtener varios hidrogeles⁴⁷ pero sin duda, el ejemplo más destacado tanto de los hidrogeles supramoleculares peptídicos Fmoc-derivados como de los hidrogeles supramoleculares en general, es el hidrogel de FmocFF (Figura 3, **14**). Descrito por primera vez por E. Gazit en 2006,⁴⁵ este hidrogel es versátil ya que puede formarse tanto por cambios de pH como de disolvente (ver más adelante en apartado 1.2.1) y dentro de un rango amplio de concentraciones (desde 0.22 hasta 2.14% (p/v)), es estable en condiciones fisiológicas, forma fibras con una anchura similar a la de las matrices extracelulares y permite el cultivo de células tanto en su superficie como en tres dimensiones. Además de las características mencionadas, es una molécula muy simple, fácil de sintetizar y también es comercial. En la Figura 4 puede verse una imagen del aspecto macroscópico del hidrogel FmocFF junto con una imagen de microscopía electrónica de barrido medioambiental en la que puede apreciarse el entramado tridimensional de fibras que lo componen.

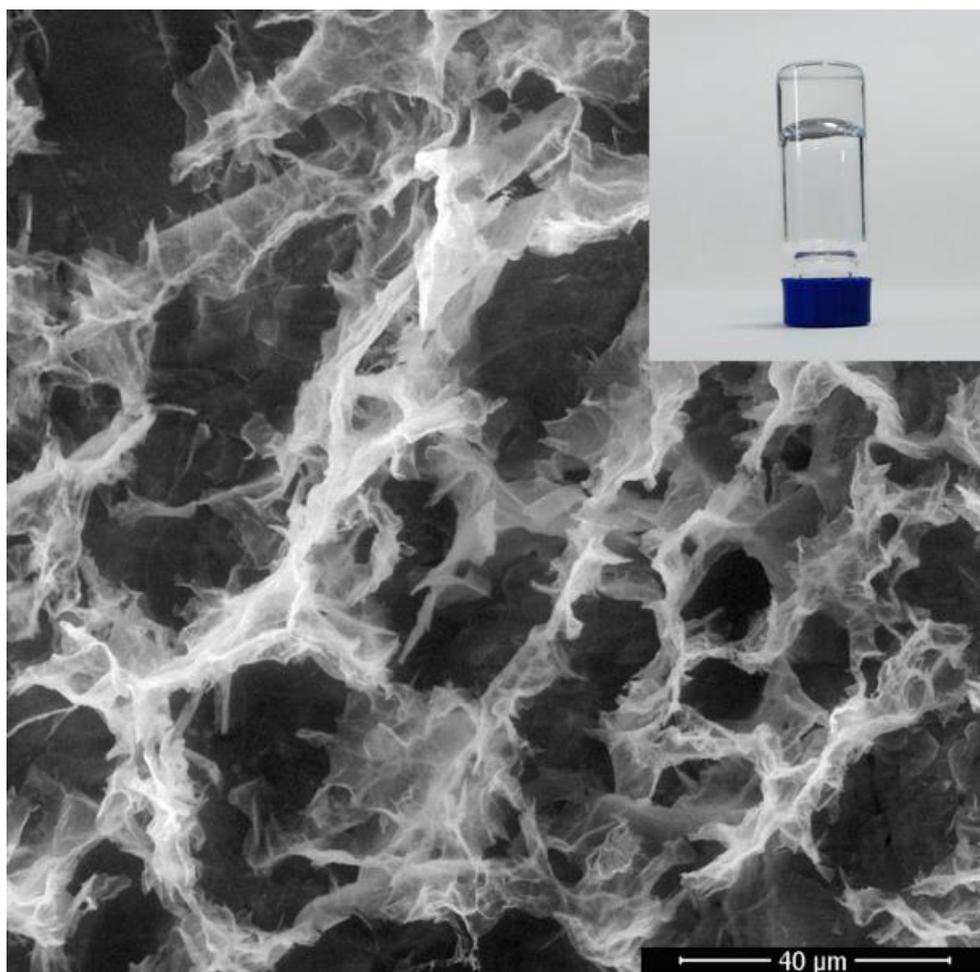


Figura 4. Imagen de microscopio electrónico de barrido medioambiental del hidrogel FmocFF. Inserto: fotografía de gel FmocFF.

1.3.1. Métodos de gelificación.

El proceso mediante el cual se consigue la autoasociación anisótropa del gelador de manera que forme una estructura tridimensional que inmovilice el flujo de líquido, se le conoce como gelificación. Para que este fenómeno ocurra suele ser necesario provocar un estímulo al sistema que induzca la autoasociación. Estos estímulos pueden ser muy variados. A continuación, se exponen las estrategias más populares debido a su versatilidad, sencillez y, sobre todo, por la homogeneidad de los geles obtenidos. Nótese que las técnicas que se exponen son aplicables a hidrogeles supramoleculares. Aunque algunas de las técnicas que se mencionan son aplicables a geles macromoleculares o a organogeles (macromoleculares o supramoleculares), no todas lo son.

A) Cambio de temperatura: los hidrogeladores supramoleculares son generalmente insolubles en agua por debajo de la llamada “temperatura gel” o T_{gel} . Esta es la temperatura máxima en la que un gel sigue manteniendo su identidad y por encima de ésta, puede pasar a ser una disolución (transición gel-sol por temperatura). El procedimiento habitual de gelificación consiste en calentar

una suspensión fina del gelador en agua hasta conseguir su disolución total. Después se deja enfriar hasta que a la T_{gel} el gelador comienza a organizarse formando el gel. Esta técnica suele dar lugar a hidrogeles muy homogéneos.

Cuando la T_{gel} está próxima a la temperatura ambiente o a la temperatura corporal, se puede utilizar la transición sol-gel en aplicaciones biomédicas como la liberación controlada de fármacos.^{48,49}

B) Cambio de disolvente: esta técnica consiste en disolver el gelador en un disolvente orgánico miscible con el agua en el que el gelador es muy soluble, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), hexafluoroisopropanol (HFIP) o metanol (MeOH). A esta disolución se le añade una mayor cantidad de agua de modo que el gelador ya no sea soluble en la nueva mezcla de disolventes. En ese momento comienza la precipitación ordenada del gelador (autoasociación) formando fibras que dan lugar al gel.

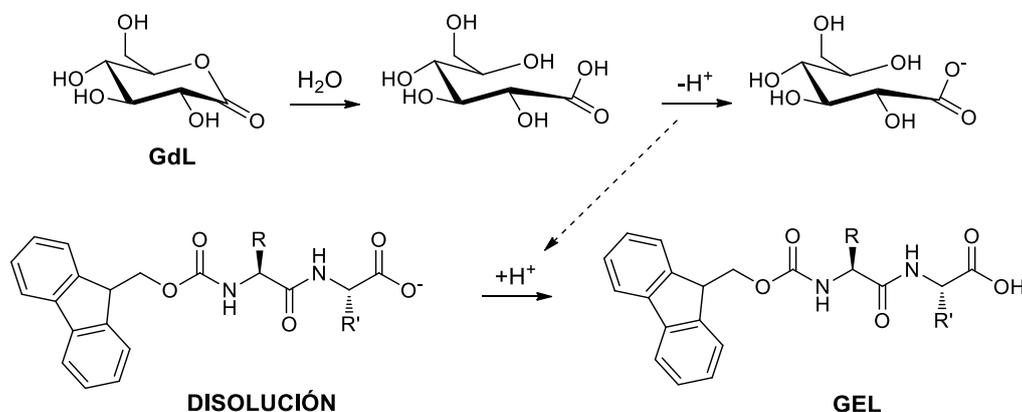
En los casos en los que la gelificación no es instantánea y se puede conseguir una homogenización de la mezcla antes de la gelificación, se suelen conseguir hidrogeles muy homogéneos. En los casos en los que esto no es posible, se suele emplear calor para conseguir una temperatura en la que el gelador es soluble en la mezcla de disolventes para luego dejarlo enfriar y conseguir así la gelificación. La última alternativa se emplea cuando el gelador no se puede disolver simplemente calentando una suspensión del mismo en la mezcla de disolventes.

En definitiva, tanto la técnica de cambio de disolvente como la combinación de ésta con el cambio de temperatura, son técnicas de gelificación muy sencillas con las que se suelen obtener resultados excelentes.

C) Cambio de pH: los hidrogeladores que poseen grupos ácidos o básicos en su estructura (como suele ser el caso de los geladores peptídicos o derivados de péptidos) son susceptibles de disolverse en medios básicos o ácidos respectivamente. Una vez disueltos se promueve su autoasociación mediante la neutralización del medio por adición de ácido o base.

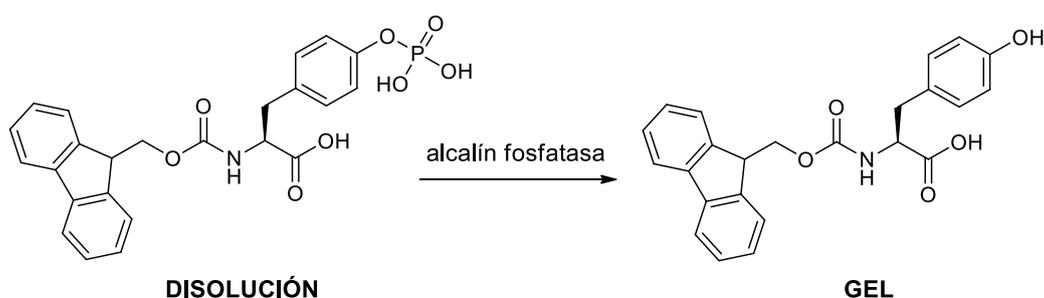
Como se ha comentado con anterioridad, los hidrogeladores supramoleculares más habituales son los derivados aromáticos de péptidos. La unión del grupo aromático se suele hacer por el grupo amino terminal dejando al menos un grupo ácido libre en su estructura. Por este motivo, la gelificación de estos péptidos consiste en disolver el compuesto en medio básico e inducir la gelificación mediante la adición de ácido. El empleo de ácidos minerales como ácido clorhídrico para inducir la gelificación⁵⁰ en muchos casos originaba geles heterogéneos debido al rápido

proceso de gelificación. Como solución a este problema, Adams y colaboradores⁵¹ en 2009 propusieron la utilización de D-(+)-glucono-1,5-lactona (GdL) de modo que la hidrólisis lenta de la lactona⁵² provocase un cambio progresivo del pH, generando así hidrogeles homogéneos (Esquema 1).



Esquema 1: ejemplificación del mecanismo de acción de la GdL.

D) Otros métodos de gelificación: aunque los métodos descritos hasta ahora son los más empleados, existen otros que merecen ser comentados. Por ejemplo, en los casos en los que una molécula sea soluble en agua y tras una transformación química pase a ser un gelador, se podría decir que la gelificación ha sido inducida por una reacción química. Existen diversas alternativas descritas en función de la reacción química que provoque la gelificación que van desde reacciones de hidrólisis⁵³ a reacciones de Diels-Alder.⁵⁴ Otro ejemplo es la gelificación inducida por enzimas. Esta estrategia puede resultar de especial interés cuando se busca la transición sol-gel en condiciones biocompatibles o fisiológicas en presencia de enzimas específicas capaces de inducir la gelificación en un lugar concreto. Un ejemplo de esta metodología, además de ser la primera, es la descrita por B. Xu y colaboradores⁵⁵ (Esquema 2) donde inducen la formación de un gel por la desfosforilación de un derivado de Fmoc-tirosina catalizada por alcalín fosfatasa.



Esquema 2. Gelificación de Fmoc-tirosina inducida por la acción de alcalín fosfatasa.

1.3.2. Versatilidad de los hidrogeles supramoleculares.

Los hidrogeles supramoleculares pueden formarse empleando una gran variedad de moléculas y de condiciones^{47,56} permitiendo obtener distintos materiales con un amplio abanico de propiedades. Es tal la versatilidad de estos materiales, que las propiedades del hidrogel pueden depender del procedimiento seguido para formarlos, así por ejemplo, las propiedades mecánicas de un hidrogel son distintas si este hidrogel se prepara por cambios de pH o de disolvente. Es más, la técnica de homogenización y el contenido en disolvente también pueden afectar a las propiedades del gel.⁵⁷⁻⁶⁰

Otra vía por la que se han conseguido modificar las propiedades mecánicas de estos materiales, ha sido por combinación con distintos aditivos. Por ejemplo, cuando el gel de FmocFF se combina con Fmoc-lisina, Fmoc-aspártico o Fmoc-serina, se obtienen geles con módulos elásticos inferiores a los del gel FmocFF sin aditivos.⁶¹ Sin embargo, si el gel de FmocFF se forma en combinación con FmocRGD (Fmoc-arginina-glicina-aspártico), el hidrogel resultante presenta tensiones mecánicas superiores.⁶² También se pueden alterar las propiedades macroscópicas de estos geles cuando se les añaden macromoléculas como pueden ser el dextrano^{63,64} que disminuye las propiedades mecánicas del gel FmocFF, la agarosa⁶⁵ que aumenta el esfuerzo de fractura, y el glucomanano⁶⁶ que produce un aumento de la estabilidad mecánica.

El hecho de que los hidrogeles sean materiales macroporosos les permite albergar en su interior nanopartículas y/o nanomateriales que pueden modificar su comportamiento micro- y macroscópico y, lo más interesante, pueden dotar al gel de nuevas propiedades. Por ejemplo, la combinación del péptido Boc-Phe-Phe-Ala-OH con nanopartículas de plata,⁶⁷ origina un gel que presenta una resistencia mecánica inferior pero a la vez, estas nanopartículas dotan al gel de fluorescencia y de propiedades antimicrobianas. La adición de nanotubos de carbono a hidrogeles de Fmoc-Phe-OH,⁶⁸ o grafeno a hidrogeles de Fmoc-Phe-Asp-OH o Fmoc-Tyr-Asp-OH,⁶⁹ incrementan la resistencia mecánica y en el caso concreto de los nanotubos de carbono, convierten al hidrogel en conductor de la electricidad. También se ha visto que determinadas nanopartículas de poliestireno son capaces de modificar la distribución de las fibras supramoleculares de glicopéptidos en el estado gel.⁷⁰

Una cualidad interesante que presentan los hidrogeles supramoleculares, es la posibilidad de diseñarlos químicamente para responder a distintos estímulos externos que les provoquen modificaciones estructurales. La naturaleza dinámica de las interacciones supramoleculares los convierte en materiales especialmente susceptibles de verse afectados por estímulos externos y

ser adaptativos a su entorno.⁷¹ A los materiales capaces de responder a estímulos y ser adaptativos a su entorno se les suele denominar materiales inteligentes.^{72,73}

1.4. Hidrogeles magnéticos (ferrogeles).

Un caso destacable de materiales inteligentes basados en hidrogeles, es el de los hidrogeles magnéticos o ferrogeles. Estos materiales compuestos se obtienen por combinación de una matriz gel con algún tipo de nanopartícula (o micropartícula) magnética, como pueden ser distintos óxidos de hierro como γ -Fe₂O₃, Fe₃O₄ o de hierro y cobalto (CoFe₂O₄), entre otros. Cuando los ferrogeles se encuentran bajo la influencia de un campo magnético, las partículas embebidas interactúan entre ellas y con la matriz que las envuelve provocando así alteraciones en las características del sistema que van desde la morfología de su microestructura hasta su comportamiento mecánico macroscópico.^{74,75} Teniendo en cuenta que los campos magnéticos se aplican a distancia sin interferir directamente en el material y que además son generalmente inocuos al resto de elementos que componen el sistema, los hidrogeles magnéticos son un buen ejemplo de material inteligente. Debido a sus características excepcionales, resultan ser materiales muy interesantes en aplicaciones concretas tales como transportadores de fármacos de liberación controlada por campos magnéticos, como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen, como agentes para el tratamiento con hipertermia, etc. La capacidad de los hidrogeles magnéticos para verse afectada por estímulos externos fue demostrada por primera vez por M. Zrinyi y colaboradores en 1996 cuando describieron un material compuesto por nanopartículas de magnetita embebidas en una matriz de polivinilalcohol (PVA), capaz de elongarse o contraerse por efecto de un campo magnético externo.⁷⁶ Años más tarde, en 2011 X. Zhao y colaboradores emplearon una estrategia similar fabricando hidrogeles de alginato modificado con RGD (arginina-glicina-aspártico) con nanopartículas de magnetita capaces de comprimirse por efecto de un campo magnético liberando fármacos, plásmidos de ADN e incluso células.⁷⁷

El otro gran objetivo en el diseño de hidrogeles magnéticos ha sido el de mejorar sus propiedades mecánicas para hacerlos más resistentes a la deformación. La posibilidad de provocar un ordenamiento interno del hidrogel por acción de un campo magnético, podría provocar el cambio en las propiedades mecánicas del gel en función del campo aplicado. El diseño de materiales mecánicamente mejorados es una cuestión de especial relevancia cuando se trata de hidrogeles para ingeniería tisular. A la hora de cultivar células en materiales artificiales, el comportamiento mecánico del material es crucial. Las células son muy sensibles a la dureza o resistencia del material en el que crecen. Conseguir modular esas propiedades puede influir drásticamente en la evolución de los cultivos celulares en cuanto a la proliferación y la diferenciación celular.^{78,79} En un reciente trabajo se describe la utilización de nano-partículas de polietilenglicol con núcleo de

magnetita para obtener un tejido artificial al combinarlas con hidrogeles de fibrina-agarosa. Además de haberse demostrado su compatibilidad en implantes *in-vivo*, también se demuestra que sus propiedades mecánicas se modifican al aplicarle un campo magnético externo.⁸⁰

2. Planteamiento y objetivos.

Como se ha expuesto en la introducción, la naturaleza dinámica de las interacciones que generan la estructura tridimensional de los hidrogeles supramoleculares les hace especialmente susceptibles de verse afectados por estímulos externos, principalmente cuando se combinan con nanomateriales. Esta ventaja ha sido poco explorada en la literatura en lo referente a la obtención de hidrogeles supramoleculares magnéticos capaces de responder a un campo magnético externo.⁸¹ En este sentido, para la elaboración del presente trabajo, se planteó si sería posible modificar las propiedades mecánicas de un hidrogel supramolecular mediante la inclusión de nanopartículas magnéticas.

Para abordar la cuestión planteada se establecieron los siguientes **objetivos** específicos:

1. Diseñar y sintetizar hidrogeles supramoleculares de FmocFF que alberguen nanopartículas de hierro magnéticas en su interior. Preparar dichos hidrogeles en presencia y ausencia de un campo magnético externo.
2. Estudiar las propiedades micro y macroestructurales de los nuevos geles supramoleculares magnéticos.

3. Materiales y métodos.

3.1. Reactivos, disolventes y equipos.

Los reactivos y disolventes empleados se obtuvieron de fuentes comerciales y se utilizaron sin purificación previa. El origen de los reactivos más relevantes se especificará a lo largo del texto con el nombre de la casa comercial en cursiva.

Los equipos empleados se especificarán a lo largo del texto escribiendo el modelo en cursiva y la marca entre paréntesis.

3.2. Recubrimiento de FeNPs con PEG.

Las nanopartículas de hierro (**FeNPs**) de 60-80 nm (99.7% de Fe) empleadas se adquirieron envasadas al vacío de *SkySpring Nanomaterials, Inc.* Para evitar la posible oxidación por una exposición larga al oxígeno de la atmósfera, se abrieron en el interior de una caja de guantes con atmósfera de argón donde se pesaron en porciones de 200 mg. Inmediatamente después se procedió a recubrirlas con una capa de polietilenglicol (PEG) como se indica a continuación.

El procedimiento seguido para el recubrimiento se basó en el descrito por Chatterjee y colaboradores⁸² y consistió en lo siguiente: en un recipiente de 1 L se preparó una mezcla de 400 mL de hexano, 150 mL de aceite mineral y 0.75 mL de sesquiolato de sorbitán. En un recipiente aparte se preparó una mezcla de 200 mg de FeNPs y 1 g de PEG-400 en 15 mL de agua destilada previamente purgada con argón. La suspensión de FeNPs se homogenizó con ayuda de un baño de ultrasonidos *603-ultrasonic bath* (HSt Powersonic) durante 7 minutos y se añadió al recipiente de un litro. La mezcla obtenida se homogeneizó con ultrasonidos durante 5 minutos para después acoplarle un agitador mecánico. Una vez la mezcla se puso en agitación, se añadieron 150 mL de una disolución de glutaraldehído al 25% en agua. La reacción se mantuvo en agitación durante 2 horas. Para completar el proceso se separaron las FeNPs recubiertas de PEG (**FeNPs@PEG**) por decantación magnética y se lavaron repetidamente con etanol y hexano.

3.3. Caracterización de nanopartículas.

3.3.1. TEM.

Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (TEM del inglés *Transmission Electron Microscope/Microscopy*) *LIBRA 120 PLUS* (Carl Zeiss) para estudiar las nanopartículas comerciales y las recubiertas con PEG. Las muestras se prepararon formando una suspensión de nanopartículas en etanol y poniendo una gota de dicha suspensión sobre una rejilla de cobre para microscopía electrónica. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos antes de introducirlas en el microscopio.

3.3.2. Medidas de movilidad electroforética.

Se determinó el punto isoeléctrico tanto de las partículas comerciales como de las FeNPs@PEG, mediante medidas de la movilidad electroforética a diferentes valores de pH empleando un equipo

de medida de dispersión dinámica de luz *Zetasizer Nano Zs* (Malvern). Para la realización de estas medidas se prepararon suspensiones diluidas de partículas en una disolución de nitrato sódico (NaNO_3) 1 mM. El ajuste de pH de cada suspensión se consiguió añadiendo pequeñas porciones de disoluciones de hidróxido sódico (NaOH) 0.1 M o ácido nítrico (HNO_3) 0.1 M a la vez que se medía el pH con ayuda de un pH-metro *session PH 3* (Hach). El pH se ajustó a cada uno de los valores enteros comprendidos en el rango de pH 4-11. Cada muestra se analizó por triplicado a 25 °C en cubetas de plástico desechables.

3.3.3. Magnetometría.

Tanto las FeNPs comerciales como las FeNPs@PEG fueron analizadas con un magnetómetro *MPMS X* (Quantum Design) para determinar sus propiedades magnéticas a través de sus curvas de magnetización.

3.4. Preparación de hidrogel control o hidrogel no magnético.

El hidrogel no magnético (**HGNM**) es un gel de FmocFF (Figura 4, **14**) con una concentración de gelador de 0.3% (p/v) preparado por cambio de pH con D-(+)-glucono-1,5-lactona (GdL, Esquema 1) siguiendo un protocolo basado en los descritos en bibliografía.⁸³ En primer lugar, se preparó una suspensión de gelador FmocFF (adquirido de *Bachem Co.*) en agua destilada con una concentración de 0.5% (p/v). Esta suspensión se disgregó con ayuda de un baño de ultrasonidos hasta que se consiguió disgregar el sólido completamente. En ese momento, se añadieron pequeñas porciones de una disolución de NaOH 0.5 M con pipeta para disolver el gelador. Tras cada adición de NaOH, la suspensión se agitó manualmente y se volvió a sumergir en el baño de ultrasonidos. La adición de NaOH se detuvo en el momento en el que la disolución alcanzó un pH aproximado de 10.3. Esta disolución se diluyó con agua destilada o con una disolución de colorante fluorescente 2.5 nM para los estudios de espectroscopía de correlación de tiempo de vida de fluorescencia (FLCS del inglés *Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy*) (ver apartado 3.15), hasta alcanzar una concentración final de 0.3% (p/v). Para inducir la gelificación, se añadieron 2 equivalentes molares de GdL (adquirida de *Alfa Aesar*) a la vez que se agitaba la disolución manualmente. La disolución preparada se vertió sobre el recipiente adecuado y se dejó gelificar a temperatura ambiente durante 24 horas (este tiempo se determinó mediante medidas reológicas que se verán más adelante en el apartado 3.16.1).

3.5. Preparación y caracterización de FeNPs@PEG recubiertas con FmocFF.

Se tomaron 100 mg de FeNPs@PEG y se suspendieron en 1.5 mL de disolución básica de FmocFF 0.5% (p/v) preparada del mismo modo que para la obtención del gel HGNM (ver apartado 3.4). Esta suspensión se sonicó durante 10 minutos y acto seguido se introdujo en tubos Eppendorf para después centrifugarlos durante 5 minutos a 10000 rpm en una centrífuga para tubos Eppendorf *1-14* (Sigma). Tras la centrifugación, las nanopartículas quedaron sedimentadas en el fondo del tubo y se desechó el sobrenadante, obteniéndose así las FeNPs@PEG recubiertas de FmocFF (**FeNPs@PEG@FmocFF**).

3.5.1. Determinación espectrofotométrica de FmocFF adsorbido sobre FeNPs@PEG.

Se prepararon disoluciones básicas de FmocFF a varias concentraciones y se midieron sus absorbancias a 266 nm (máximo de absorción, ver Figura 5A) empleando un espectrofotómetro de absorción *SPECORD 200 Plus* (Analytik Jena). De este modo se obtuvo una recta de calibrado en la que interpolar la absorbancia de disoluciones básicas de FmocFF y relacionarlas con su concentración (Figura 5B).

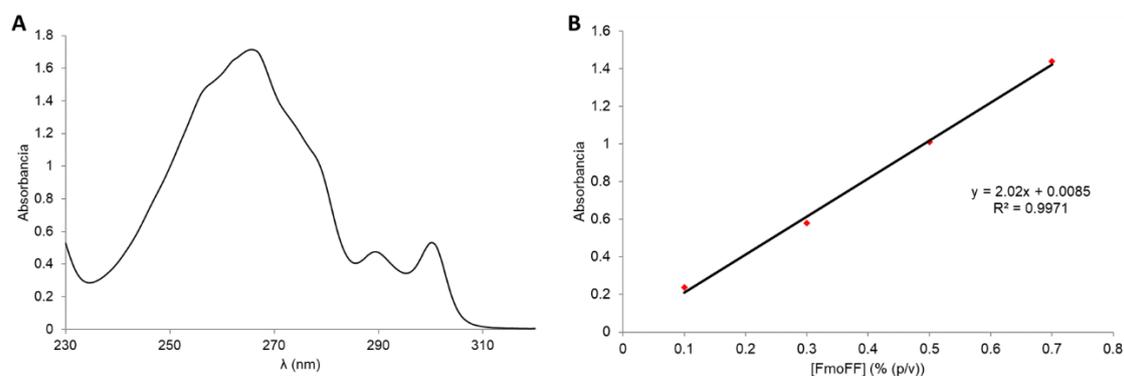


Figura 5. A) Espectro de absorción de una disolución básica de FmocFF. B) Recta de calibrado que relaciona la concentración de FmocFF en % (p/v) con la absorbancia a 266 nm.

A continuación, se midió la absorbancia del sobrenadante resultado de centrifugar las nanopartículas (por triplicado), se interpoló en la recta y se obtuvo el valor de concentración de FmocFF. A partir de la diferencia de concentración de FmocFF entre el sobrenadante y la disolución 0.5 % (p/v) añadida, se pudo determinar la cantidad de FmocFF adsorbida por gramo de nanopartículas.

3.5.2. Medidas de movilidad electroforética de FeNPs@PEG@FmocFF.

Se realizaron medidas de movilidad electroforética de las FeNPs@PEG@FmocFF. Para ello se empleó una metodología similar a la descrita en el apartado 3.3.2 para las FeNPs y FeNPs@PEG.

3.6. Preparación de hidrogeles magnéticos.

En primer lugar, se preparó una disolución básica de FmocFF 0.5% (p/v) (tal como se describe para la formación del gel HGNM en el apartado 3.4) con la que se obtuvieron las FeNPs@PEG@FmocFF (ver apartado 3.5). Con intención de simplificar el proceso, antes del recubrimiento con gelador, se pesaron las FeNPs@PEG necesarias para obtener la concentración de nanopartículas deseada en el gel final. Dichas concentraciones fueron: 0.05, 0.1, 0.3, 0.6 y 0.9% (v/v) para preparar los hidrogeles magnéticos (**HGMs**) denominados **HGM-0.05**, **HGM-0.1**, **HGM-0.3**, **HGM-0.6** y **HGM-0.9** respectivamente. Una vez realizado el recubrimiento, se retiró el sobrenadante y se añadió disolución básica de FmocFF 0.5% (p/v) y agua destilada o una disolución de colorante fluorescente 2.5 nM para los estudios de FLCS (ver apartado 3.15) hasta alcanzar una concentración final de FmocFF de 0.3% (p/v). La mezcla preparada se sonicó durante 5 minutos para obtener una suspensión homogénea de nanopartículas antes de inducir la gelificación de la misma forma que para el HGNM (ver apartado 3.4).

En el caso de los geles magnéticos gelificados en presencia de campo magnético, la disolución final se introdujo en el centro de un electroimán con un campo magnético vertical de $15 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ durante 1 hora para después dejarlo gelificar a temperatura ambiente y sin campo aplicado.

3.7. Preparación de xerogeles.

Todos los xerogeles (hidrogeles a los que se les ha retirado el agua) preparados en este trabajo se han obtenido dejando secar los hidrogeles a temperatura ambiente y a presión atmosférica. El recipiente o superficie en el que se obtuvieron los xerogeles dependió del destino del xerogel en cuestión, tal como se indicará en los apartados metodológicos correspondientes.

3.8. Caracterización de las propiedades magnéticas de hidrogeles.

Los geles fueron caracterizados magnéticamente a través de la obtención de sus curvas de magnetización. Para este propósito se empleó un magnetómetro *MPMS X* (Quantum Design) con el que se aplicaron distintos valores de campo magnético y se midieron las correspondientes magnetizaciones.

3.9. Caracterización mesoscópica de hidrogeles magnéticos mediante microscopía óptica.

Para tomar imágenes mesoscópicas de HGMs formados en presencia de campo magnético, éstos se observaron con un microscopio óptico *SMZ00* (Nikon) a 5 aumentos y se captaron fotografías con un cámara CCD (Pixelink) conectada al microscopio. Las muestras se prepararon en distintos dispositivos en función del ángulo de observación: para observar la sección transversal del gel, este se formó gelificando una pequeña lámina de gel en una placa Petri; para observar la sección longitudinal, el gel se formó en el interior de una cubeta para difracción circular (ver más adelante en el apartado 3.11).

3.10. Caracterización de hidrogeles mediante ESEM.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido medioambiental (ESEM del inglés *Environmental Scanning Electron Microscope/Microscopy*) de los geles se obtuvieron usando un microscopio *Quanta 400 ESEM* (FEI) equipado con un sistema de enfriado Peltier. Las muestras se introdujeron en el microscopio tomando una porción del gel formado con una espátula y colocándola sobre una lámina adhesiva de carbono. La temperatura óptima de medida fue $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, la presión 3 Torr y una humedad relativa de entre 80 y 95%.

3.11. Estudio de hidrogeles por CD.

Los espectros de difracción circular (CD del inglés *Circular Dichroism*) de los hidrogeles se registraron en un espectrofotómetro de CD *DSM172* (Olis) equipado con una lámpara de xenón de 150 W. Los hidrogeles se prepararon en el interior de una cubeta de cuarzo de 0.1 mm de paso de luz *0.1 mm quartz Suprasil* (Hellma) siguiendo el mismo protocolo descrito en los apartados anteriores para la gelificación de los hidrogeles HGNM y HGMs. Los espectros se registraron en el intervalo de 200 a 300 nm tomando una medida cada 1 nm con 0.1 s de tiempo de integración por medida. Las medidas se tomaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el resultado se expresó como el promedio de 20 acumulaciones.

3.12. Estudio de hidrogeles y xerogeles por FTIR.

Todos los hidrogeles preparados, así como los xerogeles correspondientes, se analizaron por espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR del inglés *Fourier Transform*

Infrared Spectroscopy) empleando un espectrómetro *Two FTIR ATR* (Perkin-Elmer). Para analizar las muestras, éstas se comprimieron sobre el cristal de diamante del espectrómetro y se registraron espectros desde 450 a 4000 cm^{-1} .

3.13. Caracterización de xerogeles mediante XRD en polvo.

Los patrones de difracción de rayos X (XRD del inglés *X-Ray Diffraction*) de los xerogeles se obtuvieron con una radiación Cu Ka ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) en un difractómetro *X'Pert PRO* (Malvern PANanalytical) equipado con un detector *PIXcel* (Malvern PANanalytical) operando a 45 kV y 40 mA. El rango de 2θ registrado fue de 5° a 80° con intervalos de (2θ) 0.039° . Para la realización de las medidas se depositaron los geles sobre una superficie de vidrio y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las medidas se realizaron una vez los geles estaban completamente secos a simple vista (xerogeles).

3.14. Caracterización de xerogeles mediante XRD en sincrotrón.

Las medidas se realizaron en el sincrotrón *Swiss Light Source* del Paul Scherren Institut (Villegen, Suiza) empleando como fuente de radiación el haz X04SA-MS. Las muestras analizadas fueron xerogeles introducidos en capilares de 0.8 mm de diámetro. El haz empleado se fijó a una energía de 16 keV y $\lambda = 0.77627 \text{ \AA}$. En las mismas condiciones se midió un material de referencia de silicio en polvo (NIST 640c, $a_0 = 0.54311946(92) \text{ nm}$ a $22.5 \text{ }^\circ\text{C}$). Se utilizó como detector un contador de fotones sensible a la posición *MYTHEN II*. Independientemente se midieron las curvas de dispersión de He/aire y de los capilares vacíos, así como los coeficientes de transmisión de los capilares con muestra y vacíos, para tenerlos en cuenta en el tratamiento de datos.

3.15. Estudio de difusión mediante FLCS.

Para estudiar el comportamiento difusivo de los hidrogeles mediante FLCS en primer lugar, éstos se prepararon en porciones de 0.3 mL en el interior de jeringas cortadas de 2 mL, siguiendo los protocolos descritos en los apartados 3.4 y 3.5 sustituyendo el agua añadida tras la adición de la disolución básica de FmocFF 0.5% (p/v) por una disolución 2.5 nM del fluoróforo *4-methoxy-Pennsylvania Green (4-OMe-PG)*⁸⁴ (Figura 6), de manera que la concentración final en los hidrogeles fuese de 1 nM. Tras completarse la gelificación, los geles se extruyeron sobre placas de vidrio para su posterior observación en el microscopio.

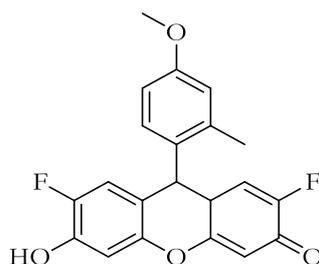


Figura 6. Estructura del fluoróforo *4-methoxy-Pennsylvania Green* (**4-OMe-PG**) empleado en los estudios de FLCS.

Las fluctuaciones de la fluorescencia del fluoróforo **4-OMe-PG** se registraron con un instrumento *MicroTime 200* (PicoQuant), basado en un microscopio confocal invertido *IX-71* (Olympus). Como fuente de excitación se empleó un láser pulsado de 470 nm *LDH-P-C470* (PicoQuant), trabajando a una frecuencia de repetición de 20 MHz. La fluorescencia emitida se recogió a través de un objetivo de inmersión en aceite 100x con 1.4 NA (apertura numérica) y enfocado sobre una apertura confocal (*pinhole*) de 75 μm , después de pasar a través de un espejo dicróico 510 dcmx y un filtro de corte *HP500LP* (AHF/Chroma). Después del *pinhole*, la luz fluorescente se dividió en dos canales por un divisor de haz 50/50, filtrado espectralmente por un filtro de paso de onda 520/35 (Semrock) para el canal 1 o un filtro de paso de onda 550/40 (Thorlabs) para el canal 2, y detectado en dos detectores fotodiodos de avalancha *SPCMAQR SPAD* (Perkin-Elmer). La adquisición de datos se llevó a cabo con un módulo de contaje temporal de fotones individuales *TimeHarp 200* (PicoQuant). La incorporación de la información de resolución temporal de fluorescencia, ha resultado en la espectroscopía de correlación de fluorescencia con tiempo de vida (FLCS), en la cual se utiliza un filtrado temporal de la señal para discernir los fotones reales del ruido.^{85,86} Se ha empleado FLCS de correlación cruzada (FLCS-CC) entre los dos canales de detección, así como FLCS de autocorrelación (FLCS-AC) de la señal de los canales individuales. En las curvas CC y AC, $g(t)$, se han ajustado a la ecuación de difusión anómala:

$$g(t) = g(0) \left[1 + \left(\frac{t}{\tau_D} \right)^\alpha \right]^{-1} \left[1 + \frac{1}{s^2} \left(\frac{t}{\tau_D} \right)^\alpha \right]^{-1/2}$$

Donde τ_D representa el tiempo de difusión, $g(0)$ es la amplitud límite de la función de correlación (cuando $t \rightarrow 0$), s es el parámetro geométrico del volumen de excitación (cociente entre los radios focales vertical y horizontal), y α es el parámetro de difusión anómala. Los efectos subdifusivos aparecen cuando $\alpha < 1$. El coeficiente de difusión aparente, D , se obtuvo como $s^2/4 \tau_D$. En difusión anómala, los coeficientes de difusión son dependientes del tiempo, y por lo tanto, sus valores deben tomarse solo como una aproximación cualitativa.⁸⁷ Sin embargo, los valores obtenidos pueden ser útiles para analizar el comportamiento general y para detectar interacciones específicas

entre el fluoróforo y las fibras de gel. Los filtros temporales de FLCS, la correlación cruzada, la autocorrelación y los ajustes se realizaron usando el programa *SymPhoTime 32* (PicoQuant). Durante los ajustes, el parámetro geométrico s se mantuvo fijo con el valor obtenido previamente.⁸⁸

Las fluctuaciones de fluorescencia del fluoróforo disuelto se recogieron enfocando a $10\ \mu\text{m}$ dentro de los hidrogeles. Se registraron al menos 15 trazas temporales de 150 segundos en distintos puntos de cada hidrogel estudiado.

3.16. Caracterización reológica de hidrogeles.

Todas las medidas reológicas se realizaron con el reómetro de esfuerzo controlado *Haake MARS III* (Thermo Fisher Scientific). La geometría elegida (salvo para las medidas de anisotropía como se verá más adelante) fue un plato de doble cono de 60 mm de diámetro y con un ángulo de 2° *sensor DC60/21 Ti L* (Thermo Fisher Scientific). Los hidrogeles se prepararon en el interior de la geometría siguiendo los procedimientos descritos en los apartados 3.4 y 3.5. Tras la gelificación se realizaron las medidas sin manipular los hidrogeles de modo que quedasen totalmente inalterados y se pudiesen realizar las medidas en condiciones de reproducibilidad. Cada muestra se analizó por triplicado para asegurar la significancia estadística de los resultados.

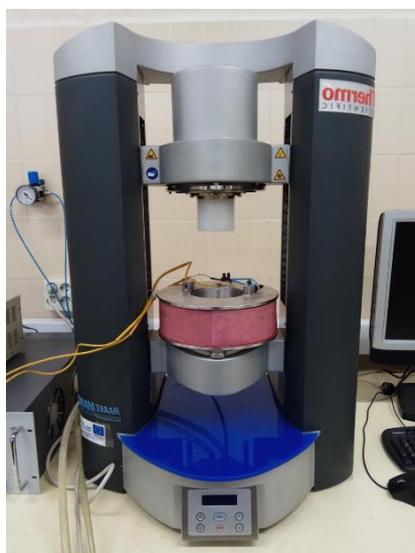


Figura 7. Fotografía del reómetro con la bobina del electroimán colocada coaxialmente al eje de la geometría para gelificación en presencia de campo magnético en el interior del reómetro.

En el caso de los hidrogeles gelificados en presencia de campo magnético, se acopló una bobina al reómetro dispuesta de forma coaxial a la geometría de modo que el hidrogel quedase justo en el centro del interior de la bobina (Figura 7).

Los distintos test reológicos aplicados a cada uno de los hidrogeles, fueron los siguientes:

3.16.1. Cinética de gelificación.

Se monitorizó la evolución de los módulos viscoelásticos G' y G'' en función del tiempo durante 24 horas. Los módulos G' y G'' se obtuvieron de la aplicación de una deformación por cizalla sinusoidal con amplitud 0.001 y frecuencia 1 Hz. De este modo se pudo determinar el tiempo de gelificación sin alterar las propiedades mecánicas de los geles resultantes.⁸⁹ Para comprobar si efectivamente las propiedades de los hidrogeles no se ven afectadas por la medida de gelificación, se midieron las propiedades mecánicas de varios geles tras 24 horas de gelificación sin la aplicación de ningún esfuerzo (sin monitorizar la cinética de gelificación). Se pudo comprobar que no había diferencias entre aplicar el esfuerzo descrito durante la gelificación, o no aplicarlo.

3.16.2. Comportamiento reológico en régimen estacionario.

Una vez se hubo completado la gelificación (24 horas) se registraron los valores de deformación de cizalla obtenidos por la aplicación de un esfuerzo de cizalla con un incremento progresivo, manteniendo cada esfuerzo aplicado durante 10 segundos. Los valores de módulo de rigidez se obtuvieron a partir de las pendientes de las curvas obtenidas de esfuerzo-deformación.

3.16.3. Comportamiento reológico en régimen oscilatorio.

Tras completarse la gelificación, los hidrogeles fueron sometidos a un esfuerzo de cizalla sinusoidal y se registró la deformación resultante. Como un estudio preliminar, en primer lugar, se realizaron barridos de amplitud manteniendo la frecuencia constante a 1 Hz para hallar la deformación de cizalla que delimita la zona viscoelástica lineal (ZVL). Para ello se incrementó logarítmicamente el valor de la amplitud de deformación hasta alcanzarse el principio de la zona viscoelástica no lineal (ZVNL), es decir, la deformación de cizalla (γ_0) en la que G' y G'' comienzan a dejar de ser constantes. Se determinó que una deformación $\gamma_0 = 0.002$ está dentro de la ZVL para todos los geles estudiados. Una vez establecido este parámetro, se realizaron dos tipos de experimentos:

A) Barridos de amplitud de deformación: para llevar a cabo estos experimentos se mantuvo constante la frecuencia en 1 Hz y se incrementó logarítmicamente la amplitud de deformación de cizalla para determinar el límite de la ZVL de cada hidrogel, punto en el que se detuvo manualmente el incremento en la amplitud de deformación. Se realizaron 5 ciclos y se tomaron los 3 últimos para calcular los valores medios de G' y G'' . Tras finalizar los ciclos de barrido de amplitud se realizó un barrido de amplitud final de cada muestra aumentando la amplitud de deformación hasta romper totalmente el gel.

B) Barridos de frecuencia: para este tipo de ensayo se mantuvo constante la amplitud de deformación de cizalla a $\gamma_0 = 0.002$ y la frecuencia se incrementó logarítmicamente desde 0 Hz hasta 10 Hz. Estos experimentos dieron como resultado los oscilogramas de variación de los módulos viscoelásticos (G' y G'') en función de la frecuencia.

3.17. Análisis reológico de la anisotropía mecánica de hidrogeles.

Debido a la imposibilidad técnica de inducir un campo magnético horizontal durante la gelificación en el interior del reómetro (ver apartado 3.16), se optó por una geometría plato-plato en lugar de la de doble cono y por preparar los hidrogeles fuera del reómetro.

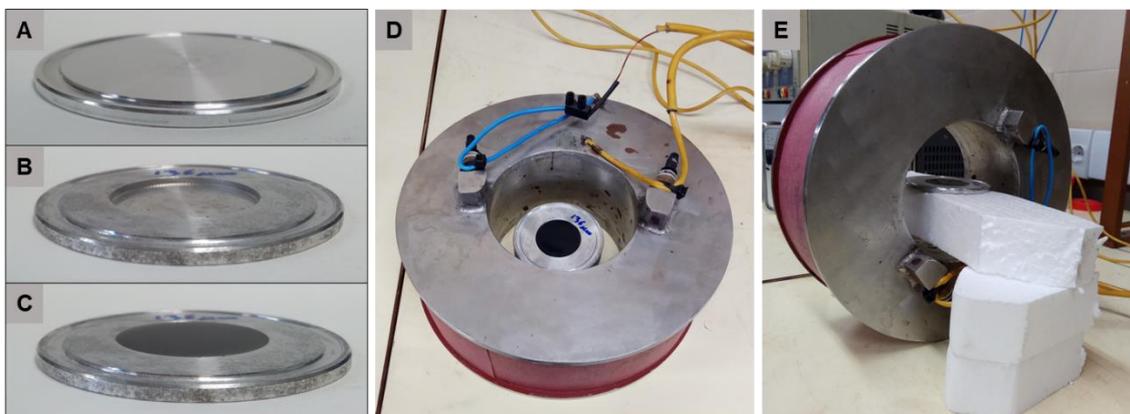


Figura 8. Fotografías de platos base de reómetro (A) sin modificar y (B) modificado con una cavidad cilíndrica de 2 mm de profundidad y 35 mm de diámetro. C) Fotografía de HGM-0.1 gelificado en el interior de un plato de reómetro modificado. Fotografías de disposición de gelificación con aplicación de campo magnético (D) vertical y (E) horizontal.

Para llevar a cabo la adaptación metodológica, en primer lugar, se hizo una modificación de los platos base del reómetro horadándolos hasta crear una cavidad cilíndrica de 2 mm de profundidad y 35 mm de diámetro (Figura 8A y 8B). Los hidrogeles se formaron en el interior de estos platos modificados vertiendo en su interior la disolución/suspensión correspondiente y dejándolos gelificar durante 24 horas en una atmósfera saturada de agua (Figura 8C). Para conseguir la orientación del campo magnético en dos direcciones (vertical y horizontal), la gelificación se realizó con la aplicación de un campo magnético de $15 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ durante la primera hora de gelificación, con una bobina dispuesta tal y como se puede ver en la Figura 8D y 8E. Una vez los hidrogeles estuvieron formados completamente tras 24 horas, cada plato con hidrogel se colocó en la parte inferior del reómetro y después se bajó la parte superior de la geometría hasta producir un contacto completo con el hidrogel sin llegar a comprimirlo. El siguiente paso fue la medida de

las propiedades mecánicas tal como se describe en el apartado 3.16 salvo la cinética de gelificación.

4. Discusión y resultados.

4.1. Recubrimiento y caracterización de nanopartículas magnéticas. Establecimiento de la metodología de preparación hidrogeles magnéticos.

Como material magnético se eligió el hierro porque es un material altamente ferromagnético y, por lo tanto, se ve muy afectado por la aplicación de un campo magnético externo. De esta forma se tendrían más opciones de poder modificar las propiedades del hidrogel híbrido con un estímulo magnético externo. Por otro lado, a diferencia por ejemplo del cobalto, el hierro es un material biocompatible, un requisito necesario en una futura aplicación biomédica o biotecnológica.

Como el destino de las partículas sería un medio acuoso (un hidrogel), se decidió protegerlas de la corrosión recubriéndolas con una capa delgada de PEG, antes de ponerlas en contacto con cualquier medio acuoso.⁸⁰ Como se comentó en el párrafo anterior, teniendo en mente una hipotética aplicación biomédica o biotecnológica, el recubrimiento con PEG serviría además para aumentar la biocompatibilidad de las nanopartículas y protegerlas del ataque de macrófagos.⁹⁻¹¹ También se pensó que este recubrimiento podría servir para favorecer una interacción supramolecular con las moléculas de gelador, algo que se demostró más adelante.

Las nanopartículas recubiertas de PEG (FeNPs@PEG) fueron observadas por TEM (Figura 9). Dichas imágenes mostraron que las FeNPs estaban recubiertas por una fina lámina de PEG. También se realizaron medidas de movilidad electroforética de las FeNPs comerciales y las FeNPs@PEG para corroborar la eficacia del recubrimiento y conocer las características superficiales de las partículas. Tales medidas consistieron en medir la movilidad electroforética de las partículas dentro de un rango amplio de pH dentro del cual se pudiese asegurar que las partículas no sufrieran reacciones superficiales (Figura 10). El intervalo elegido fue 4-11 ya que tras pruebas preliminares no se pudo asegurar la estabilidad de las partículas a pH 3 y 12. Los resultados mostraron que, el punto isoeléctrico (p.i.e) (el pH en el que la movilidad electroforética es nula) de las FeNPs@PEG (p.i.e < 4) disminuyó considerablemente respecto al de las FeNPs comerciales (p.i.e = 7). El que las FeNPs tuviesen una movilidad nula a pH = 7 está en consonancia

con la formación de una película de hematita en la superficie de las partículas lo que además explicaría su color negro intenso. La disminución observada en el p.i.e tras el recubrimiento, se entiende como efecto de la presencia de grupos hidroxilo de los grupos hemiacetal de la superficie, producto de la reacción entre el glutaraldehído y el PEG. Teniendo en cuenta los resultados de movilidad electroforética, junto con las imágenes TEM, se pudo concluir que las FeNPs estaban recubiertas efectivamente de PEG.

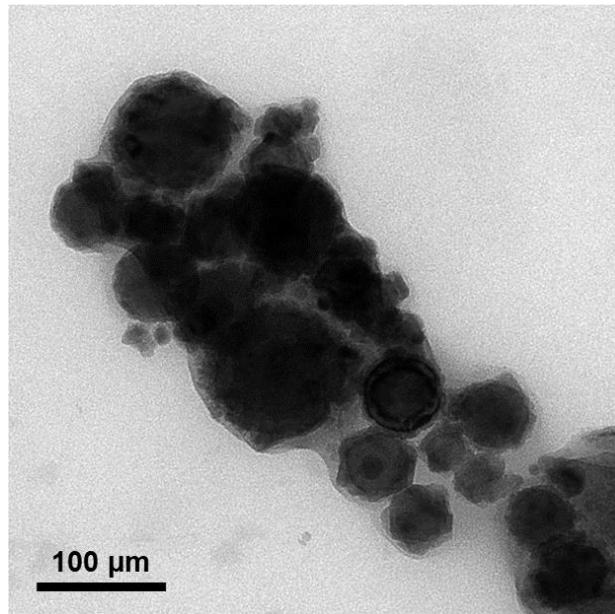


Figura 9. Imagen TEM de FeNPs@PEG donde puede apreciarse una fina capa orgánica (más clara) que recubre las FeNPs (más oscuro).

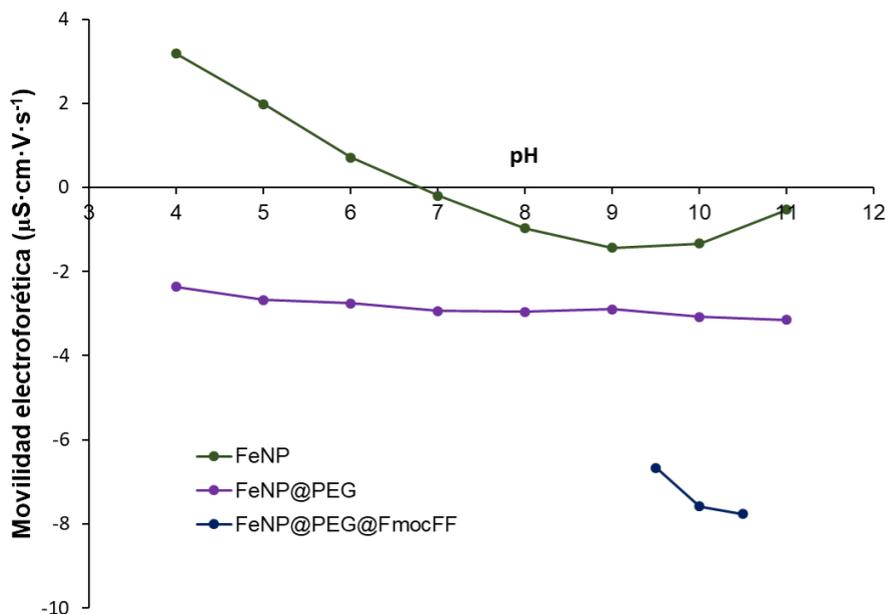


Figura 10. Representación gráfica de los valores de movilidad electroforética de FeNPs, FeNPs@PEG y FeNPs@PEG@FmocFF en función del pH.

Para un entendimiento mejor de las propiedades de estas partículas, se realizaron estudios de magnetización tanto de las FeNPs como de las FeNPs@PEG. A partir de las curvas de magnetización obtenidas (Figura 11), se demostró que ambos tipos de partículas tenían un comportamiento típico ferromagnético con valores de saturación de magnetización $1521 \pm 15 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ y $1530 \pm 12 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$, y de magnetización remanente de $62.3 \pm 2.4 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ y $75 \pm 3 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ para las FeNPs y las FeNPs@PEG respectivamente. De los datos obtenidos se pudo concluir que el recubrimiento con PEG tiene un efecto despreciable en las propiedades magnéticas de las partículas. El hecho de que los valores de saturación de magnetización y magnetización remanente fueran ligeramente más altos para las FeNPs@PEG que para las FeNPs, puede ser atribuido a la protección frente a la oxidación por parte de la lámina de PEG.

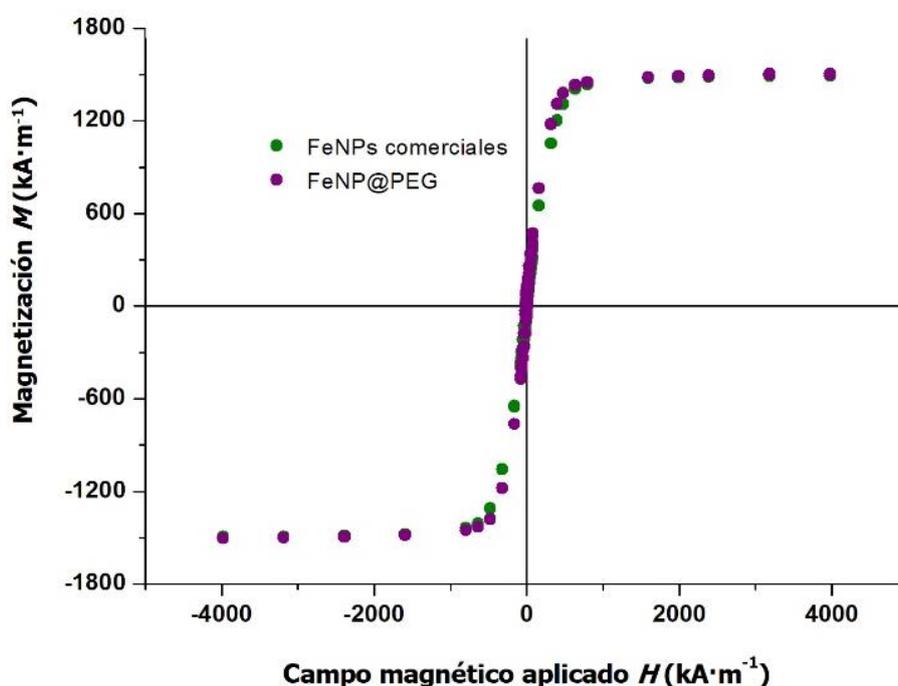


Figura 11. Curvas de magnetización de FeNPs y FeNPs@PEG.

4.1.1. Primeras pruebas de gelificación: estudio de la adsorción de FmocFF sobre FeNPs@PEG.

Como primera aproximación al intento de genera un gel híbrido con FeNPs, se intentaron formar suspensiones de distintas concentraciones de FeNPs@PEG en una disolución de FmocFF 0.3% (p/v) e inducir la posterior gelificación con la adición de D-(+)-glucono-1,5-lactona (GdL). Se pudo observar que mientras que a bajas concentraciones de FeNPs se formaban geles homogéneos, cuando se aumentaba la concentración de partículas hasta el 0.6% (v/v), las partículas sedimentaban en el fondo del recipiente y el gel que se formaba en superficie era muy

débil, prácticamente como agua líquida. Se dedujo que parte del gelador se adsorbía a las FeNPs@PEG a través de interacciones supramoleculares entre el PEG y el FmocFF ya que 0.3% (p/v) es una concentración de gelador próxima al límite inferior de gelificación (0.22% (p/v)),⁴⁵ por lo que una disminución en dicha concentración, aun siendo pequeña, podría hacer que el gel no llegase a formarse.

Para corroborar la hipótesis de recubrimiento de las FeNPs@PEG con FmocFF, se llevaron a cabo medidas espectroscópicas de la disminución de la concentración de FmocFF tras haber puesto en contacto la disolución de FmocFF con las nanopartículas (ver apartado 3.5.1 en Materiales y Métodos). El resultado de este análisis fue que efectivamente disminuía la concentración de FmocFF cuando este se ponía en contacto con las FeNPs@PEG. Dicha disminución se tradujo en $4.7775 \cdot 10^{-2}$ g de FmocFF adsorbidos por gramo de FeNPs@PEG, una cantidad muy pequeña pero que podría dificultar la gelificación en el caso de concentraciones altas de nanopartículas. Posteriormente se realizaron medidas de movilidad electroforética de las FeNPs@PEG pretratadas con FmocFF (FeNPs@PEG@FmocFF o por simplificar en el resto del texto, simplemente **FeNPs**), en el rango de pH que permitía la disolución de FmocFF (pH 9.5, 10.0 y 10.5). Como puede observarse en la Figura 10, la movilidad electroforética de las partículas con FmocFF era considerablemente menor que el de las nanopartículas con PEG, lo que se puede entender como un recubrimiento de cargas formales negativas sobre las partículas correspondientes al carboxilato de FmocFF.

Tras este hallazgo, se prepararon geles con nanopartículas a varias concentraciones (0.05, 0.1, 0.3, 0.6 y 0.9% (v/v)) pretratadas con FmocFF. Se pudo comprobar que no había sedimentación de partículas y que se formaban geles homogéneos y consistentes con todas las concentraciones de nanopartículas ensayadas. De este modo se estableció la metodología con la que se prepararían todos los hidrogeles magnéticos (**HGM-0.05**, **HGM-0.1**, **HGM-0.3**, **HGM-0.6** y **HGM-0.9**) en el resto del presente trabajo (Figura 12).

Tras el éxito en la obtención de los hidrogeles magnéticos se estudiaron sus propiedades magnéticas (Figura 13). Las curvas de magnetización presentaban una forma similar a las de las FeNPs@PEG (Figura 11), aunque con valores de saturación de magnetización mucho más bajos. De estas curvas se obtuvieron los valores de volumen de concentración de partículas magnéticas (ϕ) dentro de los HGMs mediante la “ley de mezclas del magnetismo”: $M_{sh} = \phi \cdot M_s$, donde M_{sh} y M_s son las saturaciones de magnetización de los hidrogeles y de las partículas respectivamente. Como puede verse en la Tabla 2, existía una buena correlación entre los valores de concentración del protocolo de preparación y el obtenido de las medidas de magnetización.

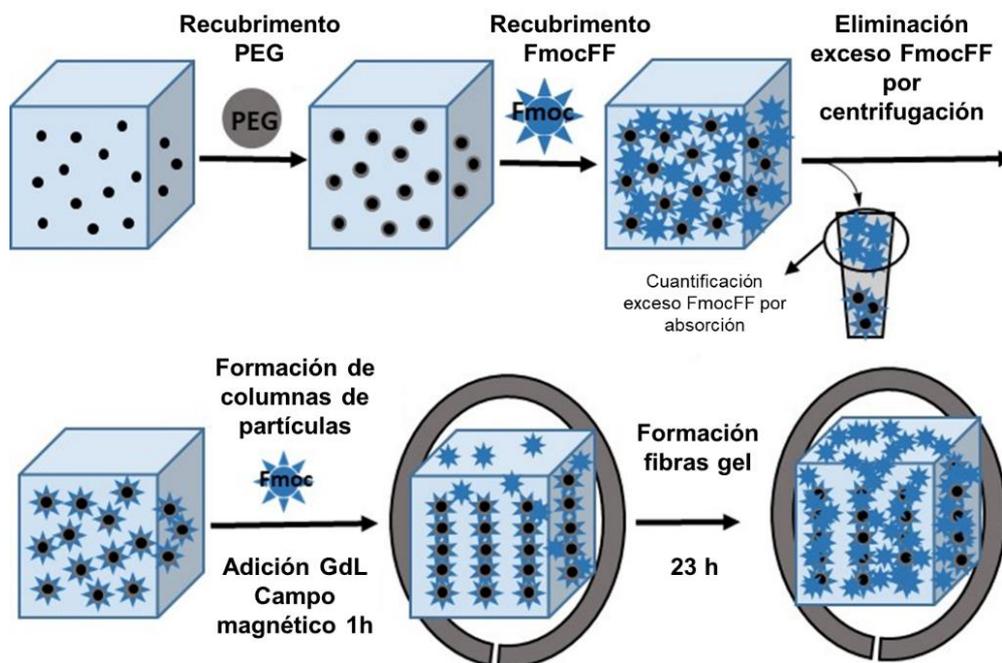


Figura 12. Representación esquemática del protocolo de preparación de hidrogeles magnéticos.

Tabla 2. Concentración de partículas en HGMs según el protocolo de preparación y ley de mezclas del magnetismo.

HIDROGEL	[FeNPs] (% (v/v)) protocolo preparación	M_{sh} ($\text{kA} \cdot \text{m}^{-1}$)	[FeNPs] (% (v/v)) ley de mezclas del magnetismo
HGM-0.1	0.1	1.73 ± 0.09	0.111 ± 0.005
HGM-0.3	0.3	4.71 ± 0.24	0.307 ± 0.015
HGM-0.6	0.6	9.3 ± 0.5	0.61 ± 0.03
HGM-0.9	0.9	13.9 ± 0.7	0.91 ± 0.05

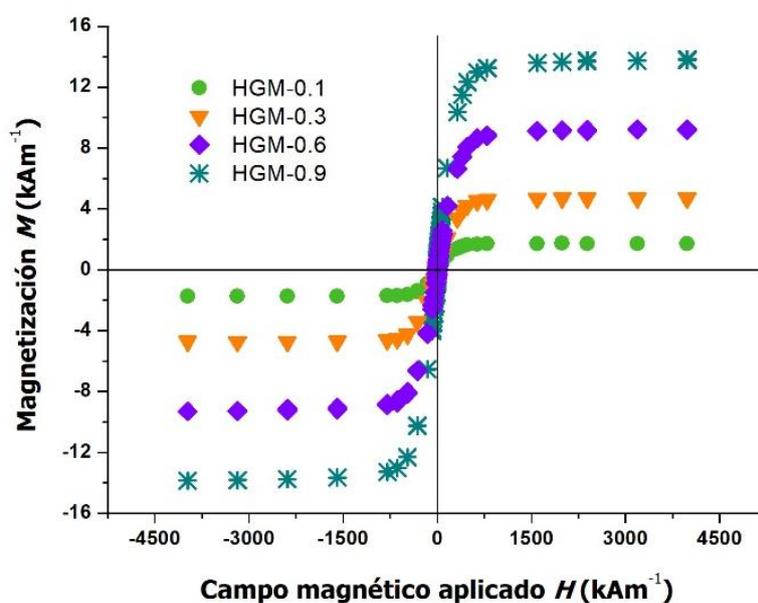


Figura 13. Curvas de magnetización de hidrogeles HGM-0.1, HGM-0.3, HGM-0.6 y HGM-0.9.

4.2. Caracterización morfológica y magnética de hidrogeles.

Una vez se consiguieron obtener hidrogeles de FmocFF con nanopartículas en suspensión distribuidas homogéneamente en el volumen del hidrogel, se procedió a estudiar cómo afectaba la presencia de las nanopartículas a la morfología de los hidrogeles, principalmente, cuando estos se gelificaban en presencia de un campo magnético.

Es conocido que cuando se aplica un campo magnético a una suspensión de nanopartículas magnéticas en un medio líquido, éstas se alinean paralelamente en la dirección del campo aplicado formando estructuras parecidas a columnas de partículas.⁹⁰ Esta agregación de partículas es reversible ya que una vez se retira el campo magnético aplicado, el movimiento browniano destruye las estructuras recuperándose la distribución isotrópica de las partículas en el líquido. En el caso de los HGMs formados con aplicación de un campo magnético de $15 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ durante 1 hora desde el inicio de la gelificación, era de esperar que se formasen columnas de partículas durante la aplicación del campo, pero lo interesante fue, que después de retirar el campo magnético permanecían las estructuras en forma de columna distribuidas homogéneamente por todo el volumen del hidrogel como puede observarse en las imágenes de microscopía óptica en la Figura 14. Este hecho no puede justificarse por la remanencia magnética de las partículas porque era demasiado baja como para mantener a las nanopartículas juntas y, por lo tanto, debía estar relacionado con una posible interacción entre los péptidos y las FeNPs.

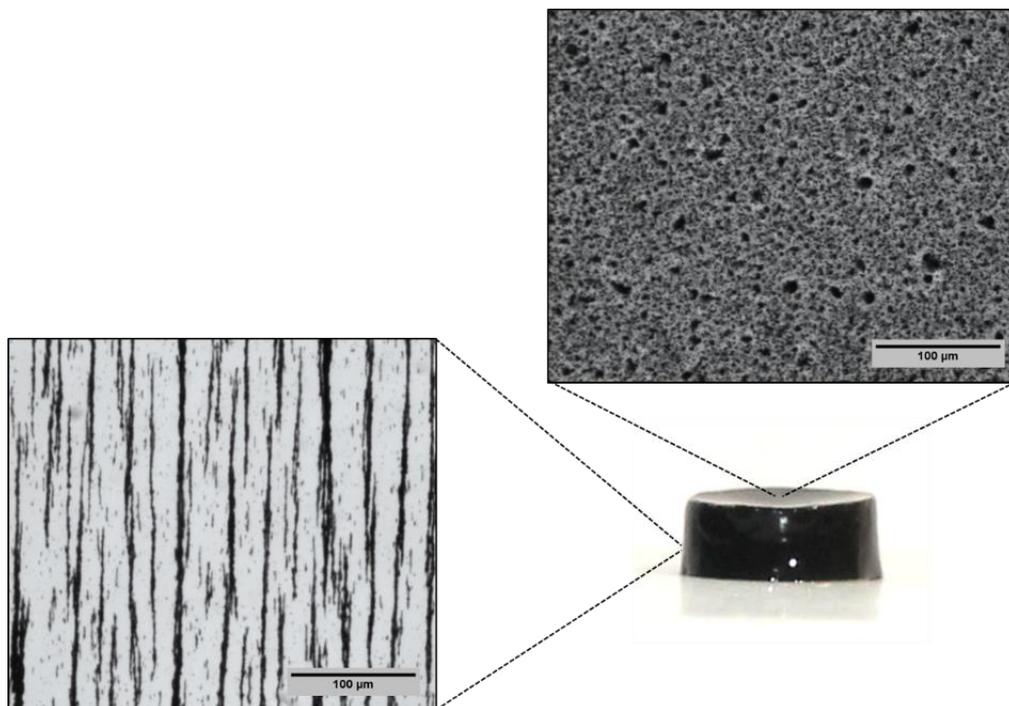


Figura 14. Vista del HGM-0.1 por microscopio óptico en (arriba derecha) la dirección del campo magnético aplicado y (abajo izquierda) perpendicular del campo.

Para profundizar más en el estudio de la morfología de los HGMs, éstos, y el gel no magnético control (HGNM), se observaron por microscopía electrónica de barrido medioambiental (ESEM) (Figura 15). Esta técnica, a diferencia de la microscopía óptica de barrido (SEM) o la de transmisión (TEM), no requiere del secado previo del material y puede observarse en su estado húmedo original. Se pensó que esta debía ser la mejor aproximación a la caracterización de los geles ya que es lo que más se acerca a la realidad. La temperatura óptima de medida fue $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, la presión 3 Torr y una humedad relativa de entre 80 y 95%. Con estas condiciones se pudo observar que el HGNM estaba formado por una red espesa de láminas y fibras que formaba una estructura porosa con una amplia variedad de tamaños de poro. Esta observación difería mucho de las imágenes publicadas de xerogeles.⁵⁰ Al observar los HGMs se pudo comprobar que la presencia de las FeNPs no alteró la microestructura supramolecular de los hidrogeles y que esta es capaz de mantener a las nanopartículas, incluso con 0.6% (v/v) de FeNPs, algo que resulta sorprendente teniendo en cuenta la pequeña concentración de gelador que forma la estructura. Lo que se observó fue una red macroporosa de fibras de FmocFF decorada con FeNPs.

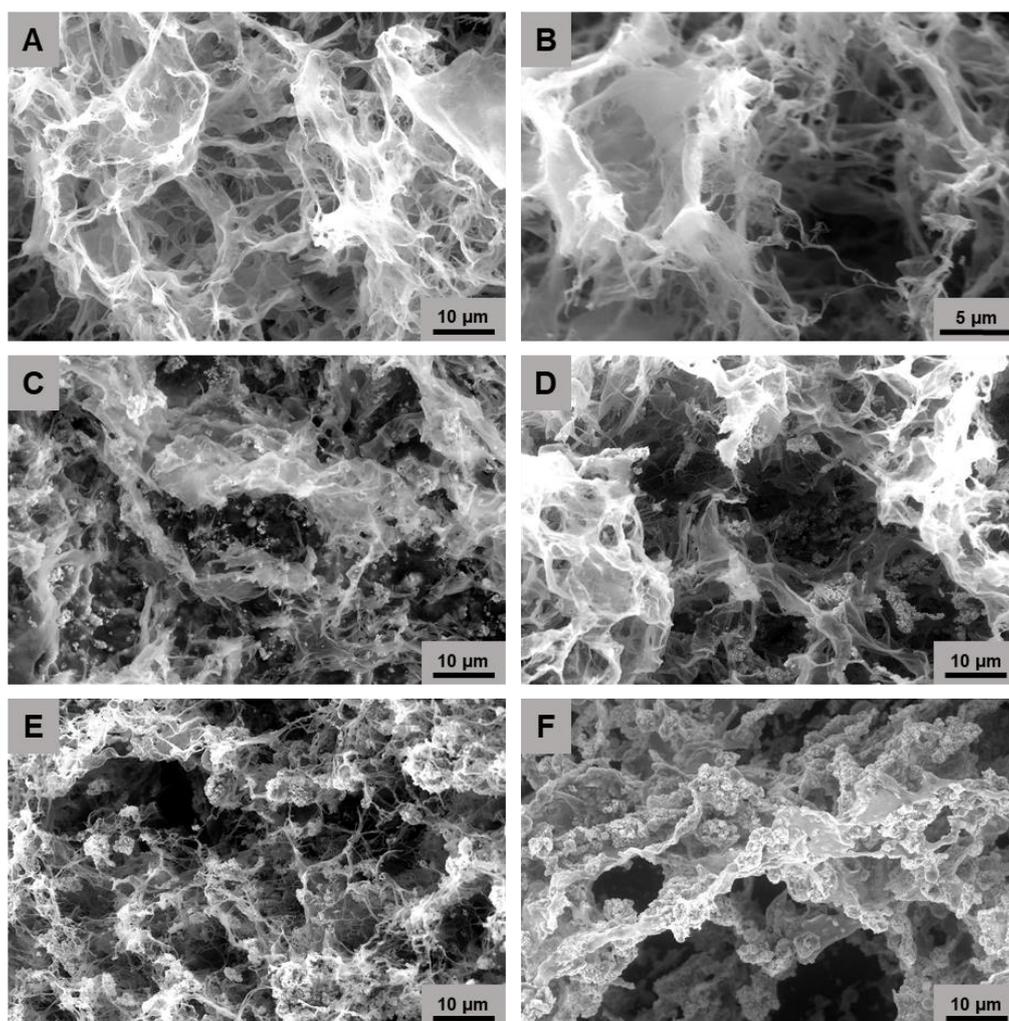


Figura 15. Imágenes ESEM de hidrogeles: A) HGNM; B) HGNM detalle de fibras; C) HGM-0.05; D) HGM-0.1; E) HGM-0.3; F) HGM-0.6.

Viendo las imágenes ESEM, una posible explicación de que los agregados de partículas en forma de columna se mantuvieran después de retirar el campo, podría deberse a que las fibras peptídicas se formaban en presencia de estas columnas y al ir creciendo englobaban y fijaban en su estructura las FeNPs dejándolas inmóviles en el estado gel.

4.3. Estudio de la estructura secundaria de hidrogeles.

Se realizaron análisis de espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), de dicroísmo circular (CD) y de difracción de rayos X (XRD) de los hidrogeles (o de los xerogeles según el caso) con intención de conocer el posible efecto que pudiera tener la presencia de FeNPs sobre la estructura secundaria de las hebras peptídicas en los HGMs.

4.3.1. Caracterización por CD.

Los espectros CD de los hidrogeles supramoleculares son muy sensibles a la concentración y al procedimiento de gelificación.^{50,91} El hidrogel control (HGNM) preparado en este trabajo (un hidrogel de FmocFF preparado por cambio de pH con GdL) presentaba un máximo de absorción a 221 nm y otro a 279 nm, lo que se correspondería con transiciones $n-\pi^*$ y $\pi-\pi^*$ del grupo fluorenilo respectivamente (Figura 16) de acuerdo con la bibliografía.

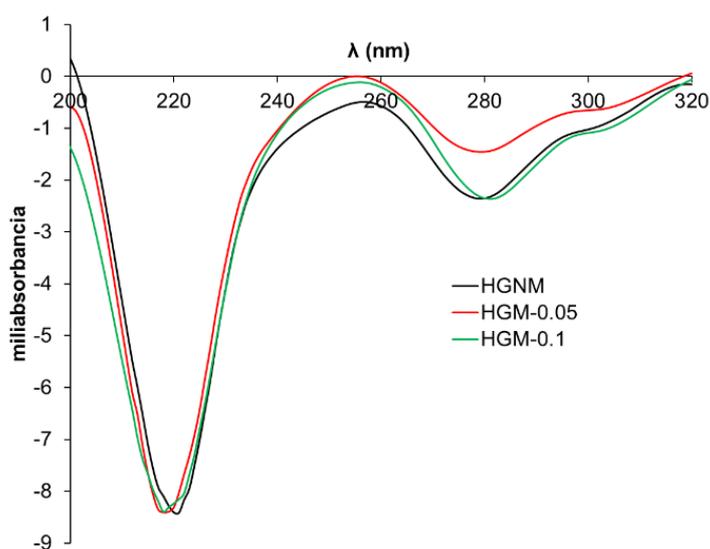


Figura 16. Espectro de CD de HGNM, HGM-0.05 y HGM-0.1.

Ulijn y colaboradores sugirieron que el FmocFF puede asociarse en estructuras de lámina beta cuando el gel se forma por cambio de pH empleando ácido clorhídrico (HCl).⁵⁰ El ligero desplazamiento del máximo a 221 nm hacia longitudes de onda más altas respecto al trabajo de

Ulijn y colaboradores (218 nm), podría deberse a la diferencia de concentración de FmocFF entre ambos experimentos (1.07% (v/v) en el trabajo de Ulijn y colaboradores y 0.3% (v/v) en el HGNM). Este fenómeno ya ha sido descrito y sugiere que a concentraciones más altas de péptido, este tiene más preferencia por conformaciones beta.⁹²

Cuando se analizaron los espectros CD de los geles HGM-0.05 y HGM-0.1 se pudo observar que presentaban espectros CD con la misma morfología que el de HGNM. De este resultado se puede concluir que la presencia de FeNPs no afectaba a la asociación supramolecular de FmocFF, al menos en las concentraciones estudiadas. Desafortunadamente no pudieron obtenerse los espectros CD correspondientes a HGMs con concentraciones más altas de FeNPs debido a la turbidez del medio.

4.3.2. Caracterización por FTIR.

El espectro FTIR del xerogel correspondiente al HGNM (Figura 17) mostró dos bandas principales a 1651 y 1534 cm^{-1} . Estas bandas se pueden asignar como “banda amida I” (correspondiente a la tensión del C=O del grupo amida) y “banda amida II” (correspondiente a la flexión N-H del grupo amida) respectivamente.⁹² El espectro del hidrogel HGNM mostró una banda de amida I desplazada al rojo ligeramente respecto a la del xerogel (1645 cm^{-1}), así como una banda amida II desplazada ligeramente al azul respecto a la del xerogel (1536 cm^{-1}). Estos desplazamientos indican la formación de enlaces de hidrógeno amida.^{92,93} La presencia de dos bandas de amida en el hidrogel se relaciona con una preferencia por un ordenamiento en lámina beta.^{50,92} La aparición de una banda a 1692 cm^{-1} sugiere que este ordenamiento es además antiparalelo.⁹³

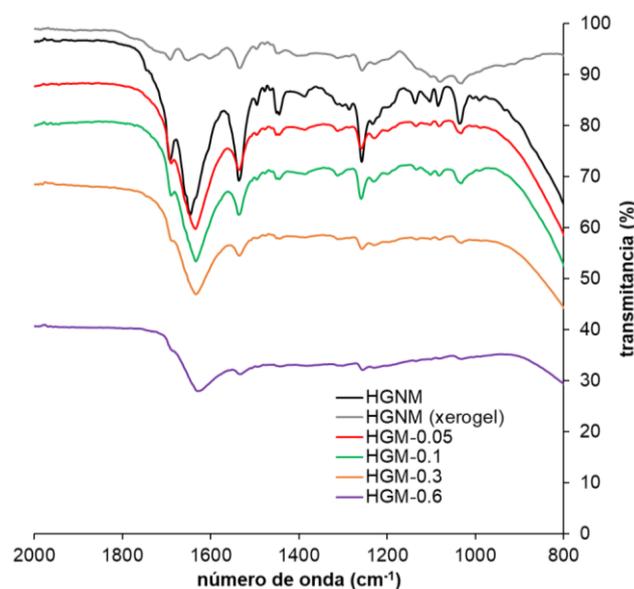


Figura 17. Espectros FTIR de HGNM, xerogel de HGNM y HGMs.

Como puede observarse en la Figura 17, los espectros FTIR de todos los HGMs tenían las dos mismas bandas amida a números de onda similares al HGNM. Se puede observar que la banda amida I de los HGMs estaba desplazada ligeramente al rojo respecto a la del HGNM (1634 cm^{-1}), lo que puede deberse a la formación de enlaces de hidrógeno entre el péptido y el PEG que recubre las FeNPs. Estos resultados están en perfecta consonancia con los resultados observados en CD, lo que corrobora la conclusión de que la presencia de las FeNPs no afecta notablemente al ordenamiento supramolecular de FmocFF.

4.3.3. Caracterización por XRD.

Como una primera aproximación al estudio por difracción de rayos X (XRD) de los hidrogeles empleados en este trabajo, se registraron los patrones XRD de los xerogeles correspondientes al HGNM y al HGM-0.3 (Figura 18A). Al analizar el HGNM se obtuvo un patrón de picos de difracción periódico con valores de espaciado nd donde d es el espaciado y $2 < n < 6$. Estas reflexiones periódicas son consistentes con la presencia de cintas planas formadas por el apilamiento paralelo de fibras a través de su eje longitudinal.⁵⁰ Representando los valores de n frente a la posición de los picos (como vector de difracción, $q = (2\pi/\lambda) \cdot \sin\theta$) se pudo obtener el ancho de una única fibra a partir de la pendiente del mejor ajuste lineal, siendo este 26.1 \AA . Del análisis de los resultados también se obtuvo que la separación entre dos péptidos dentro de la estructura fue de 4.8 \AA . Todos los resultados obtenidos están en perfecta consonancia con los publicados previamente para hidrogeles de FmocFF.^{50,94} Desafortunadamente no se pudieron registrar los patrones de XRD para el xerogel de HGM-0.3 mediante esta metodología debido a que la señal queda enmascarada por la dispersión de la señal provocada por las FeNPs.

Con la intención de evitar los inconvenientes de la dispersión de la radiación provocada por las partículas y poder observar el efecto de la presencia de las mismas en los patrones de XRD, se llevaron a cabo experimentos de difracción en sincrotrón directamente en fase gel para los mismos geles analizados con la metodología anterior. Los patrones obtenidos, mostrados en la Figura 18B, evidencian las mismas reflexiones periódicas obtenidas con la metodología anterior, tanto para el HGNM como para el HGM-0.3 formado en presencia y en ausencia de campo magnético. Estos resultados refuerzan las conclusiones obtenidas en los análisis por CD y FTIR anteriores, de que la presencia de las FeNPs no afecta a el ordenamiento supramolecular del péptido.

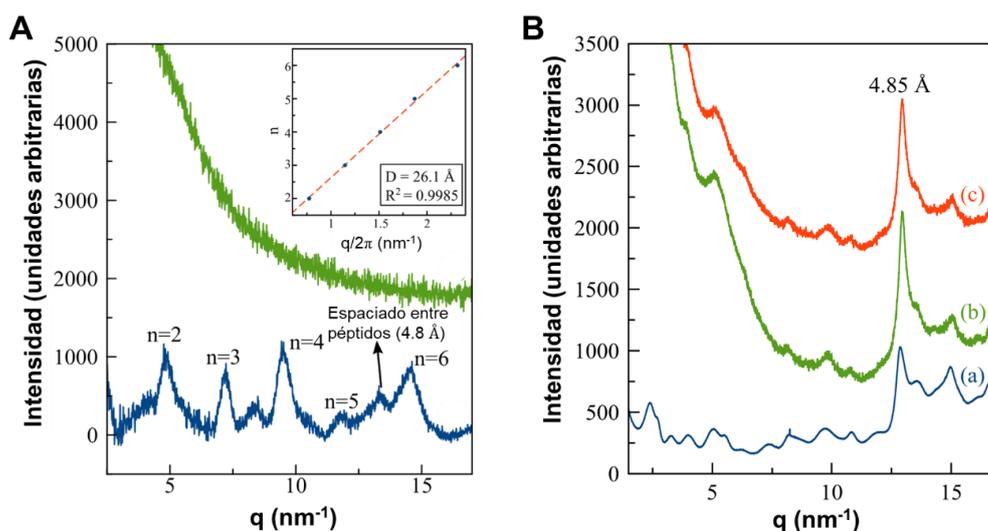


Figura 18. A) Espectro de XRD en polvo de los xerogeles de HGNM (azul) y HGM-0.3 (verde). En el recuadro interno se muestra la representación gráfica de los valores de n de los picos de difracción como un a función de su posición (vector de difracción, $q = Q/2 \pi$) y su correspondiente ajuste lineal (línea discontinua roja), de cuya pendiente se obtiene el ancho de fibra, $D = 26.1 \text{ \AA}$. B) Patrones de difracción de rayos X en sincrotrón de NMHG (azul) y MHG-0.3 formado en presencia (verde) y en ausencia (naranja) de campo magnético.

4.4. Estudio de la difusión de moléculas a través de hidrogeles.

Una de las cuestiones importantes que se plantean cuando se diseñan hidrogeles con aplicaciones biomédicas potenciales, es la capacidad de difusión de moléculas a través de ellos como pueden ser nutrientes, sustancias de desecho, u otras moléculas necesarias para que las células puedan vivir y proliferar. Esta cuestión resulta de especial interés en hidrogeles “reforzados” ya que, tradicionalmente, la estrategia seguida para mejorar las propiedades mecánicas de estos materiales ha transcurrido a través de aumentar el grado de entrecruzamiento de sus fibras con la subsecuente reducción de tamaño de poro y, por lo tanto, de la difusión. En este sentido, se planteó un estudio de la distribución del tamaño de poro de los geles empleados en este trabajo mediante el análisis de la capacidad de difusión de un fluoróforo a través del entramado tridimensional de los geles. De esta forma se pretendió identificar cuál es el efecto de la adición de FeNPs en las características difusivas de los hidrogeles.

Para llevar a cabo el estudio planteado se decidió analizar los patrones de difusión de **4-OMe-PG** (Figura 4) disuelto en los hidrogeles mediante FLCS. Se eligió este fluoróforo por ser una molécula relativamente pequeña y por tener poca variación en sus propiedades fluorescentes a pHs próximos al neutro.⁹⁵⁻⁹⁷ A través de las curvas de correlación FLCS-AC y FLCS-CC (Figura 19) se obtuvieron los valores de α que describen la difusividad del fluoróforo en los distintos

geles. Los valores de α se ajustaron a una Gaussiana con objeto de obtener un valor promedio y el error asociado (como la anchura de la función a mitad de altura) los cuales están indicados en la Tabla 3. Al comparar el valor promedio de α obtenido para el hidrogel HGNM (0.62 ± 0.22) con $\alpha = 1$ correspondiente a la difusión pura (la del fluoróforo en disolución acuosa), se pudo comprobar que la difusividad de **4-OMe-PG** a través del HGNM era claramente anómala, lo que sugiere que el hidrogel de FmocFF es una red intrincada de fibras que impide el movimiento libre del fluoróforo. Sorprendentemente, los valores promedio de α para los HGMs estaban mucho más cerca de 1 que el obtenido para el HGNM. De hecho, los valores de α para los geles HGM-0.05, HGM-0.1 y HGM-0.3 (recogidos en la Tabla 3) no son estadísticamente distintos de $\alpha = 1$ ($p > 0.03$). Este resultado implica que el fluoróforo **4-OMe-PG** tiene una difusión similar a través de estos HGMs que en disolución acuosa. Con objeto de corroborar este resultado se obtuvieron los coeficientes de difusión aparente para estos mismos geles (también en la Tabla 3), y pudo comprobarse que se correspondían con el obtenido en disolución acuosa ($410 \pm 70 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), lo que refuerza aún más la conclusión de que **4-OMe-PG** difunde libremente a través de los geles HGM-0.05, HGM-0.1 y HGM-0.3. Por otro lado, en el caso del gel HGM-0.6, el promedio de los valores de α fue estadísticamente distinto a la difusión pura con una significancia del 99 % ($p = 3 \cdot 10^{-6}$), lo que significa que el fluoróforo en este gel presentaba un comportamiento subdifusivo, aunque no muy destacable. El coeficiente de difusión aparente obtenido ($540 \pm 100 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) para este gel resultó ser ligeramente superior al correspondiente a la difusión pura. Este incremento en el coeficiente de difusión aparente respecto al de las otras medidas puede estar relacionado con la presencia de canales de difusión preferencial que restringen el movimiento aleatorio en las tres direcciones del espacio, a una dirección preferente. Este efecto ya ha sido descrito para fluoróforos pequeños en presencia de grandes concentraciones de agentes aglutinantes.^{98,99}

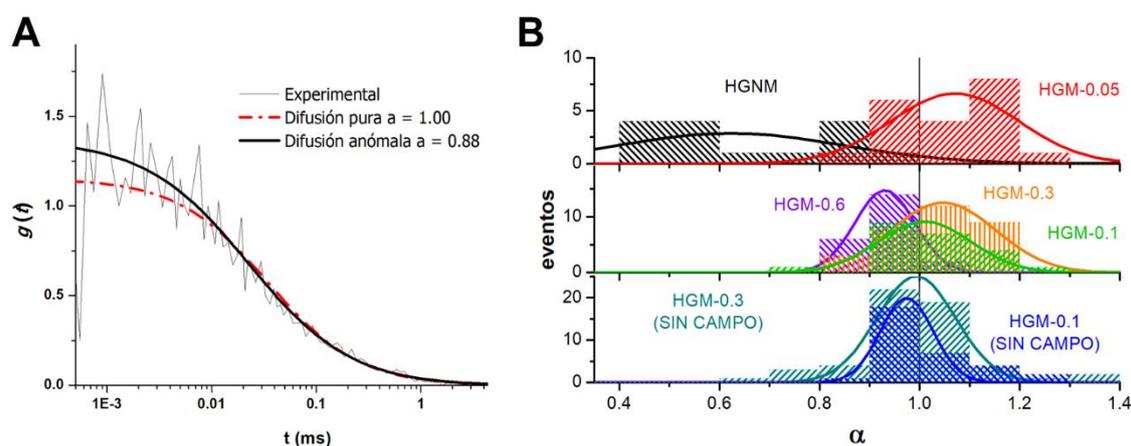


Figura 19. A) Representación de la curva FLCS-CC de 4-OMe-PG en HGM-0.6 ajustado a un modelo difusional puro y a una ecuación de difusión anómala. B) Curvas de distribución del parámetro de difusión anómala (α) en HGNM, HGMs (0.05-0.6% (v/v) FeNPs) formados en presencia de campo y HGM-0.1 y HGM-0.3 formados en ausencia de campo (No H).

Tabla 3: valores de α promedio y coeficiente de difusión aparente de los hidrogeles estudiados.

HIDROGEL	$\alpha \pm$ error asociado	Coefficiente de difusión aparente ($\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
HGNM	0.62 ± 0.22	-
HGM-0.05	1.07 ± 0.13	380 ± 130
HGM-0.1	1.01 ± 0.09	450 ± 170
HGM-0.3	1.05 ± 0.10	400 ± 110
HGM-0.6	0.93 ± 0.06	540 ± 100
HGM-0.1 (SIN CAMPO)	0.97 ± 0.11	-
HGM-0.3 (SIN CAMPO)	0.99 ± 0.08	-

Para completar el estudio del efecto de las partículas en las características difusivas de los hidrogeles, también se estudiaron los geles HGM-0.1 y HGM-0.3 formados sin campo magnético aplicado. De este modo se pretendió dilucidar si la difusión libre a través de los geles magnéticos se debía a que éstos se formaron con la aplicación de campo magnético. El promedio de los valores α obtenidos fue de 0.97 ± 0.11 para el HGM-0.1 (sin campo) y de 0.99 ± 0.08 para HGM-0.3 (sin campo). Estos valores no son significativamente distintos a $\alpha = 1$ ($p > 0.4$), confirmando que el microambiente del fluoróforo era prácticamente acuoso en los geles con FeNPs formados sin campo magnético, al igual que en los geles formados en presencia de campo. La deducción última que se obtiene de estos experimentos, es que la formación de canales preferenciales de difusión no se debió a que las FeNPs estuviesen alineadas con respecto a un campo magnético, si no que se debió a la presencia de las FeNPs en sí. Este estudio no pudo realizarse para los geles HGM-0.6 y HGM-0.9 formados sin campo, debido a que las partículas distribuidas aleatoriamente provocaban una gran dispersión de la luz que impedía las medidas de fluorescencia.

Como conclusión de este estudio, se puede afirmar que, mientras que un fluoróforo pequeño se encuentra en un ambiente intrincado de fibras que dificultan su difusión en el HGNM, se encuentra un ambiente principalmente acuoso en el interior de los HGMs (formados en presencia y en ausencia de campo magnético).

4.5. Estudios reológicos.

4.5.1. Cinéticas de gelificación.

Se realizaron medidas del tiempo de gelificación de los hidrogeles (HGNM y HGMs) consistentes en la medida de la evolución de los módulos viscoelásticos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') en función del tiempo desde el momento en el que se prepararon las mezclas completas para obtener los hidrogeles. Tomando como ejemplo el gráfico representado en la Figura 20 de la gelificación del hidrogel HGM-0.05, los valores de ambos módulos se incrementaron con el tiempo, siendo este incremento muy acelerado en los primeros instantes de la gelificación, hasta haber pasado aproximadamente 20000 segundos (unas 5 horas y media). Pasado este punto se

mantuvo el aumento de G' y G'' pero con menor velocidad hasta llegar a una meseta a los 50000 segundos (aproximadamente 14 horas) momento en el que se consideró que la gelificación había concluido. El mismo patrón se encontró para los demás geles, pero no se observó demasiada reproducibilidad, por lo que se decidió preparar los geles en el reómetro, medir la cinética de gelificación de cada uno de ellos durante 24 horas y, pasado ese tiempo, medir las propiedades mecánicas como se indica a en los siguientes apartados.

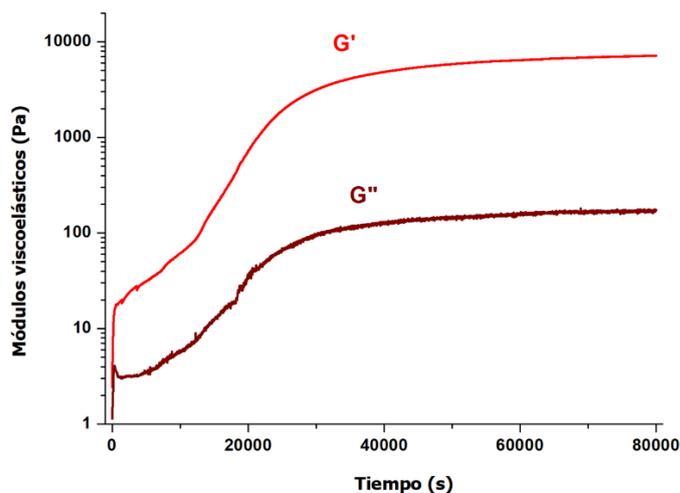


Figura 20. Representación gráfica de la evolución de G' y G'' en función del tiempo de HGM-0.05.

4.5.2. Comportamiento reológico en régimen estacionario.

Los materiales estudiados (HGNM y HGMS) mostraron una dependencia lineal entre el esfuerzo y la deformación de cizalla a bajas deformaciones (Figura 21A), lo cual, es una característica propia de los materiales viscoelásticos entrecruzados. Se representaron los valores de esfuerzo vs deformación y a partir de las pendientes se determinó el módulo de rigidez (G), parámetro que normalmente se utiliza para evaluar la resistencia de un material. Como se puede observar en la Figura 21B, el módulo de rigidez aumentó fuertemente con la concentración de FeNPs hasta un 0.1% (v/v) en el gel HGM-0.1, lo que resulta interesante, ya que una concentración tan baja de FeNPs fue capaz de incrementar el módulo de rigidez del material hasta 4 veces en comparación con HGNM. También se pudo observar que la resistencia seguía aumentando al aumentar la concentración de FeNPs hasta alcanzar un límite en 0.6% (v/v) (HGM-0.6), con un aumento menos acusado que a concentraciones más bajas. Desde 0.6% (v/v) no se producía un aumento adicional del módulo de rigidez como puede verse para el gel HGM-0.9. Una posible explicación del detenimiento en la tendencia ascendente de la resistencia del gel con la concentración por encima de 0.6% (v/v) de FeNPs, puede ser que se alcanzase el grado de saturación del hidrogel en nanopartículas de hierro. De hecho, se observó que los geles HGM-0.9 eran ligeramente

heterogéneos en algunas ocasiones y, como consecuencia, poco reproducibles. Esta falta en homogeneidad podría traducirse en una disminución en las propiedades mecánicas del hidrogel. Se pudo comprobar también, que cuando no se aplica un campo magnético durante la gelificación, no se producía un aumento en el módulo de rigidez, de lo que se dedujo que este fenómeno debía estar relacionado con el ordenamiento de las FeNPs en forma de columnas más que con la simple presencia de las FeNPs.

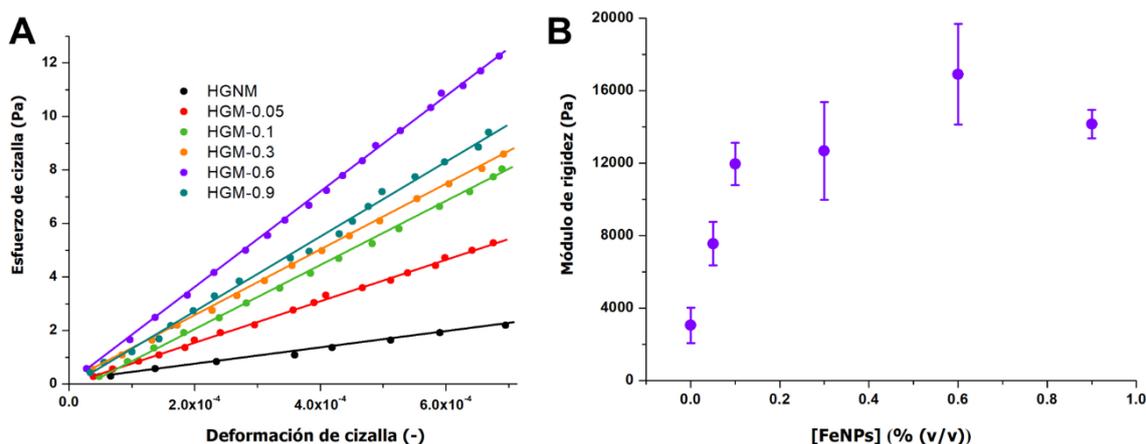


Figura 21. A) Representación gráfica del esfuerzo vs deformación del HGNM y de los HGMs. B) Variación del módulo de rigidez de los hidrogeles en función de la concentración de FeNPs.

El comportamiento global observado de un aumento de la resistencia al añadir nanopartículas magnéticas a bajas concentraciones, con una disminución de la relación entre la concentración de nanopartículas añadidas y el aumento del módulo de rigidez (incluso la disminución del mismo), ha sido previamente publicado por la Dra. Bonhome-Espinosa y colaboradores para geles poliméricos.¹⁰⁰ En dicho trabajo, los autores observaron que las nanopartículas actuaban como “nudos” de la estructura tridimensional, lo que se traducía en un aumento en el módulo de rigidez de los mismos. Sin embargo, cuando aumentaron la concentración de partículas magnéticas por encima de cierto punto, la red tridimensional del gel se vio demasiado afectada y se produjo la disminución de la resistencia mecánica de los hidrogeles.

Tal como quedó evidenciado por las pruebas relativas al estudio de la estructura secundaria de los hidrogeles, esta no se alteró por la presencia de las FeNPs. Este hecho sumado a la evidencia de la formación de “columnas” de nanopartículas a través de los HGMs formados en presencia de campo magnético, y del mantenimiento de dichas estructuras una vez se retiró el campo (como puede observarse en las imágenes de microscopio óptico de la Figura 14), lleva a pensar que las FeNPs fueron asimiladas dentro de la estructura peptídica y que la red tridimensional las mantuvo en posiciones fijas en forma de columnas. La hipótesis que se planteó fue que las columnas de

partículas actúan como un andamio microscópico que soporta la red peptídica, provocando una interacción sinérgica entre ambos materiales dando lugar a un hidrogel híbrido con una resistencia mecánica superior. Este fenómeno es ampliamente conocido en materiales compuestos en los que una matriz relativamente débil es reforzada por la inclusión de estructuras cilíndricas rígidas a través de dicha matriz.¹⁰¹ Un ejemplo paradigmático de esta forma de “reforzar” materiales es el caso del hormigón armado, en el que el hormigón actúa como matriz que es reforzada por la inclusión de estructuras cilíndricas rígidas, en este caso, barras de acero.

4.5.3. Comportamiento reológico en régimen oscilatorio.

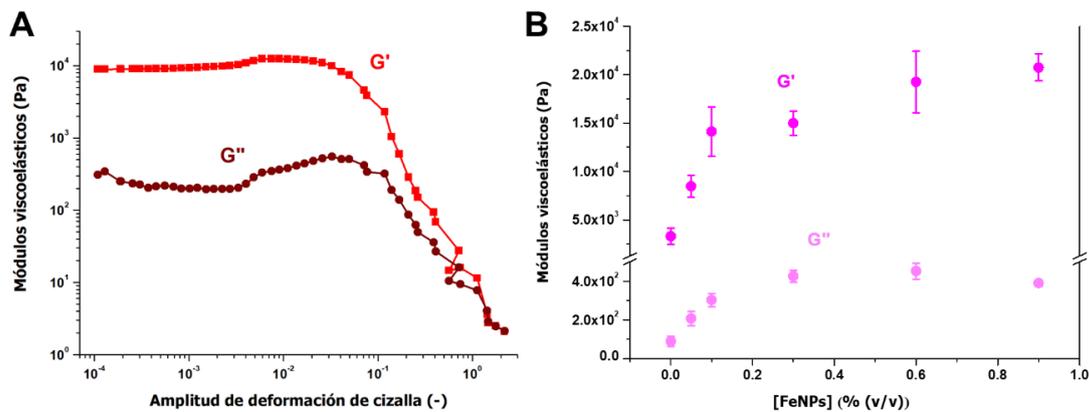


Figura 22. A) Representación de G' y G'' en función de la amplitud de deformación aplicada para el HGM-0.05. B) Representación de G' y G'' en función de la concentración de FeNPs.

Cuando se representaron los valores de G' y G'' como una función de la amplitud de deformación de cizalla a una frecuencia fija (ejemplo en Figura 22A del gel HGM-0.05), se pudo observar que ambos módulos viscoelásticos permanecieron prácticamente constantes a amplitudes de deformación bajas dentro de la zona viscoelástica lineal (ZVL). Dentro de la ZVL la respuesta elástica de los hidrogeles (el almacenamiento de energía que se corresponde con G') fue casi dos órdenes de magnitud superior que la respuesta viscosa (la pérdida de energía que se corresponde con G''), algo de esperar para materiales viscoelásticos entrecruzados como son los hidrogeles. A valores más altos de amplitud de deformación de cizalla, G'' exhibe un incremento notable hasta alcanzar un valor máximo a una amplitud de deformación aproximada de 0.03. Este máximo en pérdida de energía se correspondió con la ruptura irreversible del gel.¹⁰² Cuando se sigue incrementando la amplitud de deformación desde el punto de ruptura, G' y G'' disminuyen fuertemente hasta cruzarse, lo que supone la destrucción total del gel y pasa a ser un fluido. Todos los hidrogeles estudiados (HGNM y HGMS) mostraron el mismo patrón de variación de los módulos viscoelásticos con la amplitud de deformación de cizalla. Las diferencias entre los hidrogeles se encontraron al comparar los valores de G' y G'' que aumentaron con la

concentración de FeNPs de forma similar a como lo hizo el módulo de rigidez (G) tal como puede observarse en la Figura 22B. De los resultados obtenidos a este respecto, destaca el incremento en el valor G' de hasta 7 veces del gel HGM-0.9 respecto del gel HGNM.

4.5.3. Análisis de la anisotropía mecánica de hidrogeles magnéticos.

Al observar que la disposición de las estructuras en forma de columna que forman las FeNPs a través de los geles están en una dirección (la dirección del campo magnético) (Figura 14), se pensó en la posibilidad de que esta anisotropía estructural pudiese afectar a las propiedades mecánicas de los hidrogeles. Para dilucidar esta cuestión se hizo una adaptación de la metodología (ver apartado 3.17 en Materiales y Métodos) tanto de las mediciones reológicas como de la preparación de los geles de forma que pudiesen medirse las propiedades mecánicas de los hidrogeles magnéticos con las nanopartículas alineadas en el plano de medida, y comparar los valores obtenidos para los hidrogeles magnéticos con las nanopartículas alineadas perpendicularmente al plano de medida (como se han realizado todas las medidas hasta este punto). Como puede verse en la Tabla 4, el resultado fue que los módulos viscoelásticos de un gel HGM-0.3 preparado con las nanopartículas horizontales respecto al plano de medida (HGM-0.3H) fueron inferiores a los obtenidos para HGM-0.3 con las nanopartículas alineadas verticalmente (HGM-0.3V), e incluso, inferiores a los obtenidos para el hidrogel HGNM. Este resultado puso de manifiesto una clara anisotropía en las propiedades mecánicas de los hidrogeles magnéticos con FeNPs alineadas en forma de columna por un campo magnético externo.

Tabla 4. Datos de G' y G'' para los hidrogeles HGM-0.3 preparados con campo magnético aplicado horizontal (HGM-0.3H) o verticalmente (HGM-0.3V) respecto al plano de cizalla. Por comparación se incluyen también los valores de G' y G'' obtenidos para el hidrogel HGNM:

HIDROGEL	G' (Pa)	G'' (Pa)
HGNM	2960 ± 160	209 ± 8
HGM-0.3H	1120 ± 120	124 ± 13
HGM-0.3V	5900 ± 300	352 ± 23

5. Conclusiones.

1. Se han conseguido preparar hidrogeles supramoleculares magnéticos por la autoasociación de FmocFF en presencia de nanopartículas de hierro recubiertas con PEG, tanto en ausencia como en presencia de un campo magnético externo. Se ha demostrado que la presencia de las FeNPs no afecta a la estructura secundaria resultante de la autoasociación del péptido.
2. Un campo magnético externo aplicado durante el momento de la gelificación provoca el alineamiento de las nanopartículas en la dirección de dicho campo, dando lugar a estructuras de partículas en forma de columna. Estas estructuras permanecen estables en el interior del gel una vez se retira el campo magnético externo gracias al entrelazamiento entre las fibras peptídicas y las FeNPs.
3. Se ha podido observar que la inclusión de FeNPs en los hidrogeles da lugar en un aumento en la capacidad de difusión de moléculas pequeñas a través de ellos.
4. La presencia de estructuras de nanopartículas magnéticas en forma de columna entretejidas por las fibras peptídicas del gel, provoca una mejora en las propiedades mecánicas del hidrogel híbrido resultante respecto del hidrogel sin partículas o con partículas no alineadas.
5. Los hidrogeles magnéticos preparados en presencia de un campo magnético han demostrado ser anisótropos en lo referente a sus propiedades mecánicas.

Capítulo 2:

Cristales de lisozima crecidos en hidrogeles de FmocCF presentan una mayor estabilidad frente al daño causado por radiación de rayos X

1. Introducción.

1.1. Introducción a la cristalización de proteínas.

La primera cristalización de una proteína de la que existe evidencia data de 1840 en un artículo publicado por Hünefeld.¹⁰³ En este artículo, Hünefeld describe la cristalización de la hemoglobina de la lombriz de tierra, de cerdo y de humano. Las observaciones sobre estos cristales de hemoglobina o “cristales de sangre” (como se les llamó entonces) hizo pensar que las proteínas podían cristalizarse de manera similar a como se hace con las moléculas pequeñas. Hasta 1951 se publicaron varios trabajos sobre cristalización de hemoglobina, pero ninguno de los autores propuso un método reproducible para conseguirlo. Fue entonces cuando Funke publicó una serie de artículos enfocados en estrategias reproducibles para la cristalización de hemoglobina.^{104,105} Aun habiendo pasado más de un siglo desde el hallazgo del primer cristal de proteína, hoy en día no existe realmente una guía general para cristalizar proteínas y aunque es cierto que se han realizado avances inmensos en este sentido, la cristalización de proteínas (y de macromoléculas en general) sigue siendo una técnica empírica que requiere de paciencia, intuición y perseverancia. Es por ello por lo que la comunidad científica se refiere a la cristalización de proteínas como “un arte” más que como una ciencia.¹⁰⁶

El campo de la cristalización de proteínas es de crucial importancia para desvelar los secretos de los sistemas biológicos a nivel molecular.¹⁰⁶ La necesidad de conseguir obtener cristales de proteína radica en el hecho de que la difracción de rayos X y de neutrones de cristales individuales son las únicas técnicas con las que es posible obtener imágenes estructurales a nivel atómico de macromoléculas. Si se comparan la relación que existe entre el peso molecular y el número de interacciones no covalentes entre cada molécula y sus vecinas dentro de un cristal, bien sea de una molécula pequeña o de una proteína, encontramos que las proteínas presentan muchas menos de esas interacciones que, por otro lado, son las responsables del mantenimiento de la estructura del cristal. De este modo se pueden entender las diferencias entre un cristal de una molécula pequeña y el de una proteína.^{107,108}

Las proteínas son elementos esenciales para la vida, y la química, dentro de los seres vivos, es casi exclusivamente en fase acuosa y dentro de un rango estrecho de pH y temperatura. Los seres vivos son muy sensibles a cambios bruscos (o incluso ligeros) de estos parámetros y por tanto las proteínas también. Esta es la razón por la que los cristales de proteína deben crecerse en disoluciones acuosas en condiciones muy específicas de temperatura, pH y concentración salina. Pequeños cambios en estas condiciones, tienen una gran repercusión en el tipo de cristal que se obtiene, en su calidad e incluso en la posibilidad de llegar a formarse.

Otra característica singular de las proteínas (y macromoléculas) es que forman cristales con canales llenos del medio en el que crece el cristal (canales de disolvente). Estos canales tienen diámetros comprendidos entre 0.5 y 10 nm, suponen de entre un 30 y un 65% del volumen del cristal, y dotan a los cristales de una superficie interna que puede ser desde 800 hasta incluso 3000 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.^{16,109–111} La existencia de los canales de disolvente es la causa principal de la limitada resolución de los patrones de difracción de los cristales de proteína. Esto es debido a que, al haber un gran espacio entre proteínas adyacentes, y que las fuerzas intermoleculares que mantienen la estructura son débiles, todas las moléculas del cristal podrían no estar en posiciones exactamente equivalentes, empobreciendo así los patrones de difracción. Independientemente de los problemas asociados a la existencia de los canales, estos pueden aportar grandes ventajas frente a los cristales de moléculas pequeñas debido a las posibilidades que ofrecen. Los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos se encuentran alineados periódicamente en el interior de los canales, lo que puede permitir la acumulación de iones metálicos, complejos y/o moléculas en su interior de forma regular y periódica en un ambiente inherentemente quiral.¹¹²

1.2. Hidrogeles como medio para la cristalización de proteínas.

Una estrategia emergente en el campo de la cristalización de proteínas es el uso de hidrogeles como medio de cristalización.¹¹³ Se ha demostrado que el uso de hidrogeles macromoleculares convencionales (agarosa, poliacrilamida, sílica o *sephadex*) tienen un impacto directo en la formación de los cristales y en su calidad.¹¹⁴ De hecho, dentro de hidrogeles se han obtenido cristales de tamaños y calidades excepcionales si se comparan con los obtenidos por técnicas tradicionales de cristalización. Este fenómeno puede explicarse atendiendo a las características físicas particulares de los geles ya que son capaces de eliminar la sedimentación y las corrientes de convección, además de actuar como filtro de impurezas.¹¹⁵ Otra gran peculiaridad de los hidrogeles es la influencia a nivel molecular que pueden ejercer sobre el cristal debido a que las fibras interactúan directamente con las moléculas de proteína.¹¹⁶ Esta interacción origina cristales compuestos que albergan en su interior fibras poliméricas llegando a provocar alteraciones significativas en las propiedades de los cristales. Por ejemplo, en 2002 se reportó la obtención de cristales de lisozima en hidrogeles de agarosa, que al disolverlos dejaban una película de fibras con la forma del cristal del que provenían. Cuando se tomaba una porción de gel que contenía cristales de lisozima y estos se disolvían, la estructura del gel permanecía intacta. Estos resultados demostraron que los cristales crecían en presencia de las fibras del hidrogel de agarosa ocluyéndolas en su interior sin alterar su estructura.¹¹⁷ También se ha demostrado que la oclusión de fibras de agarosa en los cristales de proteína es capaz de evitar la formación de cristales de hielo al sumergirlos en nitrógeno líquido actuando, por lo tanto, como crioprotector.^{118,119} La agarosa también ejerce un efecto protector frente al deterioro de la estructura

de los cristales de proteína provocado por el “shock osmótico” que sufren al sumergirlos en disolventes, lo que abre la posibilidad de sumergir los cristales en disoluciones de moléculas orgánicas y estudiar las posibles interacciones proteína-ligando.¹²⁰ Otro caso interesante es el de cristales de proteína crecidos en hidrogeles de sílica y el gran efecto de la concentración del hidrogel en la morfología de los cristales. Se han llegado a obtener cristales de lisozima y taumatina con morfologías que iban desde la estructura típica de estos cristales obtenidos por otras vías, hasta cristales esféricos y elipsoidales a medida que se aumentaba la concentración de sílica. En estos cristales también se demostró la incorporación del gel en el interior de la estructura y, además, en el caso de la lisozima, los cristales presentaban propiedades mecánicas muy superiores facilitando considerablemente su manipulación. También es de destacar que la oclusión de sílica en el interior de los cristales los convertía en más higroscópicos, permitiendo su difracción en atmósfera normal sin el perjuicio de la deshidratación de los cristales, además de, al igual que ocurría con agarosa, la sílica actuaba como crio-protector.^{121,122} Empleando hidrogeles de polietilenglicol como medio para cristalizar lisozima también se ha demostrado la incorporación de las fibras en los cristales, lo que provocó un efecto sobre la morfología similar a la de los hidrogeles de sílica.¹²³

1.2.1. Cristalización de proteínas en hidrogeles supramoleculares basados en péptidos.

El grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente tesis doctoral demostró que los hidrogeles supramoleculares peptídicos son medios excelentes para la cristalización de proteínas. En el primer trabajo publicado en este sentido¹²⁴ se presentó la cristalización de lisozima, glucosa isomerasa, taumatina y una formidasa proveniente de *B. cereus* (FASE), en dos hidrogeles supramoleculares enantiómeros entre sí (D y L) derivados de dímeros de cisteína (Figura 1). Se demostró que los cristales obtenidos eran de una calidad excepcional y que los hidrogeles supramoleculares son excelentes medios para la cristalización de proteínas. En este mismo trabajo se pudo llevar a cabo por primera vez un estudio de la influencia de la quiralidad del hidrogel en el proceso de cristalización, debido al empleo de geles enantioméricos. Dependiendo de la quiralidad del gel se obtuvieron distintos polimorfos de un mismo cristal y también cristales de distinta calidad. Se obtuvo un nuevo polimorfo de glucosa isomerasa y la formación de cristales de FASE exclusivamente en el hidrogel de la serie D.

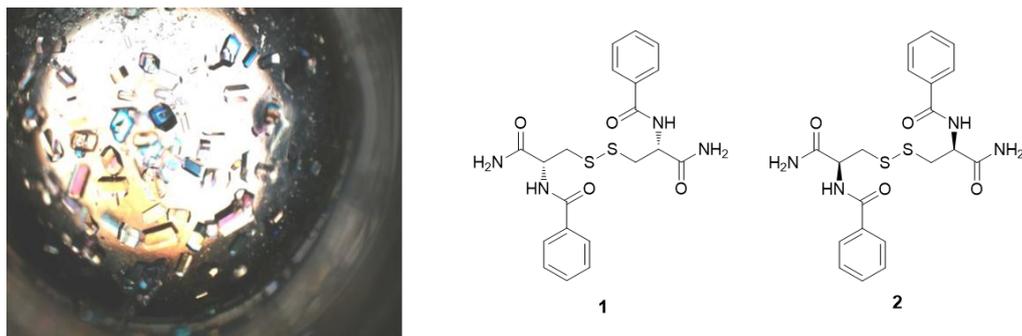


Figura 1. Izquierda: fotografía de cristales de lisozima crecidos en el hidrogel de la serie L. Derecha: estructuras de los geladores L y D (estructuras 1 y 2 respectivamente).

En un trabajo posterior se hizo un estudio de la versatilidad de los hidrogeles supramoleculares peptídicos en cristalización de proteínas extendiendo el trabajo a hidrogeles formados por Fmoc-dipéptidos (Figura 2).¹²⁵ Se demostró que la quiralidad de los hidrogeles y, sobre todo, su composición química, tienen una gran influencia en la cristalogénesis. También se pudo observar que la naturaleza química de las fibras peptídicas tenía una gran influencia en el tiempo de disolución de los cristales resultantes. Como ejemplo se observó que los cristales de lisozima crecidos en un gel de Fmoc-dialanina (FmocAA) tardaron unos 140 minutos en disolverse frente a los 5.5 minutos para los mismos cristales crecidos en agarosa.

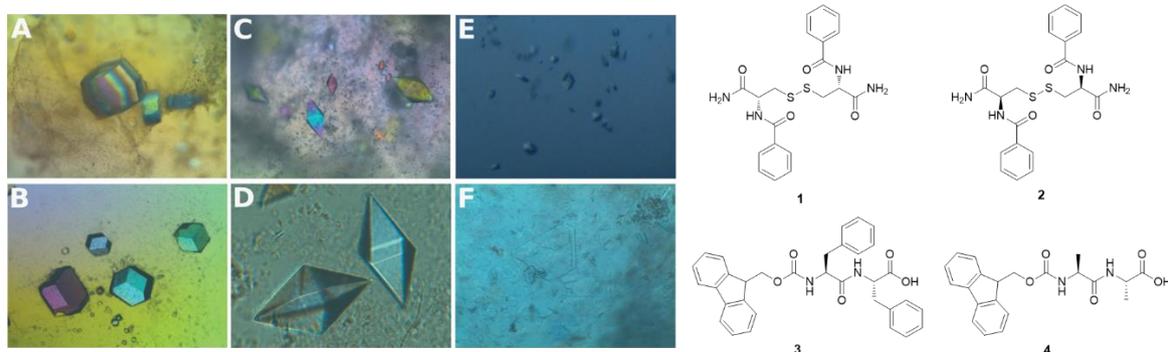


Figura 2. Cristales de lisozima (A), glucosa isomerasa (B), taumatina (C y D), insulina (E) y FASE (F) crecidos en los hidrogeles 4, 3, 2, 4, 2 y 1 respectivamente.

El efecto del aumento del tiempo de disolución se estudió posteriormente con una proteína de alto interés terapéutico como es la insulina. Se demostró que la cristalización de insulina en FmocAA daba lugar a cristales con un tiempo de disolución mayor. De este modo se consiguió obtener una insulina de liberación retardada útil para el tratamiento de la diabetes.¹²⁶

Los resultados obtenidos en estos trabajos previos, pusieron de manifiesto las ventajas de los hidrogeles supramoleculares basados en péptidos como medios para la cristalización de proteínas.

La posibilidad de diseñarlos “a la carta” permite tener una amplia variedad de opciones para obtener cristales con distintas propiedades y aplicaciones.

1.3. Radiación de sincrotrón y daño por radiación.

Debido a las características singulares de los cristales de proteínas, es más difícil obtener patrones de difracción de calidad que de cristales de moléculas pequeñas. No es común que los equipos de difracción de laboratorio tengan la potencia suficiente para resolver la estructura de un cristal de proteína. Suele ser necesario emplear radiación de sincrotrón. Brevemente, un sincrotrón es un acelerador de partículas en el que se pueden acelerar electrones a velocidades próximas a las de la luz en órbitas circulares. Cuando eso se consigue, se obliga a los electrones a circular en una órbita elíptica para que emitan radiación electromagnética de alta intensidad. Si se seleccionan los fotones de rayos X y estos se hacen incidir sobre un cristal, se pueden obtener patrones de difracción de alta calidad con los que poder resolver las estructuras de las proteínas (y de las macromoléculas en general).¹²⁷

La cristalografía de proteínas con radiación de sincrotrón, aun siendo la mejor forma de obtener patrones de difracción con los que resolver estructuras, tiene ciertas limitaciones relacionadas con el daño estructural que puede producir la irradiación con rayos X de alta intensidad.¹²⁸ La calidad y cantidad de datos de difracción pueden estar comprometidos por este daño por radiación,¹²⁹ así como las conclusiones en los modelos macromoleculares resultantes.¹³⁰ El daño por radiación es una consecuencia inherente de la interacción de la materia con una radiación ionizante. Se pueden distinguir dos tipos de daño por radiación en función del lugar donde actúe. De este modo se conoce como daño directo al que se da por ionizaciones producidas directamente en los átomos de la proteína, y como daño indirecto al daño provocado por especies reactivas ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, e_{aq}^- , entre otros) generadas por la irradiación de las moléculas de disolvente.¹³¹ Ambos tipos de daño por radiación dan lugar a una reducción del orden cristalino (daño global) y a modificaciones estructurales específicas (daño local).^{128,131,132}

Los experimentos de difracción se realizan normalmente a temperaturas bajas (100 K) con objeto de disminuir la difusión de especies reactivas (a excepción de los electrones) y así minimizar los efectos del daño indirecto. Registrar los datos a 100 K puede suponer un incremento de hasta 70 veces en la dosis de tolerancia en comparación con una irradiación a temperatura ambiente.¹³³ La contrapartida de esta metodología es la necesidad de congelar los cristales para soportar temperaturas tan bajas lo que supone la búsqueda del crioprotector adecuado. Además es posible que existan discrepancias entre la estructura de una proteína a temperatura ambiente y a 100 K.¹³⁴

En este contexto, una estrategia útil para minimizar el daño por radiación en cristales de proteína es el uso de moléculas capaces de “secuestrar” radicales libres (*scavengers*). Se ha demostrado que el grupo tiol (-SH) es el más efectivo para capturar hidroxilos y electrones solvatados.¹³⁵ Por lo tanto, si se obtienen cristales de proteína que contengan permanentemente grupos tiol en su interior, estos podrían ser más resistentes al daño por radiación. Sin embargo, el crecimiento de cristales en presencia de *scavengers* es un reto debido a que son moléculas que pueden reaccionar con la proteína alterando su estructura y dificultando su cristalización. Otro inconveniente de esta estrategia es que los *scavengers* puedan generar otros radicales libres durante la irradiación de rayos X. En este sentido, el empleo de cisteína (aminoácido con un grupo tiol libre) como aditivo en solución en experimentos de difracción de lisozima a temperatura ambiente, ha demostrado que este aminoácido no solo no protege al cristal frente al daño por radiación, sino que tiene un efecto contraproducente sensibilizando más al cristal.¹³⁶

2. Planteamiento y objetivos.

Teniendo en cuenta los precedentes expuestos, una estrategia interesante para obtener cristales de proteína más resistentes al daño por radiación podría ser el empleo de hidrogeles peptídicos con aminoácidos reductores (cisteína, metionina o tirosina) como medio para el crecimiento de cristales.

Por un lado, como se ha comentado en el apartado 1.2.1, los hidrogeles supramoleculares peptídicos son medios excelentes para cristalizar proteínas obteniéndose cristales compuestos de calidad y tamaño ideales para difracción de rayos X. Sin embargo, en este caso, el empleo de hidrogeles conteniendo cisteína podría suponer un inconveniente ya que el grupo tiol podría reaccionar con la proteína modificando su estructura e impidiendo su cristalización. Sin embargo, recientemente, Ulijn y colaboradores demostraron que en los hidrogeles de Fmoc-cisteína-fenilalanina-metiléster (Fmoc-CysPhe-OMe) los grupos tiol se mantenían activos impidiendo su autooxidación por estar “bloqueados” en el interior de las fibras de gel.¹³⁷ De igual manera podría esperarse que los aminoácidos reductores del gelador permanecerían fijos en las fibras del gel minimizando el contacto con la proteína y, por tanto, posibilitando su cristalización. De cumplirse estas expectativas, sería factible obtener cristales compuestos de proteína con fibras de un hidrogel reductor, que podrían mitigar el daño por radiación evitando los efectos adversos del empleo de *scavengers* en solución.

En relación a las propuestas anteriores se plantearon los siguientes **objetivos**:

1. Diseñar, sintetizar y caracterizar hidrogeles supramoleculares basados en péptidos que contengan aminoácidos reductores en su estructura.
2. Estudiar la posibilidad de cristalizar proteínas en los hidrogeles obtenidos en el Objetivo 1.
3. Estudiar el posible efecto protector frente al daño por radiación de los cristales de proteína obtenidos en el Objetivo 2.

3. Materiales y métodos.

3.1. Reactivos, disolventes y equipos.

Los reactivos y disolventes empleados se obtuvieron de fuentes comerciales y se utilizaron sin purificación previa. El origen de los reactivos más relevantes se especificará a lo largo del texto con el nombre de la casa comercial en cursiva.

Los equipos empleados se especificarán a lo largo del texto escribiendo el modelo en cursiva y la marca entre paréntesis.

3.2. Síntesis y caracterización de geladores.

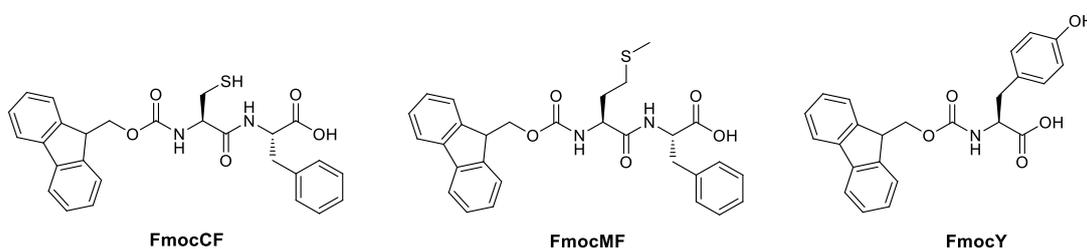
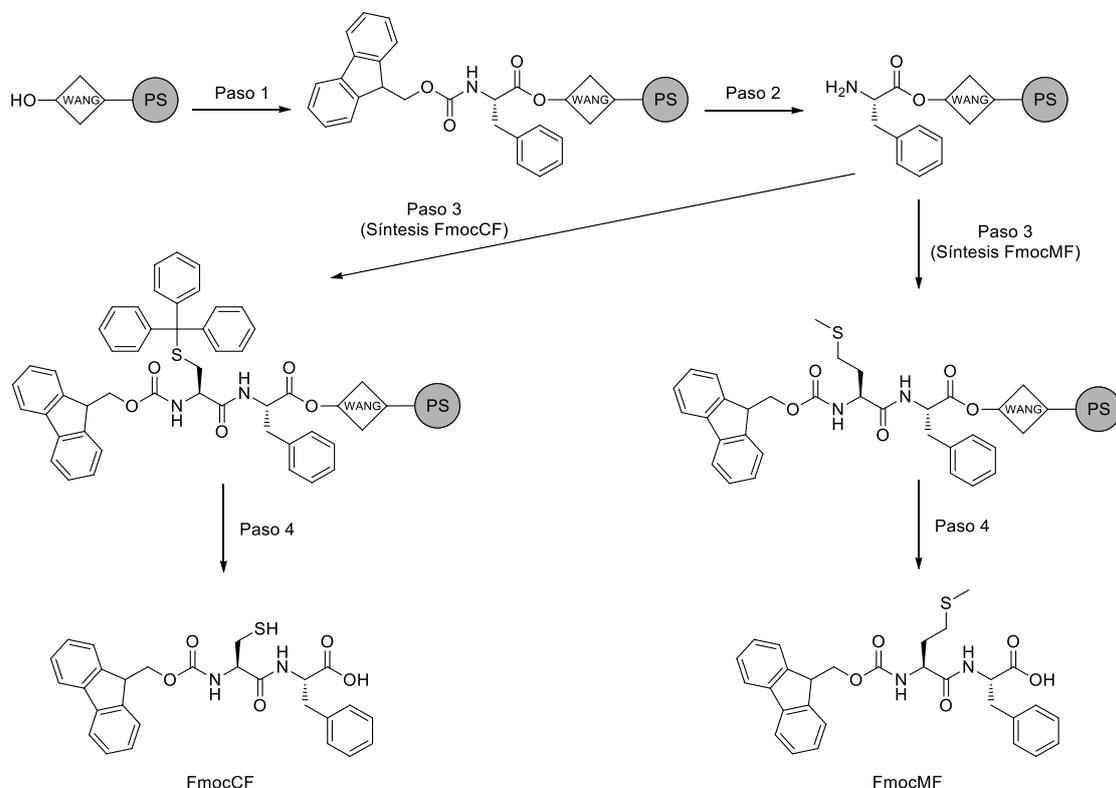


Figura 1. Estructuras de los geladores utilizados en este capítulo. De izquierda a derecha: FmocCF, FmocMF y FmocY.

3.2.1. Síntesis en fase sólida de FmocCF y FmocMF.

Mientras que el gelador FmocY (Fmoc-tirosina) fue adquirido de una casa comercial (*Sigma Aldrich*), los geladores FmocCF (Fmoc-cisteína-fenilalanina) y FmocMF (Fmoc-metionina-

fenilalanina) (estructuras en Figura 1) se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida (SPPS del inglés *Solid Phase Peptide Synthesis*). A continuación, se detalla el proceso seguido para la síntesis (Esquema 1):



Esquema 1. Procedimiento de síntesis en fase sólida de FmocCF y FmocMF.

Paso 1 – Condiciones empleadas para el acoplamiento entre la resina Wang (resina p-alcoxibencil alcohol) y Fmoc-L-fenilalanina:

En un matraz de fondo redondo se añadió la resina seca para posteriormente crear atmósfera inerte de argón dentro del matraz. Después se hinchó la resina añadiendo 10 mL de diclorometano (DCM) seco por gramo de resina. En un matraz aparte se pesaron 5 equivalentes (eq) de Fmoc-fenilalanina (FmocF) [NOTA: para hacer los cálculos de reactivos se empleó “la carga” de la resina (el número de moles de grupos funcionales por gramo de resina) o *loading* como cantidad de referencia o 1 eq] y 5 eq de hidroxibenzotriazol (HOBt), se generó atmósfera inerte dentro del matraz y se añadió la cantidad mínima de dimetilformamida (DMF) anhidra para disolver completamente los reactivos. Inmediatamente después se añadieron 5 eq de N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) y la mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Con ayuda de una jeringa se traspasó la disolución de FmocF junto con los reactivos de acoplamiento al matraz con la resina. Al matraz de reacción se le añadieron 0.01 eq de dimetilaminopiridina (DMAP) disuelta en una pequeña cantidad de DMF anhidra en atmósfera

inerte. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 17 horas para completar el acoplamiento. Para evitar futuras reacciones con los posibles grupos hidroxilo libres de la resina, estos se acetilaron añadiendo 2 eq de anhídrido acético y 2 eq de piridina a la suspensión. La mezcla se agitó durante 15 minutos antes de trasvasarla a una jeringa de síntesis en fase sólida acoplada a un sistema de vacío para drenar el disolvente. La resina fue entonces lavada añadiendo DMF (x5), DCM (x5) y éter dietílico (x2). Cada lavado se hizo añadiendo disolvente hasta completar el volumen de la jeringa, agitando manualmente y drenando con vacío.

Paso 2 – Retirada del grupo Fmoc N-terminal:

A la resina funcionalizada dentro de la jeringa de SPPS, se le añadió una disolución de piperidina al 20% (v/v) en DMF hasta completar el volumen de la jeringa. La mezcla se agitó durante 20 minutos con ayuda de un agitador rotatorio *RS-RD 5* (Phoenix Instrument) para después eliminar el disolvente a vacío. El proceso anterior se repitió dos veces. Para finalizar, la resina se lavó añadiendo DMF (x5), DCM (x5) y éter dietílico (x2).

Paso 3 – Acoplamiento del segundo aminoácido:

La resina, previamente funcionalizada con fenilalanina, se hinchó manteniéndola sumergida en DMF especial para síntesis de péptidos (DMF-péptidos). Paralelamente, en un matraz de fondo redondo se pesaron 3.5 eq del correspondiente aminoácido Fmoc-prottegido (FmocC(Trt) o FmocM, Esquema 1) y 5 eq de HOBt. A continuación, se añadieron 10 mL de DMF-péptidos por gramo de resina y la mezcla se agitó con agitación magnética hasta completar la disolución. Acto seguido, se añadieron 5 eq de DIC y la mezcla se agitó durante 15 minutos. Tras ese tiempo se retiró el exceso de disolvente de la resina y esta se añadió al matraz de reacción. Para completar el acoplamiento, la mezcla se mantuvo en agitación durante 2 horas a 60 °C. Después, la resina se lavó añadiendo DMF (x5), DCM (x5) y éter dietílico (x2). Para comprobar la efectividad del acoplamiento se realizó un test cualitativo de ninhidrina o “test de Kaiser”.¹³⁸

Paso 4 – Liberación del Fmoc-dipéptido y eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales (en su caso):

La resina completamente funcionalizada y seca se suspendió en 20 mL por gramo de resina en una mezcla ácido trifluoroacético (TFA)/agua/1,2-etanoditiol/triisopropilsilano en una relación porcentual de volumen 92.5/2.5/2.5/2.5, y se agitó en un agitador rotatorio durante 2 horas. La disolución ácida obtenida se recogió en un matraz retirando la resina por filtración a través de una jeringa de SPPS. Para asegurar la recopilación total del producto, la resina se lavó 3 veces

cubriéndola con TFA. Las distintas fracciones ácidas se reunieron y evaporaron a vacío hasta sequedad. El sólido obtenido fue suspendido en la mínima cantidad de TFA y este se añadió gota a gota sobre una mezcla fría (4 °C) de hexano:dietil éter (2:1) en un tubo de centrifuga. De esta manera se obtuvo una suspensión fina que se precipitó mediante centrifugación. Tras la centrifugación se retiró el sobrenadante y se añadió la mezcla fría hexano:dietil éter sobre el precipitado. Se disgregó el precipitado con ayuda de ultrasonidos y se volvió a centrifugar para después retirar el sobrenadante. Este último procedimiento se repitió otras 2 veces más.

3.2.2. Caracterización de productos de síntesis.

Las moléculas sintetizadas fueron caracterizadas por resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno (^1H) y carbono (^{13}C) con un espectrómetro de 300 MHz (Variant) y uno de 500 MHz (Bruker). Los desplazamientos químicos (δ), expresados en partes por millón (ppm), se obtuvieron en relación a los residuos protonados del disolvente que se usó como patrón interno. Las constantes de acoplamiento (J) se expresaron en Hz.

Los productos de síntesis también fueron caracterizados por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS del inglés *High Resolution Mass Spectrometry*) empleando un espectrómetro de masas *Xevo G2-XS QToF* (Waters).

Caracterización por RMN y HRMS de moléculas sintetizadas:

FmocCF: ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.20 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.73 (dd, $J = 7.6, 3.8$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.41 (td, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 2H), 7.35 – 7.30 (m, 2H), 7.25-7.00 (m, 5H), 6.67 (d, $J = 8.4$, 1H), 4.5-4.35 (m, 1H), 4.34 – 4.19 (m, 2H), 4.13 (s, 1H), 4.03 (s, 1H), 3.06 (dd, $J = 14.0, 5.1$ Hz, 1H), 2.98 – 2.84 (m, 1H), 2.81-2.70 (m, 1H), 2.67 – 2.56 (m, 1H). ^{13}C RMN (126 MHz, DMSO- d_6) δ 173.16, 170.04, 155.87, 143.83, 143.73, 140.68, 137.31, 129.95, 129.11, 128.21, 128.12, 127.62, 127.07, 126.40, 125.30, 120.08, 65.76, 57.04, 53.50, 46.62, 36.53, 26.29. HRMS (ESI): m/z calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 513.1460; obtenido: 513.1458.

FmocMF: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 -d) δ 7.76 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.40 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.34 – 7.28 (m, 2H), 7.23 – 7.10 (m, 5H), 4.87 – 4.67 (m, 4H), 4.45 – 4.29 (m, 2H), 4.24 – 4.15 (m, 1H), 3.25 – 3.13 (m, 1H), 3.11 – 2.95 (m, 1H), 2.51 (d, $J = 19.9$ Hz, 2H), 2.09 – 1.84 (m, 5H). ^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3 -d) δ 171.32, 156.29, 143.79, 141.46, 135.93, 129.48, 128.75, 127.95, 127.29, 127.26, 125.22, 125.17, 120.18, 67.35, 53.77, 53.57, 47.25, 37.57, 31.69, 30.03, 29.85, 15.24. HRMS (ESI): m/z calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 541.1773; obtenido: 541.1772.

3.3. Preparación de hidrogeles.

3.3.1. Preparación de hidrogeles FmocCF y FmocY.

Los hidrogeles de FmocCF y FmocY se prepararon por la metodología de cambio de disolvente (ver Capítulo 1, apartado 1.2.1). Para ello, el gelador sólido se disolvió en DMSO y se le añadió agua Milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 100 μ L. Tras la mezcla, se formó una disolución turbia que progresivamente se volvió transparente dando lugar a un hidrogel consistente en menos de 30 minutos. La relación de volúmenes DMSO:agua dependió de la concentración final del hidrogel, siendo 5:95 para 0.2% (v/v), 10:90 para 0.5 y 0.75% (v/v), y 15:85 para 1.0 y 2.0% (v/v). Una vez se hubieron formado los hidrogeles, estos se dializaron frente a 1 mL de agua Milli-Q añadido sobre la superficie de los hidrogeles. El agua se cambió una vez al día durante una semana.

La metodología descrita es específica para la preparación de hidrogeles en tubos Eppendorf para cristalización de proteínas (ver apartado 3.9) pero es extensible a otros recipientes y volúmenes.

3.3.2. Preparación de hidrogel FmocMF.

Para preparar los hidrogeles de FmocMF se empleó una estrategia de gelificación por cambio de pH similar a la descrita en el Capítulo 1 para preparar los hidrogeles de FmocFF (ver Capítulo 1, apartado 3.4). Brevemente, con ayuda de un baño de ultrasonidos, se preparó una suspensión fina del gelador sólido en agua Milli-Q a la concentración final deseada (0.2, 0.5, 0.75 o 1.0% (p/v)). A esta suspensión se le añadieron pequeñas porciones de una disolución de NaOH 0.5 M sonicando tras cada adición. La adición de NaOH se detuvo en el momento en el que se obtuvo una disolución completa del gelador con pH \sim 9. A la disolución básica obtenida se le añadieron 2 equivalentes molares de D-(+)-glucono-1,5-lactona (GdL) para provocar la gelificación. Los hidrogeles completamente formados se obtuvieron tras 24 horas a temperatura ambiente.

3.3.3. Preparación de hidrogeles de agarosa.

En primer lugar, se pesó la cantidad necesaria de agarosa en un vial. A continuación, se le añadió agua Milli-Q de modo que la concentración final fuese de 0.5% (p/v). Acto seguido, la suspensión preparada se calentó con ayuda de un horno microondas hasta que la agarosa se disolvió completamente. Una vez disuelta, la disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta estar lo suficientemente fría como para manipularla, se tomaron porciones de 50 μ L con una pipeta y se vertieron en tubos Eppendorf. Los tubos Eppendorf se dejaron enfriar a temperatura ambiente para completar la gelificación en pocos minutos.

3.4. Estudio de hidrogeles por CD.

Los espectros de CD de los hidrogeles se registraron en un espectrofotómetro de CD *DSM172* (Olis) equipado con una lámpara de xenón de 150 W. Los hidrogeles se prepararon en el interior de una cubeta de cuarzo de 0.1 mm de paso de luz *0.1 mm quartz Suprasil* (Hellma) siguiendo el mismo protocolo descrito en los apartados anteriores para la preparación de los hidrogeles. Los espectros se registraron en el intervalo de 200 a 300 nm tomando una medida cada 1 nm con 0.1 s de tiempo de integración por medida. Las medidas se tomaron a 25 °C y el resultado se expresó como el promedio de 20 acumulaciones.

3.5. Estudio de hidrogeles por FTIR.

Los hidrogeles empleados en este capítulo se caracterizaron por FTIR empleando un espectrómetro *Two FTIR ATR* (Perkin-Elmer). Para registrar los espectros correspondientes, se tomaron pequeñas porciones de los hidrogeles y se comprimieron sobre el cristal de diamante del espectrómetro y se registraron espectros desde 450 a 4000 cm^{-1} .

3.6. Caracterización de xerogeles mediante XRD en polvo.

Los patrones de XRD los xerogeles se obtuvieron con una radiación CuK α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) en un difractómetro *D2-PHASE* (Bruker) equipado con un detector *LYNXEYE* (Bruker). El rango de 2θ registrado fue de 3° a 45° con intervalos de (2θ) 0.02°. Para la realización de las medidas, los geles se depositaron sobre una superficie de vidrio y se dejaron secar a temperatura ambiente (xerogeles).

3.7. Caracterización reológica de hidrogeles.

Para realizar una caracterización mecánica de los hidrogeles se usó un reómetro de esfuerzo controlado *Haake MARS III* (Thermo Fisher Scientific).

En el caso del estudio reológico de los hidrogeles FmocCF se optó por la utilización de una geometría plato-plato. Debido a problemas metodológicos que se describirán más adelante en el apartado 4.2.3, se hizo una adaptación del plato inferior del reómetro uniéndole un cilindro metálico de diámetro ligeramente superior a 10 mm. Los hidrogeles se generaron en el interior del cilindro siguiendo la metodología descrita anteriormente en 3.3.1, para luego ser comprimidos ligeramente con un plato superior de 10 mm de diámetro.

La geometría elegida para estudiar los hidrogeles de FmocMF, fue de dos platos paralelos de 35 mm de diámetro. Con objeto de minimizar los errores experimentales y asegurar la reproducibilidad de los geles estudiados, éstos se prepararon directamente en el interior de platos inferiores de reómetro tallados con un orificio cilíndrico de 35 mm de diámetro y 2 mm de profundidad (ver Capítulo 1, apartado 3.17), en atmósfera saturada de agua y a temperatura ambiente. Las medidas se realizaron tras 24 horas de gelificación sin ninguna manipulación previa.

La caracterización de las propiedades reológicas se realizó en régimen oscilatorio aplicando dos protocolos. En el primero de ellos se sometió a los hidrogeles a un barrido de amplitud de deformación de cizalla manteniendo la frecuencia constante a 1 Hz. Se fueron registrando las medidas de esfuerzo de cizalla en función de la amplitud de deformación aplicada γ_0 . De estos datos se obtuvieron los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') en función de γ_0 . El segundo protocolo se realizó de forma independiente al primero y consistió en aplicar una γ_0 constante mientras que se aplicaba un barrido de frecuencia. Se monitorizó el esfuerzo de cizalla oscilatorio en función de la frecuencia de cuya representación se obtuvieron las curvas de G' y G'' como función de la frecuencia de oscilación.

Para cada tipo de hidrogel caracterizado, se midieron al menos tres muestras diferentes para asegurar la significancia estadística de los resultados. En las representaciones gráficas de este trabajo han representado los valores medios.

3.8. Imágenes TEM de xerogeles.

Se registraron imágenes de TEM de hidrogeles secos (xerogeles) empleando un microscopio electrónico de transmisión *LIBRA 120 PLUS* (Carl Zeiss). Las muestras de xerogeles se prepararon poniendo una gota de una suspensión acuosa de fibras de gel encima de una rejilla de cobre de microscopía electrónica donde se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

3.9. Cristalización de proteínas.

La lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL del inglés *Hen Egg-White Lysozyme*) y la taumatina de *Thaumatococcus daniellii* fueron adquiridas como polvo liofilizado de Sigma, (L6876 y T7638, respectivamente), y la glucosa isomerasa de *S. rubiginosus* se adquirió en forma de cristales en suspensión de *Hampon Research* (HR7-100). La lisozima se disolvió y dializó en una disolución de acetato sódico (AcONa) 50 mM a pH 4.5. Los cristales de glucosa isomerasa

se disolvieron en agua y se dializaron repetidamente frente a un tampón Hepes 100 mM a pH 7.0. La taumatina se disolvió en agua. En todos los casos, la concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente a 280 nm empleando un $\epsilon = 2.65 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Los experimentos de cristalización se realizaron en tubos Eppendorf, empleando la técnica de contradifusión con configuración de 2 capas (2L) utilizada en trabajos anteriores,^{124,125} de 50 μL cada una (50 μL de gel y 50 μL de precipitante). Para llevar a cabo los experimentos, la disolución de proteína preparada anteriormente se depositó sobre los geles y se dejó difundir durante una semana hasta alcanzar una concentración final de proteína en el interior de cada gel de 80, 50 y 50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de lisozima, taumatina y glucosa isomerasa, respectivamente. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se añadió una disolución de agente precipitante para inducir la cristalización. Para lisozima se empleó una disolución de NaCl al 6% (p/v) tamponada con AcONa 50 mM a pH 4.5, para taumatina se utilizó tartrato de sodio y potasio al 45% (p/v) a pH 7.9, y para glucosa isomerasa se añadió una disolución con 10% de polietilenglicol (1000 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) y 0.2 M de cloruro de magnesio, tamponada con Hepes 0.1 M a pH 7.0. Tras 24 horas de difusión del agente precipitante se empezaron a formar cristales. Mediante observación con microscopio óptico se monitorizó la evolución de los cristales hasta que se detuvo el crecimiento.

3.10. Estudios de XRD con radiación de sincrotrón.

Los estudios por difracción de rayos X empleando radiación de sincrotrón como fuente de radiación se realizaron en la línea *BL13-Xaloc* del sincrotrón *ALBA* (sincrotrón de España en Barcelona), y en la línea *ID23-1* del sincrotrón *ESRF* (Laboratorio Europeo de Radiación Sincrotrón ubicado en Grenoble, Francia).

3.10.1. Procesado de cristales y análisis de calidad.

Para recoger los cristales crecidos en hidrogeles (mirar apartado 3.9), en primer lugar, se sacó el gel de los tubos Eppendorf donde se llevó a cabo la cristalización y se transfirió a una placa Petri de plástico con disolución de agente precipitante. Los cristales se extrajeron del gel con ayuda de una pipeta con la punta cortada y se transfirieron a una gota limpia de disolución de precipitante con glicerol 20% (v/v) (crio-protector). A continuación, se pescaron los cristales de la gota empleando micro-lazos para minimizar el volumen de disolución arrastrada, para posteriormente sumergirlos en nitrógeno líquido y se almacenarlos hasta la recolección de datos en sincrotrón. Los datos adquiridos se indexaron e integraron con *XDS*¹³⁹ y se redujeron y escalaron con *Aimless*.¹⁴⁰

3.10.2. Recopilación de datos a temperatura ambiente y estudio de daño por radiación.

Todos los experimentos a temperatura ambiente y de estudio de daño por radiación se realizaron en el sincrotrón *ALBA*.

Para la recolección de datos de difracción a temperatura ambiente, se seleccionaron cristales de aproximadamente $300 \times 300 \times 300 \mu\text{m}^3$ y se introdujeron en un capilar de poliamida de 1.0 mm de diámetro interno. Para evitar la deshidratación, se dejó una gota de disolución precipitante cerca de los cristales. El capilar se selló con grasa de vacío en ambos extremos y se montó en un soporte magnético tipo *Spine* compatible con el difractómetro. Las muestras y el detector se mantuvieron a una distancia fija de 240 mm y el flujo de fotones se mantuvo constante.

Tanto los cristales crecidos en agarosa (cristales control) como los crecidos en hidrogeles FmocCF 1.0 y 2.0% (p/v) se midieron en las mismas condiciones de irradiación. Para cada cristal se registraron 9 sets de datos consecutivos comenzando con el mismo ángulo inicial en todos los casos. Cada set de datos estuvo compuesto de 90 imágenes recogidas con un incremento de ángulo de 1° por imagen. Para los cálculos se asumió que los cristales eran cúbicos con una dimensión lateral de $300 \mu\text{m}$.

4. Discusión y resultados.

4.1. Diseño y preparación de hidrogeles.

Como ya se comentó en la Introducción, la cristalización de proteínas en hidrogeles da lugar a cristales compuestos con fibras de hidrogel ocluidas dentro de la estructura. También se ha visto que las fibras de gel ocluidas pueden influir en las propiedades del cristal compuesto resultante. En este sentido se planteó la posibilidad de diseñar hidrogeles supramoleculares basados en péptidos con capacidad reductora con el objetivo de que los cristales obtenidos en estos hidrogeles fueran más resistentes al daño por difracción de manera que pudieran ser difractados a temperatura ambiente evitando el inconveniente proceso de congelación.

El diseño experimental comenzó con la elección de los aminoácidos reductores con los que se pudiesen sintetizar moléculas capaces de formar hidrogeles supramoleculares. Como punto de

partida se eligió la cisteína (Cys o C) debido principalmente a su conocida capacidad reductora,¹⁴¹ con la que se sintetizó el péptido FmocCF (Figura 1).

Una vez sintetizada y caracterizada, la molécula FmocCF se sometió a un estudio sistemático de condiciones de gelificación empezando con gelificación por cambio de temperatura y siguiendo con cambio de disolvente (ver Capítulo 1, apartado 1.2.1). Con la gelificación por cambio de temperatura no se obtuvieron geles homogéneos, pero sí con la gelificación por cambio de disolvente, más concretamente, empleando mezclas de dimetilsulfóxido (DMSO) y agua. En la Figura 2A se puede observar el primer intento de gelificación con DMSO con el que se consiguió obtener un gel autoconsistente pero opaco. Tras un proceso de optimización de las condiciones de gelificación con mezclas DMSO-agua, se consiguieron obtener hidrogeles transparentes a distintas concentraciones de FmocCF (Figura 2B) siendo estas: 0.2, 0.5, 0.75, 1.0 y 2.0% (p/v) (para más detalles sobre las proporciones de DMSO-agua consultar Materiales y Métodos apartado 3.3.1).

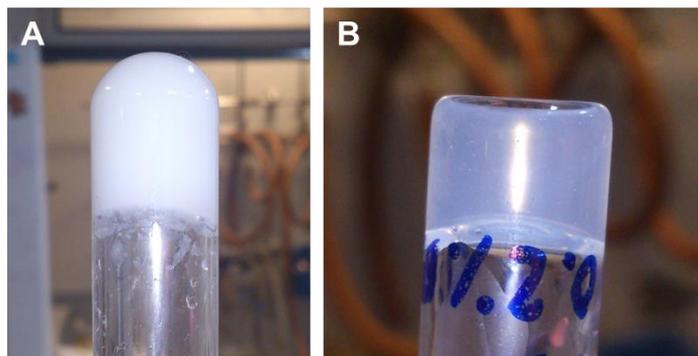


Figura 2. Fotografías de hidrogeles FmocCF (A) del primer intento de gelificación por cambio de disolvente y (B) del hidrogel 0.2% (p/v) optimizado.

Debido al éxito en la preparación de los hidrogeles FmocCF se decidió sintetizar la molécula equivalente con metionina (Met o M), es decir, FmocMF (Figura 1). De este modo se podría hacer una comparación entre la potencial capacidad protectora de la cisteína frente a la metionina. La síntesis de la molécula fue un éxito y aunque tras varios intentos de gelificación por cambio de disolvente no se consiguieron obtener hidrogeles homogéneos, transparentes y consistentes, sí que se consiguió empleando la metodología de cambio de pH utilizada anteriormente para obtener hidrogeles de FmocFF (ver Capítulo 1, apartado 3.4). Empleando esta metodología se consiguieron obtener hidrogeles con distintas concentraciones FmocMF siendo estas: 0.2, 0.5, 0.75 y 1.0% (p/v). Con el mismo objetivo se prepararon geles de FmocY (Fmoc-Tirosina, Figura 1) siguiendo un protocolo previamente descrito.⁵⁵

4.2. Caracterización de hidrogeles.

4.2.1. Imágenes TEM.

Se tomaron imágenes TEM de las fibras de los hidrogeles FmocCF y FmocMF, ambos preparados con una concentración de 0.5% (p/v). En la Figura 3 se puede observar que ambos geles presentaban fibras típicas resultado de una autoasociación supramolecular.¹³⁷ Se pueden encontrar diferencias entre los hidrogeles en cuanto al diámetro mínimo de las nanofibras, siendo este de aproximadamente 20 nm en FmocCF, y en torno a 10 nm en FmocMF.

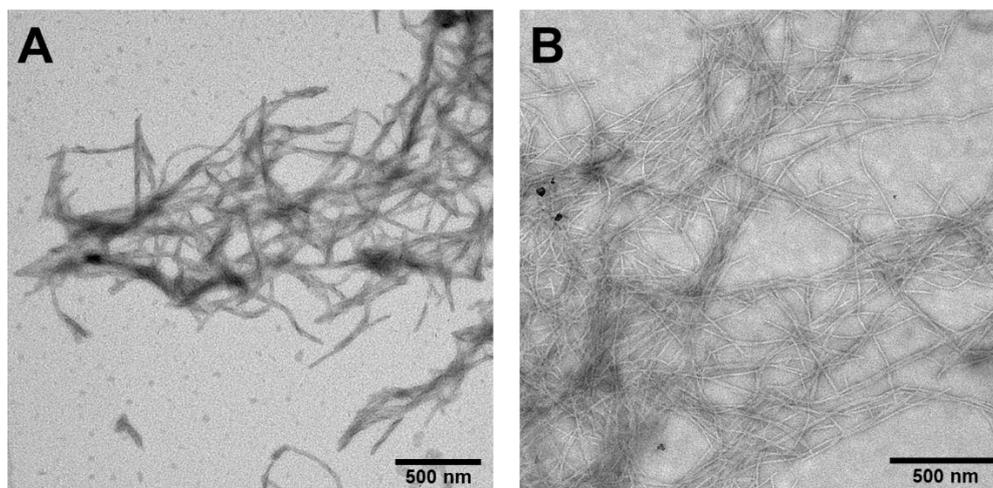


Figura 3. Micrografías TEM de xerogel de (A) FmocCF 0.5% (p/v) y (B) FmocMF 0.5% (p/v).

4.2.2. Caracterización de la estructura secundaria: CD, FTIR y XRD.

Con intención de estudiar las características de la estructura secundaria derivada de la autoasociación de FmocCF y FmocMF se registraron espectros de CD, de FTIR y de XRD en polvo.

En los espectros de CD de los hidrogeles FmocCF y FmocMF 0.5% (p/v) (Figura 4A) se pudieron observar dos bandas positivas centradas aproximadamente en 225 y 280 nm en FmocCF y en 216 y 263 nm en FmocMF. Estas bandas se relacionaron con las transiciones $n-\pi^*$ y $\pi-\pi^*$ del grupo fluorenilo. Aunque el desplazamiento de estos picos no se ajustaba exactamente con la conformación típica en lámina β de esta clase de péptidos, se han encontrado resultados similares en bibliografía.^{17,51} Los espectros FTIR de ambos hidrogeles con una concentración de 0.5% (p/v) (Figura 4B) mostraron dos picos principales correspondientes con las bandas amida I (tensión C=O a 1645 cm^{-1}) y amida II (flexión N-H a 1536 cm^{-1}). De acuerdo con trabajos previos,^{50,92} la presencia de estas dos bandas amida bien definidas sugiere una conformación en lámina β .

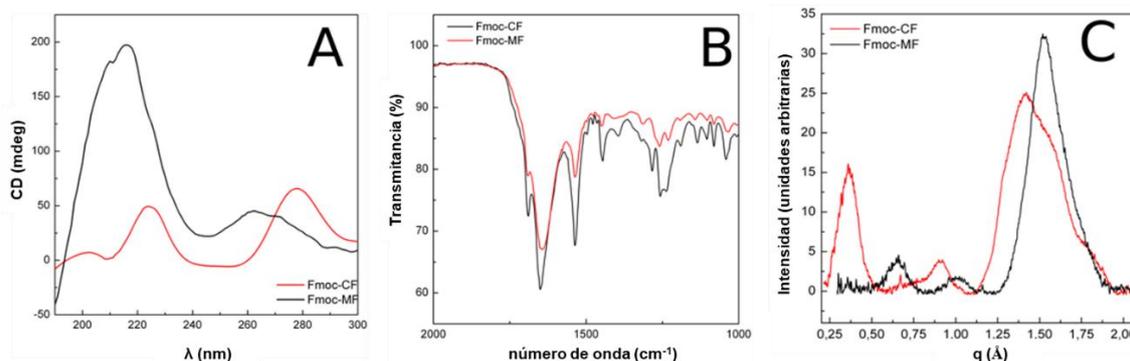


Figura 4. A) Espectro CD de los hidrogeles FmocCF y FmocMF 0.5% (p/v). B) Espectro FTIR de hidrogeles FmocCF y FmocMF 0.5% (p/v). C) XRD de xerogeles FmocCF y FmocMF 0.5% (p/v).

En los espectros de XRD en polvo de los xerogeles de FmocCF y FmocMF 0.5% (p/v) (Figura 4C) se pudieron observar una serie de picos de difracción encontrados también en otros Fmoc-dipéptidos.⁵⁰ En ambos espectros destacó una reflexión intensa a $q \sim 1.5 \text{ \AA}^{-1}$ que se corresponde aproximadamente con el espaciado entre dos péptidos dentro de una lámina β ($d = 4.2 \text{ \AA}$). El resto de los picos observados se pudieron correlacionar con reflexiones periódicas dentro de las fibras.

Tomando en conjunto los resultados expuestos en lo referente al estudio de la estructura secundaria de la autoasociación de FmocCF y FmocMF, se pudo concluir que ambos adquirirían una disposición en conformación de lámina β para formar fibras.

4.2.3. Estudio reológico.

La calidad de las medidas reológicas de geles depende directamente de la homogeneidad de las muestras. En el caso de los hidrogeles supramoleculares preparados por cambio de disolvente (como es el caso de los hidrogeles FmocCF), la homogeneidad del gel está determinada principalmente por la eficacia durante la mezcla de disolventes. Es necesario generar una mezcla completa en el menor tiempo posible para asegurar que la concentración de gelador sea isótropa en todo el volumen del gel. Para asegurar que la mezcla de disolventes fuese lo más homogénea posible, se optó por disminuir el volumen del hidrogel generándolo en un recipiente de aproximadamente 10 mm de diámetro y 2 mm de profundidad. Dicho recipiente se construyó directamente sobre el plato base del reómetro para evitar una manipulación excesiva del hidrogel, (Figura 5), al igual que se hizo en la caracterización reológica del Capítulo 1 (Capítulo 1, apartados 3.16 y 3.17). Tomando estas medidas, los hidrogeles preparados eran visiblemente homogéneos y las medidas reológicas resultaron ser altamente reproducibles como puede observarse en el ejemplo destacado en la Figura 5.

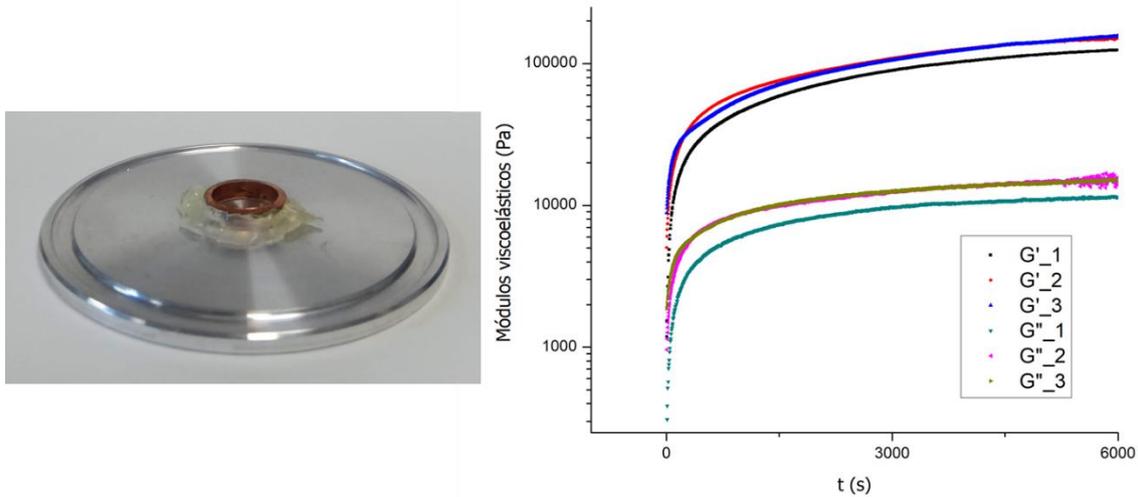


Figura 5. Izquierda: fotografía de plato inferior de reómetro adaptado con un cilindro metálico de diámetro ligeramente superior a 10 mm. Derecha: representación de la variación de G' y G'' con el tiempo de gelificación de 3 hidrogeles FmocCF 0.75% (p/v).

Los hidrogeles de FmocMF se prepararon sin mayor contratiempo en los platos de reómetro tallados empleados en el Capítulo 1, apartado 3.17.

Una vez optimizada la metodología de reología se procedió al análisis de las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles en régimen oscilatorio de amplitud de deformación de cizalla. Mediante ensayos de frecuencia de deformación constante (1 Hz) con incremento de la amplitud de deformación (Figura 6), se identificó que la zona viscoelástica lineal o ZVL (el rango de deformación en el que los valores de los módulos viscoelásticos G' y G'' se mantenían constantes) para todos los casos, se encontraba con amplitudes de deformación inferiores al 1%. Dentro de la ZVL, las muestras presentaban valores de G' considerablemente superiores a los de G'' , lo que se corresponde con un comportamiento predominantemente elástico. La magnitud de los valores de G' para los hidrogeles FmocCF y FmocMF 0.5% (p/v) fueron de 3360 y 2500 Pa respectivamente, lo que indica que estos geles eran extremadamente débiles.¹⁴² Por otro lado, a medida que se incrementaba la concentración de FmocCF, los valores de G' aumentaron hasta alcanzar un valor de 93000 Pa en el gel FmocCF a 2.0% (p/v). Al aumentar la concentración de FmocMF hasta 1.0% (p/v) se alcanzaron valores de G' de superiores reflejando un aumento de la resistencia del hidrogel con respecto a la concentración de gelador.

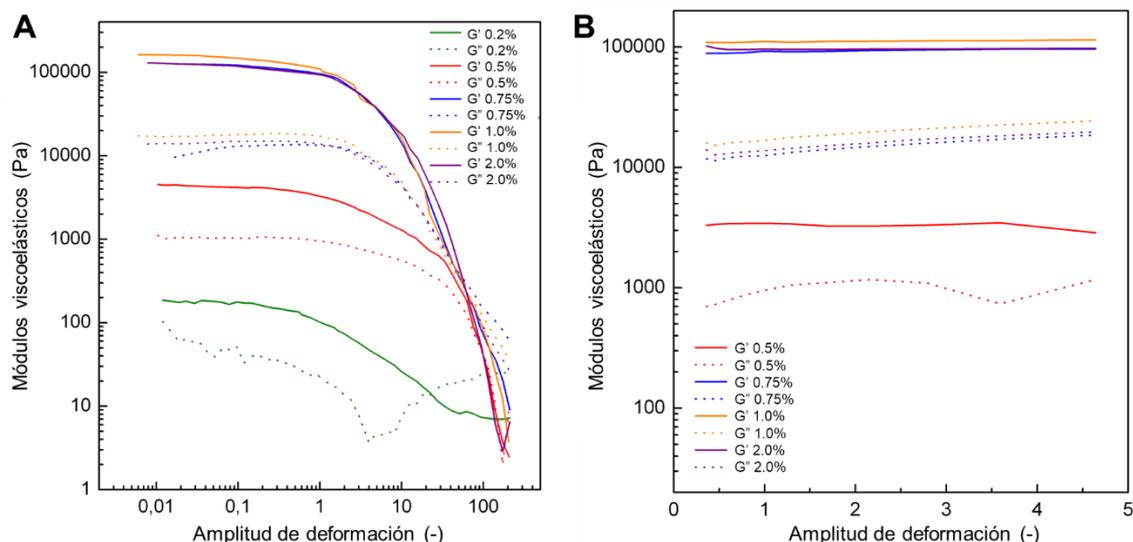


Figura 6. Representación de módulos viscoelásticos (G' y G'') obtenidos para los hidrogeles de FmocCF *versus* (A) amplitud de deformación a frecuencia constante de 1 Hz y (B) frecuencia de deformación a amplitud de deformación constante (1%).

También en régimen oscilatorio, se realizaron ensayos a amplitudes de deformación constantes e incrementando la frecuencia de deformación, con los que se pudo comprobar que los valores de G' y G'' eran independientes de la frecuencia (Figura 6B).

4.3. Cristalización de proteínas.

Una vez se hubieron sintetizado y caracterizado los hidrogeles descritos en los apartados anteriores, se procedió a estudiar la posibilidad de emplearlos como medio para cristalizar proteínas. Se emplearon las proteínas lisozima, glucosa isomerasa y taumatina que previamente ya habían sido cristalizadas en otros hidrogeles supramoleculares peptídicos.^{124,125} A modo de referencia para estudios posteriores de daño por radiación (ver apartado 4.4), se obtuvieron cristales de lisozima en hidrogeles de agarosa.

Para llevar a cabo la cristalización de proteínas en el interior de los geles, se empleó la técnica de contradifusión en dos capas (2L) descrita en los trabajos anteriores. Brevemente, esta técnica consiste en poner en contacto una disolución de proteína, o como en este caso, un gel que contenga la proteína, con una disolución del agente precipitante que provoque su precipitación/cristalización. El contacto entre las dos capas (disolución de proteína y disolución de precipitante) se hace a través de una interfase que impide el contacto entre moléculas de proteína y precipitante por convección, y solamente puede darse por difusión. Si se emplea un gel que contenga la disolución de proteína, la superficie del gel actuaría como interfase. Después del primer contacto entre capas se produce una difusión rápida del agente precipitante hacia las moléculas de proteína,

lo que provoca una gran sobresaturación que se traduce en la formación de un sólido amorfo o un precipitado microcristalino en la interfase. En las proximidades del precipitado disminuye la concentración de proteína, pero las moléculas de precipitante difunden más allá del precipitado creando un gradiente de sobresaturación que permite a las proteínas formar núcleos de cristalización en lugares de valores bajos de sobresaturación. Como resultado de este gradiente se forman menos cristales, más grandes y de mayor calidad tanto más lejos de la interfase.¹⁴³ En la Figura 7A se puede ver claramente el patrón de contradifusión ya que los cristales son más grandes cuanto más abajo se observe el gel (más lejos de la interfase).

Siguiendo el procedimiento descrito se obtuvieron cristales de las tres proteínas en todos los geles y concentraciones estudiadas. Los cristales obtenidos en todos los casos fueron de gran calidad tal como se puede comprobar en los ejemplos mostrados en la Figura 7B-D. Los cristales obtenidos en los hidrogeles de FmocCF fueron de la misma calidad independientemente de la concentración de gelador a pesar del elevado número de grupos tiol en las fibras de gel.

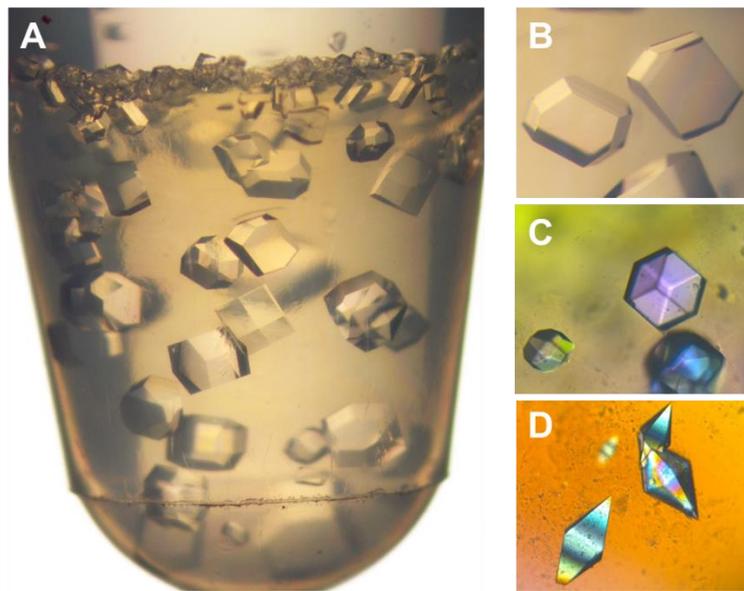


Figura 7. (A) Fotografía de tubo Eppendorf con cristales de lisozima crecidos en hidrogel FmocCF 0.5% (p/v) donde se distingue un patrón típico de contradifusión. Fotografías de cristales de (A) lisozima, (B) glucosa isomerasa y (C) taumatina, crecidos en hidrogeles FmocCF.

4.4. Estudio del efecto protector de FmocCF frente al daño por radiación.

Habiendo demostrado que era posible obtener cristales de proteína de calidad y tamaños adecuados para ser difractados por rayos X en los hidrogeles supramoleculares estudiados, se procedió a evaluar la capacidad que tenían estos geles de mitigar el daño por radiación. Para ello se seleccionaron cristales de lisozima crecidos en el gel de FmocCF a las concentraciones más altas: 1.0 y 2.0% (p/v) (Figura 8). Como control negativo se utilizaron los cristales crecidos en hidrogeles de agarosa.

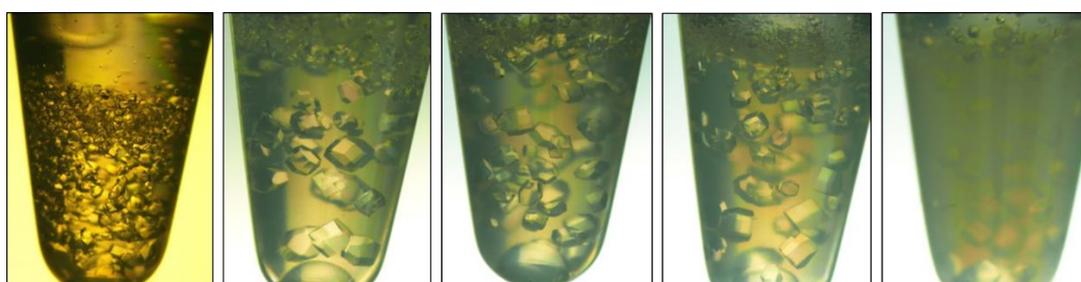


Figura 8. Cristales de lisozima crecidos en hidrogeles de FmocCF (de izquierda a derecha) 0.2, 0.5, 0.75, 1.0 y 2.0% (p/v).

El daño por radiación es el daño que se produce por efecto de la alta intensidad de los rayos X en los estudios de difracción con radiación de sincrotrón. Esta radiación es capaz de provocar el deterioro propio de la estructura de la proteína (daño por radiación directo) o también pueden provocar la formación de radicales libres principalmente del medio (H_2O) que rodea o que forma parte del cristal de proteína (daño por radiación indirecto). Se esperaba que los cristales de lisozima compuestos al contener FmocCF fueran capaces de mitigar el daño por radiación indirecto al actuar los grupos tiol de la cisteína como agentes neutralizantes de los radicales generados en el medio.

Los experimentos encaminados a evaluar el poder protector de los hidrogeles FmocCF de mayor concentración (1.0 y 2.0% (p/v)) así como de agarosa como control, consistieron en analizar la intensidad global de radiación difractada en sincrotrón, medidos en nueve ciclos de irradiación consecutivos (nombrados como $D1$ a $D9$) y a temperatura ambiente. Los efectos de la radiación se monitorizaron a escala global y específica. Para estimar el daño global en cada ciclo de irradiación (I_{Dn}/I_{D1}) se monitorizó el decaimiento de la intensidad de difracción total para cada ciclo (I_{Dn}) en comparación con la intensidad recogida en el primer set de datos (I_{D1}).

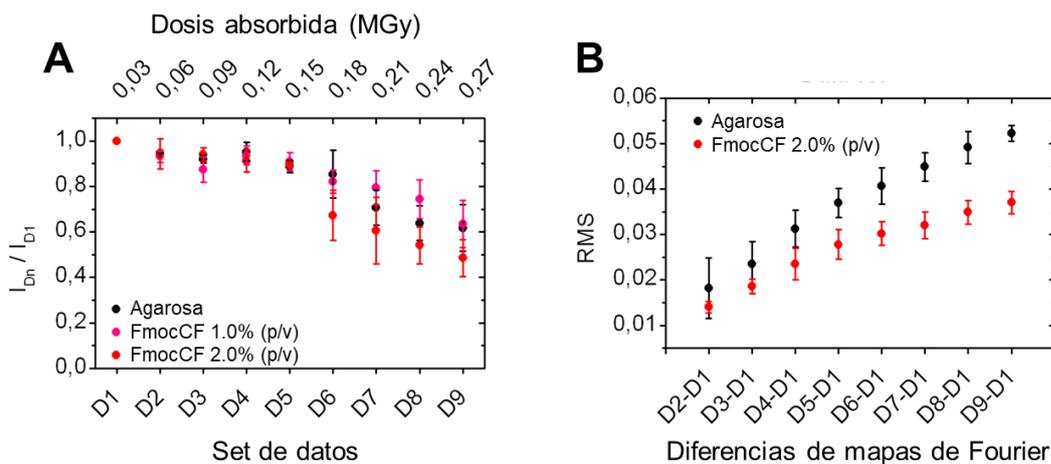


Figura 9. Daño global y específico en cristales de lisozima en presencia de hidrogeles de agarosa y FmocCF. A) I_{Dn}/I_{D1} como una función de dosis absorbida para cada set de datos. B) Valores de RMS en función de los mapas de Fourier D_n-D_1 .

Los cristales crecidos en hidrogeles FmocCF a 1.0 y 2.0% (p/v) no mostraron señales de protección frente al daño global si se comparan con los cristales crecidos en agarosa (Figura 9A). Este resultado está en consonancia con los obtenidos probando varios aditivos en disolución.¹³⁶ Pese a este resultado, sí que se observó una mejora marginal en la calidad de los parámetros cristalográficos R_{means} (coeficiente de correlación de reflexiones relacionadas) y $\langle I/\sigma \rangle$ (relación señal/ruido) en el caso de cristales crecidos en FmocCF 2.0% (p/v) (Tabla 1). Estos resultados sugieren que FmocCF estaba ayudando a preservar la integridad de las moléculas de proteína.

Tabla 1. Valores de R_{means} y $\langle I/\sigma \rangle$ obtenidos en los ciclos de irradiación $D1$ y $D9$ de los cristales de lisozima crecidos en los geles de agarosa (control) y FmocCF 2.0% (p/v).

GEL	Agarosa					
	1		2		3	
RÉPLICA						
CICLO	$D1$	$D9$	$D1$	$D9$	$D1$	$D9$
R_{means} (%)*	5.2(7.9)	5.1(32.0)	5.1(8.2)	4.2(39.8)	4.7(8.1)	3.8(38.1)
$\langle I/\sigma \rangle$ *	32.1(21.5)	24.0(5.9)	33.4(21.0)	26.5(5.2)	35.5(22.9)	31.4(6.1)

GEL	FmocCF 2.0% (p/v)					
	1		2		3	
RÉPLICA						
CICLO	$D1$	$D9$	$D1$	$D9$	$D1$	$D9$
R_{means} (%)*	4.3(7.3)	3.7(19.3)	4.0(7.8)	3.9(25.1)	4.3(8.4)	4.2(32.2)
$\langle I/\sigma \rangle$ *	39.0(23.4)	35.8(9.7)	40.1(21.5)	30.7(7.3)	38.5(21.7)	28.7(6.1)

* Los valores entre paréntesis se corresponden con los de la capa de alta resolución.

Con intención de estudiar una posible protección local se analizó la estructura de la proteína a nivel molecular mapeando todos los grupos sensibles de la lisozima al daño por radiación (metioninas y enlaces disulfuro).¹³⁵ El daño por radiación local se monitorizó inspeccionando los mapas de densidad electrónica (o mapas de Fourier) de los conjuntos de datos D_n y D_1 calculados

como D_n-D_I . El valor de la media cuadrática (RMS del inglés *Root Mean Square*) para la diferencia de densidad electrónica promedio en D_n-D_I constituye un indicador de la alteración inducida por daño por radiación entre el “cristal fresco” (D_I) y los sets de daño incremental (D_n). Con los datos obtenidos quedaba bastante claro que la presencia de FmocCF 2.0% (p/v) en el interior de los cristales de lisozima retrasaba (en lo que a ciclos de irradiación se refiere) el daño, como se puede observar en el pequeño incremento de RMS en función de D_n-D_I (Figura 9B). Cuando se compara con la referencia en agarosa, la relación de RMS entre FmocCF y agarosa alcanza su valor máximo en D_9-D_I siendo igual a 0.709.

El daño local (y la protección frente al mismo) se puede observar mejor en los grupos más sensibles (metioninas y disulfuros). Se calcularon y representaron los mapas de D_9-D_I contorneados con un nivel de contorno en relación a σ de $0.15 e/\text{\AA}^3$ sobre todos los enlaces sensibles. En estas representaciones se puede observar una protección específica considerable sobre los cristales de lisozima crecidos en presencia de FmocCF 2.0% (p/v) (Figura 10).

Analizando uno por uno los grupos funcionales objetivo, se detectó la protección específica de los enlaces disulfuro Cys64-Cys80 y Cys76-Cys94, así como en las metioninas Met12 y Met105 solamente en los cristales crecidos en FmocCF. En los cristales crecidos en agarosa, los mismos grupos funcionales protegidos con FmocCF tenían los enlaces S-S y S-C rotos en algún grado debido al efecto de la radiación. Este daño fue despreciable en el caso del enlace Cys6-Cys126 y no detectable (con un nivel de contorno en relación a σ de $0.15 e/\text{\AA}^3$) en el enlace Cys30-Cys115.

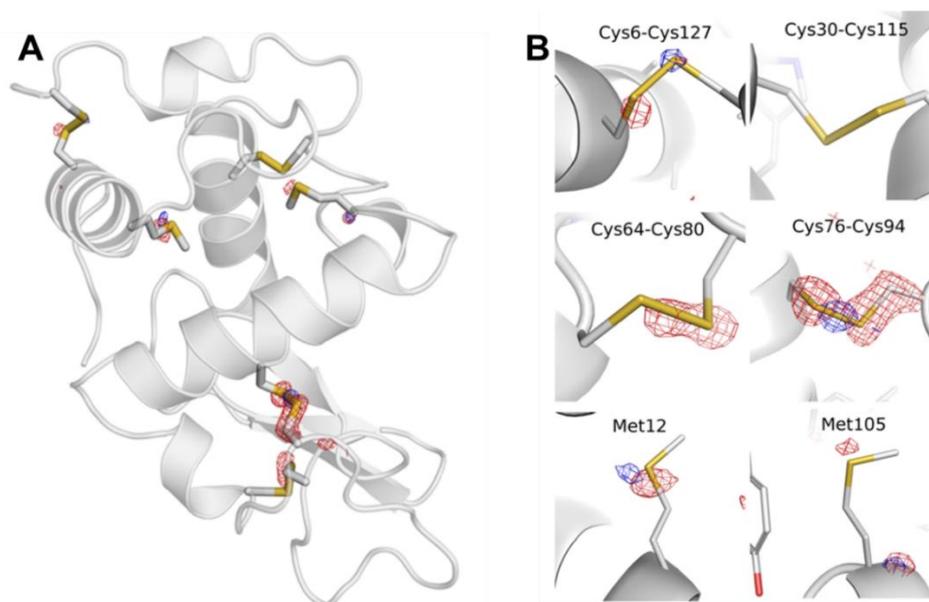


Figura 10. A) Representación en cintas de la estructura de la lisozima resaltando los grupos más sensibles al daño por radiación. Los mapas de Fourier D_9-D_I para agarosa y FmocCF se muestran en rojo y azul respectivamente. B) Detalle de los cuatro enlaces disulfuro y las dos metioninas analizadas en este estudio.

5. Conclusiones.

1. Se han conseguido preparar nuevos hidrogeles a partir de los péptidos FmocCF y FmocMF.
2. Se ha demostrado que los hidrogeles de FmocCF, FmocMF y FmocY son unos medios excelentes para la cristalización de proteínas. Los resultados obtenidos en el gel de FmocCF son remarcables teniendo en cuenta que los grupos tiol de la cisteína son capaces de reaccionar con las proteínas.
3. Se ha demostrado que la inclusión de fibras de FmocCF en cristales de lisozima tiene un efecto protector local de la estructura tridimensional de las proteínas frente al daño por radiación. Este efecto protector no ha sido observado en cristales crecidos en agarosa ni añadiendo cisteína como aditivo en solución.

Capítulo 3:

**Obtención de cristales de
lisozima reforzados con
nanotubos de carbono
catalíticos y conductores de la
electricidad**

1. Introducción.

1.1. Introducción a los materiales híbridos y compuestos con nanotubos de carbono.

Los nanotubos de carbono (CNTs) son alótopos del carbono (como el grafito, el diamante o los fullerenos). Se pueden definir como una capa grafénica enrollada de átomos de carbono sp^2 , donde cada átomo se une a otros tres átomos adyacentes formando una malla enrollada de hexágonos. Se clasifican en dos grandes grupos. Por un lado, están los nanotubos de carbono de pared simple o SWCNTs (del inglés *Single Walled Carbon NanoTubes*), constituidos por una sola capa grafénica enrollada, y por el otro estarían los nanotubos de carbono de pared múltiple o MWCNTs (del inglés *Multi Walled Carbon NanoTubes*) compuestos por dos (DWCNTs) o más capas grafénicas enrolladas de forma concéntrica. Los átomos de carbono pueden adquirir dos tipos de disposiciones relativas límite llamadas *armchair* y *zigzag*. También pueden estar ordenados en las posibles estructuras intermedias entre las dos disposiciones límite. A estas últimas se las agrupa como quirales, ya que a diferencia de *armchair* y *zigzag*, los nanotubos quirales no son superponibles a su imagen especular (Figura 1).¹⁴⁴

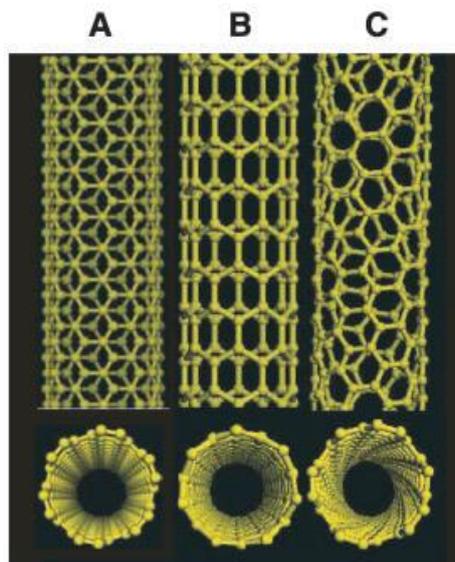


Figura 1. Ilustraciones esquemáticas de la estructura de SWCNTs (A) *armchair*, (B) *zigzag*, y (C) quiral. Arriba proyecciones normales del eje de los tubos y abajo vista a través de los tubos [imagen tomada de referencia 145 con permiso de la editorial].

Los CNTs y el grafeno presentan grandes similitudes en lo referente a su estructura electrónica, pero su comportamiento eléctrico es distinto. Mientras que el grafeno es conductor metálico, los

SWCNTs puede ser conductores o semiconductores en función de la disposición que adquieran los átomos de carbono en la capa grafénica cuando esta se “enrolla” para formar un cilindro. Todos los *armchair* son altamente conductores de la electricidad, mientras que las otras configuraciones (zigzag y quiral) tienen un comportamiento semiconductor con barreras energéticas que dependen de la disposición relativa de los átomos y del diámetro del nanotubo. Los MWCNTs suelen ser conductores metálicos capaces de conducir corrientes superiores a 10^9 A·cm⁻².¹⁴⁵ En lo que respecta a su conductividad térmica, los SWCNTs considerados individualmente pueden llegar a conducir $3500 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ a temperatura ambiente,¹⁴⁶ siendo por lo tanto muy superior a la conductividad térmica del diamante ($2000 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$). Otra característica destacable de estos nanomateriales es que suelen ser excepcionalmente fuertes, entendiéndose por fuertes a que presentan módulos elásticos elevados y una gran resistencia a la tracción. Considerando la sección transversal de un solo MWCNT se han llegado a medir módulos elásticos de hasta 1 TPa y una resistencia a la tracción de 100 GPa.¹⁴⁷ Esta “fuerza” es más de 10 veces superior a la de que cualquier fibra empleada en la industria. Otras propiedades que hacen singulares a los CNTs son su naturaleza hueca que deriva en una baja densidad, su excelente estabilidad química y electroquímica, y su elevada área específica.^{148,149}

Como se comentó en la Introducción del Capítulo 1, los materiales híbridos y compuestos han atraído la atención de los investigadores en diversos ámbitos. Gracias a la combinación de materiales se han conseguido solucionar problemas tecnológicos y científicos, además de haberse encontrado propiedades que no podrían haberse encontrado de otro modo. La combinación de CNTs con otros materiales es una estrategia con la que se han conseguido obtener una cantidad excepcional de materiales híbridos/compuestos con un número de propiedades y aplicaciones igual de extenso. Este interés especial se debe a las características singulares de los nanotubos de carbono en lo referente principalmente a sus propiedades eléctricas y mecánicas.¹⁵⁰

La combinación de nanotubos de carbono con otros materiales ha servido para mejorar las prestaciones de multitud de materiales en aplicaciones industriales. Así, por ejemplo, la capacidad de los CNTs para conducir la electricidad se ha empleado para diseñar materiales compuestos polímero-CNTs con los que se han fabricado pinturas capaces de disipar la electricidad estática, muy útiles en la industria del automóvil para proteger conductos y filtros de combustible. Combinando MWCNTs desordenados con polímeros se han llegado a conseguir materiales plásticos con conductividad eléctrica que pueden alcanzar los $10000 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ con tan solo un 10% en peso de nanotubos.¹⁵¹ Los materiales compuestos con CNTs también se han empleado para proteger dispositivos electrónicos a modo de escudo para interferencias electromagnéticas. Las propiedades mecánicas singulares de los CNTs han servido para dotar de mayor resistencia y tenacidad a materiales poliméricos,¹⁵² consiguiéndose, por ejemplo, incrementar la tenacidad a la

fractura en un 23% añadiendo tan solo un 1% de MWCNTs.¹⁵³ Con CNTs se pueden fabricar hilos que al anudarse no pierden resistencia,¹⁵⁴ y que pueden ser empleados al combinarlos con otros materiales, para fabricar hilos aptos para tejer y construir cables superconductores, electrodos de baterías, tejidos auto-limpiables, etc.¹⁵⁵

1.2. Hidrogeles con nanotubos de carbono.

La estructura macroporosa de los hidrogeles les permite o posibilita albergar nanomateriales en su interior que modifiquen de alguna forma sus propiedades o les doten de propiedades nuevas (Introducción Capítulo 1). Un ejemplo significativo y de gran interés para la comunidad científica, ha sido la combinación de nanotubos de carbono con hidrogeles (tradicionalmente poliméricos), debido a las ya mencionadas características singulares de los CNTs.

El principal reto al que se enfrentan los investigadores a la hora de diseñar un hidrogel que contenga un nanomaterial, es conseguir la dispersión homogénea de dicho nanomaterial en el agua y su incorporación en la estructura tridimensional. En el caso de los CNTs esta tarea resulta especialmente compleja debido a su notable hidrofobicidad. Considerando los hidrogeles poliméricos con nanotubos de carbono, se han descrito varias alternativas para conseguir la dispersión e incorporación homogénea dentro de la matriz polimérica del gel.¹⁴⁹ Se pueden distinguir dos estrategias para formar hidrogeles con CNTs en función del tipo de funcionalización que se haga de los nanotubos: funcionalización no covalente y funcionalización covalente.¹⁵⁶

La funcionalización no covalente se basa principalmente en la posibilidad de provocar interacciones π - π entre la superficie de los nanotubos y otras especies químicas con electrones π . Esta aproximación tiene como característica principal la no alteración de las propiedades de los nanotubos y como consecuencia, las propiedades del material resultante estarán determinadas por las de los nanotubos en su estado original. Esta aproximación ha servido, por ejemplo, para obtener hidrogeles híbridos mediante fotopolimerización inducida por luz de hidrogeles de metacrilato (GelMA) en presencia de CNTs. Los geles híbridos obtenidos eran capaces de estimular el crecimiento y maduración de células musculares. La hibridación con CNTs les dotaba de mejores propiedades mecánicas y eléctricas, lo que ha permitido la fabricación de parches cardíacos.¹⁵⁷ Empleando hidrogeles compuestos por poli-(N-isopropilacrilamida) (pNIPAM) con SWCNTs embebidos se han fabricado materiales con capacidad de modificar su estructura mediante un estímulo óptico y térmico. De esta manera se han podido construir dispositivos capaces de plegarse o desplegarse mediante un cambio de temperatura o por irradiación de luz infrarroja.¹⁵⁸

En la aproximación covalente se provocan modificaciones químicas y estructurales en la superficie de los CNTs. La naturaleza curvada de la superficie de los nanotubos genera una tensión en los carbonos sp^2 que hace que su rehibridación a sp^3 tenga una energía relativamente baja (en comparación con una capa grafénica plana) y, por lo tanto, la superficie de los CNTs es susceptible de sufrir reacciones químicas. Empleando esta clase de funcionalización se provoca una alteración en la nube π de electrones afectando a las propiedades conductoras del nanotubo pero, por otro lado, la hidrofobicidad de los nanotubos puede disminuir al modificarlos químicamente haciendo que su dispersión e integración en hidrogeles sea más sencilla.^{159,160} Un ejemplo significativo de funcionalización covalente es la oxidación de la superficie de los nanotubos con grupos oxigenados (COOH) mediante el tratamiento de los nanotubos en condiciones altamente oxidantes. Los nanotubos oxidados (CNTs-COOH) tienen una interacción más favorable con el agua y con las fibras poliméricas a través de enlaces de hidrógeno.¹⁶¹ Por esta vía, por ejemplo, se han conseguido formar hidrogeles híbridos basados en hemicelulosa¹⁶² o polivinilalcohol (PVA)¹⁶³ con CNTs-COOH. Estos materiales presentaban propiedades mecánicas mejoradas además de una mayor capacidad para absorber agua.¹⁶³

1.2.1. Hidrogeles supramoleculares con nanotubos de carbono.

Los hidrogeles supramoleculares no han sido tan ampliamente estudiados como los poliméricos en lo referente a su hibridación con nanotubos de carbono, sin embargo, en la literatura se pueden encontrar algunos ejemplos interesantes como los que se comentan a continuación:

En 2005, S. I. Stupp y colaboradores comunicaron la utilización de péptidos anfifílicos (Figura 2, **1**) capaces de dispersar MWCNTs en agua mediante funcionalización no covalente. Estos péptidos podían autoasociarse formando hidrogeles auto-consistentes conteniendo MWCNTs.¹⁶⁴ En un trabajo muy interesante, Z. Tan y colaboradores demostraron la capacidad de autoasociación de sales biliares aniónicas (Figura 2, **2**) cuando entraban en contacto con SWCNTs, originando hidrogeles. Los hidrogeles obtenidos presentaban propiedades mecánicas excelentes además de conductividad eléctrica. Resulta interesante que, de no ser por su interacción no covalente con los SWCNTs, las sales biliares no eran capaces de formar hidrogeles por sí mismas.¹⁶⁵ En 2013, K. Das y colaboradores publicaron la síntesis de una serie de péptidos anfifílicos (ejemplo en Figura 2, **3**) capaces de dispersar en agua SWCNTs inalterados en concentraciones relativamente elevadas (entre 2.0 y 3.5% (p/v)). Tras inducir la gelificación de las suspensiones obtuvieron hidrogeles con SWCNTs que llegaron a ser hasta 85 veces más resistentes que los correspondientes hidrogeles sin nanotubos.¹⁶⁶

Los hidrogeles supramoleculares peptídicos Fmoc derivados (Capítulo 1, apartado 1.3) también se han empleado para la obtención de híbridos péptido-nanotubo. En un trabajo realizado por R. Ulijn y colaboradores estudiaron la capacidad de varios Fmoc derivados de actuar como surfactantes de SWCNTs y MWCNTs inalterados. Demostraron que estos Fmoc-derivados eran unos buenos surfactantes capaces de formar suspensiones homogéneas de CNTs en agua. En particular, el derivado Fmoc-triptófano (FmocW) (Figura 2, 4) era especialmente buen surfactante.¹⁶⁷ Posteriormente, A. Banerjee y colaboradores demostraron la capacidad del péptido Fmoc-fenilalanina (FmocF) (Figura 2, 5) de generar una dispersión homogénea de SWCNTs funcionalizados con grupos carboxilo (SWCNTs-COOH) en agua.⁶⁸ La incorporación de estos SWCNTs-COOH en los hidrogeles de FmocF aumentó la estabilidad térmica en función de la concentración de nanotubos, los convirtió en materiales más elásticos y en conductores de la electricidad. Recientemente S. Marchesan y colaboradores han empleado el tripéptido leucina-D-fenilalanina-D-fenilalanina (Figura 2, 6) como agente para dispersar en agua nanomateriales de carbón oxidados incluyendo SWCNTs-COOH. Han demostrado que estos hidrogeles híbridos tienen la capacidad de auto recomponerse.¹⁶⁸

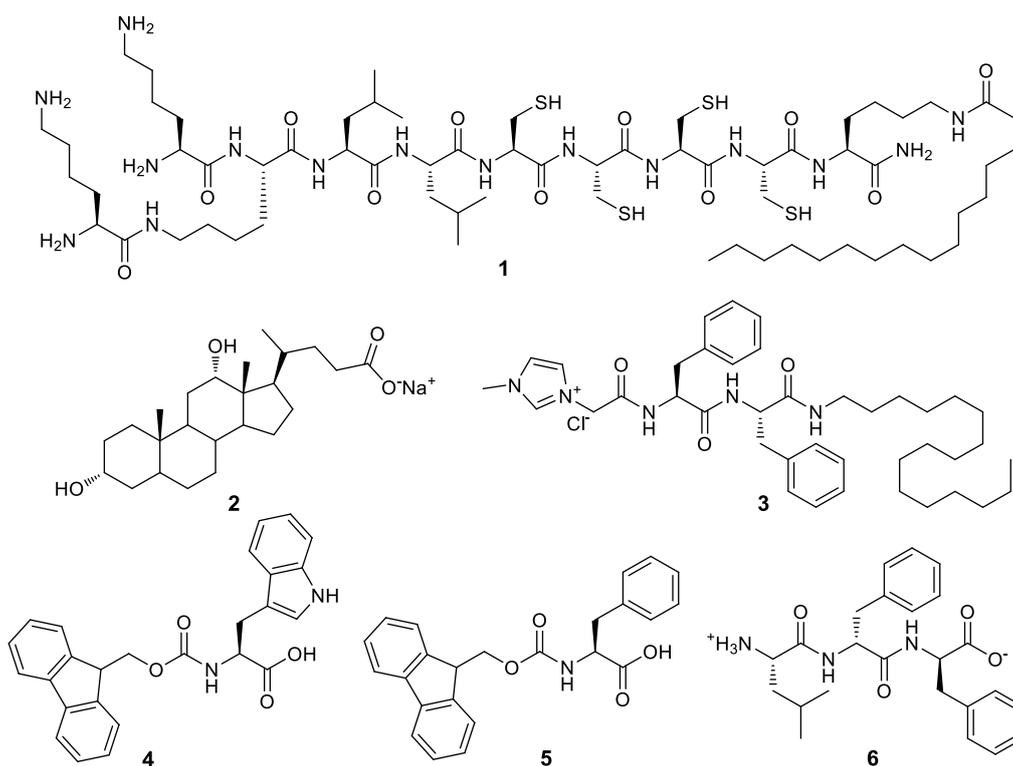


Figura 2. Estructuras de hidrogeladores supramoleculares empleados para formar hidrogeles híbridos con nanotubos de carbono.

1.3. Cristales de proteína híbridos.

De entre las diferentes moléculas orgánicas empleadas para la producción de materiales híbridos (bio)orgánico-inorgánico, las proteínas parecen ser particularmente interesantes debido a su capacidad catalítica y su habilidad para asociarse originando nanoestructuras funcionales.^{169,170} La posibilidad de formar agregados proteicos porosos (cajas) y/o cristales, hace posible el diseño de estructuras supramoleculares bien ordenadas capaces de encapsular distintos sustratos.¹⁷¹⁻¹⁷³ Una de las proteínas de mayor interés es la lisozima debido a su gran estabilidad y a la relativa facilidad para cristalizarla.¹⁷⁴ Empleando lisozima en disolución, se han conseguido preparar materiales híbridos funcionales a través de la síntesis *in situ* de *nanoclusters* metálicos (pequeñas agrupaciones de átomos metálicos) y *quantum dots* semiconductores.¹⁷⁵ La lisozima se ha empleado como agente reductor y estabilizante de iones de oro (Au) en forma de ácido cloroáurico (HAuCl₄) obteniéndose *nanoclusters* fluorescentes de Au de varios tamaños.¹⁷⁶ El sistema híbrido lisozima-Au(*nanocluster*) se ha empleado como sensor de iones de mercurio (Hg²⁺),¹⁷⁶ iones cianuro (CN⁻),¹⁷⁷ o como agente de reconocimiento y marcaje de bacterias patógenas, con la capacidad de inhibir la proliferación de bacterias resistentes a antibióticos.¹⁷⁸ La reducción de nitrato de plata (AgNO₃) con borohidruro sódico (NaBH₄) en presencia de lisozima ha permitido la obtención de *nanoclusters* de plata (Ag) fluorescentes, estabilizados por las cisteínas libres de la lisozima, resultantes de la ruptura de enlaces disulfuro durante la reducción en medio básico.¹⁷⁹ Al igual que en el caso del oro, los híbridos lisozima-Ag(*nanocluster*) pueden actuar también como sensores de iones Hg²⁺.¹⁷⁹ Otros ejemplos de la capacidad de la lisozima para estabilizar *nanoclusters* son los obtenidos con cobre (Cu) con actividad citotóxica frente diversas líneas tumorales,¹⁸⁰ o los obtenidos con platino (Pt) con actividad catalítica tipo oxidasa.¹⁸¹

En lo referente a la producción de cristales de lisozima (u otras proteínas) híbridos con partículas metálicas u otros nanomateriales, existen distintas estrategias. La primera estrategia sería la de cristalización *in situ* de la proteína en presencia del nanomaterial o de un precursor del mismo, de modo que quede ocluido en el interior del cristal en el momento de formarse. De esta forma se ha descrito la obtención de cristales de lisozima híbridos con nanopartículas de Au sumergiendo cristales de lisozima en una disolución de ClAuS(CH₂CH₂OH)₂ (precursor). El precursor de Au era capaz de formar nanopartículas en el interior de los cristales sin la necesidad de añadir agentes reductores, y su crecimiento se pudo regular añadiendo aditivos tales como Hg²⁺, histidina o tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP).¹⁸² También por esta vía se han podido generar *quantum dots* de sulfuro de cadmio (CdS) con fluorescencia mejorada en el interior de los cristales, demostrándose que los cristales de lisozima son un medio excelente para encapsular este tipo de nanopartículas.¹⁸ Aunque esta vía resulta muy interesante, está limitada por el propio proceso de cristalización de proteínas. La cristalización de proteínas es un proceso muy dependiente de la naturaleza y

concentración de aditivos y, por tanto, la presencia de sustancias extrañas como por ejemplo iones metálicos puede alterar o incluso inhibir la cristalización.

Para solventar estas limitaciones, una estrategia alternativa consiste en emplear directamente cristales de proteína y dejar difundir hacia su interior los iones metálicos sumergiendo el cristal en una disolución del precursor de forma que este penetre a través de los canales de disolvente. De este modo se han conseguido formar complejos de iones de rodio (Rh) en el interior de cristales de lisozima¹⁸³ o formar nanopartículas de platino (Pt) y paladio (Pd) en el interior de cristales del virus del mosaico del caupí.¹⁸⁴

Los cristales de proteína pueden ser entrecruzados covalentemente al igual que los materiales poliméricos. Este entrecruzamiento, que generalmente se realiza con glutaraldehído, origina cristales más estables desde un punto de vista mecánico y químico. Estos cristales son de más fácil manipulación y han tenido una gran aplicación práctica en catálisis. Estos cristales entrecruzados también han sido empleados para obtener cristales híbridos mediante difusión sumergiéndolos en disoluciones del precursor. De esta manera se han conseguido obtener cristales de lisozima entrecruzados (CLLCs del inglés *Cross-Linked Lysozyme Crystals*) rellenos de nanopartículas de Au con respuesta plasmónica y con una elevada actividad catalítica reductora.^{16,17,185} También se ha descrito la formación de nanopartículas de Ag en el interior de CLLCs mediante irradiación con luz ultravioleta¹⁶ o con NaBH_4 ,¹³ así como nanopartículas magnéticas de cobalto y platino (CoPt) sumergiendo los cristales entrecruzados en una disolución de iones de cobalto y platino para después someterlos a un proceso de reducción con NaBH_4 .¹⁸⁶ Empleando CLLCs como molde para la polimerización de pirrol, se han obtenido cristales de lisozima conductores de la electricidad.¹⁸⁷

Pese a las posibilidades que ofrece el método de producción de cristales híbridos de lisozima (y otras proteínas) con nanomateriales, sumergiendo los cristales (intactos o entrecruzados) en disoluciones de precursores, este método está restringido a moléculas pequeñas en disolución y, por lo tanto, no puede usarse para la incorporación de moléculas más grandes o nanomateriales previamente formados. Otra limitación se deriva del hecho de que los cristales de proteína necesitan un medio acuoso para formarse. Esta peculiaridad restringe la incorporación de moléculas o nanomateriales que sean insolubles en agua.

2. Planteamiento y objetivos.

Teniendo en cuenta las ventajas que ofrece la hibridación de cristales de proteína con nanomateriales, se planteó que podría ser interesante producir cristales híbridos proteína-CNTs. En caso de conseguirse, los nanotubos de carbono podrían en principio transferir algunas de sus propiedades al material híbrido resultante.

La tarea de introducir CNTs en un cristal de proteína resulta compleja debido a que, en primer lugar, los CNTs son muy insolubles en agua y como consecuencia, la cristalización de la proteína en una disolución acuosa de los mismos quedaría descartada. Se podría plantear la utilización de agentes surfactantes para formar suspensiones homogéneas de CNTs, pero estas moléculas podrían interferir con el proceso de cristalización. En caso de tener los cristales previamente formados, estos podrían sumergirse en una suspensión homogénea de CNTs con intención de que se introdujesen en los cristales a través de los canales de disolvente, sin embargo, el gran tamaño longitudinal de los mismos impediría una incorporación eficiente.

Teniendo en cuenta estas limitaciones, se planteó que la cristalización de proteínas en hidrogeles supramoleculares peptídicos que contuviesen CNTs dispersos homogéneamente, podría ser una nueva metodología para obtener cristales de proteína-CNTs híbridos ya que, como se ha comentado en el Capítulo 2,¹²⁴⁻¹²⁶ los cristales al crecer en un medio gel incorporan el contenido del gel en su interior.

En este sentido se plantearon los siguientes **objetivos** específicos:

1. Diseñar, sintetizar y caracterizar hidrogeles supramoleculares híbridos de Fmoc-difenilalanina (FmocFF) con SWCNTs.
2. Ensayar la cristalización de lisozima en los hidrogeles obtenidos en el Objetivo 1.
3. Estudiar los efectos de la incorporación de los SWCNTs en las propiedades mecánicas, catalíticas y eléctricas de los cristales de lisozima híbridos obtenidos.

3. Materiales y métodos.

3.1. Reactivos, disolventes y equipos.

Los reactivos y disolventes empleados se obtuvieron de fuentes comerciales y se utilizaron sin purificación previa. El origen de los reactivos más relevantes se especificará a lo largo del texto con el nombre de la casa comercial en cursiva.

Los equipos empleados se especificarán a lo largo del texto escribiendo el modelo en cursiva y la marca entre paréntesis.

3.2. Preparación de hidrogel FmocFF control.

El hidrogel control empleado fue un hidrogel de FmocFF 0.5% (p/v) preparado por cambio de pH con D-(+)-glucono-1,5-lactona (GdL) siguiendo el protocolo similar al empleado en el Capítulo 1 para preparar el hidrogel no magnético (ver Capítulo 1, apartado 3.4). Muy brevemente, en primer lugar, se preparó una disolución básica de FmocFF con una concentración de 0.5% (p/v) añadiendo pequeñas porciones de una disolución de NaOH 0.5 M a una suspensión de FmocFF en agua utilizando un baño de ultrasonidos *603-ultrasonic bath* (HSt Powersonic) para facilitar la disolución. La adición de NaOH se detuvo en el momento en el que se obtuvo una disolución completa (llamada disolución básica de FmocFF) con un pH aproximado de 10.5 medido con un pH-metro *sension PH 3* (Hach). A la disolución básica de FmocFF se le añadieron 2 equivalentes molares de GdL y se dejó durante 24 horas a temperatura ambiente para que se completase la gelificación.

3.3. Preparación de hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT.

Los hidrogeles híbridos (**HHs**) con SWCNTs se prepararon a partir de una suspensión madre de SWCNTs. Esta suspensión se consiguió pesando 0.5 mg de SWCNTs (SWCNT quirales (6,5), CAS: 308068-56-6, adquiridos de *Sigma-Aldrich*) en un vial. Se añadió 1 mL de disolución básica de FmocFF (preparada como se indica en el apartado anterior) y se sonicó durante 2 horas en un baño de ultrasonidos frío. Transcurridas las 2 horas, la suspensión obtenida se introdujo en tubos Eppendorf que posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 10000 rpm en un centrífuga para tubos Eppendorf *1-14* (Sigma); tras la centrifugación se recogió el sobrenadante cuidadosamente obteniéndose así una suspensión madre de SWCNTs con una concentración de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (de SWCNTs añadidos).

Para obtener los HHs con $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (**HH-100**) y con $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (**HH-250**) de SWCNT, la suspensión madre de SWCNTs se diluyó cinco y dos veces (respectivamente) con la disolución básica de FmocFF (ver apartado anterior). Las suspensiones obtenidas se homogeneizaron con ayuda de un agitador *vortex V05 series* (LBX) y se les añadió GdL para inducir la gelificación al igual que para el hidrogel control. El mismo procedimiento se empleó para preparar el hidrogel híbrido con $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de SWCNTs (**HH-500**) añadiendo GdL directamente a la suspensión madre de SWCNTs.

3.4. Preparación de xerogeles.

Todos los xerogeles preparados en este trabajo se obtuvieron dejando secar los hidrogeles a temperatura ambiente y a presión atmosférica.

3.5. Cuantificación de la concentración de SWCNTs en HHs.

Se prepararon disoluciones básicas de FmocFF y suspensiones madre de SWCNTs (apartados 3.2 y 3.3) y se liofilizaron en porciones de 2 mL en viales cuidadosamente tarados. Tras la liofilización se pesaron los residuos sólidos obtenidos y se sometieron a un análisis termogravimétrico (TGA del inglés *Thermogravimetric Analysis*) empleando un equipo *TGA/DSC1* (Mettler-Toledo). Para la realización de los experimentos, las muestras se calentaron desde temperatura ambiente hasta $900 \text{ }^\circ\text{C}$ con una rampa de temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ por minuto, en atmósfera normal. A partir de los termogramas obtenidos se observó la desaparición total de FmocFF a $440 \text{ }^\circ\text{C}$. A esta temperatura se midió la diferencia de porcentaje en peso de la suspensión madre respecto del control, con lo que se pudo obtener el porcentaje en peso de SWCNTs en el residuo seco y, por lo tanto, la concentración real de SWCNTs. Los resultados se expresaron como el promedio de 5 muestras.

3.6. Protocolos de cristalización de lisozima.

Al igual que en el Capítulo 2 (apartado 3.9), la lisozima (HEWL) empleada para formar cristales fue adquirida como polvo liofilizado y se disolvió en una disolución de acetato sódico (AcONa) 50 mM a pH 4.5. La concentración de la disolución obtenida se determinó espectrofotométricamente a 280 nm empleando un $\epsilon = 2.65 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

3.6.1. Cristalización por contradifusión.

Para cristalizar la lisozima en los hidrogeles FmocFF control y los HHs, se empleó la técnica de contradifusión en dos capas descrita previamente en el Capítulo 2 (Capítulo 2, apartados 3.9 y

4.3) con ligeras diferencias. El procedimiento se inició con la preparación de 100 μL de cada hidrogel en tubos Eppendorf de 1.5 mL (como se indica en los apartados 3.2 y 3.3). Tras completarse la gelificación, los hidrogeles obtenidos se dializaron durante una semana frente a 100 μL de agua Milli-Q añadidos sobre los geles, cambiando el agua una vez al día.

Tras la preparación y acondicionamiento de los geles, se añadieron 100 μL de la disolución tamponada de lisozima (a 200 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se dejó difundir durante una semana a 20 °C. Pasado este tiempo, se retiró la disolución de lisozima y se midió su concentración espectrofotométricamente para determinar la cantidad de lisozima incluida dentro de cada hidrogel. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 μL de disolución de agente precipitante (cloruro sódico (NaCl) 6% (p/v) en AcONa 50 mM a pH 4.5) sobre cada hidrogel y se dejó difundir. Se observó la formación de cristales y su evolución con un microscopio óptico. Tras 24 horas de difusión del agente precipitante se empezaron a formar cristales y alcanzaron el tamaño máximo en una semana aproximadamente. Se realizaron tres experimentos de cristalización por cada tipo de hidrogel estudiado, obteniéndose los mismos resultados entre réplicas.

3.6.2. Cristalización por difusión de vapor.

A modo de control, se prepararon cristales de lisozima libres de hidrogel y de SWCNTs. Se optó por emplear una técnica estándar de difusión de vapor (VD del inglés *Vapor Diffusion*).¹⁸⁸ Se ensayaron varias concentraciones de lisozima (desde 70 a 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y de agente precipitante (NaCl desde 3.0 a 8.0% (p/v)) hasta conseguir cristales de tamaño comparable a los obtenidos por contradifusión.

3.7. Protocolo de entrecruzamiento de cristales de lisozima.

Se obtuvieron cristales entrecruzados de lisozima (CLLCs) sustituyendo la disolución de agente precipitante (apartado 3.6.1) por una disolución isotónica de glutaraldehído a 5% (v/v) (agente de entrecruzamiento). El agente de entrecruzamiento se dejó difundir durante 24 horas a 20 °C. Tras el entrecruzamiento se extrajo la columna de hidrogel conteniendo los cristales de lisozima y se traspasaron a una placa Petri con ayuda de agua Mili-Q, donde se recogieron los cristales y se limpiaron minuciosamente con ayuda de un pincel y micro-herramientas. Los cristales obtenidos se guardaron en tubos Eppendorf donde se añadió agua y se mantuvieron a 20 °C durante 3 días, cambiando el agua cada día. Para finalizar, se liofilizaron los cristales y se almacenaron en atmósfera seca.

3.9. Estudios por FTIR.

Todos los cristales de lisozima (salvo los de VD), los hidrogeles, así como los xerogeles correspondientes preparados en este trabajo, se analizaron por FTIR empleando un espectrómetro *Two FTIR ATR* (Perkin-Elmer). Para analizar las muestras, éstas se comprimieron sobre el cristal de diamante del espectrómetro y se registraron espectros desde 450 a 4000 cm^{-1} .

3.10. Caracterización de xerogeles mediante XRD en polvo.

Los patrones XRD de los xerogeles se obtuvieron con una radiación CuK α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) en un difractómetro *D2-PHASE* (Bruker) equipado con un detector *LYNXEYE* (Bruker). El rango de 2θ registrado fue de 5° a 25° con intervalos de $(2\theta) 0.02^\circ$. Para la realización de las medidas, los geles se depositaron sobre una superficie de vidrio y se dejaron secar a temperatura ambiente (xerogeles).

3.11. Imágenes ESEM.

Al igual que en el Capítulo 1 (Capítulo 1, apartado 3.10), las imágenes ESEM de los hidrogeles se obtuvieron empleando un microscopio *Quanta 400 ESEM* (FEI) equipado con un sistema de enfriado Peltier. Las muestras se introdujeron en el microscopio tomando una porción del hidrogel con una espátula y colocándola sobre una lámina adhesiva de carbono. La temperatura óptima de medida fue -5°C , la presión 3 Torr y una humedad relativa de entre 80 y 95%.

3.12. Imágenes de TEM de xerogeles y cristales.

Se registraron imágenes TEM empleando un microscopio electrónico de transmisión *LIBRA 120 PLUS* (Carl Zeiss). Las muestras de xerogeles se prepararon poniendo una gota de una suspensión acuosa de fibras encima de una rejilla de cobre de microscopía electrónica, donde se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los cristales entrecruzados de lisozima (CLLCs) se prepararon deshidratándolos con etanol para luego embeberlos en resina *Embed 812* (Fisher Scientific). El bloque de resina resultante se cortó en secciones ultra delgadas (de 50 a 70 nm) usando un ultramicrotomo *Reichert Ultracut S* (Leica Microsystems). Las láminas obtenidas se depositaron sobre rejilla de cobre de microscopía electrónica.

3.13. Microscopía Raman de xerogeles y cristales.

Tanto los xerogeles como los CLLCs empleados en este trabajo, así como los residuos sólidos de las suspensiones de SWCNTs preparadas, fueron analizados por microscopía Raman empleando un microscopio Raman *NRS-5100* (JASCO) equipado con un sistema de enfriamiento Peltier, acoplado a un detector CCD de 1064 x 256 píxeles. Se utilizó un láser de diodo emitiendo a 785 nm y 500 mW como emisor de la radiación de excitación. El haz de excitación se enfocó sobre la superficie de las muestras a través de una lente de 100x. La resolución espectral fue de 2.0 cm^{-1} (usando una rejilla con surcos a 600 mm^{-1}). Cada espectro mostrado en este trabajo es el resultado del promedio de 3 adquisiciones con 100 segundos de acumulación por adquisición. La preparación de las muestras para su análisis consistió en depositarlas sobre láminas de vidrio, y en el caso de los xerogeles, dejando los hidrogeles sobre láminas de vidrio para que se secasen a temperatura ambiente.

3.14. Caracterización reológica de hidrogeles.

Para realizar una caracterización mecánica de los hidrogeles se usó un reómetro de esfuerzo controlado *Haake MARS III* (Thermo Fisher Scientific). La geometría elegida fue de dos platos paralelos de 35 mm de diámetro. Con objeto de minimizar los errores experimentales y asegurar la reproducibilidad los geles estudiados se prepararon directamente en el interior del plato inferior del reómetro tal como se describió en el Capítulo 1, apartado 3.17, en atmósfera saturada de agua y a temperatura ambiente. Las medidas se realizaron tras 24 horas de gelificación sin ninguna manipulación previa.

La caracterización de las propiedades reológicas se realizó en régimen oscilatorio aplicando los dos mismos protocolos que en el Capítulo 2, apartado 3.7.

Para cada tipo de hidrogel caracterizado se midieron al menos tres muestras diferentes para asegurar la significancia estadística de los resultados. En las representaciones gráficas de este trabajo se han representado los valores medios.

3.15. Estudios por AFM de cristales.

Los cristales de proteína se estudiaron empleando varias funciones de microscopía de fuerza atómica (AFM del inglés *Atomic Force Microscope/Microscopy*). Todas las medidas se realizaron con un microscopio de fuerza atómica *Park NX20* (Park Systems) operando a 25 °C y a presión

atmosférica. Los datos resultantes de cada estudio se procesaron utilizando el programa XEI (Park Systems).

3.15.1. Imágenes topográficas.

Se tomaron imágenes de AFM de la superficie de los cristales de las que se analizó el aspecto y la rugosidad. Para obtener las imágenes se escaneó una superficie de $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ con una sonda ACTA (frecuencia de resonancia 300 kHz y constante de fuerza (K) $40\ \text{N}\cdot\text{m}^{-1}$).

3.15.2. Propiedades nanomecánicas.

Se obtuvieron los valores de módulo elástico de CLLCs mediante el modo PinPoint™ del equipo. Brevemente, este método consiste en medir la fuerza que sufre la punta de la sonda de AFM cuando ésta se aproxima y se aleja de la superficie de la muestra. De este modo, se obtienen curvas de fuerza en función de la distancia (curvas F-d) (Figura 4). De la pendiente de la zona lineal de la curva F-d se obtiene el módulo elástico (módulo de Young) de la superficie de la muestra.

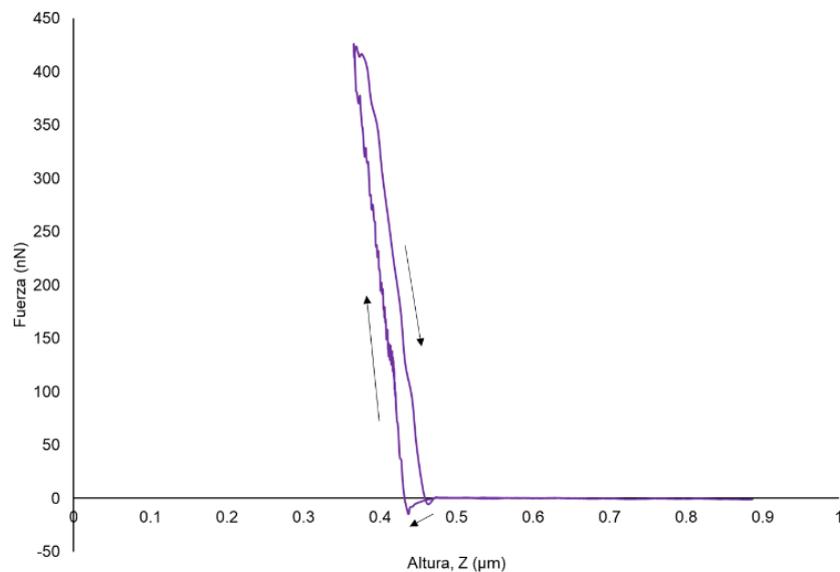


Figura 4. Ejemplo F-d. Las flechas indican el sentido de la aproximación y retracción de la punta del AFM.

Para la realización de las medidas se empleó una sonda NSC-14 (frecuencia de resonancia 166.76 KHz y $K = 5.0\ \text{N}\cdot\text{m}^{-1}$). Todas las medidas de propiedades nanomecánicas se realizaron con la misma sonda.

3.15.3. Medidas de conductividad.

Las medidas de conductividad por AFM (c-AFM) a través de cristales de lisozima se realizaron empleando una sonda CONSTPt (longitud $225\ \mu\text{m}$, frecuencia de resonancia 25 kHz y $K = 0.2$

$\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$). Para la realización de las medidas se aplicó una gota de pasta de plata para unir una esquina del cristal con la superficie conductora (Figura 1). La corriente se midió en modo I-AFM (con amplificador de corriente de ganancia de variable interna), usando un preamplificador con una ganancia de 10^9 a 10^{11} V/A. Las imágenes de conductividad se registraron a varios potenciales positivos y negativos comprendidos entre -10 y +10 V.

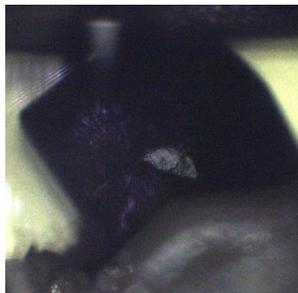


Figura 1. Fotografía realizada con el microscopio óptico del equipo de AFM en la que se puede observar un CLLC formado en un hidrogel híbrido HH-500 (CLLC_HH-500) unido a una superficie conductora con pasta de plata aplicada en una esquina del cristal.

3.16. Imágenes SEM de cristales.

Se registraron imágenes microscopía electrónica de barrido (SEM del inglés *Scanning Electron Microscope/Microscopy*) tanto de CLLCs enteros como de CLLCs cortados con un escalpelo en la dirección del eje X. Las muestras se prepararon pegando los cristales a una superficie adhesiva y recubriéndolos con una capa fina de carbono. El equipo empleado para registrar las imágenes fue un microscopio de barrido de emisión de campo (FESEM del inglés *Field Emission Scanning Electron Microscope*) GEMINI, LEO 1500 (Carl Zeiss).

3.17. Estudio de XRD de cristales de proteína con radiación de sincrotrón.

Los cristales de proteína obtenidos en este trabajo fueron caracterizados por XRD empleando radiación de sincrotrón como fuente de radiación. Los datos se recogieron en la línea Xaloc del sincrotrón ALBA (sincrotrón de España en Barcelona).

Para recoger los cristales crecidos en hidrogeles (mirar apartado 3.5), en primer lugar, se sacó el gel de los tubos Eppendorf donde se llevó a cabo la cristalización y se transfirió a una placa Petri de plástico con disolución de agente precipitante. Los cristales seleccionados se transfirieron a una gota limpia de disolución de precipitante con glicerol 20% (v/v) (crio-protector). A

continuación, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron hasta la recolección de datos en sincrotrón. Para la adquisición de datos se mantuvo constante la configuración de los parámetros de medida (Tabla 1). Los datos adquiridos se indexaron e integraron con *XDS*¹³⁹ y se redujeron y escalaron con *Aimless*.¹⁴⁰

Tabla 1. Configuración de parámetros de medida de sincrotrón.

Línea radiación	Xaloc (ALBA)
Distancia (mm)	178.72
Exposición (s)	0.1
Oscilación (°)	0.2

3.18. Análisis por TGA y por DSC de cristales de proteína.

Tanto las medidas de TGA como de calorimetría diferencial de barrido (DSC del inglés *Differential Scanning Calorimetry*) se registraron usando un equipo *TGA/DSC1* (Mettler-Toledo). Para el análisis de TGA se pesaron aproximadamente 5 mg de cristales por muestra y se introdujeron en una celdilla de TGA. Las muestras se calentaron hasta 900 °C a una velocidad constante de calentamiento de 5 °C por minuto en atmósfera normal.

Para llevar a cabo las medidas de DSC se prepararon muestras de aproximadamente 4 mg de cristales, se introdujeron en celdillas de aluminio y se sellaron. El rango de temperatura de los termogramas obtenidos fue desde temperatura ambiente hasta 300 °C con una velocidad constante de calentamiento de 2 °C por minuto.

3.19. Medidas de intensidad-Voltaje en modo de dos electrodos.

Para medir las curvas de Intensidad-Voltaje (*I-V*) de CLLCs con dos electrodos se preparó un dispositivo en configuración de “sándwich” como puede verse en la Figura 5. El cristal de proteína objeto de la medida se adhirió a una oblea de silicio (electrodo inferior) utilizando resina epoxi de plata. Se colocó otro electrodo encima del cristal adherido también con resina epoxi de plata (electrodo superior) con la precaución de no provocar un contacto entre las pastas de plata de los electrodos inferior y superior. El dispositivo con la muestra se introdujo en una cámara de vacío para eliminar los efectos de la humedad sobre las medidas y se realizaron las medidas de *I-V*. Los valores de conductancia (*G*) se obtuvieron de las pendientes de las curvas *I-V* ($G = I/V$).

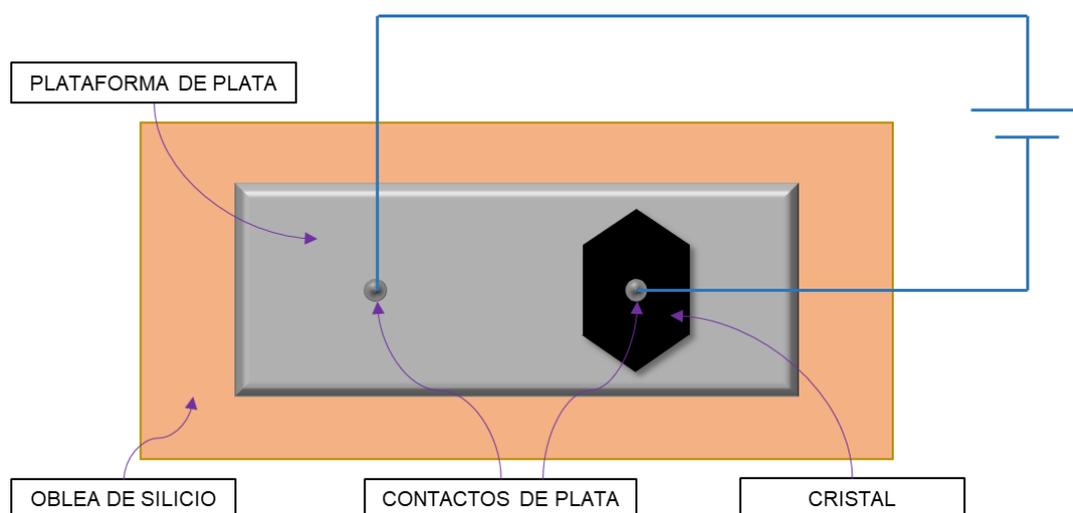


Figura 5. Esquema de la vista desde arriba del dispositivo en configuración “sándwich” para medidas de $I-V$ en CLLCs.

4. Discusión y resultados.

4.1. Preparación de hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT.

En relación a los objetivos planteados, se realizaron experimentos para intentar formar suspensiones de SWCNTs en disoluciones básicas del gelador supramolecular FmocFF. En una primera aproximación se pudo observar que los nanotubos de carbono no se disgregaban fácilmente aplicando ultrasonidos. Algo lógico teniendo en cuenta que, a diferencia de los SWCNTs modificados con grupos carboxilo, los SWCNTs inalterados son materiales altamente hidrófobos. Tras un largo proceso de optimización de condiciones se llegó a la conclusión de que para conseguir la disgregación de los aglomerados de SWCNTs era necesario aplicar ultrasonidos de alta intensidad (40 kHz) durante largos periodos de tiempo (de 1 a 2 horas). También se observó que era necesario mantener frío el baño en todo momento porque de lo contrario, se formaban suspensiones viscosas que impedían la penetración de los ultrasonidos y por tanto la disgregación de los aglomerados. Finalmente, al aplicar las condiciones anteriores se pudieron conseguir suspensiones homogéneas de agregados de SWCNTs junto con un componente insoluble (atribuido a las impurezas que indica la fuente comercial) que pudo retirarse fácilmente por centrifugación. Las distintas etapas de la preparación de las suspensiones de SWCNTs pueden verse más claramente en la Figura 6.

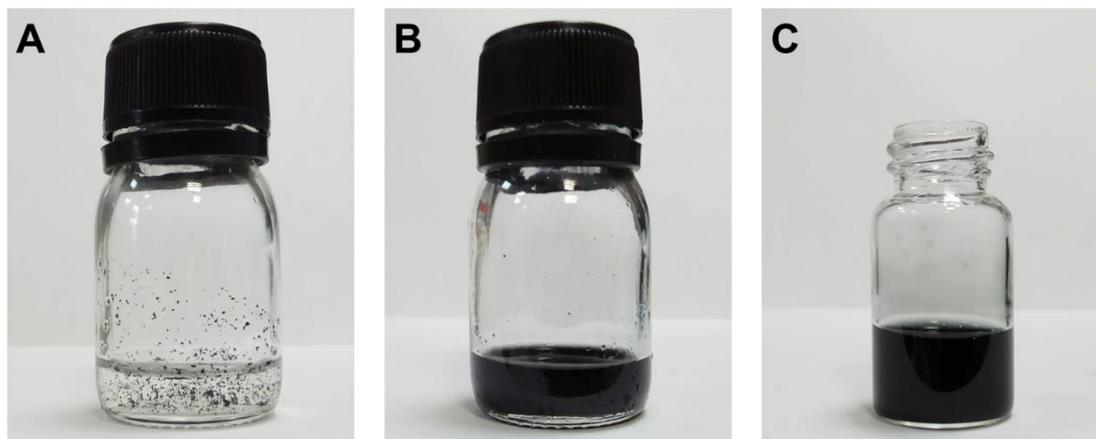


Figura 6. Fotografías de las etapas de preparación de la suspensión homogénea de SWCNTs en una disolución básica de FmocFF. A) suspensión de SWCNTs antes de aplicar ultrasonidos. B) Suspensión después de aplicar ultrasonidos durante 2 horas en un baño frío. C) Suspensión después de centrifugar.

Una vez se obtuvo una suspensión homogénea de SWCNTs se indujo la gelificación de FmocFF acidificando el medio progresivamente con la adición de GdL. De este modo, se consiguieron obtener hidrogeles con distintas concentraciones ($100, 250$ y $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de SWCNTs dispersos homogéneamente en el hidrogel, dando lugar a los hidrogeles híbridos HH-100, HH-250 y HH-500 respectivamente (Figura 7).



Figura 7. Fotografías de los hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT. De izquierda a derecha: hidrogel FmocFF-control, HH-100, HH-250 y HH-500.

4.2. Cálculo de la concentración real de SWCNTs en hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT.

Para determinar la cantidad de SWCNTs en las suspensiones con las que se prepararon los hidrogeles híbridos, se prepararon varias muestras de disolución madre de SWCNTs (ver Materiales y Métodos, apartado 3.3), así como de la disolución básica de FmocFF 0.5% (p/v) como disolución control. Las muestras se introdujeron en porciones de 2 mL en viales cuidadosamente tarados donde se liofilizaron para posteriormente analizarlas por TGA. Es

conocido que la temperatura de descomposición de FmocFF está entre 220 y 300 °C¹⁹⁰ y que la descomposición de los SWCNTs empleados comienza a 440 °C (tal como indica la casa comercial.¹⁹¹ En este sentido, con las medidas de TGA a 440 °C se obtuvo el porcentaje de pérdida de masa que correspondía exclusivamente al péptido, y de esa manera, se pudo determinar indirectamente la masa de los SWCNTs como porcentaje de masa remanente. Se comprobó que se producía una diferencia porcentual de pérdida de masa entre las dos muestras de $8.4 \pm 1.6\%$ (Figura 8). Este valor está en buena relación con el 9.1% esperado teóricamente (el porcentaje de SWCNTs añadidos respecto a la cantidad de FmocFF+SWCNTs total). Tras aplicar el valor de pérdida porcentual de masa, a las masas de residuo seco de cada muestra, se calculó que la concentración real de SWCNTs era de aproximadamente $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en el HH-500 y, por lo tanto, $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $0.08 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en HH-250 y HH-100, respectivamente. Aunque la concentración real de SWCNTs resultó ser distinta de la hipotética, se mantuvo la notación original de los HHs que estaba en relación con la concentración de SWCNTs añadidos.

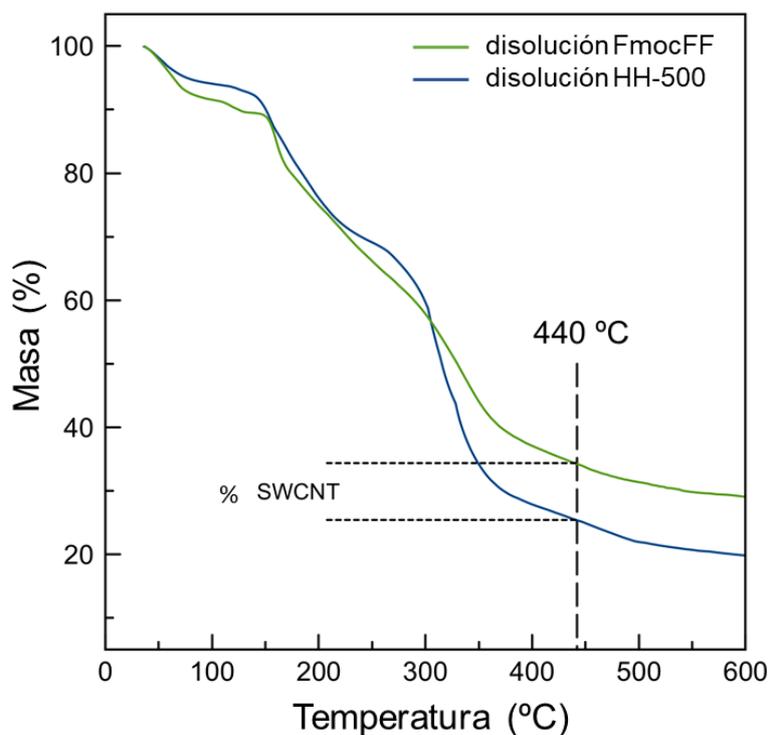


Figura 8. Termogramas de la descomposición térmica de los liofilizados de la disolución de FmocFF control y de la disolución de HH-500.

4.3. Caracterización morfológica de hidrogeles FmocFF-SWCNT.

4.3.1. TEM.

Se registraron micrografías TEM de todas las muestras de xerogeles híbridos (Figura 9) donde pudieron observarse fibras y cintas peptídicas de 10 a 150 nm de diámetro, idénticas a las del gel FmocFF control⁶⁶ y también agregados de SWCNTs. Con estas observaciones se pudo concluir, *a priori*, que la presencia de SWCNTs no afectaba a la morfología de las fibras peptídicas y que los SWCNTs estaban relativamente dispersos y entrecruzados con las fibras peptídicas.

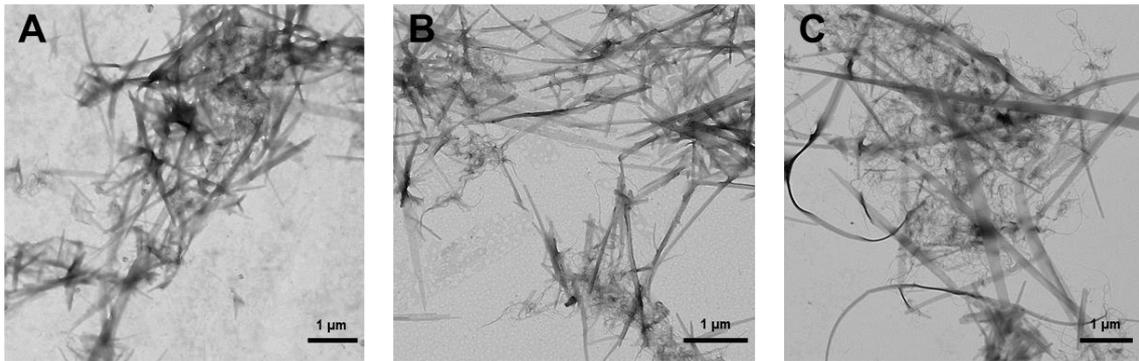


Figura 9. Micrografías TEM de los hidrogeles híbridos: A) HH-100; B) HH-250; C) HH-500.

4.3.2. ESEM.

Para completar el estudio morfológico, el hidrogel control y los HHs se observaron por ESEM con la intención de comprobar cómo afecta la presencia de los SWCNTs a la estructura tridimensional en estado gel. Con estas imágenes se evidenció que no había alteraciones en la morfología ni en las dimensiones de las fibras y cintas correspondientes al péptido (Figura 10). Sin embargo, en las imágenes de HH-500, se pudieron distinguir filamentos largos actuando de conexión entre las láminas del péptido. Estos filamentos pueden deberse a agregados formados por SWCNTs recubiertos de péptido. Resultados similares han sido observados para otro tipo de agregados SWCNT-polímero.¹⁹²

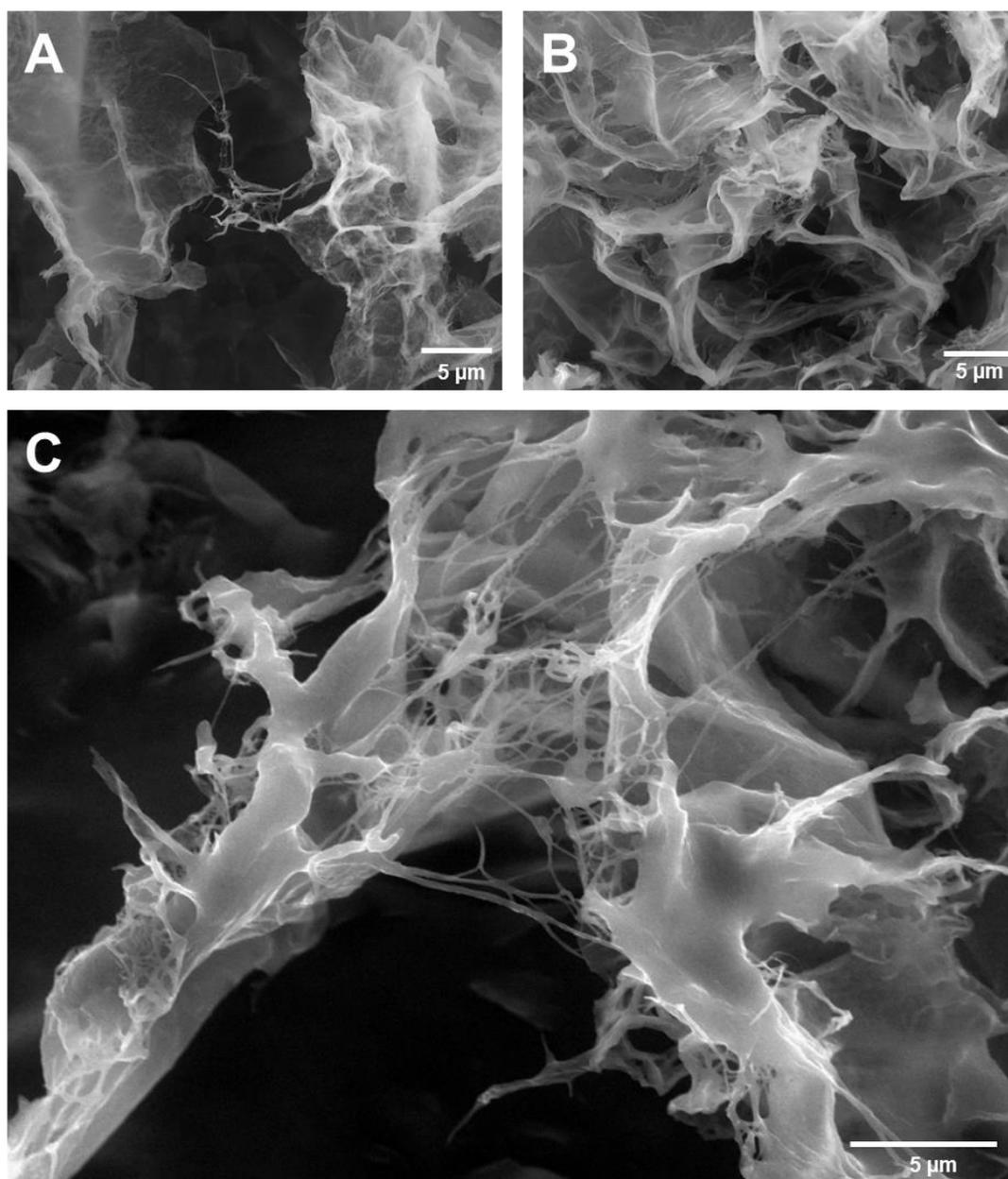


Figura 10. Imágenes ESEM de hidrogeles híbridos: A) HH-100; B) HH-250; C) HH-500.

4.4. Estudio de la estructura secundaria de hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT.

4.4.1. FTIR.

Se empleó espectroscopía FTIR para estudiar el posible efecto de la presencia de SWCNTs en la estructura secundaria del péptido en los HHs (Figura 11). Los espectros de los hidrogeles con SWCNTs (HH-100, HH-250 y HH-500) mostraron un patrón de picos idéntico al del gel de FmocFF control. La aparición de las bandas amida I y amida II (a 1638 y 1536 cm^{-1} respectivamente), junto con una banda a 1690 cm^{-1} , indicaban que el péptido estaba ordenado

preferentemente en conformación de lámina β antiparalela. También se observó un desplazamiento al rojo de la banda amida I en los geles respecto a los correspondientes xerogeles (1655 cm^{-1}). Este desplazamiento indica la presencia de enlaces de hidrógeno en los hidrogeles.^{92,93} Estos resultados indicaban que la estructura secundaria del péptido no sufría grandes alteraciones en presencia de los SWCNTs.

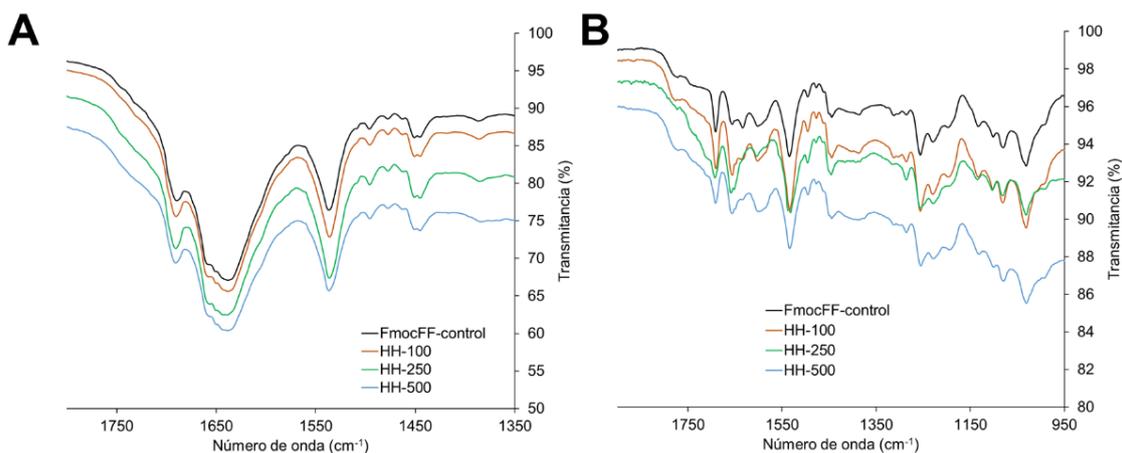


Figura 11. Espectros FTIR de: A) hidrogeles; B) xerogeles.

4.4.2. XRD en polvo.

Los patrones de difracción del xerogel control, mostraron un espaciado $d = 4.8\text{ \AA}$ (el típico para estas estructuras está entre 4 y 5 \AA) correspondiente con un ángulo $2\theta = 18.79^\circ$, y un apilamiento periódico de fibras individuales ($2 < n < 6$). Estos resultados son similares a los obtenidos para este tipo de geles⁵⁰ y similares a los obtenidos para otros péptidos sintetizados con anterioridad (Capítulo 1, apartado 4.3.3). Este mismo patrón de XRD se obtuvo para el xerogel de HH-100. Sin embargo, estas reflexiones fueron muy débiles en los patrones de HH-250 o totalmente indistinguibles en HH-500, lo que sugiere la pérdida gradual de la estructura supramolecular a medida que se incrementa la concentración de SWCNTs, debido seguramente a la interacción entre las moléculas de péptido y los SWCNTs. Para corroborar esta hipótesis se obtuvieron los patrones de difracción de los SWCNTs comerciales y de las suspensiones de FmocFF+SWCNTs correspondientes a los geles HH-100 y HH-500 (Figura 12B). Se pudo observar que los picos de los SWCNTs aparecían a ángulos 2θ de 15.80° y 24.80° , y que, por lo tanto, no coincidían con los picos de los HHs ni de sus disoluciones. De esta forma se pudo confirmar que la pérdida de intensidad de las reflexiones no estaba causada por una dispersión de la radiación provocada por los SWCNTs.

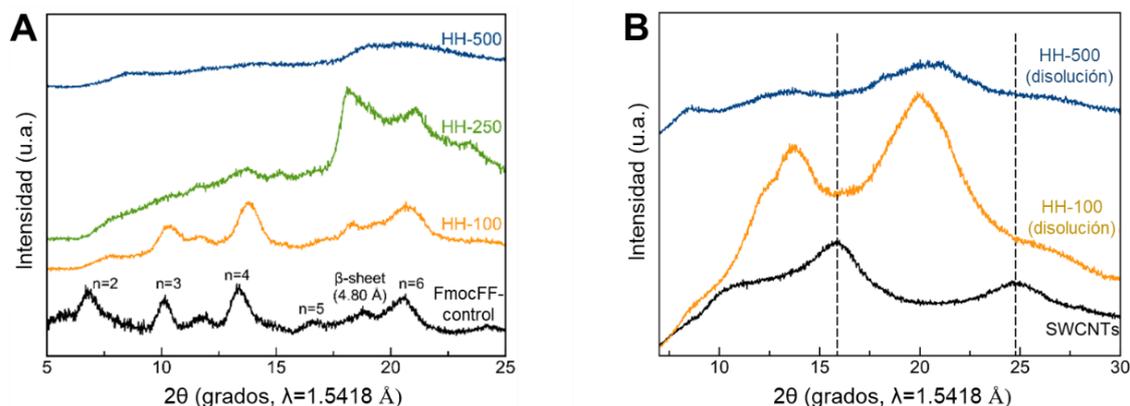


Figura 12. A) Patrones XRD de xerogeles. B) Patrones XRD de SWCNTs comerciales y disoluciones de FmocFF+SWCNTs.

4.4.3. Estudio por microscopía Raman.

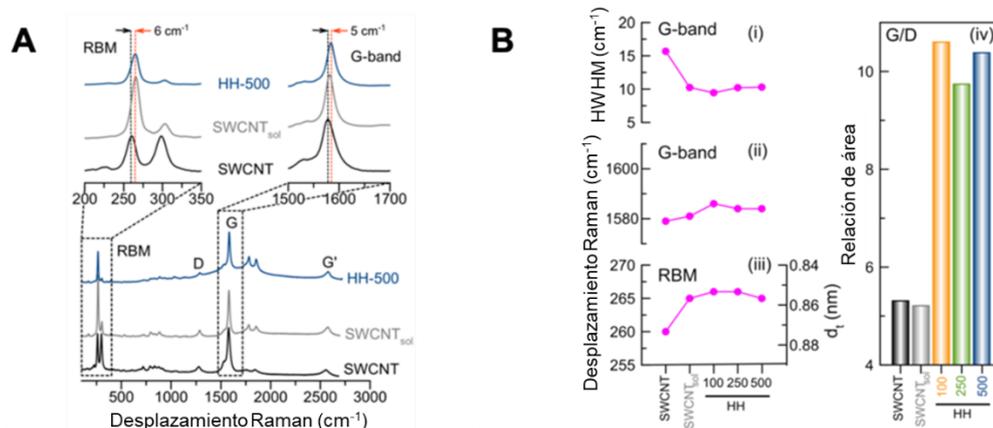


Figura 13. A) Espectros Raman de SWCNTs comerciales (negro), disolución básica de SWCNTs o SWCNT-sol (gris) y HH-500 (azul). B) Desplazamientos Raman RBMs, HWHM y relación de área G/D de SWCNTs comerciales (negro), SWCNT-sol (gris) y HH-500 (azul).

La interacción entre el péptido FmocFF y los SWCNTs se estudió también mediante microscopía Raman. Como puede verse en la Figura 13, al analizar una muestra de la suspensión básica de SWCNTs antes de la gelificación, en comparación con los SWCNTs comerciales, se observó un desplazamiento de la banda G^+ de 1579 cm^{-1} a 1582 cm^{-1} en la suspensión de nanotubos con gelador. El desplazamiento observado de esta banda hacia mayor número de onda fue aún más notable en el caso de HH-500 (desplazamiento de 5 cm^{-1}). La banda G^+ está relacionada con las vibraciones de los átomos de carbono a lo largo del eje del nanotubo y su posición es sensible a fenómenos de transferencia de carga de posibles dopantes, de modo que, un desplazamiento a mayor o menor número de onda se relaciona con la interacción con dopantes aceptores o donores, respectivamente. Este hallazgo en el desplazamiento de la banda G^+ sugiere que existía una

transferencia de electrones desde los SWCNTs a los péptidos, o lo que es lo mismo, que los péptidos estaban actuando como dopantes que retiraban carga de los nanotubos creando “huecos de carga” (p), convirtiendo a los SWCNTs en semiconductores p -dopados.

Unas bandas características de los espectros Raman de los SWCNTs son los Modos de Respiración Radial (RBMs del inglés *Radial Breathing Modes*). Estos modos dan información acerca del diámetro de los nanotubos de carbono. En un análisis de las RBMs correspondientes a los SWCNTs comerciales, se encontraron dos bandas principales a $\omega_{RBM} = 260$ y 298 cm^{-1} correspondientes a diámetros promedio (d_t) de 0.76 y 0.87 nm, respectivamente, siendo $d_t = 234 / (\omega_{RBM} + 10)$.¹⁹³ Tras la adición de FmocFF se observó una modificación drástica en la intensidad relativa de estas bandas: la banda $\omega_{RBM} = 260 \text{ cm}^{-1}$ se mantuvo, mientras que la banda $\omega_{RBM} = 298 \text{ cm}^{-1}$ desapareció prácticamente. Este suceso implica que el FmocFF provocaba una separación de SWCNTs por selección de diámetro de 0.76 frente a 0.87 nm. La pureza de los SWCNTs también se puede evaluar atendiendo a la intensidad de la banda D (relacionada con la presencia de defectos en las paredes de los nanotubos) y más concretamente de la relación de intensidades de las bandas G⁺ y D (G/D). Cuanto mayor sea la relación G/D, menor será el número de defectos estructurales de los SWCNTs. Otro parámetro útil para evaluar la pureza de los SWCNTs es la “mitad de anchura a media altura” o HWHM (del inglés *Half-Width at Half Maximum*). Como puede observarse en la Figura 3B, la hipótesis de la “purificación” se confirmó con el incremento de la relación G/D en los HHs, así como por la disminución del HWHM en presencia de gelador. Por otro lado, la adición de FmocFF también dio lugar a un desplazamiento de los picos a 260 cm^{-1} hacia números de onda mayores, lo que indica una ligera disminución de d_t , debido, probablemente, a una compresión mecánica de los SWCNTs provocada por el hidrogel.

4.5. Estudio reológico de hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT.

Todos los geles empleados en este trabajo fueron analizados reológicamente en régimen oscilatorio (Figura 14A) para determinar el efecto de la inclusión de SWCNTs en los hidrogeles de FmocFF sobre sus propiedades mecánicas. A valores bajos de amplitud de deformación de cizalla, todas las muestras mostraron valores de G' y G'' siendo $G' \gg G''$, lo que se corresponde con el comportamiento típico de un sistema entrecruzado. Al comparar los valores obtenidos de ambos módulos viscoelásticos para las distintas muestras en la zona viscoelástica lineal (ZVL), no se encontraron diferencias entre ellos. Esta observación sugiere que la inclusión de SWCNTs no afectó a las propiedades mecánicas del gel resultante aun cuando tenía una concentración de $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en el HH-500. Similares resultados fueron observados por S. Roy y A. Banerjee para hidrogeles supramoleculares híbridos con concentraciones análogas de SWCNTs modificados.⁶⁸

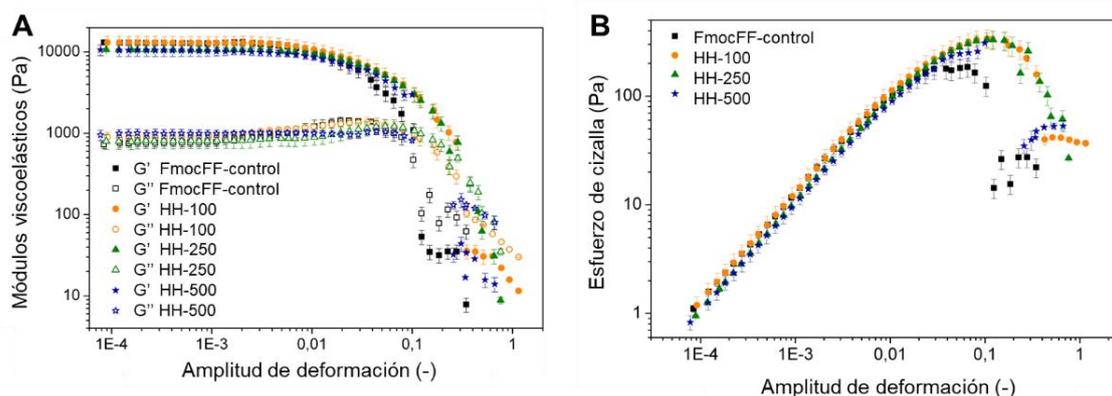


Figura 14. A) Representación gráfica de la variación de los módulos viscoelásticos G' y G'' en función de la amplitud de deformación de cizalla aplicada a los hidrogeles. B) Representación de la variación de la amplitud de la formación de cizalla en función del esfuerzo de cizalla aplicado a los hidrogeles.

Se pudieron observar diferencias entre los hidrogeles cuando se aplicaron amplitudes de deformación grandes (zona viscoelástica no lineal). En esta zona, el esfuerzo de cizalla necesario para provocar una deformación determinada era mayor cuanto mayor era la concentración de SWCNTs (Figura 14B). Este comportamiento ha sido observado anteriormente en gelatinas de metacrilato (GelMa) reforzadas con concentraciones similares de nanotubos de carbono.¹⁹² La explicación de este fenómeno puede ser que los nanotubos de carbono son largos y pueden torsionarse a amplitudes de deformación bajas en la zona viscoelástica lineal, pero cuando se aplica una deformación mayor, los nanotubos oponen resistencia.

4.6. Preparación de cristales de proteína en hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT.

Para abordar el objetivo de cristalizar proteínas en los hidrogeles híbridos FmocFF-SWCNT se decidió optar por emplear lisozima por ser una proteína modelo y que tiene actividad enzimática. Esta propiedad permitiría un posterior estudio del efecto de la incorporación de SWCNTs en las capacidades catalíticas de la proteína.

La metodología empleada para la cristalización consistió en un protocolo de contradifusión de dos capas (ver Materiales y Métodos, apartado 3.5.1). Aplicando este protocolo se consiguieron obtener cristales en todos los hidrogeles híbridos ensayados (HH-100, HH-250 y HH-500) y en el hidrogel FmocFF-control (Figura 15). El éxito en la obtención de los cristales en presencia de SWCNTs resulta sorprendente en principio teniendo en cuenta que, en los precedentes en los que se ha estudiado la interacción entre proteínas y SWCNTs, se ha demostrado que se producen interacciones fuertes entre ellos,^{194,195} lo que induce a pensar que los SWCNTs deberían dificultar

la cristalización. Una justificación podría ser que los nanotubos se encontrasen total o parcialmente recubiertos de péptido en el interior de los hidrogeles limitando así la efectividad de las interacciones proteína-SWCNTs.

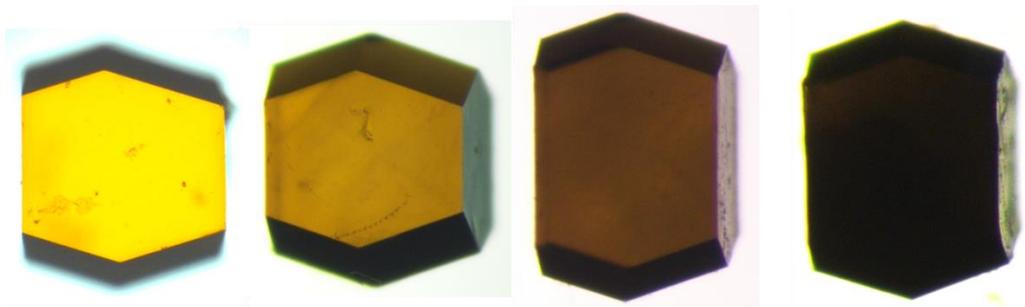


Figura 15. De izquierda a derecha: imágenes tomadas con microscopio óptico de los cristales de lisozima entrecruzados CLLC_control, CLLC_HH-100, CLLC_HH-250 y CLLC_HH-500.

Los cristales de lisozima (LCs) obtenidos en los distintos hidrogeles híbridos presentaban una coloración tanto más oscura cuanto mayor era la concentración de SWCNTs en el hidrogel, siendo prácticamente negros en el caso de los cristales crecidos en HH-500 (Figura 15). Al observar los cristales obtenidos a través de un microscopio óptico, se pudo comprobar que los cristales presentaban morfología prismática tetragonal y que estaban dentro de un rango amplio de tamaños y de relación de forma (relación entre los ejes ancho y largo de una imagen en microscopio). Estas observaciones son de esperar en experimentos de contradifusión (ver Capítulo 2, apartado 4.3). El patrón observado fue el mismo para todas las muestras independientemente de la concentración de SWCNTs. Donde sí se observaron diferencias, fue en el tamaño de los cristales, siendo los más grandes los crecidos en el hidrogel FmocFF-control (de 40 a 90 μm), seguidos de los correspondientes a HH-100 (de 25 a 80 μm) y siendo los más pequeños los obtenidos en los HH-250 y HH-500 (de 25 a 60 μm). Este resultado sugiere que los SWCNTs tuvieron un efecto sobre el crecimiento de los cristales, probablemente debido a una disminución del nivel de sobresaturación causada por la interacción entre las proteínas y los SWCNTs.

El resto de experimentos de caracterización de los cristales se realizaron previo entrecruzamiento de los mismos con glutaraldehído obteniéndose así, los cristales entrecruzados de lisozima (CLLCs) tanto de los cristales crecidos en el hidrogel FmocFF-control (CLLC_control), como en los hidrogeles híbridos HH-100, HH-250 y HH-500, nombrados como CLLC_HH-100, CLLC_HH-250 y CLLC_HH-500, respectivamente.

4.7. Caracterización morfológica de cristales.

4.7.1. SEM.

Las imágenes SEM mostraron que la superficie de todos los cristales era relativamente lisa sin diferencias significativas entre los distintos cristales entrecruzados (Figura 16).

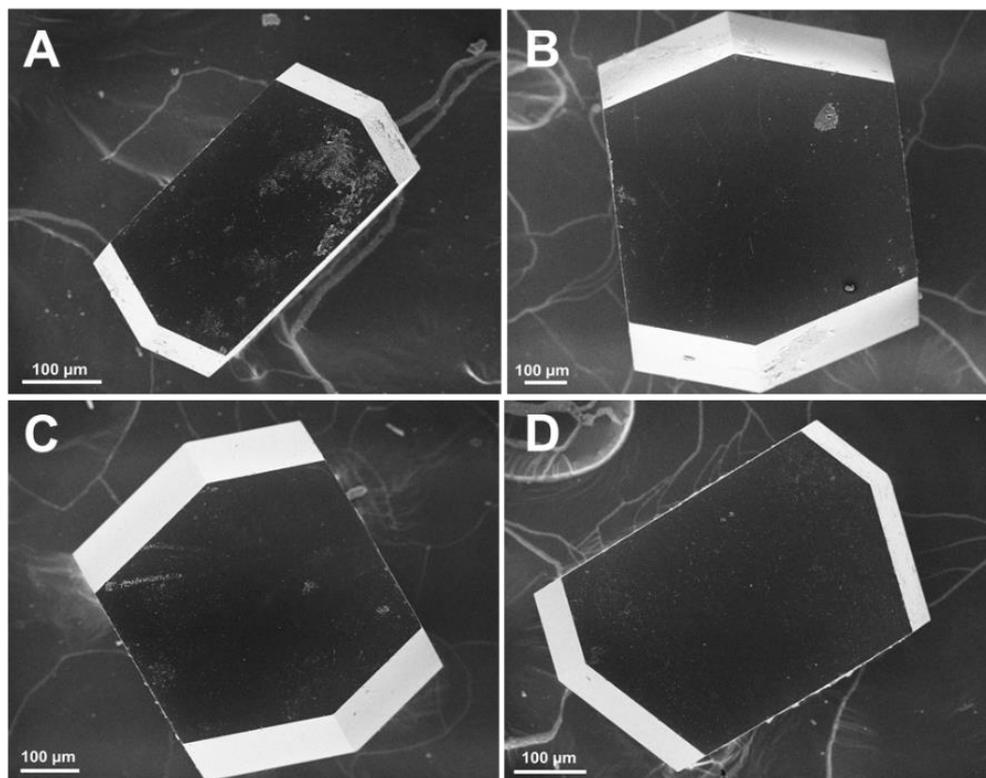


Figura 16. Imágenes SEM de vista general de cristales: A) CLLC_control; B) CLLC_HH-100; C) CLLC_HH-250; D) CLLC_HH-500.

Como se ha indicado anteriormente, los cristales eran tanto más oscuros cuanto mayor era la concentración de SWCNTs en los hidrogeles híbridos en los que se formaron, lo que constituye una primera evidencia de la incorporación de los nanotubos en el interior de los cristales. Para confirmar la presencia de fibras FmocFF-SWCNT en el interior de los cristales, éstos se cortaron a lo largo del eje X y se observaron por SEM en la zona del corte (Figura 17). En los CLLCs_HHs se pudieron distinguir estructuras alargadas que salían del interior de los cristales con una distribución homogénea en toda el área observada. Estos filamentos no se observaron en los CLLCs_control por lo que se consideró que debían ser fibras de FmocFF-SWCNTs.

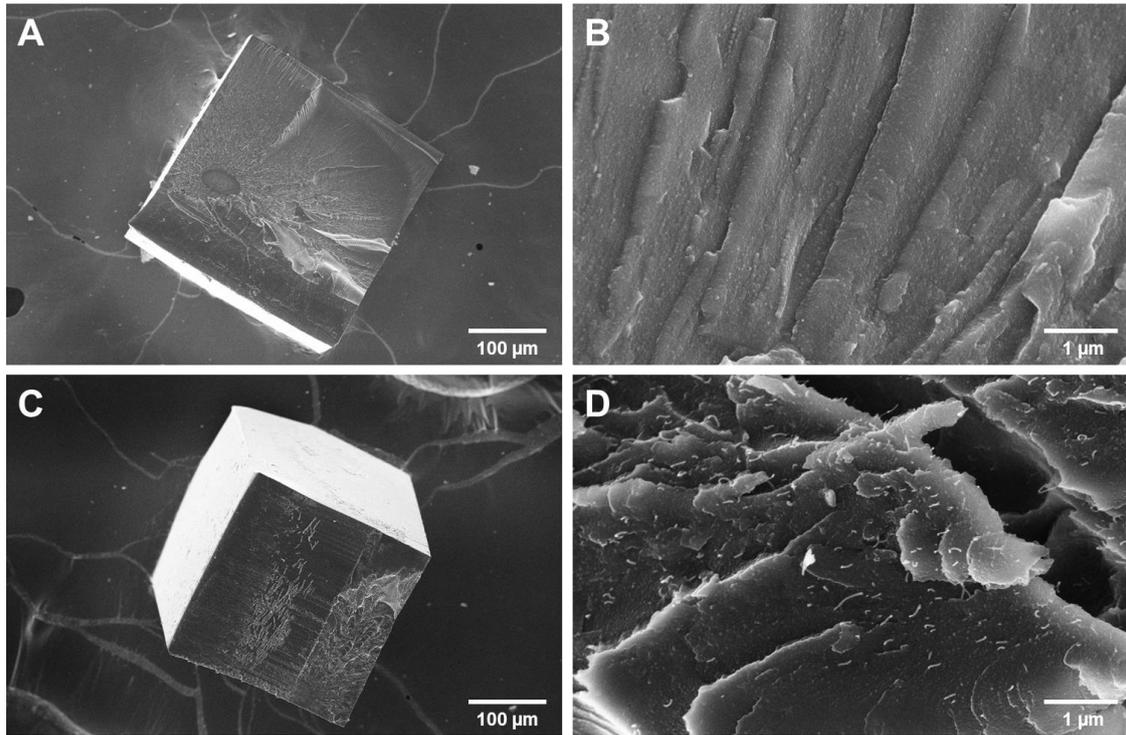


Figura 17. Imágenes SEM de CLLCs cortados por el eje X: A) vista general CLLC_control; B) detalle CLLC_control; C) vista general CLLC_HH-500; D) detalle CLLC_HH-500.

4.7.2. TEM.

Se realizaron imágenes TEM de secciones internas de los CLLC_HHs y se pudieron observar manchas negras circulares de varios nm de diámetro que fueron atribuidos a haces de SWCNTs (Figura 18). Al igual que ocurría en SEM para las fibras en la zona de corte, las manchas observadas por TEM presentaban una distribución homogénea en toda el área observada.

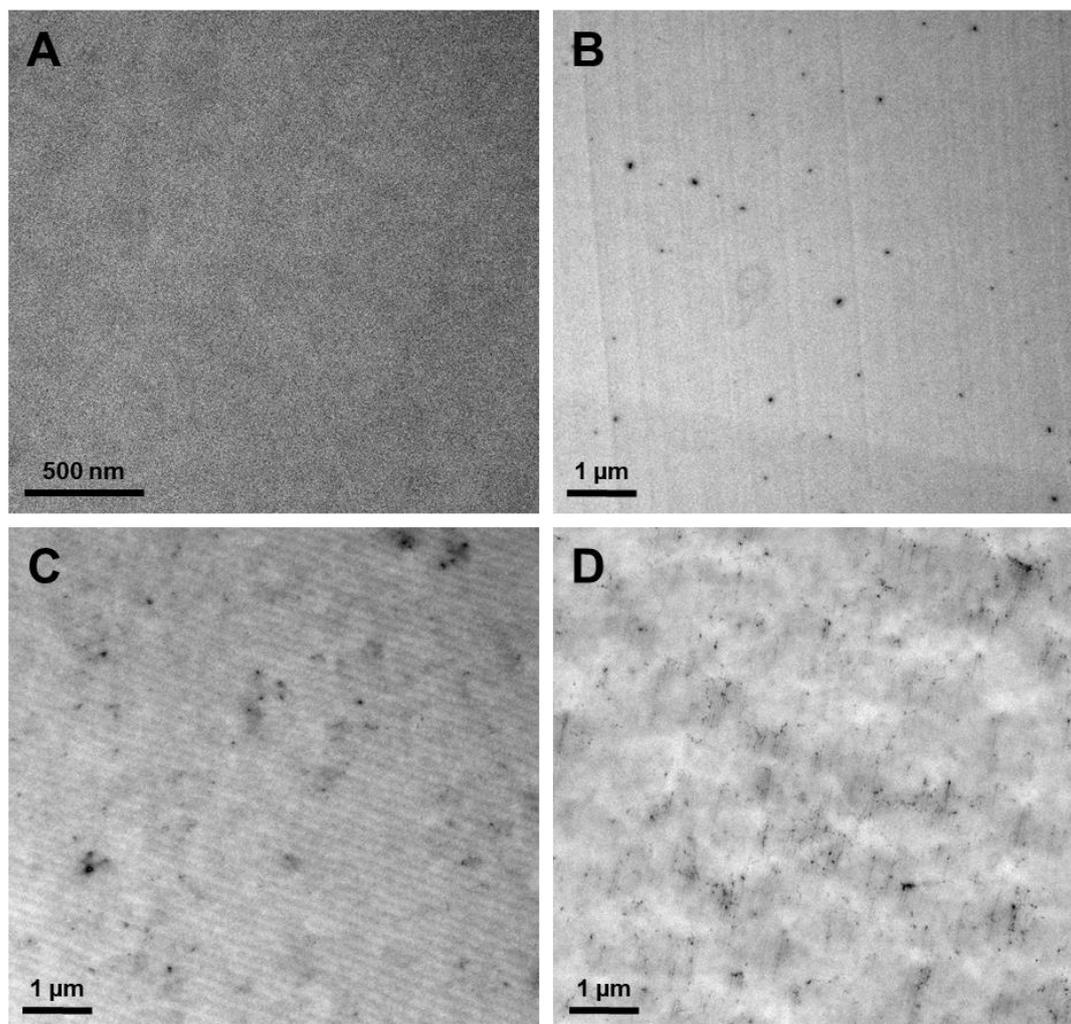


Figura 18. Imágenes TEM de secciones internas de CLLCs: A) CLLC_control; B) CLLC_HH-100; C) CLLC_HH-250; D) CLLC_HH-500.

Con las observaciones de SEM y TEM se pudo concluir que los SWCNTs estaban distribuidos homogéneamente por todo el volumen de los CLLC_HHs en forma de haces de nanotubos.

4.7.3. Análisis topográfico por AFM.

La topografía de los cristales de proteína fue analizada por AFM (Figura 19). El análisis de rugosidad demostró que no había diferencias significativas entre las distintas muestras, siendo el valor de rugosidad (altura promedio de los elementos que están por encima de la superficie plana) en torno a 3.3 nm en todos los casos. Este hecho sugiere que prácticamente la totalidad de los SWCNTs estaban contenidos dentro del cristal de proteína demostrando que la cantidad de SWCNTs que sobresalía de los cristales era insignificante.

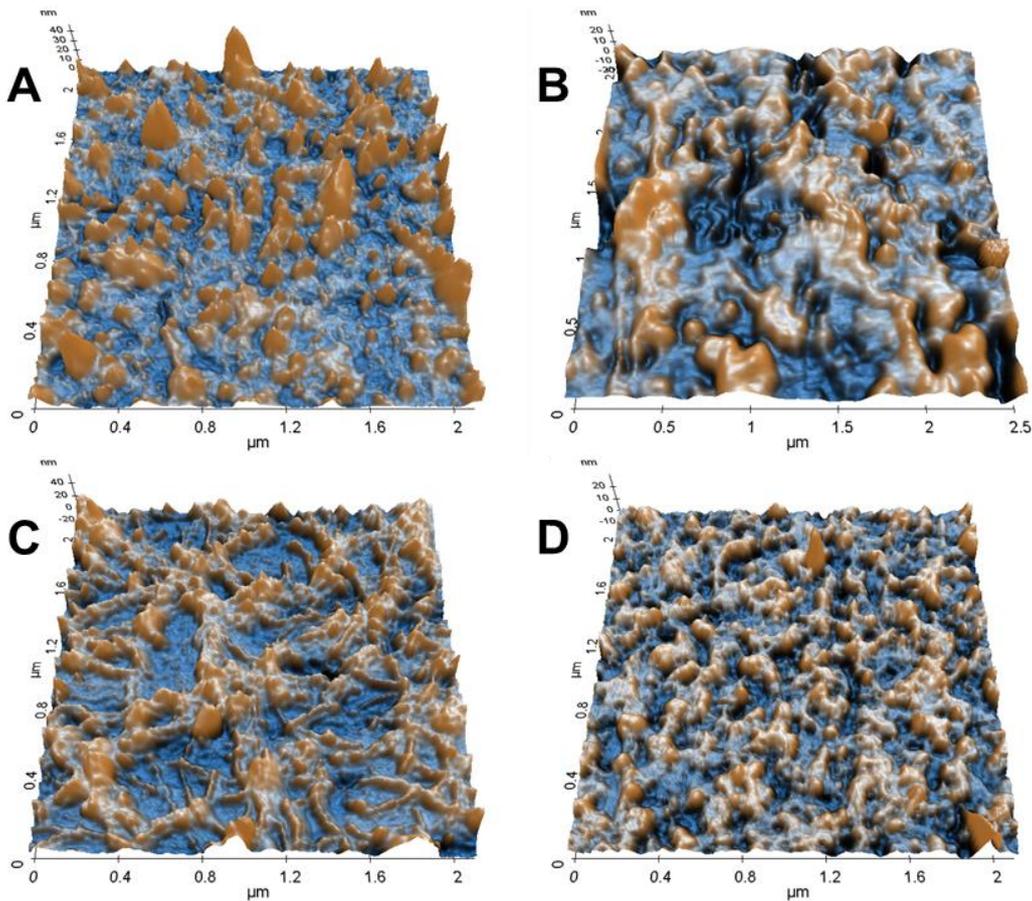


Figura 19. Imágenes topográficas de AFM tomadas de la superficie de los CLLCs: A) CLLC_control; B) CLLC_HH-100; C) CLLC_HH-250; D) CLLC_HH-500.

4.8. Estudio de las interacciones entre proteína y FmocFF-SWCNT en cristales híbridos lisozima-FmocFF-SWCNT.

4.8.1. Estudio por FTIR.

Todos los cristales fueron analizados por FTIR para determinar el efecto de la presencia de los SWCNTs sobre la estructura secundaria de la lisozima (Figura 20). En los espectros de los distintos SWCNT@CLLCs se observaron las bandas amida I (1654 cm^{-1}) y amida II (1535 cm^{-1}) características de las proteínas. No se detectaron desplazamientos en estas bandas con respecto a FmocFF@CLLCs. Este resultado indica que la estructura secundaria de la proteína apenas se vio afectada por la presencia de SWCNTs.

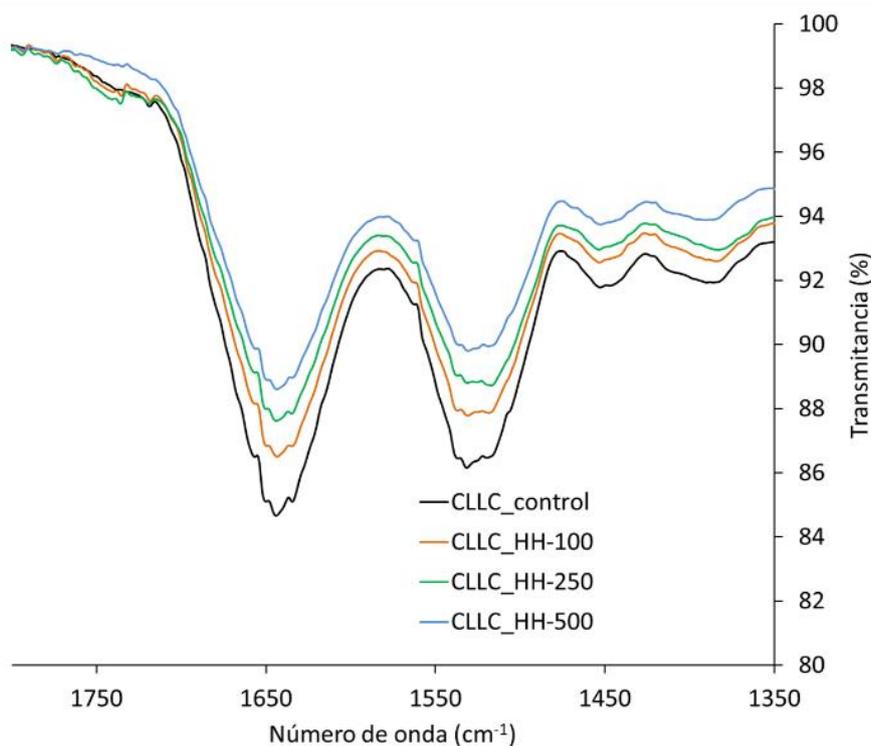


Figura 20. Espectros FTIR de CLLCs.

4.8.2. Estudio por microscopía Raman.

En los espectros Raman de los CLLCs_HHs se observó un desplazamiento hacia números de onda mayores en la banda G^+ correspondientes a los SWCNTs (por encima de 1595 cm^{-1}), en comparación con los hidrogeles FmocFF-SWCNT (Figura 21). Este desplazamiento extra se pudo relacionar con una interacción adicional entre los SWCNTs y los grupos aromáticos o hidrofóbicos de la proteína que actuarían como dopantes aceptores de carga (ver apartado 4.4.3). De estos resultados, se pudo deducir *a priori*, que existía una interacción directa entre los SWCNTs y los grupos aromáticos de FmocFF y de la proteína por separado, y que ambas interacciones provocaron un efecto sinérgico modificando las propiedades eléctricas de los SWCNTs convirtiéndolos en semiconductores *p*-dopados. Tal como se comentó en el apartado 4.6, resulta interesante, que el contacto directo existente entre la lisozima y los SWCNTs no dificulte el proceso de cristalización ni afecte a la calidad de los cristales (como se verá más adelante en el apartado 4.9).

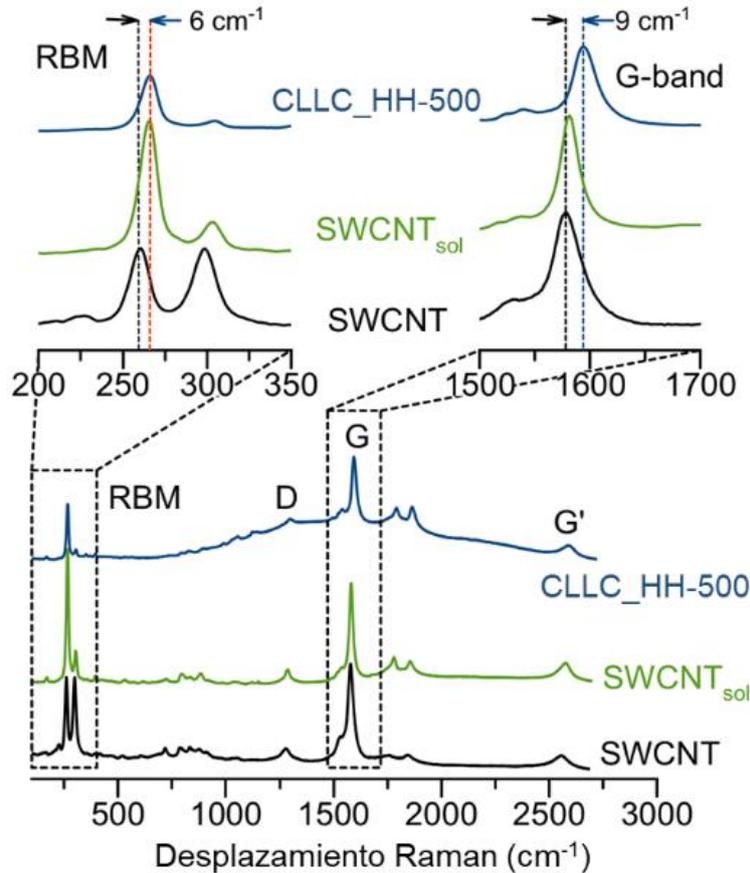


Figura 21. Espectros Raman de SWCNTs comerciales (negro), disolución básica de SWCNTs o SWCNT-sol (gris) y CLLC_HH-500 (azul).

4.9. Estudio cristalográfico de cristales híbridos.

Se realizaron experimentos de difracción de rayos X con radiación de sincrotrón para analizar el efecto de la incorporación de SWCNTs dentro de los cristales de lisozima sobre las propiedades cristalográficas de los cristales no entrecruzados (LCs). En la Tabla 2 se enumeran los valores obtenidos para los parámetros cristalográficos más relevantes.

Tabla 2. Valores de parámetros cristalográficos obtenidos por difracción con radiación de sincrotrón.

CRISTAL	LC_HH-100	LC_HH-250	LC_HH-500
Grupo espacial	P 4 ₃ 2 ₁ 2	P 4 ₃ 2 ₁ 2	P 4 ₃ 2 ₁ 2
Celdilla unidad a=b, c (Å)	78.61, 36.99	78.65, 36.99	78.86, 37.05
Resolución (Å)*	39.28-1.20 (1.22-1.20)	39.30-1.20 (1.22-1.20)	39.43-1.20 (1.22-1.20)
R _{merge} * (%)	6.8 (65.5)	9.5 (70.3)	6.2 (57.0)
I/σ(I)*	20.1 (4.4)	15.2 (4.2)	24.0 (4.8)
B-factor (Å ²)	10.6	9.1	9.6
Mosaicidad (°)	0.47	0.30	0.29

* Los valores entre paréntesis se corresponden con los de la capa de alta resolución.

Siguiendo criterios de calidad estándar, en todos los casos, los cristales difractaron con un límite de resolución muy alto, inferior a 1.2 Å en todos los casos, y presentaron valores de B-factor (factor de movilidad térmica o factor térmico) en el rango de 10 Å², valores comparables a los descritos para los cristales de mejor calidad obtenidos dentro de hidrogeles supramoleculares basados en péptidos.¹²⁵

La mosaicidad fue menor en todos los CLLC_HHs que en los cristales de lisozima control crecidos en FmocFF (CLLC_control).¹²⁵ Teniendo en cuenta que la mosaicidad es un valor relacionado con el orden interno de un cristal, y que la mosaicidad fue tanto menor a medida que aumentaba la concentración de SWCNTs, se puede decir que los cristales con SWCNT tenían mayor orden interno que el cristal control. Esta observación se correlaciona con un ligero incremento de las dimensiones de la celdilla unidad a medida que se aumentó la concentración de SWCNTs, lo que a su vez sugiere la existencia de interacciones entre la lisozima y los SWCNTs, tal como se concluyó de los experimentos de microscopía Raman (apartado 4.8.2). Otra conclusión derivada de estos datos es, que mientras que las fibras peptídicas no afectaron al orden interno del cristal cuando estaban ocluidas en su interior, los SWCNTs sí que tuvieron un efecto, incluso cuando la concentración era baja.

4.10. Estudio de la estabilidad térmica de CLLCs.

Tras someter a los CLLCs a TGA se observaron los cuatro pasos de pérdida de masa (Figura 22A) descritos previamente para cristales de lisozima^{13,16,17} prácticamente idénticos en todos los cristales. La única diferencia observable se pudo encontrar en la velocidad de descomposición térmica entre 400 y 500 °C que fue más rápida a medida que se incrementaba la concentración de SWCNTs. Este hecho tiene sentido debido a que esa es la temperatura en la que comienza la descomposición térmica de los SWCNTs.¹⁹¹

Se empleó DSC (Figura 22B) para determinar la temperatura de desnaturalización de la lisozima en todos los tipos de cristales, y no se observó una influencia clara de la concentración de SWCNTs. Sin embargo, sí se pudo comprobar que la temperatura de desnaturalización fue en torno a 208 °C en los CLLCs, una temperatura de desnaturalización muy superior a la de la lisozima en disolución (60 °C).

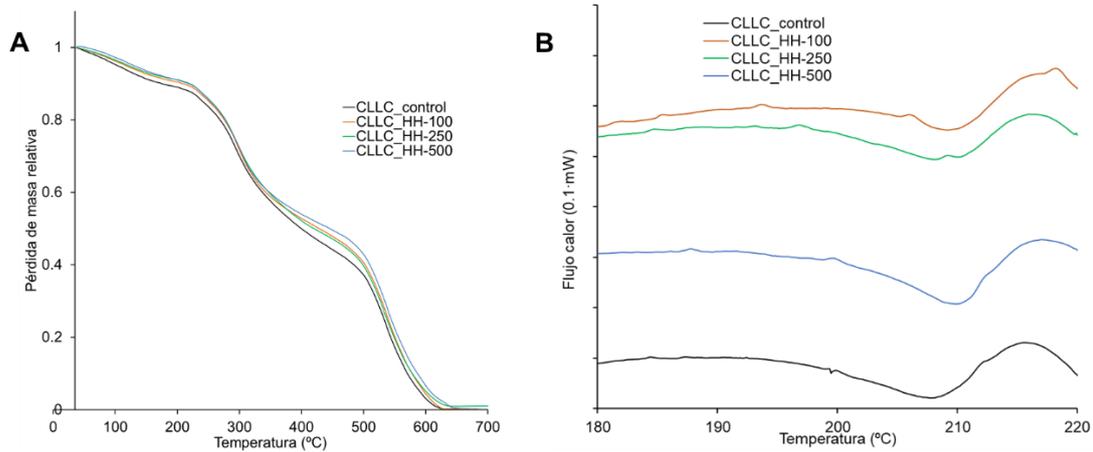


Figura 22. Análisis térmicos de CLLCs: A) TGA; B) DSC.

4.11. Estudio de las propiedades mecánicas de CLLCs.

Una vez se demostró la inclusión efectiva de los SWCNTs dentro de los cristales de lisozima y la existencia de una posible interacción entre ellos, se planteó la posibilidad de que la inclusión de nanotubos diese lugar a una modificación en las propiedades mecánicas de los cristales. Para tratar de resolver esta cuestión se analizó la dureza de la superficie de los cristales mediante AFM en modo PinPoint™. Con esta técnica se pueden obtener valores del módulo de Young (módulo elástico) de la superficie que se escanea con la punta del AFM. Los valores obtenidos con esta técnica no pueden considerarse como cuantitativos sin un material de referencia. En caso de usarse la misma punta para estudiar todas las muestras, los valores de módulo de Young pueden considerarse como relativos entre ellos.

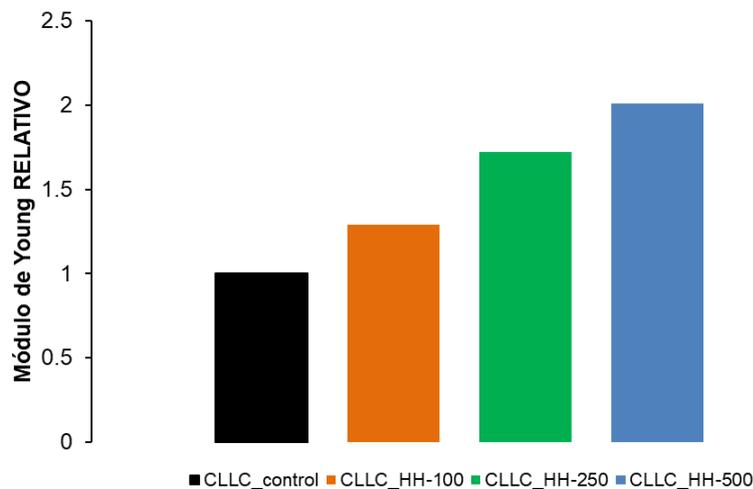


Figura 23. Representación del módulo de Young relativos de los CLLCs obtenidos en función de la concentración de SWCNTs medidos por AFM en modo PinPoint™.

Al analizar la superficie de los cristales con la misma punta de AFM se obtuvieron los valores de módulo de Young representados en la Figura 23 en una escala relativa. Considerando el módulo de Young como un valor relacionado con la dureza de un material, se encontró que los CLLCs eran tanto más duros conforme aumentaba la concentración de SWCNTs, siendo el cristal CLLC_HH-500 el doble de duro que el cristal control (CLLC_control). Este resultado sugiere la existencia de una interacción entre los SWCNTs con las moléculas de proteína y no solo con las fibras de péptido, tal como se observó previamente por espectroscopía Raman y por el análisis cristalográfico (apartados 4.8.2 y 4.9 respectivamente). Se puede intuir que los SWCNTs estaban actuando como agentes de entrecruzamiento entre la proteína y el hidrogel, provocando así una interacción sinérgica que se tradujo en un aumento en la dureza de los cristales.

4.12. Estudio de la capacidad catalítica de CLLCs.

Es conocido que los cristales entrecruzados de enzimas (CLECs del inglés *Cross-Linked Enzyme Crystals*) son capaces de retener su actividad enzimática mejorando considerablemente la estabilidad de los enzimas, abriendo así la posibilidad de emplearlos en condiciones más drásticas y a escala industrial.¹⁹⁶ En este sentido se decidió evaluar la actividad catalítica de estos cristales con el fin de determinar la influencia de los SWCNTs en la misma.

Para alcanzar el objetivo planteado, se siguió el procedimiento descrito en el apartado 3.6 de Materiales y Métodos, consistente en la medida de la evolución de la fluorescencia en la degradación de **4-MU-GlcNAc3** (sustrato) a **4-MU** (producto) (Figura 3). Este procedimiento se basa en que el sustrato no es fluorescente mientras que el producto de hidrólisis sí lo es, de este modo se puede determinar la actividad catalítica midiendo la fluorescencia emitida por el producto de degradación enzimática (tomando como referencia la autodegradación del sustrato).

Siguiendo el protocolo mencionado, se analizó la actividad catalítica de cristales entrecruzados de lisozima crecidos por difusión de vapor (CLLC_VD), los CLLC_control y los CLLC_HHs, a 42 °C, tal como se indica en el protocolo estándar. Como resultado de este experimento se concluyó que todos los cristales entrecruzados mantenían la actividad catalítica y que además esta era similar en todos los casos como puede observarse en la Figura 24 (color azul).

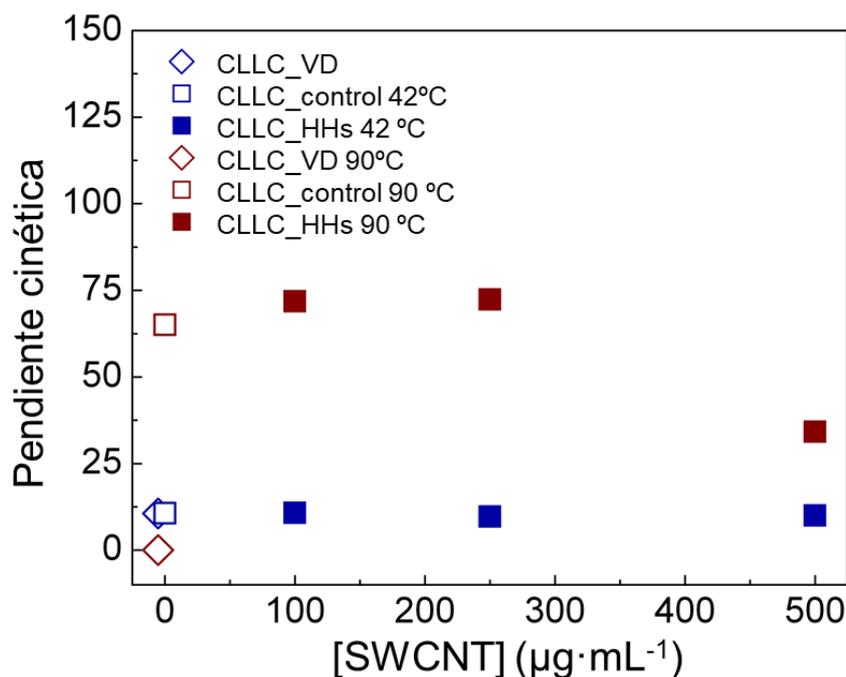


Figura 24. Representación de la actividad catalítica a 42 °C (azul) y 92 °C (granate) en CLLC_VD (rombos), CLLC_control (cuadrados huecos) y CLLC_HHs (cuadrados sólidos).

Tras comprobar el mantenimiento de la actividad enzimática a 42 °C y después de haber comprobado que la temperatura de desnaturalización de los cristales entrecruzados estaba en torno a 208 °C (medido por DSC, ver apartado 4.10), se decidió analizar la actividad catalítica a 90 °C ya que es la temperatura más alta que permiten los experimentos en disolución acuosa a 1 atm. El resultado obtenido fue sorprendente ya que mientras que la actividad de la lisozima en disolución y de los CLLC_VD era inexistente a 90 °C (tal como era de esperar porque la lisozima se desnaturaliza a 60 °C), los CLLC_control y los CLLC_HHs no solo mostraron actividad a 90 °C, si no que se incrementó respecto a la observada a 42 °C. Este comportamiento solo se puede explicar por un incremento drástico de la estabilidad funcional mantenida por la naturaleza compuesta del material ya que hasta donde se conoce, esta es la primera vez que se observan CLLCs catalíticamente activos a temperaturas tan elevadas y a diferencia de los reportados hasta la fecha, los cristales que aquí se describen tienen naturaleza híbrida.

4.13. Medida de propiedades eléctricas de CLLCs.

Como se ha ido comentando a lo largo de la presente tesis doctoral, el diseño de un material híbrido o compuesto, tiene como objetivo la obtención de un material nuevo con propiedades nuevas o mejoradas resultado de la interacción entre materiales. Hasta este punto, combinar cristales de proteína (lisozima) con hidrogeles FmocFF-SWCNT, ha dado lugar a la obtención de cristales híbridos más duros y con actividad catalítica a temperatura más alta de la observada para

cristales no compuestos. Por último, y teniendo en cuenta las excelentes propiedades conductoras de la electricidad de los SWCNTs, se decidió evaluar la capacidad conductora de estos cristales híbridos. En este sentido se registraron las curvas de intensidad-voltaje (I - V) para los distintos CLLCs a temperatura ambiente y a vacío en configuración de “sándwich” (ver Materiales y Métodos, apartado 3.19). Mientras que no se observó paso de corriente en el cristal control (CLLC_control) ni en los CLLC_HH-100, sí que se observó una conducción de 0.5 nS en los CLLC_HH-250 y una conductividad por encima de los 600 nS en los CLLC_HH-500 (Figura 25). La primera conclusión derivada de estos resultados fue que efectivamente, los SWCNTs dotaban de conductividad eléctrica a los CLLC_HHs.

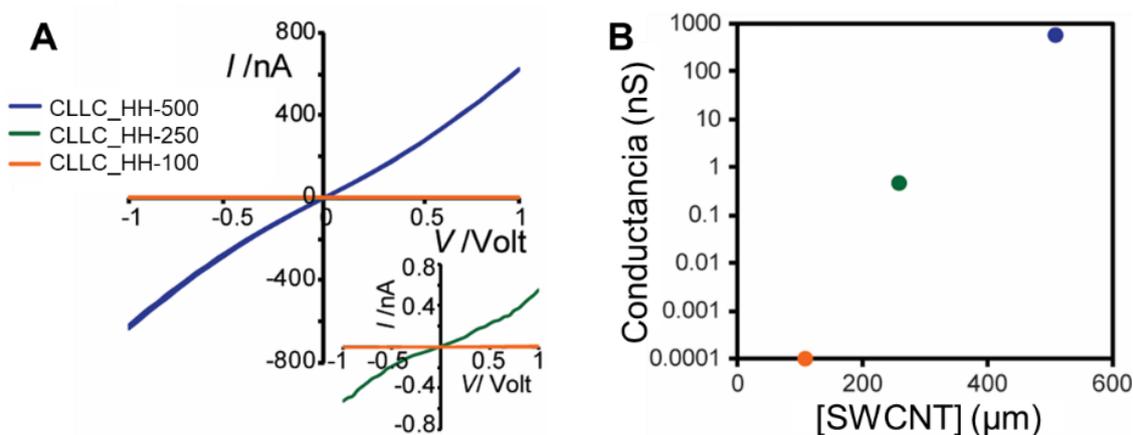


Figura 25. A) Representación gráfica de las curvas I - V medias para los CLLC_HHs en configuración de “sándwich”. B) Valores de conductancia de los CLLC_HHs obtenidos de las pendientes de las curvas I - V .

El incremento notable (de hasta dos órdenes de magnitud) de la conductividad entre CLLC_HH-250 y CLLC_HH-500 indicó que el umbral de percolación de conductividad (la concentración mínima de SWCNTs a partir de la cual se forma una conectividad necesaria para que ocurra la conducción a través del cristal) debía estar en torno a una concentración de nanotubos por debajo de $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, es decir, por debajo de 0.02% en peso. Este valor está muy por debajo del umbral de percolación encontrado comúnmente en materiales compuestos polímero-CNT.¹⁵¹ Merece la pena destacar que la conductividad observada en CLLC_HH-500 fue mucho mayor que la encontrada para CLLCs cargados con polipirrol.¹⁸⁷

Para confirmar las observaciones obtenidas con las curvas de I - V , se realizaron mapeos de la conducción de corriente a través de los CLLC_HHs por AFM de conducción (c-AFM) (Figura 26). Con estas medidas se pudo comprobar que en la superficie de los cristales conductores había puntos de alta conductividad distribuidos por una superficie no conductora. Estos “puntos conductores” no se observaron en los CLLC_control ni en los CLLC_HH-100. Los resultados de

c-AFM confirmaron que la conducción eléctrica ocurría a través de canales de conducción compuestos por SWCNTs que atravesaban totalmente los cristales de lisozima.

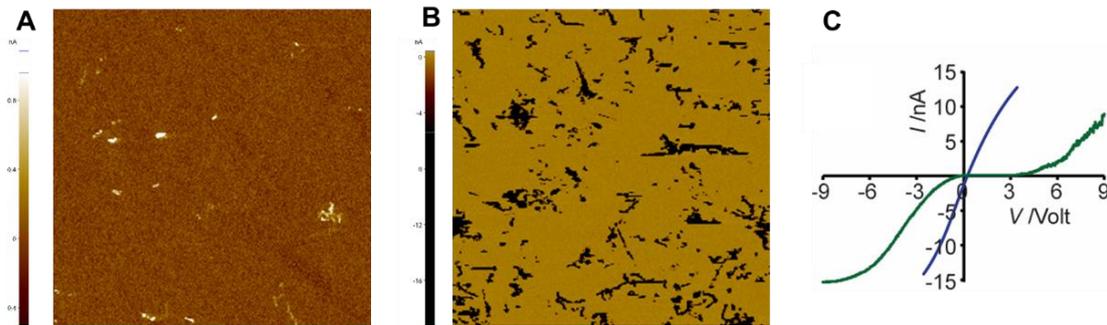


Figura 26. Mapas de conductividad c-AFM de (A) CLLC_HH-250 observado a 10 V y (B) CLLC_HH-500 observado a -5 V. El área de cada imagen es de $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$. C) Representación de las curvas I - V locales tomadas en los puntos de conductividad de CLLC_HH-250 (verde) y CLLC_HH-500 (azul).

Tras hacer un mapeo de conducción se registraron las curvas I - V de los puntos conductores empleando la punta de C-AFM. Los cristales CLLC_HH-500 mostraron un comportamiento óhmico típico, mientras que los CLLC_HH-250 presentaron una conducción muy poco lineal como puede observarse en la Figura 26C. Un comportamiento similar se puede encontrar en trabajos publicados de materiales híbridos polímero-CNT,¹⁹⁷ y se justifica como resultado de la existencia de barreras de efecto túnel a lo largo del canal de conducción cuando la concentración de SWCNTs es baja, cerca del umbral de percolación. Cuando se incrementa la cantidad de SWCNTs en el canal se producen más contactos directos entre los nanotubos lo que resulta en una disminución de la resistividad. La baja resistividad de los contactos SWCNT-SWCNT se manifiesta también por la baja barrera de activación al voltaje umbral de activación (0.015 eV) observada en los CLLC_HH-500.

Para estudiar la isotropía o anisotropía de la conductividad a través de los CLLC_HH-500 se realizaron mapeos de c-AFM de cristales cortados en la dirección del eje X y del eje Z. Los valores obtenidos fueron similares entre sí y a los medidos en el cristal entero, por lo que se puede concluir que la conductividad eléctrica era isotrópica en estos materiales. Estos resultados también confirman que los SWCNTs estaban distribuidos homogéneamente en el interior de los cristales de lisozima convirtiéndolos en semiconductores 3D.

5. Conclusiones.

1. Se han conseguido preparar y caracterizar hidrogeles supramoleculares híbridos de FmocFF y SWCNTs.
2. Se han conseguido obtener cristales de lisozima de calidad en el interior de los hidrogeles híbridos demostrándose la incorporación efectiva de los SWCNTs en el interior de los cristales.
3. Se han caracterizado las propiedades mecánicas, catalíticas y eléctricas de los cristales híbridos lisozima-SWCNT comprobándose que la hibridación ha resultado en cristales más duros, con actividad catalítica mejorada y conductores de la electricidad.

Capítulo 4:

**De la mineralización biomimética
de magnetita en hidrogeles
supramoleculares a
nanopartículas híbridas
magnetita-lisina**

1. Introducción.

1.1. Nanopartículas de magnetita: descripción y aplicaciones.

La magnetita es un sólido ferromagnético con fórmula Fe_3O_4 en la que los iones de hierro se encuentran en una relación $1\text{Fe}^{2+}: 2\text{Fe}^{3+}$. Tiene estructura de espinela inversa en la que los iones Fe^{3+} puede ocupar huecos octaédricos y tetraédricos, mientras que el Fe^{2+} solo pueden localizarse en huecos octaédricos.¹⁹⁸

La magnetita se puede encontrar en la naturaleza en diversos tipos de rocas y sedimentos. También es posible encontrar magnetita en el interior de varios seres vivos donde puede cumplir varias funciones. Por ejemplo, se puede encontrar en bacterias magnetotácticas,¹⁹⁹ en algas del género *Anisonema*,²⁰⁰ en la mariposa monarca,²⁰¹ en la tortuga verde,²⁰² en el pico de las palomas mensajeras,²⁰³ en peces,²⁰⁴ en las abejas,²⁰⁵ en anfibios y reptiles,²⁰² e incluso en el cerebro de algunos simios incluyendo los humanos.^{206,207} Una de las funciones principales que cumple la magnetita en los organismos mencionados es la de dotarles de la capacidad de orientarse con el campo magnético de la tierra, algo muy importante en animales migratorios.

Las nanopartículas de magnetita (**MNPs** del inglés *Magnetite Nanoparticles*) han demostrado ser de gran utilidad en diversas aplicaciones tecnológicas,^{208,209} como son el almacenamiento de información, la fabricación de tintas magnéticas para cifrar información o en la producción de ferrofluidos.²¹⁰⁻²¹² Éstos últimos son suspensiones coloidales estables de nanopartículas ferromagnéticas, como es el caso de la magnetita. Cuando se aplica un campo magnético a un ferrofluido, este se ve afectado por el campo magnético como si fuese un todo, es decir, es el fluido en su totalidad el que se atrae y alinea con el campo. Gracias a sus propiedades excepcionales, con estos materiales se han conseguido fabricar lubricantes para cojinetes en la industria aeroespacial, ya que, mediante confinamiento magnético, se puede evitar la evaporación del lubricante, algo que ocurriría en caso de utilizar aceites.²¹³ Los ferrofluidos también se han empleado de forma similar como amortiguadores de discos duros y centrifugas gracias a que con la aplicación de un campo magnético se puede conseguir la modificación de sus propiedades mecánicas y servir como sistema de amortiguamiento de vibraciones o para detener la rotación del eje. Una de las aplicaciones más destacadas en la actualidad de estos materiales, es su empleo en biomedicina, en diagnóstico, como agente de contraste en resonancia magnética de imagen (MRI), en el tratamiento mediante hipertermia, además de como transportadores de fármacos en tratamientos quimioterapéuticos dirigidos.^{214,215}

La aplicabilidad de las MNPs como “nano-transportadores” en biomedicina, viene determinada por varias características relacionadas con la biocompatibilidad y el magnetismo. Uno de los requisitos más importantes es que sean superparamagnéticas a temperatura ambiente y a temperaturas más elevadas, o lo que es lo mismo, que a dichas temperaturas sean capaces de orientarse y atraerse por un campo magnético aplicado haciendo posible guiarlas a través del organismo hasta el lugar objetivo, y que se comporten como “no magnéticas” en ausencia de un campo magnético externo, evitándose así su agregación. En nanopartículas de magnetita cristalina, la eficiencia de su respuesta ante un campo magnético externo viene determinada por el momento magnético por partícula que está directamente relacionado con el tamaño. Por ello, es importante que las MNPs sean de un tamaño adecuado para que puedan responder eficientemente a un campo magnético externo y poder guiarlas a través de un organismo vivo.^{216–218} El tamaño también es importante en lo referente a su aplicación en tratamientos de hipertermia, ya que el calor generado por unidad de masa de MNPs, con la aplicación de un campo magnético alterno, está directamente relacionado con la cantidad de hierro de las partículas.^{214,215,219} Es importante que las MNPs tengan el tamaño adecuado para conseguir la temperatura necesaria introduciendo en el organismo la menor cantidad posible de nanopartículas. Finalmente, otra característica importante de estas nanopartículas para su aplicación en biomedicina, es que deben tener una composición superficial que las biocompatibilice en el sentido de que el recubrimiento evite su degradación, bloquee la adsorción de moléculas no deseadas, impida su agregación y dificulte o facilite su endocitosis en función del objetivo de las MNPs. En el caso de su empleo como nano-transportadores el recubrimiento debe favorecer el transporte y liberación de moléculas de interés mediante estímulos externos como puede ser un cambio de pH.^{220–222}

1.2. Métodos de producción de nanopartículas de magnetita.

En la actualidad existe una amplia variedad de métodos para producir MNPs, cada uno con ciertas restricciones impuestas por las condiciones de reacción y las características de las MNPs que se obtienen. La metodología que se emplea viene condicionada principalmente por la aplicación que se les vaya a dar a las MNPs.^{215,223,224}

La metodología clásica y más extendida es la coprecipitación en agua de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} en una relación estequiométrica 2:1 respectivamente, a pH alcalino comprendido entre 8 y 14, y en medios no oxidantes.²²⁵ La reacción de coprecipitación sigue la siguiente ecuación química:



Esta metodología tiene la ventaja de ser muy simple y barata, permitiendo su escalado industrial. Sin embargo, tiene el inconveniente de que no es posible conseguir un gran control sobre la distribución de tamaño de las MNPs. Aun así, se puede ejercer cierto control en el tamaño ajustando el pH, la fuerza iónica del medio, la temperatura, el tipo de sales y la relación de concentraciones $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}]$.²²⁶ Empleando coprecipitación también se puede conseguir cierto control en el tamaño y/o en la composición superficial de las partículas, añadiendo compuestos orgánicos como aditivos capaces de formar quelatos con los iones de hierro. Por ejemplo, añadiendo polivinilalcohol (PVA) y dextrano al medio de coprecipitación se ha conseguido modificar el tamaño y polidispersidad de las MNPs, obteniéndose partículas más pequeñas y con una distribución de tamaño más estrecha que en los controles correspondientes siendo estos tamaños 7 ± 2.28 nm en el control, y 4.11 ± 0.85 nm y 5 ± 1.30 nm cuando se añadía dextrano o PVA, respectivamente. Otra peculiaridad de añadir estos aditivos en la coprecipitación fue la obtención de agregados de partículas cuando se empleaba dextrano, y filamentos de partículas cuando se usaba PVA, indicando que el grado de plegamiento del polímero añadido también tiene un efecto en el grado de agregación de las partículas.²²⁷ Utilizando ácido oleico como aditivo se ha conseguido obtener un control sobre el tamaño y la morfología de las MNPs, obteniéndose partículas esféricas más grandes que en los controles, además de con un recubrimiento de ácido oleico capaz de minimizar la agregación y permitiendo, por lo tanto, una mayor estabilidad coloidal.²²⁸ Añadiendo ácido cítrico al medio de mineralización también se ha conseguido obtener MNPs recubiertas del aditivo, haciéndolas en este caso, más hidrófilas.²²⁹ Otra clase de aditivo interesante son las alcanolaminas que pueden actuar simultáneamente como base (en sustitución de por ejemplo el hidróxido sódico o el amoníaco) y como quelantes del hierro, haciendo posible tener control sobre el tamaño de las MNPs, obteniéndose MNPs más pequeñas.²³⁰

La síntesis hidrotérmica consiste en sintetizar las MNPs en agua mediante la hidrólisis y oxidación/neutralización de sales o hidróxidos de hierro a presiones y temperaturas elevadas.^{231,232} En estos procesos los parámetros más importantes que controlan el tamaño de las MNPs son la cantidad de disolvente, la temperatura y el tiempo. En la práctica se suele controlar el tamaño cambiando la temperatura y manteniendo constante el resto de parámetros. Por ejemplo, al calentar una disolución acuosa de cloruro ferroso (FeCl_2) e hidrato de diamina ($\text{H}_4\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), este último actúa como oxidante del Fe^{2+} formando Fe^{3+} con el que obtener magnetita. Calentando durante 6 horas se pueden obtener MNPs de 25 nm al calentar a 100 °C, o de 40 nm al calentar a 140 °C.²³¹ Otra vía térmica de obtención de MNPs es la que se da por descomposición de precursores orgánicos como pueden ser el carbonilo de hierro ($\text{Fe}(\text{CO})_5$) que al calentarlo a reflujo en mezclas éter octílico/ácido oleico y posterior oxidación con aire, se descompone dando lugar a MNPs esféricas de 19 nm con una excelente distribución de tamaño.²³³ También se puede destacar el caso del acetilacetonato de hierro ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) cuya descomposición térmica en 2-

pirrolidona a reflujo (actúa como disolvente y estabilizante mediante su coordinación con el hierro) da lugar a MNPs monodispersas de 5 nm solubles en agua.²³⁴ Mediante el calentado a reflujo $\text{Fe}(\text{acac})_3$ en mezclas de éter fenílico/alcohol/ácido oleico/oleamina se ha conseguido tener un control excelente sobre el tamaño de las MNPs obtenidas, pudiéndose producir partículas monodispersas en el rango de 3 a 20 nm.²³⁵ También se han descrito precursores inorgánicos como el cloruro férrico (FeCl_3), cuya descomposición térmica en 2-pirrolidona a reflujo da lugar a MNPs con tamaños promedio de 4, 12 o 60 nm en función de si se mantiene a reflujo durante 1, 10 o 24 horas (respectivamente), pasando de geometría esférica a cúbica con el aumento en el tiempo de calefacción.²³⁶ Pese a la posibilidad de tener un gran control en el tamaño de las MNPs, la descomposición térmica de precursores tiene el inconveniente de la necesidad de emplear disolventes orgánicos contaminantes y temperaturas elevadas.

Una metodología de síntesis de MNPs de gran interés es la mineralización en ambientes confinados, es decir, llevar a cabo la reacción de síntesis en el interior de estructuras químicas nanoscópicas restringiendo así el tamaño de las partículas. Estos protocolos podrían considerarse como una adaptación de las metodologías expuestas anteriormente ya que se basan en realizar los distintos tipos de reacciones vistos, pero en ambientes confinados. Se han descrito multitud de alternativas de esta metodología pudiéndose destacar algunas de ellas como por ejemplo la síntesis en emulsiones de agua en disolventes apolares mediado por surfactantes,²³⁷⁻²⁴⁰ en “cajas” de apoferritina,^{241,242} con dendrímeros,²⁴³ ciclodextrinas^{244,245} o también, en membranas fosfolipídicas capaces de formar vesículas (magnetoliposomas).²⁴⁶⁻²⁴⁸ Empleando estas estrategias se puede llegar a conseguir un buen control sobre el tamaño y recubrimiento de las MNPs. También dentro de esta categoría de metodologías se puede incluir la de coprecipitación en hidrogeles poliméricos²⁴⁹ como pueden ser hidrogeles de poliestireno-poliacrilato,²⁵⁰ quitosano,^{251,252} celulosa y quitosano,²⁵³ o poliácridamida.²⁵⁴ La mineralización en estos últimos casos se da en el interior de los poros de la estructura tridimensional de los geles mediada por la interacción entre los iones de hierro y los grupos funcionales del polímero que constituye el gel.

Recientemente ha cobrado un gran interés la síntesis de MNPs mediante aproximaciones biomiméticas, o lo que es lo mismo, aproximaciones en las que la mineralización se da en agua, a temperatura ambiente y mediada por un sustrato de origen biológico, emulando así las condiciones en las que ocurre la mineralización en los seres vivos (biomineralización). Estas condiciones son completamente respetuosas con el medio ambiente y su desarrollo sería de gran interés en la producción industrial de MNPs. El interés en esta vía de mineralización radica en el conocimiento de que en el magnetosoma (orgánulo en el que se produce magnetita) de las bacterias magnetotácticas se producen nanopartículas de magnetita monocristalinas superparamagnéticas, de gran tamaño (50 nm) y con una excelente homogeneidad en la

morfología y distribución de tamaño.¹⁹⁹ Aunque en principio se podrían emplear cultivos de estas bacterias para producir MNPs de calidad, la cantidad que se puede obtener es demasiado baja como para ser una vía de producción escalable. Para solventar este problema, se han hecho grandes esfuerzos en el estudio de las proteínas que median en el proceso de biomineralización en estas bacterias para así poder sintetizarlas mediante la tecnología del ADN recombinante y emplearlas como aditivo en la producción de MNPs a mayor escala. Se ha descubierto que las proteínas del magnetosoma, Mms6 y MamC, son mediadoras del proceso de biomineralización estabilizando las nanopartículas y mediante el efecto “plantilla” que ejercen los grupos carboxilato de sus aminoácidos constituyentes (ácido glutámico, ácido aspártico y C-terminal), capaces de quelar el hierro de forma epitaxial a la magnetita, o lo que es lo mismo, los iones de hierro se encuentran separados unos de otros al unirse a las proteínas por la misma distancia que los separa en un cristal de magnetita. Empleando estas proteínas como aditivo en síntesis por coprecipitación de magnetita se ha conseguido controlar el tamaño y distribución de los cristales,²⁵⁵⁻²⁵⁷ llegándose a alcanzar nanopartículas de hasta 60 nm usando MamC.²⁵⁷⁻²⁵⁹ También se han empleado poliaminoácidos o péptidos de origen sintético como aditivos para la producción biomimética de MNPs demostrándose que ejercen un efecto sobre la nucleación y el crecimiento cristalino de las partículas, regulando su tamaño y morfología.²⁶⁰⁻²⁶² Siguiendo esta estrategia de mineralización con péptidos, y con intención de emular la biomineralización en las bacterias magnetotácticas, se han sintetizado artificialmente péptidos que mimetizan partes de la proteína Mms6. Con estos experimentos se pudo determinar que, cuando se empleaba el péptido correspondiente al extremo C-terminal de Mms6, se obtenían MNPs con la misma morfología octaédrica que las producidas por biomineralización, aunque no con el mismo tamaño.²⁶² En estudios de mineralización biomimética con cadenas largas de poliaminoácidos, se ha determinado que el principal regulador de la mineralización con estos aditivos, es la proporción de aminoácidos con grupos carboxilato en la cadena lateral (glutámico y aspártico) debido a su efecto estabilizador de los iones de hierro. En los mismos estudios también se ha comprobado que las cadenas de poliaminoácidos que contienen grupos amonio o guanidinio (lisina y arginina) permanecen adheridas a las MNPs. Este último hecho ha podido emplearse para regular la dispersión/precipitación de las nanopartículas mediante la protonación/desprotonación de los residuos de lisina o arginina de los poliaminoácidos.^{260,261}

1.2.1. Limitación del escalado en la producción de MNPs para aplicaciones biomédicas.

Tal como se comentó en el apartado 1.1, las MNPs útiles para aplicaciones biomédicas deben cumplir ciertos requisitos como son: ser superparamagnéticas, tener el tamaño apropiado para responder con efectividad a los campos magnéticos y tener un recubrimiento que las

biocompatibilice, y en caso de emplearse como nano-transportadores, su superficie debe servir para transportar moléculas que posteriormente se liberen mediante un estímulo. En la actualidad, no se conoce ningún protocolo sintético escalable industrialmente con el que obtener MNPs que reúnan todos los requisitos técnicos expuestos y, de los pocos protocolos publicados en los que se consigue un control sobre el tamaño y/o la composición superficial, ninguno de ellos son métodos económicamente asequibles y/o respetuosos con el medio ambiente con los que escalar la producción de magnetita a nivel industrial. Como se ha visto anteriormente, muchos de estos protocolos requieren de la utilización de disolventes orgánicos y altas temperaturas, lo que genera una gran cantidad de productos tóxicos.^{215,223,224,263} De entre los métodos que no son contaminantes, la coprecipitación en agua es uno de los preferidos para la producción a gran escala de las MNPs, ya que es un método efectivo en coste y tiempo, además de escalable industrialmente. Sin embargo, con estos protocolos no se puede ejercer un gran control sobre el tamaño y por extensión, sobre las propiedades magnéticas. Las MNPs obtenidas por coprecipitación a temperatura ambiente suelen ser altamente polidispersas con un tamaño promedio de cristal que puede oscilar entre los 5 y los 20 nm, por lo que son demasiado pequeñas para actuar como nano-transportadores y, además, no poseen una superficie biocompatible.^{215,218,224,225,230}

Los inconvenientes expuestos anteriormente se traducen en la necesidad de diseñar métodos novedosos de coprecipitación que permitan un control sobre el tamaño de las partículas y sus propiedades magnéticas, junto con la posibilidad de funcionalizar sus superficies y que se realicen en condiciones benignas con el medio ambiente. En este contexto, un método prometedor es la aproximación biomimética realizada en agua a temperatura ambiente utilizando proteínas del magnetosoma de bacterias magnetotácticas (Mms6 y MamC) o con poliaminoácidos. Pese a las ventajas de estas estrategias, el empleo de proteínas o poliaminoácidos supone un coste demasiado elevado, haciendo poco factible su escalado industrial. Por tanto, la búsqueda de nuevos aditivos más económicos capaces de controlar el tamaño de las MNPs en condiciones biomiméticas es un objetivo deseable.

2. Planteamiento y objetivos.

Las proteínas y los poliaminoácidos en disolución tienen grandes similitudes con los hidrogeles supramoleculares basados en péptidos en cuanto a su composición y estructura. Debido a estas similitudes, y a que las proteínas y poliaminoácidos son hasta la fecha las mejores alternativas

para la mineralización biomimética de MNPs, podría ser interesante estudiar la mineralización biomimética en el interior de dichos hidrogeles. Debido a las características difusivas de los hidrogeles supramoleculares peptídicos, junto con su flexibilidad en lo referente a su composición química y su biocompatibilidad (Capítulo 1, apartado 1.3), podrían ofrecer grandes ventajas en la mineralización biomimética de MNPs con aplicaciones en biomedicina. Además, estos péptidos al ser moléculas muy simples son muy baratos, lo que permitiría desarrollar un protocolo de producción de MNPs más económico que los dos métodos anteriores.

Hasta la fecha, no se han descrito metodologías de producción de magnetita empleando hidrogeles supramoleculares y aunque sí que existen precedentes sobre el empleo de hidrogeles macromoleculares, los resultados obtenidos no han sido suficientemente satisfactorios. Estos hechos suponen que el reto de mineralizar magnetita en el interior de hidrogeles supramoleculares peptídicos sería una tarea compleja. En este sentido, se decidió llevar a cabo un estudio preliminar sobre la influencia que pudieran ejercer aminoácidos en disolución en procesos de mineralización de magnetita en condiciones biomiméticas, es decir, en agua y a temperatura ambiente. Con la información obtenida de estos experimentos podría hacerse un diseño racional de la composición de los hidrogeles supramoleculares peptídicos con los que ensayar la mineralización.

En este sentido se plantearon los siguientes **objetivos** específicos:

1. Diseñar y aplicar una metodología de mineralización de magnetita en presencia de aminoácidos en condiciones biomiméticas.
2. Estudiar el efecto de la presencia de aminoácidos en el tamaño, magnetismo y características superficiales de las MNPs obtenidas en el Objetivo 1.

3. Materiales y métodos.

3.1. Reactivos, disolventes y equipos.

Los reactivos y disolventes empleados se obtuvieron de fuentes comerciales y se utilizaron sin purificación previa.

Los equipos empleados se especificarán a lo largo del texto escribiendo el modelo en cursiva y la marca entre paréntesis.

Todos los experimentos de mineralización se realizaron en un volumen final de 50 mL por réplica y en atmósfera libre de oxígeno en el interior de una cámara de anaerobiosis “COY” (Coy Laboratory Products) llenada con nitrógeno al 4% de hidrógeno.

El agua desoxigenada empleada en todos los experimentos se preparó hirviendo agua MilliQ durante 1 h y después se enfrió en baño de hielo a la vez que se burbujeaba nitrógeno. Acto seguido se introdujo en el interior de la cámara COY. Este agua se empleó para obtener las disoluciones madre de todos los compuestos empleados: $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0.15 M/0.15 M), NaOH (1 M), $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ (0.5 M), FeCl_3 (1 M) y aminoácidos (en forma de clorohidratos).

3.2. Precipitación de magnetita control.

Los experimentos se realizaron en el interior de una cámara de anaerobiosis COY para evitar una posible oxidación de los productos. La magnetita se dejó precipitar a 25 °C y a 1 atmósfera siguiendo el protocolo previamente descrito por Pérez-González y colaboradores²⁶⁴ como se comenta a continuación: la síntesis de la magnetita se consiguió después de mezclar y diluir las disoluciones madre de sales hasta alcanzar la concentración final de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ (2.78 mM), FeCl_3 (5.56 mM) y $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (3.5 mM/3.5 mM). Se añadió una disolución de NaOH para alcalinizar el medio hasta pH 9 dando lugar al inicio de la precipitación de magnetita. La suspensión de nanopartículas generada se dejó durante un mes antes de ser procesada (ver apartado 3.4).

3.3. Precipitación de magnetita en presencia de aminoácidos.

En primer lugar, se pesaron cuidadosamente los aminoácidos lisina o arginina (en forma de clorhidrato), se desoxigenaron con ayuda de una corriente de argón e inmediatamente se introdujeron en la cámara COY donde se prepararon disoluciones madre para cada una de las concentraciones usadas (0.1, 2 o 10 mM de aminoácidos). El volumen apropiado de cada disolución de aminoácidos se mezcló con la disolución para preparar magnetita (descrita en el apartado anterior) previamente a la adición de NaOH . Una vez se hubo completado la mezcla, se inició la precipitación de magnetita añadiendo NaOH y se dejó durante un mes antes de ser procesada (ver apartado 3.4).

3.4. Purificación de sólidos magnéticos.

Los sólidos magnéticos obtenidos en las correspondientes precipitaciones se concentraron con ayuda de un imán permanente de neodimio y se retiró el sobrenadante (decantación magnética). El imán se retiró y el sólido se volvió a suspender con agua libre de oxígeno para después volver a decantarlo magnéticamente. Este procedimiento se repitió tres veces para cada experimento de precipitación.

3.5. Imágenes TEM y cálculo de distribución de tamaño.

Las nanopartículas obtenidas se deshidrataron empleando etanol para luego embeberlas en resina *Embed 812* (Fisher Scientific). El bloque de resina resultante se cortó en secciones ultra delgadas (de 50 a 70 nm) usando un ultramicrotomo *Reichert Ultracut S* (Leica Microsystems). Las láminas obtenidas se depositaron sobre rejillas de cobre de microscopía electrónica. La morfología y tamaño de partícula se analizó empleando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) *LIBRA 120 PLUS* (Carl Zeiss) y un microscopio TEM de alta resolución (HRTEM) *TITAN G2* (FEI).

A partir de las imágenes TEM se obtuvieron los valores de tamaño de las partículas empleando el programa *ImageJ 1.47*. El cálculo de la distribución de tamaño y los cálculos estadísticos se realizaron con el programa *Origin pro 9*. Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, los tamaños de partícula se midieron de múltiples imágenes midiendo al menos 1000 nanopartículas por cada experimento.

3.6. Medidas de potencial- ζ .

La carga superficial de las nanopartículas a distintos pHs se evaluó a través de medidas de potencial- ζ usando un equipo de medida de dispersión dinámica de luz *Zetasizer Nano Zs* (Malvern). Todas las muestras objeto de estos estudios se prepararon formando suspensiones diluidas de partículas en una disolución 10 mM de NaClO₄. El pH de las suspensiones se ajustó a valores enteros comprendidos en el intervalo de pH 3-8 añadiendo pequeñas porciones de disoluciones 0.1 M de NaOH o HCl a la vez que se medía el pH con ayuda de un pH-metro *sension PH 3* (Hach). Las medidas se realizaron por triplicado a 25 °C usando cubetas desechables.

3.7. Estudios por TGA.

Los termogramas de los distintos tipos de nanopartículas de magnetita se obtuvieron a partir de aproximadamente 10 mg de polvo liofilizado de cada muestra. Las medidas se realizaron en un equipo *TGA/DSC1* (Mettler-Toledo) calentando las muestras desde temperatura ambiente hasta 900 °C a una velocidad constante de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno.

3.8. Medida de propiedades magnéticas.

Las medidas de enfriamiento de campo cero o ZFC-W (del inglés *Zero-Field Cooling*) y enfriamiento de campo o FC-C (del inglés *Field Cooling*) se realizaron empleando un magnetómetro de superconducción de interferencia cuántica (SQUID) de 5 T. Bajo una corriente suave de argón, una cantidad determinada de polvo de cada muestra se introdujo en una cápsula de policarbonato. Las muestras se enfriaron rápidamente hasta 5 K sin campo aplicado, para así preservar la magnetización aleatoria de los nanocristales. Acto seguido, se aplicó un campo magnético de 500 Oe y las muestras se calentaron a 300 K. Desde ese punto, las muestras se enfriaron hasta 5 K con el campo magnético activado. Las curvas obtenidas se normalizaron respecto a la masa de cada muestra para poder establecer comparaciones. Los ciclos de histéresis magnética se registraron a 5 y 300 K. La temperatura de bloqueo (T_B) de cada muestra se determinó como la correspondiente a la máxima magnetización en las curvas ZFC, mientras que las temperaturas de irreversibilidad (T_{irr}), como la temperatura debajo de la cual las nanopartículas superparamagnéticas ya no estaban equilibradas térmicamente (separación de las curvas ZFC-W y FC-C).

3.9. Estudios por FTIR.

Para la obtención de los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se empleó un espectrómetro *Two FTIR ATR* (Perkin-Elmer). Para analizar las muestras, una pequeña porción de polvo seco de nanopartículas se colocó sobre el cristal de diamante del espectrómetro donde se comprimió para luego realizar las medidas. Los espectros se registraron para cada muestra en el intervalo 1300 a 1800 cm^{-1} . Los resultados se expresaron como el promedio de 64 acumulaciones.

4. Discusión y resultados.

4.1. Experimentos de mineralización biomimética con aminoácidos.

Desde un punto de vista práctico, se decidió emplear lisina (Lys) y arginina (Arg) como aditivo en la mineralización de magnetita. Estos dos aminoácidos se eligieron por su bajo coste, biocompatibilidad y por su capacidad de interactuar débilmente con cationes de hierro a pH básico. En la literatura se pueden encontrar ejemplos del empleo de estos aminoácidos en biomineralización de MNPs no observándose ninguna influencia en el proceso de mineralización.²⁶⁵⁻²⁶⁷ Sin embargo, estos aminoácidos pueden tener la capacidad de interactuar con iones metálicos a través de una coordinación de tipo glicina en función del pH.²⁶⁸⁻²⁷⁰ A diferencia de los métodos publicados en los que el pH en el que se lleva a cabo la mineralización es 14 (o próximo a 14), en el método empleado en este estudio, la mineralización se llevó a cabo a pH 9. A este pH es posible que los aminoácidos actúen como quelantes de cationes de Fe alterando así la cinética de nucleación y/o de crecimiento de cristales de magnetita dando lugar a cristales de tamaño y/o morfologías distintos a los correspondientes controles sin aditivos.

Para comprobar esta hipótesis se llevaron a cabo experimentos de mineralización de magnetita en presencia de cantidades crecientes de Lys (0.1, 2 y 10 mM) y Arg (0.1 y 2 mM). En todos los casos estudiados, la presencia de aminoácidos (en las concentraciones indicadas) no modificó el pH del medio manteniéndose constante a pH 9. En una primera observación se pudo comprobar que había ligeras diferencias en los primeros instantes de mineralización entre el control sin aditivos y en presencia de Lys en disolución. Se observó que, mientras que en el control se formaba un precipitado negro altamente magnético (magnetita) casi instantáneamente tras añadir el NaOH, cuando había lisina presente en la disolución de mineralización, el precipitado negro se formó más progresivamente y no era tan magnético (no se atraía fuertemente por un imán) en los primeros instantes. Este fenómeno no se observó en la mineralización con Arg.

Las diferencias observadas en los primeros instantes de la mineralización en presencia de Lys respecto al control llevaron a pensar que la lisina estaba ejerciendo alguna influencia en el proceso de mineralización. Para comprobar esta hipótesis se analizaron los sólidos magnéticos obtenidos en cada experimento mediante microscopía TEM.

4.2. Imágenes TEM, HRTEM y medidas de tamaño.

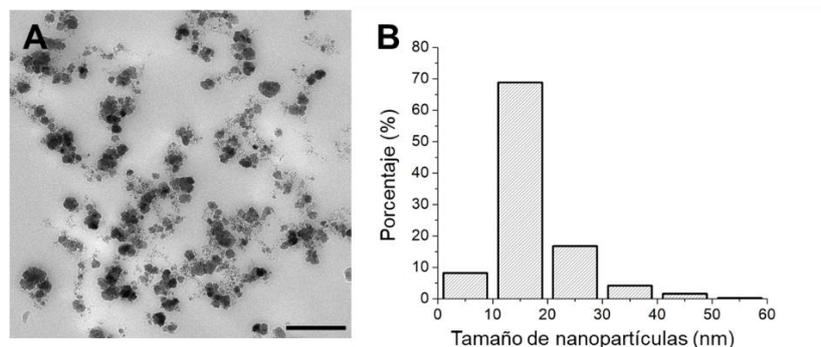


Figura 1. Imagen TEM de las MNP-control y su distribución de tamaño (A y B respectivamente). La barra de escala en A se corresponde con 200 nm.

Tras 30 días de mineralización se obtuvieron las imágenes TEM de cada una de las condiciones estudiadas. A partir de las imágenes (Figuras 1, 2 y 4) se midió el tamaño de al menos 1000 partículas por muestra para así obtener una distribución de tamaño representativa. Como puede verse en la Figura 3 las nanopartículas control (MNP-control), es decir, las nanopartículas mineralizadas sin aditivos, presentaron un tamaño promedio de 17 ± 7 nm. Las MNPs crecidas en presencia de distintas concentraciones de Lys (0.1, 2 y 10 mM nombradas como Lys0.1-MNP, Lys2-MNP y Lys10-MNP respectivamente) mostraron tamaños promedio superiores (desde 21 ± 7 a 29 ± 7 nm) a medida que se incrementaba la concentración de Lys desde 0.1 a 10 mM. Por el contrario, cuando se analizaron las partículas crecidas en presencia de Arg no se observó un aumento de tamaño ni por la presencia ni por el aumento de la concentración de Arg siendo estas de 16 ± 7 y 17 ± 6 nm para concentraciones de Arg iguales a 0.1 y 2 mM respectivamente (llamadas en adelante como Arg0.1-MNP y Arg2-MNP). Los tamaños promedio de las MNPs mineralizadas con Arg no eran significativamente distintos a los correspondientes a MNP-control (Figura 4). Los resultados obtenidos sugieren que el aminoácido Lys modificó la cinética de nucleación y crecimiento de magnetita, mientras que Arg no. Tras la realización de un test ANOVA a los tamaños promedio de los cristales, se pudo concluir que existían diferencias significativas entre las muestras con Lys, entre ellas y con el control.

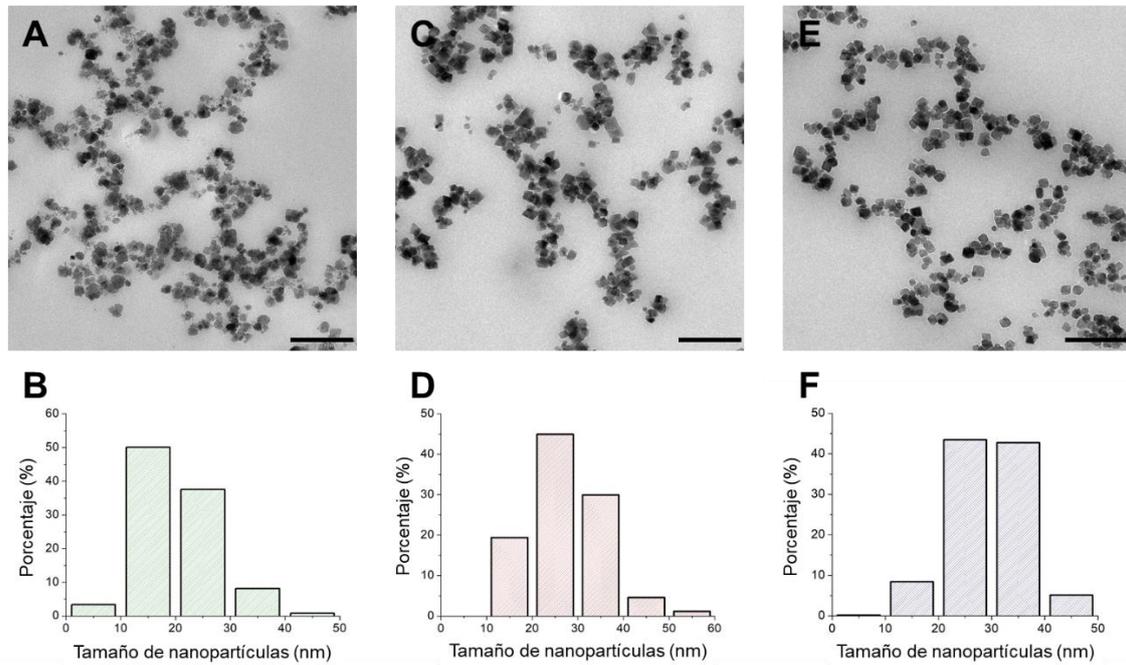


Figura 2. Imágenes TEM de nanopartículas de magnetita y su distribución de tamaño respectivamente de (A y B) Lys0.1-MNP, (C y D) Lys2-MNP y (E y F) Lys10-MNP. La barra de escala en las imágenes TEM se corresponde con 200 nm.

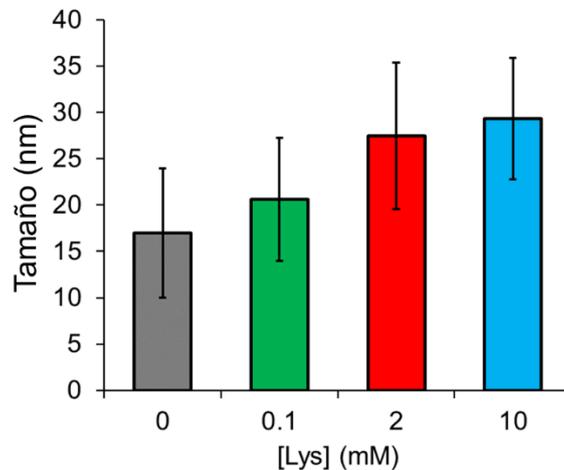


Figura 3. Representación gráfica del tamaño promedio de las nanopartículas de magnetita en función de la concentración de Lys añadida junto con su desviación estándar.

Una justificación al fenómeno observado puede deberse atendiendo a las cargas formales de los aminoácidos al pH del estudio (pH 9). En estas condiciones, la Arg está cargada positivamente mientras que la Lys existe principalmente como *zwitterion* y parcialmente en estado neutro. Por tanto, era de esperar que los cationes de Fe no se unieran a Arg mientras que sí lo pudieran hacer a Lys. En este escenario, la sobresaturación del medio disminuiría respecto a la magnetita y, su nucleación ocurriría en aquellas regiones en las que los cationes de Fe estuvieran más

concentrados por Lys debido a un efecto ionotrópico basado en las interacciones entre los iones de Fe y los grupos funcionales de la Lys.²⁶⁸⁻²⁷⁰ Puesto que la concentración de hierro es limitada, en el caso de la mineralización con Lys, se formarían menos núcleos de cristalización que en los experimentos control provocando la formación de cristales más grandes. El papel que estaría jugando la Lys sería el de reservorio de Fe que va proveyendo de iones de Fe a medida que el sistema los necesita para el crecimiento cristalino, permitiendo así que los cristales crezcan a baja sobresaturación.

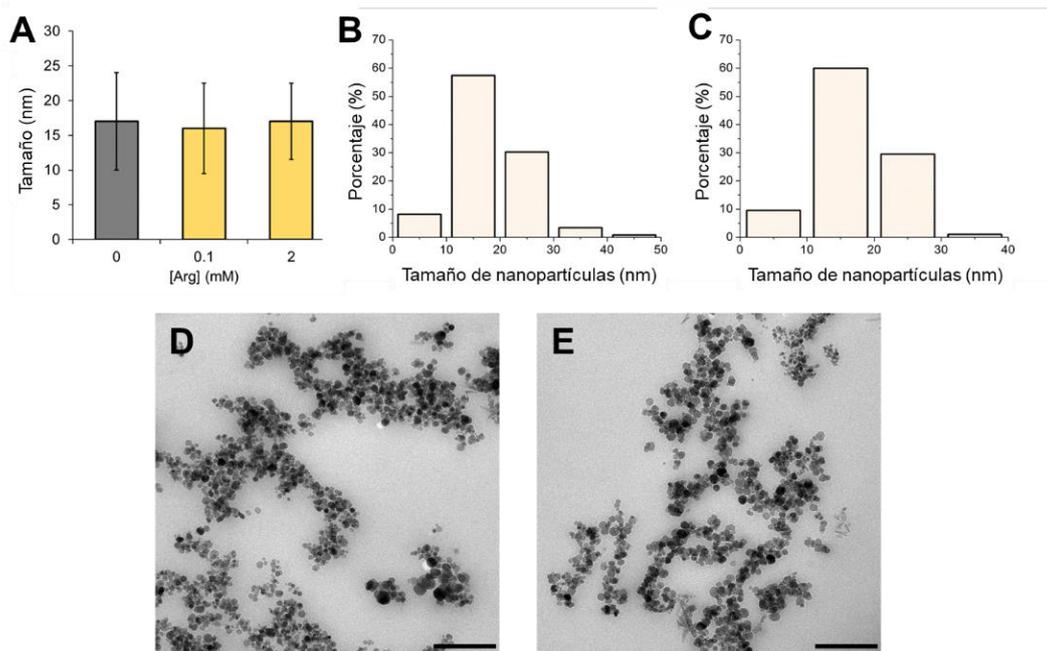


Figura 4. A) Representación gráfica del tamaño promedio de las nanopartículas de magnetita en función de la concentración de Arg añadida junto con su desviación estándar. B) y C) distribuciones de tamaño de Arg0.1-MNP y Arg2-MNP, respectivamente. D) y E) imágenes TEM de Arg0.1-MNP y Arg2-MNP, respectivamente. La barra de escala en las imágenes TEM se corresponde con 200 nm.

La hipótesis del efecto ionotrópico de la Lys se confirmó posteriormente por análisis de HRTEM. Los cristales de magnetita mostraron formas en dos dimensiones bien definidas como hexágonos o rombos enlazados presentando caras cristalinas correspondientes a un espaciado (111) (Figura 5). En algunos casos se detectaron bordes redondeados que pueden corresponder con caras incipientes (110) pero en la mayoría de los casos, las muestras contenían cristales bien facetados (con caras bien definidas) de tamaño muy homogéneo. Las imágenes FFT (del inglés *Fast Fourier Transform*) demostraron que las nanopartículas eran cristales individuales de magnetita (Figura 5A inserto). La presencia de Lys no introdujo modificaciones morfológicas en los cristales de magnetita, ya que estos presentaban las mismas caras cristalinas que las MNPs-control.

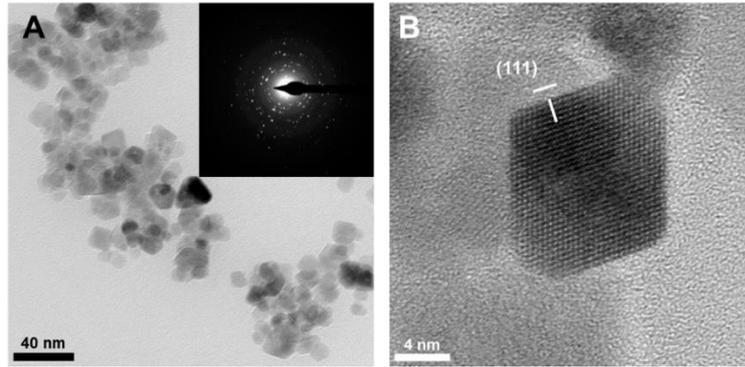


Figura 5. A) Vista general HRTEM de Lys0.1-MNP donde el inserto muestra el patrón FFT. B) Detalle HRTEM de partícula de magnetita Lys0.1-MNP resaltando la cara cristalina (111).

4.3. Estudio de la adsorción de Lys sobre cristales de magnetita.

Tras la demostración de la capacidad de la Lys para influir en el tamaño de las MNPs, se llevaron a cabo una serie de experimentos encaminados a determinar si la Lys se adsorbía en la superficie de las nanopartículas aun después de haber retirado todas las moléculas e iones del medio de mineralización.

Un análisis de TGA de las MNPs obtenidas en presencia de 0.1, 2 y 10 mM de Lys en comparación con MNPs-control, demostró que las moléculas de Lys permanecían adsorbidas en la superficie de las nanopartículas. Como puede verse en la Figura 6A, Lys0.1-MNP, Lys2-MNP y Lys10-MNP, tuvieron una pérdida de masa de 7.0, 6.3 y 7.4% respectivamente a 600 °C frente al 4.7% de pérdida en MNP-control. Este resultado muestra que la Lys se adsorbió en la superficie de todas las muestras alcanzando un máximo de 2.7% en peso de Lys en Lys10-MNP. Las pequeñas diferencias en la cantidad adsorbida sugieren que la adsorción de Lys es limitada en consonancia con trabajos previos.²⁷¹

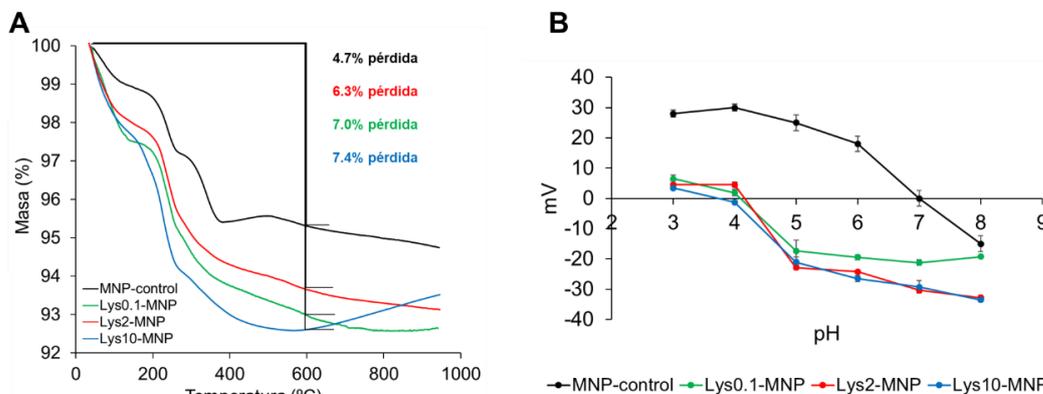


Figura 6. A) Análisis termogravimétrico de MNPs. B) Estudio del potencial- ζ de MNPs en el rango de pH 3-8.

Una vez comprobada la adsorción, se estudió el efecto de la presencia de Lys en las propiedades de las partículas. Para ello se realizaron medidas de potencial- ζ de todas las muestras suspendiendo las nanopartículas cubriendo un rango de pH desde 3 a 8 (Figura 6B). A diferencia de las MNP-control, las MNPs con Lys estaban cargadas con valores muy negativos a pH 7.4 (pH fisiológico) mostrando potenciales de -20 a -31 mV. El punto isoeléctrico de las partículas (pH en el que la movilidad electroforética y potencial de las nanopartículas es nulo) con Lys se encontró en torno a pH 4, en todos los casos, mientras que el punto isoeléctrico de las MNPs-control se encontró a pH 7.

Los valores negativos de potencial Z de las MNPs con Lys a pH 4-8 sugieren que la Lys, que se encontraría en estado catiónico en ese rango de pH, estaba interaccionando con la superficie de las MNPs a través de los grupos amonio exponiendo los grupos carboxilato al medio acuoso. En un intento por dilucidar esta cuestión, se registraron los espectros FTIR de las MNPs obtenidas (Figura 7), en los que se observó el desplazamiento de las bandas amonio (de ambos grupos amino) de Lys2-MNP y Lys10-MNP desde 1521 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} . Este desplazamiento a números de onda más bajos confirmaría la interacción entre Lys y MNPs a través de los grupos amonio en consonancia con lo descrito en bibliografía.^{272,273}

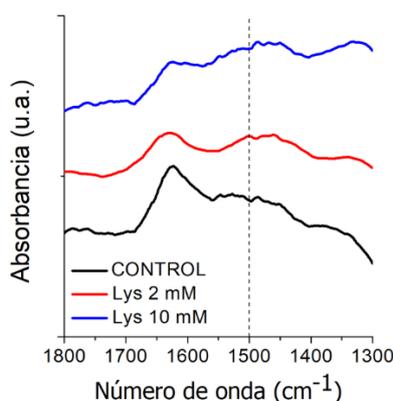


Figura 7. Espectros FTIR de nanopartículas de magnetita MNP-control (negro), Lys2-MNP (rojo) y Lys10-MNP (azul).

El recubrimiento de Lys y que esta exponga los grupos carboxilato (COO^-) al medio, hace que estas MNPs estén cargadas con valores muy negativos a pH fisiológico (-30 mV), algo que resulta ser muy relevante por varias razones. Por un lado, al aumentar la carga superficial, aumenta la repulsión electrostática entre partículas, lo que se traduce en un aumento de la estabilidad coloidal.²⁷⁴ Por otro lado, esta funcionalización de la superficie permitiría el acoplamiento con otras moléculas a través de interacciones electrostáticas.²⁷³ Gracias a que los cristales de magnetita recubiertos con lisina tienen un punto isoeléctrico entorno a un pH 4, estas partículas podrían

liberar su cargamento a pH ácidos como los que presentan algunos tejidos tumorales. La carga superficial negativa también es importante para minimizar la interacción potencial de estas nanopartículas con células de plasma y sangre (también cargadas negativamente) favoreciendo su circulación a través del torrente sanguíneo.²⁷⁵ En definitiva, las propiedades superficiales descubiertas para estas MNPs recubiertas de Lys, abre la puerta a su potencial aplicación *in vivo*.

4.4. Estudio de las propiedades magnéticas de MNPs.

Las propiedades magnéticas de las MNPs se estudiaron registrando las curvas de enfriamiento de campo cero y de enfriamiento de campo o ZFC-FC (del inglés *Zero Field Cooling-Field Cooling*), además de los ciclos de histéresis magnética.

En un experimento general para la obtención de las curvas ZFC-FC, la muestra se enfría desde la temperatura mínima alcanzable (normalmente 5 K), se aplica un campo magnético constante (en este caso 500 Oe) y la muestra se calienta hasta ver un crecimiento y posterior descenso de la magnetización (curva ZFC), es decir, hasta que la muestra vuelve a ser superparamagnética. En ese punto, la muestra se vuelve a enfriar con el campo magnético aplicado (curva FC). De estas curvas se obtienen dos parámetros relevantes para la caracterización magnética de las partículas. Uno es la “temperatura de bloqueo” (T_B), que se corresponde con el máximo de magnetización en las curvas ZFC, y el otro es la “temperatura de irreversibilidad” (T_{irr}), que se corresponde con la temperatura a la que se separan las curvas ZFC y FC. En la Figura 8A se pueden observar los resultados de medidas de ZFC-FC para MNP-control, Lys2-MNP y Lys10-MNP. Se puede comprobar que había una clara diferencia entre el comportamiento de las MNP-control con respecto a las MNPs con Lys. Las Lys10-MNP presentaron el incremento más lento en magnetización mientras que el más rápido se encontró para las MNP-control. La T_B fue de 103 K para las MNP-control, 270 K para Lys2-MNP y 280 K para Lys10-MNP. La T_{irr} fue también diferente para los tres tipos de nanopartículas, siendo 274 K para MNP-control, 295 K para Lys2-MNP y 298 K para Lys10-MNP. De acuerdo con el trabajo de Prozorov y colaboradores²¹⁸ este incremento lento de la magnetización para las MNPs con Lys, junto con valores elevados de T_B y T_{irr} , es consistente con partículas de alta cristalinidad y un gran momento magnético por partícula, particularmente en el caso de las nanopartículas Lys10-MNP. Las pequeñas diferencias entre T_B y T_{irr} para Lys10-MNP se correlaciona con una menor polidispersidad.

De las medidas de los ciclos de histéresis magnética a 5 y 300 K de las distintas nanopartículas obtenidas se pudo deducir que todas las MNPs estudiadas presentaban un comportamiento típico ferromagnético a 5 K mientras que, a 300 K, presentaban coercitividad cero (sin magnetización remanente) indicando su carácter superparamagnético.

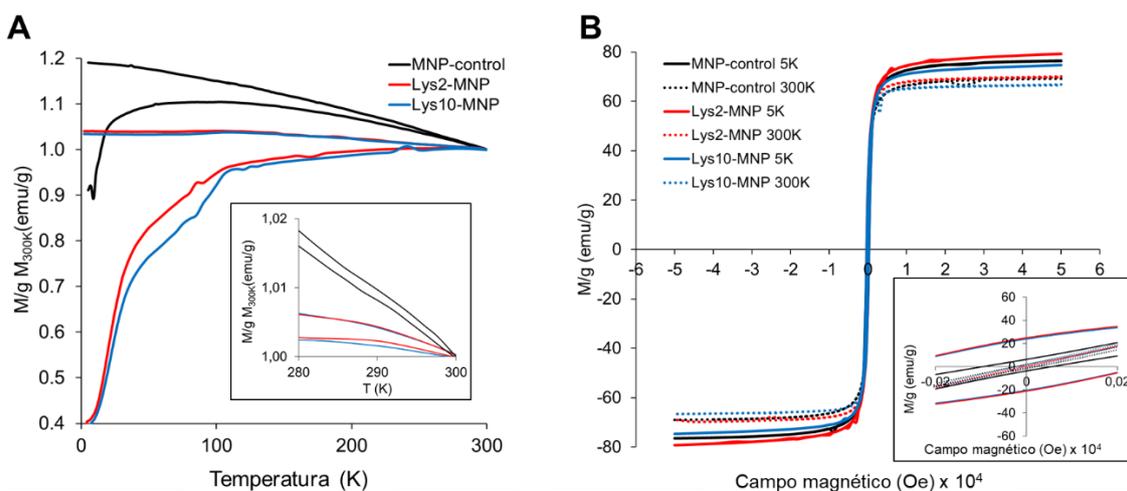


Figura 8. A) Curvas ZFC-FC de MNPs. B) Curvas de histéresis magnética de MNPs.

Tomando en conjunto todos los datos obtenidos hasta este punto en lo referente al estudio de las propiedades magnéticas de las MNPs mineralizadas en presencia de Lys, se pudo deducir cierta información relevante. Por un lado, los valores elevados de T_B para MNPs con Lys, indicaron que la Lys jugó un papel necesario en el aumento del tamaño de los cristales, lo cual está en perfecta consonancia con los resultados obtenidos por TEM (apartado 4.2). La baja polidispersidad de las Lys10-MNP, obtenida a través de las medidas magnéticas, también está en buena correlación con los resultados de TEM y asegura que las muestras eran homogéneas en términos de respuesta a un campo magnético externo. Por otro lado, los valores de T_B , que determinan el límite de temperatura sobre el cual las nanopartículas superparamagnéticas van a comportarse como no magnéticas en ausencia de un campo magnético externo,²¹⁶ fueron en todos los casos inferiores a la temperatura ambiente o la temperatura corporal. De este hecho se deduce que, cualquiera de las MNPs obtenidas no mostraría magnetización a dichas temperaturas previniendo así su agregación.^{215,218} Por otro lado, una vez aplicado un campo magnético, las MNPs obtenidas responderían eficientemente mostrando valores de magnetización relativamente elevados. La magnetización de saturación (M_s) a 300 K es similar entre muestras, siendo esta 66.5 emu/g para Lys10-MNP y 69 emu/g para MNP-control y Lys2-MNP. El valor ligeramente inferior de M_s para Lys10-MNP puede deberse a un enmascaramiento del núcleo magnético por el recubrimiento de Lys.

La ligeramente baja magnetización de las nanopartículas obtenidas en este trabajo en comparación con otras descritas en literatura podría deberse al hecho de que a bajas temperaturas, la monodispersidad no puede ser controlada tan bien como a altas temperaturas ya que, a temperaturas bajas, pueden ocurrir agregaciones.²⁷⁶ Sin embargo, el método propuesto en este

trabajo compensa esta pequeña desventaja con el hecho de ser una tecnología escalable, barata y respetuosa con el medio ambiente, con la que se pueden producir MNPs con propiedades magnéticas lo suficientemente buenas para la mayoría de las aplicaciones.

5. Conclusiones.

1. Se ha demostrado que la lisina puede influir en el tamaño de los cristales de magnetita obtenidos en condiciones de mineralización biomimética. En presencia de Lys las MNPs presentaron un mayor tamaño que aumentaba al aumentar la concentración de Lys.
2. La concentración de Arg no afectó el tamaño promedio de las MNPs, obteniéndose MNPs de tamaño análogo a las MNP-control.
3. La caracterización de la composición superficial de las Lys-MNP determinó que la lisina se encontraba en la superficie de las partículas dispuesta con los grupos carboxilato hacia el medio dotando a las nanopartículas de carga negativa a pH fisiológico.
4. La caracterización de las propiedades magnéticas de las Lys-MNP determinó que dichas nanopartículas tenían un comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente y que las Lys10-MNP tenían baja polidispersidad.
5. El empleo de lisina como aditivo en procesos de mineralización biomimética de magnetita, a diferencia del empleo de proteínas o poliaminoácidos, hace que este protocolo sea mucho más económico al mismo tiempo que respetuoso con el medio ambiente. Estas ventajas abren la puerta a un posible escalado industrial de este protocolo.

Capítulo 5:

Participación en otros proyectos

A. Cristales de insulina crecidos en hidrogeles de FmocAA muestran alta estabilidad térmica y perfiles de liberación controlada *in vivo*.

Como ya se comentó en el Capítulo 2 (apartado 1.2.1), anteriormente se ha demostrado que los hidrogeles supramoleculares basados en péptidos cortos son medios excelentes para la cristalización de proteínas, obteniéndose cristales compuestos proteína-hidrogel con características que dependen de la composición y estereoquímica del hidrogel.^{124,125} Más concretamente, se ha demostrado que los cristales de lisozima obtenidos en hidrogeles de FmocAA aumentan considerablemente el tiempo de disolución de los cristales en comparación con los obtenidos en otros hidrogeles peptídicos y de agarosa.¹²⁵ Basándonos en estos resultados nos planteamos el reto de cristalizar una proteína con fines terapéuticos con el objetivo de comprobar si estos geles podrían aumentar su estabilidad y mejorar su vida media *in vivo*. Para ello seleccionamos insulina ya que es una proteína de alto valor terapéutico, de la cual existen distintas formulaciones farmacéuticas con distintos perfiles farmacocinéticos y, además, su evaluación *in vivo* es relativamente simple.

Para ello lo primero que se tuvo que hacer fue optimizar el método de cristalización para obtener cristales pequeños y homogéneos que fueran compatibles con una administración subcutánea y que mantuvieran un perfil de liberación homogéneo. Empleando la técnica de “sembrado” (en inglés *seeding*) se consiguieron producir lotes reproducibles de cristales pequeños (de menos de 10 micras) aptos para su administración subcutánea *in vivo*, libres de cualquier aditivo tóxico y con una distribución de tamaño pequeña (Figura 1).

Como puede observarse en la Figura 2, una vez optimizada la preparación de los cristales tanto en agarosa como en hidrogeles de FmocAA, se midió la velocidad de disolución de ambos en condiciones similares a las fisiológicas, es decir, a 38 °C y pH 7.0. Se pudo comprobar que mientras que los cristales crecidos en agarosa presentaban disolución acelerada alcanzando un estado meseta a los 30 minutos, los cristales crecidos en FmocAA presentaban una disolución mucho más lenta siendo todavía significativa a 120 min.

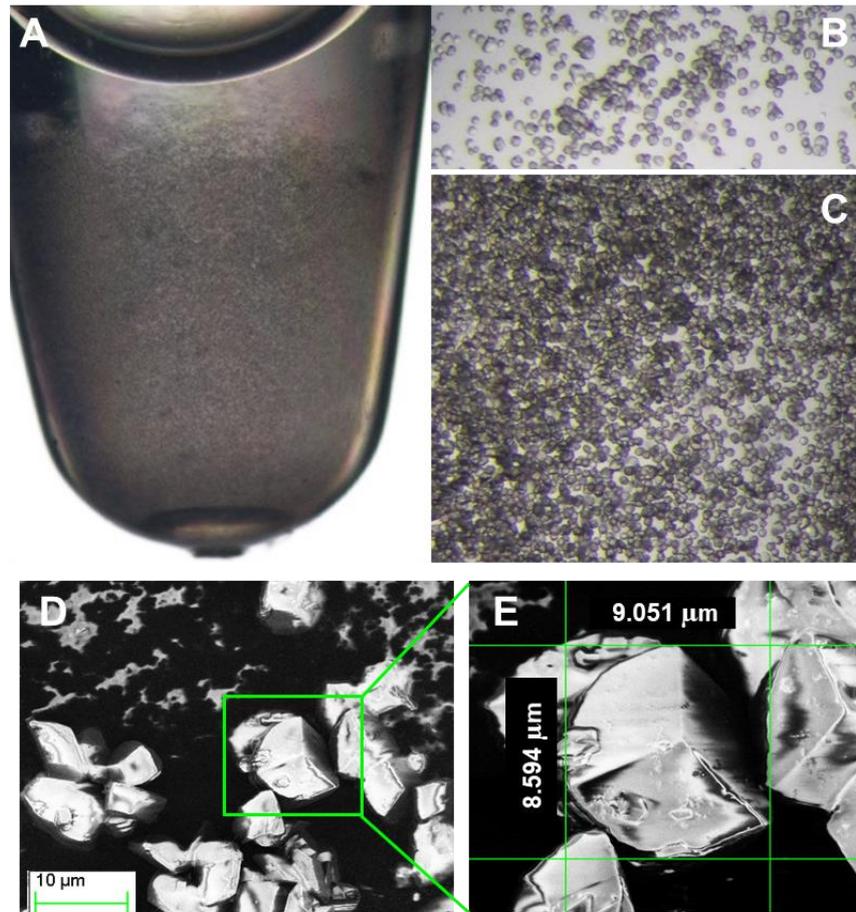


Figura 1. A) Imagen de microscopio óptico de cristales de insulina crecidos en hidrogeles de FmocAA mediante *seeding* en tubos Eppendorf. B) Detalle de zona de baja densidad de cristales de la imagen A. C) Detalle de zona de alta densidad de cristales de la imagen A. D) Imagen SEM de cristales de insulina crecidos en hidrogeles de FmocAA junto con (E) detalle de un cristal mostrando las dimensiones.

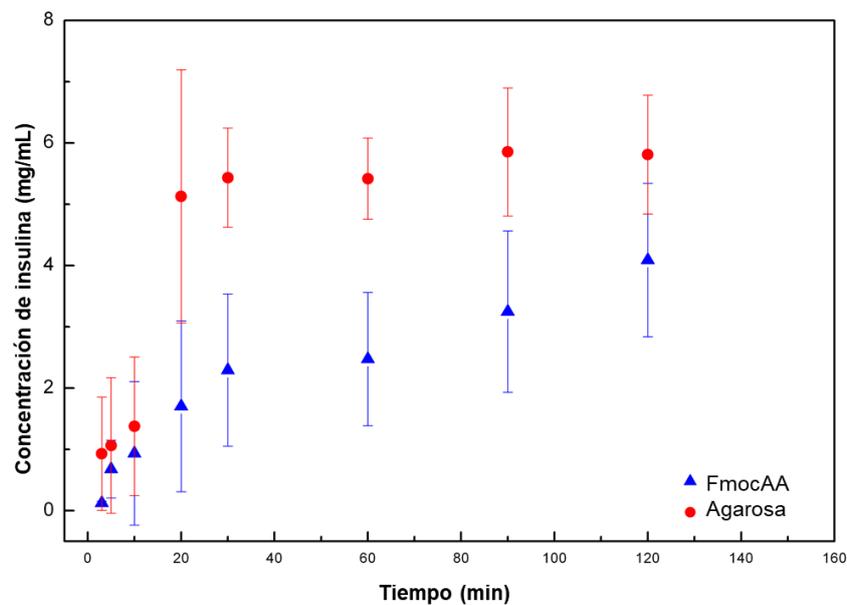


Figura 2. Velocidad de disolución de cristales de insulina a 38 °C y pH 7 crecidos en hidrogeles de FmocAA (azul) y agarosa (rojo).

La estabilidad física de los cristales obtenidos fue evaluada incubándolos a 50 °C durante 7 días (4 días a 50 °C equivalen a 2 años a temperatura ambiente).²⁷⁷ Se tomaron imágenes de microscopía óptica desde el día primero hasta el séptimo (también de los controles correspondientes a temperatura ambiente) con intención de evaluar la calidad de los cristales y observar posibles diferencias. Como puede comprobarse en la Figura 3, ambos tipos de cristales seguían siendo de gran calidad después del tratamiento térmico, presentando caras bien definidas análogas a los mantenidos a temperatura ambiente. Aunque estos experimentos son cualitativos y no pueden usarse para evaluar el grado real de degradación de la proteína, sí que constituyen una primera evidencia de estabilidad física de los cristales compuestos.

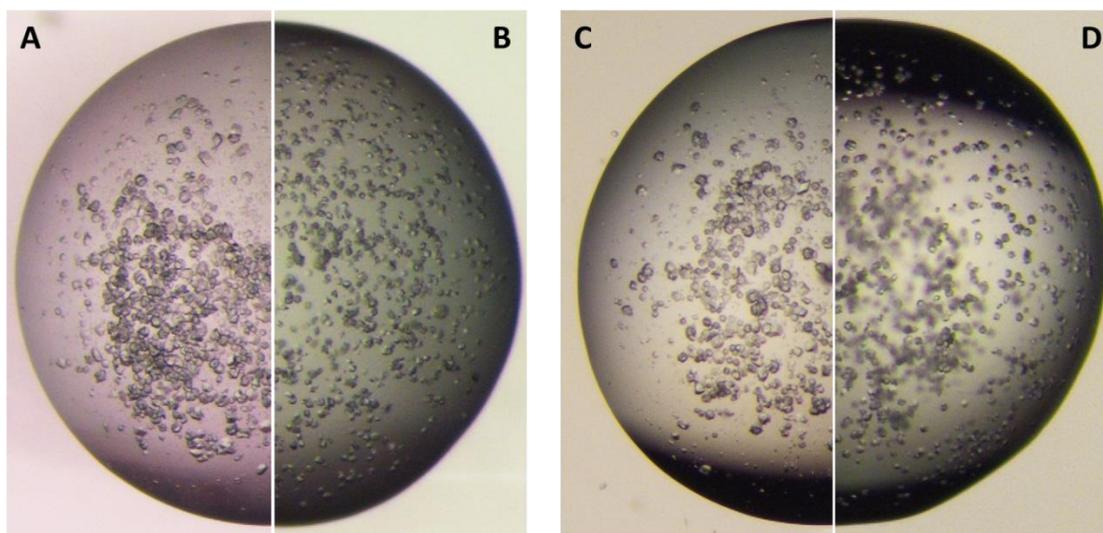


Figura 3. A la izquierda, cristales de insulina después de 7 días a temperatura ambiente crecidos en hidrogeles de (A) FmocAA y (B) agarosa. A la derecha, cristales de insulina después de 7 días a 50 °C crecidos en hidrogeles de (C) FmocAA y (D) agarosa.

Los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo en ratas normoglucémicas mediante administración subcutánea de las distintas formulaciones de insulina. Como puede observarse en la Figura 4, se consiguió una respuesta hipoglucémica similar empleando la misma dosis de insulina en disolución que en forma de cristales crecidos en agarosa. Sin embargo, empleando la misma dosis de cristales de insulina crecidos en FmocAA no se observó respuesta alguna (datos no mostrados), indicando una marcada disminución en la velocidad de liberación. Para poder realizar medidas comparativas, se tuvo que incrementar la dosis de insulina-FmocAA 5 veces respecto a los otros dos tipos de muestras (de 16.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 83.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$). En lo referente al comportamiento *in vivo* de las distintas formas de insulina “envejecidas” a 50 °C, se pudo comprobar (Figura 4) que la insulina en disolución perdía prácticamente la totalidad de su actividad biológica, mientras que los cristales de insulina obtenidos tanto en agarosa como en hidrogeles de FmocAA, mantenía su capacidad hipoglucémica después del tratamiento térmico.

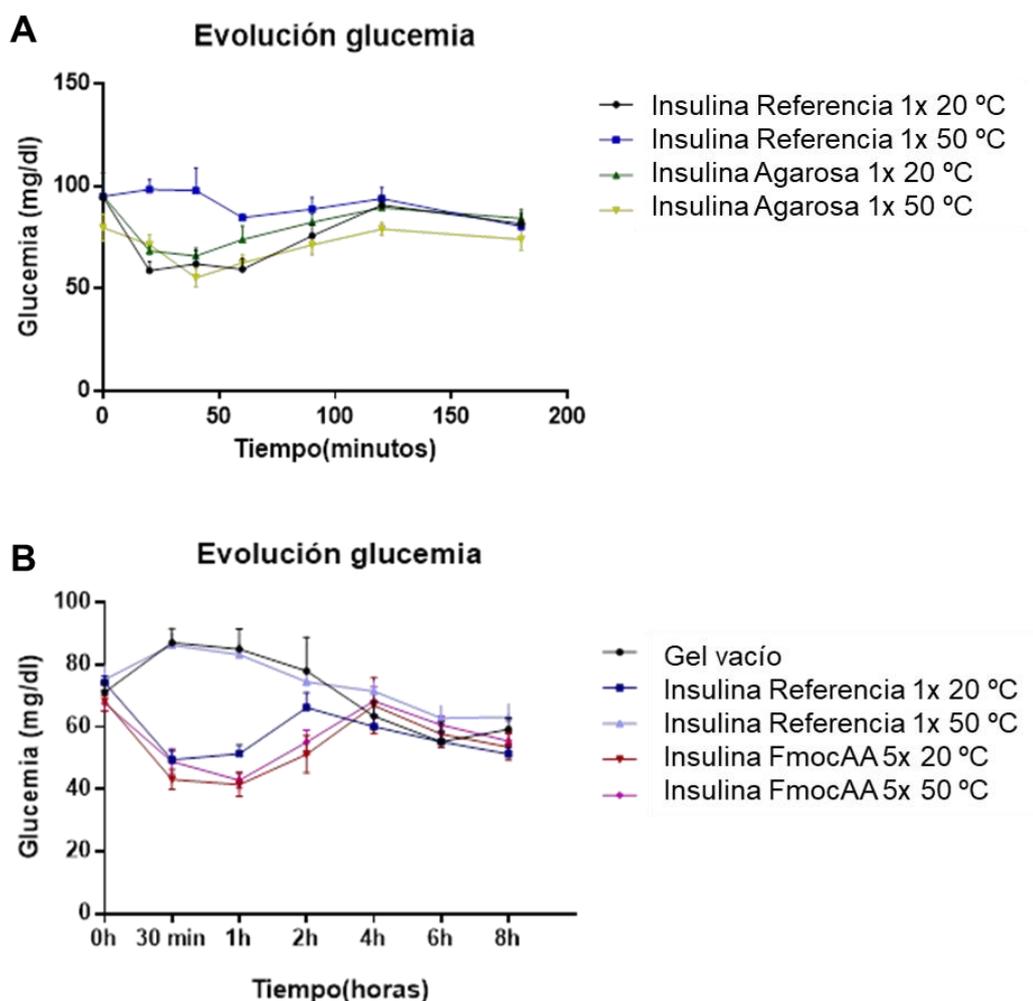


Figura 4. Evolución de la glucemia en ratas Wistar de 250 g tratadas con insulina humana. A) Tratadas con 16.73 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rata (1x) de insulina de referencia y en forma de cristales crecidos en hidrogeles de agarosa; ambos tipos de muestra mantenidos a 20 y 50 °C durante 7 días, N = 3-6. B) Tratadas con hidrogel de FmocAA vacío, 1x de insulina de referencia mantenida 7 días a 20 y 50 °C, y con 83.65 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rata (5x) de insulina en forma de cristales crecidos en hidrogeles de FmocAA.

De los resultados obtenidos en este trabajo se derivan las siguientes conclusiones: (1) Los cristales de insulina crecidos en hidrogeles tanto de agarosa como en FmocAA siguen siendo farmacológicamente activos. (2) Ambos tipos de cristales compuestos presentan una mayor estabilidad frente a la temperatura siguiendo siendo biológicamente activos después de haberlos mantenido a 50 °C durante 7 días. (3) Los cristales crecidos en FmocAA presenta una velocidad de disolución más lenta lo cual se traduce en un efecto de liberación retardada una vez administrados *in vivo*. Este efecto es menos significativo en los cristales crecidos en agarosa.

Este trabajo ha sido llevado a cabo en colaboración con los grupos de Dr. Fermín Sánchez de Medina (Dpto. Farmacología, Facultad de Farmacia, UGR), Dra. Olga Martínez-Augustin (Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UGR) y Dr. José A. Gavira (Laboratorio de Estudios Cristalográficos, Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Granada).

B. Descifrando la autoasociación bidimensional de Fmoc-dipéptidos en interfases fluidas.

Se realizó un estudio encaminado a evaluar la capacidad de una batería de Fmoc-dipéptidos (FmocGG, FmocAA, FmocLG, FmocRF, FmocCF, FmocMF y FmocFF) y Fmoc-aminoácidos (FmocY y FmocF) de autoasociarse supramolecularmente en interfases agua/aire consiguiéndose resultados exitosos para los Fmoc-dipéptidos: FmocFF, FmocMF y FmocCF (Figuras 5 y 6). Se pudo establecer que los parámetros moleculares $\log P$ (donde P es el coeficiente de reparto) y $-\log S$ (donde S es la solubilidad en agua) son suficientes para determinar, de forma predictiva, qué secuencia de aminoácidos debe tener el Fmoc-dipéptido para autoasociarse en superficie.

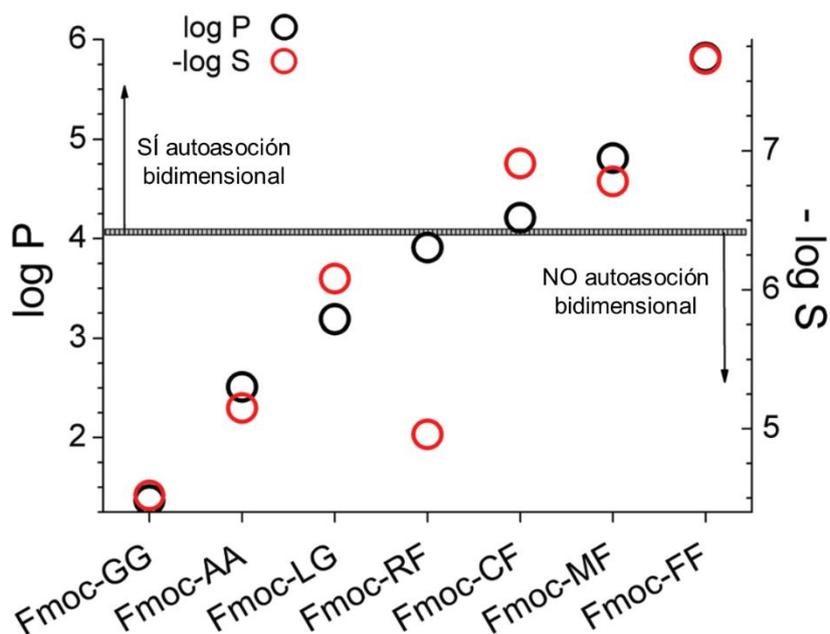


Figura 5. Representación de $\log P$ (círculos negros) y $-\log S$ (círculos rojos) para los Fmoc-dipéptidos estudiados. Se pueden diferenciar dos regímenes: zona de no autoasociación para valores de $\log P$ y $-\log S$ son inferiores a 4.1 y 6.4 respectivamente, y la zona de autoasociación donde los valores de $\log P$ y $-\log S$ superiores a 4.1 y 6.4 respectivamente.

También se pudo comprobar que la información quiral de los péptidos se mantenía en las superficies sólidas obtenidas, lo que constituye una vía relativamente sencilla de disponer de

superficies quirales con aplicaciones quiroópticas potenciales. La funcionalidad química de los aminoácidos también se mantuvo tras la autoasociación bidimensional de los Fmoc-dipéptidos. Este hecho permitió la obtención de nanopartículas de oro plasmónicas en las superficies bidimensionales generadas con el péptido FmocCF (Figura 6C), gracias a la disponibilidad de grupos tiol de los residuos cisteína.

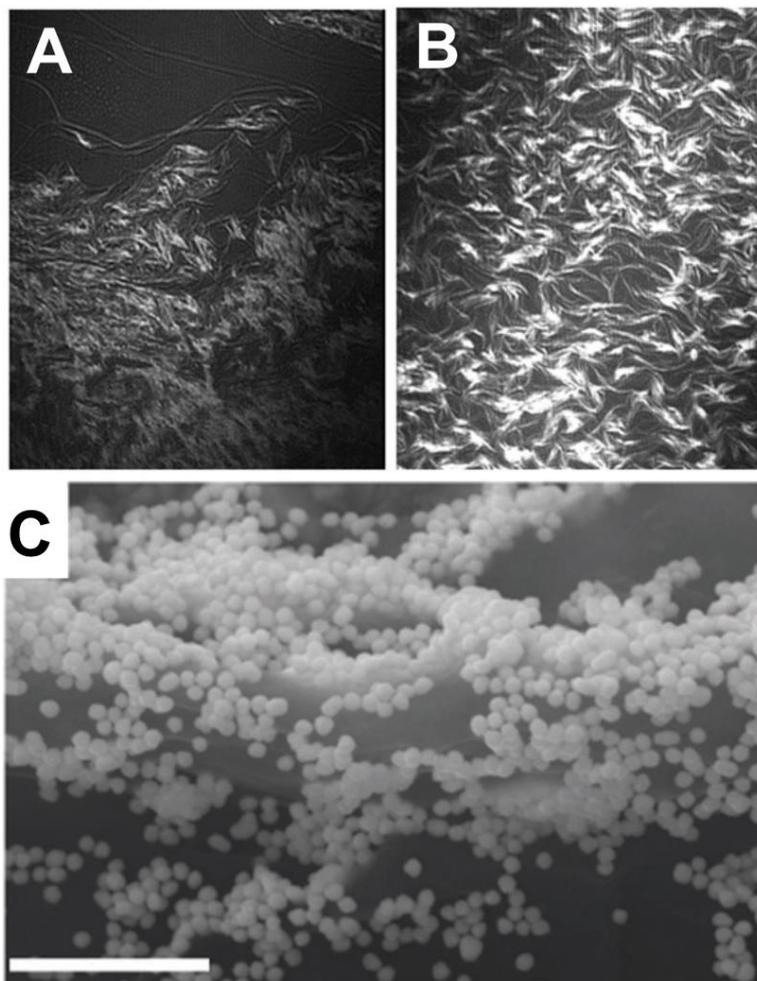


Figura 6. Imágenes de microscopía de ángulo de Brewster (BAM del inglés *Brewster Angle Microscopy*) de las superficies generadas en la interfase agua/aire por (A) FmocFF y (B) FmocMF donde la anchura de cada imagen se corresponde con 215 μm . C) Imagen SEM de superficie generada por FmocCF decorada con nanopartículas de oro (barra de escala 1 μm).

Este trabajo se ha realizado en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Juan J. Giner-Casares (Depto. de Química Física y Termodinámica Aplicada, Instituto Universitario de Investigación en Química Física y Nanoquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba) y fue publicado en la revista *Soft Matter* en 2018.²⁷⁸

C. Funcionalización de QDs con péptidos SS para medidas de pH intramitocondriales en líneas celulares de cáncer de mama.

Se ha llevado a cabo un proyecto de investigación encaminado a la medida del pH intramitocondrial en líneas celulares de cáncer de mama con el propósito último de relacionar el metabolismo de las células cancerígenas con su pH intramitocondrial y poder así determinar las diferencias entre líneas tumorales distintas, además de como herramienta diagnóstica.

Como sonda para las medidas de pH se eligió emplear QDs fluorescentes de seleniuro de cadmio/sulfuro de zinc (CdSe/ZnS) recubiertos con ácido mercaptopropiónico (MPA del inglés *MercaptoPropionic Acid*) (Figura 7). El tiempo de vida de la fluorescencia (τ) de los QDs se ve fuertemente afectada por procesos de transferencia de carga y, por lo tanto, la protonación o desprotonación del MPA unido a la superficie tiene un efecto directo sobre τ . Este fenómeno puede emplearse para medir cambios de pH en el entorno de los QDs funcionalizados con MPA (QDs-MPA) mediante medidas de τ .²⁷⁹

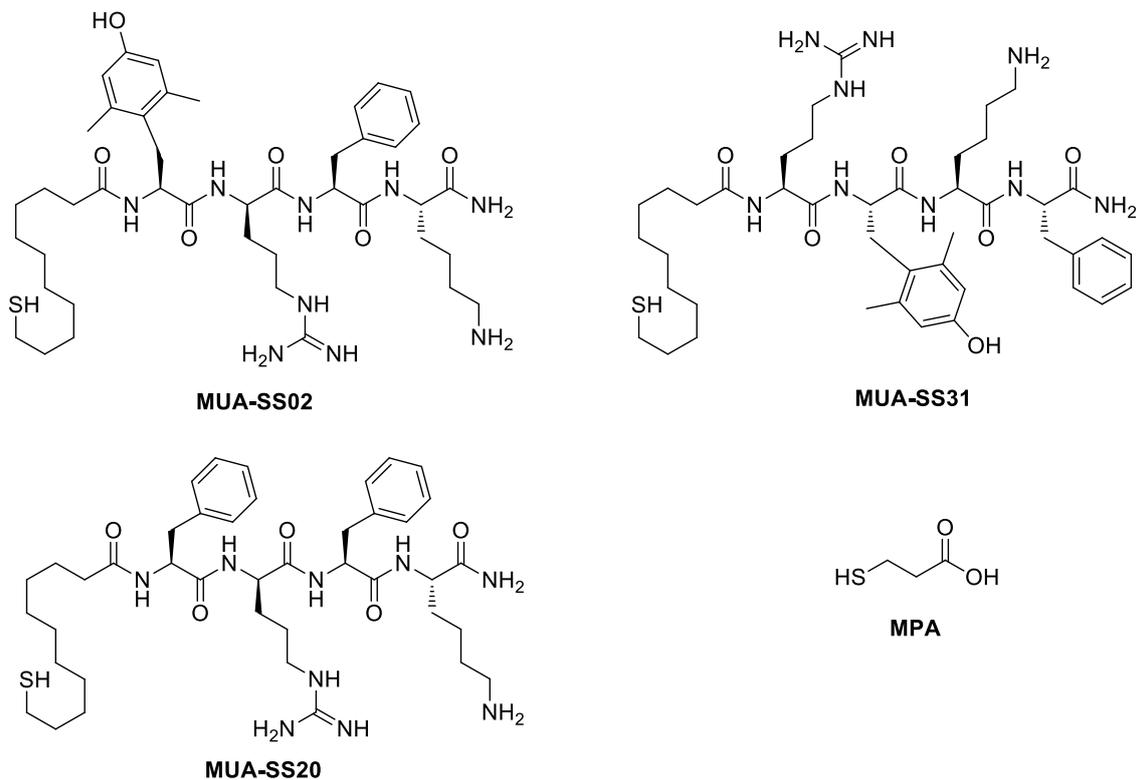


Figura 7. Estructuras de MUA-SS02, MUA-SS31, MUA-SS20 y MPA.

A modo de vehiculizar los QDs-MPA al interior de las mitocondrias se optó por funcionalizarlos con péptidos que fueran reconocidos específicamente por las membranas mitocondriales como es el caso de los tetrapéptidos sintéticos *Szeto-Schiller* (SS): SS02 (Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂,

donde Dmt es 2',6'-dimetiltirosina), SS20 (Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂) y SS31 (D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂).^{280,281} Al tener en su composición aminoácidos no proteínogénicos (Dmt y D-Arg) se optó por sintetizarlos mediante síntesis en fase sólida de péptidos (SPPS). Para conseguir una unión estable entre los QDs-MPA y los péptidos, éstos se modificaron acoplado ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA, del inglés *11-MercaptoUndecanoic Acid*) al extremo N terminal durante su síntesis por SPPS, obteniéndose así los derivados de péptido denominados como **MUA-SS02**, **MUA-SS20** y **MUA-SS31** (Figura 7). El grupo tiol del ácido MUA sirvió para coordinar los péptidos a la superficie de los QDs-MPA y la cadena hidrocarbonada actuó como espaciador.

Tras la realización de ensayos preliminares se pudo comprobar que los QDs-MPA con MUA-SS20 tenían el mejor comportamiento ya que se probó su capacidad para introducirse en las células y para responder eficientemente a cambios de pH.

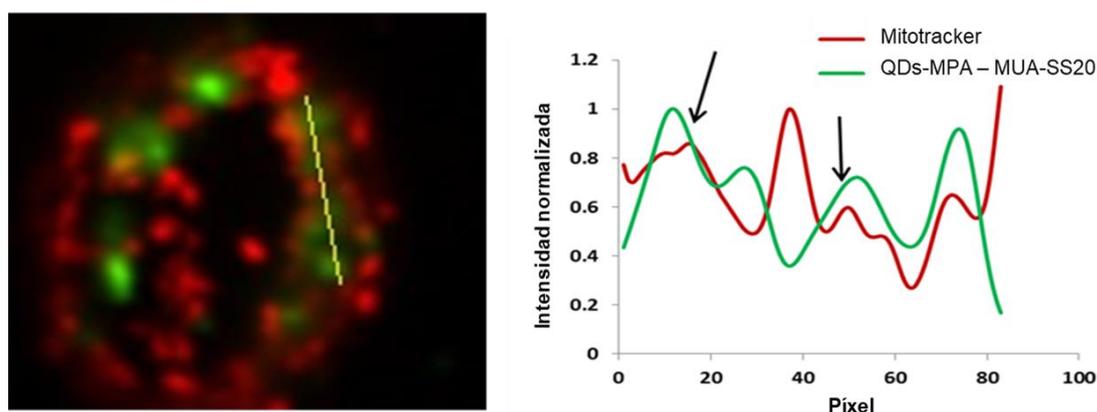


Figura 8. A la izquierda, imagen FLIM de célula de la línea MCF7 en la que se observa la fluorescencia del *mitotracker* en rojo y de los QDs-MPA funcionalizados con MUA-SS20 en verde. A la derecha, representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de ambos fluoróforos correspondiente a la línea amarilla dibujada en la imagen FLIM (izquierda).

Para comprobar la incorporación de las sondas en el interior de las mitocondrias, las células se incubaron en presencia de las sondas de QDs (con emisión fluorescente en el verde) junto con un marcador de mitocondrias con emisión fluorescente en el rojo (*Mitotracker Deep Red*). Tras observar las células en los canales rojo y verde de un microscopio de imagen por tiempo de vida de fluorescencia (FLIM del inglés *Fluorescence Lifetime Imaging Microscope*) se pudo observar que los QDs-MPA funcionalizados con MUA-SS20 se encontraban efectivamente en las mitocondrias (ejemplo en Figura 8). A través de las medidas de τ de los QDs derivatizados en función del pH sin células, se estableció una recta de calibrado en la que luego se interpolaron los valores de τ medidos *in vitro* en células, obteniéndose los valores de pH intramitocondriales.

Este proyecto se ha realizado en colaboración con los grupos del Dr. Ángel Orte (Depto. de Físicoquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada) y del Dr. Miquel Martín Hernández (Depto. de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada).

D. Inmovilización de nanopartículas de Pd en hidrogeles de agarosa para su empleo en "química BOOM".

Durante el transcurso de esta tesis doctoral se realizó una estancia en el grupo del Dr. Asier Unciti-Broceta en el *Innovative Therapeutic Lab* ubicado en el *Edinburgh Cancer Research Centre* (Universidad de Edimburgo, Reino Unido).

Durante dicha estancia se estudió la posibilidad de formar hidrogeles de agarosa con un tipo especial nanopartículas de Pd (**PdNPs**) coloidales. Con esta estrategia se pretendió inmovilizar las nanopartículas en una matriz biocompatible y permeable al paso de moléculas que redujese la toxicidad del Pd, de modo que los hidrogeles híbridos obtenidos pudiesen emplearse en química organometálica bioortogonal (química BOOM del inglés *Bioorthogonal Organometallic Chemistry*).²⁸²

La química BOOM es una línea de investigación de reciente creación que se centra en llevar a cabo transformaciones químicas mediadas por metales de transición en condiciones fisiológicas compatibles con los seres vivos. Debido a que los seres vivos no son capaces de llevar a cabo ese tipo de transformaciones, el empleo de esta química dentro de un ser vivo permite un alto grado de selectividad (bioortogonalidad) y por tanto eficacia y seguridad, activándose o modificándose únicamente aquellas moléculas que son sustrato de estos metales de transición. El grupo del Dr. Unciti-Broceta ha sido uno de los principales grupos de investigación involucrados en el desarrollo de esta línea de investigación.^{12,282,283} En la actualidad es un grupo de referencia en el empleo de esta química BOOM en química médica mediante la activación selectiva *in vivo* de profármacos que son sensibles a catalizadores metálicos y que en presencia de ellos se activan a fármacos realizando su actividad terapéutica de una manera local, por tanto, aumentando su eficacia y reduciendo su toxicidad. En la actualidad para que esta química tenga utilidad *in vivo*, los catalizadores metálicos ocluidos en micropartículas o nanopartículas poliméricas tienen que implantarse mediante cirugía en la zona donde se pretenda llevar a cabo el efecto terapéutico.

Previamente a la colaboración, en el grupo del Dr. Unciti-Broceta se demostró que las PdNPs coloidales podían catalizar *in vitro* la transformación de profármacos en fármacos

anticancerígenos mediante química BOOM con resultados excelentes. El inconveniente de esta metodología es que el Pd “desnudo” puede ser tóxico en ciertas concentraciones y, el hecho de que las nanopartículas empleadas formen suspensiones coloidales estables, podría resultar en la imposibilidad de localizarlas en el tejido a tratar en una futura aplicación *in vivo*. Para resolver estos inconvenientes se planteó ocluir las PdNPs en hidrogeles de agarosa de modo que su difusión estuviese restringida por la naturaleza tridimensional del hidrogel, pero que, a su vez, permitiese la entrada y salida de moléculas (profármacos y fármacos respectivamente). Atrapar las nanopartículas en el hidrogel restringiría el contacto célula-nanopartícula disminuyendo la toxicidad.

Se prepararon hidrogeles de agarosa con distintas concentraciones de Pd usando una estrategia similar a la descrita en el apartado 3.3.3 del Capítulo 2, utilizando suspensiones de PdNPs en lugar de agua y en condiciones de esterilidad. Dichos hidrogeles se prepararon bien en tubos Eppendorf o en pocillos para ingeniería tisular (Figura 9).



Figura 9. Fotografías de hidrogeles de agarosa con PdNPs preparados en pocillos para ingeniería tisular introducidos en pocillos de cultivo y sumergidos en medio de cultivo. La fotografía de la parte superior se corresponde con los instantes iniciales y la inferior tras 4 días en incubación a 37 °C.

Se estudió la capacidad catalítica de las PdNPs ocluidas en los hidrogeles mediante medidas de fluorescencia resultado de la transformación catalítica mediada por Pd de **Pro-Rodamina110** (no fluorescente) a **Rodamina110** (fluorescente) (Figura 10),^{284,285} añadida en disolución sobre los hidrogeles preparados en tubos Eppendorf. Los resultados obtenidos con los hidrogeles híbridos fueron similares a los obtenidos con las PdNPs en suspensión en las mismas concentraciones

respecto al volumen final del experimento (Figura 10), demostrándose así, que la capacidad catalítica de las partículas no se reduce notablemente por estar en el interior de los hidrogeles y que, además, la matriz tridimensional permite el intercambio de moléculas con el medio. Respecto a la salida de las PdNPs, no se observaron a simple vista PdNPs en el líquido sobre los hidrogeles tras el primer ciclo de medidas de actividad catalítica, pero tras realizar 4 ciclos, casi no se observó actividad, y los hidrogeles perdieron la coloración negra intensa que tenían gracias a las PdNPs. Merece la pena mencionar que estos experimentos se realizaron con agitación intensa en ciclos de 24 horas cada uno.

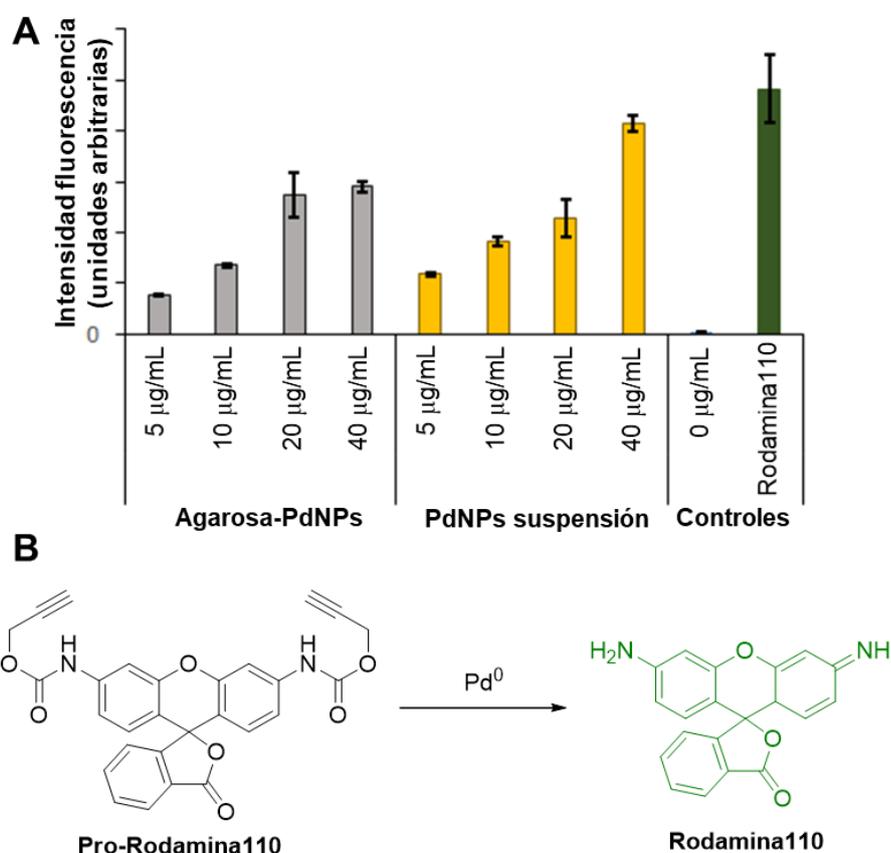


Figura 10. A) Representación de la intensidad medida de Rodamina110 tras la catálisis producida por distintas concentraciones de PdNPs respecto al volumen final del experimento, ocluidas en hidrogeles de agarosa o en suspensión, N = 3 B) Esquema de reacción de la transformación de Pro-Rodamina110 en Rodamina110 catalizada por Pd⁰.

Se llevaron a cabo estudios de biocompatibilidad de los hidrogeles híbridos preparándolos en pocillos de ingeniería tisular con fondo poroso de modo que se pudiesen sumergir en el líquido sobrenadante que cubre las células de cáncer de pulmón (A549) situadas en el fondo de un pocillo de cultivo celular (Figura 9). Tras 3 días de incubación se pudo comprobar que la viabilidad celular era del 100% en todas las concentraciones estudiadas de PdNPs en hidrogeles de agarosa

(aunque ligeramente inferior en la concentración de Pd más alta) y superior a la de las PdNPs en suspensión a las concentraciones más altas (Figura 11).

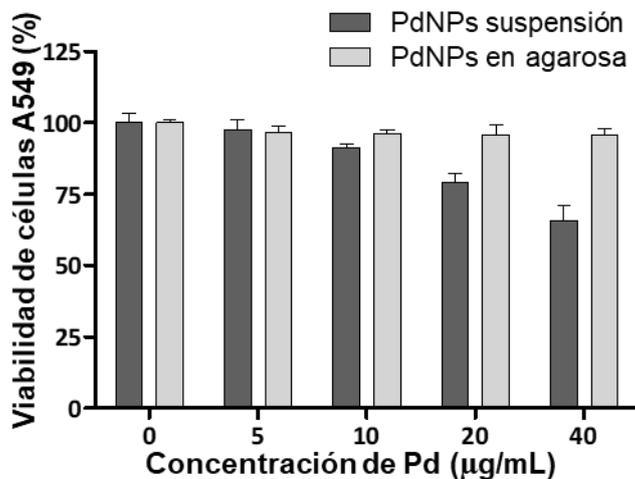


Figura 11. Estudio comparativo de viabilidad celular de células de cáncer de pulmón (A549) de distintas concentraciones de PdNPs en suspensión y ocluidas en hidrogeles de agarosa.

A modo de conclusión, se han obtenido hidrogeles de agarosa con PdNPs coloidales ocluidas en su interior, lo que ha servido para retener su difusión libre y mejorar su biocompatibilidad, todo ello sin disminuir su capacidad catalítica.

Este proyecto se ha realizado en colaboración con los grupos de investigación del Dr. Asier Unciti-Broceta y del Dr. Jesús Santamaría (Departamento de Ingeniería Química, Instituto de Nanociencia de Aragón, Universidad de Zaragoza) quienes proporcionaron las PdNPs.

GENERAL CONCLUSIONS

Chapter 1

1. Magnetic supramolecular hydrogels have been obtained by self-assembly of FmocFF in the presence of core-shell iron nanoparticles with polyethylene glycol covering, both in presence and absence of an external magnetic field. It has been demonstrated that the secondary arrangement of FmocFF peptide was largely conserved in the hydrogels containing FeNPs.
2. An external magnetic field applied during gelation process resulted in the formation of column-like aggregates of FeNPs that followed the direction of the magnetic field. These structures remained stable inside the gel after magnetic field removal due to the interwoven nature of the fiber peptides with the FeNPs column-like aggregates.
3. It has been observed that the diffusion of a small solute through the hydrogel network was improved in hydrogels containing FeNPs.
4. The presence of the FeNPs column-like structures interwoven with peptide fibers of the hydrogels, resulted in an enhancement of the mechanical strength of the hybrid hydrogel in comparison to the native hydrogel or with the hydrogel having FeNPs randomly dispersed.
5. The magnetic hydrogels prepared in the presence of a magnetic field showed anisotropic mechanical properties.

Chapter 2

1. Novel supramolecular hydrogels with FmocCF and FmocMF peptides have been prepared.
2. It has been demonstrated that the FmocCF, FmocMF and FmocY hydrogels are excellent media for protein crystallization. The results obtained using the FmocCF hydrogel were remarkable taking into account that the thiol groups of cysteine could react with proteins.
3. It has been proven that the FmocCF fibers occluded within the crystal can exert a local protection of the three-dimensional structure of the protein against radiation damage. This protective effect was not observed in agarose grown crystals or when cysteine was used as additive in solution.

Chapter 3

1. Hybrid FmocFF-based supramolecular hydrogels with SWCNTs have been prepared and characterized.
2. High quality lysozyme crystals have been obtained within the hybrid hydrogels, showing the effective incorporation of SWCNTs within the crystals.
3. Mechanical, catalytical and electric properties of lysozyme-SWCNT hybrid crystals have been characterized, proving that the hybridization resulted in stiffer, catalytically active enhanced and electrically conductive protein crystals.

Chapter 4

1. It has been proven that lysine is able to exert an effect over the size of MNPs produced under biomimetic mineralization conditions. In the presence of Lys the MNPs showed a higher average size which increased as Lys concentration increased.
2. The Arg concentration had no effect on the average size of MNPs, obtaining MNPs of a size almost equal to MNP-control.
3. The surface characterization of Lys-MNP demonstrated that lysine was onto particle's surface, arranged with carboxylic groups exposed to the environment, conferring negative charge to the nanoparticles at physiological pH.
4. The magnetic characterization of Lys-MNP showed that such nanoparticles had superparamagnetic behaviour at room temperature and that Lys10-MNP had low polydispersity.
5. Using lysine as additive for biomimetic mineralization of magnetite, unlike proteins or polyaminoacids, gives rise a protocol more economic and eco-friendly. These advantages open the door to use this protocol for large scale production.

Chapter 5

A) The *in vivo* effect of insulin crystals grown inside Fmoc-dialanine (FmocAA) and agarose hydrogels has been tested. It has been demonstrated that these composite crystals are physically stable being bioactive after maintaining them at 50 °C for 7 days. Moreover, insulin crystals grown in FmocAA presented slower dissolution rate and a slow release profile *in vivo*.

B) A systematic study of the physicochemical properties required for the bidimensional self-assembly at the air/water interface of Fmoc-dipeptides has been developed. The ability of these peptides to self-assemble at the air/water interface has been related for first time with the $\log P$ and $-\log S$ values.

D) Quantum dots (QDs) coated with mercaptopropionic acid (MPA) and the oligopeptides SS02, SS20 and SS31 functionalized with 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) have been produced. The MPA has served as pH-sensitive group and the oligopeptides functionalized with MUA (MUA-SS02, MUA-SS20 y MUA-SS31) drove the modified QDs inside of a number of breast tumour lines cells mitochondria. Using this strategy, the inner pH of mitochondria of that cells has been measured.

E) Palladium nanoparticles (PdNPs) occluded inside agarose hydrogels have been produced. The catalytic activity of the PdNPs have been retained while their toxicity against lung cancer cells have been reduced.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 M. Faustini, L. Nicole, E. Ruiz-Hitzky and C. Sanchez, *Adv. Funct. Mater.*, 2018, **28**, 1–30.
- 2 E. Ruiz-Hitzky, P. Aranda and M. Darder, in *CRC Concise Encyclopedia of Nanotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL, US, 2015, p. 330.
- 3 N. Nassif and J. Livage, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 849–859.
- 4 C. Sanchez, H. Arribart and M. M. G. Guille, *Nat. Mater.*, 2005, **4**, 277–288.
- 5 E. Bäuerlein, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2003, **42**, 614–641.
- 6 J. R. Young and K. Henriksen, *Rev. Mineral. Geochemistry*, 2001, **54**, 189–215.
- 7 D. Faivre and T. U. Godec, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2015, **54**, 4728–4747.
- 8 S. Mann, *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, UK, 2001.
- 9 R. A. Petros and J. M. Desimone, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2010, **9**, 615–627.
- 10 M. Arruebo, M. Galán, N. Navascués, C. Téllez, C. Marquina, M. Ricardo Ibarra and J. Santamaría, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 1911–1919.
- 11 H. Otsuka, Y. Nagasaki and K. Kataoka, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, **64**, 246–255.
- 12 R. M. Yusop, A. Unciti-Broceta, E. M. V. Johansson, R. M. Sánchez-Martín and M. Bradley, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 239–243.
- 13 M. Liang, L. Wang, R. Su, W. Qi, M. Wang, Y. Yu and Z. He, *Catal. Sci. Technol.*, 2013, **3**, 1910–1914.
- 14 H. Wei and Y. Lu, *Chem. - An Asian J.*, 2012, **7**, 680–683.
- 15 H. Tabe, S. Abe, T. Hikage, S. Kitagawa and T. Ueno, *Chem. - An Asian J.*, 2014, **9**, 1373–1378.
- 16 M. Guli, E. M. Lambert, M. Li and S. Mann, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2010, **49**, 520–523.
- 17 O. L. Muskens, M. W. England, L. Danos, M. Li and S. Mann, *Adv. Funct. Mater.*, 2013, **23**, 281–290.
- 18 H. Wei, S. House, J. Wu, J. Zhang, Z. Wang, Y. He, E. J. Gao, Y. Gao, H. Robinson, W. Li, J. Zuo, I. M. Robertson and Y. Lu, *Nano Res.*, 2013, **6**, 627–634.
- 19 P. J. Flory, *Discuss Faraday Soc.*, 1974, **57**, 7–11.
- 20 P. Terech and R. G. Weiss, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 3133–3160.
- 21 N. M. Sangeetha and U. Maitra, *Chem. Soc. Rev.*, 2005, **34**, 821–836.
- 22 X. Du, J. Zhou, J. Shi and B. Xu, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 13165–13307.
- 23 K. Brenzinger, *Z. Physiol. Chem.*, 1892, **16**, 552–588.
- 24 R. A. Gortner and W. F. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1921, **43**, 2199–2202.
- 25 F. M. Menger and K. L. Caran, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 11679–11691.
- 26 A. R. Hirst, B. Escuder, J. F. Miravet and D. K. Smith, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2008, **47**, 8002–8018.

- 27 L. A. Estroff and A. D. Hamilton, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 1201–1217.
- 28 S. S. Babu, V. K. Praveen and A. Ajayaghosh, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 1973–2129.
- 29 P. Dastidar, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 2699–2715.
- 30 X. Chu, P. Xing, S. Li, M. Ma, J. Hao and A. Hao, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 1969–1978.
- 31 A. Bernet, M. Behr and H. W. Schmidt, *Soft Matter*, 2011, **7**, 1058–1065.
- 32 S. Sun, J. Song, Z. Shan and R. Feng, *J. Electroanal. Chem.*, 2012, **676**, 1–5.
- 33 S. A. Joshi and N. D. Kulkarni, *Chem. Commun.*, 2009, **399**, 2341–2343.
- 34 S. Roy, D. Kumar Maiti, S. Panigrahi, D. Basak and A. Banerjee, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 11053–11060.
- 35 J. Yang, M. B. Dewal, D. Sobransingh, M. D. Smith, Y. Xu and L. S. Shimizu, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 102–110.
- 36 S. M. Park and B. H. Kim, *Soft Matter*, 2008, **4**, 1995–1997.
- 37 C. Bao, R. Lu, M. Jin, P. Xue, C. Tan, Y. Zhao and G. Liu, *Carbohydr. Res.*, 2004, **339**, 1311–1316.
- 38 M. Reches and E. Gazit, *Science*, 2003, **300**, 625–627.
- 39 N. S. De Groot, T. Parella, F. X. Aviles, J. Vendrell and S. Ventura, *Biophys. J.*, 2007, **92**, 1732–1741.
- 40 T. H. Sharp, M. Bruning, J. Mantell, R. B. Sessions, A. R. Thomson, N. R. Zaccai, R. L. Brady, P. Verkade and D. N. Woolfson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012, **109**, 13266–13271.
- 41 Y. Zhang, Y. Kuang, Y. Gao and B. Xu, *Langmuir*, 2011, **27**, 529–537.
- 42 L. Chen, S. Revel, K. Morris, L. C. Serpell and D. J. Adams, *Langmuir*, 2010, **26**, 13466–13471.
- 43 J. Nanda, A. Biswas and A. Banerjee, *Soft Matter*, 2013, **9**, 4198–4208.
- 44 V. Jayawarna, A. Smith, J. E. Gough and R. V. Ulijn, *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, **35**, 535–537.
- 45 A. Mahler, M. Reches, M. Rechter, S. Cohen and E. Gazit, *Adv. Mater.*, 2006, **18**, 1365–1370.
- 46 Y. Zhang, H. Gu, Z. Yang and B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 13680–13681.
- 47 K. Tao, A. Levin, L. Adler-Abramovich and E. Gazit, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**, 3935–3953.
- 48 A. Friggeri, B. L. Feringa and J. Van Esch, *J. Control. Release*, 2004, **97**, 241–248.
- 49 H. Wang, W. Zhang, X. Dong and Y. Yang, *Talanta*, 2009, **77**, 1864–1868.
- 50 A. M. Smith, R. J. Williams, C. Tang, P. Coppo, R. F. Collins, M. L. Turner, A. Saiani and R. V. Ulijn, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 37–41.
- 51 D. J. Adams, M. F. Butler, W. J. Frith, M. Kirkland, L. Mullen and P. Sanderson, *Soft Matter*, 2009, **5**, 1856–1862.
- 52 Y. Pocker and E. Green, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 113–119.

- 53 F. Zhao, Y. Gao, J. Shi, H. M. Browdy and B. Xu, *Langmuir*, 2011, **27**, 1510–1512.
- 54 M. Ikeda, R. Ochi, Y. S. Kurita, D. J. Pochan and I. Hamachi, *Chem. - A Eur. J.*, 2012, **18**, 13091–13096.
- 55 Z. Yang, H. Gu, D. Fu, P. Gao, J. K. Lam and B. Xu, *Adv. Mater.*, 2004, **16**, 1440–1444.
- 56 E. R. Draper and D. J. Adams, *Chem*, 2017, 3, 390–410.
- 57 J. Raeburn, C. Mendoza-Cuenca, B. N. Cattoz, M. A. Little, A. E. Terry, A. Zamith Cardoso, P. C. Griffiths and D. J. Adams, *Soft Matter*, 2015, **11**, 927–935.
- 58 J. Raeburn, G. Pont, L. Chen, Y. Cesbron, R. Lévy and D. J. Adams, *Soft Matter*, 2012, **8**, 1168–1174.
- 59 L. Chen, J. Raeburn, S. Sutton, D. G. Spiller, J. Williams, J. S. Sharp, P. C. Griffiths, R. K. Heenan, S. M. King, A. Paul, S. Furzeland, D. Atkins and D. J. Adams, *Soft Matter*, 2011, **7**, 9721–9727.
- 60 W. Helen, P. De Leonardis, R. V. Ulijn, J. Gough and N. Tirelli, *Soft Matter*, 2011, **7**, 1732–1740.
- 61 V. Jayawarna, S. M. Richardson, A. R. Hirst, N. W. Hodson, A. Saiani, J. E. Gough and R. V. Ulijn, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 934–943.
- 62 M. Zhou, A. M. Smith, A. K. Das, N. W. Hodson, R. F. Collins, R. V. Ulijn and J. E. Gough, *Biomaterials*, 2009, **30**, 2523–2530.
- 63 G. Pont, L. Chen, D. G. Spiller and D. J. Adams, *Soft Matter*, 2012, **8**, 7797.
- 64 L. Chen, S. Revel, K. Morris, D. G. Spiller, L. C. Serpell and D. J. Adams, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 6738–6740.
- 65 J. Wang, Z. Wang, J. Gao, L. Wang, Z. Yang, D. Kong and Z. Yang, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 7892–7896.
- 66 R. Huang, W. Qi, L. Feng, R. Su and Z. He, *Soft Matter*, 2011, **7**, 6222–6230.
- 67 J. Nanda, B. Adhikari, S. Basak and A. Banerjee, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 12235–12244.
- 68 S. Roy and A. Banerjee, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 2105–2111.
- 69 B. Adhikari and A. Banerjee, *Soft Matter*, 2011, **7**, 9259–9266.
- 70 M. Ikeda, S. Ueno, S. Matsumoto, Y. Shimizu, H. Komatsu, K. I. Kusumoto and I. Hamachi, *Chem. - A Eur. J.*, 2008, **14**, 10808–10815.
- 71 A. Wang, W. Shi, J. Huang and Y. Yan, *Soft Matter*, 2016, **12**, 337–357.
- 72 M. Ebara, Y. Kotsuchibashi, R. Narain, N. Idota, Y.-J. Kim, J. M. Hoffman, K. Uto and T. Aoyagi, *Smart biomaterials*, Springer Japan, Tokyo, Japan, 2014.
- 73 A. Döring, W. Birnbaum and D. Kuckling, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 7391–7420.
- 74 E. I. Anastasova, V. Ivanovski, A. F. Fakhardo, A. I. Lepeshkin, S. Omar, A. S. Drozdov and V. V. Vinogradov, *Soft Matter*, 2017, **13**, 8651–8660.
- 75 J. Thévenot, H. Oliveira, O. Sandre and S. Lecommandoux, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**,

- 7099–7116.
- 76 M. Zrínyi, L. Barsi and A. Büki, *J. Chem. Phys.*, 1996, **104**, 8750–8756.
- 77 X. Zhao, J. Kim, C. A. Cezar, N. Huebsch, K. Lee, K. Bouhadir and D. J. Mooney, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011, **108**, 67–72.
- 78 R. Langer and D. A. Tirrell, *Nature*, 2004, **428**, 487–492.
- 79 M. P. Lutolf and J. A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.*, 2005, **23**, 47–55.
- 80 L. Rodriguez-Arco, I. A. Rodriguez, V. Carriel, A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, P. Kuzhir, J. D. G. Duran and M. T. Lopez-Lopez, *Nanoscale*, 2016, **8**, 8138–8150.
- 81 Z. Yang, H. Gu, J. Du, J. Gao, B. Zhang, X. Zhang and B. Xu, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 7349–7357.
- 82 J. Chatterjee, M. Bettge, Y. Haik and C. Jen Chen, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2005, **293**, 303–309.
- 83 D. J. Adams, L. M. Mullen, M. Berta, L. Chen and W. J. Frith, *Soft Matter*, 2010, **6**, 1971–1980.
- 84 V. Puente-Muñoz, J. M. Paredes, S. Resa, A. M. Ortuño, E. M. Talavera, D. Miguel, J. M. Cuerva and L. Crovetto, *Sensors Actuators, B Chem.*, 2017, **250**, 623–628.
- 85 P. Kapusta, M. Wahl, A. Benda, M. Hof and J. Enderlein, *J. Fluoresc.*, 2007, **17**, 43–48.
- 86 S. Rüttinger, P. Kapusta, M. Patting, M. Wahl and R. Macdonald, *J. Fluoresc.*, 2010, **20**, 105–114.
- 87 N. Fatin-Rouge, K. Starchev and J. Buffle, *Biophys. J.*, 2004, **86**, 2710–2719.
- 88 J. M. Paredes, S. Casares, M. J. Ruedas-Rama, E. Fernandez, F. Castello, L. Varela and A. Orte, *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, **13**, 9400–9418.
- 89 H. H. Winter, *Polym. Eng. Sci.*, 1987, **27**, 1698–1702.
- 90 G. Bossis, O. Volkova, S. Lacis and A. Meunier, *Lect. Notes Phys.*, 2002, **594**, 201–230.
- 91 B. Ding, Y. Li, M. Qin, Y. Ding, Y. Cao and W. Wang, *Soft Matter*, 2013, **9**, 4672–4680.
- 92 B. Adhikari, G. Palui and A. Banerjee, *Soft Matter*, 2009, **5**, 3452–3460.
- 93 A. Banerjee, G. Palui and A. Banerjee, *Soft Matter*, 2008, **4**, 1430–1437.
- 94 X. Mu, K. M. Eckes, M. M. Nguyen, L. J. Suggs and P. Ren, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 3562–3571.
- 95 D. Bonn and M. M. Denn, *Science*, 2009, **324**, 1401–1402.
- 96 L. F. Mottram, S. Boonyarattanakalin, R. E. Kovel and B. R. Peterson, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 581–584.
- 97 A. Orte, L. Crovetto, E. M. Talavera, N. Boens and J. M. Alvarez-Pez, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **109**, 734–747.
- 98 S. Smith, C. Cianti and R. Grima, *J. R. Soc. Interface*, 2017, **14**, 20170047.
- 99 H. Sanabria, Y. Kubota and M. N. Waxham, *Biophys. J.*, 2007, **92**, 313–322.

- 100 A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, I. A. Rodríguez, V. Carriel, J. A. Marins, A. Zubarev, J. D. G. Duran and M. T. Lopez-Lopez, *Soft Matter*, 2017, **13**, 2928–2941.
- 101 Z. Hashin and B. W. Rosen, *J. Appl. Mech.*, 1964, **31**, 223–232.
- 102 E. Moghimi, A. R. Jacob, N. Koumakis and G. Petekidis, *Soft Matter*, 2017, **13**, 2371–2383.
- 103 F. L. Hünefeld, in *Der Chemismus in der tierescher Organization*, Leipzig University, Leipzig, Germany, 1840, p. 160.
- 104 O. Funke, *Z. Rat Med*, 1851, **1**, 172–179.
- 105 A. McPherson, *J. Cryst. Growth*, 1991, **110**, 1–10.
- 106 A. McPherson and J. A. Gavira, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.*, 2014, **70**, 2–20.
- 107 A. A. Chernov, *J. Struct. Biol.*, 2003, **142**, 3–21.
- 108 P. G. Vekilov and A. A. Chernov, *The physics of protein crystallization*, 2002, vol. 57.
- 109 B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.*, 1968, **33**, 491–497.
- 110 L. Z. Vilenchik, J. P. Griffith, N. St. Clair, M. A. Navia and A. L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 4290–4294.
- 111 V. N. Morozov, G. S. Kachalova, V. U. Evtodienko, N. F. Lanina and T. Y. Morozova, *Eur. Biophys. J.*, 1995, **24**, 93–98.
- 112 S. Abe and T. Ueno, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 21366–21375.
- 113 S. Sugiyama, N. Shimizu, G. Sazaki, M. Hirose, Y. Takahashi, M. Maruyama, H. Matsumura, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue and Y. Mori, *Cryst. Growth Des.*, 2013, **13**, 1899–1904.
- 114 B. Lorber, C. Sauter, A. Théobald-Dietrich, A. Moreno, P. Schellenberger, M. C. Robert, B. Capelle, S. Sanglier, N. Potier and R. Giegé, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2009, **101**, 13–25.
- 115 A. E. S. Van Driessche, F. Ota, J. A. Gavira and G. Sazaki, *Cryst. Growth Des.*, 2008, **8**, 3623–3629.
- 116 O. Vidal, M. C. Robert and F. Boué, *J. Cryst. Growth*, 1998, **192**, 257–270.
- 117 J. A. Gavira and J. M. García-Ruiz, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2002, **58**, 1653–1656.
- 118 D. W. Zhu, B. Lorber, C. Sauter, J. D. Ng, P. Bénas, C. Le Grimellec and R. Giegé, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2001, **57**, 552–558.
- 119 C. Biertümpfel, J. Basquin, D. Suck and C. Sauter, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2002, **58**, 1657–1659.
- 120 S. Sugiyama, M. Maruyama, G. Sazaki, M. Hirose, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori and H. Matsumura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 5786–5789.
- 121 J. M. García-Ruiz, J. A. Gavira, F. Otálora, A. Guasch and M. Coll, *Mater. Res. Bull.*,

- 1998, **33**, 1593–1598.
- 122 J. A. Gavira, A. E. S. Van Driessche and J. M. Garcia-Ruiz, *Cryst. Growth Des.*, 2013, **13**, 2522–2529.
- 123 J. A. Gavira, A. Cera-Manjarres, K. Ortiz, J. Mendez, J. A. Jimenez-Torres, L. D. Patiño-Lopez and M. Torres-Lugo, *Cryst. Growth Des.*, 2014, **14**, 3239–3248.
- 124 M. Conejero-Muriel, J. A. Gavira, E. Pineda-Molina, A. Belsom, M. Bradley, M. Moral, J. de D. G. López-Durán, A. Luque González, J. J. Díaz-Mochón, R. Contreras-Montoya, Á. Martínez-Peragón, J. M. Cuerva and L. Álvarez De Cienfuegos, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 3862–3865.
- 125 M. Conejero-Muriel, R. Contreras-Montoya, J. J. Díaz-Mochón, L. Álvarez De Cienfuegos and J. A. Gavira, *CrystEngComm*, 2015, **17**, 8072–8078.
- 126 L. Álvarez de Cienfuegos, J. A. Gavira, J. J. Díaz-Mochón, M. T. Conejero-Muriel, R. Contreras-Montoya, in *WO 2017/191323 AI* (Ed: W. I. P. Organization), Spain, **2017**.
- 127 J. M. Holton, *J. Synchrotron Radiat.*, 2009, **16**, 133–142.
- 128 B. Kauffmann, M. S. Weiss, V. S. Lamzin and A. Schmidt, *Structure*, 2006, **14**, 1099–1105.
- 129 E. Crosas, A. Castellvi, I. Crespo, D. Fulla, F. Gil-Ortiz, G. Fuertes, C. S. Kamma-Lorger, M. Malfois, M. A. G. Aranda and J. Juanhuix, *J. Synchrotron Radiat.*, 2017, **24**, 53–62.
- 130 G. I. Berglund, G. H. Carlsson, A. T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen and J. Hajdu, *Nature*, 2002, **417**, 463–468.
- 131 E. F. Garman, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2010, **66**, 339–351.
- 132 A. Meents, S. Gutmann, A. Wagner and C. Schulze-Briese, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2010, **107**, 1094–1099.
- 133 C. Nave and E. F. Garman, *J. Synchrotron Radiat.*, 2005, **12**, 257–260.
- 134 K. V. Dunlop, R. T. Irvin and B. Hazes, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2005, **61**, 80–87.
- 135 G. Xu and M. R. Chance, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 3514–3543.
- 136 J. Kmetko, M. Warkentin, U. Englich and R. E. Thorne, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2011, **67**, 881–893.
- 137 V. Jayawarna, M. Ali, T. A. Jowitt, A. F. Miller, A. Saiani, J. E. Gough and R. V. Ulijn, *Adv. Mater.*, 2006, **18**, 611–614.
- 138 E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger and P. I. Cook, *Anal. Biochem.*, 1970, **34**, 595–598.
- 139 W. Kabsch, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2010, **66**, 125–132.
- 140 P. Evans, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2005, **62**, 72.
- 141 J. E. Coggle, *Biological effects of radiation*, Taylor and Francis, London, UK, 2nd edn.,

- 1983.
- 142 R. Contreras-Montoya, A. B. Bonhome-Espinosa, A. Orte, D. Miguel, J. M. Delgado-López, J. D. G. Duran, J. M. Cuerva, M. T. Lopez-Lopez and L. Álvarez de Cienfuegos, *Mater. Chem. Front.*, 2018, **2**, 686–699.
- 143 F. Otálora, J. A. Gavira, J. D. Ng and J. M. García-Ruiz, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2009, **101**, 26–37.
- 144 R. H. Baughman, A. A. Zakhidov and W. A. de Heer, *Science*, 2012, **787**, 787–792.
- 145 B. Q. Wei, R. Vajtai and P. M. Ajayan, *Appl. Phys. Lett.*, 2001, **79**, 1172–1174.
- 146 E. Pop, D. Mann, Q. Wang, K. Goodson and H. Dai, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 96–100.
- 147 B. Peng, M. Locascio, P. Zapol, S. Li, S. L. Mielke, G. C. Schatz and H. D. Espinosa, *Nat. Nanotechnol.*, 2008, **3**, 626–631.
- 148 K. Gao, Z. Shao, X. Wang, Y. Zhang, W. Wang and F. Wang, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 15058–15064.
- 149 A. A. Adewunmi, S. Ismail and A. S. Sultan, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, 2016, **26**, 717–737.
- 150 M. F. L. De Volder, S. H. Tawfick, R. H. Baughman and J. Hart, *Science*, 2013, **339**, 535–539.
- 151 W. Bauhofer and J. Z. Kovacs, *Compos. Sci. Technol.*, 2009, **69**, 1486–1498.
- 152 T.-W. Chou, L. Gao, E. T. Thostenson, Z. Zhang and J.-H. Byun, *Compos. Sci. Technol.*, 2010, **70**, 1–19.
- 153 F. H. Gojny, M. H. G. Wichmann, U. Köpke, B. Fiedler and K. Schulte, *Compos. Sci. Technol.*, 2004, **64**, 2363–2371.
- 154 Z. Mei, A. K. R. and B. R. H., *Science*, 2004, **306**, 1358–1361.
- 155 V. P. Veedu, A. Cao, X. Li, K. Ma, C. Soldano, S. Kar, P. M. Ajayan and M. N. Ghasemi-Nejhad, *Nat. Mater.*, 2006, **5**, 457–462.
- 156 C. Wang, Z. X. Guo, S. Fu, W. Wu and D. Zhu, *Prog. Polym. Sci.*, 2004, **29**, 1079–1141.
- 157 S. R. Shin, S. M. Jung, M. Zalabany, K. Kim, P. Zorlutuna, S. B. Kim, M. Nikkhah, M. Khabiry, M. Azize, J. Kong, K. T. Wan, T. Palacios, M. R. Dokmeci, H. Bae, X. Tang and A. Khademhosseini, *ACS Nano*, 2013, **7**, 2369–2380.
- 158 X. Zhang, C. L. Pint, M. H. Lee, B. E. Schubert, A. Jamshidi, K. Takei, H. Ko, A. Gillies, R. Bardhan, J. J. Urban, M. Wu, R. Fearing and A. Javey, *Nano Lett.*, 2011, **11**, 3239–3244.
- 159 D. Tasis, N. Tagmatarchis, A. Bianco and M. Prato, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 1105–1136.
- 160 S. W. Kim, T. Kim, Y. S. Kim, H. S. Choi, H. J. Lim, S. J. Yang and C. R. Park, *Carbon N. Y.*, 2012, **50**, 3–33.
- 161 S. H. Hong, T. T. Tung, L. K. H. Trang, T. Y. Kim and K. S. Suh, *Colloid Polym. Sci.*, 2010, **288**, 1013–1018.

- 162 X.-F. Sun, Q. Ye, Z. Jing and Y. Li, *Polym. Compos.*, 2014, **35**, 45–52.
- 163 X. Tong, J. Zheng, Y. Lu, Z. Zhang and H. Cheng, *Mater. Lett.*, 2007, **61**, 1704–1706.
- 164 M. S. Arnold, M. O. Guler, M. C. Hersam and S. I. Stupp, *Structure*, 2005, **21**, 4705–4709.
- 165 Z. Tan, S. Ohara, M. Naito and H. Abe, *Adv. Mater.*, 2011, **23**, 4053–4057.
- 166 S. K. Mandal, T. Kar and P. K. Das, *Chem. - A Eur. J.*, 2013, **19**, 12486–12496.
- 167 B. G. Cousins, A. K. Das, R. Sharma, Y. Li, J. P. McNamara, I. H. Hillier, I. A. Kinloch and R. V. Ulijn, *Small*, 2009, **5**, 587–590.
- 168 D. Iglesias, M. Melle-Franco, M. Kurbasic, M. Melchionna, M. Abrami, M. Grassi, M. Prato and S. Marchesan, *ACS Nano*, 2018, **12**, 5530–5538.
- 169 B. O. Okesola and A. Mata, *Chem. Soc. Rev.*, 2018, **47**, 3721–3736.
- 170 Q. Luo, C. Hou, Y. Bai, R. Wang and J. Liu, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 13571–13632.
- 171 M. Uchida, M. T. Klem, M. Allen, P. Suci, M. Flenniken, E. Gillitzer, Z. Varpness, L. O. Liepold, M. Young and T. Douglas, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 1025–1042.
- 172 S. Abe, H. Tabe, H. Ijiri, K. Yamashita, K. Hirata, K. Atsumi, T. Shimoi, M. Akai, H. Mori, S. Kitagawa and T. Ueno, *ACS Nano*, 2017, **11**, 2410–2419.
- 173 S. Abe, B. Maity and T. Ueno, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 6496–6512.
- 174 J. A. Gavira, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2016, **602**, 3–11.
- 175 Y. Ding, L. Shi and H. Wei, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 8268–8291.
- 176 H. Wei, Z. Wang, L. Yang, S. Tian, C. Hou and Y. Lu, *Analyst*, 2010, **135**, 1406–1410.
- 177 D. Lu, L. Liu, F. Li, S. Shuang, Y. Li, M. M. F. Choi and C. Dong, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2014, **121**, 77–80.
- 178 W. Chen, J. Lin, W. Chen, E. Wei-guang and Y. Chen, *Nanomedicine*, 2010, **5**, 755–764.
- 179 T. Zhou, Y. Huang, W. Li, Z. Cai, F. Luo, C. J. Yang and X. Chen, *Nanoscale*, 2012, **4**, 5312–5315.
- 180 R. Ghosh, A. K. Sahoo, S. S. Ghosh, A. Paul and A. Chattopadhyay, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 3822–3828.
- 181 C. J. Yu, T. H. Chen, J. Y. Jiang and W. L. Tseng, *Nanoscale*, 2014, **6**, 9618–9624.
- 182 H. Wei, Z. Wang, J. Zhang, S. House, Y. G. Gao, L. Yang, H. Robinson, L. H. Tan, H. Xing, C. Hou, I. M. Robertson, J. M. Zuo and Y. Lu, *Nat. Nanotechnol.*, 2011, **6**, 93–97.
- 183 T. Ueno, S. Abe, T. Koshiyama and T. Ohki, *Chem. - A Eur. J.*, 2010, **16**, 2730–2740.
- 184 J. C. Joshua, M. E. Turner, J. K. Bosworth, T. J. Trentler, J. E. Johnson, T. Lin and V. L. Colvin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 5274–5275.
- 185 M. Liang, L. Wang, X. Liu, W. Qi, R. Su, R. Huang, Y. Yu and Z. He, *Nanotechnology*, 2013, **24**, 245601.
- 186 S. Abe, M. Tsujimoto, K. Yoneda, M. Ohba, T. Hikage, M. Takano, S. Kitagawa and T. Ueno, *Small*, 2012, **8**, 1314–1319.

- 187 M. W. England, E. M. Lambert, M. Li, L. Turyanska, A. J. Patil and S. Mann, *Nanoscale*, 2012, **4**, 6710–6713.
- 188 A. Ducroix and R. Giege, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, UK, second., 2004.
- 189 Y. Yang and K. Hamaguchi, *J. Biochem.*, 1980, **88**, 829–836.
- 190 X. Gong, C. Branford-White, L. Tao, S. Li, J. Quan, H. Nie and L. Zhu, *Mater. Sci. Eng. C*, 2016, **58**, 478–486.
- 191 <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/Bulletin/1/773735bul.pdf>.
- 192 S. R. Shin, H. Bae, J. M. Cha, J. Y. Mun, Y. C. Chen, H. Tekin, H. Shin, S. Farshchi, M. R. Dokmeci, S. Tang and A. Khademhosseini, *ACS Nano*, 2012, **6**, 362–372.
- 193 M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito and A. Jorio, *Phys. Rep.*, 2005, **409**, 47–99.
- 194 F. Bomboi, A. Bonincontro, C. La Mesa and F. Tardani, *J. Colloid Interface Sci.*, 2011, **355**, 342–347.
- 195 D. Nepal and K. E. Geckeler, *Small*, 2006, **2**, 406–412.
- 196 A. L. Margolin and M. A. Navia, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2001, **40**, 2204–2222.
- 197 A. Trionfi, D. A. Scrymgeour, J. W. P. Hsu, M. J. Arlen, D. Tomlin, J. D. Jacobs, D. H. Wang, L.-S. Tan and R. A. Vaia, *J. Appl. Phys.*, 2008, **104**, 083708.
- 198 A. S. Teja and P. Y. Koh, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, 2009, **55**, 22–45.
- 199 R. B. Frankel, R. P. Blakemore and R. S. Wolfe, *Science*, 1979, **203**, 1355–1356.
- 200 F. F. T. de Araujo, M. A. Pires, R. B. Frankel and C. E. M. Bicudo, *Biophys. J.*, 1986, **50**, 375–378.
- 201 S. A. Jungreis, *Florida Entomol.*, 1987, **70**, 277–283.
- 202 A. Perry, G. B. Bauer and A. E. Dizon, in *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms*, eds. J. L. Kirschvink, D. S. Jones and B. J. MacFadden, Plenum, New York, US, 1985, pp. 439–453.
- 203 C. Walcott, J. L. Goulu and J. L. Kirschvink, *Science*, 1979, **205**, 1027–1029.
- 204 S. Mann and J. P. Hannington, *J. Colloid Interface Sci.*, 1988, **122**, 326–335.
- 205 J. L. Gould, J. L. Kirschvink and K. S. Deffeyes, *Science*, 1978, **201**, 1026–1028.
- 206 J. L. Kirschvink, *J. Exp. Biol.*, 1981, **92**, 333–336.
- 207 R. R. Baker, J. G. Mather and J. H. Kennaugh, *Nature*, 1983, **301**, 78–80.
- 208 R. M. Cornell and U. Schwertmann, *The iron oxides : structure, properties, reactions, occurrences, and uses*, Wiley-VCH, 2003.
- 209 L. Blaney, *Magnetite (Fe₃O₄): Properties, Synthesis, and Applications*, Lehigh, PA, US, 2007.
- 210 C. Scherer and A. M. Figueiredo Neto, *Brazilian J. Phys.*, 2005, **35**, 718–727.
- 211 P. Berger, N. B. Adelman, K. J. Beckman, D. J. Campbell, A. B. Ellis and G. C.

- Lisensky, *J. Chem. Educ.*, 1999, **76**, 943–948.
- 212 B. M. Berkovski, *Magnetic fluids and applications handbook*, Begell House, Inc, New York, US, 1996.
- 213 A. B. Ellis, *Teaching general chemistry: a materials science companion*, American Chemical Society, Washington, DC, US, 1993.
- 214 A. K. Gupta and M. Gupta, *Biomaterials*, 2005, **26**, 3995–4021.
- 215 A. H. Lu, E. L. Salabas and F. Schüth, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2007, **46**, 1222–1244.
- 216 J. J. M. Lenders, C. L. Altan, P. H. H. Bomans, A. Arakaki, S. Bucak, G. De With and N. A. J. M. Sommerdijk, *Cryst. Growth Des.*, 2014, **14**, 5561–5568.
- 217 G. F. Goya, T. S. Berquó, F. C. Fonseca and M. P. Morales, *J. Appl. Phys.*, 2003, **94**, 3520–3528.
- 218 T. Prozorov, D. A. Bazyliniski, S. K. Mallapragada and R. Prozorov, *Mater. Sci. Eng. R Reports*, 2013, **74**, 133–172.
- 219 E. Alphandéry, S. Faure, O. Seksek, F. Guyot and I. Chebbi, *ACS Nano*, 2011, **5**, 6279–6296.
- 220 L. Xiao, J. Li, D. F. Brougham, E. K. Fox, N. Feliu, A. Bushmelev, A. Schmidt, N. Mertens, F. Kiessling, M. Valldor, B. Fadeel and S. Mathur, *ACS Nano*, 2011, **5**, 6315–6324.
- 221 Z. Li, L. Wei, M. Gao and H. Lei, *Adv. Mater.*, 2005, **17**, 1001–1005.
- 222 M. Arruebo, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra and J. Santamaría, *Nano Today*, 2007, **2**, 22–31.
- 223 S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst and N. R. Muller, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2064–2110.
- 224 A. G. Kolhatkar, A. C. Jamison, D. Litvinov, R. C. Willson and T. R. Lee, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**, 15977–16009.
- 225 T. Ahn, J. H. Kim, H. M. Yang, J. W. Lee and J. D. Kim, *J. Phys. Chem. C*, 2012, **116**, 6069–6076.
- 226 N. M. Griбанov, E. E. Bibik, O. V. Buzunov and V. N. Naumov, *J. Magn. Magn. Mater.*, 1990, **85**, 7–10.
- 227 H. Pardoe, W. Chua-anusorn, T. G. St. Pierre and J. Dobson, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2001, **225**, 41–46.
- 228 K. Petcharoen and A. Sirivat, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.*, 2012, **177**, 421–427.
- 229 R. A. Frimpong, J. Dou, M. Pechan and J. Z. Hilt, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2010, **322**, 326–331.
- 230 C. Pereira, A. M. Pereira, C. Fernandes, M. Rocha, R. Mendes, M. P. Fernández-García, A. Guedes, P. B. Tavares, J. M. Grenéche, J. P. Araújo and C. Freire, *Chem. Mater.*,

- 2012, **24**, 1496–1504.
- 231 J. Wang, J. Sun, Q. Sun and Q. Chen, *Mater. Res. Bull.*, 2003, **38**, 1113–1118.
- 232 D. Chen and R. Xu, *Mater. Res. Bull.*, 1998, **33**, 1015–1021.
- 233 K. Woo, J. Hong, S. Choi, H. W. Lee, J. P. Ahn, C. S. Kim and S. W. Lee, *Chem. Mater.*, 2004, **16**, 2814–2818.
- 234 Z. Li, H. Chen, H. Bao and M. Gao, *Chem. Mater.*, 2004, **16**, 1391–1393.
- 235 S. Sun and H. Zeng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 8204–8205.
- 236 Z. Li, Q. Sun and M. Gao, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2005, **44**, 123–126.
- 237 V. Uskokovic and M. Drogenik, *Surf. Rev. Lett.*, 2005, **12**, 239–277.
- 238 P. A. Dresco, V. S. Zaitsev, R. J. Gambino and B. Chu, *Langmuir*, 1999, **15**, 1945–1951.
- 239 S. Santra, R. Tapeç, N. Theodoropoulou, J. Dobson, A. Hebard and W. Tan, *Langmuir*, 2001, **17**, 2900–2906.
- 240 M. Gobe, K. Kon-No, K. Kandori and A. Kitahara, *J. Colloid Interface Sci.*, 1983, **93**, 293–295.
- 241 K. K. W. Wong, T. Douglas, S. Gider, D. D. Awschalom and S. Mann, *Chem. Mater.*, 1998, **10**, 279–285.
- 242 F. C. Meldrum, B. R. Heywood and S. Mann, *Science*, 1992, **257**, 522–523.
- 243 E. Strable, J. W. M. Bulte, B. Moskowitz, K. Vivekanandan, M. Allen and T. Douglas, *Chem. Mater.*, 2001, **13**, 2201–2209.
- 244 D. Bonacchi, A. Caneschi, D. Dorignac, A. Falqui, D. Gatteschi, D. Rovai, C. Sangregorio and R. Sessoli, *Chem. Mater.*, 2004, **16**, 2016–2020.
- 245 Y. Hou, H. Kondoh, M. Shimojo, E. O. Sako, N. Ozaki, T. Kogure and T. Ohta, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 4845–4852.
- 246 C. Sangregorio, J. K. Wiemann, C. J. O’Connor and Z. Rosenzweig, *J. Appl. Phys.*, 1999, **85**, 5699–5701.
- 247 M. De Cuyper and M. Joniau, *Langmuir*, 1991, **7**, 647–652.
- 248 M. De Cuyper and M. Joniau, *Eur. Biophys. J.*, 1988, **15**, 311–319.
- 249 V. Nguyen, M. Gauthier and O. Sandre, *Nanomaterials*, 2014, **4**, 628–685.
- 250 M. Breulmann, H. Cölfen, H. P. Hentze, M. Antonietti, D. Walsh and S. Mann, *Adv. Mater.*, 1998, **10**, 237–241.
- 251 M. A. Morales, E. C. De Souza Rodrigues, A. S. C. M. De Amorim, J. M. Soares and F. Galembeck, *Appl. Surf. Sci.*, 2013, **275**, 71–74.
- 252 Y. Wang, B. Li, Y. Zhou and D. Jia, *Nanoscale Res. Lett.*, 2009, **4**, 1041–1046.
- 253 S. Kaihara, Y. Suzuki and K. Fujimoto, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2011, **85**, 343–348.
- 254 Z. Xiong, Z.-B. Sun, M.-L. Zheng, Y.-Y. Cao, F. Jin, W.-Q. Chen, Z.-S. Zhao and X.-M. Duan, *Mater. Chem. Phys.*, 2011, **130**, 72–78.

- 255 T. Prozorov, S. K. Mallapragada, B. Narasimhan, L. Wang, P. Palo, M. Nilsen-Hamilton, T. J. Williams, D. A. Bazylinski, R. Prozorov and P. C. Canfield, *Adv. Funct. Mater.*, 2007, **17**, 951–957.
- 256 Y. Amemiya, A. Arakaki, S. S. Staniland, T. Tanaka and T. Matsunaga, *Biomaterials*, 2007, **28**, 5381–5389.
- 257 C. Valverde-Tercedor, M. Montalbán-López, T. Perez-Gonzalez, M. S. Sanchez-Quesada, T. Prozorov, E. Pineda-Molina, M. A. Fernandez-Vivas, A. B. Rodriguez-Navarro, D. Trubitsyn, D. A. Bazylinski and C. Jimenez-Lopez, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, **99**, 5109–5121.
- 258 H. Nudelman, T. Perez Gonzalez, S. Kolushiva, M. Widdrat, V. Reichel, A. Peigneux, G. Davidov, R. Bitton, D. Faivre, C. Jimenez-Lopez and R. Zarivach, *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.*, 2018, **74**, 10–20.
- 259 R. Lopez-Moreno, A. Fernández-Vivas, C. Valverde-Tercedor, A. I. Azuaga Fortes, S. Casares Atienza, A. B. Rodriguez-Navarro, R. Zarivach and C. Jimenez-Lopez, *Cryst. Growth Des.*, 2017, **17**, 1620–1629.
- 260 J. J. M. Lenders, H. R. Zope, A. Yamagishi, P. H. H. Bomans, A. Arakaki, A. Kros, G. De With and N. A. J. M. Sommerdijk, *Adv. Funct. Mater.*, 2015, **25**, 711–719.
- 261 J. Baumgartner, M. Antonietta Carillo, K. M. Eckes, P. Werner and D. Faivre, *Langmuir*, 2014, **30**, 2129–2136.
- 262 A. Arakaki, F. Masuda, Y. Amemiya, T. Tanaka and T. Matsunaga, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **343**, 65–70.
- 263 D. Kim, N. Lee, M. Park, H. Kim, K. An and T. Hyeon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 454–455.
- 264 T. Perez-Gonzalez, A. Rodriguez-Navarro and C. Jimenez-Lopez, *J. Supercond. Nov. Magn.*, 2011, **24**, 549–557.
- 265 H. Nosrati, M. Salehiabar, E. Attari, S. Davaran, H. Danafar and H. K. Manjili, *Appl. Organomet. Chem.*, 2018, **32**, 1–10.
- 266 Z. Durmus, H. Kavas, M. S. Toprak, A. Baykal, T. G. Altinçekiç, A. Aslan, A. Bozkurt and S. Coşgun, *J. Alloys Compd.*, 2009, **484**, 371–376.
- 267 A. Ebrahiminezhad, S. Davaran, S. Rasoul-Amini, J. Barar, M. Moghadam and Y. Ghasemi, *Curr. Nanosci.*, 2012, **8**, 868–874.
- 268 S. M. Flynn, F. M. Clydesdale and O. T. Zajicek, *J. Food Prot.*, 1984, **47**, 36–40.
- 269 H. N. Aliyu and J. Na'aliya, *Int. Res. J. Pharm. Pharmacol.*, 2012, **2**, 76–80.
- 270 O. Yamauchi and A. Odani, *Pure Appl. Chem*, 1996, **68**, 469–496.
- 271 S. P. Schwaminger, P. F. García, G. K. Merck, F. A. Bodensteiner, S. Heissler, S. Gü and S. Berensmeier, *J. Phys. Chem. C*, 2015, **119**, 23032–23041.
- 272 N. Kitadai, T. Yokoyama and S. Nakashima, *J. Colloid Interface Sci.*, 2009, **338**, 395–

- 401.
- 273 G. Germán, G. Rubia, A. Peigneux, Y. Jabalera, J. Puerma, F. Oltolina, K. Elert, D. Colangelo, J. Gómez, G. Morales, M. Prat and C. Jimenez-Lopez, *Langmuir*, 2018, **34**, 13713–13724.
- 274 J. Y. Park, E. S. Choi, M. J. Baek and G. H. Lee, *Mater. Lett.*, 2009, **63**, 379–381.
- 275 S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier and J. M. DeSimone, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008, **105**, 11613–11618.
- 276 J. Li, Y. Huang, X. Liu, Y. Lin, L. Bai and Q. Li, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2007, **8**, 448–454.
- 277 B. Shenoy, Y. Wang, W. Shan and A. L. Margolin, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **73**, 358–369.
- 278 P. G. Argudo, R. Contreras-Montoya, L. Álvarez de Cienfuegos, J. M. Cuerva, M. Cano, D. Alba-Molina, M. T. Martín-Romero, L. Camacho and J. J. Giner-Casares, *Soft Matter*, 2018, **14**, 9343–9350.
- 279 A. Orte, J. M. Alvarez-Pez and M. J. Ruedas-Rama, *ACS Nano*, 2013, **7**, 6387–6395.
- 280 K. Zhao, G. M. Zhao, D. Wu, Y. Soong, A. V. Birk, P. W. Schiller and H. H. Szeto, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 34682–34690.
- 281 H. H. Szeto, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, **1147**, 112–121.
- 282 A. Unciti-Broceta, E. M. V. Johansson, R. M. Yusop, R. M. Sánchez-Martín and M. Bradley, *Nat. Protoc.*, 2012, **7**, 1207–1218.
- 283 J. T. Weiss, J. C. Dawson, K. G. Macleod, W. Rybski, C. Fraser, C. Torres-Sánchez, E. E. Patton, M. Bradley, N. O. Carragher and A. Unciti-Broceta, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 3277–3285.
- 284 J. Li, J. Yu, J. Zhao, J. Wang, S. Zheng, S. Lin, L. Chen, M. Yang, S. Jia, X. Zhang and P. R. Chen, *Nat. Chem.*, 2014, **6**, 352–361.
- 285 A. M. Pérez-López, B. Rubio-Ruiz, V. Sebastián, L. Hamilton, C. Adam, T. L. Bray, S. Irusta, P. M. Brennan, G. C. Lloyd-Jones, D. Sieger, J. Santamaría and A. Unciti-Broceta, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, **56**, 12548–12552.