

UNIVERSIDAD DE GRANADA



FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**DISEÑO DE HIDROGELES
SUPRAMOLECULARES CONSTITUIDOS
POR PEQUEÑOS PÉPTIDOS: ESTUDIO DE
AUTOENSAMBLAJE Y APLICACIONES**

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

presentada por

MARIA DEL CARMEN MAÑAS TORRES

para optar al título de DOCTOR EN QUÍMICA

con mención de DOCTOR INTERNACIONAL

Directores:

Luis Álvarez de Cienfuegos Rodríguez y Modesto Torcuato López López

Granada, 2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María del Carmen Mañas Torres
ISBN: 978-84-1117-422-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/75955>

El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el grupo de investigación “Materiales Orgánicos Funcionales” (FQM-367) del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, y en el grupo de investigación “Física de Interfases y Sistemas Coloidales” (FQM-144) del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada. El trabajo se ha realizado gracias a una ayuda predoctoral para la formación de doctores (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación, vinculada al proyecto de investigación FIS2017-85954-R titulado “Hidrogeles magnéticos supramoleculares para medicina regenerativa”.

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

Los geles supramoleculares basados en péptidos han sido un área de interés en muchos campos de investigación ya que son materiales funcionales biocompatibles y biodegradables, útiles para la creación de nuevos sistemas terapéuticos en nanomedicina. Además, ayudan a comprender los procesos involucrados en el ensamblaje de nanoestructuras permitiendo el diseño y síntesis de estructuras más complejas.

La presente Tesis Doctoral titulada *Diseño de hidrogeles supramoleculares constituidos por pequeños péptidos: estudio de autoensamblaje y aplicaciones*, se encuentra dividida en una Introducción General y cinco capítulos claramente diferenciados. En la Introducción General se expone una breve explicación sobre la clasificación de los distintos tipos de geles, centrándonos en los geles supramoleculares, sobre todo en los basados en péptidos. Además, se explica por qué son interesantes este tipo de materiales, los métodos para formarlos, cómo se organizan y las aplicaciones más importantes con algunos ejemplos representativos. El objetivo de esta introducción es poner en contexto los capítulos que se irán desarrollando a lo largo de la memoria. Por su parte, los capítulos I, II, III y IV se centran en un tipo de estudio o en el desarrollo de una aplicación diferente para estos hidrogeles supramoleculares péptidicos, ordenando la información en cada capítulo con una estructura común: una introducción para poner en contexto el tema de estudio del capítulo, unos objetivos concretos, los resultados y discusión donde se muestra el trabajo realizado y se compara con los datos ya conocidos o previamente presentados en esta misma memoria, y finalmente, las conclusiones obtenidas de dicho estudio. El capítulo V, por su parte, expone brevemente otros trabajos en los que se ha colaborado.

El *Capítulo I* se centra en presentar los conceptos de autoensamblaje y co-ensamblaje que tienen lugar en la formación de los hidrogeles supramoleculares y en el estudio de estos procesos mediante el uso de técnicas novedosas. En los capítulos II, III y IV se muestran aplicaciones diferentes para este tipo de hidrogeles.

Concretando, en el *Capítulo II* se presenta un nuevo hidrogel magnético supramolecular con mejores propiedades de inyectabilidad y resistencia mecánica para posibles aplicaciones en la ingeniería de tejidos. En este capítulo se hace una introducción sobre los sistemas inyectables basados en péptidos, centrándonos en las ventajas y características únicas que poseen los péptidos para el empleo como sistemas inyectables. En el *Capítulo III*, en cambio, se plantea un nuevo material híbrido orgánico/inorgánico que reproduce de forma más similar la biogénesis ósea natural, en la que se produce de manera simultánea el autoensamblaje de las fibrillas de colágeno y la mineralización. El sistema resultante permite ampliar nuestro conocimiento sobre la biomineralización ósea que es de gran importancia para mejorar el tratamiento médico y propiciar el desarrollo de materiales sintéticos que sean capaces de remplazar el tejido óseo dañado. Mientras tanto, el *Capítulo IV* se centra en el desarrollo de un nuevo sistema híbrido combinando las ventajas que presentan los hidrogeles supramoleculares péptidicos con los materiales de carbono para el estudio del efecto CISS con el objetivo de crear un sistema con posibles aplicaciones en el área de la espintrónica.

Por otra parte, el *Capítulo V* 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.

Finalmente se aporta un anexo en el que se recoge un listado de publicaciones que muestran los resultados, propios y en colaboración, obtenidos durante el periodo predoctoral y una bibliografía general donde se reúne las referencias utilizadas para el desarrollo de esta memoria.

SUMMARY

Peptide-based supramolecular gels have been an area of interest in many fields of research as they are inherently biocompatible and biodegradable functional materials useful for the creation of new therapeutic paradigms in nanomedicine. In addition, they allow the understanding of the pathways involved in the self-assembly of nanostructures and provide information on their more complex structural equivalents.

This Doctoral Thesis entitled *Design of supramolecular hydrogels made up of small peptides: self-assembly study and applications* is divided into a General Introduction and five clearly differentiated chapters. In the **General Introduction**, a brief explanation is given on the classification of the different types of gels, focusing on supramolecular gels, especially those based on peptides. In addition, it explains why these types of materials are interesting, the methods to form them, how they are organized and the most important applications with some representative examples. The objective of this introduction is to put in context the chapters that will be developed throughout the report. For their part, Chapters I, II, III and IV are focused on a different type of study or application of the peptide supramolecular hydrogels. The contents of the chapters have the following structure: an introduction, that describes the context of the study; some specific Objectives; results and discussion, where the work carried out is shown and compared with the already known data or previously presented in this same report, and finally, conclusions obtained from the study. Chapter V, for its part, briefly exposes other works in which it has collaborated.

Chapter I focuses on the concepts of self-assembly and co-assembly that take place in the formation of supramolecular hydrogels and details the use of novel techniques used for the study of these processes. Chapter II, III and IV show different applications for this type of hydrogels. Specifically, **Chapter II** presents a new magnetic supramolecular hydrogel with better properties of injectability and mechanical resistance for possible applications in tissue engineering. This chapter

introduces peptide-based injectable systems, focusing on the unique features and advantages of peptides for use as injectable systems. In *Chapter III* a new hybrid organic/inorganic material is proposed that similarly reproduces natural bone biogenesis, in which self-assembly of collagen fibrils and mineralization occur at the same time. The resulting system allows us to broaden our knowledge about bone biomineralization, which is essential to improve medical treatment and promote the development of synthetic materials that can replace damaged bone tissue. *Chapter IV* focuses on the development of a new hybrid system combining the advantages presented by peptide supramolecular hydrogels with carbon materials for the study of the CISS effect with the aim of creating a system with possible applications in the area of the spintronics.

On the other hand, *Chapter VI* is a compendium of the results obtained in collaboration with other research groups that are not included in the central theme of the doctoral thesis.

Finally, an annex is provided showing the list of publications obtained during the predoctoral period alongside a general bibliography that gathers the references used in the development of this memory.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|------|--|
| ABU | Ácido aminobutírico |
| AFM | Microscopía de fuerza atómica (<i>Atomic Force Microscopy</i>) |
| ALP | Fosfatasa alcalina (<i>Alkaline Phosphatase</i>) |
| AMPK | Monofosfato de adenosina (<i>Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase</i>) |
| AQui | 9- (azetidín-1-il) -5-butíl-4Hbenzo [de] [2, 6] naftiridina-4,6 (5H) -diona] |
| Bn | Bencil |
| Cbz | Carboxibencilo |
| CD | Dicroísmo circular (<i>Circular dichroism</i>) |
| CISS | Selectividad de espín inducida por quiralidad (<i>Chiral-Induced Spin Selectivity</i>) |
| CNH | Nanocuernos de carbono (<i>Carbon Nanohorns</i>) |
| CNT | Nanotubos de carbono (<i>Carbon Nanotubes</i>) |
| DBC | N'N'-Dibenzoyl-L-cistina |
| DFT | <i>Density Functional Theory</i> |
| DM | Dinámica Molecular |
| DMEM | Medio de cultivo celular, (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |

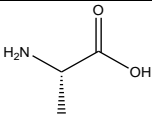
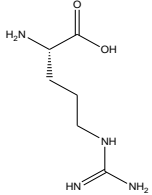
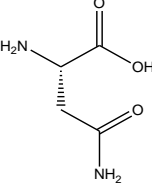
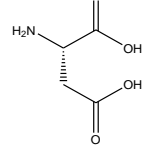
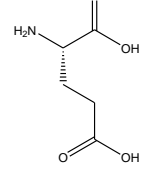
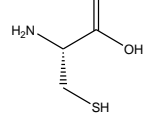
| | |
|------------|--|
| DSC | Calorimetría diferencial de barrido (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>) |
| DTG | Termogravimetría derivativa |
| ESEM | Microscopía electrónica de barrido ambiental (<i>Environmental Scanning Electron Microscopy</i>) |
| FLCS | Espectroscopía de correlación de vida de fluorescencia (<i>Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy</i>) |
| FLIM | Microscopía de tiempo de vida de fluorescencia (<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>) |
| Fmoc | Fluorenilmetoxicarbonil |
| FRET | Transferencia de energía por resonancia de Förster (<i>Förster resonance energy transfer</i>) |
| FTIR | Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier |
| G* | Módulo complejo |
| G' | Módulo de almacenamiento |
| G'' | Módulo de pérdida |
| GdL | δ -gluconolactona |
| GEM | Gemcitabina |
| GO | Óxido de grafeno (<i>Graphene Oxide</i>) |
| HA | Hidroxiapatita |
| HAADF-STEM | Microscopía electrónica de transmisión de barrido de campo oscuro anular de alto ángulo (<i>High-Angle Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscopy</i>) |
| HAP | Hidrocarburos aromáticos policíclicos |

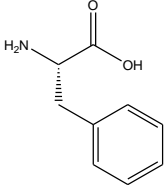
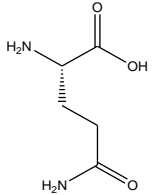
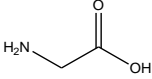
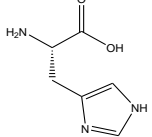
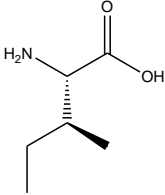
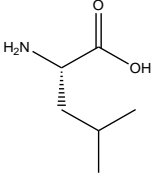
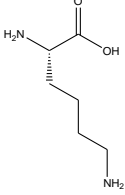
| | |
|--------|---|
| HCT | Hematocrito (<i>hematocrit</i>) |
| HFIP | 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol |
| HGB | Hemoglobina (<i>hemoglobin</i>) |
| HGM | Hidrogeles magnéticos |
| HGNM | Hidrogeles no magnéticos |
| HR-TEM | Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (<i>High-Resolution Transmission Electron Microscopy</i>) |
| IFN | Interferón |
| LLPS | Separación de fases líquido-líquido (<i>Liquid-liquid phase separation</i>) |
| LMWG | Moléculas de bajo peso molecular (<i>Low Molecular Weight Gelators</i>) |
| LVR | Zona viscoelástica lineal (<i>Linear Viscoelastic Region</i>) |
| MCH | Hemoglobina corpuscular media (<i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>) |
| MCHC | Concentración de hemoglobina corpuscular media (<i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>) |
| MCV | Volumen corpuscular medio (<i>Mean Corpuscular Volumen</i>) |
| MEC | Matriz extracelular |
| MR | Magnetorresistencia |
| MWCNT | Nanotubos de pared múltiple (<i>Multi-Walled Carbon Nanotubes</i>) |
| ND | Nanodiamantes (<i>Nanodiamonds</i>) |
| NPM | Nanopartículas magnéticas |

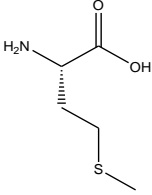
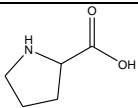
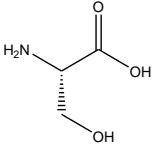
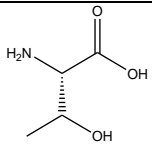
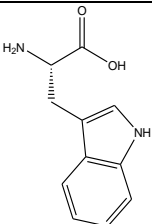
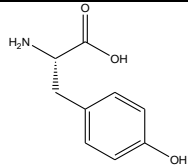
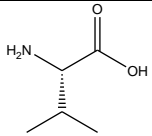
| | |
|--------|--|
| NPX | Naproxeno |
| PAs | Péptidos anfifílicos |
| PEG | Polietilenglicol |
| PTX | Paclitaxel |
| PVA | Poli(vinil) alcohol |
| P-XRD | Difracción de rayos X en polvo |
| RBC | Glóbulos rojos (<i>Red Blood Cell</i>) |
| RDW_CV | Ancho de distribución de glóbulos rojos y coeficiente de variación (<i>Red Blood Cell Distribution Width And Coefficient of Variation</i>) |
| RDW_SD | Ancho de distribución de glóbulos rojos y desviación estándar (<i>Red Blood Cell Distribution Width and Standard Deviation</i>) |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| rMSC | Células madre mesenquimales de médula de rata |
| SAED | Difracción de electrones de área seleccionada |
| SAFINs | <i>Self-Assembled Fibrillar Networks</i> |
| SAXS | Dispersión de rayos X de ángulo pequeño (<i>Small-Angle X-ray Scattering</i>) |
| SEM | Microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning Electron Microscopy</i>) |
| SBF | Suero bovino fetal |
| STEM | Microscopía electrónica de transmisión de barrido (<i>Scanning Transmission Electron Microscopy</i>) |

| | |
|------------------|--|
| SWCNT | Nanotubos de pared simple (<i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i>) |
| TEM | Microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>) |
| TGA | Termogravimetría |
| T _{gel} | Temperatura de gelificación |
| TM | Modo Tangencial (<i>Tangential Mode</i>) |
| U-Gln | UltraGlutamine |
| UV-vis | Espectroscopia ultravioleta-visible |
| XEDS | Espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (<i>Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy</i>) |
| XRD | Difracción de rayos X (<i>X-ray Diffraction</i>) |
| 2D | Bidimensional |
| 3D | Tridimensional |
| 1D | Unidimensional |

AMINOÁCIDOS

| NOMBRE | ABREVIATUR A | LETR A | ESTRUCTURA |
|--------------------|-----------------|-----------|---|
| Alanina | Ala | A |  |
| Arginina | Arg | R |  |
| Asparagina | Asn | N |  |
| Ácido aspártico | Asp | D |  |
| Ácido glutámico | Glu | E |  |
| Cisteína | Cys | C |  |

| | | | |
|------------------|-----|----------|---|
| Fenilalanin a | Phe | F |  |
| Glutamina | Gln | Q |  |
| Glicina | Gly | G |  |
| Histidina | His | H |  |
| Isoleucina | Ile | I |  |
| Leucina | Leu | L |  |
| Lisina | Lys | K |  |

| | | | |
|------------|-----|----------|---|
| Metionina | Met | M |  |
| Prolina | Pro | P |  |
| Serina | Ser | S |  |
| Treonina | Thr | T |  |
| Triptófano | Trp | W |  |
| Tirosina | Tir | Y |  |
| Valina | Val | V |  |

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

| | |
|--|----|
| 1. DEFINICIÓN DE GEL Y CLASIFICACIÓN | 37 |
| 2. GELES SUPRAMOLECULARES | 39 |
| 2.1. Hidrogeles supramoleculares basados en péptidos cortos | 41 |
| 3. ORGANIZACIÓN JERÁRQUICA DE LOS GELES SUPRAMOLECULARES | 44 |
| 3.1. Polimerización supramolecular | 47 |
| 4. MÉTODOS PARA LA FORMACIÓN DE HIDROGELES SUPRAMOLECULARES | 48 |
| 4.1. Cambio de temperatura | 49 |
| 4.2. Cambio de pH..... | 49 |
| 4.3. Por adición de sales..... | 50 |
| 4.4. Cambio de disolvente | 51 |
| 4.5. Otros métodos de gelificación | 51 |
| 5. TÉCNICAS COMÚNMENTE EMPLEADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES SUPRAMOLECULARES | 52 |
| 5.1. Estudio a escala macroscópica..... | 53 |
| 5.2. Estudio a escala nanométrica | 55 |
| 5.3. Estudio a escala molecular | 57 |
| 6. HIDROGELES HÍBRIDOS SUPRAMOLECULARES | 61 |
| 6.1. Hidrogeles híbridos supramoleculares incorporando nanopartículas | 63 |
| 6.2. Hidrogeles híbridos supramoleculares como plantillas para fabricación de nanomateriales | 65 |
| 6.3. Hidrogeles híbridos supramoleculares incorporando materiales de carbono | 67 |
| 7. APLICACIONES BIOMÉDICAS DE HIDROGELES SUPRAMOLECULARES | 70 |
| 7.1. Crecimiento celular e ingeniería de tejidos..... | 70 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| 7.2. Liberación de medicamentos | 73 |
| 7.3. Inyectabilidad | 75 |
| 7.4. Acción antimicrobiana | 76 |

Capítulo I. ESTUDIO DEL ENSAMBLAJE *vs* COENSAMBLAJE DE PÉPTIDOS AROMATICOS CORTOS

| | |
|---|-----|
| RESUMEN | 81 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 83 |
| 1.1. Importancia del autoensamblaje | 83 |
| 1.2. Autoensamblaje de péptidos aromáticos cortos..... | 84 |
| 1.3. Co-ensamblaje de péptidos aromáticos cortos | 87 |
| 2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS..... | 90 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 91 |
| PARTE A. Estudio del mecanismo de autoensamblaje de péptidos aromáticos cortos..... | 91 |
| 3.A.1. Estudio y formación de hidrogeles en presencia de sales..... | 91 |
| 3.A.2. Mecanismo de autoensamblaje..... | 97 |
| 3.A.3. Cinética del autoensamblaje | 99 |
| 3.A.4. Estudio de las propiedades mecánicas | 104 |
| 3.A.5. Estudios de autocuración | 105 |
| 3.A.6. Estudio de la coordinación péptido-metal..... | 108 |
| PARTE B. Estudio del mecanismo de co-ensamblaje de péptidos aromáticos Cortos | 109 |
| 3.B.1. Estudio y formación de hidrogeles con diferentes dipéptidos | 109 |
| 3.B.2. Estudios espectroscópicos del co-ensamblaje con diferentes dipéptidos | 113 |
| 3.B.3. Estudios de fluorescencia..... | 117 |
| 3.B.4. Estudio de los estados intermedios en la formación del gel | 120 |
| 3.B.5. Estudio de las propiedades mecánicas..... | 121 |

| | |
|---|-----|
| 3.B.6. Estudios de dinámica molecular..... | 123 |
| 4. CONCLUSIONS | 124 |
| 5. SECCIÓN EXPERIMENTAL..... | 125 |
| 5.1. Reactivos y materiales | 125 |
| 5.2. Preparación de hidrogeles | 125 |
| 5.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 126 |
| 5.4. Dicroísmo circular (CD) | 127 |
| 5.5. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) | 127 |
| 5.6. Fluorescencia | 127 |
| 5.7. Reología | 128 |
| 5.8. Calorimetría deiferencial de barrido(DSC)..... | 128 |
| 5.9. Microscopía FLIM y espectroscopía FLCS..... | 129 |
| 5.10. Cálculos DFT..... | 130 |
| 5.11. Protocolo de dinámica molecular (DM) | 130 |

Capítulo II. HIDROGELES HÍBRIDOS MAGNÉTICOS DE PÉPTIDOS AROMATICOS CORTOS PARA MEDICINA REGENERATIVA

RESUMEN

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 135 |
| Hidrogeles inyectables: requisitos para la ingeniería de tejidos | 137 |
| Hidrogeles fluidificantes supramoleculares peptídicos..... | 138 |
| 1.1.2. Hidrogeles fluidificantes supramoleculares peptídicos incorporando nanopartículas magnéticas..... | 140 |
| 2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS..... | 142 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 143 |
| 3.1. Síntesis y caracterización fisicoquímica de hidrogeles | 143 |
| 3.2. Evaluación mecánica de hidrogeles..... | 145 |
| 3.3. Evaluación <i>in vitro</i> de los hidrogeles | 146 |
| 3.4. Comportamiento de degradación e hinchamiento..... | 148 |

| | |
|---|-----|
| 3.5. Biocompatibilidad <i>in vivo</i> de partículas e hidrogeles | 149 |
| 3.6. Evaluación de la inyectabilidad de los hidrogeles | 152 |
| 4. CONCLUSIONS..... | 154 |
| 5. SECCIÓN EXPERIMENTAL | 155 |
| 5.1. Reactivos y materiales | 155 |
| 5.2. Funcionalización de las nanopartículas magnéticas..... | 156 |
| 5.3. Preparación de hidrogeles no magnéticos | 156 |
| 5.4. Preparación de hidrogeles magnéticos..... | 157 |
| 5.5. Caracterización fisicoquímica de los hidrogeles | 159 |
| 5.5.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)..... | 159 |
| 5.5.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 159 |
| 5.5.3. Dicroísmo circular (CD) | 159 |
| 5.6. Evaluación mecánica de los hidrogeles..... | 159 |
| 5.6.1. Caracterización de las propiedades mecánicas de los hidrogeles..... | 159 |
| 5.6.2. Cinética de gelificación | 160 |
| 5.6.3. Comportamiento autocurativo de los hidrogeles..... | 161 |
| 5.7. Biocompatibilidad <i>in vitro</i> de los hidrogeles | 161 |
| 5.8. Comportamiento de degradación e hinchamiento | 162 |
| 5.9. Biocompatibilidad <i>in vivo</i> de partículas e hidrogeles | 163 |
| 5.10. Evaluación de los hidrogeles magnéticos como plataformas para el suministro de células por inyección | 163 |

Capítulo III. HIDROGELES HÍBRIDOS DE PÉPTIDOS AROMATICOS CORTOS PARA MINERALIZACION DE HIDROXIAPATITA

| | |
|--------------------------------|-----|
| RESUMEN | 167 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 169 |
| 1.1.Composición del hueso..... | 169 |

| | |
|---|-----|
| 1.2. Hidrogeles supramoleculares peptídicos como sustitutos del hueso | 170 |
| 2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS..... | 172 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 173 |
| 3.1. Síntesis y estudio de los hidrogeles híbridos | 173 |
| 3.1.1. Estudio de la ratio mineral/péptido | 176 |
| 3.2. Caracterización de los hidrogeles híbridos..... | 178 |
| 3.2.1. Caracterización de los hidrogeles con diferente ratio mineral/péptido | 181 |
| 3.3. Evaluación de la influencia del calcio en la formación del hidrogel | 185 |
| 4. CONCLUSIONS | 189 |
| 5. SECCIÓN EXPERIMENTAL..... | 189 |
| 5.1. Reactivos y materiales | 189 |
| 5.2. Mineralización de péptidos aromáticos cortos | 190 |
| 5.3. Caracterización de los materiales híbridos | 191 |
| 5.3.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 192 |
| 5.3.2. Microscopía electrónica de transmisión de barrido de campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF-STEM) | 192 |
| 5.3.3. Microscopía electrónica de barrido criogénico (crio-SEM) | 192 |
| 5.3.4. Difracción de rayos X en polvo (P-XRD) | 192 |
| 5.3.5. Espectros de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de xerogeles | 193 |
| 5.3.6. Termogravimetría (TGA) de los xerogeles..... | 193 |
| 5.3.7. Reología | 193 |

Capítulo IV. XEROGELES HÍBRIDOS DE PÉPTIDOS AROMATICOS CORTOS COMO FILTROS DE SPIN INDUCIDOS POR LA QUIRALIDAD

| | |
|----------------------|-----|
| RESUMEN | 197 |
| 1.INTRODUCCIÓN | 199 |

| | |
|---|-----|
| 1.1. Espintrónica molecular | 199 |
| 1.1.1. Efecto CISS y su estudio | 199 |
| 1.1.2. Material quiral con efecto CISS: nanotubos funcionalizados con péptidos aromáticos cortos | 202 |
| 2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS | 203 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 204 |
| 3.1. Formación de los hidrogeles híbridos | 204 |
| 3.2. Análisis Raman | 205 |
| 3.3. Estudios de I-V de los CNT funcionalizado con Fmoc-dipéptidos | 206 |
| 3.4. Estudios de magnetorresistencia de los hidrogeles híbridos | 208 |
| 4 CONCLUSIONS | 213 |
| 5 SECCIÓN EXPERIMENTAL | 214 |
| 5.1. Reactivos y materiales | 214 |
| 5.2. Preparación de los hidrogeles híbridos | 214 |
| 5.3. Estudios Raman | 215 |
| 5.4. Síntesis del dispositivo híbrido de Fmoc-dipéptidos-SWCNT | 215 |
| 5.5. Medidas de transporte | 216 |

Capítulo V. PARTICIPACIÓN EN OTROS PROYECTOS

V.A. CRISTALES DE INSULINA CRECIDOS EN HIDROGELES

SUPRAMOLECULARES DE PÉPTIDOS CORTOS CON UNA MAYOR

ESTABILIDAD TÉRMICA Y UN PERFIL DE LIBERACIÓN MÁS LENTO 219

V.B. NANOLÁMINAS SUPRAMOLECULARES ENSAMBLADAS A PARTIR DE

NANOGRAFENOS QUE CONTIENEN HEPTÁGONOS ANFIFÍLICOS..... 226

ANEXOS

LISTA DE PUBLICACIONES..... 233

BIBLIOGRAFÍA 235

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. DEFINICIÓN DEL GEL Y CLASIFICACIÓN

Los geles son un tipo de material blando de gran relevancia que están presentes en nuestra vida diaria en forma de cosméticos, fármacos, pinturas, alimentos, adhesivos, etc. Además, son objeto de numerosos estudios estructurales, así como de investigación para su aplicación en diferentes áreas tecnológicas.¹ Aunque estos materiales son fácilmente reconocibles gracias a sus propiedades únicas (material de apariencia sólida, blando y flexible), aún no existe una definición clara de que es un gel. Esto se debe a que, a pesar de su forma característica, el término “gel” describe varios estados de la materia y clases de materiales diferentes. En 1926, Dorothy Jordon-Lloyd ya reconocía que “la condición coloidal, el gel, es más fácil de reconocer que de definir”.² En general estos materiales blandos están formados por al menos dos constituyentes, disolvente (componente mayoritario) y gelante (componente minoritario).

La definición comúnmente aceptada es la propuesta por Flory en 1974: “un gel tiene una estructura continua que es permanente en la escala de tiempo analítico y es similar a un sólido en su comportamiento reológico”.³ Un gel también podría definirse como un estado coloidal de la materia constituido por una pequeña cantidad de un sólido capaz de formar una estructura tridimensional que inmoviliza de manera macroscópica el flujo de una mayor cantidad de líquido.⁴

Para comprender mejor esta clase de material, los geles se han clasificado atendiendo a distintos criterios tales como el medio en el que se forman, su origen, su constitución y el tipo de entrecruzamiento que crea la red tridimensional (Figura 1).⁵

Los geles se pueden clasificar ampliamente según el **medio** en el que se forman, por ello podemos hablar de organogeles, si el disolvente usado es de naturaleza orgánica, y de hidrogeles, si el disolvente es agua. Existen casos en los que el disolvente es sustituido por un gas, dando lugar a aerogeles (sin colapso del entramado tridimensional) o a xerogeles (cuando colapsa la estructura fibrilar). De

entre todos ellos, los hidrogeles están adquiriendo cada vez más relevancia para aplicaciones biológicas como administración de fármacos y regeneración de tejidos, ya que proporcionan entornos tridimensionales semihúmedos adecuados para interacciones biológicas a nivel molecular.⁶

Con respecto a su **origen**, existen dos clases principales de geles: naturales si se obtienen de recursos naturales como el alginato, el quitosano o la gelatina, que son derivados de plantas y animales, y sintéticos, si por el contrario se sintetizan en el laboratorio. A su vez, según su **constitución**, los geles derivados de compuestos de síntesis se pueden clasificar en geles macromoleculares constituidos por polímeros, y en geles supramoleculares. Los geles de tipo supramolecular son aquellos que se forman por el autoensamblaje de moléculas de bajo peso molecular y son en los que nos centraremos a lo largo de esta Tesis Doctoral. En este tipo de geles el **entrecruzamiento** tiene lugar solamente mediante interacciones físicas (no covalentes), en cambio, dentro de los macromoleculares, pueden existir diferentes tipos de uniones que generan el entrecruzamiento, tanto químicas (covalentes) como físicas. En comparación con los geles macromoleculares, los geles supramoleculares generalmente tienen la ventaja de una composición estructural definida, fácil modificación química, menor concentración crítica de gelificación y formación de un gel reversible ante ciertos estímulos externos.⁷⁻⁹

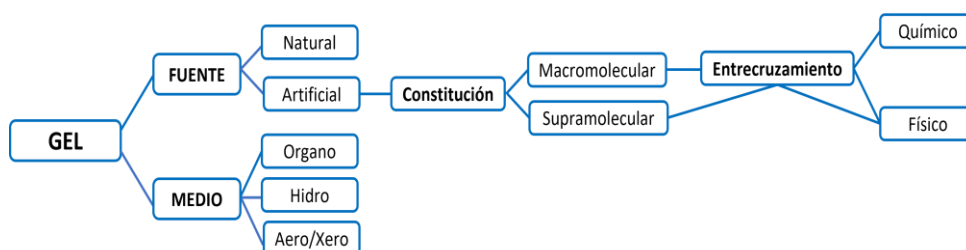


Figura 1. Clasificación de los geles

2. GELES SUPRAMOLECULARES

Los geles supramoleculares se forman a partir de moléculas de bajo peso molecular (LMWG, *Low Molecular Weight Gelators*) que se unen mediante interacciones de tipo no covalente, como son enlaces de hidrógeno, interacciones π - π , interacciones dador-aceptor, fuerzas solvofóbicas (fuerzas hidrofóbicas para hidrogeles), de coordinación metal-ligando, etc. Estos geladores normalmente se autoasocian para dar fibras originando un entramado tridimensional fibrilar (SAFINs, *Self-Assembled Fibrillar Networks*),⁸ aunque también se pueden organizar en (nano)cintas, (nano)hojas y (nano)esferas, entre otras (Figura 2).

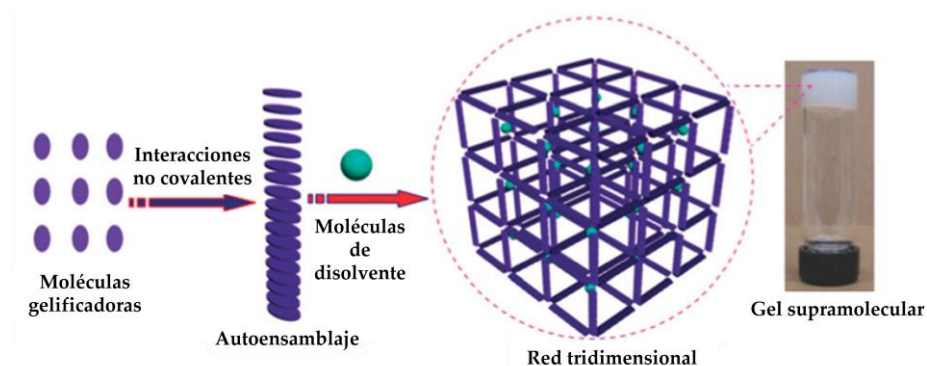


Figura 2. Descripción del autoensamblaje de pequeñas moléculas gelificantes que conducen a la formación de un gel supramolecular. Imagen adaptada de la ref⁹ con permiso de la Royal Society of Chemistry.

Las redes de polímeros convencionales interconectadas por enlaces covalentes no se pueden volver a disolver y son térmicamente irreversibles.¹⁰ Sin embargo, la naturaleza dinámica y reversible de las interacciones no covalentes que mantienen unidas las estructuras de red, da como resultado la capacidad inherente de los geles supramoleculares para responder a estímulos externos, como temperatura, pH, disolventes, luz y reacciones redox.¹¹⁻¹⁴ La capacidad de respuesta a estímulos de estos nuevos materiales blandos los hacen muy importantes en ciencia de los materiales.

Fue en el siglo XIX, cuando Brenzinger describió por primera vez un gelificante de bajo peso molecular, N,N'-Dibenzoyl-L-cistina, DBC, que posteriormente fue

redescubierto por Hoffman¹⁵ en 1921, y que fue capaz de formar un gel a una concentración del 0,1 % en peso (Figura 3). Los geles obtenidos fueron estudiados años después por el grupo de Menger¹⁶ que los caracterizaron en profundidad y proporcionaron detalles moleculares que han revelado muchos principios fundamentales para el diseño de nuevos gelificadores efectivos hechos de moléculas pequeñas.

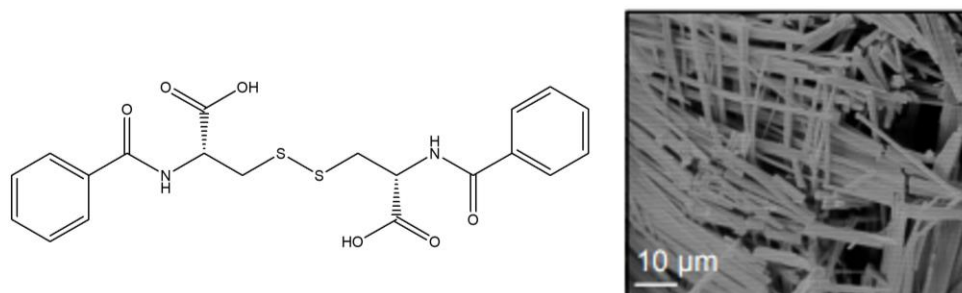
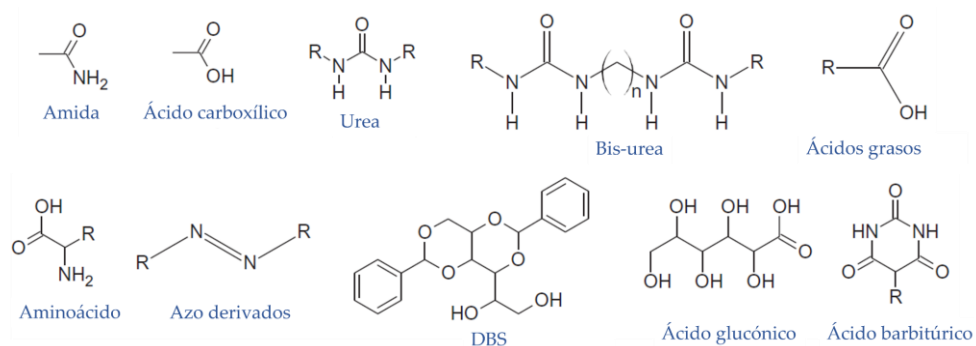


Figura 3. Estructura de DBC (izquierda). Imagen del xerogel de DBC (derecha).

La diversidad de estructuras gelificadoras de bajo peso molecular ha crecido constantemente. En la Figura 4 se ilustra algunos motivos estructurales y grupos funcionales que se utilizan de forma recurrente para fabricar geles supramoleculares (como urea, aminoácidos, ácidos grasos, azúcares, derivados de esteroides, etc).¹⁷⁻²⁶ De entre todas las subclases, los gelificadores a base de aminoácidos recibirán una especial atención en la presente Tesis Doctoral.



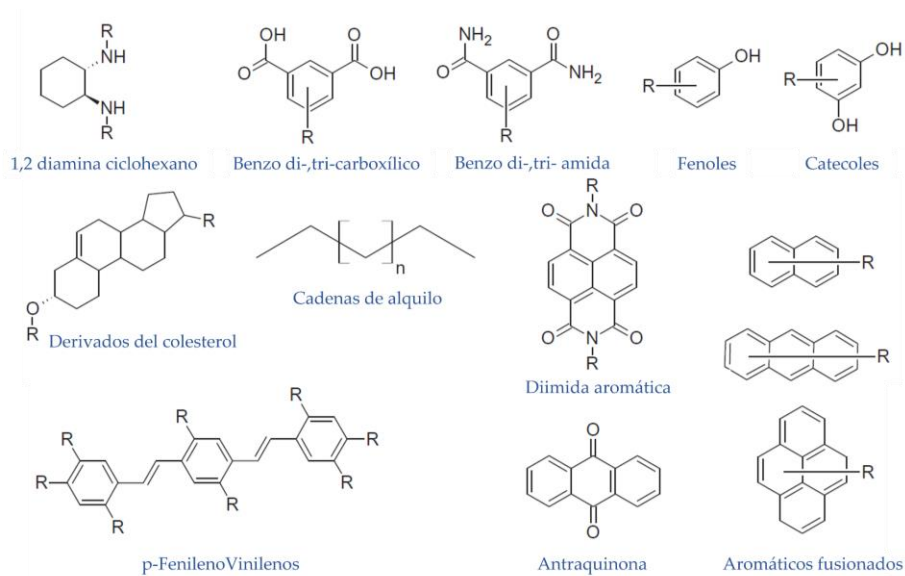


Figura 4: Ejemplos de estructuras gelificadoras de bajo peso molecular.

2.1. Hidrogeles supramoleculares basados en péptidos cortos

Los sistemas biológicos se basan en gran medida en el autoensamblaje de tres clases de biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos) para realizar funciones biológicas, así que el autoensamblaje de pequeñas moléculas derivadas de componentes básicos biológicos en agua ofrece un excelente punto de partida para imitar estructuras y funciones de biomacromoléculas. Por tanto, hidrogeles supramoleculares constituidos por bloques de construcción biológicos pueden conducir a materiales con aplicaciones biológicas diseñadas o inesperadas (Figura 5).²⁷

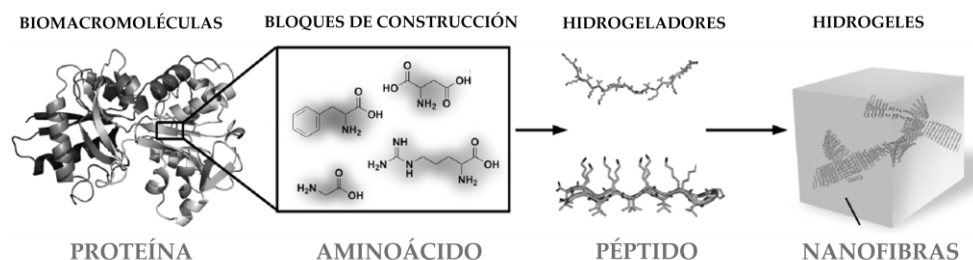


Figura 5. Ejemplo del proceso de autoensamblaje desde bloques de construcción biológicos básicos (proteínas) hasta crear moléculas que actúan como geladores. Imagen adaptada de ref²⁷ con permiso de Wiley.

Los hidrogel basados en péptidos han despertado un gran interés en las dos últimas décadas. Las características estructurales y químicas de los péptidos (p. ej., rigidez del enlace amida, gran variabilidad química proporcionada por la funcionalidad de la cadena lateral de los aminoácidos, capacidad para formar patrones de enlaces de hidrogeno específicos), junto con el uso de agua como disolvente, ha hecho que estos hidrogel presenten aplicaciones no solo en el campo de los biomateriales sino también en muchas otras áreas de la nanociencia.²⁸

La secuencia peptídica autoensamblada más pequeña identificada es la difenilalanina (FF). Este dipéptido aromático se deriva del motivo de reconocimiento central del polipéptido β -amiloide de la enfermedad de Alzheimer. Se autoensambla en nanotubos alargados discretos con una longitud de ~ 100 nm debido a una red de interacciones π - π y enlaces de hidrógeno. Debido a su simplicidad química y versatilidad, la FF se ha convertido en el paradigma del estudio del autoensamblaje de péptidos y, modificando su estructura química simple, se han propuesto una gran cantidad de análogos en los últimos años.²⁹

Hasta la observación fortuita de un gelificador hecho de [fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) -dialanina protegida,³⁰ la capacidad del grupo fluorenilo para permitir el autoensamblaje de péptidos en agua para formar hidrogel había sido pasada por alto. El ejemplo más destacado de los hidrogel supramoleculares peptídicos Fmoc-derivados es sin duda el Fmoc-FF sintetizado por

Reches y Gazit en 2006. Fmoc-FF muestra la capacidad de formar un material con características macroscópicas de gel a pH fisiológico a una concentración crítica de 0,5% en peso y además, es un material adecuado para el cultivo celular³¹ (Figura 6).

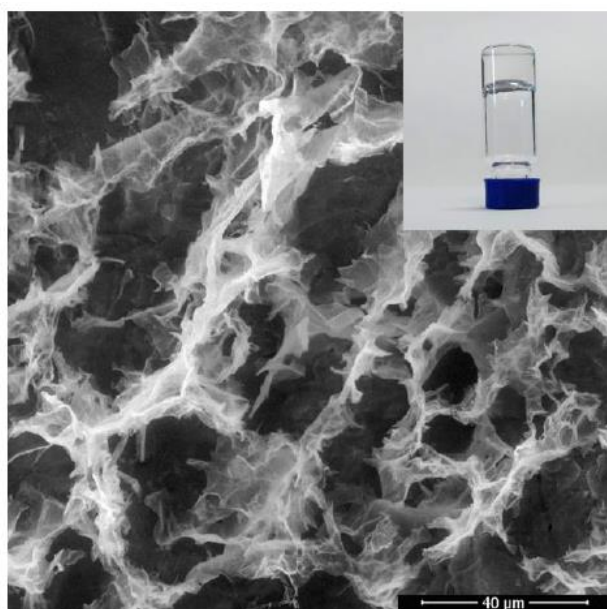


Figura 6. Imagen de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) del hidrogel de Fmoc-FF. En la imagen insertada se puede observar el aspecto macroscópico que posee este tipo de gel.

El uso intensivo de Fmoc en la fabricación de geladores supramoleculares también se debe a sus ventajas, como la facilidad de incorporarse en derivados de péptidos/aminoácidos mediante síntesis, bajo costo y excelente capacidad para promover el autoensamblaje. Este autoensamblaje se ve favorecido por la presencia del grupo aromático que aumenta la insolubilidad de los péptidos en agua y favorece la autoasociación por interacciones hidrofóbicas.³² Estos geladores supramoleculares que presentan una parte hidrofóbica (grupo aromático) y otra parte hidrofílica (cadena de aminoácidos) se conocen como péptidos anfifílicos (PAs) y son bloques de construcción adecuados para el autoensamblaje molecular.

Además del grupo Fmoc³¹ **5**, existen otras estructuras aromáticas ampliamente utilizadas como el naftaleno³³ **1**, el 2-naftol³⁴ **2**, el anillo de pireno³⁵ **3** o el

carboxibencilo (Cbz)³⁶ **4** entre otras.³⁷⁻³⁹ En la figura 7 se pueden ver algunos ejemplos de hidrogeladores supramoleculares con grupos aromáticos.

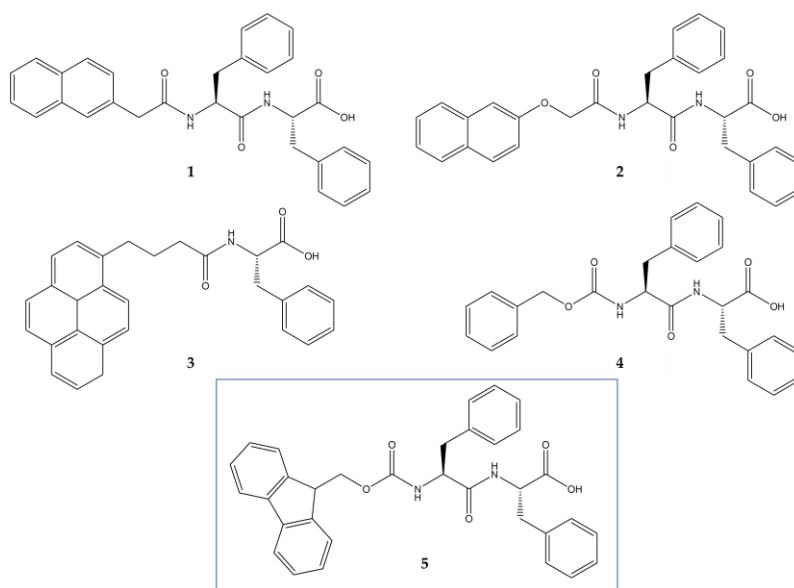


Figura 7. Ejemplos de hidrogeladores con grupos aromáticos.

3. ORGANIZACIÓN JERÁRQUICA DE LOS GELES SUPRAMOLECULARES

Los geles supramoleculares están formados por moléculas que se autoorganizan en múltiples escalas de longitud⁴⁰ mediante un procedimiento “bottom up”. Steed y colaboradores explican esta organización jerárquica que conduce al proceso de gelificación mediante los siguientes pasos:¹

1. Asociación de las moléculas individuales.
2. Formación de oligómeros por interacción entre las moléculas.
3. Formación de fibrillas por extensión de los oligómeros.
4. Formación de fibras por la unión de varias fibrillas.
5. Interacción de las fibras en una red interconectada.
6. Inmovilización del disolvente en la red fibrilar, normalmente por efectos de la tensión superficial.

Para entender mejor el mecanismo de formación de un gel, de manera similar al comportamiento de agregación de proteínas, el proceso de autoensamblaje de los LMWG se puede clasificar en diferentes niveles jerárquicos, todos mediados por interacciones no covalentes⁴¹ (Figura 8). Así encontramos que los agregados supramoleculares poseen estructura primaria, secundaria y terciaria.⁴²

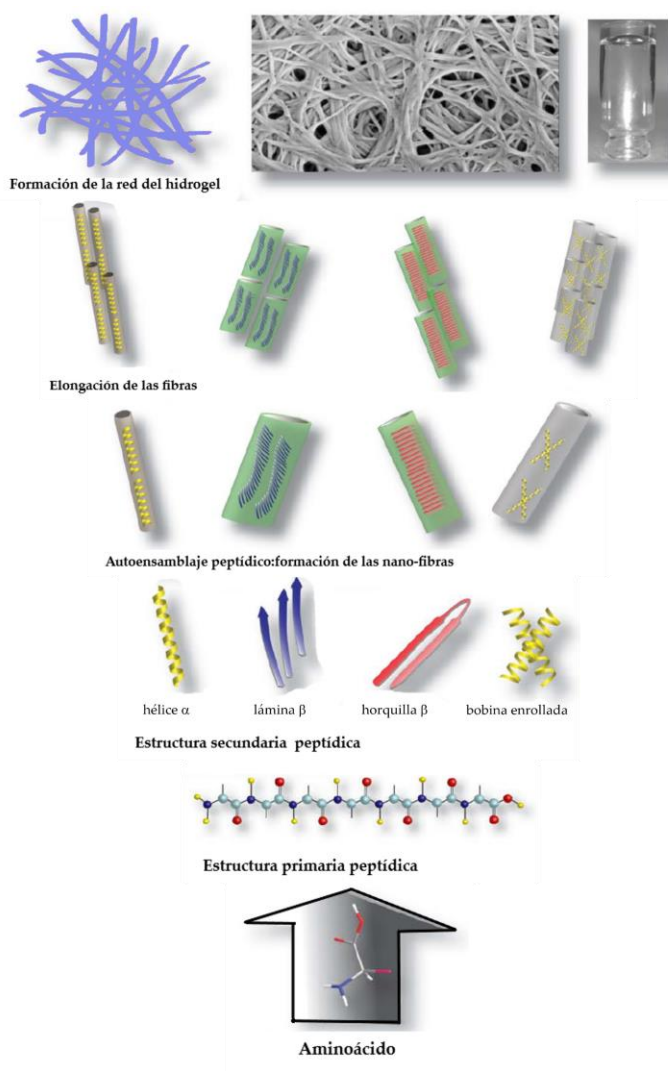


Figura 8. Ilustración esquemática simplificada del proceso de autoensamblaje jerárquico involucrado en la formación de hidrogel a partir de moléculas peptídicas. Imagen adaptada de ref⁴² con permiso de RSC Advances.

Estructura primaria: viene determinada por los acontecimientos que ocurren a nivel molecular que promueven la agregación o auto-ensamblaje⁴³ a través de interacciones no covalentes dirigidas, como enlaces de hidrógeno y apilamiento π - π . La estructura molecular se encuentra dentro del rango de angstroms y nanómetros

Estructura secundaria: la estructura secundaria se refiere a la morfología de los agregados, en su mayoría unidimensionales, que generalmente están en el rango de nano a micrómetros. Dependiendo de la estructura molecular del gelificador, se pueden encontrar diferentes motivos estructurales secundarios, como una hélice α , una lámina β , una horquilla β o una bobina enrollada. La **lámina β** es una de las estructuras secundarias más comunes y regulares en las proteínas. Está formada por enlaces de hidrógeno intermoleculares entre hebras β laterales. La formación de agregados de proteínas y fibrillas en forma de lámina β es la responsable de la aparición de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer.⁴⁴

Estructura terciaria: la agregación de estructuras secundarias a través de interacciones no covalentes da a su vez superestructuras en el rango de micro a milímetros (Figura 9) que incluyen láminas,⁴⁵⁻⁴⁷ cintas,⁴⁸ discos,⁴⁹ esferas,⁵⁰ micelas,⁵¹ barriles,⁵² tubos,⁵³⁻⁵⁵ y fibrillas.⁵⁶⁻⁵⁹ Las fibrillas son estructuras privilegiadas capaces de un ensamblaje de orden superior que conduce a la formación de redes que constituyen la formación de hidrogeles macroscópicos.

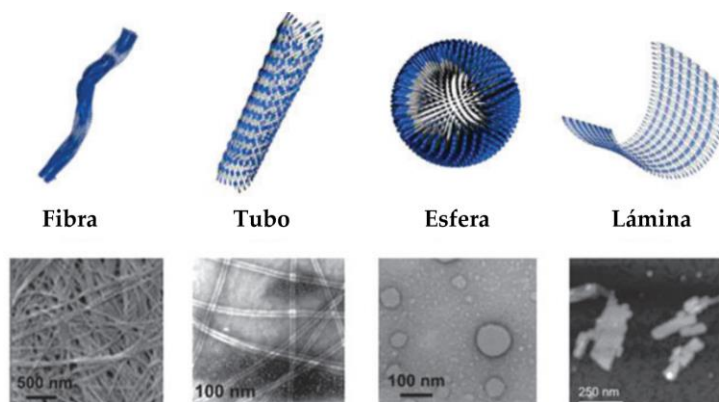


Figura 9. Diferentes nanoestructuras obtenidas después del autoensamblaje de di- y tripéptidos conteniendo grupos Fmoc. Imagen adaptada de la ref⁶⁰ con permiso de Chem. Soc. Rev.

3.1. Polimerización supramolecular

El autoensamblaje molecular suele ser un evento estocástico, es decir, la nucleación y el crecimiento de la estructura ocurren en todo el volumen de la muestra y son difíciles de controlar. La obtención de estructuras altamente organizadas a partir de moléculas discretas que se autoensamblan por medio de interacciones no covalentes, es lo que se conoce como **polimerización supramolecular**. A pesar de ciertas similitudes entre la polimerización covalente y supramolecular, lo último ocurre a través de interacciones no covalentes entre monómeros, lo que hace que estos procesos sean reversibles y más susceptibles a los cambios ambientales.

Basándonos en trabajos de Meijer y colaboradores. Los polímeros supramoleculares pueden clasificarse aludiendo a su mecanismo de crecimiento, es decir, desde la asociación de una o varias especies hasta la formación de agregados de mayor tamaño, correlacionándose con diferentes modelos de polimerización covalente. Los tres mecanismos más habituales para la polimerización supramolecular son **isodésmica** (análogo de la polimerización de crecimiento escalonado), recuerda a un proceso de polimerización clásica por condensación. Por otro lado, está la polimerización **cooperativa o de nucleación-elongación** (análoga a la polimerización de crecimiento de cadena),⁶¹ donde los monómeros se unen para formar núcleos activos y una vez formados, el crecimiento de estos es más rápido dando lugar al régimen de elongación.

La principal diferencia entre ambos mecanismos es la gran variación en el peso molecular de los agregados resultantes. En un proceso isodésmico, la energía libre que se desprende al formarse la especie supramolecular es igual, independientemente de los monómeros constitutivos. Eso hace que haya una distribución muy amplia de tamaños. Sin embargo, en un mecanismo cooperativo, la energía libre que se libera al formarse un núcleo es habitualmente mayor que la desprendida en la elongación. Eso implica que, una vez formado el núcleo, las unidades monoméricas tengan más tendencia a unirse a los núcleos ya formados que a formar nuevos núcleos. La

consecuencia es una menor polidispersidad y, por tanto, unas propiedades muy distintas para la estructura supramolecular (Figura 10). De hecho, los sistemas autoensamblados, particularmente aquellos gobernados por un mecanismo cooperativo, a menudo pueden dar lugar a más de un polimorfo, lo que sugiere que los intermedios metaestables pueden evolucionar y quedar atrapados bajo condiciones cinéticas.^{62,63} Por último, **de cadena de anillo** (similar a la polimerización de apertura de anillo), si bien este tercer mecanismo es menos frecuente.

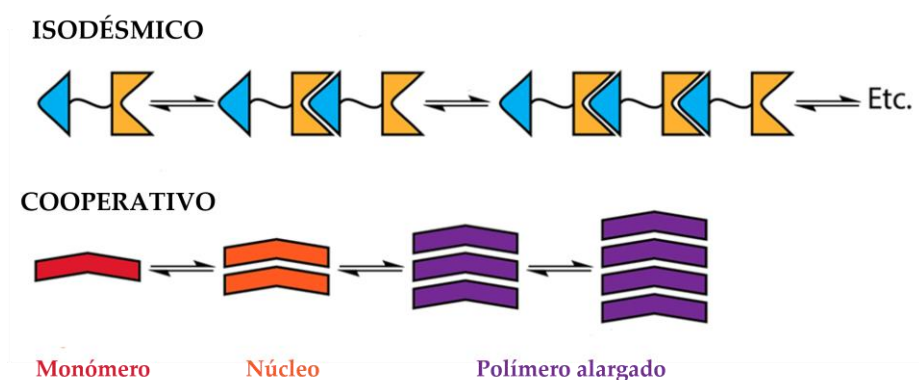


Figura 10. Esquema representativo de los modelos de polimerización supramolecular isodésmico y cooperativo. Imagen adaptada de la ref⁶⁴ con permiso de ACS Publications.

4. MÉTODOS PARA LA FORMACIÓN DE HIDROGELES SUPRAMOLECULARES

La formación de un hidrogel supramolecular, o hidrogelación supramolecular, se origina a partir de un equilibrio entre dos comportamientos aparentemente paradójicos—disolución y precipitación—de los hidrogelificantes en agua. Requiere interacciones intermoleculares adecuadas para formar una red molecular, pero, al mismo tiempo, las cadenas de la red deben interactuar con una gran cantidad de moléculas de agua. Por lo tanto, los gelificadores deben poseer fracciones tanto hidrofóbicas como hidrofílicas para lograr el equilibrio esencial para la

hidrogelación.²⁷ Los protocolos más utilizados para la preparación de los hidrogeles supramoleculares se pueden clasificar en varias categorías descritas a continuación.

4.1. Cambio de temperatura

Es uno de los métodos más simples para la formación de geles. Consiste en someter a los gelificadores a una rampa de calor y frío, primero para solubilizarlos por encima de su T_{gel} (temperatura máxima en la que un gel sigue manteniendo su identidad) y luego para ensamblarlos durante la etapa de enfriamiento.⁶⁵ Aunque es uno de los métodos más simples para formar un gel, no siempre permite un control preciso sobre la estructura de los ensamblajes peptídicos, visiblemente por un cambio en la turbidez entre las muestras. Esta falta de control en el autoensamblaje se debe probablemente a las diferencias de temperatura a través del hidrogel durante el enfriamiento y los flujos convectivos en la fase de solución. Todos estos efectos de cambio de temperatura tienden a interferir con la cinética de autoensamblaje.

4.2. Cambio de pH

Es posible lograr la gelificación disminuyendo o aumentando el pH para aquellos geladores que posean grupos ionizables ácidos y básicos respectivamente (como suele ser el caso de los geladores peptídicos). En el caso de Fmoc-FF, su solubilidad aumenta mediante la desprotonación del grupo carboxílico. La consiguiente protonación del gelificador promoverá el autoensamblaje y, por tanto, el pH al que ocurre este proceso depende en gran medida del pKa aparente del gelador.^{66,67}

Un problema común que suele encontrarse en la gelificación dependiente del pH es la dificultad de lograr obtener un gel homogéneo tras la adición de ácido o base. El empleo de ácidos, como el ácido clorhídrico para inducir la formación del gel,⁶⁸ en muchos casos origina geles heterogéneos debido al rápido proceso de gelificación.

Una buena estrategia para obtener hidrogeles homogéneos y reproducibles usando cambios de pH fue demostrada por Adams y colaboradores quienes introdujeron el uso de δ -gluconolactona (GdL).⁶⁹ Se sabe que la GdL se hidroliza lentamente en agua generando ácido D-gluconico y, como consecuencia, disminuye lentamente el valor de pH. La hidrólisis lenta de GdL también tiene la ventaja de permitir seguir el proceso de gelificación en el tiempo y además se puede modular la tasa de cambio de pH modificando la cantidad de GdL, ofreciendo nuevas posibilidades para una hidrogelación programada (Figura 11).

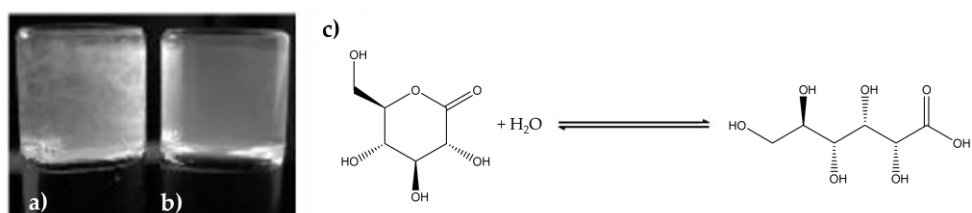


Figura 11. Fotografía de hidrogeles preparados por adición de a) HCl y b) GdL.
c) Hidrólisis de GdL

4.3. Por adición de sales

La adición de sales y las interacciones electrostáticas pueden servir como estímulo para el autoensamblaje de péptidos, proteínas y otros sistemas. Particularmente en agua, el equilibrio de unión del hidrogelador-ion tiene una fuerte competición con ésta ya que solvata las sales y, por lo tanto, el efecto de los iones en el comportamiento del agua como solvente puede usarse para controlar la formación de gel en lugar de la interacción ion – hidrogelador en sí.⁷⁰ El método de cambio de sal consiste en agregar y disolver una sal en una solución peptídica homogénea, que en consecuencia cambia la repulsión o conformación electrostática del gelificador para desencadenar la reacción molecular de autoensamblaje.

Frank Hofmeister⁷¹ describió la capacidad relativa de diferentes sales para disminuir (kosmótopos) o aumentar (caótopos) la solubilidad de las proteínas y algunos otros coloides. Los kosmótopos tienden a desestabilizar la interfase

agua-soluto promoviendo interacciones hidrofóbicas mientras que los caótropos tienden al efecto opuesto, es decir, estabilizar la interfase del soluto debilitando las interacciones hidrofóbicas.^{71,72} Basándose en estos estudios, Ulijn⁷⁰ investigó la influencia en el autoensamblaje de Fmoc-dipéptidos con soluciones de aniones que van desde caótropos a kosmótropos. Por ejemplo, en el *Capítulo I* de la presente Tesis Doctoral se estudia en detalle el impacto de diferentes sales en el autoensamblaje de péptidos cortos aromáticos y cómo influye en las propiedades finales del hidrogel resultante.

4.4. Cambio de disolvente

Junto con las metodologías de cambio de pH y adición de sal, se descubrió que los hidrogeles pueden formarse también mediante un método de cambio de disolvente. En primer lugar, los gelificantes se disuelven completamente en un disolvente orgánico miscible con el agua en el que la molécula es muy soluble, como 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP) o dimetilsulfóxido (DMSO), y posteriormente se mezclan con una mayor proporción de agua, en la que el gelador no es soluble, para formar un hidrogel peptídico.

4.5. Otros métodos de gelificación

A pesar de que los métodos de gelificación explicados anteriormente son los más utilizados, existen otros que merecen ser comentados, como la gelificación **catalizada por enzimas**, la que es llevada a cabo mediante el empleo de **reacciones químicas**, o aquella que emplea **ultrasonidos** para inducir la gelificación.

Uno de los primeros ejemplos de gelificación catalizada por enzimas fue descrito por Xu y colaboradores (Figura 12).⁷³ Describen una disolución de Fmoc-Tirosina fosforilada (Fmoc-Yp) a la que se le añade la enzima fosfatasa alcalina (ALP, *Alkaline Phosphatase*) y como resultado de la hidrólisis del grupo fosfato se obtiene un hidrogel. La ALP cataliza la desfosforilación para convertir una molécula iónica y soluble en

agua (Fmoc-Yp) en una molécula anfifílica (Fmoc-Y). En cuanto a la gelificación inducida por reacciones químicas, existen muchas que se identifican como medios cruciales para producir hidrogeles, incluidas las reacciones de hidrólisis,⁷⁴ la “click chemistry”,⁷⁵ reacciones de Diels Alder⁷⁶ y las reacciones redox.⁷⁷



Figura 12. Gelificación provocada por la hidrólisis de una enzima.

Los ultrasonidos también pueden influir en el autoensamblaje supramolecular, reestructurando la agregación de moléculas, modificando las interacciones intermoleculares y favoreciendo la autoasociación que depende de la secuencia del péptido y el entorno del solvente.⁷⁸

5. TÉCNICAS COMÚNMENTE EMPLEADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES SUPRAMOLECULARES.

La caracterización en detalle de los geles supramoleculares se basa en el estudio de su estructura desde la **escala molecular** a la **escala macroscópica** pasando por la **escala nanométrica**. Para intentar comprender la gelificación es necesario utilizar la combinación de una amplia gama de habilidades y técnicas. En la Figura 13 podemos ver un resumen de las diferentes técnicas que son apropiadas para analizar las conformaciones que se forman en los diferentes niveles jerárquicos estructurales y se explicarán aquellos métodos más empleados para caracterizar cada una de ellas.

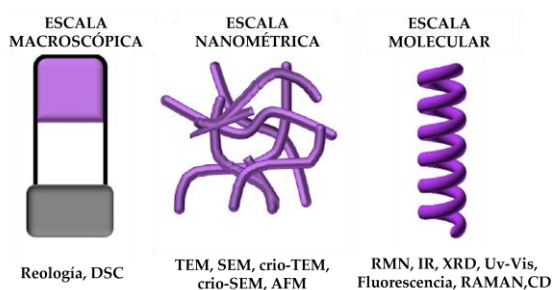


Figura 13. Ilustración de las distintas escalas de autoensamblaje con las técnicas más apropiadas para el análisis de las estructuras formadas en cada una de ellas. Imagen adaptada de la referencia⁷⁹ con permiso de Elsevier.

5.1. Estudio a escala macroscópica

Una de las técnicas más utilizadas y sencillas para estudiar las propiedades macroscópicas de un gel es la prueba de **inversión de vial**. El método consiste en la observación visual tras invertir un vial en el que se encuentra el gel. De acuerdo con la inspección visual, el material se puede clasificar fácilmente como una disolución, un líquido viscoso, un semigel o un gel autoconsistente, lo que puede contribuir a la selección de técnicas más adecuadas para caracterizar aún más los hidrogeles. Proporciona una impresión intuitiva sobre la consistencia y forma de los hidrogeles.³²

La **reología** es una técnica muy útil para describir las propiedades macroscópicas de materiales viscoelásticos proporcionando información sobre las características mecánicas de los hidrogeles supramoleculares. Además, nos informa del comportamiento reológico del gel mediante la aplicación de un estímulo mecánico y posterior recuperación de la estructura tridimensional después de su rotura (autocuración), muy importantes para el empleo de hidrogeles en aplicaciones de ingeniería de tejidos, así como para evaluar su potencial para la administración mínimamente invasiva *in vivo* mediante inyección.^{80,81} Estas propiedades serán estudiadas a lo largo de este trabajo.

Una técnica comúnmente utilizada para la caracterización reológica en el régimen viscoelástico lineal (LVR, *Linear Viscoelastic Region*) del material es el cizallamiento oscilatorio de pequeña amplitud, y esto incluye el uso de pruebas de

barrido de frecuencia, pruebas de barrido de tiempo y pruebas de barrido de deformación. En esta zona, a valores bajos de deformación, existe una independencia de los módulos viscoelásticos con la amplitud de la deformación por cizallamiento. Entre los distintos módulos viscoelásticos se encuentran G^* , el módulo viscoelástico complejo, que comprende G' y G'' . El módulo de almacenamiento o elástico, G' , representa el comportamiento elástico del material, y por tanto, su capacidad de volver a su estado original después de la deformación. G'' , el módulo de pérdidas o viscoso, representa el comportamiento viscoso del material. Para muestras de tipo gel, el módulo de almacenamiento (G') debe ser apreciablemente mayor que el módulo de pérdida (G''). La reología bajo cizalla consiste en colocar una pequeña cantidad de material entre dos superficies de modo que pueda ser deformado mediante esfuerzos o deformaciones de cizalla. Un ejemplo típico, es la cizalla mediante discos paralelos o geometría plato-plato (Figura 14).

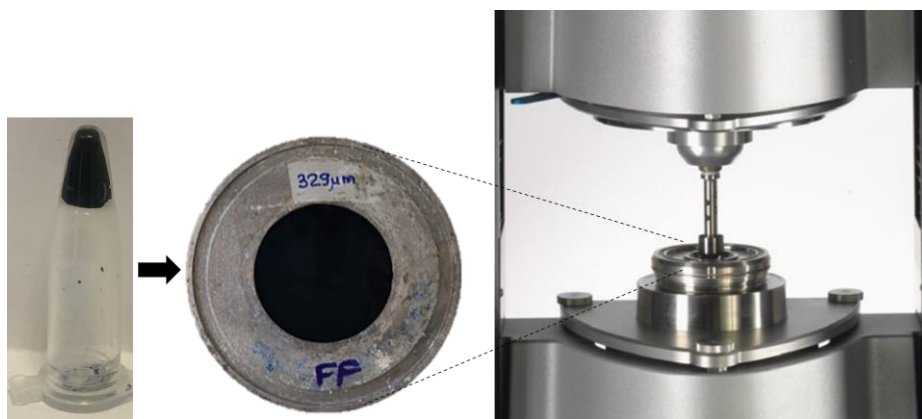


Figura 14. De izquierda a derecha: hidrogel de Fmoc-FF con nanopartículas magnéticas (NPM) formado en el interior de un Eppendorf; hidrogel de Fmoc-FF +NPM formado en un pocillo de 35 mm x 35 mm utilizado para su posterior adaptación a la base del reómetro. Fotografía de la geometría plato-plato usada para medir las propiedades viscoelásticas en el reómetro.

Asimismo, también se pueden llevar a cabo pruebas en el régimen no lineal, mediante cizalla oscilatoria de gran amplitud, que suele ir acompañado del daño o rotura del hidrogel de forma irreversible.⁸² Mediante el empleo de reómetros también

se puede determinar la temperatura de transición gel-sol, o temperatura de gelificación.⁸³ La temperatura de gelificación (T_{gel}) es un parámetro comúnmente usado a la hora de caracterizar macroscópicamente un gel.

Por su parte, la calorimetría diferencial de barrido (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) es un método termoanalítico de caracterización con el que también se puede estudiar la T_{gel} , analizando la entalpía y temperatura asociadas a las transiciones que sufre el hidrogel. Además puede proporcionar información sobre las propiedades térmicas de los precursores intermediarios y los intercambios de energía durante la formación de gel inducida por calor. Cualquier proceso que ocurra durante la gelificación se puede analizar y recoger en un termograma.⁹

5.2. Estudio a escala nanométrica

El enfoque más popular para estudiar nano-morfologías se basa en técnicas de microscopía que aseguran una alta resolución, a partir de las cuales se pueden ver y comprender los detalles de los agregados que conducen a la hidrogelación.

Dentro de las técnicas de microscopía electrónica, encontramos las microscopías de transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*), donde las imágenes se forman cuando los electrones pasan a través de una muestra suficientemente delgada y de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscopy*), donde las imágenes se producen cuando la superficie de una muestra es escaneada con un haz de electrones. La microscopía electrónica tiene la capacidad de revelar las estructuras de objetos pequeños con una resolución de hasta 0,5 angstroms (para TEM) y de 0,4 nanómetros (para SEM). Un tipo de microscopía TEM es la microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM, *Scanning Transmission Electron Microscopy*). Un STEM es un microscopio donde los electrones pasan a través de una muestra delgada, al igual que en un TEM. Sin embargo, el STEM se diferencia del TEM convencional por enfocar el haz de electrones en un punto que escanea la muestra, similar al microscopio electrónico de barrido (SEM). Esto hace que STEM sea adecuado para técnicas

analíticas como la imagen de campo oscuro anular de contraste Z (HAADF-STEM, *High-Angle Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscopy*) y el mapeo espectroscópico de las muestras mediante energía de rayos X de dispersión (XEDS, *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*). Sin embargo, para visualizar las muestras en TEM y SEM un requisito es observarlas completamente secas en las condiciones operativas (por ejemplo, alto vacío) y esto hace que reproduzcan con menos fidelidad la estructura nativa del hidrogel. Además, los agentes de tinción (p. ej., acetato de uranilo, fosfotungstato o tetróxido de osmio), que se usan en TEM para mejorar la calidad/contraste de las imágenes, pueden interactuar con los gelificadores y producir falsos resultados en la muestra.³²

Afortunadamente, las técnicas de microscopía electrónica criogénicas⁸⁴ (crio-TEM y crio-SEM) permiten obtener imágenes del estado nativo del gel. El disolvente de las muestras se sublima *in situ* y ello permite observar la estructura fibrilar y las cavidades que antes ocupaba el disolvente. Además, el desarrollo de otra técnica, la microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM, *Environmental Scanning Electron Microscopy*), también proporciona un enfoque útil para caracterizar hidrogeles supramoleculares bajo cierta humedad. Dentro de las técnicas microscópicas, también se encuentra la microscopía de fuerza atómica (AFM, *Atomic Force Microscopy*) que proporciona imágenes topográficas tridimensionales de la superficie y de la altura de la estructura del gelificador. Con AFM, se pueden analizar muestras hidratadas *in situ* en condiciones de alta humedad o incluso sin deshidratación³² (Figura 15).

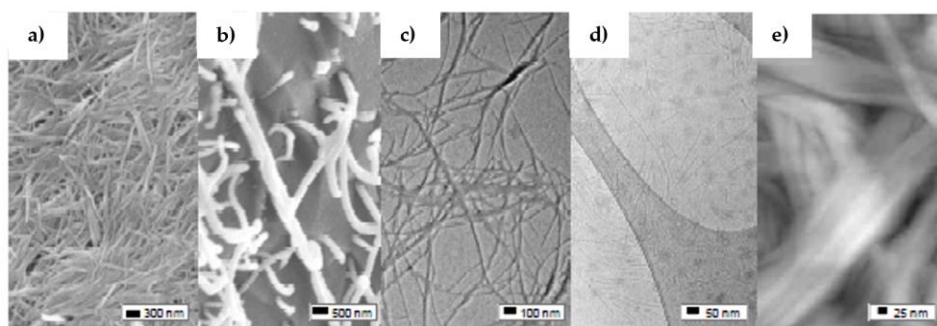


Figura 15. Imágenes de fibras autoensambladas obtenidas por diferentes técnicas microscópicas. A) SEM; b) Crio-SEM; c) TEM; d) Crio-TEM; e) AFM.

Una técnica de microscopía no tan común en la caracterización habitual de los hidrogeles supramoleculares y que se utilizará principalmente en el *Capítulo I* de esta memoria, es la microscopía de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM, *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*). Es una técnica que hace uso de las propiedades inherentes de los marcadores fluorescentes. Además de tener espectros de emisión característicos, cada molécula fluorescente tiene un tiempo de vida propio que refleja cuánto tiempo pasa el fluoróforo en estado de excitación antes de emitir un fotón. El análisis del tiempo de vida proporciona información adicional a las mediciones estándar de la intensidad de la fluorescencia. Por tanto, con esta técnica, se producen imágenes con la intensidad de cada píxel determinada por el tiempo de vida, τ , que permite ver el contraste entre materiales con diferentes tasas de desintegración de la fluorescencia (Figura 16). Las imágenes que se obtienen son multidimensionales, es decir contienen información tanto del tiempo de vida en cada uno de los píxeles como de la intensidad total recogida. Nos proporciona información sobre el ambiente del fluoróforo en las fibras, sobre cambios conformacionales, detección de interacciones moleculares y separación de múltiples componentes entre muchas otras.⁸⁵ Esta técnica nos permite realizar un estudio tanto a escala nanométrica como molecular.

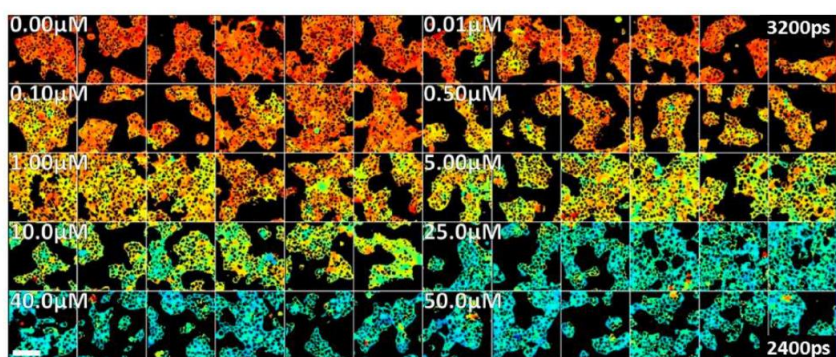


Figura 16. Imágenes FLIM de un sensor específico para la detección de actividad quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK, *Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase*) en cultivos de esferoides tumorales, respondiendo a diferentes concentraciones del activador AMPK. La escala de colores arbitraria representa tiempos de vida de luminiscencia entre 2400 y 3200 ps. Figura adaptada de la ref⁸⁶ con permiso de Sensor.

5.3. Estudio a escala molecular

Para comprender el empaquetamiento molecular, y la estructura que se forma tras el autoensamblaje de los péptidos se utilizan con frecuencia técnicas espectroscópicas como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), la espectroscopia infrarroja, el dicroísmo circular (CD), la fluorescencia, espectroscopia UV-vis y la espectroscopía RAMAN. Además, también se emplean técnicas de difracción, como la difracción de rayos X (XRD) y técnicas computacionales.

La *espectroscopia de RMN* es una técnica que permite entender a nivel molecular los procesos de autoensamblaje. Debido a los problemas derivados de la rigidez de las moléculas cuando se encuentran en estado gel (difícilmente observables mediante esta técnica), se suelen realizar los experimentos en condiciones cercanas a la gelificación. Esta técnica es muy útil para estudiar los procesos de agregación de las moléculas o cambios conformacionales (análisis a concentración variable)⁸⁷ o detectar modificaciones que se producen al romper térmicamente las interacciones supramoleculares (análisis a temperatura variable).⁸⁸ Del mismo modo, la *espectroscopia infrarroja* se puede utilizar para mostrar las interacciones supramoleculares que se producen por enlaces de hidrógeno específicos (vibraciones OH, NH, C=O) y por interacciones de van der Waals (vibraciones C-H). Por otro lado, la quiralidad de los ensamblajes supramoleculares puede ser importante en la comprensión y el diseño de la funcionalidad de los hidrogeles y se investiga con mayor frecuencia con *espectroscopia de dicroísmo circular* (CD). Al analizar los espectros de CD, se puede recopilar además información sobre las constantes de equilibrio, los cambios conformacionales, el plegamiento, la desnaturalización de las proteínas, y la estructura secundaria de la secuencia peptídica.⁸⁹

La *espectroscopia de fluorescencia* es otro tipo de espectroscopia electromagnética que analiza la fluorescencia de una muestra. Introducir marcadores fluorescentes permite evaluar el proceso de agregación del péptido en la formación del gel.⁹⁰ La *espectroscopia UV-visible* es muy útil para estudiar el proceso de formación del gel,

además de proporcionar evidencias de cambios en la composición, concentración o entorno químico. La cinética de la reacción también se puede rastrear si la absorbancia se ve afectada. UV-vis y fluorescencia son especialmente útiles para identificar entornos hidrofóbicos dentro de hidrogeles o detectar cambios en la hidrofobicidad del entorno para un grupo determinado. Una técnica fluorescente que permite la investigación de las interacciones moleculares y que se va a utilizar en el *Capítulo I* es la transferencia de energía de resonancia de Förster, (FRET, *Förster resonance energy transfer*). A grandes rasgos, esta técnica se basa en la excitación de una molécula donadora que produce la transferencia directa de energía de excitación a otra molécula receptora, la cual puede ocurrir en distancias muy pequeñas (1-10 nm). La transferencia de energía se demuestra apagando la fluorescencia donante junto con una reducción en el tiempo de vida fluorescente, y un incremento de la emisión fluorescente en el receptor.⁹¹

Otro tipo de espectroscopía de fluorescencia novedosa y que se va a utilizar también en el *Capítulo I*, es la espectroscopia de correlación de tiempo de vida de fluorescencia (FLCS, *Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy*). Esta técnica presenta la ventaja de medir dos o más especies fluorescentes presentes en la misma muestra de manera precisa separando las curvas para cada una de ellas, además, elimina el ruido de fondo y la luz dispersa que con otras técnicas sería muy difícil de suprimir. Con esta técnica se puede estudiar la determinación exacta de concentraciones, comportamiento de difusión (Figura 17), interacciones moleculares y dinámica molecular.⁹²

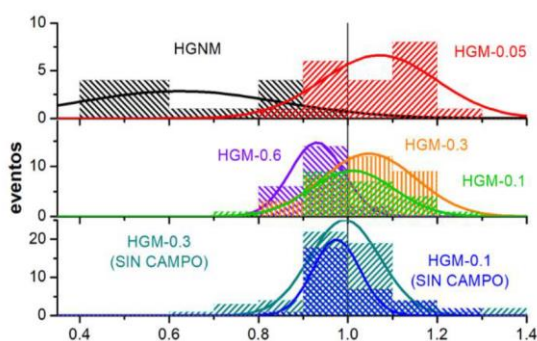


Figura 17. Ejemplo del uso de FLCS para estudiar la distribución del tamaño de poro de la red de hidrogel y, por lo tanto, la difusión de solutos a través de ella usando un colorante **4-Ome-PG** (4-methoxy-Pennsylvania Green). Se estudia el parámetro de difusión en hidrogeles sin partículas magnéticas (HGNM) y en hidrogeles con partículas magnéticas (0.05-0.6% (v/v) (HGM-0.05-0.6) formadas en presencia de campo y HGM-0.1 y HGM-0.3 formadas en ausencia de campo magnético (No H). Figura tomada de la ref⁹³ con permiso de la Royal Society of Chemistry.

La *espectroscopia RAMAN* permite recopilar datos estructurales atómicos y moleculares y medir propiedades como la cristalinidad. Las bandas espectrales Raman indican la presencia de diferentes grupos funcionales, con una región de huella digital única para cada sustancia.⁸² En concreto esta técnica se va a utilizar ampliamente en el *Capítulo IV*, donde se estudiarán los parámetros más característicos del espectro Raman de los nanotubos de carbono (CNT). Estos espectros son bastante interesantes debido a los fenómenos de resonancia y la sensibilidad a la estructura del nanotubo.⁹⁴

Las técnicas de *difracción de rayos X* (XRD) cuando se aplican a los hidrogeles ayudan a determinar la disposición y las estructuras de las moléculas en los ensamblajes. Es una técnica no destructiva que se basa en los fenómenos de dispersión de rayos X para caracterizar y definir varios materiales cristalinos a medida que los patrones de difracción muestran las disposiciones relativas de los átomos de la estructura. La difracción en polvo (P-XRD) es el tipo más común que se utiliza para analizar materiales en estado sólido y puede acomodar el uso de muestras en forma de polvo, película delgada o a granel.⁹⁵ La difracción de rayos X se usa en un gel seco

y esto puede ser problemático, lo más común es suponer que no se producen cambios en la muestra durante el secado. Se puede utilizar otras pruebas como la dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS, *Small-Angle X-ray Scattering*) para determinar cómo se empaquetan las moléculas en estado pregelificado como en estado gel, así como para seguir la transición entre los dos tipos de agregados.⁹⁶ Los rayos X, como otros tipos de radiación electromagnética, pueden generarse mediante fuentes de radiación sincrotrón. Las ventajas más importantes de la radiación sincrotrón es su amplio rango de longitudes de onda y su elevada intensidad. Por último, las *técnicas computacionales* también desempeñan un papel importante en la investigación de las interacciones entre los gelificadores, lo que puede ayudarnos a comprender los mecanismos de gelificación y los posibles modos de agregación.⁹

Es importante conocer las ventajas y desventajas de cada técnica de caracterización y como combinarlas considerando el mecanismo de gelificación y otros posibles factores de cada gelificador para obtener los mejores resultados.

6. HIDROGELES HÍBRIDOS SUPRAMOLECULARES

Los materiales sintéticos basados en LMWG abren oportunidades interesantes en el diseño de sistemas multicomponente debido a su naturaleza simple, bajo costo, alta versatilidad y por ser obtenidos por una metodología “*bottom-up*”.⁹⁷ Los **geles híbridos**, generados a través de la incorporación de dos o más elementos de naturaleza diferente, interaccionan entre sí a nivel molecular o nanométrico y mezclan sinérgicamente las propiedades de los componentes individuales. El material integrado puede poseer características personalizadas, mostrando cualidades mecánicas mejoradas, morfologías deseadas, complejidad estructural y funcional implementada, estructuras supramoleculares novedosas, mayor estabilidad y bioactividad mejorada.⁹⁸

Según Buerkle y Rowan⁹⁹ estos geles multicomponente se pueden clasificar en tres clases principales. La *primera clase* requiere todos los componentes agregados

para formar el gel; es decir, ningún componente forma un gel por sí mismo (Figura 18a). Un ejemplo es el desarrollado por Das Mahapatra y colaboradores, los cuales describieron la formación de un hidrogel híbrido constituido por un Fmoc-tripéptido embebido en PVA, poli(vinil alcohol).¹⁰⁰ Observaron que el hidrogel de tripéptido puro era inestable y se convertía en sol después de media hora; la adición de PVA (polímero soluble en agua) a la matriz del gel formó un hidrogel híbrido de péptido-polímero mecánica y térmicamente estable.

Una *segunda clase* utiliza dos (o más) gelificadores que pueden co-ensamblarse juntos o en ensamblajes distintos. En tales sistemas puede ocurrir que, (a) ambos gelificadores interactúen entre sí para formar co-polímeros, (“co-assembly”). Este tipo de asociación se explicará en más detalle en el *Capítulo I* de la Tesis Doctoral. Por el contrario, puede ocurrir que (b) los dos gelificadores se autoasocien consigo mismos dando como resultado dos tipos de nanofibras diferentes dentro del gel, lo que se conoce como “self-sorting”. En un sistema de “self-sorting”, las moléculas discriminan entre propias y no propias, de modo que los ensamblajes puros de una molécula coexisten con ensamblajes puros de la otra (Figura 18b).

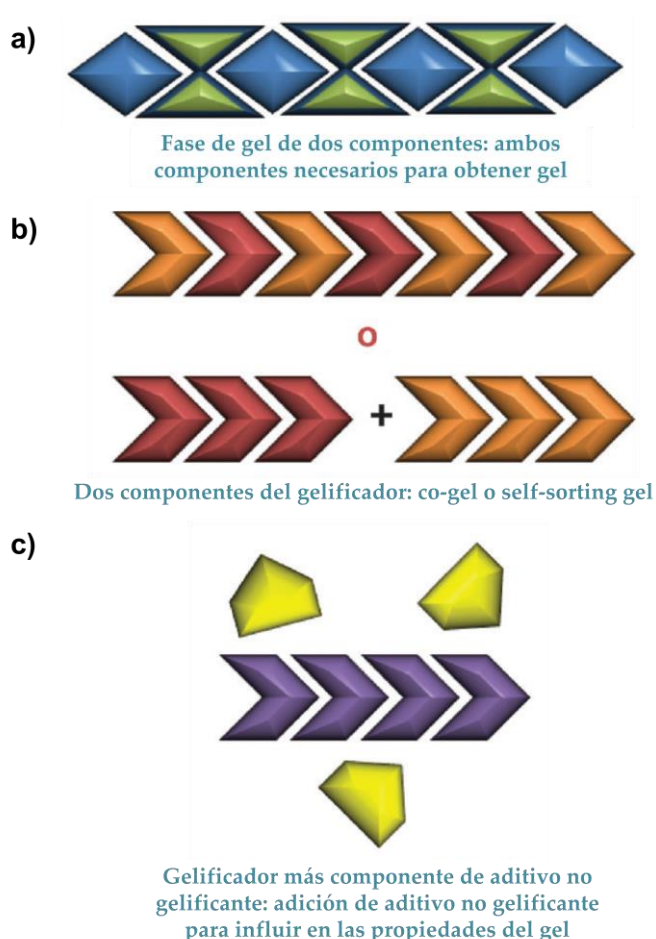


Figura 18. Ilustración de las tres principales clases de geles supramoleculares multicomponentes. Imagen adaptada de⁹⁹ con permiso de Chem. Soc. Rev.

Por último, la *clasificación final* consta de uno (o más) gelificadores y uno (o más) aditivos que no gelifican pero que pueden afectar al proceso de ensamblaje y por lo tanto a las propiedades del gel (Figura 18c). El impacto de los aditivos y el momento de la incorporación a la matriz puede alterar el proceso de autoensamblaje del péptido. Por otro lado, la promoción del autoensamblaje en presencia de aditivos puede maximizar las interacciones entre ambos materiales dando lugar a materiales híbridos y/o compuestos más homogéneos. Podemos encontrar agentes no gelificantes como polímeros, tensioactivos, materiales bioactivos, nucleótidos, materiales fotoactivos, nanopartículas, sales, materiales de carbono, etc. que ayudan

a mejorar las propiedades de gelificación, actividad biológica, encapsulación de fármacos, eficiencia de liberación, cultivo celular y propiedades eléctricas y de biodetección, con el objetivo de crear nuevos materiales con una gran variedad de aplicaciones.¹⁰¹⁻¹⁰⁷ Esta última clasificación se va a comentar más detalladamente, centrándonos en aquellos materiales que se van a ir desarrollando a lo largo de este trabajo.

6.1. Hidrogeles supramoleculares incorporando nanopartículas

La incorporación de nanopartículas en la matriz del hidrogel es una de las estrategias más comunes para provocar alteraciones en sus características tanto microscópicas como macroscópicas. Las nanopartículas se pueden incorporar dentro de los hidrogeles mediante encapsulación física o química.

Un caso destacable de materiales que incorporan nanopartículas es el de los **hidrogeles magnéticos o ferrogeles**. Estos materiales se obtienen por combinación de una matriz gel con algún tipo de nanopartícula (o micropartícula) magnética. La incorporación de nanopartículas magnéticas (NPM) permite el desarrollo de hidrogeles inteligentes que son capaces de responder a un campo magnético externo y modificar sus propiedades (microestructura, comportamiento mecánico, etc.). Esta cualidad hace que estos materiales sean únicos, ya que sus propiedades se pueden controlar de forma remota mediante campos magnéticos.¹⁰⁸ El método de preparación puede también influir en las propiedades finales del ferrogel. Se han desarrollado varios métodos para fabricar hidrogeles magnéticos, un método de **mezcla**¹⁰⁹ (donde un hidrogel no magnético se sumerge en una suspensión magnética, absorbiendo las NPM durante el proceso de hinchamiento), el método de **precipitación *in situ***¹¹⁰ (donde las NPM se sintetizan dentro de un hidrogel no magnético) y el método de **entrecruzamiento**¹¹¹ (donde la reticulación de los precursores del hidrogel se realiza en presencia de NPM, (Figura 19). En el *Capítulo II* se desarrolla un hidrogel magnético formado por este último método.

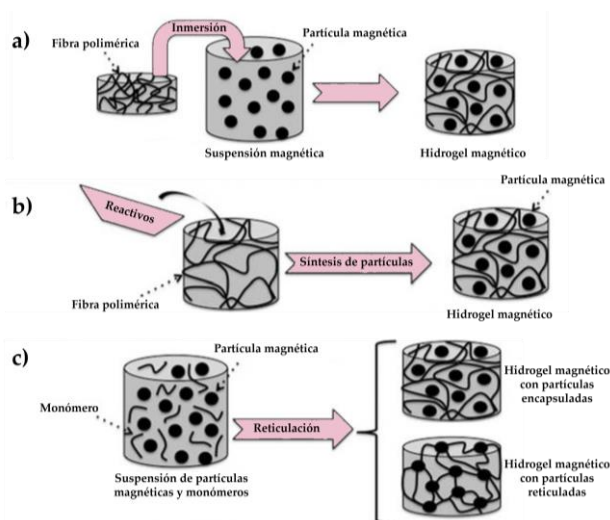


Figura 19. Diferentes estrategias para la preparación de hidrogeles magnéticos. a) Método de mezcla, b) Método de precipitación *in situ* y c) Método de entrecruzamiento.

Las partículas magnéticas son sustratos sólidos que permiten su recubrimiento y funcionalización para diferentes propósitos. La naturaleza de la capa de recubrimiento puede modular las interacciones entre las nanopartículas (NPM) y fibras que forman los geles, lo que tiene un impacto directo en las propiedades de los hidrogeles.¹¹² Un ejemplo de ello, ha sido desarrollado por nuestro grupo de investigación en el que se crea un hidrogel de Fmoc-FF con nanopartículas de hierro en su interior recubiertas con polietilenglicol (PEG) para producir un gel de Fmoc-FF con un aumento en la resistencia del material.⁹³ Das y colaboradores introdujeron otro enfoque muy interesante, aunque bastante elaborado, utilizando el coensamblaje de esferas de polidopamina recubiertas de magnetita con difenilalanina para formar un hidrogel con respuesta a estímulos magnéticos.¹¹³

6.2. Hidrogeles supramoleculares como plantillas para fabricación de nanomateriales

La red del hidrogel supramolecular peptídico puede ser una plantilla eficiente para la fabricación de nanomateriales con un control adecuado del tamaño y la dimensión.¹¹⁴ La ventaja más importante de emplear el autoensamblaje para construir materiales es que los bloques de construcción monoméricos individuales a menudo influyen en las propiedades del material resultante y los materiales basados en péptidos juegan un papel superior debido a su funcionalidad y morfología fácilmente ajustables.¹¹⁵

En general, las velocidades de reacción lentas, ayudadas, por ejemplo, por niveles bajos de sobresaturación y concentraciones de reactivos, se utilizan para facilitar interacciones favorables específicamente en la superficie orgánica, de modo que la deposición del material a nanoescala se produzca preferentemente a lo largo de las superficies accesibles de la plantilla.¹¹⁶

Las tres principales vías de síntesis para formar nanomateriales usando geles supramoleculares como plantilla son: proceso de **coensamblaje *in situ***, proceso de **postranscripción** y **proceso de autoensamblaje**. En el coensamblaje *in situ* se produce la gelificación en presencia de precursores del gel y materiales inorgánicos-orgánicos; mientras, que en el proceso de postranscripción, primero tiene lugar el autoensamblaje dando lugar a un gel preformado y posteriormente se produce la impregnación o la difusión de precursores minerales o híbridos. Mediante estas dos estrategias, se pueden obtener materiales híbridos nanofibrosos, que consisten en fibrillas de gelador recubiertas con especies inorgánicas/híbridas parcialmente condensadas. Estas especies pueden ubicarse en las superficies externas (exotemplado) y, a veces, también internas (endotemplado) de las nanofibrillas del gel. En algunos casos, la plantilla del gel se elimina posteriormente para obtener una réplica de nanofibras, que puede o no tener un hueco interno. La mayoría de los materiales han sido preparados a través de estos tipos de procesos. En la tercera

estrategia, en cambio, la especie reactiva ya está unida al gelador y puede desempeñar un papel activo en la autoagregación del gel fibroso.¹¹⁷ Uno de los primeros ejemplos del uso de gelificadores como plantillas para fabricar nanomateriales fue demostrado por Shinkai y colaboradores en 1998 que usaron el proceso de postranscripción para formar un gelador derivado del colesterol como plantilla para preparar hebras de sílice huecas¹¹⁸ (Figura 20). Adicionalmente demostraron que la quiralidad de la hebra del gelificador era transferida a la de sílice¹¹⁹ (Figura 21).

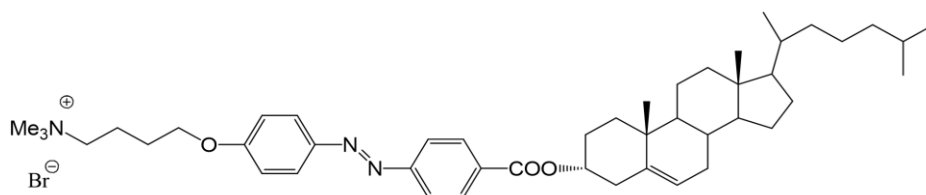


Figura 20. Gelador derivado del colesterol.

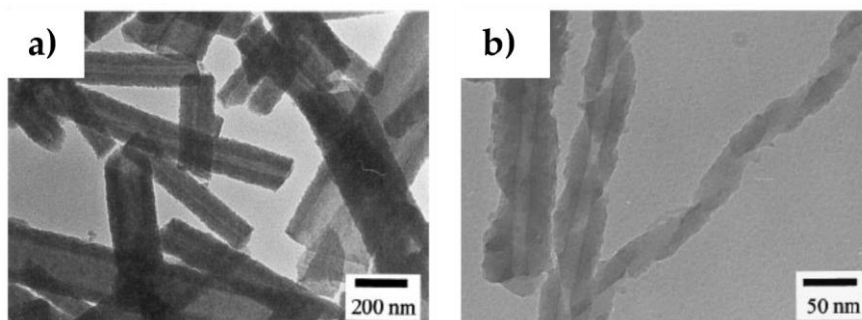


Figura 21. Imágenes de microscopio electrónico de (a) hebras de sílice hueca y (b) hebras de sílice quirales en forma de hélice. Imagen adaptada de la ref¹¹⁹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

La ventaja de los autoensamblajes de péptidos, es que pueden producir nanoestructuras diferentes como fibras, tubos, cintas, láminas, etc., que pueden usarse como plantilla para producir los nanomateriales. Se han formado varios materiales de este tipo utilizando esta particular técnica. Un ejemplo de ello es la formación de nanotubos de sílice huecos de pared simple a partir de un hidrogel basado en un péptido anfífilo simple.¹²⁰ En el *Capítulo III* de la Tesis Doctoral, se crea un hidrogel

híbrido biomimético del tejido óseo en el que se produce el autoensamblaje de un péptido artificial, el Fmoc-FF y precursores de hidroxiapatita, de manera simultánea y que ofrece un nuevo proceso de nanofabricación de materiales sintéticos muy organizados.

Recientemente se han utilizado estructuras autoensambladas diferentes de una serie de péptidos cortos anfifílicos asimétricos que consisten en Ac-EI₃K-NH₂ (EI₃K), Ac-EI₄K-NH₂ (EI₄K), Ac-KI₃E-NH₂ (KI₃E) y Ac-KI₄E-NH₂ (KI₄E). Se prepararon a temperatura ambiente nanomateriales de sílice y titanio que reproducían fielmente las estructuras morfológicas de las estructuras peptídicas. Este trabajo demuestra los efectos de las interacciones no covalentes en el autoensamblaje de péptidos y también proporciona nuevos conocimientos sobre el diseño y la preparación de materiales inorgánicos a partir de plantillas orgánicas ajustables¹²¹ (Figura 22).

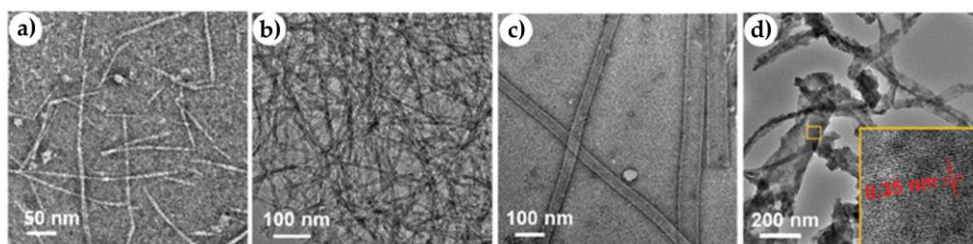


Figura 22. Imágenes TEM de EI₃K autoensamblado a pH 7 (a) y nanoestructuras de sílice mediadas por EI₃K a pH 7 (b). Imágenes TEM de nanoestructuras EI₄K (c) y titanio autoensambladas mediadas por nanotubos EI₄K (d). El recuadro en el panel d) es la imagen TEM de alta resolución que muestra la existencia de nanocristales de TiO₂. Imagen tomada de la ref¹²² con el permiso de ACS Publications.

6.3. Hidrogeles supramoleculares incorporando materiales de carbono

Un tipo específico de aditivos que merece una discusión detallada comprende la familia de nanoestructuras de carbono (Figura 23). Todos comparten la característica común de estar compuestos por átomos de carbono, que en la mayoría de los casos tienen hibridación sp² e interconectados en una red en forma de panel.¹²³ Sin embargo, pueden ser extremadamente diversos tanto en términos de estructura y de

morfología, como en reactividad y propiedades fisicoquímicas. Comprenden fullerenos 0D,¹²⁴ nanocebollas¹²⁵ y nanopuntos luminiscentes,¹²⁶ nanotubos de carbono (CNT, *Carbon Nanotubes*) unidimensionales,¹²⁷ y materiales basados en grafeno.¹²⁸ Otros ejemplos incluyen grupos de nanocuernos (CNH, *Carbon Nanhorns*)¹²⁹ y nanodiamantes (ND, *Nanodiamonds*), que presentan una gran cantidad de átomos de carbono con hibridación sp^3 .¹³⁰

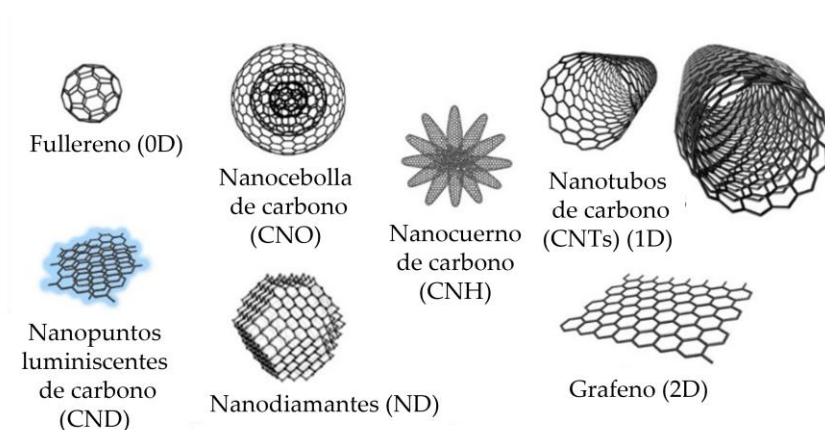


Figura 23. Ilustración de los diferentes tipos de materiales de carbono. Figura adaptada de la ref¹³¹ con permiso de Molecules.

De entre todos ellos los CNT son una buena opción para fabricar materiales híbridos. Presentan una morfología tubular y se pueden clasificar en nanotubos de pared simple SWCNTs (*Single-Walled Carbon Nanotubes*) o nanotubos de pared múltiple MWCNTs (*Multi-Walled Carbon Nanotubes*) dependiendo del número de capas de pared gráfénica enrollada.¹³² En concreto, los SWCNT presentan numerosas ventajas como alto grado de conductividad eléctrica que se puede modular con la concentración de CNT, redes fáciles de fabricar utilizando SWCNT disponibles comercialmente, sus propiedades de transporte se comprenden bien,¹³³⁻¹³⁵ y encuentran una multitud de aplicaciones en electrónica, optoelectrónica y termoelectrónica.¹³⁶

Por un lado, los péptidos son componentes ideales para aplicaciones biotecnológicas¹³⁷ e interactúan favorablemente con el agua¹³⁸ y por otro lado, la

conductividad eléctrica y térmica mejorada y la resiliencia mecánica de los nanotubos de carbono proporcionan características adicionales a los sistemas basados en péptidos.¹³⁹ En el *Capítulo IV* del presente trabajo se desarrolla un material híbrido de Fmoc-dipéptido y materiales de carbono con posibles aplicaciones en el área de la espintrónica.

Existen muchos ejemplos de materiales híbridos peptídicos con materiales de carbono como el descrito por el grupo de Marchesan donde se evaluaron los efectos de tres nanocarbonos oxidados diferentes, nanotubos de carbono o CNT como material 1D, lámina de óxido de grafeno (GO, *Graphene Oxide*) como material 2D y CNH (*carbon nanhorns*) como material tridimensional (3D) en el autoensamblaje del tripéptido desprotegido Leu-^DPhe-^DPhe en condiciones fisiológicas. En todos los casos se obtuvieron hidrogeles supramoleculares y las propiedades viscoelásticas se vieron claramente afectadas por los nanocarbonos, que aumentaron la rigidez y la resistencia a la tensión aplicada. En particular, el comportamiento de autocuración se observó solo en el caso de los CNT¹⁴⁰ (Figura 24).

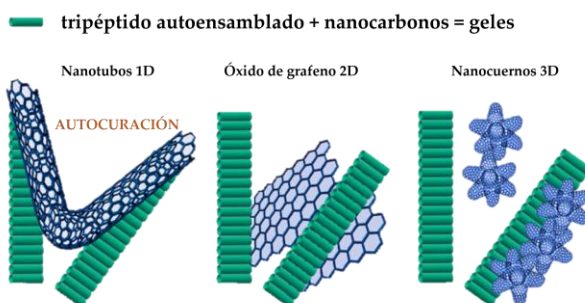


Figura 24. Representación de los tres diferentes tipos de materiales de carbono usados en este trabajo para la formación del hidrogel híbrido peptídico. Figura adaptada de¹⁴⁰ con permiso de ACS Publications.

También se han ensayado este tipo de geles híbridos para la liberación controlada de fármacos. La combinación de ácido L-ascórbico y óxido de grafeno en dos hidrogeles formados por Fmoc-Tyr-OH/Fmoc-Tyr(Bn)-OH (Fmoc-Tirosina/Fmoc-bencil-tirosina) y Fmoc-Phe-OH/Fmoc-Tyr(Bn)-OH (Fmoc-

Fenilalanina/Fmoc-bencil-tirosina), demostró que mediante la irradiación de luz infrarroja cercana, se consiguió liberar una gran cantidad de ácido ascórbico provocado por el calor generado por los nanomateriales de carbono. Este ejemplo ofrece perspectivas interesantes para la administración controlada de fármacos.¹⁴¹

En definitiva, estos ejemplos ilustran el enorme alcance funcional que las interacciones no covalentes proporcionan a estos sistemas gelificantes. La adecuada elección de los componentes moleculares de partida permite construir arquitecturas supramoleculares capaces de combinar varias propiedades en un mismo material de modo que permita el desarrollo de hidrogeles multicomponente con propiedades clave que los hacen adecuados para numerosas aplicaciones.

7. APLICACIONES BIOMÉDICAS DE HIDROGELES SUPRAMOLECULARES

De entre la multitud de aplicaciones de los hidrogeles supramoleculares el progreso de la investigación en el campo de la biomedicina ha sido de especial interés en los hidrogeles supramoleculares basados en péptidos. A continuación, se describen algunas de sus principales aplicaciones.

7.1. Crecimiento celular e ingeniería de tejidos

Es una de las aplicaciones más extendidas dentro de los hidrogeles supramoleculares peptídicos. El diseño y la síntesis de los hidrogeles basados en péptidos miméticos de la matriz extracelular (MEC) los convierten en candidatos prometedores para el cultivo celular y las aplicaciones de ingeniería de tejidos. La MEC es una red supramolecular tridimensional que consiste principalmente en proteínas fibrosas y proteoglicanos, presentes en todos los tejidos y órganos, que proporciona no solo un soporte físico importante para las células circundantes, sino

también señales bioquímicas y biomecánicas para morfogénesis, diferenciación y homeostasis de los tejidos.¹⁴²

Los hidrogeles supramoleculares presentan algunas propiedades clave que los convierten en candidatos ideales para esta aplicación¹⁴³(Figura 25) como capacidad de respuesta (los desencadenantes fisiológicos, como las enzimas, pueden alterar las propiedades de los materiales), flexibilidad (deformación con retención de propiedades mecánicas), biomimetismo (prevención del rechazo del material por parte del huésped y activación de los receptores para inducir procesos celulares), modularidad y especificidad (se pueden incorporar varias funcionalidades en el polímero, lo que permite una multitud de actividades biológicas).

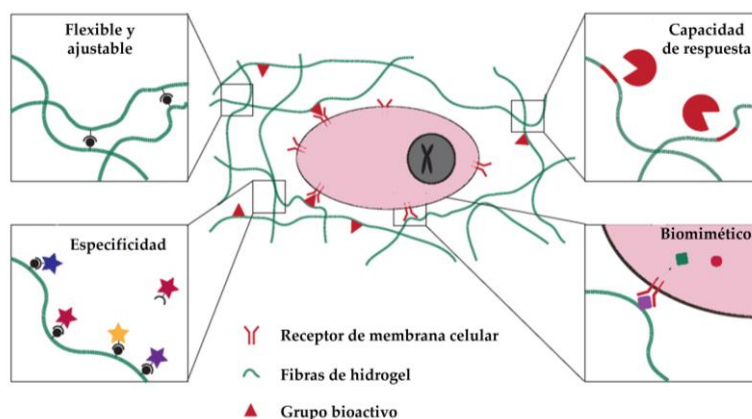


Figura 25. Los péptidos pueden autoensamblarse en matrices biomiméticas que actúan como andamios para generar cultivos celulares. Figura adaptada de¹⁴³ con permiso de Nature Materials.

Los pioneros en este campo fueron Stupp y colaboradores¹⁴⁴ mediante el empleo de péptidos anfifílicos con epítopos bioactivos, como es el caso de IKVAV (isoleucina-lisina-valina-alanina-valina), que promueve una mayor y más rápida diferenciación de las células progenitoras neurales en neuronas. Al mezclarse con medios de cultivo celular, se autoensamblaron en una red tridimensional de nanofibras (en presencia de iones de calcio) y proporcionaron un hidrogel capaz de promover que las células progenitoras neurales se diferencien rápidamente en neuronas.

Un importante motivo es el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp), que posee propiedades que imitan la matriz extracelular y se ha identificado como una secuencia de adhesión celular esencial mínima.¹⁴⁵ Este tripéptido funciona como un ligando que se suele combinar con otro componente que proporciona la rigidez estructural, la estabilidad y el entorno nanofibroso. Desde su descubrimiento, se han desarrollado numerosos materiales que han sido funcionalizados con RGD para una amplia gama de propósitos, incluidas las aplicaciones médicas. Por ejemplo, Quan y colaboradores desarrollaron un andamio bioactivo que contenía 16 aminoácidos, el factor de adhesión celular (RGD) y ácido poliaspártico para construir un andamio funcional capaz de regenerar hueso. Los estudios de cultivos celulares indicaron que este andamio no solo promovió la expresión de genes osteogénicos, sino que también aceleró la proliferación y diferenciación de células madre mesenquimales de médula de rata (rMSC) hacia el osteoblasto.¹⁴⁶ En otro estudio reciente, se describe un PA funcionalizado con la secuencia bioactiva Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) (Figura 26). La aplicación de geles de RGDS-PA acelera la recuperación de las heridas por quemaduras mediante la estimulación del fibroblasto y la proliferación de células epiteliales, lo que favorece la cicatrización de las heridas.¹⁴⁷

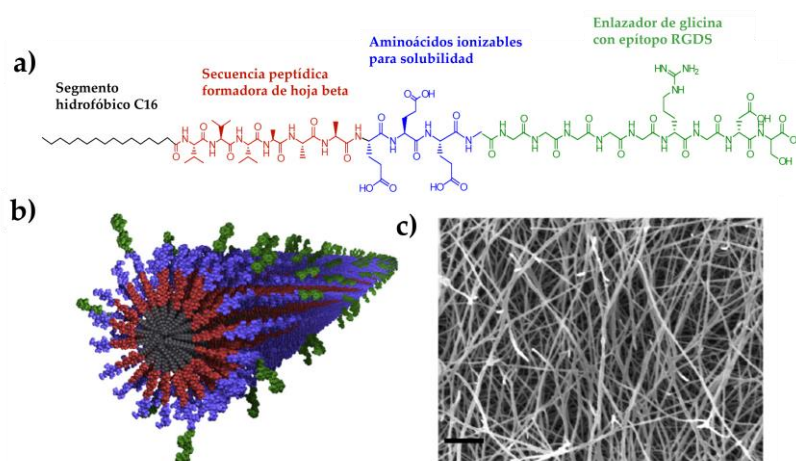


Figura 26. a) Estructura química de la molécula bioactiva de RGDS-PA. b) Ilustración tridimensional de una nanofibra de moléculas de PA bioactivas. Estas nanofibras forman fácilmente geles a través de enlaces cruzados iónicos. c) Imagen del gel en microscopía electrónica de transmisión. Barra de escala: 500nm. Figura adaptada de ref¹⁴⁷ con permiso de Elsevier.

Centrándonos en los materiales de Fmoc-dipéptidos que contienen este epítipo bioactivo, (material de estudio en el *Capítulo II* de este manuscrito), Ulijn y colaboradores diseñaron un hidrogel mezclando Fmoc-FF y Fmoc-RGD, como andamio 3D para células de fibroblastos. Se descubrió que este hidrogel mixto proporcionaba una red de nanofibras rígidas altamente hidratadas con láminas β entrelazadas por el apilamiento π - π de los grupos Fmoc.¹⁴⁸ Utilizando un principio de diseño similar, se han desarrollado numerosos trabajos usando Fmoc-aminoácidos. Un ejemplo de ello, que va un paso más allá, es desarrollado por William y colaboradores basándose en sus trabajos previos con Fmoc-FRGDF (N-fluorenilmetiloxycarbonil-fenilalanina-arginina-glicina-ácido aspártico-fenilalanina), y muestran que es posible presentar dos epítopos simultáneamente RGD y PHSRN (prolina-histidina-serina-arginina-asparagina) mediante el coensamblaje de ambos, y comparar estos resultados con la efectividad de las señales de un solo péptido. Los resultados mostraron que tanto Fmoc-FRGDF como Fmoc-PHSRN (N-fluorenilmetiloxycarbonil-prolina-histidina-serina-arginina-asparagina) produjeron hidrogeles. El cultivo celular tridimensional *in vitro* de fibroblastos mamarios humanos en el péptido mixto de hidrogel mostró una adhesión, propagación y proliferación dramáticamente mejoradas. Los resultados demostraron que el efecto de sinergia selectiva de PHSRN con RGD es una forma eficaz de aumentar la solidez y la funcionalidad de los andamios autoensamblados.¹⁴⁹

7.2. Liberación de medicamentos

En el campo de la administración de fármacos, la liberación controlada de moléculas huésped bioactivas, como fármacos, vitaminas o factores de crecimiento, desde una red de hidrogel a un sitio diana específico del cuerpo es de gran interés. Debido al carácter no covalente y biocompatible de los hidrogeles supramoleculares peptídicos, su respuesta a estímulos externos es rápida y la disolución completa del gel simplemente da como resultado moléculas pequeñas que pueden ser fácilmente degradadas por enzimas y excretados por el cuerpo. Además, estos sistemas han

atraído un gran interés como formulaciones farmacéuticas para la administración de moléculas durante un largo periodo de tiempo, que de otro modo serían poco solubles, rápidamente degradables o incluso tóxicas.¹⁵⁰

La incorporación de moléculas de fármaco dentro de las nanoestructuras autoensambladas es un proceso que se puede lograr a través de tres vías diferentes:

i) simple atrapamiento físico de moléculas de carga dentro de la red transportadora; ii) interacciones no covalentes entre moléculas de péptido y fármaco; iii) interacciones covalentes entre fármacos y componentes peptídicos.¹⁵¹ Entre otras aplicaciones, la conjugación o encapsulación de agentes terapéuticos como medicamentos contra el cáncer en hidrogeles peptídicos ha sido ampliamente estudiada, ya que los hidrogeles proporcionan una matriz sólida que permite una liberación selectiva y controlada evitando el contacto con tejidos sanos y brindando ventajas en comparación con los medicamentos libres.¹⁵² Por ejemplo, se ha estudiado la encapsulación simultánea de los medicamentos paclitaxel (PTX) y gemcitabina (GEM) dentro de hidrogeles de péptidos OE (VKVKVOVK-V^DPPT-KVEVKVKV-NH₂) inyectables y sensibles al pH para formar un sistema estable de administración conjunta de dos medicamentos. Cuando el hidrogel de péptido OE cargado con fármaco se inyecta cerca del tejido tumoral, ambos fármacos se retienen en este tejido durante un tiempo sostenido y concentrado, liberando el fármaco hidrofílico GEM en grandes cantidades y liberando lentamente el fármaco hidrofóbico PTX hasta su liberación completa, lo que no solo prolonga la duración de la acción del fármaco, sino que también mejora aún más su eficacia.¹⁵³ Asimismo, si a esta matriz de hidrogel se le incorporan nanopartículas magnéticas, el control remoto de la frecuencia y la intensidad del campo magnético aplicado puede mejorar la capacidad de liberación del fármaco, reduciendo los efectos secundarios que provoca el mismo. Por ejemplo recientemente, se ha sintetizado una matriz de hidrogel de naproxeno-dehidropéptido a la que se le incorporaron nanopartículas de ferrita de manganeso. Aquí, los hidrogeles magnéticos de Npx-L-Phe-ΔAbu-OH (1), Npx-L-Trp-Z-ΔPhe-OH (2) y Npx-L-Ala-ΔPhe-Gly-L-Arg-Gly-L-Asp-Gly-OH (3) (siendo Npx: naproxeno; Phe: fenilalanina; ΔPhe:

dehidrofenilalanina; Abu: ácido aminobutírico; ΔAbu: ácido dehidroaminobutírico; Ala: alanina; Arg: arginina; Asp: ácido aspártico; Gly: glicina; Trp: triptófano) se probaron como nanotransportadores para fármacos antitumorales modelo, incluido un derivado de tieno[3,2-b]-piridina y curcumina¹⁵⁴ (Figura 27).

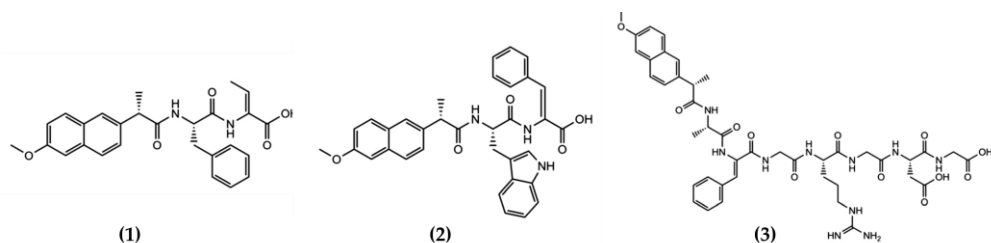


Figura 27. Estructura molecular de los hidrogeladores.

7.3. Inyectabilidad

Estos sistemas de hidrogel se pueden aplicar a los seres vivos de diferentes maneras, mediante inyección oral, ocular, rectal, epidérmica y subcutánea. Por lo tanto, la inyectabilidad de un hidrogel basado en péptidos, lo que significa la transición de gel a sol al aplicar suficiente estrés, puede considerarse como una de las propiedades importantes de estos materiales. En los geles inyectables es importante controlar la cinética de gelificación, es decir, la transición sol-gel, para que esta ocurra dentro de un intervalo de tiempo restringido.¹⁵⁵

Existen dos alternativas principales para la administración del producto mediante una jeringa: **hidrogeles de gelificación *in situ*** e **hidrogeles fluidificantes (*shear-thinning*)**. El primer enfoque se basa en inyectar una mezcla líquida que incluye los precursores de gel y cuya gelificación puede desarrollarse en condiciones fisiológicas por la presencia de enzimas, sales, reticulación química, cambios de temperatura, u otros estímulos.¹⁵⁶ Por ejemplo, Ulijn y colaboradores han demostrado que utilizando una enzima como la termolisina, es posible unir covalentemente dos precursores peptídicos líquidos como Fmoc-aminoácido (precursor A) y dipéptidos (precursor B) dando lugar a la formación de una molécula de hidrogel peptídico

anfífilo que se autoensambla para formar estructuras nanofibrosas, mostrando un método para la creación de hidrogel *in situ* en medio fisiológico¹⁵⁷ (Figura 28).

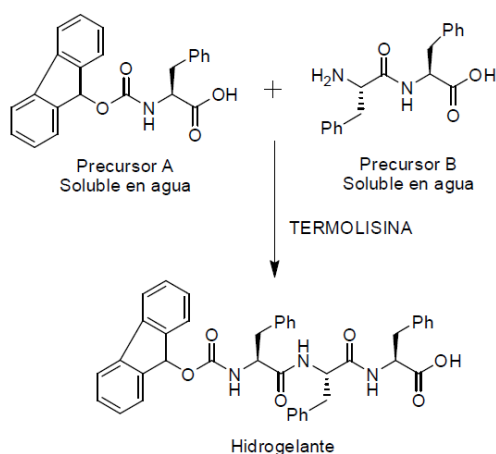


Figura 28. Ejemplo de gelificación *in situ* provocada por la formación de un enlace amida.

Sin embargo, estos hidrogeles gelificantes *in situ* pueden tener algunos inconvenientes ya que, al ser líquidos, su contenido puede filtrarse al cuerpo, y el proceso de gelificación, así como las propiedades biomecánicas finales, pueden verse afectadas por las condiciones *in vivo*. En cambio, el otro tipo de hidrogeles inyectables, los hidrogeles fluidificantes, permiten la formación de un hidrogel antes de la inyección, con las propiedades mecánicas, morfológicas y biológicas deseadas, y que puede fluir como un material de baja viscosidad bajo estrés. Posteriormente pueden recuperar rápidamente su estado inicial por sí mismo (*self-healing*) después de retirar el esfuerzo aplicado, sin la intervención de ningún estímulo externo.¹⁵⁸ Por ello, son buenos candidatos para su uso en aplicaciones biomédicas. De este tipo de materiales, se hablará en más detalle en el *Capítulo II* de esta memoria.

7.4. Acción antimicrobiana

Los agentes antimicrobianos deben actualizarse continuamente para luchar contra las bacterias resistentes a múltiples fármacos que causan enfermedades infecciosas. Los péptidos antimicrobianos con sus ventajas de actividad de amplio

espectro, baja resistencia, acción antibacteriana rápida y baja inmunogenicidad se pueden usar para formar hidrogeles y obtener como resultado un material particularmente útil para su aplicación como agente antibacteriano.¹⁵⁹ La hidrofobicidad de los péptidos es una característica esencial que permite que funcionen como un mejor agente antimicrobiano, ya que determina el grado de penetración en las membranas lipídicas. A mayor hidrofobicidad se produce una permeabilización de la membrana mejor y más efectiva. Sin embargo, los péptidos más hidrofóbicos causan una toxicidad significativa hacia los glóbulos rojos y muestran hemólisis. Por lo tanto, un equilibrio entre la hidrofobicidad y la hidrofiliidad es esencial para una mejor selectividad de los péptidos.¹⁶⁰ Por ejemplo, péptidos anfífilicos han mostrado resultados prometedores frente a la actividad antimicrobiana, como el péptido MAX1 (VKVKVKVKV^DPPTKVKVKVKV-NH₂) introducido por Schneider y colaboradores y que exhibe actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.¹⁶¹ En otros estudios se han usado Fmoc-dipéptidos para formar estructuras con actividades antimicrobianas, como por ejemplo combinado Fmoc-Leucina (que posee propiedades antiinflamatorias y antibacterianas intrínsecas)^{162,163} con Fmoc-Fenilalanina para generar un hidrogel con actividad antimicrobiana.¹⁶⁴

CAPÍTULO I

Estudio del autoensamblaje *vs*
co-ensamblaje de péptidos
aromáticos cortos

RESUMEN

Los péptidos aromáticos cortos anfífilos, poseen la capacidad de autoensamblarse en solución dando lugar a agregados poliméricos supramoleculares. A concentraciones específicas, estos péptidos son capaces de formar redes de fibras entrelazadas extendidas que inmovilizan la solución líquida dando lugar a geles físicos. Estos polímeros supramoleculares han permitido el desarrollo de nuevos materiales blandos e inteligentes que han encontrado aplicaciones en la ingeniería de tejidos, sistemas de administración de fármacos, cristalización de proteínas y otras aplicaciones no biológicas en las últimas décadas.

Haciendo uso de diferentes técnicas microscópicas y espectroscópicas se ha podido estudiar el proceso de autoensamblaje en agua y a temperatura ambiente, tanto de Fmoc-FF en presencia de diferentes sales, como de mezclas de péptidos con diferente quiralidad que contienen grupos Fmoc- y Nap-. Se ha proporcionado información sobre la cinética de formación de fibras, el empaquetamiento de los péptidos dentro de las fibras y la capacidad de los péptidos para auto-ensamblarse después de la rotura (autocuración).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del autoensamblaje

Inspirándose en la naturaleza, los investigadores han creado materiales sofisticados mediante el autoensamblaje.^{61,165-167} Cada célula individual es en realidad en sí misma un ensamblaje supramolecular: su membrana resulta de la asociación de muchas moléculas pequeñas llamadas fosfolípidos, que se autoensamblan mediante interacciones débiles para formar una doble capa de moléculas que conduce a la membrana final (Figura I.1). Los orgánulos dentro de la célula también son el resultado de moléculas que se autoensamblan. Sus propiedades están controladas por una organización molecular precisa a partir de un cuidadoso equilibrio de fuerzas diferentes y generalmente débiles.¹⁶⁸

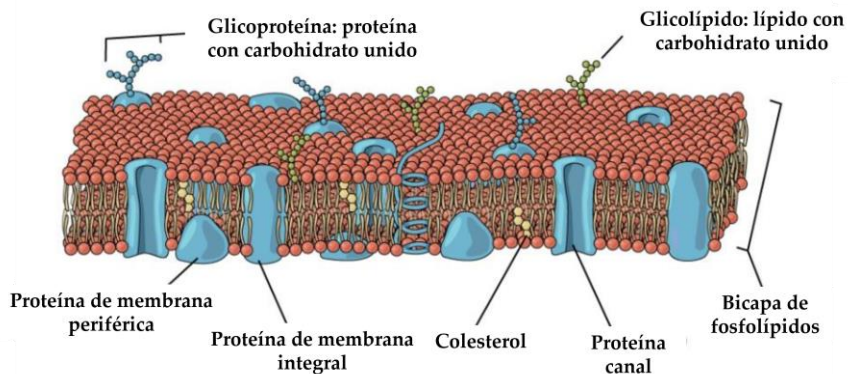


Figura I.1. Representación de la bicapa de fosfolípidos que, entre otros componentes, forma la membrana celular (fuente: Wikipedia).

El **autoensamblaje** no es más que la asociación espontánea y reversible de moléculas en condiciones de equilibrio en estructuras bien ordenadas como resultado de interacciones intramoleculares/intermoleculares no covalentes.¹⁶⁹ El autoensamblaje y la agregación de péptidos y proteínas juegan un papel crucial en muchas de las funciones del cuerpo humano. Por ejemplo, las redes de fibrillas de colágeno proporcionan un andamiaje bioquímico con muchas funciones que gobiernan la morfología y las propiedades mecánicas del tejido biológico.¹⁷⁰ Las

fibrillas de actina ensambladas son elementos esenciales para muchas funciones clave en las células eucariotas, como la motilidad, la morfología, el mantenimiento de la polaridad celular y la regulación de la transcripción. Además, hay una serie de enfermedades asociadas con la agregación errante de proteínas. El mal plegamiento de las proteínas y su posterior ensamblaje en fibrillas de amiloide son características patológicas de varias enfermedades, como el Parkinson, el Alzheimer, la diabetes tipo II entre otras.¹⁷¹ Estos desafíos se originan principalmente por la naturaleza jerárquica intrínsecamente dinámica y multiescala del proceso de autoensamblaje.¹⁷²⁻¹⁷⁴

Estas interacciones no covalentes tan diversas y dinámicas han dado lugar a materiales que muestran reversibilidad, autocuración y capacidad de respuesta a estímulos externos como temperatura, pH, luz, composición del disolvente, concentración, etc.^{116,175-180} Sin embargo, su formación inicial también es dinámica, mostrando una evolución dependiente del tiempo en la que pequeños cambios iniciales en las condiciones pueden tener un impacto significativo en el resultado final, dando lugar a sistemas que presentan mayor adaptabilidad.¹⁸¹⁻¹⁸³ Por tanto, es fundamental comprender los mecanismos moleculares mediante los cuales estas moléculas se autoensamblan.

1.2. Autoensamblaje de péptidos aromáticos cortos

Más allá de la tremenda complejidad del autoensamblaje de biomoléculas naturales,¹⁸⁴⁻¹⁹⁰ el estudio de bloques de construcción bioinspirados más simples capaces de autoensamblarse en condiciones similares puede ayudar a comprender comportamientos más complejos. El autoensamblaje de péptidos aromáticos cortos representa un modelo más simple para estudiar la interacción entre los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas.^{79,191-194} Gazit,¹⁹⁵ y Yan¹⁹⁶ han demostrado que el mecanismo de autoensamblaje de estos péptidos pasa por intermedios metaestables consecutivos que muestran diferentes agregados polimórficos. El trabajo de Gazit, se centra en el péptido aromático corto N-(t-butoxycarbonyl)-L-Phe-L-Phe-COOH (Boc-FF), un ejemplo de péptido con una alta propensión hacia la

autoorganización supramolecular, y describe el camino a través del cual forma una serie de nano-ensamblajes con diferentes características estructurales pasando por fases metaestables que muestran morfologías esféricas y fibrilares, hasta el estado estable final de tubos cristalinos (Figura I.2).

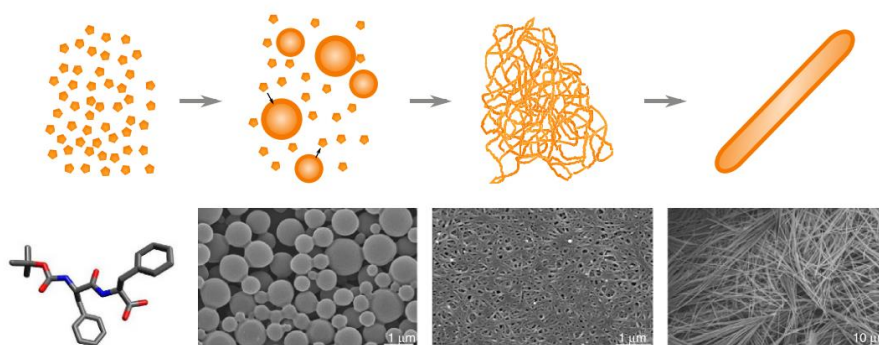


Figura I.2. Representación esquemática de la transición de fase observada en el sistema Boc-FF a lo largo del tiempo con las correspondientes imágenes TEM y estructura molecular de Boc-FF. Imagen sacada de ref¹⁹⁵ con permiso de Nature Communications.

Yan y colaboradores descubren que el mecanismo de formación de nanofibrillas supramoleculares autoensambladas a partir de soluciones homogéneas de aminoácidos y péptidos cortos protegidos por grupos aromáticos como el Cbz o el Fmoc, se produce a través de densas gotas de líquido, formadas como resultado de un proceso de separación de fases líquido-líquido (LLPS, *Liquid-Liquid Phase Separation*), que luego se convierten en nanofibrillas termodinámicamente favorables (en la Figura I.3 se puede ver una representación esquemática del modelo LLPS). Las gotitas de líquido ricas en soluto sirven como precursores de nucleación y los nanoclusters solvatados dentro de ellas actúan como centros de nucleación heterogéneos. La presencia de LLPS disminuye significativamente la barrera de nucleación por la formación de una fase líquida metaestable, que es distinta de la nucleación clásica de un solo paso en una solución homogénea.

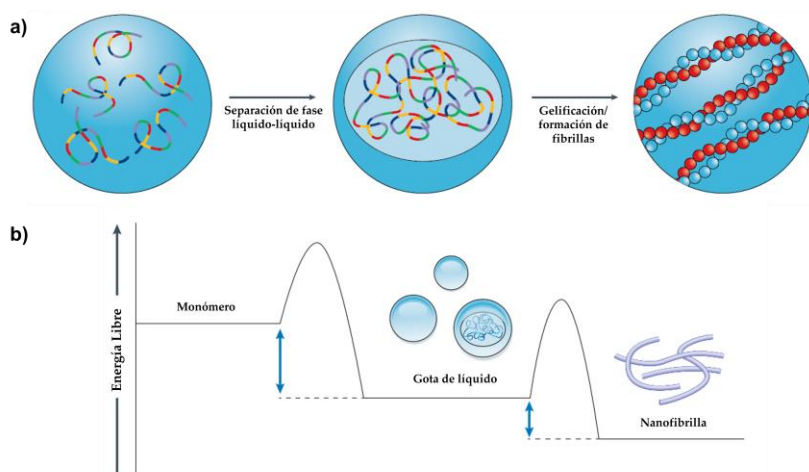


Figura I.3. Mecanismos de separación y condensación de fases líquido-líquido. a) Una solución de péptido homogénea puede someterse a una separación de fases líquido-líquido (LLPS) para dar condensados metaestables y estos, a su vez, pueden sufrir una transición de fase para formar fibrillas sólidas favorecidas termodinámicamente. b) Transición de fase para formar estructuras cada vez más organizadas. La transición desde los precursores de nucleación atrapados cinéticamente a las nanofibrillas se acompaña de una disminución de la energía libre de Gibbs. Imagen tomada de la ref¹⁹³ adaptada de Nature Reviews Chemistry.

Sin embargo, debido a la naturaleza dinámica y compleja, y las concentraciones diluidas requeridas para observar y hacer un seguimiento experimental de los eventos de nucleación y pre-nucleación, estos procesos han sido difíciles de establecer. Además, las técnicas tradicionales utilizadas para caracterizarlos como RMN, UV-vis, CD, XRD y diferentes microscopías electrónicas, son indirectas y/o no pueden estudiar los eventos en tiempo real, lo que puede dar lugar a malas interpretaciones. Una mejor solución sería visualizar directamente el mecanismo de crecimiento de los núcleos a las fibras utilizando microscopía de fluorescencia. Gracias a los recientes avances en las técnicas de microscopía, es posible obtener imágenes en tiempo real de nanofibras supramoleculares. Los grupos de Meijer,¹⁹⁷ De Cola¹⁹⁸ y Hamachi,¹⁹⁹ entre otros^{200,201} han implementado estas técnicas para obtener imágenes *in situ* en tiempo real de la formación de fibras supramoleculares y estudiar los fenómenos de homopolimerización (*self-sorting*) o copolimerización de

monómeros entre fibras, fenómenos difíciles de identificar y estudiar por otras técnicas.

De entre todos los diferentes estímulos capaces de inducir el autoensamblaje, es importante destacar que el autoensamblaje de péptidos Fmoc está significativamente influenciado por la presencia de iones metálicos, pudiendo modular no solo su mecanismo de crecimiento¹⁹⁶ sino también la estructura secundaria de los polímeros supramoleculares resultantes y las propiedades del gel.²⁰² Además, la presencia de iones metálicos coordinados con la estructura supramolecular da lugar a metalogeles con múltiples aplicaciones,²⁰³ incluidas biomédicas.²⁰⁴

1.3. Co-ensamblaje de péptidos aromáticos cortos

El coensamblaje es otro enfoque simple y sólido para obtener materiales basados en péptidos. El término **co-ensamblaje** denota un proceso de autoensamblaje donde dos o más componentes forman una estructura organizada que da como resultado nanoensamblajes estructuralmente cada vez más complejos que pueden tener propiedades físicas y químicas distintas que las monoestructuras originales (Figura I.4).

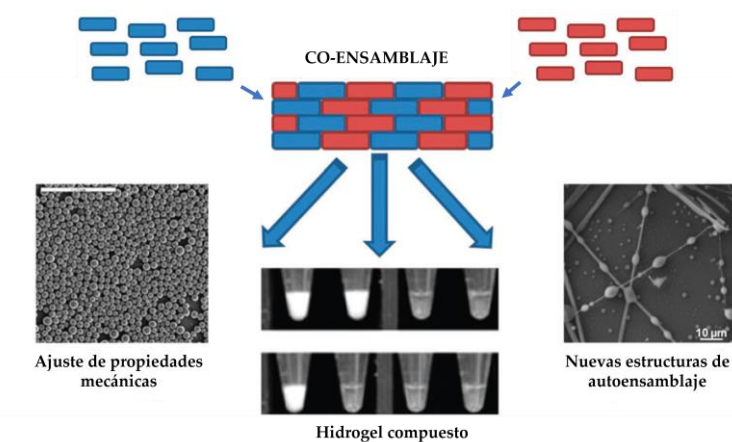


Figura I.4. Ilustración esquemática de dos bloques de construcción coensamblados en copolímeros supramoleculares, para modular sus propiedades físicas con propiedades mecánicas ajustables, obtener hidrogel compuesto y arquitecturas de ensamblaje ajustables. Imagen adaptada de la ref²⁰⁵ con permiso de American Chemical Society.

En comparación con el tradicional autoensamblaje, el co-ensamblaje de diferentes monómeros presenta varias ventajas; por ejemplo, permite la producción de nuevos polímeros con diferentes morfologías y materiales, como geles, con un amplio control sobre sus propiedades mecánicas.^{206–209} Además, la capacidad de controlar el proceso de ensamblaje permite obtener materiales más sofisticados con funciones específicas como el transporte de energía^{210,211} y los biomateriales.²¹²

Parámetros como la concentración, la temperatura, la composición del disolvente y la aplicación de estímulos externos son factores que hacen que el proceso de ensamblaje supramolecular sea muy difícil de controlar siendo particularmente difícil la obtención de copolímeros con una composición bien definida. Aunque se han implementado diferentes estrategias para ejercer un control sobre la distribución relativa de los monómeros, muy pocos trabajos han demostrado, sin embargo, el tipo de copolímero formado.²¹³ Algunas de estas estrategias se basan en diferentes tipos de reconocimiento molecular (enlaces H complementarios, donante-aceptor, interacciones electrostáticas, etc.) para controlar la composición del co-polímero.^{214–216} Se han desarrollado también estrategias para ejercer un control cinético en el proceso de polimerización, lo que ha permitido el desarrollo de polimerizaciones supramoleculares “vivas” y también inducidas por “semillas” permitiendo obtener co-polímeros con un mejor control sobre la distribución de los monómeros.^{63,213,217} Sin embargo, la mayoría de estas recientes estrategias de polimerización se han explorado en disolventes orgánicos utilizando moléculas orgánicas aromáticas como perileno bisimida, porfirinas, etc.,^{63,218–220} apenas estudiándose estos procesos en moléculas biomiméticas que se autoensamblan en agua a temperatura ambiente.^{121,221}

La copolimerización de péptidos anfifílicos cortos aromáticos^{222–224} ha sido investigada principalmente por los grupos de Gazit,^{225,226} Ulijn^{227,228} y Adams,^{66,206–209,229} respectivamente. Ulijn y colaboradores han descrito tres tipos diferentes de co-ensamblajes: ortogonal, cooperativo y disruptivo (Figura I.5), basados en las similitudes estructurales de los péptidos.²²⁸ En particular, los péptidos anfifílicos cortos, como los que tienen grupos Fmoc- y Nap-, pueden autoensamblarse mediante

un proceso **cooperativo**.^{79,191-194} De hecho, recientemente se ha demostrado que el mecanismo de polimerización de estos péptidos cortos anfifílicos pasa por un proceso de nucleación cooperativo.^{195,196,230} Esta fase de nucleación es un estado metaestable cuya persistencia en el tiempo depende de la hidrofobicidad y concentración del péptido. La formación de fibrillas supramoleculares solo ocurre cuando un cambio en las condiciones permite que el sistema supere la barrera de energía libre de la polimerización.

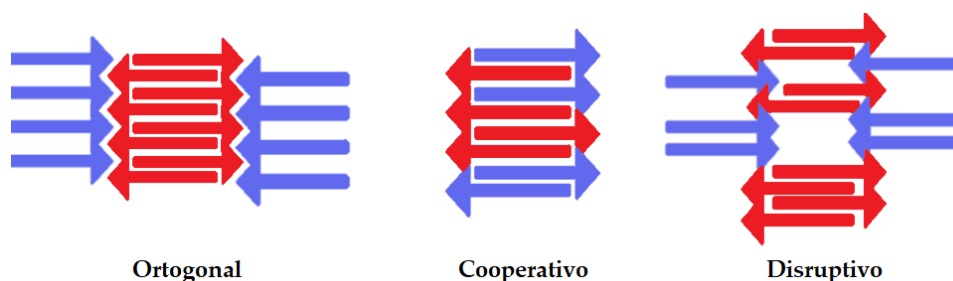


Figura I.5. Diagrama conceptual que ilustra los diferentes modos posibles de co-ensamblaje: (a) autoensamblaje **ortogonal**, donde los bloques de construcción azules y naranjas se segregan en distintos componentes estructurales que pueden interactuar íntimamente entre sí.; (b) autoensamblaje **cooperativo**, donde los componentes básicos se adhieren a un modo común de autoensamblaje dispuestos de manera ordenada; y (c) autoensamblaje **disruptivo**, donde la incorporación aleatoria y los desajustes entre los bloques de construcción dan como resultado la aparición de defectos/discontinuidades en la estructura. Figura modificada de ref²²⁸ con permiso de Biomacromolecules.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Es complicado observar tanto los procesos moleculares que tienen lugar durante las primeras etapas del proceso de autoensamblaje, así como controlar la distribución relativa del monómero dentro de la estructura supramolecular en los procesos de co-ensamblaje. Además, es importante conocer el impacto que pequeños cambios en las condiciones ambientales pueden tener sobre el proceso de autoensamblaje y co-ensamblaje de moléculas biológicas y sobre la estabilidad de los ensamblajes resultantes. Por ese motivo basándonos en esta hipótesis, nuestro objetivo principal

es estudiar y comprender mejor los mecanismos involucrados en estos procesos, compararlos con los resultados ya descritos y estudiar el impacto que tienen en las propiedades finales de los geles. Para ellos, se plantean los siguientes objetivos específico:

PARTE A

1. Sintetizar y estudiar la formación del gel de Fmoc-FF en presencia de diferentes sales metálicas.
2. Monitorear el mecanismo de autoensamblaje temprano y el crecimiento de fibras peptídicas, desde la solución a los geles, usando un fluoróforo sensible al ambiente para la agregación de péptidos con las técnicas FLCS y FLIM.
3. Respalda los resultados obtenidos por FLCS con otras técnicas como microscopía, infrarrojo, reología, etc.
4. Comprender la influencia que pequeños cambios pueden tener en el proceso de autoensamblaje y en las propiedades físicas de los geles resultantes.

PARTE B

1. Sintetizar y estudiar la formación de los geles mixtos de Fmoc-difenilalanina (Fmoc-FF, L) y Nap-dipéptidos como Nap-dialanina (Nap-AA, L y D) y Nap-diglicina (Nap-GG).
2. Estudiar el proceso de co-ensamblaje que tiene lugar por la combinación de Fmoc-FF con los Nap-dipéptidos.
3. Demostrar que ambos monómeros tienen una mayor tendencia a formar co-ensamblajes dando lugar a copolímeros alternativos y comprender el proceso de copolimerización que está llevándose a cabo.
4. Estudiar las propiedades mecánicas de los copolímeros resultantes mediante reología.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE A: Estudio del mecanismo de autoensamblaje de péptidos aromáticos cortos

3.A.1. Estudio y formación de hidrogeles en presencia de sales

En primer lugar, tal y como se ha planteado en el primer objetivo, se llevó a cabo el estudio de gelificación de Fmoc-FF a partir de su sal de sodio, (necesaria para hacerlo soluble en agua). En soluciones acuosas, se sabe que la formación de polímeros supramoleculares es promovida por la hidrofobicidad de los monómeros.⁶⁴ Por lo tanto, y teniendo en cuenta que las interacciones agua: Fmoc-FF son clave para el proceso, nos preguntamos si los cationes metálicos podrían afectar dicha interacción ajustándose a diferentes propiedades: la hidrofobicidad del catión (kosmótropo o caótropo) y las capacidades de unión. Para ello se realizó un estudio inicial de sales con aniones y cationes diferentes (selección recogida en la Tabla I.1). Para los experimentos posteriores se seleccionaron CaCO_3 y Cs_2CO_3 , ya que estas dos sales produjeron hidrogeles homogéneos con propiedades mecánicas significativamente diferentes (columna de módulo de almacenamiento en Tabla I.1), que poseían el mismo anión (más fácilmente comparables) y tenían la propiedad de recuperar su estructura de gel tras la rotura por vórtex (propiedades que se estudiarán más adelante en este trabajo). Así, por ejemplo, dos cationes simples como Ca^{2+} , un kosmótropo, y Cs^+ , un caótropo, podrían ser útiles para tales propósitos.

Se utilizaron tres concentraciones diferentes de sal: 25 mM, 12,5 mM, 6,25 mM combinándolas con tres concentraciones diferentes de péptido: 10 mM, 5 mM, 2,5mM, siendo la relación de péptido:sal de 2,5 en todos los casos (2,5:6,25 mM; 5:12,5 mM; 10:25 mM) (más información de la preparación de los hidrogeles en *Sección Experimental*).

Tabla I.1. Diferentes sales estudiadas en la inducción de la gelificación a la concentración de 10 mM de péptido y 25 mM de sal.

| Sal | Gel homogéneo | Recuperación tras rotura | Módulo de almacenamiento G' (LVR) |
|---------------------------------|---------------|--------------------------|-----------------------------------|
| NaCl | No | No | - |
| CaCl ₂ | No | No | - |
| KCl | Sí | No | - |
| MgCl ₂ | No | No | - |
| CsCl | Sí | No | ~10 ³ Pa |
| BaCl ₂ | No | No | - |
| Na ₂ CO ₃ | Si | Sí | ~10 ³ Pa |
| CaCO ₃ | Si | Si | ~10 ⁴ Pa |
| K ₂ CO ₃ | Sí | Sí | ~10 ² Pa |
| BaCO ₃ | Sí | No | - |
| Cs ₂ CO ₃ | Sí | Sí | ~10 ¹ Pa |
| Li ₂ CO ₃ | Sí | Sí | ~10 ² Pa |
| Na ₂ SO ₄ | Sí | Sí | ~10 ³ Pa |
| CaSO ₄ | No | No | - |
| Cs ₂ SO ₄ | Sí | Sí | ~10 ³ Pa |
| MgSO ₄ | No | No | - |
| BaSO ₄ | No | NO | - |
| LiOTf | Sí | Sí | ~10 ³ Pa |
| Ba (OTf) ₂ | No | No | - |
| Ca (OTf) ₂ | No | No | - |

A continuación, se evaluó la posibilidad de extraer información de agregados supramoleculares Fmoc-FF en presencia de sales de Ca²⁺ y Cs⁺ utilizando diferentes técnicas de fluorescencia. Para ello, se empleó un fluoróforo sensible al medio capaz de dar información sobre las interacciones circundantes tras la intercalación en fibrillas proteicas, el derivado de 9-azetidín-quinolimidina **AQui** [9-(azetidín-1-il)-5-butí-4H-benzo-[de]-[2, 6]-naftiridina-4,6-(5H)-diona].²³¹ La principal ventaja de esta molécula es que experimenta un aumento de hasta 10 veces su valor de emisión al unirse a regiones hidrófobas de proteínas, y también experimenta cambios sensibles

al medio en ambos espectros, en el desplazamiento de la longitud de onda y en la vida media útil de fluorescencia, τ (Figura I.6.).

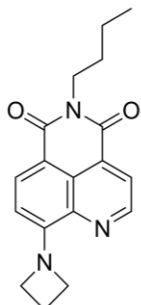


Figura I.6. Estructura del fluoróforo AQui empleado en estos estudios

Mediante la técnica FLIM (recordar *Introducción General* para más detalles sobre esta técnica), se pudo realizar la observación a través de un doble canal de emisión para seguir los cambios en la hidrofobicidad de los agregados mediante imagen ratiométrica en las dos regiones espectrales de 550 y 630 nm (I_{630} representa el número de fotones emitidos en una anchura de banda 630 ± 30 nm e I_{550} representa los emitidos en una anchura de banda de 550 ± 20 nm), y así obtener imágenes de microscopia de los dos canales de observación, así como el análisis de las imágenes en función de los tiempos de vida de emisión (Figura I.7).

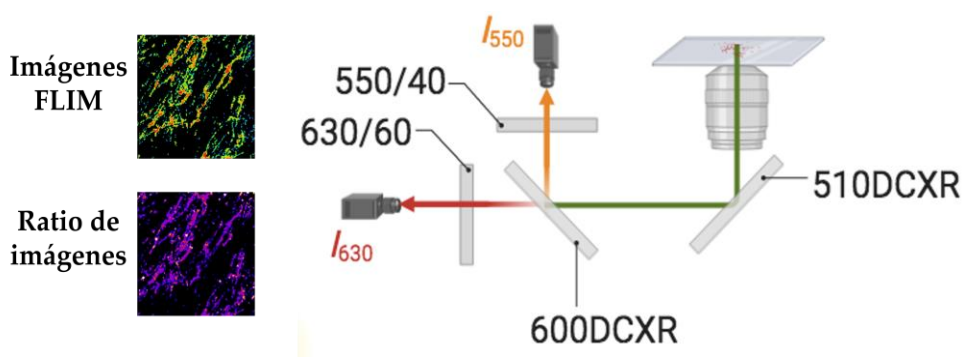


Figura I.7. Esquema de la instrumentación para imágenes FLIM e imágenes ratiométricas de los dos canales diferentes de detección (naranja a 550/40 y rojo a 630/60).

Por lo tanto, se formaron agregados de Fmoc-FF (10 mM) en presencia del colorante AQui (25 μ M) inducido por Ca^{2+} o Cs^+ (Figuras I.8a y I.8b). En ambos casos

se detectaron fibras y se observó una estructura reticulada, aunque más clara en las formadas con Ca^{2+} . Los resultados muestran que mientras que las fibras Fmoc-FF Ca^{2+} se caracterizaron por valores largos de τ y valores de relación I_{630}/I_{550} bajos, las fibras de Fmoc-FF Cs^+ exhibieron valores de τ más bajos y valores de relación I_{630}/I_{550} ligeramente mayores (indicativo de un entorno más hidrófilo o más expuesto al disolvente) (Figuras I.8c y I.8d).

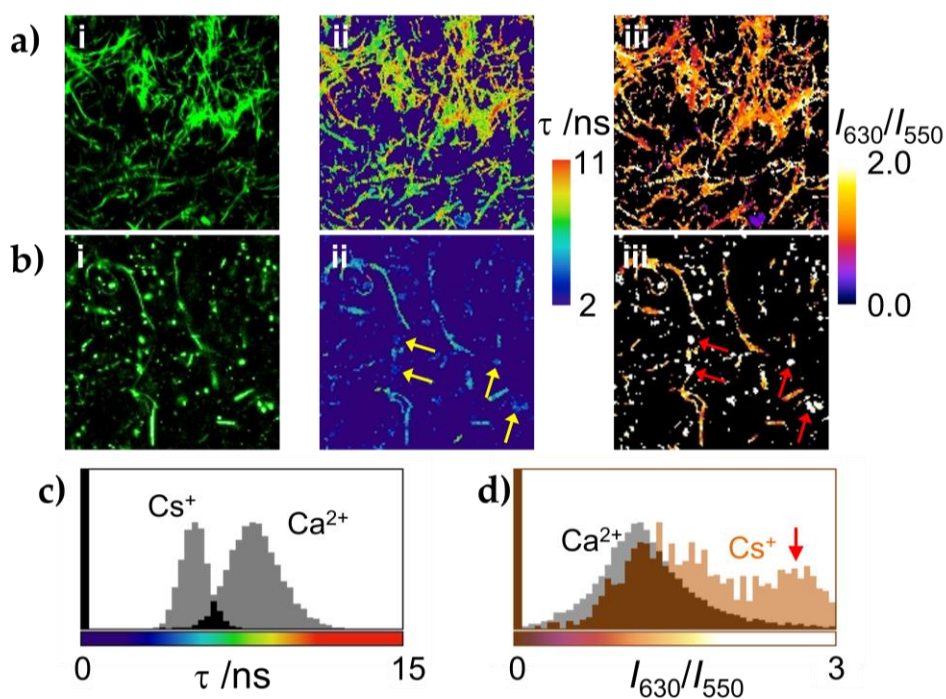


Figura I.8. a y b) Imágenes de intensidad (i), FLIM (ii) y ratiométrica (iii) del colorante AQui en hidrogeles Fmoc-FF formados con Ca^{2+} (a) y Cs^+ (b). Las flechas indican la presencia de agregados peptídicos en los que la emisión del colorante AQui se caracteriza por un valor de τ bajo y una relación I_{630}/I_{550} alta. El tamaño de las imágenes es de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. c y d) Histogramas de población de valores de τ (c) y ratios I_{630}/I_{550} (d) de AQui en hidrogeles Fmoc-FF formados con Ca^{2+} y Cs^+ , obtenidos como la distribución total de, al menos, cinco imágenes diferentes.

Curiosamente, se encontró una segunda población de agregados exclusivamente para Fmoc-FF Cs^+ (resaltada con flechas en la Figura I.8d.), caracterizada por valores de τ muy bajos y valores de relación $I_{630}/I_{550} > 2.5$, indicativos de un ambiente hidrófilo

altamente expuesto a agua, que podría deberse por la presencia de nanoesferas en el medio. Por lo tanto, el fluoróforo AQui está más protegido en las regiones hidrófobas de las fibras Fmoc-FF Ca²⁺, que también se demuestra en las imágenes de relación I₆₃₀/I₅₅₀ que revelaron un entorno totalmente diferente de AQui en las fibras formadas con Ca²⁺ y Cs⁺.

Con el fin de correlacionar los resultados obtenidos con las imágenes FLIM, se estudió Fmoc-FF Ca²⁺ y Fmoc-FF Cs⁺ a las tres concentraciones diferentes del dipéptido y el contraíón comentadas anteriormente, mediante imágenes TEM. En la Figura I.9e se observa que también se encontró la coexistencia de nanoesferas y fibrillas en la muestra de Fmoc-FF Cs⁺, mientras que no se detectaron con iones Ca²⁺ a la misma concentración (Figura I.9h). De hecho, se encontraron nanoesferas de tamaños homogéneos a 2,5 mM Fmoc-FF Cs⁺ (Figura I.9d), mientras que las fibras surgieron por la coalescencia de nanoesferas en concentraciones más altas. Curiosamente, la fibrilación de Fmoc-FF Na⁺ siguió patrones similares que con los iones Cs⁺ (Figura I.9 a, b y c).

Por el contrario, las imágenes TEM de la solución peptídica a 2,5 mM en presencia de Ca²⁺ mostraron agregados de mayor tamaño formados por la coalescencia de las gotitas (Figura I.9g), lo que sugiere la aparición de un proceso de separación de fases líquido-líquido en una etapa muy temprana,¹⁹⁷ pero se convirtieron totalmente en fibrillas estrechas a concentraciones más altas, lo que sugiere que el Ca²⁺ fue capaz de promover el autoensamblaje del péptido de manera más eficiente que el Na⁺ o Cs⁺.

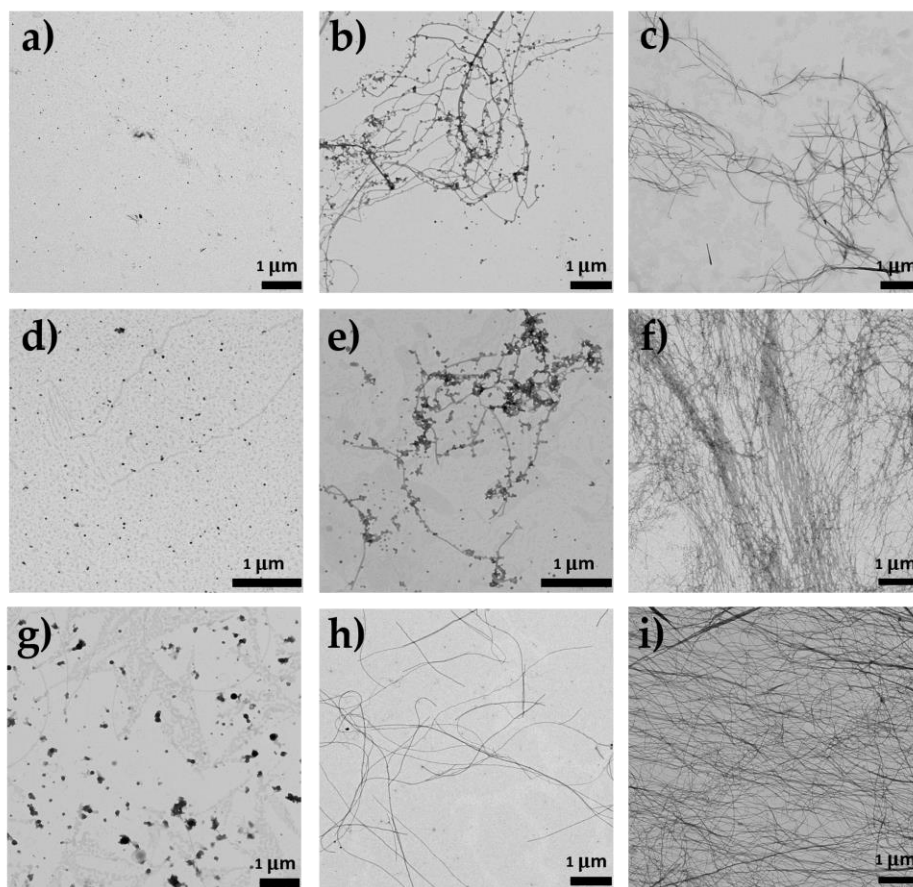


Figura I.9. Imágenes de TEM de sal Fmoc-FF Na⁺ a 2,5 mM (a), 5 mM (b) y 10 mM (c); Imágenes TEM de sal Fmoc-FF Cs⁺ a 2,5 mM (d), 5 mM (e) y 10 mM (f); Imágenes TEM de sal de Fmoc-FF Ca²⁺ a 2,5 mM (g), 5 mM (h) y 10 mM (i) de conc. de péptido.

Estos resultados fueron comparados con péptidos menos hidrófobos como Fmoc-AA (Fmoc-dialanina) y Fmoc-GG (Fmoc-diglicina) mediante imágenes TEM (Figura I.10), y se confirmó que Fmoc-FF es un candidato ideal para estos estudios debido a su capacidad para formar fibras bien definidas.

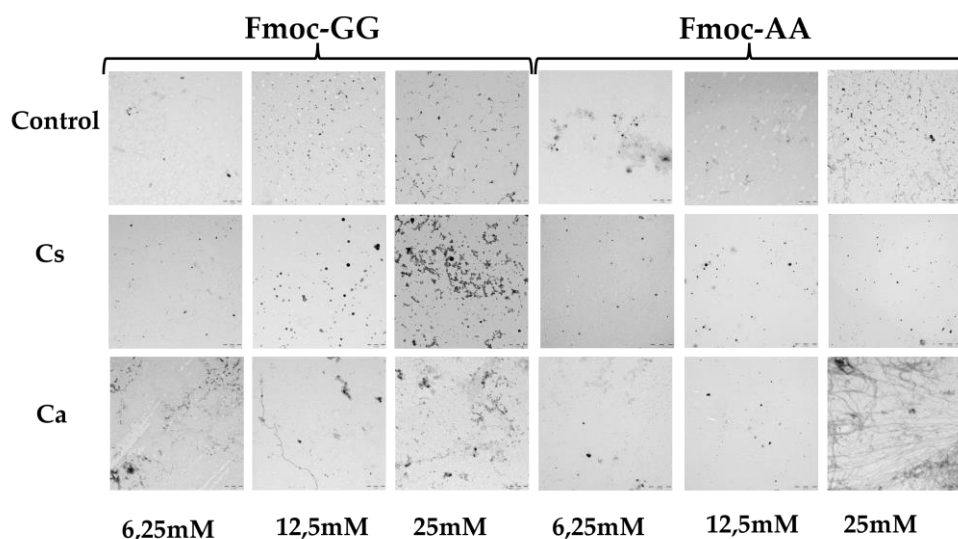


Figura I.10. Imágenes TEM de hidrogeles peptídicos de Fmoc-GG y Fmoc-AA formados en presencia de CaCO_3 y Cs_2CO_3 a diferentes concentraciones de sal: péptido 2,5/6,25 mM, 5/12,5 mM y 10/25 mM. Escala 1 μm .

3.A.2. Mecanismo de autoensamblaje

Las primeras etapas del autoensamblaje se investigaron mediante FLCS, una técnica de molécula única que informa sobre las propiedades de difusión de los sistemas moleculares (para más información sobre el fundamento de la técnica ver *Introducción General*). Se siguió la evolución temporal de las curvas de correlación FLCS durante los primeros 15 minutos de interacción de Fmoc-FF Ca^{2+} y Fmoc-FF Cs^+ a las tres concentraciones diferentes del dipéptido y el contraión. El análisis de las curvas de correlación demostró la presencia de dos estados de difusión diferentes, una forma de difusión rápida, con un tiempo de difusión, $\tau_{\text{D rápido}}$, de $55 \pm 3 \mu\text{s}$, y un estado de difusión lento con valores de $\tau_{\text{D lento}}$ que varían según la concentración y el tiempo de incubación. Los valores de $\tau_{\text{D rápido}}$ corresponden a las propiedades de difusión de pequeñas moléculas orgánicas, como los fluoróforos individuales, por lo que asignamos esta forma al monómero Fmoc-FF. Entonces, las especies de difusión lenta se pueden atribuir a núcleos y agregados en crecimiento específicos $\tau_{\text{D lento}}/\text{ms}$.

Por lo tanto, se comparó el diferente comportamiento de las sales Fmoc-FF Ca²⁺ y Fmoc-FF Cs⁺, en términos de valores de $\tau_{D \text{ lento}}$, que pueden relacionarse con el tamaño promedio de los agregados. Las curvas de FLCS de Fmoc-FF Ca²⁺ mostraron una contribución constante de agregados grandes presentando un valor de $\tau_{D \text{ lento}}$ promedio de (7 ± 3) % ms en las tres concentraciones probadas (Figuras I.11a). Este comportamiento es consistente con un equilibrio continuo entre monómero y agregados en forma micelar, similar a lo que ocurre con otros péptidos pequeños agregantes.^{188,232-234} Curiosamente, esta situación permaneció constante durante largos períodos de tiempo (> 30 min), lo que indica un tamaño de núcleo estable en equilibrio con el monómero que sirve como reservorio para el crecimiento posterior de fibrillas (Figura I.11c). Por el contrario, las curvas de FLCS de Fmoc-FF Cs⁺ representaron un escenario claramente diferente. Los valores de $\tau_{D \text{ lento}}$ exhibieron dependencia del tiempo y la concentración, con valores que aumentaron hasta varias decenas de ms (Figura I.11a), alcanzando valores más altos a Fmoc-FF 10 mM y Cs⁺ 25 mM. Esto indica que las especies grandes, responsables de $\tau_{D \text{ lento}}$, experimentaron un crecimiento dentro del marco de tiempo de 15 minutos.

Curiosamente, a la concentración más baja utilizada (Fmoc-FF 2,5 mM), la contribución relativa de las especies de difusión lenta fue de alrededor del $6 \pm 3\%$ y no varió con el tiempo de incubación; similar a la situación encontrada para el polímero supramolecular que se forma en presencia de Ca²⁺. Estos hallazgos apoyan un mecanismo diferente para el autoensamblaje de Fmoc-FF en presencia de iones Cs⁺: hay un tamaño de núcleo crítico en equilibrio con los monómeros; y a medida que avanza la incorporación de agregados grandes en fibras amorfas aún más grandes (que no se difundirían en un régimen de tiempo accesible por FLCS), un cambio en el equilibrio del agregado del núcleo del monómero hacia la formación de más agregados permite la fibrilización (Figura I.11c).

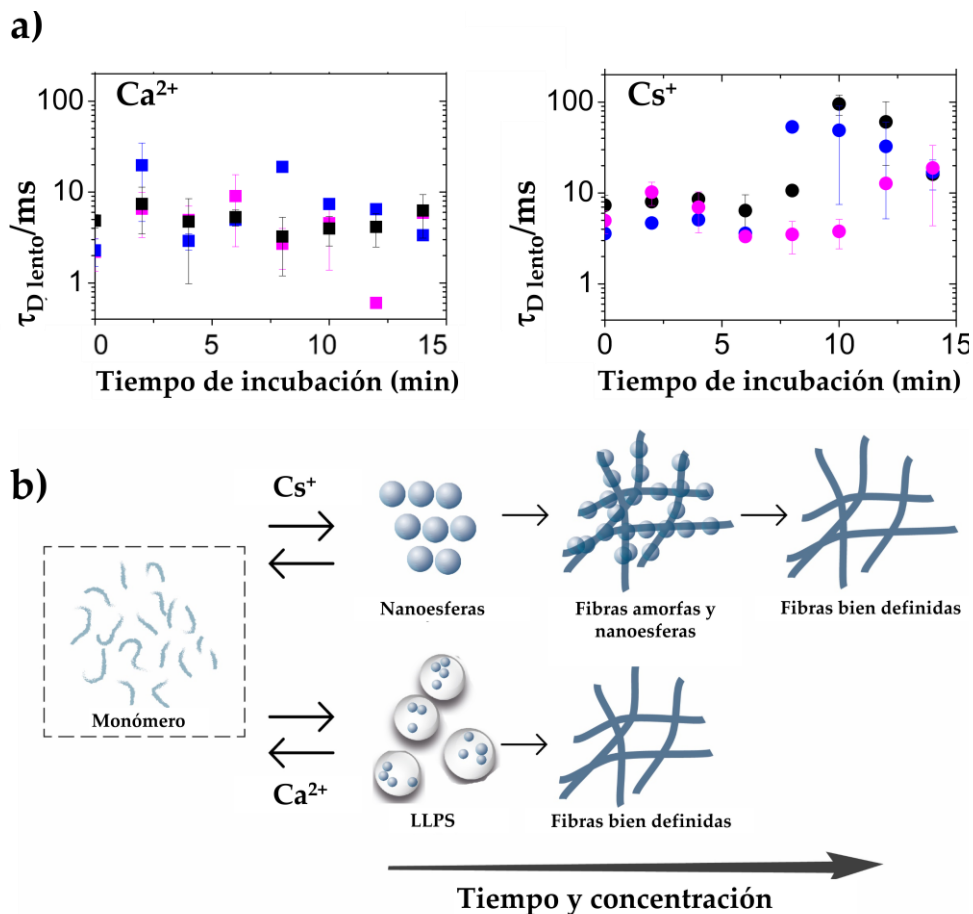


Figura I.11. a) Tiempo de difusión de las especies de difusión lenta ($\tau_{D \text{ lento}}$) de Ca^{2+} (cuadrados) o Cs^{+} (círculos) a una concentración de iones de 6,25 mM (magenta), 12,5 mM (azul) o 25 mM (negro). b) Modelo propuesto de las diferentes vías de formación de núcleos de Fmoc-FF en presencia de contraiones Cs^{+} o Ca^{2+} .

3.A.3. Cinética del autoensamblaje

También se siguió la cinética de autoensamblaje de las soluciones Fmoc-FF Ca^{2+} y Fmoc-FF Cs^{+} (péptido Fmoc-FF 10 mM, Ca^{2+} o Cs^{+} 25 mM y AQui 25 μM) mediante espectroscopía de fluorescencia y FLIM del colorante **AQui** durante la formación de los polímeros supramoleculares. El colorante AQui exhibió una mejora de emisión más pronunciada y desplazamiento hacia el azul (desplazamiento hacia longitudes de onda disminuidas) de mayor intensidad en las fibras Fmoc-FF Ca^{2+} que en Fmoc-

FF Cs⁺ (Figuras I.12a y b), lo que confirma que las fibrillas formadas con contracciones de Ca²⁺ eran más hidrofóbicas que las formadas en presencia de Cs⁺, como ya se ha comentado anteriormente.

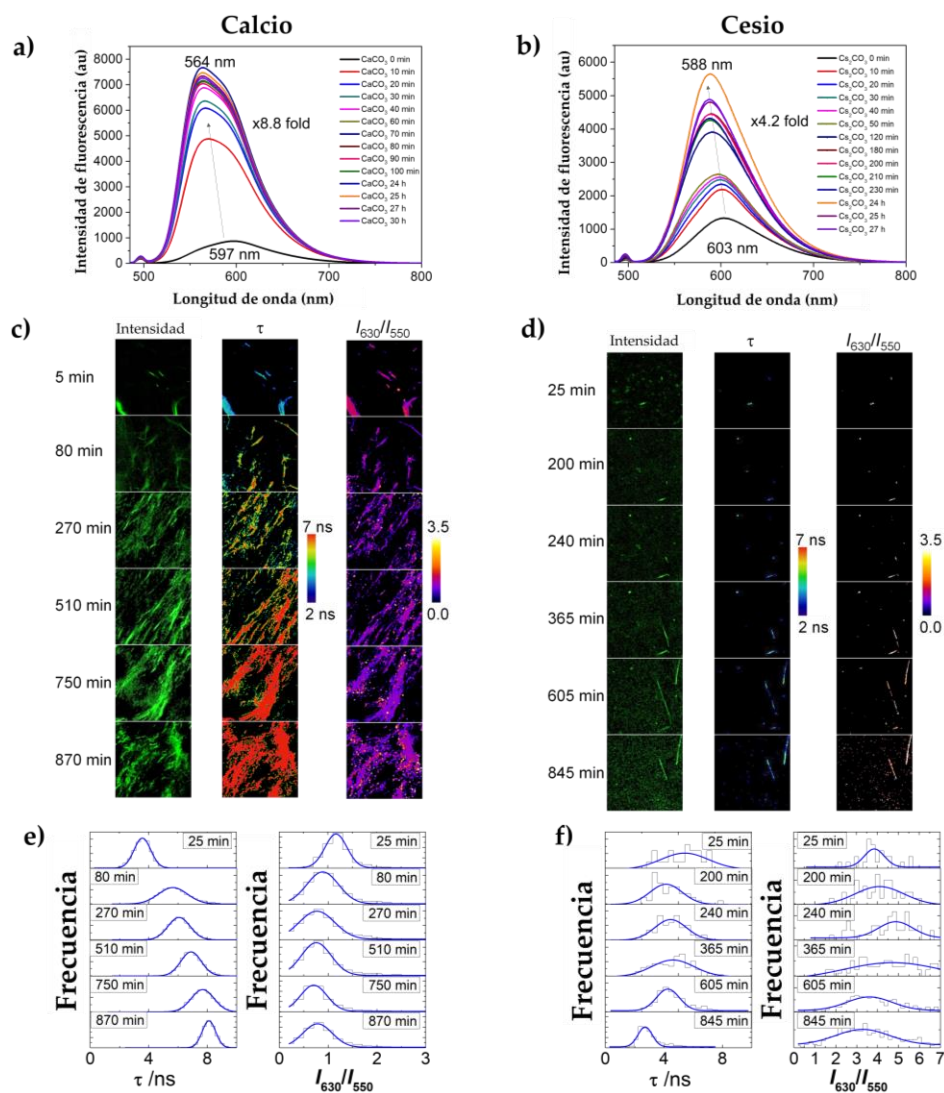


Figura I.12. a y b) Espectros de fluorescencia de la cinética de formación de los hidrogeles de Fmoc-FF 10 mM en presencia de Ca²⁺ (a) o Cs⁺ (b) 25 mM en función del tiempo de incubación ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) de AQui. c y d) Imágenes de intensidad, FLIM (τ) y relación I_{630}/I_{550} en función del tiempo de incubación para Fmoc FF 10 mM en presencia de Ca²⁺ (c) o Cs⁺ (d). e y f) Distribuciones extraídas de la vida útil τ y la relación I_{630}/I_{550} de las imágenes en c y d. El tamaño de la imagen es de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$.

Además, las imágenes FLIM y ratiométricas en tiempo real de la formación de fibras Fmoc-FF Ca²⁺ y Fmoc-FF Cs⁺ (Figura I.12c y I.12d) demostraron que **AQui** estaba en un ambiente hidrofílico en las primeras etapas, caracterizado por una emisión de baja intensidad y valores de vida útil de fluorescencia bajos, pero a medida que se producía la formación de fibras maduras, **AQui** pudo interactuar con más regiones hidrofóbicas y, por lo tanto, resultó en una mejora de la emisión de fluorescencia y valores de τ más largos. Las imágenes de relación I₆₃₀ / I₅₅₀, mostraron un cambio hacia valores de relación más altos a medida que avanzaba el crecimiento fibrilar.

Estos experimentos también evidenciaron diferencias en el tipo de fibrillas formadas en presencia de Ca²⁺ o Cs⁺. Cuantitativamente, los histogramas de población (Figura I.12e y f) mostraron cómo las fibrillas formadas con Ca²⁺ se hacen más hidrófobas con el tiempo (caracterizadas por valores de τ más altos y proporciones de I₆₃₀ / I₅₅₀ más bajas). Por el contrario, las fibrillas formadas en presencia de iones Cs⁺ siempre mostraron valores de τ bajos y relaciones I₆₃₀ / I₅₅₀ altas, lo que respalda que **AQui** interactúa con sitios más hidrófilos. Los resultados demostraron claramente distintas interacciones, estructura y cinética en fibrillas de hidrogel Fmoc-FF formadas con iones Ca²⁺ o Cs⁺.

La cinética del autoensamblaje, también se evaluó mediante estudios FTIR y pudo confirmarse diferencias estructurales significativas entre los geles formados en presencia de Cs⁺ y Ca²⁺ (Figura I.13). Los espectros mostraron dos bandas separadas a 1638 cm⁻¹ y 1690 cm⁻¹, atribuibles a los grupos amida y carbamato respectivamente.^{235,236} En presencia de Cs⁺, la formación de gel resultó en una fuerte caída inicial en la absorbancia para ambas bandas y una recuperación lenta en la banda amida, aunque las posiciones de las bandas no cambiaron significativamente. La formación de gel en presencia de Ca²⁺ mostró claramente un cambio simultáneo y opuesto para ambas bandas a 1692 y 1635 cm⁻¹, respectivamente.

Esto sugiere la formación y el fortalecimiento de enlaces de H intermoleculares entre péptidos (de tipo lamina β) en el gel que no están presentes en el gel Fmoc-FF Cs⁺.

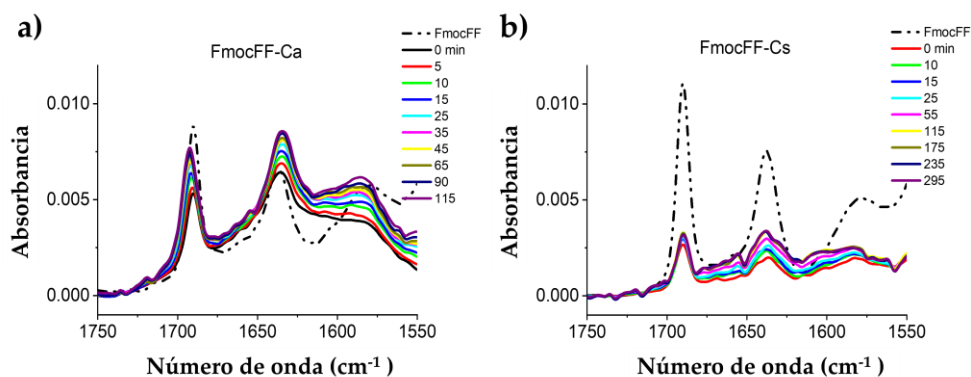


Figura I.13. Espectros FTIR dependientes del tiempo de hidrogeles de sales Cs⁺ (a) y Ca²⁺ (b) de Fmoc-FF (conc. de péptido 10 mM).

El mecanismo de fibrilación diferente también se demostró en las mediciones de DSC. Se calentaron las muestras de Fmoc-FF a diferentes concentraciones en presencia de sales de CaCO₃ y Cs₂CO₃ a 2 °C/min para inducir su agregación (Figura I.14). A una concentración de Fmoc-FF de 2,5 mM, en presencia de Cs⁺ o Ca²⁺, se observó un único pico endotérmico alrededor de 41-44 °C, que podría atribuirse a la desagregación de nanoesferas y gotitas observadas por TEM. En presencia de Na⁺, estos agregados mostraron un pico similar, pero a una temperatura más baja, lo que sugiere que las nanoesferas eran menos estables en esta condición, aunque se estabilizaron a una concentración más alta de Fmoc-FF. A concentraciones de 5 mM y 10 mM, Fmoc-FF Cs⁺ mostró termogramas de DSC más complejos con varios máximos y mínimos a temperaturas más altas, lo que sugiere la formación de agregados diferentes y más estables durante el calentamiento.

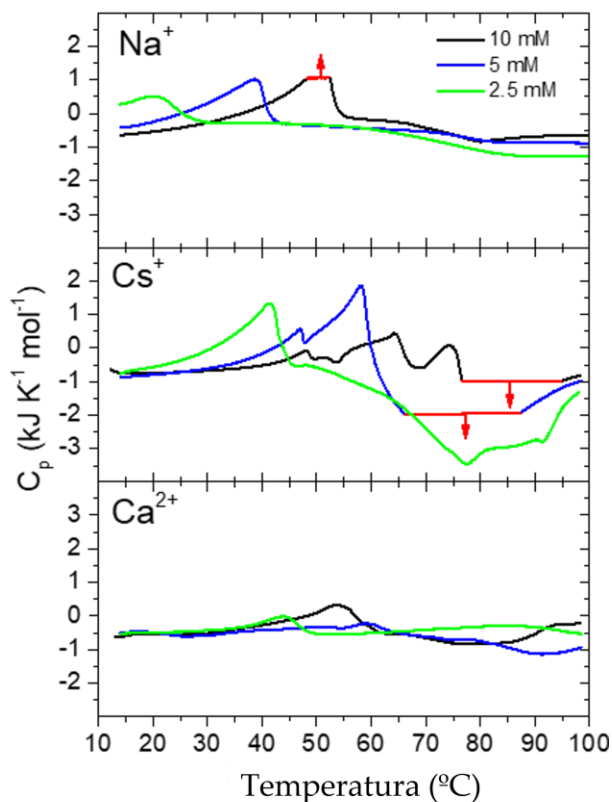


Figura I.14. Exploraciones DSC de Fmoc-FF a diferentes concentraciones en presencia de diferentes cationes. Línea negra indica la muestra de Fmoc-FF 10mM:sal 25mM, la línea roja indica la muestra de Fmoc-FF 5mM:sal 12,5mM y la línea verde indica la muestra de Fmoc-FF 2,5mM:sal 6,25mM. Las regiones del termograma en rojo indican la saturación de la señal del calorímetro.

En el caso de Fmoc-FF Ca²⁺ los perfiles de DSC fueron menos complejos y los efectos endotérmicos y exotérmicos fueron mucho menos intensos, a pesar de la formación de un hidrogel altamente rígido y estable. Esto indica que la formación de gel de Fmoc-FF Ca²⁺ pasa a través de una ruta menos compleja que en el caso de Fmoc-FF Cs⁺. Estos resultados sugieren que en presencia de Cs⁺ se forman varias especies intermedias cada vez más estables, favorecidas por un aumento en la concentración de Fmoc-FF y Cs⁺. Dado que estos intermedios se forman por procesos endotérmicos consecutivos, acumulan entalpía, que es liberada por su posterior conversión exotérmica en hidrogel. Sin embargo, en presencia de Ca²⁺, los estados precursores de gelificación parecen acumular menos entalpía y, en consecuencia, la formación de gel

es claramente menos exotérmica. Todos estos resultados están de acuerdo con el modelo propuesto en la Figura I.11c.

3.A.4. Estudio de las propiedades mecánicas

Dado que los hidrogeles Fmoc-FF formados con iones Ca^{2+} o Cs^+ presentan un mecanismo de autoensamblaje diferente, es importante correlacionarlo con las correspondientes propiedades reológicas.²³⁷⁻²³⁹ En los barridos de amplitud (Figura I.15 a y d), la región viscoelástica lineal (LVR) se observa más claramente para las muestras de Ca^{2+} y para la muestra de Cs^+ más concentrada (10 mM), mientras que se puede deducir de manera aproximada para los de Fmoc-FF Cs^+ a las concentraciones más bajas (2,5 mM y 5 mM), lo que indica interacciones más débiles en estas dos muestras. Recordar, que para que una muestra sea considerada gel, el módulo de almacenamiento (G') debe ser mayor que el módulo de pérdidas (G'') dentro de la LVR. Sin embargo, para las dos concentraciones más bajas en el caso de Fmoc-FF Cs^+ , G' era solo algo mayor que G'' , lo que indica la debilidad extrema de los geles resultantes.

La fortaleza (resistencia) de las muestras se cuantificó mediante los valores promedio del módulo de almacenamiento correspondiente a la LVR. Como se observa en la Figura I.15b y I.15e, las muestras de Ca^{2+} exhibieron valores del módulo de almacenamiento aproximadamente 500 veces mayores que las muestras de Cs^+ , lo que demuestra la resistencia mucho mayor de las primeras. Para ambas sales, la resistencia de las muestras aumentó en gran medida con el contenido de péptidos (la relación péptido: sal fue de 1:2,5 en todas las muestras). Esta mejora con el aumento del contenido de péptidos (y sal) se debe a la formación de fibrillas más largas y mejor definidas, lo que justificaría el aumento del módulo de almacenamiento. En la muestra de Cs^+ a la concentración más alta, tuvo lugar un aumento mucho más fuerte respecto a las otras muestras a 5 y 2,5 mM debido a la percolación y la microestructura en forma de red asociada con el comportamiento similar a un gel.

Finalmente, en los barridos de frecuencia (Figuras I.15c y f), las muestras de Cs⁺ exhibieron una tendencia creciente con la frecuencia, especialmente para las dos concentraciones más bajas, que es más típica de soluciones poliméricas,²⁴⁰ corroborando la naturaleza casi líquida o muy débil de las muestras de FmocFF Cs⁺ a bajas concentraciones. Por el contrario, los barridos de frecuencia de las muestras de Ca²⁺ mostraron valores de G' y G'' aproximadamente independientes de la frecuencia, con $G' > G''$, como se esperaba para los geles. Para Fmoc-FF Cs⁺ (10 mM), se demostró un comportamiento intermedio entre carácter líquido y gel.

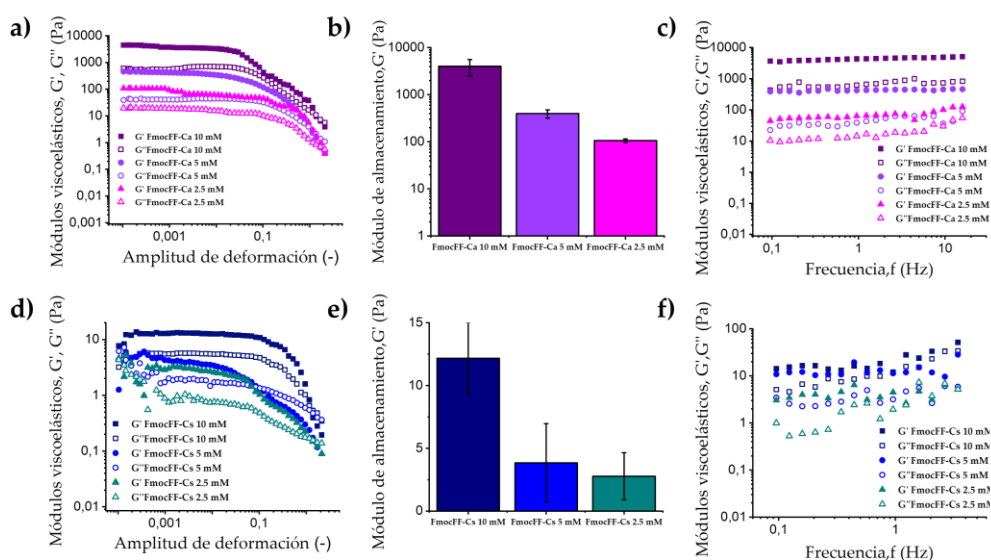


Figura I.15. Caracterización mecánica de las muestras bajo cizalla oscilatoria. (a) y (c) muestran barridos de amplitud para deformaciones oscilatorias de 1 Hz de frecuencia y barridos de frecuencia para deformaciones oscilatorias de amplitud 10^{-3} en muestras de Ca²⁺, y (b) la media y la desviación estándar del módulo de almacenamiento correspondiente a la región viscoelástica lineal. (d, e y f) muestran los mismos resultados para las muestras de Cs⁺.

3.A.5. Estudios de autocuración

La capacidad de los hidrogeles para recuperar la estructura reticulada después de romper su estructura también se probó con microscopía de fluorescencia. Los geles completamente formados de Fmoc-FF (10 mM) en presencia de contraiones Ca²⁺ o Cs⁺, se rompieron en un baño de ultrasonidos durante 10 min en hielo (para evitar un

calentamiento excesivo de las muestras que pudiera dañar irreversiblemente los geles). A continuación, se obtuvieron imágenes de las muestras de hidrogel durante varios minutos mediante microscopía FLIM, agregando el fluoroforo AQui como indicador (Figura I.16c y d). En ambos casos, la estructura reticular de los geles parecía rota y solo eran visibles fibras cortas. Además, en ambos tipos de geles, el alargamiento de las fibras se detectó claramente en un tiempo de 20-30 min. Este período de tiempo es mucho más corto que el proceso general de fibrilación, lo que indica que los fragmentos de fibrillas preformados son capaces de actuar como centros de nucleación secundarios.

Las características de AQui en los hidrogeles recuperados exhibieron las mismas tendencias que en los geles maduros; esto es, un ambiente más hidrofóbico en los hidrogeles Fmoc-FF Ca^{2+} , en comparación con los geles formados con Cs^+ , y la presencia de una gran población de agregados amorfos expuestos al solvente en los geles formados con la sal de cesio, en los cuales el fluoroforo AQui mostró valores bajos de τ y altas relaciones I_{630} / I_{550} (Figura I.16 d). Es importante destacar que estos agregados amorfos parecen tener un papel importante en el proceso de autocuración, ya que tienden a conectar las fibras entre sí.

También se comprobó el proceso de autorrecuperación siguiendo la evolución temporal de los espectros de emisión de AQui de los geles colocados en una cubeta. El colorante AQui exhibió una recuperación del 76% en la intensidad de emisión después de 100 min de autocuración en el gel de Fmoc-FF Ca^{2+} (Figura I.16a), mientras que la recuperación de la emisión fue solo del 25% en el gel de Fmoc-FF Cs^+ (Figura I.16b). El hecho de que los fragmentos fibrilares puedan actuar como semillas secundarias para el crecimiento fibrilar continuo también se evidenció al seguir el proceso durante 16 h de incubación, después de la sonicación. Después de 16 h, los resultados mostraron un aumento de 5,5 veces (en Fmoc-FF Ca^{2+}) (gráfica insertada en Figura I.16.a) y un aumento de 1,8 veces (en Fmoc-FF Cs^+) en la emisión con respecto a los geles preformados (geles que no se sometieron al proceso de rotura). Esto indica que los geles continuaron formándose y creciendo, después de la

sonicación, incluso en mayor medida que el gel preformado, lo cual sugiere una nucleación heterogénea en la que las semillas promueven el crecimiento de fibrillas de manera más eficiente bajo control cinético. En cualquier caso, esta recuperación y posterior crecimiento siempre fue más notoria cuando los iones Ca^{2+} estaban presentes en el medio.

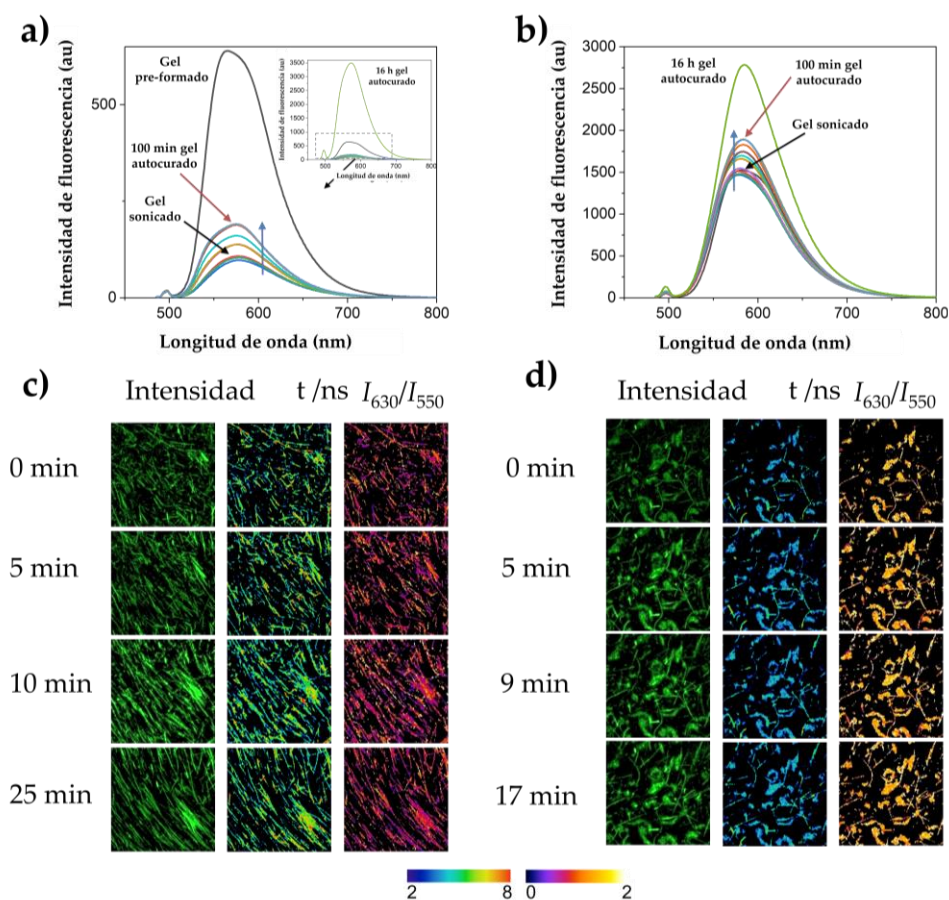


Figura I.16. a y b) Tiempo de recuperación de los espectros de emisión ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) de AQui en geles Fmoc-FF Ca^{2+} (a) y Fmoc-FF Cs^{+} (b), después de la rotura con ultrasonidos. c y d) Imágenes de intensidad, FLIM y ratiométricas del fluoróforo AQui en hidrogeles autocurativos Fmoc-FF formados con Ca^{2+} (a) y Cs^{+} (b) después de la rotura con ultrasonidos, en función del tiempo. El tamaño de las imágenes es de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$.

3.A.6. Estudio de la coordinación péptido-metal

Mediante cálculos de DFT (*Density Functional Theory*) se estudiaron las interacciones de coordinación péptido-metal que pueden estar involucradas en la formación de las fibrillas. Para ello, se investigó el intercambio de Na^+ en Fmoc-FF Na^+ por los otros cationes Cs^+ y Ca^{2+} . Se consideraron dos posibles conformaciones para la estructura principal de Fmoc-FF, una extendida en forma de lámina β y una más doblada (Figura I.17).

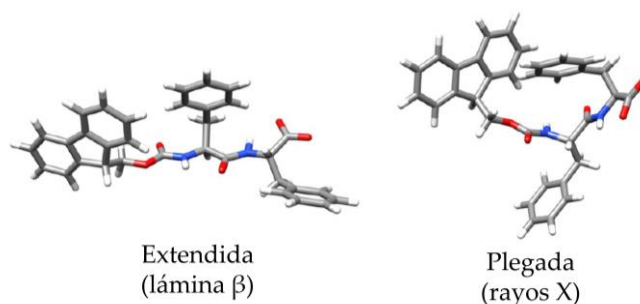


Figura I.17. Estructuras calculadas para Fmoc-FF desprotonado. Código de colores: C, gris; N, azul; O, rojo; H, blanco.

Se estudió la interacción de Fmoc-FF desprotonado con Na^+ , mostrando que la estructura en forma de lámina β era más estable que la forma plegada cuando interactuaba el carboxilato terminal con el catión. Luego se investigó el intercambio de Na^+ por Cs^+ o Ca^{2+} . Los cálculos correspondientes mostraron que se favoreció el reemplazo de Na^+ por un ion Ca^{2+} ($\Delta G = -3.56$ kcal / mol), lo que indica que Ca^{2+} se une con más fuerza al residuo Fmoc-FF a través de sitios listos para la unión de hidrógeno debido a su carácter kosmótopo. Además, la estructura extendida permanece más estable. Por el contrario, la interacción con Cs^+ fue menos favorecida y también apuntaría a una conformación más plegada, menos adecuada para el establecimiento de interacciones supramoleculares (Figura I.18).

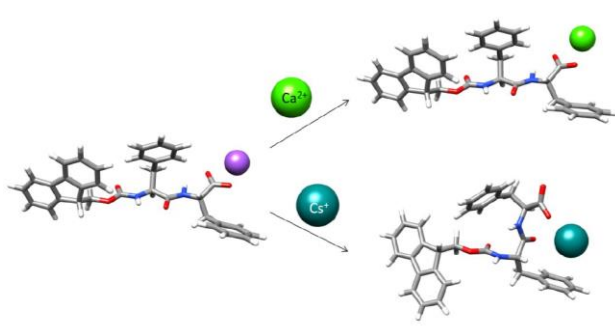


Figura I.18. Proceso de intercambio catiónico de Fmoc-FF Na⁺ estudiado por cálculos DFT. Código de colores: C, gris; N, azul; O, rojo; H, blanco; Na, morado, Ca, verde, Cs, verde-azul.

PARTE B: Estudio del mecanismo de co-ensamblaje de péptidos aromáticos cortos

3.B.1. Estudio y formación de hidrogel con diferentes dipéptidos

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de la capacidad de autoensamblaje de las mezclas de Fmoc-FF con otros Nap-dipéptidos [Nap-AA(L y D), Nap-GG] a la concentración final de 10 mM. El estudio se llevó a cabo con las muestras en solución, es decir, sin añadir un agente que induzca la formación de gel y se utilizaron dos proporciones de Fmoc-FF:Nap-dipéptidos, 1:1 (5 mM:5 mM) y 1:3 (2,5 mM:7,5 mM). Así, para una proporción de 1:1, se ha comprobado que Fmoc-FF a 5mM en solución es capaz de autoensamblarse en fibras por sí solo (recordar Figura II.9.b), por tanto, para poder observar mejor la influencia en el autoensamblaje que poseen ambos péptidos, se escogió la proporción 1:3 (2,5mM:7,5mM), ya que Fmoc-FF a 2,5 mM en solución, no es capaz de autoensamblarse en fibras tan definidas (recordar Figura I.9.b). Es importante señalar que los Nap-dipéptidos a la concentración de 7,5 mM tampoco pudieron formar fibras definidas por sí mismos.

Como se puede observar en la Figura I.19, los agregados predominantes encontrados en la muestra de sal sódica de Nap-AA fueron pequeñas nanoesferas (Figura I.19b y c), en cambio, en el caso de la sal sódica de Nap-GG aparecían

pequeñas fibrillas (Figura I.19 a) esto parece indicar un mayor grado de fibrilización de este péptido en comparación con Nap-AA. Solamente cuando se mezclaron en relación 1:3 con Fmoc-FF, las imágenes TEM de la mezcla de dipéptidos mostraron la presencia de fibras bien definidas, lo que sugiere que ambos péptidos están involucrados en el co-ensamblaje en las diferentes mezclas (Figura I.19 d-f). Además, se puede observar una morfología de las fibrillas muy diferente entre las distintas mezclas, lo que indica la formación preferencial de co-ensamblajes.

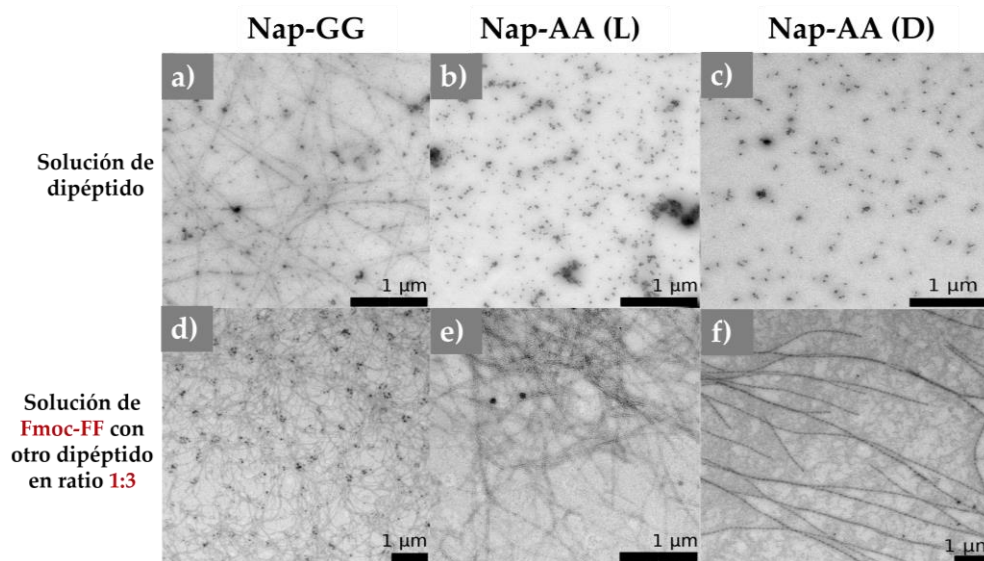


Figura I.19. Imágenes de TEM de muestras (a), (b), (c), de la solución de sal de sodio de cada uno de los dipéptidos individuales a la concentración de 10 mM. Solución de sal de sodio de Fmoc-FF y: Nap-GG (d), Nap-AA(L) (e), Nap-AA (D) (f) en proporción 1:3 sin GdL.

Luego, se llevó a cabo un estudio de la capacidad de las mezclas de péptidos para formar geles a una concentración final de 10 mM y en proporción 1:1 (5 mM:5 mM), 1:3 (2,5 mM:7,5 mM), y 1:4 (2 mM:8 mM) de Fmoc-FF:Nap-dipéptidos. La gelificación se desencadenó provocando un cambio en el pH mediante la adición de GdL (más detalles de formación de los hidrogeles en *Sección Experimental*). En todos los casos se formaron geles de diferente consistencia después de 24 horas. En la Figura I.20a-d se pueden ver imágenes TEM representativas de los geles formados en la

proporción 1:3. A la concentración final de 10 mM, solo Fmoc-FF pudo formar geles por sí mismo. Después de la adición de GdL, las mezclas de péptidos mostraron en todos los casos, fibras y cintas de mayor relación de aspecto que las que se observaron en solución (Tabla I.2). La morfología de los agregados fue similar entre sí y similar a las fibras formadas por Fmoc-FF solo.

Tabla I.2. Ancho de las fibras peptídicas (en nm) formadas a la concentración final de 10 mM tras la adición de GdL medido a partir de imágenes TEM en proporción 1:3 de Fmoc-FF:dipéptidos.

| | Nap-GG (Sol.) | Nap-GG (Gel) | Nap-AA (L) (Sol.) | Nap-AA (L) (Gel) | Nap-AA (D) (Sol.) | Nap-AA(D) (Gel) |
|-----|---------------|--------------|-------------------|------------------|-------------------|-----------------|
| 1:3 | ~14±4 | ~19±6 | ~14±4 | ~27±1,8 | ~18±1,7 | ~22±4 |

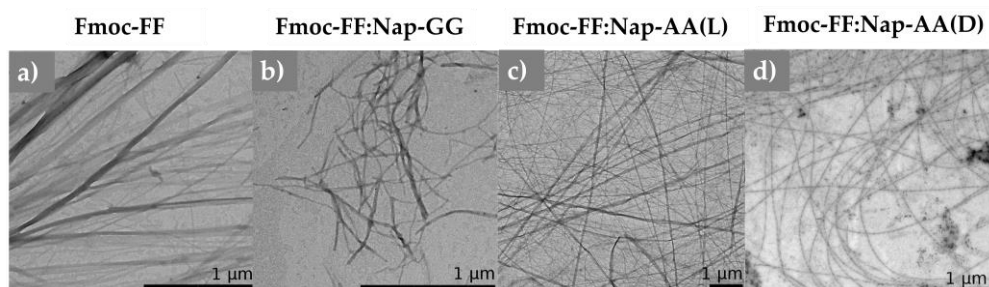


Figura I.20. Imágenes TEM de hidrogeles, formados por la adición de GdL, de Fmoc-FF (a) y: Nap-GG (b), Nap-AA(L) (c), Nap-AA (D) (d) en proporción 1:3.

Al igual que en el estudio del ensamblaje de Fmoc-FF por adición de sales (recordar Parte A), con el fin de obtener más conocimientos sobre el entorno intrafibrilar en condiciones más similares a las nativas, se empleó el fluoróforo AQui para obtener imágenes FLIM. La Figura I.21a muestra la estructura fibrilar de los geles formados con mezclas de Fmoc-FF o Fmoc-FF:Nap-GG en proporción 1:1 y 1:3. Para estos experimentos se empleó Nap-GG por el mayor grado de fibrilación que posee respecto al Nap-AA. Las mezclas de Fmoc-FF:Nap-GG exhibieron fibrillas de morfología similar a las de Fmoc-FF solo. Curiosamente en algunas fibrillas, las

imágenes FLIM mostraron la presencia de patrones repetitivos de valores de vida alta (indicados como flechas en la Figura I.21 a y b). Esto puede deberse a la estructura helicoidal de las fibrillas, así como a la presencia de motivos hidrófobos repetidos, que son más notables en las mezclas Fmoc-FF: Nap-GG. El fluoróforo AQui además, mostró valores de τ ligeramente más altos en las mezclas, con valores de τ promedio de 2.5 ± 0.5 ns y 4.4 ± 0.1 ns para hidrogel de Fmoc-FF y mezcla de Fmoc-FF:Nap-GG 1:1, respectivamente (ver distribuciones en Figura I.21c). Esto sugiere que la co-agregación eficaz de los dos péptidos dio como resultado cambios en el microambiente fibrilar.

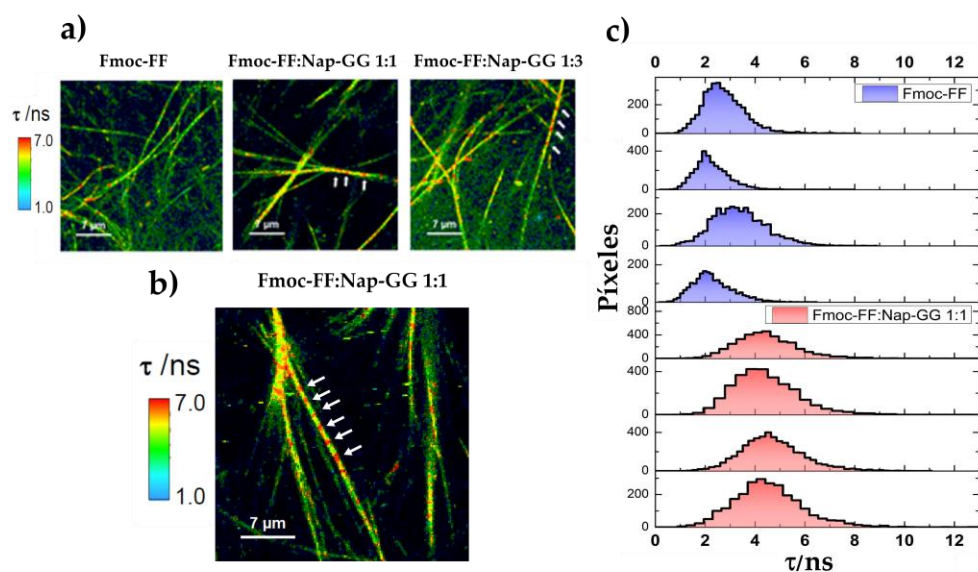


Figura I.21. a) Imágenes FLIM de AQui (12,5 μ M) interactuando con hidrogel de Fmoc-FF (10 mM) o Fmoc-FF:Nap-GG 1:1 (5 mM:5 mM) y 1:3 (2,5mM:7,5mM). Las flechas indican secciones repetitivas de alta vida útil del fluoróforo dentro de las fibrillas de hidrogel (a y b). c) Distribuciones de vida útil de fluorescencia de AQui (12,5 μ M) interactuando con fibras de hidrogel de Fmoc-FF y de Fmoc-FF:Nap-GG en proporción 1:1 de varias imágenes FLIM de los dos tipos de hidrogel.

3.B.2. Estudios espectroscópicos del co-ensamblaje con diferentes dipéptidos

Para ampliar los resultados anteriormente expuestos, el proceso de autoensamblaje de Fmoc-FF y Nap-GG solo y en mezcla en una proporción de 1:3 fue estudiado por FTIR a lo largo del tiempo, antes y después de la adición de GdL. Antes de la adición de GdL, Fmoc-FF (10 mM) mostró la presencia de dos bandas fuertes en la región amida I a 1638 cm^{-1} y 1690 cm^{-1} (Figura I.22a). Muchos autores atribuyen estas dos bandas a la formación de una estructura antiparalela β basada en los espectros típicos de polipéptidos y proteínas, pero un estudio muestra que la banda a 1690 cm^{-1} podría atribuirse al apilamiento del grupo carbamato.²³⁶ Por el contrario, Nap-GG no mostró esos dos picos intensos, sino uno más ancho a 1652 cm^{-1} y otro más agudo, pero menos intenso a $1629,5\text{ cm}^{-1}$. El espectro de la mezcla 1:3 de Fmoc-FF:Nap-GG muestra características de ambos péptidos. De hecho, el espectro calculado teóricamente de la mezcla 1:3 es similar, aunque no idéntico al espectro observado. Esto sugiere que los dos péptidos influyen mutuamente en su estructura en solución.

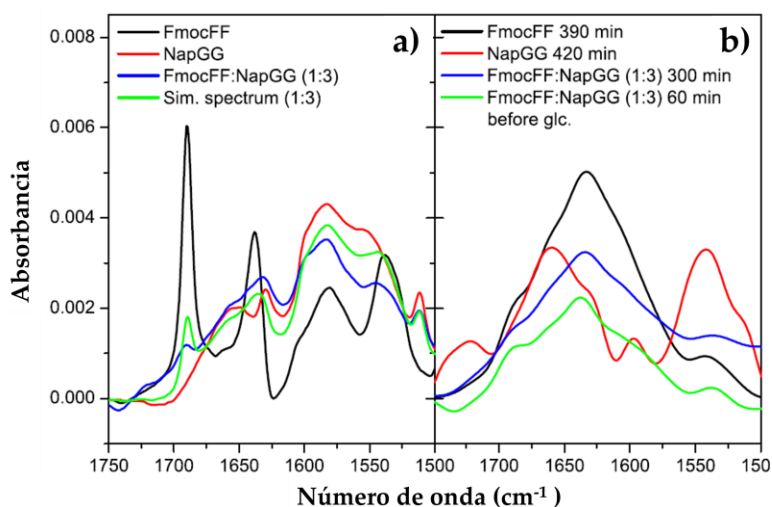


Figura I.22. Espectros FTIR de péptidos. a) Fmoc-FF, Nap-GG (10 mM) y mezcla 1:3 (2,5 mM:7,5 mM) Fmoc-FF:Nap-GG antes de añadir GdL y b) después de añadir GdL. El espectro simulado de la mezcla también se muestra para comparación.

Posteriormente, se siguió la evolución de los espectros (durante unas 5 horas) tras añadir GdL, intentando observar los cambios que se producen a medida que se forman los geles (Figura I.22.b). En el caso de Fmoc-FF solo, los cambios espectrales muestran el desarrollo de una banda ancha centrada en aproximadamente 1633 cm^{-1} , atribuible a la formación de la estructura de la hoja β . Por el contrario, Nap-GG mostró diferentes cambios espectrales, presentando un aumento en la intensidad de la banda a 1662 cm^{-1} . Esto es consistente con la falta de capacidad de este péptido para autoensamblarse en una estructura fibrilar de hoja.

A continuación, se estudió la quiralidad supramolecular de los agregados dipéptidos en proporciones de 1:1 y 1:3 en el estado gel usando espectroscopía de CD (Figura I.23). Como se comentó anteriormente, Nap-AA y Nap-GG por sí solos no formaron geles, mientras que Fmoc-FF sí formó gel. El gel de Fmoc-FF mostró un espectro de CD que coincidía con el ya reportado^{30,68,241} con un pico negativo intenso a 220 nm y un pico negativo menos intenso a 280 nm. Para este péptido se ha propuesto una conformación de lámina β antiparalela.⁶⁸ Como se puede observar en la Figura I.23a y b, los espectros de CD de las mezclas de péptidos parecen todos similares a los espectros del Fmoc-FF solo. En todos los casos, los espectros presentaron dos bandas negativas principales, una en la región ultravioleta lejana alrededor de 220 nm y otra en la región ultravioleta cercana alrededor de 280 nm. Este resultado va en línea con el observado anteriormente, en el que la estructura secundaria de la lámina β formada por Fmoc-FF se conserva en las mezclas. Este resultado es bastante interesante considerando que los dipéptidos de diferente quiralidad o aquiral no modificaron la quiralidad supramolecular del copolímero. También es significativo que los valores de CD encontrados para las mezclas en una proporción de 1:1 fueran más altos que los encontrados en una proporción de 1:3. Este resultado también es coherente ya que la estructura secundaria está definida por Fmoc-FF, por tanto, a mayor proporción de Fmoc-FF, mayores valores de elipticidad. Este efecto es particularmente relevante en las mezclas derivadas de dipéptidos aquirales (Fmoc-FF:Nap-GG).

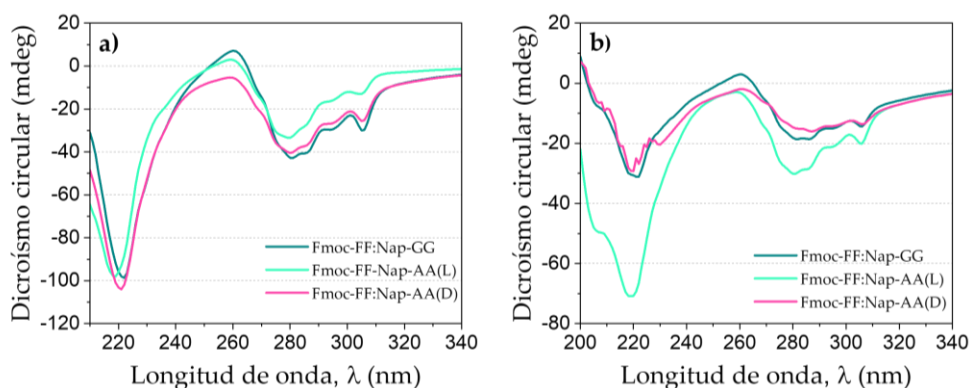


Figura I.23. Resultados de CD en función de la longitud de onda incidente para hidrogeles formados por Fmoc-FF y otros dipéptidos en proporción (a) 1:1 (2,5 mM:2,5 mM) y (b) 1:3 (1,25 mM:3,75 mM). Concentración final de 5mM.

En este caso, la preservación de la quiralidad supone un proceso de amplificación quiral supramolecular por un principio de “sargento y soldados”.^{229,242,243} La retención de la quiralidad en mezclas que contienen dipéptidos de quiralidad opuesta (Nap-D-Ala- D-Ala) mostró el papel predominante de Fmoc-FF (sargento) en bloquear y dirigir la disposición supramolecular de los dipéptidos (soldados).

Por lo tanto, el análisis de todos los datos obtenidos por TEM, FTIR y CD están en concordancia si se considera que las mezclas de péptidos están interactuando de manera cooperativa, dando lugar a copolímeros de características morfológicas similares. Los resultados muestran que las mezclas de péptidos interactúan a pH alto probablemente formando agregados micelares mixtos que evolucionan a estructuras fibrilares mixtas al aumentar la concentración de péptidos y/o la reducción del pH. En este caso, todas las mezclas probadas mostraron la formación de co-ensamblajes. La razón detrás de este resultado podría deberse al fuerte carácter hidrofóbico de Fmoc-FF que forma micelas estables que pueden acomodar otros dipéptidos, como sugirieron Adams y colaboradores para Nap-FF.²²⁹ También demostraron que estos péptidos son capaces de sufrir un proceso de self-sorting basado en las diferencias entre el pKa aparente de los péptidos⁶⁶. En nuestros experimentos se utiliza aprox. 20

veces más GdL que en los experimentos desarrollados por Adams, por lo tanto, en nuestro caso, la rápida caída del pH (en menos de 5 min) no permite un autoensamblaje secuencial de los diferentes dipéptidos en función de su pKa relativo, ver Figura I.24 para las variaciones de pH en el tiempo de los péptidos.

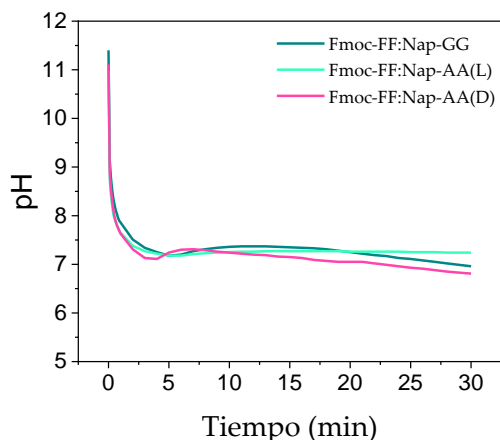


Figura I.24. Cambio de pH frente al tiempo de las soluciones de mezclas de dipéptidos Fmoc-FF: otros dipéptidos en proporción 1:3 (concentración final 10 mM a pH 10,6 utilizando NaOH) tras la adición de 5 μ L de una solución de GdL (200 mg/mL).

3.B.3. Estudios de fluorescencia

A continuación, aprovechando las propiedades fluorescentes de los grupos Fmoc- y Nap-, se realizaron estudios de fluorescencia para obtener información sobre el tipo de copolímeros que forman estos péptidos. En particular, el grupo Fmoc- emite fluorescencia a 325 nm; mientras que los monómeros de Nap emiten alrededor de 350 nm. Además, los grupos Nap- tienen la capacidad de formar excímeros dinámicos y estáticos,^{244,245} que exhiben luminiscencia desplazada al rojo, caracterizada por una banda ancha a > 400 nm. Asimismo, la transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET, *Förster resonance energy transfer*) de los grupos Fmoc- a Nap- sería factible cuando están muy cerca, debido a una superposición espectral favorable de la emisión de Fmoc, actuando como donante, con la absorción de Nap, como aceptor de energía.

Por lo tanto, al investigar las propiedades de emisión y la eficacia del proceso FRET, se puede inferir la capacidad de coagregación de Fmoc-FF con Nap-AA (D), Nap-AA (L) o Nap-GG, demostrado para dipéptidos similares que llevan unidades de Nap y pireno.²⁴⁶ Para confirmar inequívocamente que ocurre FRET de Fmoc a Nap en dipéptidos coagregados, primero, nos enfocamos en los espectros de emisión de los dipéptidos individuales incubados sin GdL (Figura I.25a). Fmoc-FF mostró la emisión típica debida al anillo aromático Fmoc, centrado a 325 nm. También puede estar presente cierta contribución de la emisión de fenilalanina, aunque normalmente giraría en torno a los 280 nm, por lo que su efecto sería insignificante.

Curiosamente, para Nap-AA (D), Nap-AA (L) y Nap-GG, la formación de excímeros estáticos de Nap dentro de los péptidos individuales proporciona una medida del grado de interacción propia en solución. En los tres espectros de emisión (Figura I.25), estaban presentes tanto la emisión de Nap monómeros (~ 340 nm) como de excímeros estáticos (~ 400 nm). Sin embargo, hubo diferencias notables entre los distintos péptidos. Nap-GG mostró una contribución casi insignificante de monómeros y se encontró la mayor formación de excímeros. Esto está de acuerdo con el mayor grado de fibrilización de este péptido en comparación con Nap-AA (Figura I.19). Por ello, se utilizó de nuevo el Nap-GG para hacer un estudio más exhaustivo de las propiedades de coagregación.

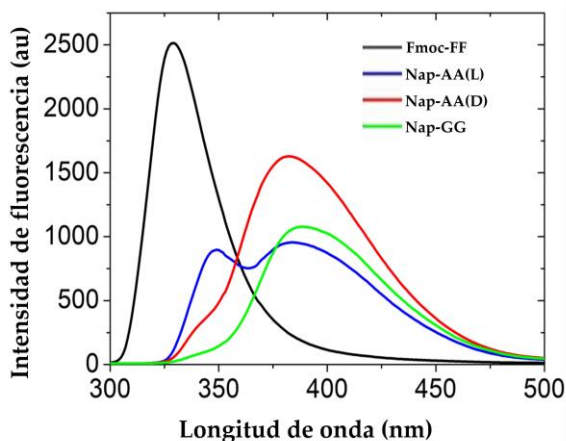


Figura I.25. Espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm) de Fmoc-FF (negro), Nap-AA(L) (azul), Nap-AA(D) (rojo) y Nap-GG (verde).

Se obtuvo información cuantitativa sobre la cinética de coagregación de Fmoc-FF:Nap-GG a relaciones 1:1, 1:3 y 3:1 mediante la evolución temporal de los espectros de emisión (Figura I.26a). En todos estos espectros, la fluorescencia de Fmoc se anula prácticamente por completo, lo que demuestra una rápida interacción entre los dos péptidos, Fmoc-FF y Nap-GG. La señal de FRET indica la formación de co-agregados empaquetados en las primeras etapas de gelificación. Los principales cambios temporales se detectaron en una disminución en la banda centrada alrededor de 400 nm, donde emiten los excímeros Nap, con un aumento concomitante de una banda centrada alrededor de 340 nm, en la región de emisión de monómero Nap.

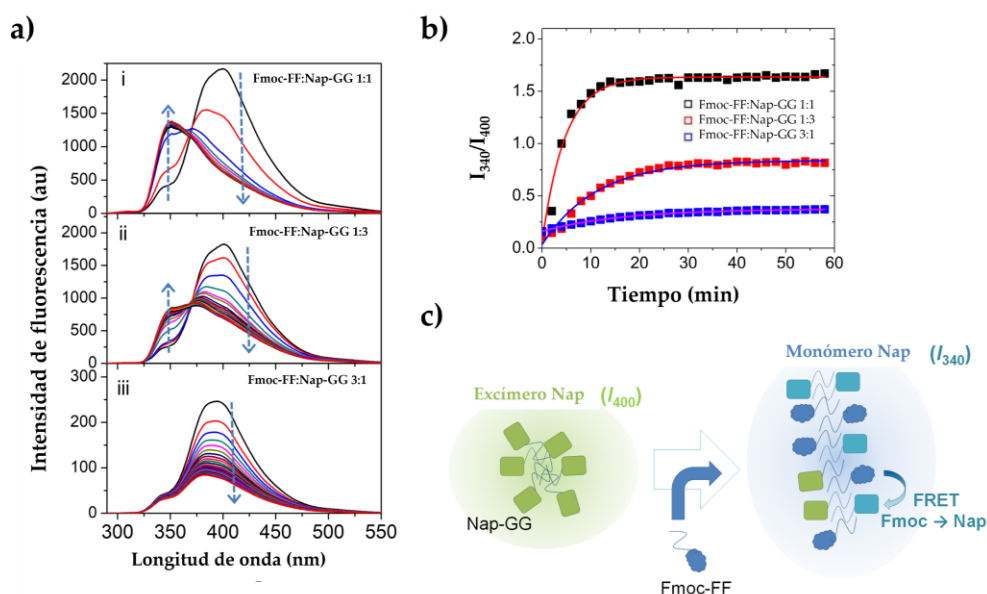


Figura I.26. a) Evolución temporal de los espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 280$ nm) de i) mezclas Fmoc-FF:Nap-GG a 1:1 (5 mM:5 mM), ii) 1:3 (2,5 mM:7,5 mM) y iii) 3:1 (7,5 mM:2,5 mM). Las flechas indican el aumento del tiempo de 0 min a 60 min. b) Cinética de agregación usando la relación de intensidad I_{340}/I_{400} de los espectros de emisión de las mezclas de Fmoc-FF:Nap-GG a 1:1 (5 mM:5 mM, símbolos negros), 1:3 (2,5 mM:7,5 mM, símbolos rosas) y 3:1 (7,5 mM:2,5 mM, símbolos azules). Las curvas representan ajustes no lineales a una ecuación de crecimiento exponencial.

Además, se estudió la cinética de agregación de las mezclas trazando la relación de intensidad a 340 nm y 400 nm (I_{340}/I_{400}), como medida de la relación monómero y excímero de Nap (Figura I.26b). En todos los hidrogeles estudiados, la relación I_{340}/I_{400}

mostró un aumento con el tiempo, por lo tanto, una transformación de Nap-excímeros a monómeros. La cinética de agregación más rápida se encontró para la mezcla Fmoc-FF:Nap-GG 1:1 y la meseta alcanzada en $(I_{340}/I_{400}) = 1,64$ fue la mayor, lo que indica la ruptura más eficaz de los excímeros de Nap en monómeros. Dado que existe una correlación entre la ruptura de los agregados de Nap-GG y la formación macroscópica real del hidrogel, la causa subyacente debe ser la co-agregación efectiva con Fmoc-FF (Figura I.26c).

Estos resultados contrastan con la mezcla Fmoc FF:Nap-GG 1:3 en el que un exceso de Nap-GG mostró excímeros restantes de Nap-GG que no se incorporaron eficientemente en el polímero. En consecuencia, se midió el espectro de emisión de la mezcla de Fmoc-FF:Nap-GG en proporción 3:1 y se representó la cinética de agregación. En este caso, el gran exceso de Fmoc-FF en la mezcla 3:1 dio como resultado una coagregación más lenta y una menor interrupción de los excímeros Nap-GG, lo que indica que la relación molar de los dos péptidos no favorece la disposición alterna. La cinética de coagregación más lenta en esta última proporción sugiere también que la fase metaestable inicial es más estable debido a una mayor proporción de Fmoc-FF más hidrofóbica, como hemos demostrado anteriormente. El hecho de que la mezcla 1:1 exhibiera la coagregación más efectiva y rápida, respalda claramente que Fmoc-FF y Nap-GG pueden agregarse de manera alterna, ya que la proporción de excímeros de Nap-GG es muy baja.

3.B.4. Estudio de los estados intermedios en la formación del gel

Para investigar los intercambios de energía y si los estados intermedios involucrados en la formación de gel, están involucrados en los procesos de co-agregación, se llevaron a cabo experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) con soluciones de péptido recién preparadas sin GdL (es decir en solución) en proporciones 3:1, 1:1 y 1:3 (Figura I.27). Se escanearon mezclas de péptidos recién preparadas en diferentes proporciones molares a 2°C/min. El termograma de Fmoc-

FF individual muestra un fuerte pico endotérmico inicial cerca de ~ 50 °C atribuible a la desagregación de nanoesferas metaestables que luego evolucionan a gel fibrilar en una transición exotérmica a mayor temperatura (~ 75 °C). En el caso de las mezclas Fmoc-FF:Nap-GG, mientras que el péptido Nap-GG individual no muestra ninguna transición, de acuerdo con su carácter de agregación débil, las mezclas muestran picos exotérmicos significativos que indican formación de gel. Sin embargo, los picos endotérmicos agudos solo aparecen débilmente para la mezcla 1:1, que en realidad es la que muestra la coagulación más eficiente. Estos resultados respaldan que el coensamblaje de péptidos en geles mixtos es promovido por la formación de precursores de agregados mixtos y está de acuerdo con los experimentos de fluorescencia anteriores, que revelaron la cinética más rápida y eficiente para la mezcla 1:1 Fmoc FF:Nap-GG.

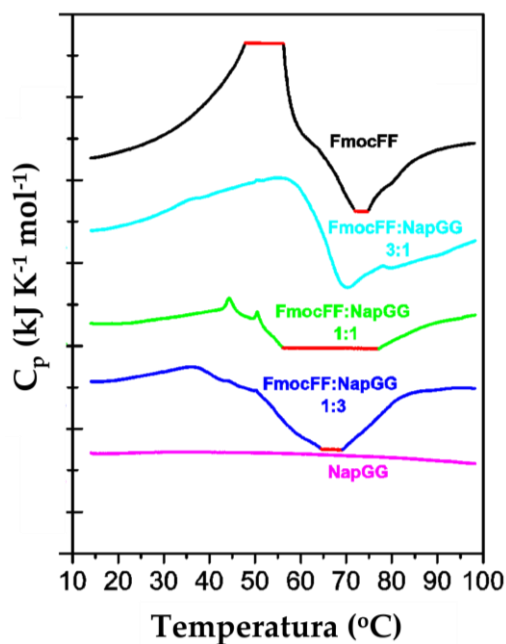


Figura I.27. DSC de soluciones frescas de los péptidos a una concentración final de 10 mM de: Fmoc-FF y de mezclas de FmocFF:Nap-péptido. Los escaneos se realizaron a 2 °C/min. Las regiones planas rojas indican la saturación de la señal del calorímetro debido a picos fuertes. Los termogramas se han desplazado verticalmente en intervalos de 1 $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ en aras de la claridad.

3.B.5. Estudio de las propiedades mecánicas

De los experimentos reológicos se obtuvieron los valores de los módulos de almacenamiento (G') de los hidrogeles a diferentes proporciones Fmoc-FF:Nap-dipéptidos, para una concentración total de péptidos de 10 mM. Primero, debe notarse que solo Fmoc-FF fue capaz de formar gel por sí mismo. Tomando como muestra de referencia el hidrogel formado solo por Fmoc-FF, a una concentración de 10 mM, por sustitución parcial del Fmoc-FF con otros dipéptidos se obtuvo un fortalecimiento en la mayoría de los casos. (Figura I.28). Para una proporción de Fmoc-FF:Nap-dipéptidos de 3:1, todas las composiciones dieron como resultado un aumento en G' , siendo máximo para la muestra Fmoc-FF:Nap-AA(D). Para una muestra de proporción 1:1, Fmoc-FF:Nap-AA(L) dio como resultado el gel más débil, mientras que otras composiciones 1:1 dieron como resultado hidrogeles más fuertes; destacando el aumento de un orden de magnitud para Fmoc FF:Nap-AA(D). Sin embargo, para la composición 1:3 se obtuvo una disminución de G' para todas las mezclas, siendo más pronunciada para Fmoc-FF:Nap-GG.

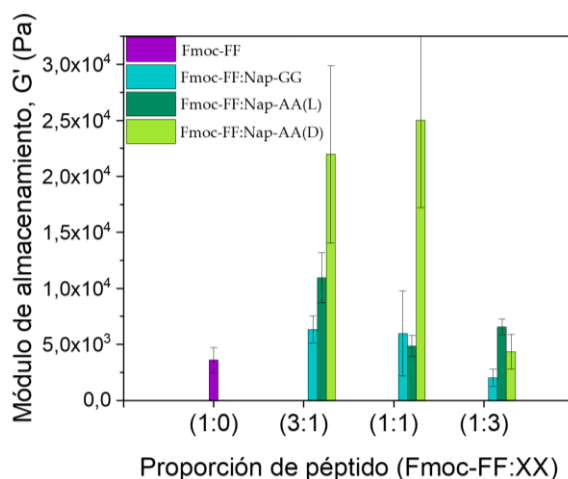


Figura I.28. Módulo de almacenamiento promedio (G') correspondiente a la LVR en función de la proporción de dipéptidos para hidrogeles a una concentración final de 10 mM.

Estos resultados son muy interesantes, ya que demuestran no solo que la mezcla de dipéptidos hizo posible la generación de geles a concentraciones de dipéptidos que

no dieron como resultado geles por separado, si no, lo que es más interesante, que se logró un gran fortalecimiento del gel mediante la sustitución parcial de Fmoc-FF por otros dipéptidos.

3.B.6. Estudios de dinámica molecular (DM)

La organización molecular de Fmoc-FF, Nap-GG y las mezclas de ambos monómeros en una proporción de 1:1 se exploró mediante el seguimiento de la evolución dinámica de los autoensamblajes a través de simulaciones de DM (ver *Sección Experimental* para más detalles). Después de simulaciones DM, el grupo más poblado de Fmoc-FF mostró una distribución similar a una lámina β , caracterizada por interacciones de apilamiento Fmoc-Fmoc y enlaces H.²²⁶ El tamaño del grupo mostró distancias promedio de 66,2 Å ; 46,4 Å y 34,7 Å (Figura I.29a). El grupo Nap-GG, sin embargo mostró una distribución más parecida a una esfera, predominantemente controlada por interacciones de apilamiento dentro de los grupos naftilo; en este caso las distancias fueron: 39,5 Å; 36,2 Å y 37,9 Å (Figura I.29b).

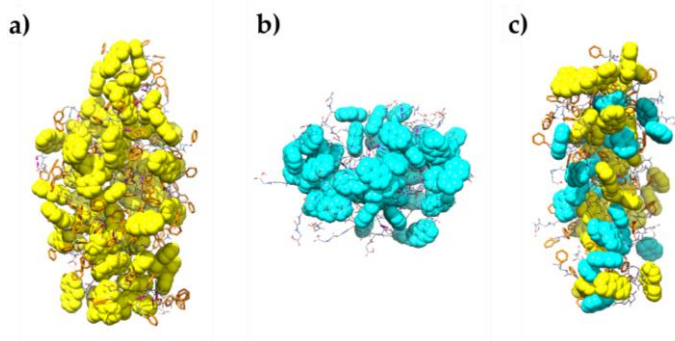


Figura I.29. Grupo de ensamblaje más representativo de Fmoc-FF (a), Nap-GG (b) y relación Fmoc-FF:Nap-GG 1:1 (c) de las simulaciones de DM de 300 ns, vista lateral. Los grupos Fmoc- y Nap- se representan como esferas amarillas y cian, respectivamente. Los péptidos FF y GG se representan como hilos grises y los grupos bencilo en FF como palitos de naranja. Los enlaces H se muestran como líneas púrpuras discontinuas.

Los clusters formados por mezclas de Fmoc-FF y Nap-GG en proporción 1:1 mostraron nuevamente la formación de agregados tipo lámina β pero, en este caso, las distancias entre los monómeros fueron menores, revelando una estrecha red de

apilamiento molecular (distancias promedio de grupos de: 56,19 Å; 20,5 Å; 35,71 Å) (Figura I.29c). El co-ensamblaje mostró la preferencia por una disposición alternativa de ambos monómeros. Esta estrecha disposición entre ambos monómeros podría justificar la preferencia a formarse agregados co-ensamblados, en los que el número promedio de enlaces H intramoleculares (19) no se redujo significativamente en comparación con el grupo de Fmoc-FF (22).

4. CONCLUSIONS

In this chapter:

PART A

- Thanks to the use of advanced fluorescence techniques, we have been able to monitor the growth mechanism of the fibrils and the self-healing of Fmoc-FF in the presence of different salts.
- It has been observed that the nature of the metallic counterion has a strong impact on the self-assembly mechanism and, as a result of this, the physical properties of the resulting gels change completely. Ca^{2+} ions are able to promote a liquid-liquid separation phase that promotes faster and more efficient peptide self-assembly, giving rise to more stable hydrophobic fibrils at lower peptide concentrations. On the other hand, Cs^{+} ions modulate the self-assembly process in a significantly different way since it tends to stabilize the water-solute interface, weakening the hydrophobic interactions and, therefore, favoring the formation of metastable intermediates.
- It has been shown that these peptides have a strong tendency to interact with each other in solution, at high pH, in an intermediate initial phase, responsible for the final composition of the fibrils.

PART B

- It has been shown that the self-assembly of these peptides follows a nucleation-elongation mechanism, in which, from an initial nucleation phase, fibril formation is triggered by a change in initial conditions.
- Fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis between the dipeptides Fmoc-FF and Nap-GG has shown that when the proportion of both monomers is equimolar, the copolymerization process is faster, pointing to the coassembly of both monomers in the alternated form, according to the results obtained following the emission band of Nap excimers. We have shown that the relationship between both monomers determines the self-assembly kinetics and the arrangement of both monomers within the copolymer
- The results showed that the co-polymerization of the hybrid intermediates is thermodynamically favored, so the copolymer is the specie that predominates in the final composition.
- Finally, the rheological analysis showed that the partial substitution of Fmoc-FF by other dipeptides resulted in a strong improvement of the storage modulus of the hydrogels.

5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.1. Reactivos y materiales

Fmoc-FF se adquirió de Bachem Co., Suiza, y se usó sin una purificación adicional. El carbonato de calcio y el carbonato de cesio $\geq 99,9$ % y el resto de sales usadas para los ensayos se adquirieron de Alfa Aesar, Alemania. El hidróxido de sodio (NaOH) y δ -gluconolactona se adquirieron de Sigma Aldrich, EE. UU. El fluoróforo **AQui** (9-(azetidín-1-il)-5-butí-4Hbenzo[de[2,6]naftiridina-4,6(5H)diona²³¹

fue proporcionado por la Dra. Rosario Herranz y el Dr. Francisco Fueyo-Gonzalez del Instituto de Química Médica-CSIC (IQM-CSIC). La síntesis de Nap-dipéptidos fue llevada a cabo por el grupo de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia (UGR) y se realizó siguiendo un protocolo descrito,²⁴⁷ donde también se describe la caracterización de Nap-GG.²⁴⁸

5.2. Preparación de hidrogeles

Para la preparación de hidrogeles con sales (Parte A), el péptido Fmoc-FF se pesó en un vial y se añadió agua desionizada para obtener una concentración final de 20 mM. A continuación, esta suspensión se sonicó (en un baño de ultrasonidos HSt Powersonic 603) durante 1 hora. Después, se añadió gota a gota una solución de NaOH 0,5 M. Tras cada adición, la solución se sonicó hasta obtener una solución clara a un pH de aproximadamente 10,6. El pH se midió usando un medidor de pH HACH sensiont PH 3. El medidor de pH se calibró utilizando soluciones tampón de pH 4, pH 7 y pH 10. Para preparar los hidrogeles con las sales esta solución se diluyó nuevamente con agua desionizada para obtener una concentración final de Fmoc-FF de 10 mM, 5 mM y 2,5 mM. La gelificación fue inducida añadiendo sales a 25 mM, 12,5 mM o 6,25 mM.

Para la preparación del gel mixto (Parte B) Fmoc-FF con otros dipéptidos se mezclaron en proporción de 1:1,1:3 y 3:1, se disolvieron en agua ajustando el pH a 10,35 utilizando también NaOH 0,5 M. Las mezclas de péptidos formaron soluciones transparentes a una concentración final de 10 mM. La gelificación se desencadenó mediante un cambio de pH añadiendo GdL a una concentración final de gel de 1 mg/ml. En todos los casos, se formaron geles de diferente consistencia después de 24 horas.

Para los estudios de FLIM, FLCS y fluorescencia, se preparó el péptido-hidrogel añadiendo el fluoróforo **AQui** a una solución de péptido o mezcla de péptidos transparente para una concentración final de fluoróforo de 25 μ M (en los hidrogeles

preparados con sales, Parte A) y de 12.5 μM (en los hidrogeles preparados con GdL, Parte B).

5.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los hidrogeles utilizados en este trabajo fueron estudiados con un microscopio electrónico LIBRA 120 PLUS Carl Zeiss. Los hidrogeles se agitaron y diluyeron 1/10 con agua (en los hidrogeles preparados con sales, Parte A) y 1/5 (en los hidrogeles preparados con GdL, Parte B). Se colocó una gota de una suspensión acuosa del hidrogel en una rejilla de cobre de malla 300. La muestra de TEM se tiñó con 1% de solución acuosa de acetato de uranilo. La muestra se secó a temperatura ambiente durante 30 min.

5.4. Dicroísmo circular (CD)

Los espectros de CD se registraron utilizando un espectropolarímetro Jasco J-815 con una lámpara de xenón de 150 W. Los hidrogeles se gelificaron en una celda de cuarzo de 0,1 mm (Hellma 0,1 mm de cuarzo Suprasil) utilizando el protocolo descrito anteriormente. Los espectros se obtuvieron de 200 a 350 nm con un paso de 1 nm y un tiempo de integración de 0,5 s por paso a 20 °C y 100 acumulaciones. Los CD se realizaron a una concentración final de dipéptidos de 5 mM para evitar artefactos derivados de las muestras.

5.5. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR se registraron utilizando un espectrómetro Bruker IFS-66 (Bruker, Ettlingen, Alemania) equipado con un detector MCT enfriado con nitrógeno líquido y un accesorio de reflexión total atenuada (BioATR-II) termostatzado a 25 °C. Los hidrogeles o las mezclas se depositaron en la celda ATR y los espectros se escanearon cada 5 min en el rango entre 4000 y 900 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1}

y 128 acumulaciones. Los espectros de fondo previamente medidos se restaron a los espectros de la muestra para eliminar la contribución de las fuertes bandas de agua. Las contribuciones espectrales del vapor de agua residual se redujeron utilizando el filtro de compensación atmosférica incorporado en el software Bruker OPUS.

5.6. Fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia y la cinética de gelificación se obtuvieron en un espectrofluorímetro Jasco FP-8300 (Jasco, Tokio, Japón), a la longitud de onda de excitación λ_{ex} de 470 nm (en los experimentos de la Parte A) y a λ_{ex} de 280 nm (en los experimentos de la Parte B). Para el estudio de la cinética de gelificación, se formaron hidrogeles de sales peptídicas *in situ* en presencia del fluoróforo **AQui** (Parte A) y se estudió la gelificación durante 24 h.

I.5.7. Reología

Las propiedades mecánicas se caracterizaron bajo esfuerzo de cizalla oscilatorio a una temperatura de $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, utilizando un reómetro de esfuerzo controlado Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), provisto de un sensor placa-placa de 35 mm de diámetro. Primero se obtuvieron los valores de los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') en función de la amplitud de la deformación de cizalla oscilatoria, γ_0 , a una frecuencia constante de 1 Hz (barridos de amplitud), tanto para los hidrogeles de la Parte A, como para los hidrogeles de la Parte B. Luego, las muestras se sometieron a pruebas de barrido de frecuencia, bajo amplitud de deformación de cizalla fija ($\gamma_0 = 0,0002$) dentro de la región viscoelástica lineal (LVR), y para frecuencias crecientes en el rango 0,1-15 Hz. De estos ensayos se obtuvieron los valores de los módulos viscoelásticos (tanto G' como G'') correspondientes a la LVR en función de la frecuencia. Se realizaron al menos tres repeticiones para diferentes alícuotas.

I.5.8. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los experimentos de DSC se realizaron en un microcalorímetro DASM-451 equipado con células capilares de platino. La celda de referencia se llenó con el volumen de una solución salina en agua y la celda de muestra se llenó con una mezcla de hidrogel-precursor preparada inmediatamente antes de su introducción en el instrumento. Las muestras se escanearon hasta 100 °C, se enfriaron y se volvieron a escanear para verificar la reversibilidad de los termogramas. La velocidad de exploración se varió entre 0,5 y 2 °C min⁻¹ para investigar específicamente la dependencia con el tiempo de los efectos térmicos observados. Las líneas base instrumentales se registraron con ambas celdas llenas de solución salina en agua y se restaron de los termogramas experimentales. Los termogramas corregidos se normalizaron a la capacidad calorífica relativa del agua utilizando las concentraciones molares de Fmoc-FF. Los experimentos DSC se han llevado a cabo en colaboración con el Dr. Francisco Conejero Lara del Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias (UGR).

I.5.9. Microscopía FLIM y espectroscopía FLCS

Estos experimentos se llevaron a cabo en un instrumento MicroTime 200 (PicoQuant GmbH, Berlín, Alemania), descrito previamente en detalle.²³¹ La fuente de excitación fue un láser de diodo pulsado de 470 nm (LDH-PC-470, PicoQuant), operado a una tasa de repetición de 20 MHz. El haz de excitación se enfocó en la muestra a través de un objetivo de inmersión en aceite ×100, 1.4NA. La emisión de fluorescencia se recogió, se filtró a través del espejo dicróico principal y se enfocó en la apertura confocal de 75 μm. La luz emitida se dividió en un canal naranja y un canal rojo usando un espejo dicróico 600DCXR y filtros de paso de banda apropiados para definir I₅₅₀ (filtro de paso de banda Thorlabs 550/40) e I₆₃₀ (filtro de paso de banda Chroma 630/60). Se utilizaron dos detectores de fotón único de avalancha (Perkin Elmer) para detectar fotones individuales y un módulo de recuento de fotones

TimeHarp 200 (PicoQuant) para el etiquetado de tiempo de fotones individuales. Las imágenes FLIM se obtuvieron con una resolución espacial de al menos 19,5 nm/píxel y una resolución temporal de 29 ps/canal en la escala de microtiempo. Las imágenes se analizaron usando SymPhoTime 64 (PicoQuant) y scripts codificados en FIJI (distribución de Image J).²⁴⁹ Las imágenes FLIM se obtuvieron ajustando todos los píxeles de la imagen a una función de decaimiento monoexponencial, usando una función de respuesta de instrumento reconstruida, después de aplicar un Binning espacial de 5 píxeles y binning temporal de 8 canales. La segmentación se realizó restando el fondo definido por un filtro mediano²⁵⁰ de 50 píxeles y aplicando la herramienta robusta de selección automática de umbral en FIJI. Para los experimentos FLCS, el láser de excitación se enfocó 10 μm dentro de la solución acuosa del dipéptido Fmoc-FF (a 2,5, 5 o 10 mM) y el contraión estudiado, Ca^{2+} o Cs^+ (a concentraciones de 6,25, 12,5 o 25 mM). Los rastros de fluctuación de fluorescencia se recolectaron durante 16 min, en pasos de 2 min. Se realizaron al menos tres repeticiones con diferentes preparaciones de cada muestra. Las curvas FLCS se obtuvieron aplicando un filtro ponderado en el tiempo para tener en cuenta los fotones de fluorescencia durante la autocorrelación de la señal de fluctuación. Estas medidas se han llevado a cabo en colaboración con el grupo de físico-química dirigido por el Prof. Ángel Orte de la Facultad de Farmacia (UGR).

I.5.10. Cálculos DFT

Los cálculos teóricos se realizaron mediante métodos DFT utilizando el software Gaussian 09 en el nivel de teoría $\omega\text{B97XD/def2SVP}$.²⁵¹ Se utilizó el conjunto base y el pseudopotencial LanL2DZ para Na^+ , Cs^+ y Ca^{2+} .²⁵² Los cálculos se realizaron con una integración ultrafina y en agua como solvente aplicando el modelo de continuo polarizable con el formalismo de ecuación integral disponible en Gaussian 09.²⁵³ Los datos de termoquímica se obtuvieron a través de cálculos de frecuencia, lo que también confirmó que las estructuras optimizadas correspondían a un mínimo de energía. El error de superposición del conjunto básico se corrigió para los complejos

Fmoc-FF con Na^+ , Cs^+ y Ca^{2+} utilizando el método del contrapeso.²⁵⁴ Los cálculos DFT han sido llevados a cabo por el Dr. Víctor Blanco del departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias (UGR).

II.5.11. Protocolo de dinámica molecular (DM)

Los conjuntos Fmoc-FF, Nap-GG y Fmoc-FF + Nap-GG en una proporción de 1:1 se construyeron inicialmente usando Maestro.²⁵⁵ Se ensambló una configuración inicial de 60 moléculas confrontando los grupos Fmoc y Nap en un lado y la cadena del dipéptido en el otro en forma de lamina β . A continuación, los conjuntos se convirtieron en archivos pdb independientes y se usaron para la simulación de dinámica molecular atomística (DM) con VDM²⁵⁶ y NADM 2.14.²⁵⁷ Los dipéptidos Fmoc y Nap se parametrizaron con el servidor LigParGen²⁵⁸⁻²⁶⁰ y la simulación MD se ejecutó con el campo de fuerza OPLS-AA/M.²⁶¹ Los conjuntos iniciales se sometieron primero a una minimización de energía de 30 picosegundos (ps) a 300 K en condiciones de contorno periódicas para eliminar los contactos de alta energía, seguido de NVT de 300 ps sucesivos y un equilibrio de NPT de 1 nanosegundo (ns) antes de los 300 ns productivos (simulación MD productiva). Durante la DM productiva, los enlaces de agua se restringieron utilizando el algoritmo SHAKE,²⁶² la electrostática de largo alcance se trató con el método²⁶³ de Ewald de malla de partículas con un espaciado de rejilla de 1; temperatura y presión constantes se mantuvieron acoplando el sistema a un baño externo a 300 K y 1 bar, utilizando velocidad reescalado²⁶⁴ y Parrinello-Rahman,²⁶⁵ respectivamente. Se utilizó un propagador RESPA con un paso de tiempo de integración de 1 fs. Se aplicó el modelo²⁶⁶ TIP3P para agua,²⁶⁷ y se utilizó UCSF Chimera 1.14 para realizar los análisis de trayectoria y generar las imágenes finales.²⁶⁸ Los datos de las trayectorias se sometieron a un grupo RMSD análisis utilizando la herramienta de película DM en Chimera configurando el cuadro 1 como el inicial, y un tamaño de paso de 101. Las estructuras representativas del grupo obtenidas se guardaron como un archivo pdb y se analizaron. Los cálculos del área de superficie accesible al solvente (SASA), enlaces

H y rmsd se realizaron utilizando VMD con secuencias de comandos TLC internas. La dinámica molecular ha sido llevada a cabo por el Dr. Francisco Franco-Montalban del departamento de Química Farmacéutica y Orgánica de la Facultad de Farmacia (UGR).

CAPÍTULO II

Hidrogeles híbridos magnéticos
basados en péptidos aromáticos
cortos para medicina regenerativa

RESUMEN

La inclusión de nanopartículas magnéticas (NPM) en una matriz de hidrogel para producir hidrogeles magnéticos ha permitido el desarrollo de nuevos materiales en investigación biomédica. Los NPM integradas ofrecen la posibilidad de modular las propiedades físicas del hidrogel de forma remota y bajo demanda mediante la aplicación de un campo magnético externo. Además, permiten cambios permanentes en las propiedades mecánicas del hidrogel, así como alteraciones en la micro y macroporosidad de su estructura tridimensional (3D).

Nuestro trabajo se centra en utilizar nanopartículas magnéticas para desarrollar un material a base de péptidos de Fmoc-FF/Fmoc-RGD que presente ventajas en aplicaciones biomédicas como es la capacidad de ser inyectado sin alteración de fase. Estos hidrogeles magnéticos inyectables se han evaluado en estudios *in vivo* en ratones mostrando buena biocompatibilidad y ausencia de toxicidad, lo que junto con su estabilidad mecánica mejorada y excelente inyectabilidad los convierten en biomateriales ideales para aplicaciones biomédicas *in vivo* con cirugía mínimamente invasiva. Este trabajo pone de manifiesto el potencial de hidrogeles supramoleculares basados en péptidos cortos para aplicaciones *in vivo* con una estrategia de administración mínimamente invasiva.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Hidrogeles inyectables: requisitos para la ingeniería de tejidos.

El paradigma clásico de la ingeniería de tejidos se basa en un andamio que se puede utilizar como material de relleno de espacios y para la administración de células y agentes terapéuticos. Los materiales inyectables son prometedores para las aplicaciones de ingeniería de tejidos, ya que eliminan la necesidad de intervenciones quirúrgicas y el procedimiento mínimamente invasivo de inyección reduce la incomodidad y las complicaciones para el paciente. Además, los materiales inyectables brindan la capacidad de adoptar la forma de la cavidad en la que se colocan y, por lo tanto, pueden rellenar defectos irregulares²⁶⁹(Figura II.1).

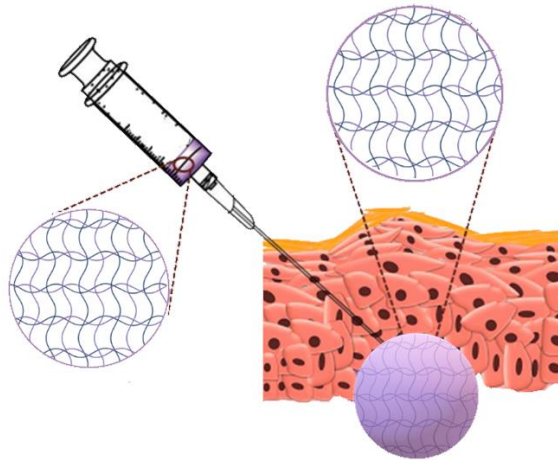


Figura II.1. Dibujo esquemático que muestra un hidrogel inyectable para su administración dentro del tejido biológico. Imagen adaptada de la ref²⁷⁰ con permiso de Elsevier.

Los requisitos clave para que un hidrogel inyectable sea adecuado en aplicaciones biomédicas incluyen:²⁷¹(i) el hidrogel debe fluir bajo una presión moderada y fijarse rápidamente en el sitio de destino; (ii) las propiedades mecánicas del hidrogel deben recuperarse rápidamente después de la inyección; (iii) el hidrogel

debe mantener suficiente integridad y resistencia durante el tiempo que sea necesario; (iv) el hidrogel y los precursores deben ser biocompatibles con una citotoxicidad mínima; (v) el hidrogel debe tener una biodegradabilidad controlada; y finalmente, (vi) la estructura del hidrogel debe ser fácilmente ajustable. En este sentido, los hidrogeles fluidificantes (*shear-thinning*) ofrecen numerosas ventajas sobre otros sistemas inyectables.

1.1.1. Hidrogeles fluidificantes supramoleculares peptídicos

Los hidrogeles fluidificantes (*shear-thinning*, capacidad de un material viscoelástico de fluir mediante la aplicación de un esfuerzo mecánico) comprenden un grupo relativamente grande de sistemas (como sistemas coloidales, hidrogeles basados en ciclodextrinas, hidrogeles basados en MEC descelularizada, hidrogeles basados en péptidos, etc).²⁷¹ Los hidrogeles fluidificantes basados en péptidos constituyen el grupo más importante dentro de esta categoría.

Como se ha comentado en la *Introducción General* estos geles son biocompatibles y se basan en reticulaciones físicas reversibles que involucran interacciones no covalentes. Estas interacciones son generalmente débiles individualmente pero colectivamente pueden conducir a la formación de estructuras de redes estables. Debido a la naturaleza dinámica de estas asociaciones físicas débiles, estos geles pueden fluir bajo la aplicación de un esfuerzo mecánico (*shear-thinning*), y posteriormente volver a recuperar su estado inicial una vez que cesa el esfuerzo (autocuración, autorreparación, *self-healing*). Además, la facilidad de poder modificar las secuencias de los péptidos a nivel molecular es una ventaja significativa, que permite ajustar con precisión las propiedades físicas del hidrogel, como la densidad de reticulación, el tamaño de la malla, la hidrofobicidad/hidrofiliidad, la carga neta (electrostática) y la tasa de degradación.¹¹⁵

La cinética de deformación/autorreparación son parámetros importantes que determinan la idoneidad del sistema para aplicaciones biomédicas (Figura II.2). Por ejemplo, durante la liberación de medicamentos, la recuperación lenta del material,

puede provocar la sedimentación o la fuga del fármaco encapsulado dentro de la matriz del hidrogel. Cuando en vez de fármacos, se introducen células dentro del hidrogel, además de la tasa de recuperación, es muy importante la cantidad de cizalla aplicada para la supervivencia celular. La velocidad de deformación se concentra en mayor medida cerca de la pared de la aguja donde es mucho más alta que en el centro, por tanto, es posible que el material cerca de la pared sufra deformación por el esfuerzo aplicado mientras que el material en el centro retenga una estructura de red intacta.²⁷¹



Figura II.2. Ilustración esquemática del ensamblaje (autorreparación, naranja) y rotura de la estructura del hidrogel. Imagen sacada de la ref⁸⁰ con permiso de Natureprotocols.

Este tipo de hidrogeles han sido estudiados en detalle por Pochan y Schneider,²⁷²⁻²⁷⁴ entre otros.^{275,276} Los péptidos diseñados por Pochan y Schneider incluyen hidrogeles constituidos por péptidos que se autoensamblan en forma de horquilla β , a los que llamaron péptidos 'MAX'. Este grupo de péptidos contienen dos bloques de aminoácidos hidrófobos (Val) y básicos (Lys) alternos, unidos entre sí por un espaciador que pliega la secuencia Val^D-Pro-Pro-Tyr. El péptido MAX1 (Figura II.3) ampliamente estudiado contiene una secuencia (Val-Lys)₄-Val^D-Pro-Pro-Tyr-(Val-Lys)₄. La capacidad de autoensamblarse en condiciones fisiológicas hace que estos hidrogeles basados en péptidos sean atractivos para la encapsulación y administración de células, entre otras aplicaciones.

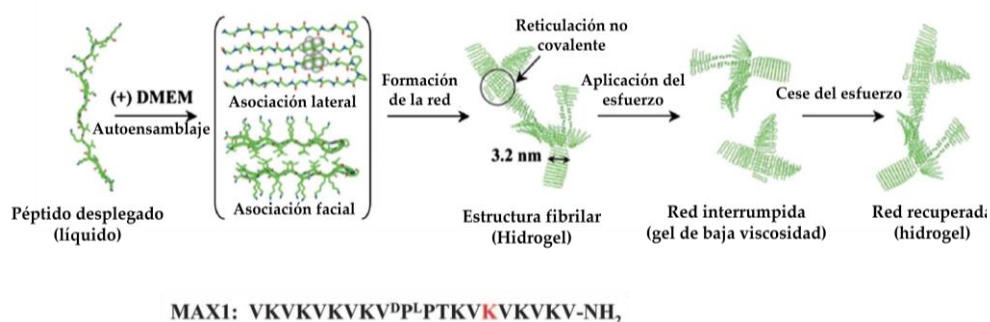


Figura II.3. Mecanismo de autoensamblaje, comportamiento fluidificante y autocuración del hidrogel fibrilar constituido por el péptido MAX1. La adición de DMEM (medio de cultivo celular, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) a una solución tamponada de péptido desplegado, induce la formación de una estructura de horquilla que se autoensambla de forma lateral y facial y proporciona un hidrogel rígido con una estructura supramolecular fibrilar. La aplicación posterior de un esfuerzo de deformación interrumpe la red estabilizada de forma no covalente, lo que lleva a la conversión del hidrogel en un gel de baja viscosidad. Al cesar el esfuerzo, la estructura de la red se recupera convirtiendo el líquido nuevamente en un hidrogel rígido. Se puede observar la secuencia peptídica de MAX1. Imagen adaptada de la ref²⁷¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

1.1.2. Hidrogeles fluidificantes supramoleculares peptídicos incorporando nanopartículas magnéticas

Los hidrogeles fluidificantes generalmente son menos robustos en condiciones fisiológicas que los sistemas entrecruzados químicamente lo cual puede ser un inconveniente para aplicaciones *in vivo*. Una estrategia para mejorar las propiedades mecánicas de algunos geles consiste en desarrollar hidrogeles compuestos o híbridos elaborados con diferentes materiales orgánicos u orgánicos + inorgánicos.¹⁵⁶ Esta estrategia se ha utilizado ampliamente en geles peptídicos con el objetivo de mejorar sus propiedades mecánicas.

El gel de Fmoc-FF sufre una separación de fases durante la inyección, por lo que para intentar mejorar sus propiedades, Adler Abramovic y colaboradores, combinaron Fmoc-FF y ácido hialurónico que, en proporciones específicas, dio lugar a geles que pueden inyectarse debido a su comportamiento fluidificante, y los convierten en excelentes vehículos para la administración de fármacos.²⁷⁷ De manera

análoga, Li y colaboradores, desarrollaron un hidrogel inyectable para ingeniería de tejidos basado en la combinación de Nap-FF y fibroína de seda.¹⁰⁴

Otra estrategia para modificar las propiedades de los hidrogeles es la incorporación de NPM en el interior de la matriz del hidrogel para dar lugar a hidrogeles magnéticos o ferrohgeles (recordar apartado 6.1 *Introducción General*) que permiten modificar las propiedades mecánicas mediante el uso de un campo magnético externo. Los campos magnéticos tienen la ventaja de poder aplicarse de forma remota (sin contacto con la muestra), no son destructivos y se pueden utilizar de forma segura en presencia de polímeros e incluso células vivas.²⁷⁸ Estos, además, permiten modular la microestructura (porosidad) y disposición interna de las fibras logrando obtener hidrogeles anisótropos mediante la alineación de las NPM englobadas en el hidrogel. Lograr esta anisotropía es importante ya que la mayoría de los tejidos del cuerpo humano se caracterizan por una estructura ordenada jerárquicamente, altamente anisótropa, como es el caso de los tejidos musculares,^{279,280} la piel^{281,282} y el cartílago articular.^{283,284} Nuestro grupo de investigación ha preparado hidrogeles magnéticos anisótropos basados en la autoasociación supramolecular de pequeños péptidos en presencia de NPM.⁹³ Las imágenes ópticas revelaron la formación de agregados de NPM dispuestos en columnas paralelas al campo magnético aplicado (Figura II.4). Estos hidrogeles presentan una rigidez anisótropa modulada por la orientación de las NPM. Los resultados han demostrado que la presencia de NPM funcionalizadas no compromete la biocompatibilidad *ex vivo* e *in vivo*.^{285,286}

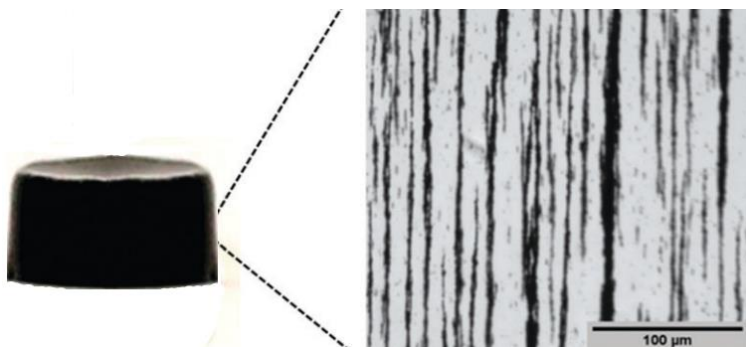


Figura II.4. Imagen macroscópica del hidrogel e imagen óptica de la vista lateral donde se observan las cadenas de NPM alineadas. Imagen adaptada de la ref⁹³ con permiso de Royal Society of Chemistry.

Además, numerosos estudios indican que cuando se utilizan andamios magnéticos en ingeniería de tejidos, la presencia de NPM estimula la adhesión, proliferación y diferenciación de células *in vitro* e incluso la formación de hueso *in vivo*.²⁸⁷⁻²⁹⁰ Recientemente, se ha patentado un método para promover la osteogénesis utilizando NPM y campos electromagnéticos.²⁹¹ También se han demostrado los efectos combinatorios de un campo magnético estático con el uso de andamios que contienen NPM en la regeneración ósea.^{292,293} Los hidrogeles magnéticos también se han utilizado como vehículos de administración de fármacos pulsátiles y en la ingeniería de tejidos para la estimulación magnetomecánica de diferentes líneas celulares,^{294,295} entre otras aplicaciones.²⁸⁶

Por lo tanto, combinando las ventajas de inyectabilidad y biocompatibilidad inherentes que presentan los péptidos, junto con la capacidad de modulación remota de sus propiedades mecánicas mediante la aplicación de un campo magnético externo, se pueden obtener sistemas con interesantes propiedades para aplicaciones biomédicas.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Como hemos comentado anteriormente se han desarrollado sistemas fluidificantes basados en péptidos que se autoensamblan para formar geles en condiciones fisiológicas, que fluyen bajo presión moderada (durante la inyección) y se autorreparan (después de la inyección). Estos sistemas son muy modulables y permiten incorporar promotores de la adhesión celular. Aunque el uso de estos sistemas como hidrogeles inyectables en biomedicina es muy reciente y se limita principalmente a estudios *in vitro*, la mayoría de estos sistemas son potencialmente adecuados para aplicaciones de ingeniería de tejidos y administración de moléculas. El gran desafío al que se enfrentan estos sistemas son las débiles propiedades mecánicas, tanto a nivel macroscópico como microscópico, que tienden a limitar sus aplicaciones. Además, dada la dificultad técnica para obtener este tipo de materiales, especialmente mediante procedimientos que proporcionen biocompatibilidad y escalabilidad, el número de estudios hasta la fecha es muy limitado. Por tanto, en este capítulo se plantean los siguientes objetivos:

1. Sintetizar y caracterizar hidrogeles híbridos supramoleculares magnéticos que combinen en un solo sistema las ventajas de inyectabilidad con la capacidad de modulación remota de sus propiedades mecánicas mediante la aplicación de un campo magnético externo.
2. Estudiar la biocompatibilidad de estos sistemas mediante experimentos *in vitro* como andamios 3D para crecimiento de osteoblastos e *in vivo* como vehículos de suministro de fibroblastos mediante inyección.
3. Estudiar la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas y la capacidad de rotura y autocuración de los nuevos sistemas formados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntesis y caracterización fisicoquímica de hidrogeles

La selección de los péptidos cortos aromáticos Fmoc-FF + Fmoc-RGD (FF + RGD) para la formación de los hidrogeles biocompatibles inyectables se debe a varias razones como se ha mencionado previamente tanto en la *Introducción General* como en este capítulo. Entre ellas, la presencia del motivo RGD como promotor de la adhesión celular, las excelentes propiedades de los hidrogeles peptídicos (biocompatibilidad, versatilidad, comportamiento fluidificante, autocuración) y la incorporación de NPM, hacen de estos sistemas matrices ideales para el propósito que se busca.

Se sintetizaron hidrogeles peptídicos de Fmoc-FF + Fmoc-RGD con y sin NPM recubiertas de polietilenglico (PEG) (en proporción 7:3 de FF:RGD, para más información sobre la formación de los geles ver *Sección Experimental*). Las morfologías de las fibras en los hidrogeles peptídicos Fmoc-FF y los hidrogeles Fmoc-FF + Fmoc-RGD fueron estudiadas por TEM para sistemas con y sin NPM. Como se puede observar, la imagen TEM del péptido FF (Figura II.5a) muestra fibras con una relación longitud-diámetro similar a las mostradas por la mezcla de FF + RGD (Figura II.5b). Estos resultados son similares a los reportados por Ulijn y colaboradores en los que demostraron que la morfología de las fibras de la mezcla FF + RGD sigue siendo similar a las de FF cuando la cantidad de RGD es igual o menor a 30%, que es el caso en el presente trabajo.¹⁴⁸ La incorporación de NPM en ambas condiciones (Figura II.5c, d) tampoco modificó apreciablemente la morfología de las fibras.

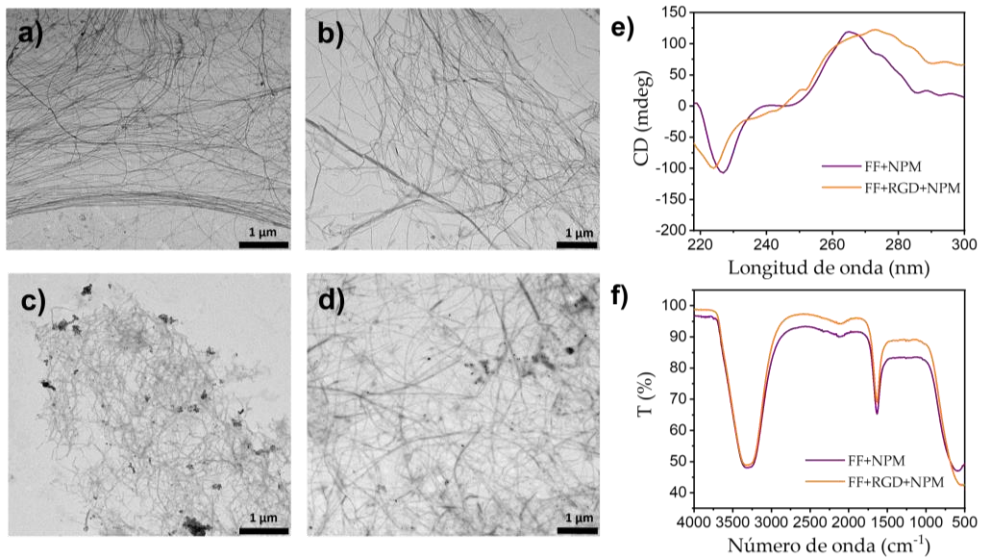


Figura II.5. Imágenes representativas de TEM y espectros de CD y FTIR de los hidrogel: (a) Fmoc-FF, (b) Fmoc-FF + Fmoc-RGD, (c) Fmoc-FF + NPM, (d) Fmoc-FF + Fmoc-RGD + NPM, (e) CD de Fmoc-FF + NPM y Fmoc-FF + Fmoc-RGD + NPM, y (f) FTIR de Fmoc-FF + NPM y Fmoc-FF + Fmoc-RGD + NPM.

El análisis de la estructura secundaria del péptido autoensamblado mediante CD y FTIR también confirmó la preservación de la morfología de las fibras y de la estructura secundaria en presencia de NPM. Los espectros de CD de Fmoc-FF y Fmoc-FF + Fmoc-RGD mostraron una banda ancha cerca de 280 nm correspondiente a las transiciones de los grupos fluorenilo y un pico negativo intenso cerca de 220 nm que sugiere una estructura secundaria en forma de lamina β , como es conocido¹⁴⁸ (Figura II.5e). La similitud de los dos espectros confirmó que la disposición dentro de la mezcla de péptidos dio lugar a un empaquetamiento similar al de FF solo, consistente con las imágenes TEM. Los espectros FTIR mostraron resultados similares: todas las muestras con y sin NPM produjeron una banda intensa en la región de amida I a 1627 cm^{-1} atribuible a la formación de estructuras de lamina β (Figura II.5f).

3.2. Evaluación mecánica de hidrogeles

Para evaluar las propiedades mecánicas de los hidrogeles formados y el impacto que posee la combinación de FF con RGD y NPM, se midieron los módulos viscoelásticos para diferentes muestras (Figura II.6a). Los resultados mostraron que las muestras de FF produjeron la respuesta más débil (valores más pequeños de G' y G'' dentro del LVR). La adición de RGD mostró una ligera mejora en la rigidez mientras que la adición de NPM mejoró notablemente las propiedades mecánicas al inducir un aumento en 7 veces de G' y G'' . El fortalecimiento mecánico de hidrogeles inducido por la inclusión de partículas sólidas se ha estudiado en geles poliméricos y se ha descubierto que es el resultado de cambios en la reticulación o en la microestructura de la red polimérica o simplemente el resultado directo de las inclusiones sólidas, o una combinación de estos efectos.^{93,285,296}

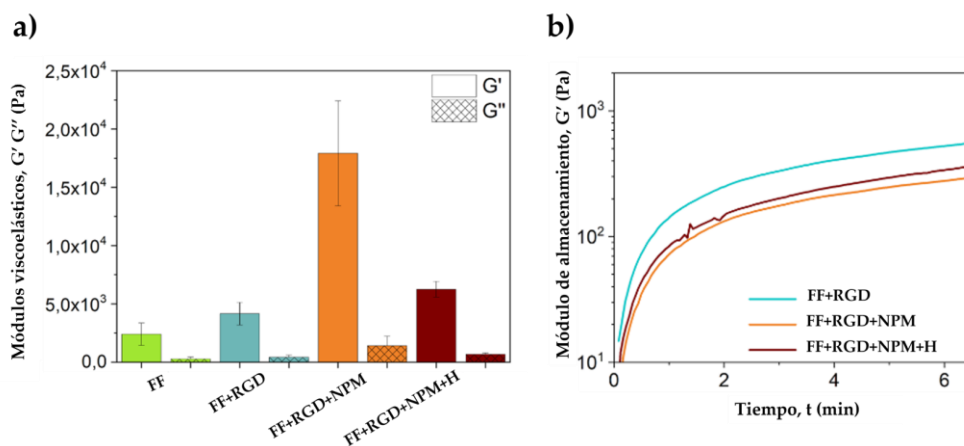


Figura II.6. a) Módulos viscoelásticos correspondiente a la LVR, para los hidrogeles estudiados. b) Curvas del módulo de almacenamiento durante el tiempo de gelificación de los hidrogeles estudiados.

La aplicación de un campo magnético durante la gelificación (muestra FF + RGD + NPM + H) dio como resultado una gran disminución en G' y G'' en comparación con la muestra con NPM gelificada en ausencia de campo magnético (muestra FF + RGD + NPM). También se estudió el tiempo que tardan los hidrogeles en formarse

mediante el seguimiento de la evolución del módulo de almacenamiento (G') en función del tiempo. Como se observó en la Figura II.6b, G' aumentó abruptamente con el tiempo desde el comienzo de la prueba y continuó aumentando después de unos minutos, lo que puede atribuirse a la formación de gel rápida y profunda. En cuanto a las diferencias entre muestras, todas mostraron cinéticas de gelificación similares.

3.3. Evaluación *in vitro* de los hidrogeles

Para analizar la biocompatibilidad *in vitro* de los hidrogeles, se prepararon cultivos de células 3D de osteoblastos en diferentes grupos experimentales durante dos períodos de cultivo diferentes: 12 días y 38 días (Figura II.7). En primer lugar, las muestras que no contenían NPM se degradaron completamente a los 38 días de cultivo celular (tanto la muestra de FF como la de FF + RGD) y, por lo tanto, no pudieron evaluarse. La visualización de tinción con hematoxilina (HE) reveló un gran aumento, estadísticamente significativo ($P < 0,05$), en el número de células entre el día 12 y el día 38 (gráficos en la Figura II.7). En ambos periodos de tiempo, la adición de RGD y/o NPM pareció tener un efecto positivo sobre la supervivencia / proliferación celular.

Como se comentó anteriormente, cuando las NPM son añadidas a los andamios poliméricos pueden estimular la adhesión, la proliferación y la diferenciación de las células *in vitro* e incluso la formación de hueso *in vivo*. En el presente trabajo, las diferencias entre la proliferación celular en diferentes muestras se correlacionan bien con las diferencias en las propiedades mecánicas mediadas por las NPM: hidrogeles más fuertes (G' más alto) que contienen NPM dan lugar a un mayor número de células en un período de cultivo celular determinado. Este resultado no es inesperado, dado que las células son sensibles a las propiedades mecánicas del medio circundante, y las propiedades mecánicas apropiadas generalmente se consideran una característica esencial para la biocompatibilidad de los biomateriales. Por lo tanto, nuestros resultados parecen indicar que la mejora de la proliferación de osteoblastos se debió, al menos parcialmente, a las propiedades mecánicas mejoradas de los hidrogeles.

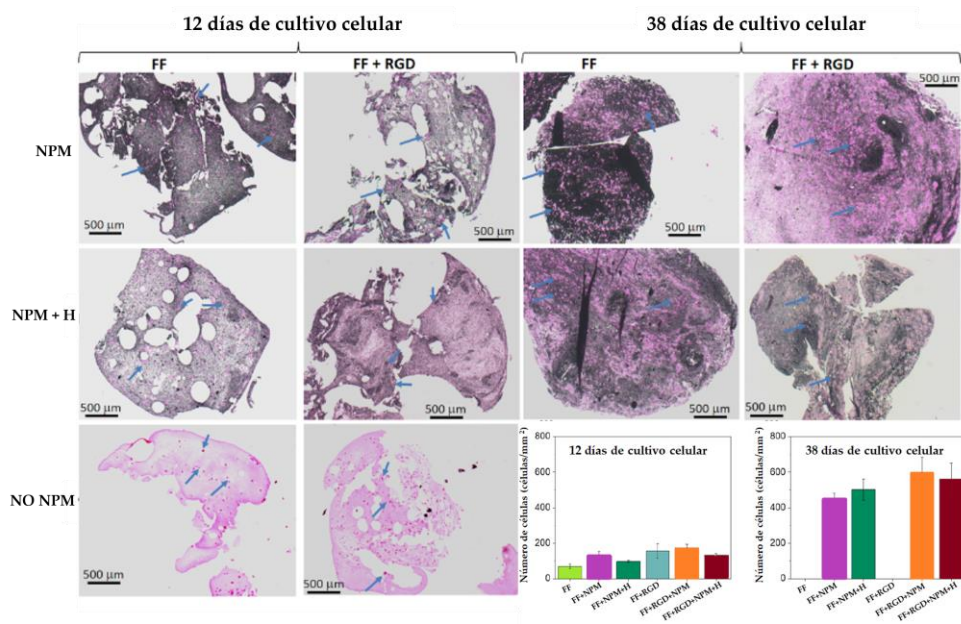


Figura II.7. Tinción con hematoxilina y eosina. Los puntos rosas brillantes representan células (algunas de las cuales están marcadas con flechas azules). **NPM**: hidrogeles que contienen NPM; **NPM + H**: hidrogeles que contienen NPM y gelificados bajo un campo magnético; **NO NPM**: hidrogeles que no contienen NPM. **FF**: matriz peptídica Fmoc-FF; **FF + RGD**: matriz híbrida basada tanto en péptidos Fmoc-FF como Fmoc-RGD. Las fotografías son imágenes representativas de cada condición experimental. Los datos de los gráficos representan los valores medios \pm errores estándar del recuento de células de cuatro secciones transversales diferentes de un solo andamio.

Para analizar más a fondo la proliferación celular en los hidrogeles, se utilizó tinción inmunohistoquímica que permite investigar la expresión potencial del antígeno Ki-67. El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear grande (sus dos isoformas principales tienen pesos moleculares teóricos de 345 y 395 kDa) expresada preferentemente durante todas las fases activas del ciclo celular pero ausente en las células en reposo. Esta proteína es necesaria para mantener los cromosomas mitóticos individuales dispersos en el citoplasma después de la duplicación nuclear. Nuestros resultados demuestran que, a los 38 días de cultivo celular, el 15-20% de las células estaban en fases activas del ciclo celular en hidrogeles que contenían NPM, independientemente de si se aplicó un campo magnético o si contenían RGD (Figura II.8). Los hidrogeles que no contenían NPM se degradaron completamente a los 38

días, lo que impidió el análisis inmunohistoquímico. Estos resultados corroboran aún más la idea de que los hidrogeles con NPM son adecuados para promover el crecimiento de células osteoblásticas.

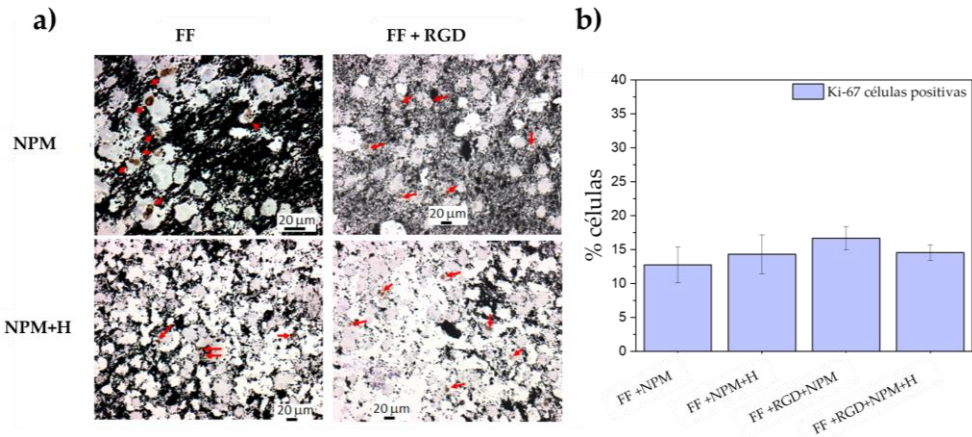


Figura II.8. Tinción inmunohistoquímica para la expresión del antígeno Ki-67 después de 38 días de cultivo celular en muestras que contienen NPM. La tinción nuclear marrón se observa en células en fases activas del ciclo celular (algunas células marcadas con flechas rojas), mientras que la tinción nuclear azul identifica células en la fase de reposo del ciclo celular. Debido a que las secciones tenían un grosor de 3 μm , algunas células aparecen sin núcleo. NPM: Hidrogeles que contienen NPM; NPM + H: Hidrogeles que contienen NPM y gelificados bajo un campo magnético; FF: matriz peptídica Fmoc-FF; FF + RGD: matriz híbrida basada tanto en péptidos Fmoc-FF como Fmoc-RGD. Las fotografías son imágenes representativas de cada condición experimental. Los datos en los gráficos representan los valores medios \pm errores estándar de recuentos de células de tres secciones transversales diferentes del mismo andamio.

3.4. Comportamiento de degradación e hinchamiento

Como se señaló en el apartado anterior, las muestras que no contenían NPM se degradaron por completo después de 38 días de cultivo celular. Para investigar más a fondo la estabilidad del hidrogel, se observaron los cambios a lo largo del tiempo en el comportamiento de degradación e hinchamiento de los hidrogeles acelulares. Todas las muestras mostraron signos de degradación, por ejemplo, pérdida de integridad (Figura II.9a) y disminución de masa en los experimentos de hinchamiento (Figura II.9b). Sin embargo, este resultado no fue incompatible con la alta estabilidad de las muestras celulares observada en experimentos llevados a cabo para evaluación

in vitro, dado que en trabajos previos con hidrogeles magnéticos de fibrina-agarosa la presencia de células estabilizaba los hidrogeles frente a la degradación durante un período de seguimiento (30 días).²⁹⁷ En el presente estudio, la combinación de células y NPM pareció tener un efecto sinérgico en la prevención de la degradación en hidrogeles magnéticos de péptidos. Por otro lado, no se observaron signos de corrosión de NPM, lo que respalda la efectividad del recubrimiento de PEG para este objetivo, en consonancia con trabajos anteriores²⁸⁶.

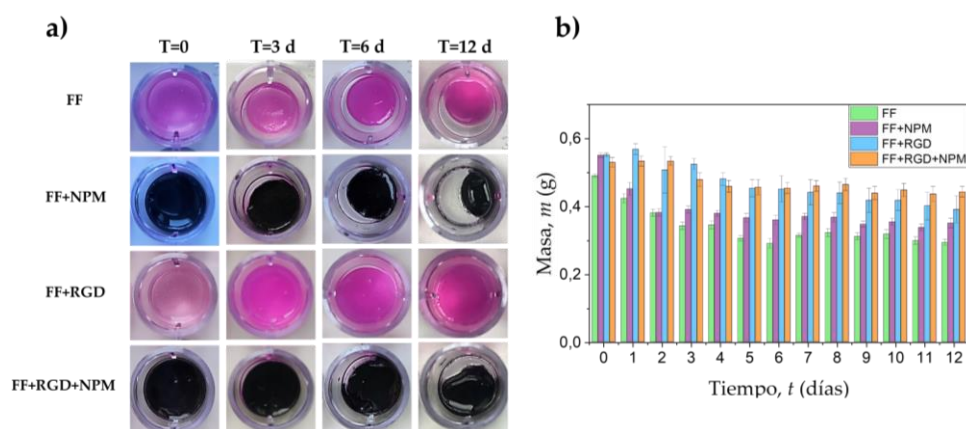


Figura II.9. a) Estudio de degradación: imágenes representativas de hidrogeles acelulares en períodos seleccionados después de la preparación. b) Comportamiento hinchamiento: masa de hidrogeles (después de eliminar el agua sobrenadante) en función del tiempo. Los datos representan valores medios \pm errores estándar para cuatro muestras diferentes por condición experimental.

3.5. Biocompatibilidad *in vivo* de partículas e hidrogeles

Para determinar la biocompatibilidad *in vivo* de las partículas y los hidrogeles utilizados, las muestras se inyectaron por vía subcutánea en ratones de laboratorio (Figura II.10a). Cabe señalar que los hidrogeles magnéticos respondieron a un campo magnético aplicado después de la inyección subcutánea en los ratones. Los ratones que recibieron implantes no mostraron signos detectables de alteraciones sistémicas según lo determinado por pruebas hematológicas (Tabla II.1). Específicamente, encontramos que todos los parámetros para glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas eran similares en los tres grupos (controles, animales con inyección de

partículas y con hidrogeles durante 1 semana y durante 30 días) y ninguno de los parámetros difirió significativamente en comparación con los animales de control ($P > 0,05$).

Tabla II.1. Valores medios de los principales parámetros hematológicos en sangre de animales del grupo control (CTR) (ratones nativos) y animales con inyección de los diferentes materiales tras 1 semana (1S) y 30 días (1M). Cada animal en los grupos experimentales recibió un implante de cada uno de los cuatro materiales separados 1 cm en diferentes partes del área dorsal.

| | RBC | HGB | HCT | MCV | MCH | MCHC | RDW_SD | RDW_CV |
|-----|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| CTR | 7915000 ±845000 | 12.4 ±1.2 | 40.05 ±4.15 | 50.65 ±0.15 | 15.65 ±0.15 | 31 ±0.2 | 27.9 ±1.1 | 13.8 ±2 |
| 1S | 8740000 ±411290.65 | 13.2 ±1.69 | 44.37 ±2.21 | 50.77 ±0.88 | 15.05 ±1.33 | 29.68 ±2.72 | 28.13 ±0.4 | 14.32 ±0.61 |
| 4M | 8138333.33 ±449329.13 | 12.53 ±0.83 | 40.7 ±2.4 | 50 ±0.55 | 15.4 ±0.3 | 30.8 ±0.89 | 27.42 ±0.12 | 12.65 ±0.16 |

| | WBC | LYM# | MXD# | NEUT# | PLT | PDW | MPV | P_LCR |
|-----|---------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------|----------------|---------------|----------------|
| CTR | 3300 ±1200 | 2750 ±1050 | 200 ±0 | 350 ±150 | 44500 ±9500 | 14 ±0.3 | 8.15 ±0.65 | 21.75 ±5.35 |
| 1S | 3816.67 ±1851.94 | 3150 ±1650.15 | 433.33 ±258.2 | 233.33 ±81.65 | 42833.33 ±20855.85 | 11.35 ±5.46 | 9.88 ±2.31 | 37.03 ±19.9 |
| 1M | 3900 ±616.44 | 3250 ±484.77 | 350 ±137.84 | 300 ±126.49 | 44333.33 ±23114.21 | 10.52 ±5.29 | 7.53 ±1.1 | 16.2 ±10.16 |

Abreviaturas: **RBC**: red blood cell (glóbulos rojos); **HGB**: hemoglobin (hemoglobina); **HCT**: hematocrit (hematocrito); **MCV**: mean corpuscular volumen (volumen corpuscular medio); **MCH**: mean corpuscular hemoglobin (hemoglobina corpuscular media); **MCHC**: mean corpuscular hemoglobin concentration (concentración de hemoglobina corpuscular media); **RDW_SD**: red blood cell distribution width and standard deviation (ancho de distribución de glóbulos rojos y desviación estándar); **RDW_CV**: red blood cell distribution width and coefficient of variation (ancho de distribución de glóbulos rojos y coeficiente de variación); **WBC**: white blood cells (glóbulos blancos).

Además, se analizó el sitio del implante para buscar efectos locales de cada hidrogel. Los resultados confirmaron la biocompatibilidad de las partículas y los hidrogeles y que ninguno de los animales de los grupos experimentales mostró ningún signo histológico de inflamación, infección, necrosis, hemorragia o tumorigénesis tras 1 semana y 1 mes después de la inyección de los materiales *in vivo* (Figura II.10).

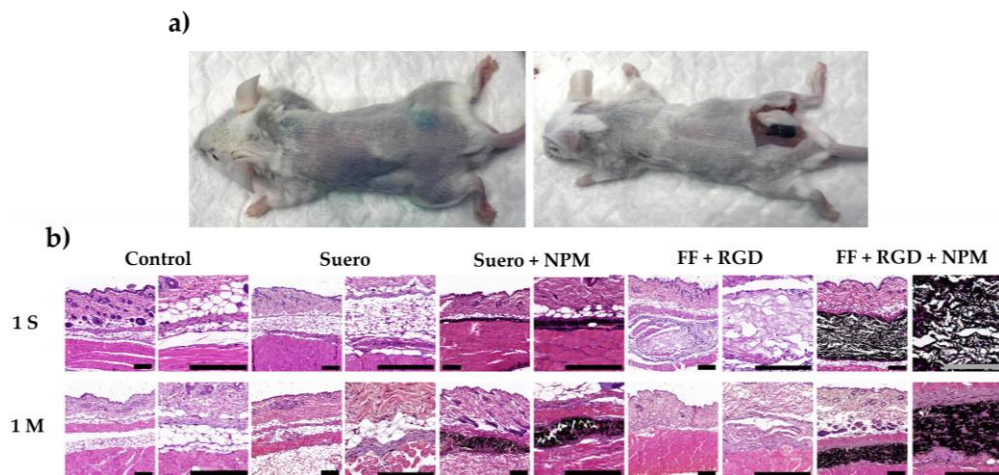


Figura II.10. a) Depósito subcutáneo de hidrogel magnético (FF + RGD + MNP) 1 mes después de la inyección. b) Análisis histológico (tinción con hematoxilina y eosina) del sitio del implante en animales seguidos durante 1 semana y 1 mes después de la inyección *in vivo*. En cada animal (excepto en el animal control) se inyectaron las diferentes condiciones (suero, suero + NPM, FF + RGD y FF + RGD +NPM) en diferentes sitios en el área dorsal en los grupos de 1 semana y 1 mes. Para cada condición, se muestran dos imágenes con diferentes aumentos. Barra de escala, 200 μ m. Las fotografías son imágenes representativas de cada condición experimental.

Tampoco se observaron signos de corrosión de las NPM en ninguno de los implantes. Los hallazgos en el sitio de inyección con solución salina fueron compatibles con el tejido subcutáneo normal que consiste en tejido conectivo fibroso y adipocitos, como se observa en los animales de control en ambos tiempos de seguimiento. Las zonas del implante en las que se inyectaron NPM suspendidas en solución salina mostraron una capa subcutánea delgada que consistía en NPM que ocupaba un área relativamente grande de tejido subcutáneo, aunque no se observaron NPM en otras estructuras vecinas. Curiosamente, después de 1 mes de seguimiento, las NPM estaban encapsuladas por tejido conectivo denso. En los implantes de hidrogeles FF + RGD, encontramos que los materiales inyectados estaban en el lugar del implante, donde formaban una estructura fibrilar homogénea restringida al lugar de la inyección en el tejido subcutáneo después de 1 semana. Sin embargo, el hidrogel sin NPM se reabsorbió por completo y fue indetectable en las muestras examinadas después de 1 mes.

Cuando se inyectaron hidrogeles FF + RGD + NPM por vía subcutánea, se encontró que las muestras permanecían concentradas en el sitio de inyección después de 1 semana de seguimiento y no se dispersaban a los tejidos vecinos. Los hallazgos después de 1 mes fueron muy similares, aunque se descubrió que las células huésped podían encapsular el material implantado por vía subcutánea y migrar dentro del material. Nuestros resultados *in vivo* sugieren que los nuevos hidrogeles descritos en el presente estudio son altamente biocompatibles, aunque se deben realizar futuras pruebas de irritación y corrosión para investigar más a fondo la biocompatibilidad de estos productos en la piel humana.

3.6. Evaluación de la inyectabilidad de los hidrogeles

Tanto los hidrogeles magnéticos como los no magnéticos conservaron su homogeneidad después de la inyección, sin signos apreciables de separación de fases. Uno de los experimentos que se llevó a cabo para estudiar el comportamiento fluidificante y autocuración (*shear-thinning* y *self-healing*) fue probar si los hidrogeles podían recuperar sus propiedades mecánicas después de la inyección a través de una jeringa. Para ello, las muestras se inyectaron directamente en el sensor de medición del reómetro y posteriormente se midió la evolución de los módulos viscoelásticos con el tiempo. Todas las muestras mostraron un aumento constante de G' en el paso posterior a la inyección (Figura II.11a), aunque solo la muestra sometida a un campo magnético durante este paso alcanzó valores de G' del mismo orden de magnitud que antes de la inyección (recordar Figura II.6a), probablemente debido al efecto combinado de atracción magnética entre las partículas y la recuperación de las interacciones supramoleculares entre péptidos.

Tras ser inyectados, los ensayos con imanes mostraron, como se esperaba, que los hidrogeles no magnéticos no podían ser impulsados por el imán. Por el contrario, la fuerza magnética sin contacto permitió el desplazamiento controlado de los hidrogeles magnéticos a través del laberinto sin separación de fases, una propiedad que es potencialmente útil para lograr la cobertura completa, el relleno de lesiones

internas o la liberación y dispersión completa de la carga en un área interna particular (Figura II.11b). Como se comentó anteriormente, el carácter fluidificante de los hidrogeles peptídicos, junto con la probable localización del esfuerzo dentro de la aguja en las paredes, protege a la mayor parte de las células, lo que hace posible inyectarlas sin daño celular sustancial. Este mismo efecto se corroboró en los sistemas de hidrogeles magnéticos, en los que se observó un daño celular mínimo durante la inyección, junto con la característica adicional de actuación magnética por fuerzas magnéticas sin contacto. Como se muestra en los ensayos de azul tripán (Figura II.11c), la mayoría de las células permanecieron vivas después de que la mezcla de hidrogel-células se sometiera a la extrusión con jeringa y posteriormente a un campo magnético.

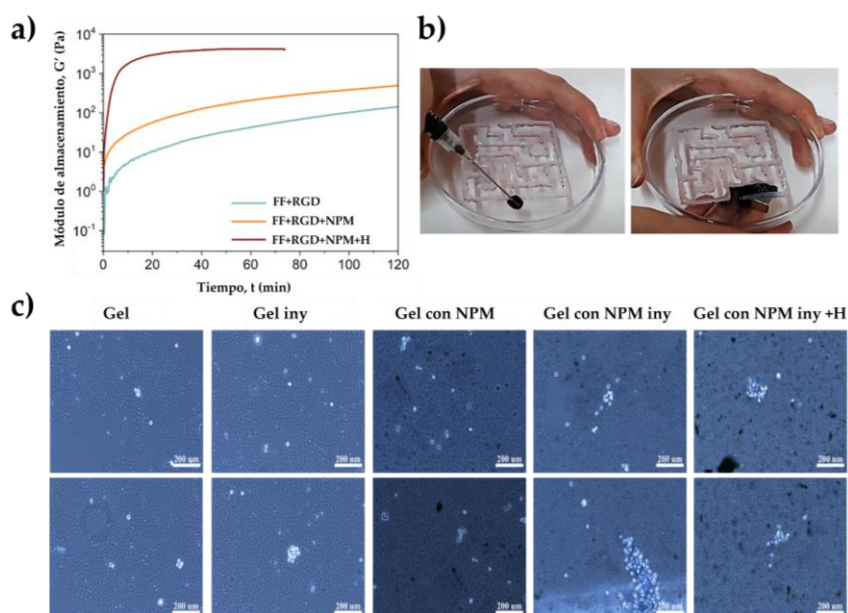


Figura II.11. Prueba de inyectabilidad: a) Curva representativa de la evolución del módulo de almacenamiento durante la prueba de autocuración (self-healing) tras la inyección del hidrogel. b) Hidrogel magnético inyectado y conducido a través de un laberinto con un imán. c) Análisis con azul tripán de cinco condiciones: FF + RGD hidrogel (**Gel**), FF + RGD hidrogel después de la extrusión con jeringa (**Gel iny**), FF + RGD + NPM hidrogel (**Gel con NPM**), FF + RGD + NPM después de la extrusión con jeringa (**Gel con NPM iny**), y FF + RGD + NPM tras extrusión con jeringa y aplicación de un campo magnético (**Gel con NPM iny + H**). Se muestran dos fotografías para cada condición. Las membranas celulares en células vivas permanecieron intactas (tinción blanca), mientras que las membranas celulares se rompieron en células muertas (tinción azul).

4. CONCLUSIONS

In this chapter:

- We have prepared and studied new short peptide supramolecular magnetic hydrogels showing improved physical properties. The inclusion of MNPs in the hydrogel matrix significantly increased the robustness and stability of the hydrogels and, at the same time, improved the injectability properties through a self-healing/shear thinning process.
- We tested these hybrid hydrogels as scaffolds for 3D growth of osteoblasts, and our results demonstrated that these hydrogels promoted cell growth and did not degrade after 30 days of culture.
- The injectability of these biomaterials was evaluated *in vivo* by subcutaneous injections in mice. We demonstrated that these hydrogels remained localized in the injection site without degradation for 1 month after injection. During this time, the hydrogels produced no toxicity, and promoted cell growth and migration through the hydrogel matrix.
- We have shown that the magnetic hydrogels analyzed in this study have mobility properties without observable phase separation.

5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.1. Reactivos y materiales

El péptido Fmoc-FF se adquirió de Bachem Co. (Bubendorf BL, Suiza) y el ácido N-fluorenilmetoxicarbonil-arginil-glicil-aspártico (Fmoc-RGD) de Synpeptide (Shanghai, China) y se utilizaron sin purificación adicional. Las nanopartículas magnéticas (NPM) de hierro (pureza del 99,7% o más) con diámetros en el rango de 60-80 nm se adquirieron en SkySpring Nanomaterials, Inc. (Houston, TX, EE. UU.). El polietilenglicol con una masa molecular de 400 g mol⁻¹ (PEG-400), glutaraldehído

(solución al 25% en agua), aceite mineral y sesquioleato de sorbitán fueron todos proporcionados por Sigma-Aldrich (Burlington, MA, EE. UU.). El n-hexano (pureza mínima del 99%) se compró a Scharlab SL (Barcelona, España). El medio de cultivo celular (DMEM), la solución de penicilina (10,000 U / mL) / estreptomina (10,000 µg / mL) y UltraGlutamine 1200 mM (U-Gln) se compraron en Lonza (Basilea, Suiza). La modificación alfa del medio esencial mínimo (modificación α con bicarbonato de sodio, ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos sin L-glutamina) se adquirió de Sigma-Aldrich. El suero bovino fetal (SBF) caracterizado con HyClone se adquirió de Cytiva (Marlborough, MA, EE. UU.).

5.2. Funcionalización de las nanopartículas magnéticas

Para obtener una adecuada integración de las NPM en los hidrogeles peptídicos, se requirió una adecuada funcionalización, para lo cual se siguió un protocolo previamente publicado.⁹³ Comentándolo brevemente, primero se recubrieron las NPM con PEG usando el método de microemulsión de Chatterjee y colaboradores.²⁹⁸ Luego, 100 mg de NPM recubiertas con PEG fueron suspendidas en 1.5 mL de una solución acuosa básica (pH aprox. 10.5) de Fmoc-FF (0.5% p/v). La suspensión resultante se sonicó durante 10 min y luego se centrifugó durante 5 min a 10.000 rpm (centrífuga Sigma 1-14) para obtener NPM con un revestimiento doble de PEG y Fmoc-FF. Finalmente se eliminó el sobrenadante y las partículas recubiertas fueron usadas para preparar los hidrogeles magnéticos. Una caracterización completa de las propiedades fisicoquímicas de estas partículas ha sido publicada con anterioridad. En particular, las NPM demostraron un comportamiento ferromagnético blando típico con una alta magnetización de saturación de 1521 ± 15 kA/m, una baja magnetización remanente de $62,3 \pm 2,4$ kA/m, y efectos insignificantes del recubrimiento de PEG sobre las propiedades magnéticas.⁹³

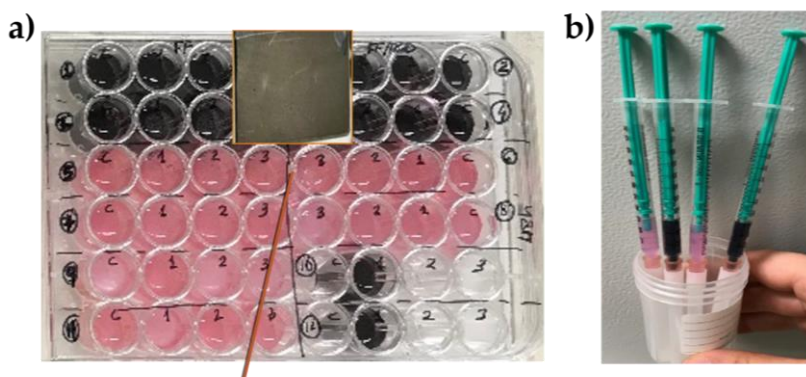
5.3. Preparación de hidrogeles no magnéticos

Para la preparación de hidrogeles no magnéticos se preparó una cantidad apropiada de péptido Fmoc-FF en un vial, al que se agregó agua desionizada hasta una concentración final de 20 mM. El vial se sumergió en un baño de ultrasonidos (HSt Powersonic 603) para lograr una dispersión homogénea de los péptidos (aproximadamente 1 h). Luego, se agregaron pequeñas cantidades de una solución de NaOH 0.5 M hasta obtener una solución transparente a un pH de aproximadamente 10,5. El valor de pH fue medido con un pH-metro HACH sensION + pH 3 previamente calibrado con soluciones tampón de pH 4, 7 y 10. A continuación, se preparó la disolución de Fmoc-RGD a una concentración de 20 mM en agua desionizada. Esta solución se volvió transparente inmediatamente tras añadir el agua con un pH de aprox. 3,98. Para preparar soluciones híbridas de Fmoc-FF + Fmoc-RGD, se mezclaron en una proporción de 7:3 de Fmoc-FF:Fmoc-RGD, mientras que para los hidrogeles puros de Fmoc-FF (sin péptido Fmoc RGD), se mezcló la solución de péptido Fmoc-FF con agua en una proporción de 7:3. Finalmente, la gelificación fue inducida en las soluciones híbridas de Fmoc FF + Fmoc-RGD o de péptidos Fmoc-FF puros añadiendo volúmenes iguales de una mezcla 50:50 de DMEM y agua. El pH final del hidrogel Fmoc-FF fue aproximadamente 7,4 y el pH final del hidrogel Fmoc-FF + Fmoc-RGD fue aproximadamente 7,1.

5.4. Preparación de hidrogeles magnéticos

El protocolo anterior fue ligeramente modificado agregando cantidades apropiadas de NPM con doble recubrimiento (PEG + Fmoc-FF) a las soluciones de péptidos antes de la adición de DMEM. La concentración final de NPM fue de 0,1% en volumen. En algunos casos, se indujo la formación de estructuras alargadas anisótropas de NPM en la microestructura del hidrogel aplicando un campo magnético vertical ($H = 15 \text{ kA m}^{-1}$) durante la primera hora de gelificación después de la adición de DMEM. Se utilizó un solenoide conectado a una fuente de alimentación de corriente continua

para aplicar el campo magnético en los estudios reológicos, mientras que en los experimentos *in vitro* se utilizaron dos imanes de neodimio de dimensiones 30 x 30 x 15 mm (Figura II.12).



Imán

Figura II.12. a) Placa “well-plate” de 48 pocillos con los hidrogeles formados en el interior para el cultivo *in vitro* de osteoblastos. Algunas muestras de hidrogeles magnéticos fueron sometidas a campo magnético mediante imanes. b) Jeringas con los hidrogeles para llevar a cabo los experimentos *in vivo* en ratones.

Todos los hidrogeles se prepararon de acuerdo con el procedimiento detallado anteriormente. En todos los casos, las propiedades del hidrogel se caracterizaron 24 h después de que se añadió DMEM para permitir la gelificación completa. Un resumen de los diferentes hidrogeles estudiados en este trabajo se muestra en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Resumen de las principales características de los hidrogeles preparados para el presente trabajo.

| Muestra | Péptidos utilizados para la matriz | Adición de NPM | Aplicación de campo magnético |
|--------------------|------------------------------------|----------------|-------------------------------|
| FF | Fmoc-FF | No | No |
| FF + NPM | Fmoc-FF | Sí | No |
| FF + NPM + H | Fmoc-FF | Sí | Sí |
| FF + RGD | Fmoc-FF + Fmoc-RGD ^d | No | No |
| FF + RGD + NPM | Fmoc-FF + Fmoc-RGD ^d | Sí | No |
| FF + RGD + NPM + H | Fmoc-FF + Fmoc-RGD ^d | Sí | Sí |

^aLa concentración de péptido fue de 20 mM en todos los casos. ^bLa concentración de NPM fue del 0,1% en volumen. La NPM se recubrieron previamente con PEG + Fmoc-FF. ^cLa intensidad del campo magnético fue $H = 15 \text{ kA m}^{-1}$ y se mantuvo durante la primera hora de gelificación. La relación Fmoc-FF/ Fmoc-RGD fue de 7:3.

5.5. Caracterización fisicoquímica de los hidrogeles

5.5.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR fueron registrados con un espectrómetro PerkinElmer Two FTIR ATR. Los hidrogeles magnéticos y no magnéticos se comprimieron sobre el cristal de diamante y los espectros se escanearon en un rango de 4000 a 450 cm^{-1} .

5.5.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los hidrogeles se examinaron con un aparato LIBRA 120 PLUS Carl Zeiss. Los hidrogeles se agitaron con vórtex y se diluyeron con agua 1:10. Las muestras de hidrogel se colocaron en una rejilla de cobre de malla 300 teñidas con una solución acuosa de acetato de uranilo al 1% y se secaron a temperatura ambiente durante 30 min. Al menos seis áreas diferentes de hidrogel para cada condición experimental fueron analizadas.

5.5.3. Dicroísmo circular

Los espectros de CD se registraron con un espectropolarímetro Jasco J-815 y una lámpara de xenón de 150 W. Los hidrogeles se gelificaron en una celda de cuarzo de 0,1 mm (Hellma Suprasil de cuarzo de 0,1 mm) de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Los espectros se obtuvieron de 200 a 320 nm con un paso de 1 nm y un tiempo de integración de 0,5 s por paso a 20 °C.

5.6. Evaluación mecánica de los hidrogeles

5.6.1. Caracterización de las propiedades mecánicas de los hidrogeles

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles se caracterizaron bajo esfuerzos de cizalla oscilatoria utilizando un reómetro de esfuerzo controlado Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) equipado con un sensor de doble

placa de 35 mm de diámetro y superficies rugosas para evitar el deslizamiento de la pared (sensor P35 Ti LS dentado, Thermo Fisher Scientific). La caracterización se llevó a cabo a una temperatura constante de $37,0 \pm 0,1$ °C. Los hidrogeles se sometieron a barridos de amplitud, a frecuencia constante de 1 Hz y amplitud de la deformación oscilatoria, γ_0 , creciente en el rango de 0,0001 - 2 a lo largo de una rampa logarítmica. Estas mediciones proporcionaron los valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdidas (G'') en función de γ_0 . Se obtuvieron medidas para al menos tres muestras diferentes para cada condición experimental de las que se reportan los valores medios correspondientes y los errores estándar de las mediciones.

5.6.2. Cinética de gelificación

La cinética de gelificación de los hidrogeles se llevó a cabo con el mismo reómetro, pero equipado con un sensor de placa cónica doble de 60 mm de diámetro con un ángulo de 2° (sensor DC60 / 2° Ti L). Para estos ensayos, se siguió el protocolo para la preparación de hidrogeles magnéticos y no magnéticos descrito anteriormente. Se añadieron todos los componentes en el sistema de medición del reómetro a excepción del DMEM, que se añadió en último lugar para inducir la gelificación. Inmediatamente después, la muestra fue sometida a una deformación por cizallamiento oscilatorio de frecuencia fija (1 Hz) y amplitud ($\gamma_0 = 0.001$) y se siguió la evolución de los módulos viscoelásticos en función del tiempo. Para las muestras FF + RGD + MNP + H, se aplicó un campo magnético de 15 kA / m durante la gelificación mediante el uso de una bobina conectada a una fuente de alimentación colocada coaxialmente al eje del reómetro. La caracterización se llevó a cabo a una temperatura constante de $37,0 \pm 0,1$ °C. Se obtuvieron medidas para al menos tres muestras frescas de cada condición experimental.

5.6.3. Comportamiento autocurativo de los hidrogeles

Para el estudio del comportamiento de autocuración de los hidrogeles se utilizó el mismo reómetro equipado con un sensor de doble cono-placa (sensor DC60 / 2 ° Ti L). El hidrogel se produjo en un vial de acuerdo con el protocolo de preparación de gel indicado anteriormente y se mantuvo durante 24 h. Luego, se rompió con un vórtex, se introdujo en una jeringa con una aguja de calibre 20G y se inyectó en el sistema de medición del reómetro. La combinación de la mezcla con vórtex y del esfuerzo producido durante la inyección condujo a la rotura completa de la muestra. A continuación, las muestras se sometieron inmediatamente a una deformación de cizalla oscilatoria de frecuencia fija (1 Hz) y amplitud ($\gamma_0 = 0,001$) mientras se controlaban los módulos viscoelásticos resultantes en función del tiempo. Para las muestras FF + RGD + MNP + H, aplicamos un campo magnético de 15 kA / m durante la gelificación con una bobina conectada a una fuente de alimentación colocada coaxialmente al eje del reómetro. Se obtuvieron medidas para al menos tres muestras diferentes para cada condición experimental.

5.7. Biocompatibilidad *in vitro* de los hidrogeles

El protocolo de preparación de gel descrito anteriormente se modificó ligeramente para la incorporación de células. Primero, se esterilizaron todos los reactivos y la preparación del gel se realizó en condiciones estériles dentro de una placa de pocillos estéril. Luego, se siguieron los pasos anteriores para la preparación del gel, excepto el último paso: en lugar de DMEM, se agregaron osteoblastos humanos normales (hOB# 35, pase 8) dispersos en α MEM. Se eligió una densidad de 1 millón de células por pocillo de cultivo (osteoblastos primarios humanos, Lonza, Basilea, Suiza). Se agregó α MEM suplementado con Hyclone SBF al 10%, U-Gln (2 mM) y penicilina / estreptomina (100 U / mL y 100 μ g / mL, respectivamente) y las muestras se cultivaron en condiciones de cultivo estándar para dos períodos de tiempo diferentes de 12 y 38 días. Al final de cada período, se examinaron las muestras después de la tinción con hematoxilina y eosina (HE) (las muestras se fijaron durante

72 h en formaldehído a temperatura ambiente y luego se embebieron en parafina; se realizaron cortes de 4 μm de espesor, desparafinados en xileno, hidratados, y teñidos con HE). Se investigó la proliferación celular para muestras seleccionadas después de la inmunotinción con un anticuerpo anti-antígeno Ki-67 humano (antígeno monoclonal de ratón anti-Ki-67 humano, clon MIB-1, de Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.). Estos experimentos se llevaron a cabo en el grupo del Dr. David Momier del Instituto de Biología Valrose, de la Université Côte d'Azur (Niza) durante mi estancia predoctoral.

5.8. Comportamiento de degradación e hinchamiento

Para los estudios de degradación, los hidrogeles se depositaron (tres muestras por condición experimental) en placas de pocillos, que luego se sumergieron en DMEM y se mantuvieron a 37°C en una incubadora de laboratorio. Cada 24 h se cambió el medio DMEM y se monitoreó la integridad física de los hidrogeles mediante observación directa y fotografía sin aumento artificial durante un período total de 12 días.

Para estudiar el comportamiento de hinchamiento, los hidrogeles se prepararon en tubos Eppendorf (cuatro muestras de 500 μL por cada condición experimental), y se agregaron 500 μL de agua en cada uno de ellos. Se almacenaron a temperatura ambiente. Cada 24 h, el sobrenadante fue retirado y la masa de los hidrogeles se calculó restando la masa del tubo vacío a la masa del tubo + hidrogel hidratado. Las medidas de masa se obtuvieron con una microbalanza. Tras cada medida, se volvía a agregar 500 μL de agua y se almacenaban los hidrogeles a temperatura ambiente hasta la siguiente medición.

5.9. Biocompatibilidad *in vivo* de partículas e hidrogeles

La biocompatibilidad de las NPM e hidrogeles se evaluó en 12 ratones de laboratorio BALB/c. Los animales fueron anestesiados con ketamina y acepromazina, y se realizó una inyección subcutánea en cada ratón consistente en 300 μ L de (i) NPM diluidas en solución salina (0.1% v/v de NPM recubiertas con PEG-Fmoc-FF), (ii) hidrogel que consiste en FF + RGD en una proporción de 7:3, (iii) hidrogel que consiste en FF + RGD + NPM (0.1% v/v de NPM recubiertas con PEG-Fmoc-FF en un hidrogel con FF + RGD en una proporción de 7:3), o (iv) solo solución salina (usada como control). Cada animal recibió una inyección de cada uno de los cuatro materiales en diferentes partes de la zona dorsal, con una separación de 1 cm entre los sitios de implante. Se sacrificaron seis animales mediante inyección intraperitoneal de una solución de eutanasia (Eutanax 200, Fatro Ibérica, Barcelona, España) tras 7 o 30 días de seguimiento. Las cuatro áreas de inyección se extirparon y analizaron histológicamente. Como control, se utilizó un ratón BALB / c sin implantes para cada uno de los dos períodos de seguimiento. Estos experimentos se llevaron a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Miguel Alaminos, de la Facultad de Medicina (UGR).

5.10. Evaluación de los hidrogeles magnéticos como plataformas para el suministro de células por inyección.

Primero, se investigó la inyectabilidad de los hidrogeles y la posibilidad de manipularlos por fuerzas magnéticas. El hidrogel se preparó en un tubo Eppendorf y, después de la gelificación completa, se rompió con un vórtex. Inmediatamente después, el hidrogel se introdujo en una jeringa con un calibre de 0,3 mm y se inyectó en una placa de Petri a la que previamente se había pegado un laberinto prefabricado. A continuación, con la ayuda de un imán permanente, se intentó mover el hidrogel inyectado por el laberinto.

En un experimento separado, se procedió como se describe, pero antes de que el hidrogel roto se extrajera en la jeringa, se mezcló con fibroblastos humanos (200.000 células por ml de hidrogel). En algunos grupos experimentales, la mezcla de células / hidrogel fue sometida a un campo magnético en una placa de Petri como se describió anteriormente. En otros grupos, la mezcla de células / hidrogel se inyectó en pocillos de cultivo y, después de 10 min, la viabilidad celular fue analizada mediante tinción con azul tripán para observar si el hidrogel protegía a las células del daño mecánico causado por las fuerzas de extrusión y el desplazamiento inducido por el campo magnético. Como control, se analizaron muestras de células/hidrogel que no fueron sometidas al uso de jeringas ni a un campo magnético. Estos experimentos se realizaron para tres hidrogeles diferentes en cada condición experimental. Para los estudios de viabilidad celular, se usaron al menos tres muestras para cada condición experimental. Estos experimentos se llevaron a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Miguel Alaminos, de la Facultad de Medicina (UGR).

CAPÍTULO III

Hidrogeles híbridos de péptidos
aromáticos cortos para
mineralización de hidroxiapatito

RESUMEN

El tejido óseo está formado por una matriz orgánica compuesta de fibras de colágeno alineadas que contienen cristales de nanoapatita orientados a lo largo de la dirección de las fibras. Durante la mineralización ósea, las fibras de colágeno son capaces de controlar la nucleación de fosfato de calcio y el posterior crecimiento de cristales de apatita en un rango muy limitado de densidad de colágeno y concentración iónica, siendo ambos procesos, el autoensamblaje de las fibrillas de colágeno y la mineralización simultáneos. Los péptidos y proteínas autoensamblados han resultado ser excelentes plantillas para el crecimiento de minerales inorgánicos que intentan emular los procesos naturales de biomineralización. De especial interés es el desarrollo de andamios capaces de guiar la regeneración ósea.

En este estudio se ha desarrollado un protocolo en el que se produce el autoensamblaje de un péptido artificial Fluorenilmetoxicarbonil-difenilalanina (Fmoc-FF) y la formación de hidroxapatita, de manera simultánea mediante la adición de iones Ca^{2+} . Este protocolo reproduce de forma más fiable la biogénesis ósea natural en la que se produce a la vez el autoensamblaje de las fibrillas de colágeno y la mineralización. Además, se ha investigado el papel de las concentraciones iónicas y peptídicas proporcionando hidrogeles híbridos orgánicos/inorgánicos con diferentes grados de homogeneidad y mineralización. El sistema resultante se ha estudiado macroscópicamente, estudiando las propiedades mecánicas de los hidrogeles, y micro- y nanoscópicamente, estudiando el grado de integración de los diferentes componentes que dan lugar al material compuesto híbrido. Además, Fmoc-AA (Fmoc-dialanina), un péptido capaz de formar hidrogeles débiles, también se ha utilizado para obtener más información sobre la influencia del autoensamblaje del péptido en el proceso de biomineralización.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Composición del hueso

El hueso es un material muy complejo tanto desde un punto de vista estructural y composicional, así como por su comportamiento ya que se trata de un tejido dinámico y metabólicamente activo. El hueso se encuentra en continuo proceso de remodelado, lo que confiere al esqueleto su capacidad regenerativa y la posibilidad de auto-reparación.²⁹⁹ La matriz extracelular del hueso está compuesta por una parte orgánica (17-20% peso), constituida mayoritariamente por fibras de colágeno tipo I y otras proteínas minoritarias las cuales cumplen distintas funciones en la matriz como proliferación del crecimiento celular, control del proceso de biomineralización, etc. El colágeno se ensambla para alcanzar la estructura tridimensional fibrilar característica de la matriz extracelular como se puede apreciar en la Figura III.1a). Este proceso se denomina fibrogénesis y de sus características dependen las propiedades mecánicas del tejido.³⁰⁰

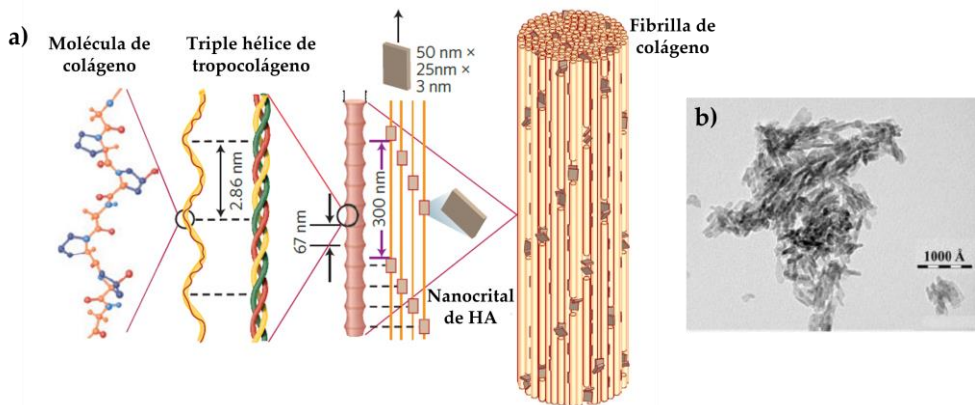


Figura III.1: a) Esquema de la distribución de los componentes del hueso. b) Imagen TEM de cristales de apatito. Figura adaptada de la ref³⁰¹ con permiso de Nature Materials.

La parte mineral que se forma en las fibrillas de colágeno ocupa aproximadamente el 70-80% peso, y está constituida en su mayoría por nanocristales de un mineral de fosfato de calcio, el apatito. Este mineral (Figura III.1b), conforma

un grupo de minerales con una composición química similar, pudiendo encontrar dentro de este grupo, la hidroxiapatita, fluorapatita y cloroapatita. En concreto, la hidroxiapatita (HA) es característica de los huesos cuya fórmula química no estequiométrica es $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$.³⁰² Este mineral alberga el 99% del calcio y el 80% del fósforo corporal y en el organismo se encuentra parcialmente sustituida con varios iones presentes en el medio fisiológico como magnesio o carbonatos con una morfología y tamaño particulares.³⁰³

1.2. Hidrogeles supramoleculares peptídicos como sustitutos del hueso.

Cuando se producen fracturas traumáticas o en ciertas patologías óseas (p.ej., osteonecrosis), el tejido óseo no es capaz de regenerarse por sí mismo y por tanto se requiere un injerto óseo o un sustitutivo sintético para promover la reparación ósea. A la hora de intentar simular una matriz extracelular sintética ósea idónea para la realización de un trasplante, es importante conocer tanto la composición de ésta como la evolución de la misma dentro del cuerpo hasta finalizar la formación del tejido.

En las últimas décadas, el diseño de biomateriales como implantes para el hueso se ha centrado en la mineralización biomimética de polímeros naturales (por ej., colágeno, celulosa o quitosano) ya que ésta les otorga propiedades osteoinductivas asociadas a la presencia de la fase mineral y propiedades osteoconductoras asociadas a las propiedades superficiales (p.ej., nano-rugosidad) derivadas de la mineralización.³⁰⁴ Sin embargo, los biomateriales basados en polímeros naturales presentan serios inconvenientes que dificultan su comercialización como son baja reproducibilidad de su composición y pureza, posibilidad de reacciones inmunológicas en pacientes susceptibles, debido a su composición proteica no humana o incluso la posible contaminación con sustancias patógenas. Para evitar esto, se han desarrollado polímeros o péptidos sintéticos que puedan formar estructuras 3D, que presenten determinados grupos funcionales y que sean biocompatibles y biodegradables. En este escenario, los geles supramoleculares basados en péptidos

son un excelente material para obtener hidrogeles híbridos como plantillas para la biomineralización de hidroxiapatito. Como se ha comentado en la *Introducción General*, la incorporación de aditivos en la matriz del hidrogel peptídico y el momento en que estos se introducen (antes o después de la gelificación), son factores importantes que pueden modificar el proceso de autoensamblaje y es crucial si se pretenden obtener hidrogeles híbridos o compuestos.^{203,305}

En trabajos previos sobre mineralización de péptidos supramoleculares autoensamblados se estudió el crecimiento del mineral a partir de una red polimérica supramolecular preexistente,³⁰⁶⁻³¹⁰ de forma similar a trabajos realizados en hidrogeles poliméricos.^{311,312} Stupp y colaboradores demostraron el potencial de las fibras peptídicas anfífilas para controlar la orientación de los nanocristales de apatita, mostrando que las morfologías de las nanofibras juegan un papel relevante en la cristalización de apatita de manera similar a la encontrada en los huesos^{307,310} (Figura III.2).

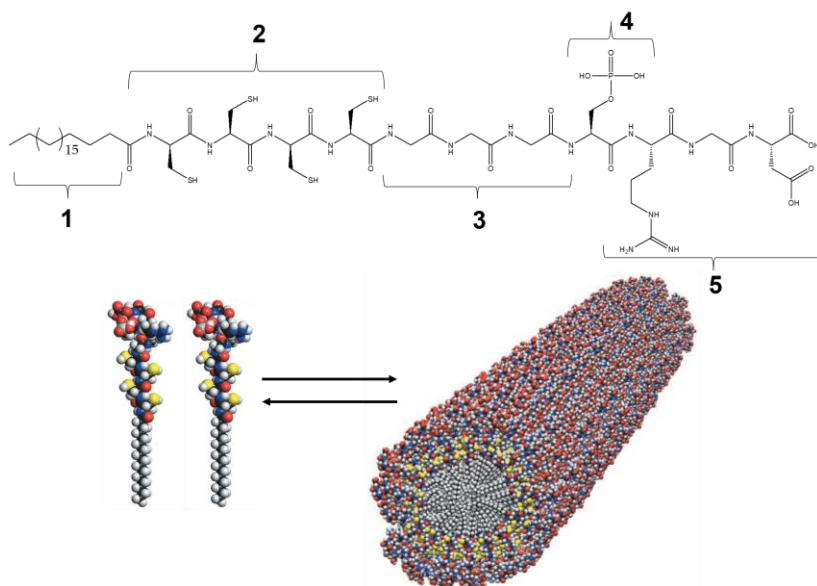


Figura III.2: Péptido anfílico y modelo de autoensamblaje diseñado por Stupp y colaboradores para la mineralización de HA. El péptido posee una cadena alifática larga (1), cuatro restos de cisteína (2) capaces de formar enlaces disulfuro si se oxidan, tres residuos de glicina (3), un resto de serina fosforilado (4) para interaccionar con iones calcio y dar lugar a la mineralización de HA y, por último, un ligando de adhesión celular (5). Figura adaptada desde³⁰⁷ con permiso de Science.

La mineralización del hidrogel Fmoc-FF se ha llevado a cabo obteniendo un hidrogel híbrido con una mayor estabilidad térmica, rigidez y resistencia a la rotura bajo tensión.³⁰⁸ Resultados similares se han obtenido al incorporar nanopartículas de apatita en hidrogeles coensamblados de Fmoc-FF y Fmoc-R.³⁰⁹

Por otro lado, la mineralización ósea ha sido ampliamente investigada para comprender sus fascinantes propiedades biomecánicas y la relación entre su estructura y su función, y como fuente de inspiración en el desarrollo de materiales sofisticados con funciones altamente controlables y especializadas.^{301,313–315} Durante la mineralización ósea, las fibras de colágeno sirven como una plantilla estructural que controla tanto la nucleación de fosfato de calcio como el subsiguiente crecimiento de cristales de apatita, desempeñando un papel predominante en la determinación del tamaño y la distribución 3D del mineral. Este control preciso ocurre bajo un rango muy limitado de densidad de colágeno y concentración iónica (calcio, fosfato y carbonato) con ambos procesos, es decir, el autoensamblaje de las fibrillas de colágeno y la mineralización ocurriendo simultáneamente.³¹⁶ El ajuste de manera correcta del péptido y la concentración iónica permite reproducir de manera más precisa las condiciones de biomineralización.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Como se comentó en la *Introducción General*, el desarrollo de hidrogeles multicomponente abre numerosas posibilidades en el diseño y la construcción de nuevos materiales que combinan en uno solo diferentes propiedades. Considerando la importancia de encontrar materiales que mimeticen el tejido óseo para fabricar reemplazos funcionales de tejidos que permitan suplir total o parcialmente a los órganos o tejidos naturales, y conociendo las ventajas que presentan los hidrogeles basados en péptidos, en este trabajo se propone el diseño y la síntesis de un nuevo hidrogel híbrido orgánico/inorgánico.

Además, en este capítulo se han expuesto ejemplos de hidrogeles supramoleculares que han servido como plantilla para el crecimiento mineral, aunque el proceso de formación no se asemeje completamente al mecanismo que tiene lugar en la naturaleza. Por tanto, en esta Tesis Doctoral se plantea obtener hidrogeles híbridos combinando simultáneamente el autoensamblaje de un péptido corto aromático, Fmoc-FF y la mineralización de hidroxiapatita nanocrystalina, ya que ambos procesos dependen de la concentración de iones Ca^{2+} para que puedan ocurrir. Esta estrategia sería una alternativa de gran utilidad para favorecer la formación de hidrogeles híbridos más homogéneos y reproducir de manera más eficiente el proceso de mineralización que ocurre en el organismo.

Por ello, los objetivos que se plantean en este capítulo son los siguientes:

1. Sintetizar geles supramoleculares híbridos funcionales y capaces de mimetizar la matriz ósea diseñando un protocolo con la relación óptima de matriz orgánica/matriz inorgánica.
2. Estudiar el impacto que los iones Ca^{2+} tienen en la formación final del material híbrido.
3. Estudiar la micro y macroestructura de los hidrogeles híbridos sintetizados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntesis y estudio de los hidrogeles híbridos

En primer lugar, tal y como se ha planteado en el primer objetivo se evaluó la relación entre la composición peptídica y su capacidad para formar hidrogeles mineralizados con hidroxiapatita. Los estudios se llevaron a cabo utilizando dos péptidos cortos aromáticos Fmoc-FF y Fmoc-AA cuyas estructuras se muestran en la Figura III.3.

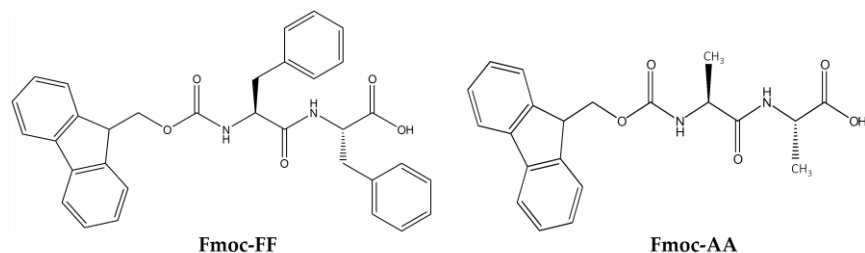


Figura III.3. Estructuras peptídicas estudiadas en este trabajo.

El ensamblaje y la mineralización se llevó a cabo simultáneamente a través de un protocolo inspirado en la biomineralización ósea.^{317,318} Se partió de una solución peptídica madre en medio básico a la concentración de 20 mM, y se mezcló con vortex en las diferentes proporciones péptido/mineral con una solución que contenía fosfato, carbonato y citrato, siendo estos dos últimos componentes esenciales de la nanoapatita ósea.^{319–321} Luego, se agregó una solución que contenía calcio a la última mezcla, lo que desencadenó el autoensamblaje y la mineralización simultánea de las fibrillas peptídicas. Las concentraciones de cada reactivo se detallan en la Tabla III.2 de la *Sección Experimental*. Después de 24 horas, la muestra que contenía Fmoc-FF (FF-HA) mostró la formación de un hidrogel translúcido débil que no pudo sostenerse por sí mismo tras la inversión del vial (recuadro Figura III.4a). La muestra que contenía Fmoc-AA (AA-HA) mostró la formación de agregados blancos individuales, pero no un hidrogel (recuadro de la Figura III.4b). La imagen TEM de FF-HA mostró la presencia de una malla densa de fibras largas formadas por el autoensamblaje de Fmoc-FF en presencia de Ca^{2+} . La mayoría de estas fibras estaban exhaustivamente decoradas con nanocristales de HA que aparecían distribuidos homogéneamente por toda el área visualizada, al igual que las fibras peptídicas (Figura III.4a). Por el contrario, la imagen TEM de AA-HA (Figura III.4b) mostró la presencia de mayores cantidades de nanocristales de HA dispuestos en agregados densos, similar a la mineralización de HA en ausencia de fibras peptídicas (Figura III.5a).

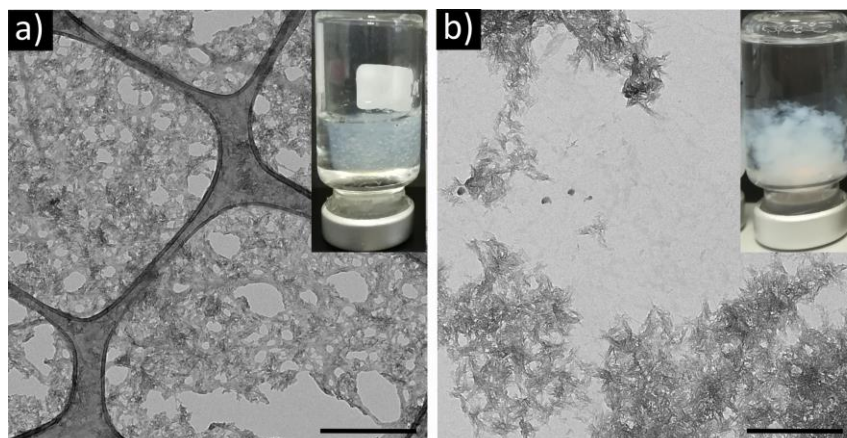


Figura III.4. Imágenes TEM de muestras sin teñir de FF-HA (a) y AA-HA (b). Barra de escala = 500 nm. Los recuadros muestran imágenes de viales invertidos de cada condición.

Como se ha estudiado en el *Capítulo I* de la Tesis Doctoral, el Fmoc-FF en presencia de Ca^{2+} tiene una mayor tendencia y una cinética más rápida para autoensamblarse en fibras largas que Fmoc-AA, dando lugar a hidrogeles más rígidos. Teniendo esto en cuenta, y conociendo la diferente hidrofobicidad que presentan ambos péptidos, podemos inferir, basándonos en las imágenes obtenidas por TEM, que el entrecruzamiento de la estructura supramolecular por iones de calcio no solo mejora la estabilidad de los hidrogeles, sino que también actúa como sitios reactivos para la nucleación y el crecimiento del fosfato de calcio. Por ello, los resultados con el péptido de Fmoc-FF mostraron que, en estas condiciones, se estaba produciendo una competencia entre los péptidos y los iones fosfato por el ion Ca^{2+} , mientras que con el Fmoc-AA, la ausencia de fibras peptídicas sugiere que los iones Ca^{2+} se han utilizado principalmente para promover el crecimiento de HA. El comportamiento diferente en esta muestra solo podría explicarse por la capacidad más débil y/o más lenta de Fmoc-AA para autoensamblarse.

Para indagar más profundamente en el proceso de biomineralización en estos péptidos, se realizaron experimentos de control en ausencia de fosfato para evitar la mineralización de los péptidos demostrando que el Fmoc-AA no formaba hidrogel y mostraba una morfología globular en las imágenes TEM (Figura III.5b). Si bien Fmoc-AA no pudo autoensamblarse en fibras, por el contrario, Fmoc-FF formó hidrogeles a

través del autoensamblaje de fibras peptídicas similares a las encontradas previamente en hidrogeles híbridos FF-HA (Figura III.5c).

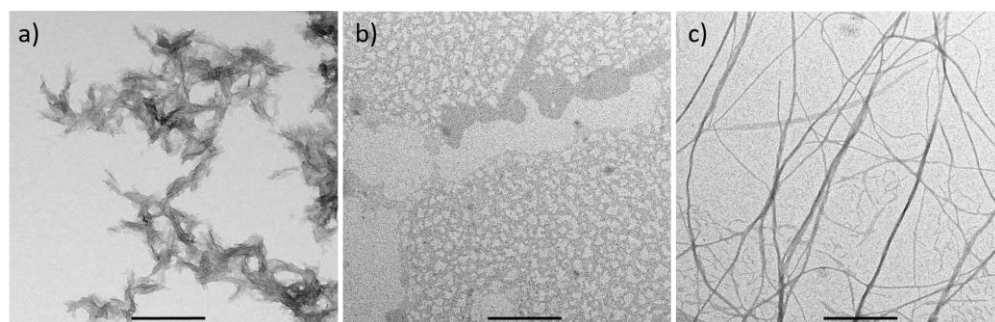


Figura III.5. Imágenes TEM de muestras HA (a), Fmoc-AA (b) y Fmoc FF (c). Barra de escala = 200 nm.

3.1.1. Estudio de la ratio mineral/péptido

Teniendo esto en cuenta, se seleccionó Fmoc-FF para estudiar las propiedades de los hidrogeles híbridos resultantes. Primero, se estudió el impacto de las relaciones de peso inorgánico/orgánico (HA/FF) durante el proceso de mineralización al aumentar las concentraciones de Fmoc-FF: 0.8 mM (HA/FF:80/20), 2.1 mM (HA/FF:60/40), 4.7 mM (HA/FF:40/60) y 12.5 mM (HA/FF:20/80) (ver Tabla III.3 en *Sección Experimental* con la concentración de todos los componentes utilizados para la formación de los hidrogeles híbridos). La muestra 80/20 (la que posee menor concentración de péptido) no formó un gel, sino agregados blancos similares a la muestra HA-AA (Figura III.6 arriba). La imagen TEM de esta muestra mostró nanocristales de HA mientras que no se observaron fibras peptídicas (Figura III.6a). Las muestras 60/40 y 40/60 formaron hidrogeles homogéneos translúcidos, siendo el hidrogel 60/40 aparentemente más opaco (Figura III.6 arriba). En ambos casos, los hidrogeles mostraron una clara sinéresis (perdida de agua) debido a la rigidez y contracción de la parte sólida del hidrogel inducida por el proceso de biomineralización.

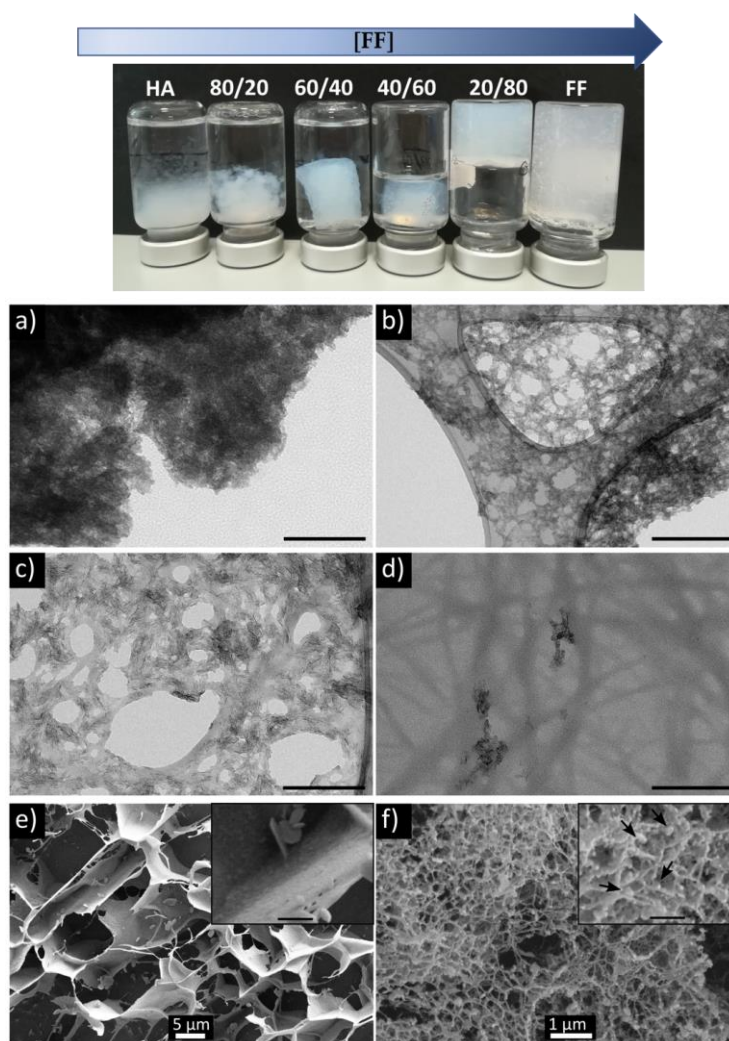


Figura III.6. En la parte superior: imágenes de viales invertidos de hidrogeles híbridos en varias proporciones nominales de peso HA/FF (es decir, 80/20, 60/40, 40/60 y 20/80), hidrogel Fmoc-FF y suspensión de HA. En la parte inferior: imágenes de TEM de hidrogeles híbridos sintetizados en una proporción de peso HA/péptido nominal: (a) 80/20, (b) 60/40, (c) 40/60 y (d) 20/80, barra de escala = 200 nm (e-f) Imágenes crio-SEM de hidrogeles híbridos sintetizados en una relación de peso nominal de 40/60 HA/péptido. Los recuadros muestran imágenes de gran aumento con una barra de escala de 1 μm (e) y 250 nm (f). Las flechas indican la presencia de nanopartículas de apatito.

Se observaron fibras peptídicas ampliamente decoradas con nanocristales de HA en imágenes TEM de ambas muestras (Figura III.6b-c). Como diferencia importante, la muestra 60/40 exhibió áreas locales con mayor acumulación de nanocristales de

HA, lo que sugiere que la mineralización también ocurrió en solución. Por el contrario, la reducción de la fracción mineral (40/60) resultó en la mineralización homogénea de las fibras. De hecho, las fibras peptídicas se identificaron más claramente y los nanocristales de HA (las señales de Ca y P se identificaron mediante XEDS, Figura III.7) se integraron en la matriz orgánica, dando un hidrogel híbrido más homogéneo. Un análisis posterior de este hidrogel por crio-SEM (Figura III.6e-f) reveló superficies rugosas debido a la integración de la fase mineral en la matriz orgánica, como se ha observado previamente en imágenes SEM del péptido mineralizado.^{322,323} Además, la presencia de partículas globulares a lo largo de las fibras peptídicas (zoom de la figura III.6f) parece indicar una distribución homogénea de los nanocristales de apatita en la matriz orgánica. Finalmente, la muestra 20/80 formó un hidrogel rígido compuesto por una malla densa de fibras peptídicas con escasas cantidades de nanocristales de HA unidos a la red peptídica (Figura III.6d).

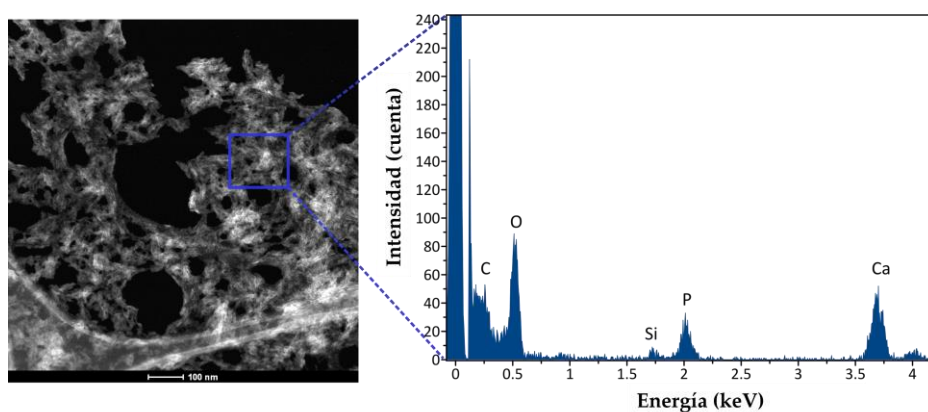


Figura III.7. Imagen HAADF-STEM y espectro de rayos X de dispersión de energía (XEDS) del área seleccionada de hidrogeles híbridos 40/60 nominales.

3.2. Caracterización de los hidrogeles híbridos

Para analizarlas con más detalle, las muestras sintetizadas, se lavaron con agua ultrapura, se secaron por congelación y se caracterizaron por XRD, FTIR y TGA. El patrón XRD de la muestra de control Fmoc-FF (Figura III.8a) reveló la presencia de calcita debido a que esta muestra se preparó a través del mismo protocolo de mineralización, pero sin agregar fosfato, lo que provocó la precipitación de carbonato

de calcio, una sal poco soluble difícil de eliminar mediante el procedimiento de lavado. Los patrones de XRD de muestras de HA, FF-HA y AA-HA mostraron dos picos anchos alrededor de 26° y 32° (2θ) atribuidos a hidroxiapatita poco cristalina. La curva TGA de esta muestra (Figura III.8b) presenta tres pérdidas de peso: alrededor de 200°C , 324°C y 710°C . Las dos primeras pérdidas de peso corresponden a la degradación del péptido Fmoc-FF que desaparece por completo a los 440°C .³²⁴ La pérdida de peso a los 710°C se debe a la descarbonatación de la calcita ($\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CaO}$),³²⁵ quedando un residuo del 17% en peso después de calentar a 900°C . Por otro lado, los patrones XRD de muestras de HA, FF-HA y AA-HA (Figura III.8a) muestran dos picos anchos alrededor de 26° y 32° (2θ) atribuidos a apatito poco cristalino.

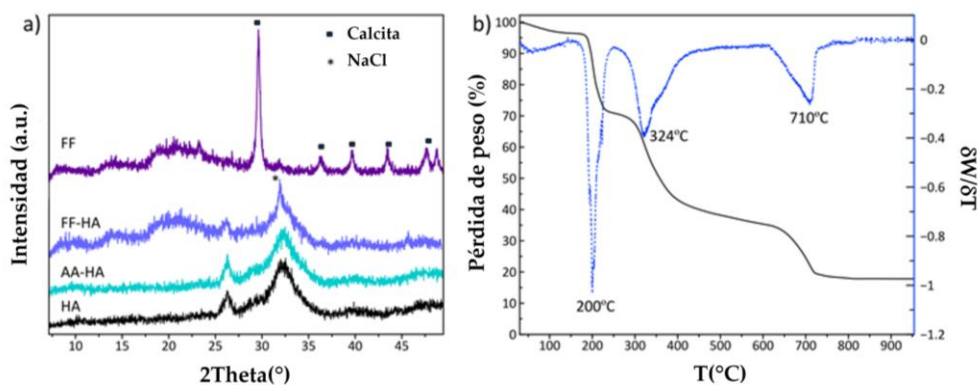


Figura III.8. (a) Patrones XRD de muestras FF, FF-HA, AA-HA y HA. (b) Curva TGA (línea negra) y curva DTG (termogravimetría derivativa, mide la derivada de la masa con respecto al tiempo) (línea azul) del xerogel FF control.

De hecho, los espectros FTIR de HA, AA-HA y FF-HA (Figura III.9a) muestran bandas vibracionales de fosfato típicas de apatita poco cristalina ($\nu_4\text{PO}_4$ a 561 y 602 cm^{-1} y $\nu_3\text{PO}_4$ a 1032 , 1046 y 1087 cm^{-1}), que contienen citrato (ν_{asCOO^-} a 1599 cm^{-1}) y carbonato ($\nu_3\text{CO}_3$ a 1431 y 1491 cm^{-1}).³²¹ Este hallazgo revela que la mineralización biomimética de péptidos aromáticos cortos permite obtener nanopartículas de apatita que imitan la poca cristalinidad y la composición de la apatita ósea, teniendo en cuenta que el carbonato representa del 4 al 6 % en peso de la composición de apatita ósea y el citrato representa el 5,5 % en peso de la materia orgánica del hueso. Por lo

tanto, los péptidos sintéticos mineralizados se proponen como candidatos potenciales para la regeneración ósea debido a sus propiedades osteoconductoras y osteoinductivas.^{322,323}

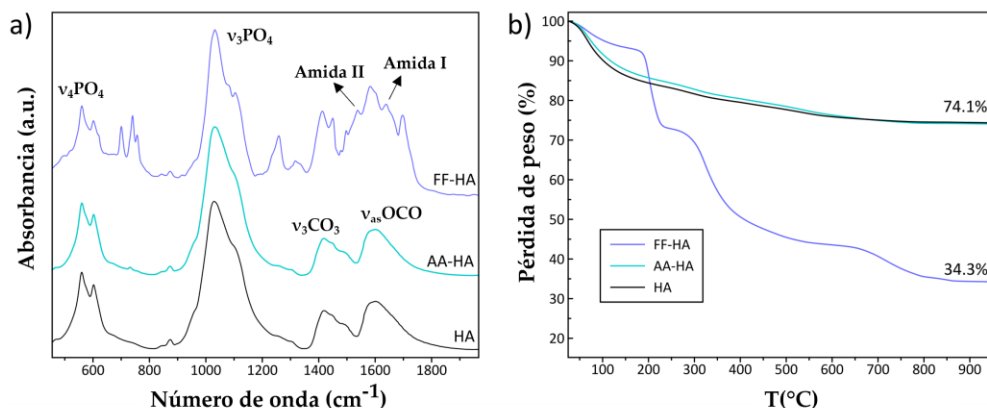


Figura III.9. Espectros FTIR (a) y curvas TGA (b) de muestras FF-HA y AA-HA liofilizadas. Los datos de HA (control) también se muestran para comparar.

El espectro FTIR de FF-HA (Figura IV.9a) también muestra bandas vibratorias de Fmoc-FF como la banda de estiramiento C=O (amida I) a 1651 cm^{-1} y la banda de flexión NH (amida II) a 1534 cm^{-1} .⁹³ La curva TGA de FF-HA (Figura III.9b) confirmó la formación de hidrogel híbrido que contenía 66% en peso de péptido y 34% en peso de fase mineral (es decir, apatita).

Por otro lado, el espectro FTIR de AA-HA (Figura III.9a) reveló la presencia nula del péptido AA, lo que fue confirmado por TGA. La degradación térmica de AA-HA (Figura III.9b) mostró la misma pérdida de peso que la muestra de control (HA), lo que confirma la ausencia de péptido. Estos resultados, además de revelar las débiles fuerzas intermoleculares entre las moléculas de Fmoc-AA y, por tanto, la limitada estabilidad del hidrogel en agua, confirman la escasa interacción química entre el péptido y la fase mineral. Sobre esta base, está claro que los hidrogeles FF-HA mantuvieron una estructura supramolecular híbrida estable incluso después de varios ciclos de lavado. Este efecto podría estar asociado al doble papel de los iones de calcio en la formación del hidrogel híbrido: i) actuando como agente de

entrecruzamiento de fibras peptídicas y ii) actuando como sitios para la nucleación y crecimiento de fosfato de calcio.

3.2.1. Caracterización de los hidrogeles con diferente ratio mineral/péptido

Las muestras estudiadas con diferente ratio fase mineral/fase orgánica se analizaron por FTIR y mostraron bandas vibratorias de fosfato atribuidas a la apatita biomimética y las bandas características de Fmoc-FF. Mientras que las bandas asociadas con la fase orgánica tienden a desaparecer al aumentar la relación ponderal nominal HA/FF, las bandas vibratorias de fosfato se hicieron más prominentes (Figura III.10a). De hecho, el gráfico de barras de la intensidad relativa de $\nu_3\text{PO}_4$ a 565 cm^{-1} aumentó de forma concomitante con el aumento de la relación ponderal HA/FF inicial, lo que revela que se pueden sintetizar materiales híbridos con mayor contenido mineral variando la relación HA/FF. No obstante, un mayor contenido de minerales resultó en hidrogeles heterogéneos que contenían grandes agregados de minerales fuera de las fibrillas (mineralización extrafibrilar, ver Figura III.6). Por tanto, se debe lograr un compromiso entre el contenido mineral y la matriz orgánica para obtener hidrogeles híbridos con una distribución uniforme de nanopartículas de fosfato de calcio. Además, los patrones XRD de los materiales híbridos muestran dos bandas anchas a 26° y 32° (2θ), lo que confirma la formación únicamente de apatito poco cristalino (Figura III.10c).

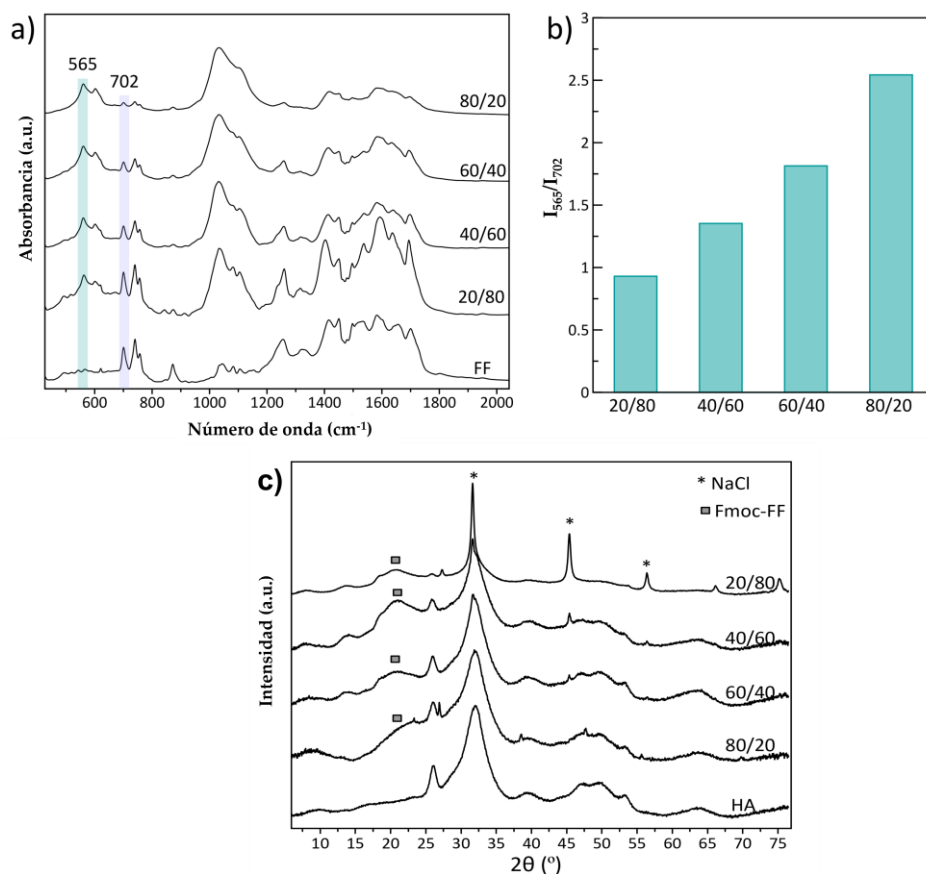


Figura III.10. (a) Espectros FTIR de Fmoc-FF y xerogeles híbridos sintetizados con una relación de peso HA/FF nominal creciente: 20/80, 40/60, 60/40 y 80/20. (b) Histograma de la relación de la intensidad máxima de IR de Fmoc-FF con respecto a HA (I_{565}/I_{702}). (c) Patrones XRD de HA y xerogeles híbridos sintetizados en proporciones nominales de peso HA/FF: 20/80, 40/60, 60/40 y 80/20. Amplios picos 26° y 32° (2θ) se atribuyen a hidroxiapatita pobremente cristalina (HA, ficha ASTM n° 09-432).

Para evaluar el impacto que tenían las correspondientes relaciones en peso HA/FF sobre las propiedades mecánicas de los hidrogeles resultantes, se estudiaron muestras con una relación en peso HA/FF de 60/40, 40/60 y 20/80 mediante reología de cizalla. En estas muestras, las concentraciones iónicas se mantuvieron constantes pero la cantidad de péptido Fmoc-FF varió significativamente de 2,08 mM (relación 60/40) a 4,68 mM (relación 40/60) y 12,47 mM (relación 20/80) (Tabla III.3 *Sección Experimental*). En primer lugar, hay que tener en cuenta que todas las muestras demostraron un comportamiento similar al de un gel, caracterizado por valores del

módulo de almacenamiento (G') mayores en aproximadamente un orden de magnitud que los del módulo de pérdidas (G'') dentro de la LVR, así como tendencias de estos módulos aproximadamente independientes de la frecuencia de oscilación en las pruebas de barrido de frecuencia (Figura III.11). Además, los resultados reológicos demuestran que los geles se volvieron más robustos (valores de G' y G'' más grandes) a medida que aumentaba la concentración de péptido. Este resultado es consistente con el trabajo presentado en el *Capítulo I* de la Tesis Doctoral.

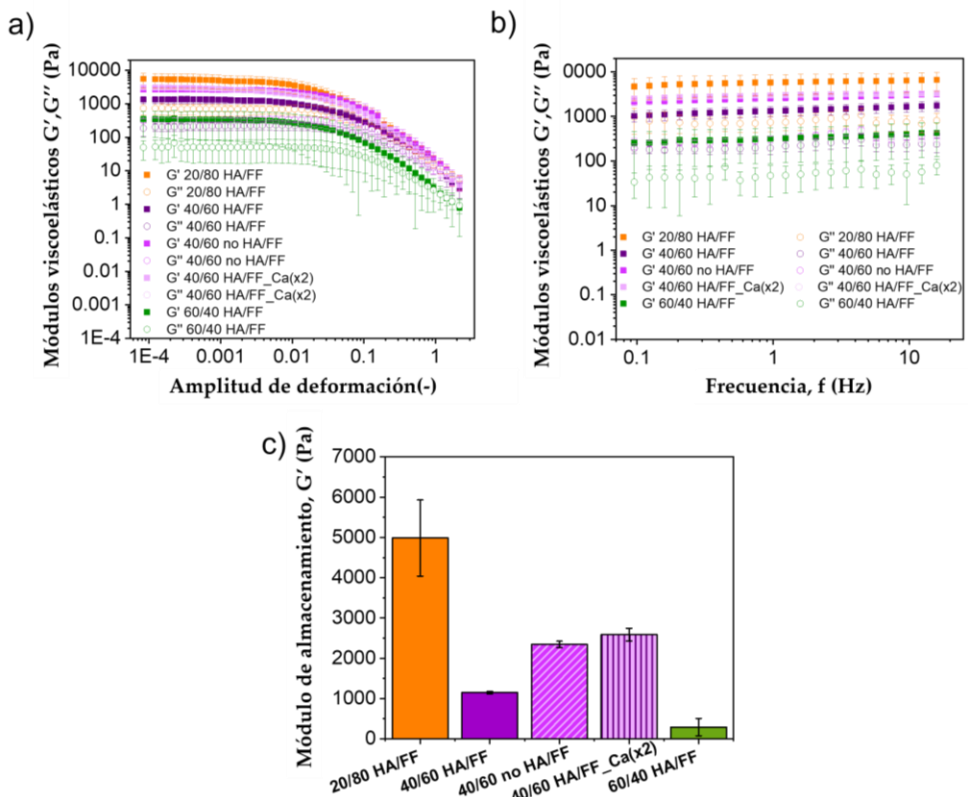


Figura III.11. Caracterización mecánica de hidrogeles híbridos Fmoc-FF en las diferentes relaciones HA/péptido (20/80, 40/60 y 60/40) bajo cizalla oscilatorio. a) Barridos de amplitud: módulos viscoelásticos en función de la amplitud de deformación de cizalla para experimentos bajo deformaciones oscilatorias impuestas de 1 Hz de frecuencia fija. b) Barridos de frecuencia: módulos viscoelásticos en función de la frecuencia de la deformación de cizalla para experimentos bajo deformaciones oscilatorias impuestas de amplitud fija, $\gamma_0 = 10^{-3}$. c) Valores medios y desviaciones estándar de los valores del módulo de almacenamiento correspondientes a la región viscoelástica lineal, obtenidos a partir de experimentos de barridos de amplitud.

Sin embargo, curiosamente, los valores medios de G' correspondientes a LVR (Figura III.11a) difieren en magnitud de los valores que se han reportado en el *Capítulo I* de la Tesis Doctoral (ver *Figura II.15*) para geles Fmoc-FF (que no contienen HA) para una cantidad similar de péptido (Tabla III.1): 4986 Pa para 12.47 mM de Fmoc-FF en el presente trabajo (muestra 20/80) *vs* 4031 Pa para 10 mM de Fmoc-FF en el trabajo anterior; 1146 Pa para 4,68 mM en el presente trabajo frente a 400 Pa para 5 mM en el trabajo anterior; aprox. 291 Pa para 2,08 mM en el presente trabajo frente a 106 Pa para 2,5 mM en el trabajo realizado en el *Capítulo I*.

Tabla III.1. Comparación de los valores de G' correspondientes a la LVR del presente trabajo con los obtenidos en el trabajo del *Capítulo I* para geles Fmoc FF que no contienen HA.

| Concentración de Fmoc-FF (trabajo actual) | Concentración de Fmoc-FF (trabajo anterior) | Relación de concentración de Fmoc-FF (trabajo actual / trabajo anterior) | Relación G' correspondiente a LVR (trabajo actual / trabajo anterior) |
|---|---|--|---|
| 2.08 mM | 2.5 mM | 0.83 | 2.74 ± 0.05 |
| 4.68 mM | 5 mM | 0.94 | 2.88 ± 0.05 |
| 12.47 mM | 10 mM | 1.25 | 1.25 ± 0.05 |

La naturaleza comparativamente más fuerte de los geles del presente trabajo a las dos concentraciones más bajas de Fmoc-FF con respecto al trabajo anterior, debe estar relacionada con un papel no despreciable del HA en las propiedades mecánicas de los geles. Sin embargo, a la concentración más alta de Fmoc-FF, esto no se mantiene (hay que tener en cuenta que en este caso las proporciones de los valores del trabajo actual frente al trabajo anterior son $12,47/10 = 1,25$ para la concentración de péptidos y G' de $4985,828/4030,504 = 1,237$). Por tanto, parece que a la concentración más alta objeto de estudio en el presente trabajo, los efectos combinados de HA y Fmoc-FF no

dieron como resultado un aumento del valor de G' con respecto al gel Fmoc-FF. La razón probable es la competencia del ion fosfato y Fmoc-FF por los iones de calcio en las muestras de Fmoc-FF-HA, lo que limitaría el ensamblaje de péptidos.

Para sustentar esta hipótesis, caracterizamos las propiedades mecánicas de dos muestras más, tomando como base la muestra Fmoc-FF/HA en una proporción 40/60, con la única diferencia de no añadir fosfato en un caso, y duplicar el contenido de iones de calcio en el otro, ambos respecto a la muestra de referencia. Como se observa en la Figura III.11c ambas modificaciones resultaron en un incremento de más del doble en el valor de G' con respecto a la muestra de referencia, apoyando la hipótesis de la competencia entre los péptidos y los iones fosfato por el ion Ca^{2+} .

3.3. Evaluación de la influencia del calcio en la formación del hidrogel

También se evaluó la influencia de la concentración de calcio en el autoensamblaje y la mineralización del péptido. Las imágenes TEM de la muestra que tenía la cantidad más baja de Ca^{2+} (2 mM) mostraron la presencia de la malla típica de fibras peptídicas en la que algunas de las fibras aparecían completamente mineralizadas (Figura III.12).

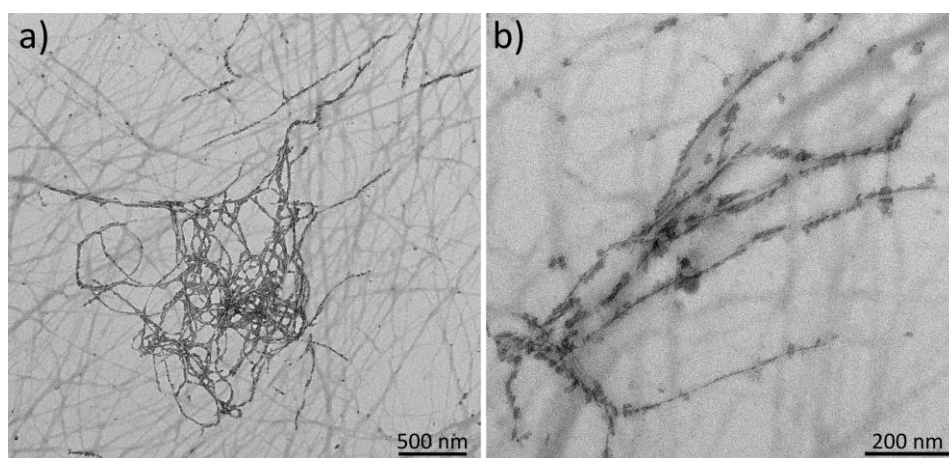


Figura III.12. Imágenes TEM de hidrogeles Fmoc-FF mineralizados con las concentraciones de calcio más bajas (2 mM).

Un profundo análisis de la composición de las fibras se llevó a cabo mediante EDS-STEM (Figura III.13). La imagen HAADF-STEM mostró una fibra peptídica menos brillante y la presencia de elementos relativamente pesados en la fibra peptídica. Los mapas elementales individuales revelan la posición relativa de Ca y P demostrando claramente la formación de nanopartículas de fosfato de calcio dentro de la fibra. Además, el patrón SAED de la misma fibra mineralizada muestra un patrón de difracción con puntos a 002 y 004 en forma de arco que indican que el eje c de los nanocristales de apatita está alineado con el eje longitudinal de la fibra peptídica (Figura III.13). Esta disposición ordenada de los nanocristales de apatita dentro de la fibra es similar a la que se encuentra en las fibrillas de colágeno mineralizado biológico.³¹⁴ Estas observaciones sugieren que la mineralización ocurre dentro de las fibras a una concentración más baja de Ca^{2+} , probablemente debido a la interacción específica de todo el Ca^{2+} disponible con las fibras peptídicas.

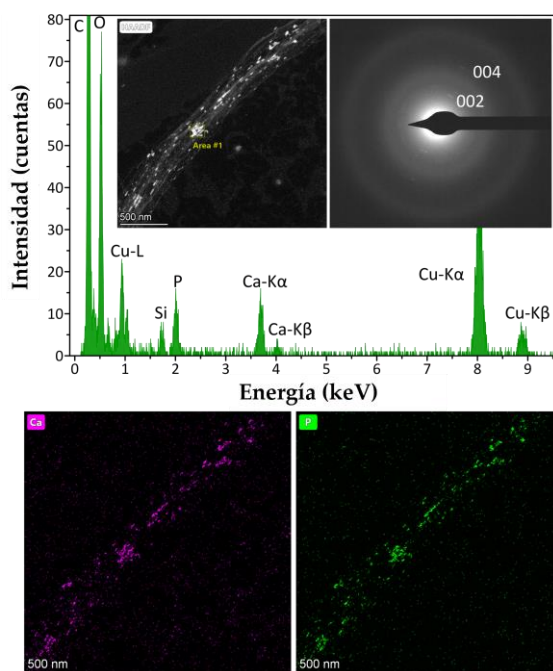


Figura III.13. Micrografía HAADF-STEM, espectro EDS y patrón SAED de una fibrilla mineralizada. También se muestran mapas EDS que muestran la distribución espacial de Ca y P. El eje c (puntos de difracción a 002 y 004) de los nanocristales está orientado específicamente dentro de la fibrilla.

A medida que aumenta la concentración de Ca^{2+} en el medio, los nanocristales de HA pueden crecer fuera de las fibras, como se observa en las muestras que tienen una mayor cantidad de iones Ca^{2+} (Figura III.14).

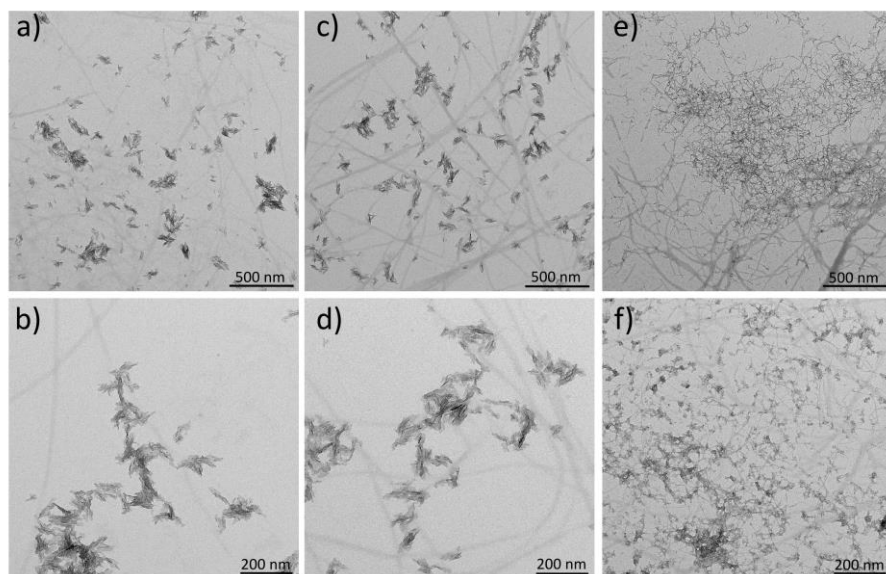


Figura III.14. Imágenes TEM de hidrogeles Fmoc-FF mineralizados a concentraciones crecientes de calcio (mM): 8.3 (a-b), 11.1 (c-d) y 33.3 (e-f).

Para evaluar el impacto que poseen las cantidades crecientes de iones Ca^{2+} en las propiedades mecánicas de los hidrogeles, se midieron muestras con una concentración de Fmoc-FF de 4,7 mM y una concentración creciente de Ca^{2+} de 2 mM, 8,3 mM, 11,11 mM, 16,67 mM y 33,3 mM mediante reología (Figura III.15 a y b). Como se observa, las curvas de los barridos de amplitud y frecuencia demostraron tendencias similares en todos los casos, típicas de las muestras tipo gel (ver la discusión anterior de la Figura III.11), siendo el único efecto relevante de la adición de Ca^{2+} la mejora aproximadamente lineal de G' y G'' con la concentración de este ion (Figura III.15c), siendo los iones Ca^{2+} los responsables del proceso de autoensamblaje y, por tanto, de la formación del hidrogel.

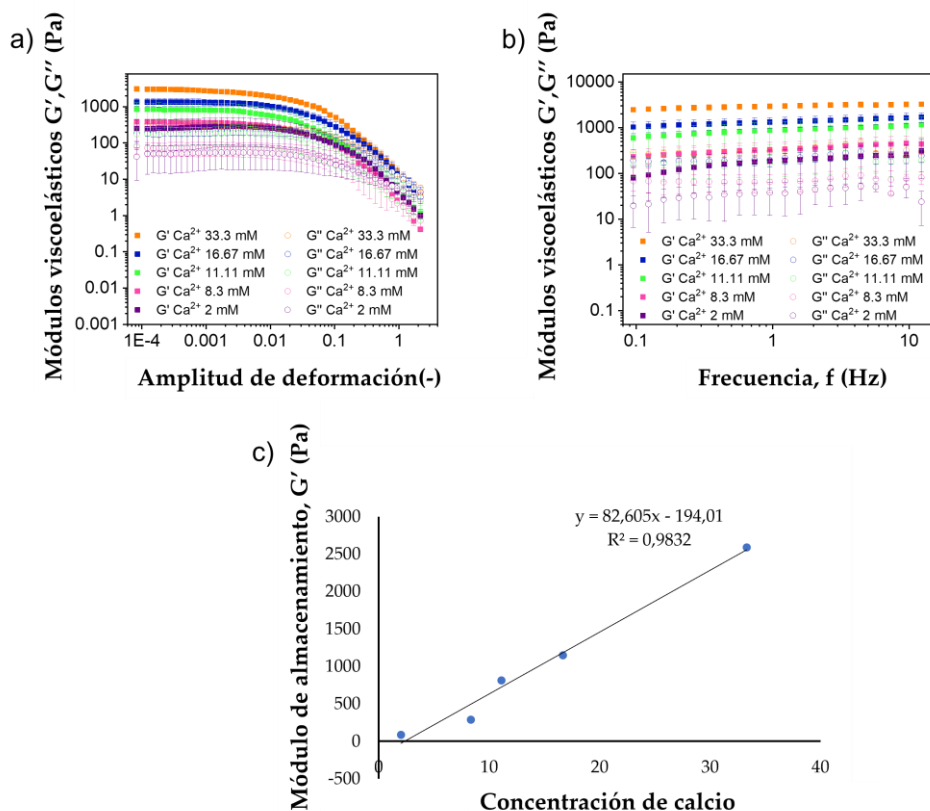


Figura III.15. Propiedades mecánicas de hidrogeles híbridos con diferentes concentraciones de Ca^{2+} (2 mM, 8,3 mM, 11,11 mM, 16,67 mM y 33,3 mM). a) Módulos viscoelásticos en función de la amplitud de la deformación de cizalla para experimentos bajo deformaciones oscilatorias de 1 Hz de frecuencia fija. b) Módulos viscoelásticos en función de la frecuencia de deformación de cizalla para experimentos bajo deformaciones oscilatorias de amplitud fija, $\gamma_0 = 10^{-3}$; c) Ajuste lineal de la concentración de Ca^{2+} frente al módulo de almacenamiento.

4. CONCLUSIONS

In this chapter:

- We have developed a simple synthetic protocol in which the formation of the organic matrix and nanoapatite occur simultaneously.

- We have shown that the amount of Ca^{2+} present in the media is essential to obtain a fully composite material in which, nanoapatite crystals are embedded, perfectly oriented, in the organic matrix, as occurring during collagen mineralization in bone.
- By studying the microstructural and mechanical properties of the resulting hybrid hydrogels we have demonstrated that peptide self-assembly and mineral growth compete for the Ca^{2+} ions present in the media. This effect has implication in the micro and macroscopic properties of the hybrid hydrogels and in the final fiber composition.
- Competition for Ca^{2+} ions in the organic matrix modulates crystal growth in a more precise way, emulating the natural process. This protocol demonstrates some of the properties that self-assembled systems can have in the development of complex materials and shed light about how nature uses them to exert a more precise control in biomineralization processes.

5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.1. Reactivos y materiales

Cloruro de calcio dihidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, reactivo ACS, $\geq 99\%$), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4 , BioXtra, $\geq 99\%$), citrato de sodio dihidrato ($\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99\%$) y carbonato de sodio (Na_2CO_3 , BioXtra, $\geq 99\%$) se adquirieron de Sigma Aldrich. Todas las soluciones se prepararon con agua ultrapura ($0,22 \mu\text{S}$, 25°C , Milli-Q, Millipore). Fmoc-FF y Fmoc-AA se adquirieron de Bachem Co., Suiza y se usaron sin purificación adicional.

5.2. Mineralización de péptidos aromáticos cortos

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un vial de 10 mL. Se pesaron 1,27 g de solución de péptido (20 mM, pH = 10,2, ajustado con NaOH) en un vial de 10 ml. Luego, se agregó 420 μ L de solución de Na_2HPO_4 (120 mM), 420 μ L de solución de Na_3Cit (100 mM) y 420 μ L de solución de Na_2CO_3 (100 mM) y se mezcló vigorosamente con vortex. El pH de la solución fue de 10,4. Finalmente, se agregaron 420 μ L de solución de CaCl_2 (200 mM) para desencadenar el autoensamblaje y la mineralización simultánea del péptido. La precipitación de fosfato de calcio provocó una ligera disminución del pH (pH = 9). Las concentraciones molares finales del péptido y de las soluciones mineralizantes se resumen en la Tabla IV.2. La relación molar Ca/P fue de 1,67, correspondiente al valor estequiométrico de la hidroxiapatita. Luego, la mezcla se mantuvo a 37 °C sin perturbaciones, lo que condujo a la formación de hidrogeles híbridos. Después de 24 horas, los hidrogeles mineralizados se lavaron repetidamente con agua ultrapura por centrifugación (7500 rpm, 3 min) y se liofilizaron durante la noche a vacío (liofilizador Telstar Cryodos). La cristalización de HA también se llevó a cabo en ausencia de péptidos como control. Los geles Fmoc-FF y Fmoc-AA no mineralizados se prepararon mediante el mismo procedimiento sin la adición de solución de fosfato para evitar la cristalización de HA.

Tabla III.2. Concentraciones molares finales de reactivos (mM) para cada experimento. Fmoc-FF y Fmoc-AA se denominan FF y AA, respectivamente.

| Muestra | Péptido | Na_2HPO_4 | Na_2CO_3 | Na_3Cit | CaCl_2 |
|---------|---------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|
| AA-HA | 4.7 | 10 | 8.33 | 8.33 | 16.67 |
| FF-HA | 4.7 | 10 | 8.33 | 8.33 | 16.67 |
| HA | - | 10 | 8.33 | 8.33 | 16.67 |
| AA | 4.7 | - | 8.33 | 8.33 | 16.67 |
| FF | 4.7 | - | 8.33 | 8.33 | 16.67 |

Los hidrogeles Fmoc-FF fueron seleccionados para estudios adicionales. Los materiales híbridos se prepararon aumentando la relación de peso mineral/orgánico nominal manteniendo constante la concentración de soluciones mineralizantes y

variando la concentración de péptido. También se prepararon hidrogeles híbridos Fmoc-FF en presencia de concentraciones crecientes de iones de calcio (Tabla IV.3).

Tabla III.3. Concentraciones molares finales de reactivos (mM) para la preparación de hidrogeles híbridos Fmoc-FF.

| Muestra | Fmoc-FF | Na ₂ HPO ₄ | Na ₂ CO ₃ | Na ₃ Cit | CaCl ₂ |
|---------|---------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------|-------------------|
| 80/20 | 0.8 | 10 | 8.33 | 8.33 | 16.67 |
| 60/40 | 2.1 | 10 | 8.33 | 8.33 | 16.67 |
| 40/60 | 4.7 | 10 | 8.33 | 8.33 | 16.67 |
| 20/80 | 12.5 | 10 | 8.33 | 8.33 | 16.67 |
| Ca1 | 4.7 | 10 | 8.33 | 8.33 | 2 |
| Ca2 | 4.7 | 10 | 8.33 | 8.33 | 8.3 |
| Ca3 | 4.7 | 10 | 8.33 | 8.33 | 11.11 |
| Ca4 | 4.7 | 10 | 8.33 | 8.33 | 16.67 |
| Ca5 | 4.7 | 10 | 8.33 | 8.33 | 33.3 |

*40/60 y Ca4 son los mismos experimentos, correspondientes a la relación molar Ca/P de 1,67, valor estequiométrico de hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂).

5.3. Caracterización de los materiales híbridos

La formación del gel se evaluó visualmente mediante el método del vial invertido, además de utilizar diferentes técnicas que se describen a continuación.

5.3.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes se realizaron con un instrumento LIBRA 120 PLUS, operando a 120 kV. Se depositó una pequeña porción de hidrogel sintetizado en rejillas de cobre convencionales y se incubó durante varios minutos. Luego, las rejillas se lavaron con

agua ultrapura seis veces (gotas de 30 μL) y se dejaron secar al aire en condiciones ambientales. Las muestras de TEM no se tiñeron (ni con osmio ni con acetato de uranilo) ya que los nanocristales de apatita y los precipitados de tinción a veces son indistinguibles entre sí.

5.3.2. Microscopía electrónica de transmisión de barrido de campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF-STEM).

Se adquirieron imágenes de espectros de rayos X de dispersión de energía (XEDS) y difracción de electrones de área seleccionada (SAED) de diferentes áreas de la muestra FF-HA con STEM FEI Microscopio TALOS F200X equipado con 4 Super-X SDD (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA).

5.3.3. Microscopía electrónica de barrido criogénico (crio-SEM)

Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio ESEM Quanta 650 FEG (Thermofiser-FEI) equipado con un sistema criogénico (Quorum Technologies, modelo PP3010T). El hidrogel se sublimó a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 min, luego la muestra se insertó en un recipiente enfriado con nitrógeno ($-210\text{ }^{\circ}\text{C}$) y finalmente se transfirió en vacío a un recipiente enfriado ($-140\text{ }^{\circ}\text{C}$).

5.3.4. Difracción de rayos X en polvo (P-XRD)

Los datos se recopilaron en un difractómetro Bruker D8 Discover usando radiación $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.5406\text{ \AA}$) y detector PILATUS3R 100K-A. Los datos se recolectaron de 5° a 50° (2θ) con una velocidad de escaneo de 3 s paso^{-1} , tamaño de paso de 0.02° y un grupo electrógeno HV a 50 kV y 1 mA. Estas medidas han sido realizadas en colaboración con el Dr. Jose M. Delgado-López y Gloria B. Ramírez Rodríguez del departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias (UGR).

5.3.5. Espectros de infrarrojos por transformada de fourier (FTIR) de xerogeles

Los espectros se registraron en un espectrómetro Tensor 27 (Bruker, Karlsruhe, Alemania). Se mezclaron 2 mg de muestra con 200 mg de bromuro de potasio anhidro (KBr) y se prensaron a 5 toneladas en un disco de 12 mm de diámetro usando una prensa hidráulica (Specac). Se usó un disco de KBr puro como blanco. Los espectros infrarrojos se registraron por acumulación de 25 escaneos que abarcan desde 400 cm^{-1} hasta 4000 cm^{-1} a una resolución de 3 cm^{-1} .

5.3.6. Termogravimetría (TGA) de los xerogeles

El análisis se realizó en una balanza térmica Mettler-Toledo TGA/DSC1 (Mettler-Toledo International Inc., Suiza) con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min hasta 900 °C bajo corriente de nitrógeno.

5.3.7. Reología

Las mediciones se realizaron utilizando un reómetro de esfuerzo controlado Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a una temperatura constante de $37 \pm 0,1\text{ °C}$ y con una geometría placa-placa de 35 mm de diámetro (sensor P35 Ti L S dentado). Después de completar el período de gelificación de 24 h, se realizaron rampas de deformaciones oscilatorias de amplitud creciente y frecuencia constante (1 Hz), de las que se obtuvieron los valores de los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') en función de la amplitud de deformación, γ_0 . A partir de estas curvas de G' y G'' en función de γ_0 (barridos de amplitud) se delimitó la extensión de la LVR. Luego, sometimos las muestras a rampas de amplitud de deformación de cizalla fija ($\gamma_0 = 0,0002$), dentro de la LVR, y aumentando la frecuencia en el rango de 0,1 a 15 Hz (barridos de frecuencia). Para cada conjunto de condiciones

experimentales, se midieron al menos 3 muestras diferentes. En este trabajo se proporcionan los valores medios y las desviaciones estándar de cada magnitud

CAPÍTULO IV

Xerogeles híbridos de péptidos aromáticos cortos como filtros de spin inducidos por la quiralidad

RESUMEN

Como se comentó en la *Introducción General*, los materiales basados en carbono encuentran una multitud de aplicaciones en campos como la electrónica, optoelectrónica y termoelectrónica. La funcionalización molecular de los CNT es un procedimiento de rutina en el campo de la nanotecnología. Sin embargo, se desconoce en gran medida si estas moléculas afectan la polarización de espín de los portadores de carga en los CNT.

En este capítulo se ha utilizado un hidrogel híbrido de Fmoc-dipéptidos con nanotubos de carbono para demostrar que la polarización de espín puede inducirse en redes de nanotubos de carbono bidimensionales (2D) por péptidos aromáticos y que la señal de espín sobrevive rutinariamente a escalas de longitud que superan significativamente 1 μm . Este resultado conecta efectivamente el área de la espintrónica molecular con la de nanoelectrónica 2D basada en carbono. Además, gracias a la versatilidad de la química de los péptidos, se ha demostrado que la polarización de espín depende de características estructurales moleculares como la quiralidad y las interacciones entre moléculas y nanotubos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Espintrónica molecular

El área de la espintrónica molecular explora el transporte de espín en sistemas moleculares orgánicos que podrían ser útiles para el procesamiento de información cuántica y otras aplicaciones.³²⁶ Los desarrollos recientes en este campo han desentrañado una conexión intrigante entre la quiralidad molecular orgánica y la polarización del espín portador, denominada "selectividad de espín inducida por quiralidad" o CISS (*Chiral-Induced Spin Selectivity Effect*).

1.1.1. Efecto CISS y su estudio

El **efecto CISS** se refiere a la capacidad de las moléculas orgánicas quirales para transferir electrones con una orientación de espín preferencial sobre la otra, por lo que la quiralidad es un requisito indispensable para que una molécula actúe como un filtro de espín basado en el efecto CISS (Figura IV.1).

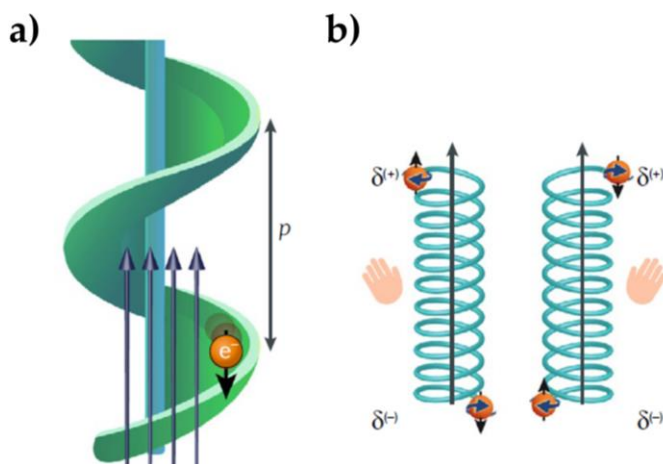


Figura IV.1. Descripción esquemática de a) la transmisión de electrones a través de un potencial quiral y b) de la polarización de carga y espín en moléculas quirales, cuando las moléculas están expuestas a un campo eléctrico que actúa a lo largo de sus ejes (flechas negras). Imagen adaptada de la ref³²⁷ con permiso de Nature Reviews Chemistry.

Cuando un electrón se mueve a través del compuesto quiral en una dirección, dicho movimiento de carga genera un campo magnético cuyo sentido depende de la quiralidad de la molécula en cuestión. Ese campo inducido es capaz de interactuar con el propio espín del electrón implicado en el transporte, de forma que si su espín tiene el mismo sentido que el campo magnético inducido, su transporte se ve favorecido, mientras que si tiene sentido opuesto, la interacción con el campo dificulta su movimiento.³²⁷⁻³²⁹

Así, en un campo eléctrico, el espín de los electrones se orienta arbitrariamente sin que su orientación influya en la corriente eléctrica generando una "corriente electrónica no polarizada" (NPEC, *Non-Polarized Electronic Current*), pero cuando en el sistema se produce una magnetización, un espín será preferente respecto al otro en función de su interacción con el campo magnético inducido, produciendo así el filtrado de espín. El campo eléctrico estará constituido por una "corriente de electrones polarizada por espín" (SPEC, *Spin-Polarized Electron Current*).³²⁷ (Figura IV.2).³³⁰

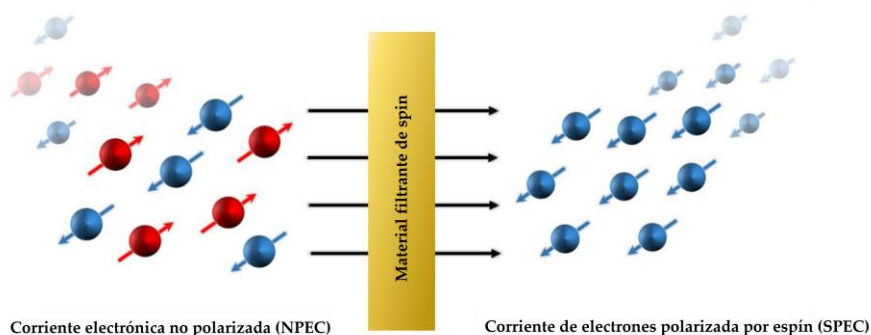


Figura IV.2. Ilustración esquemática de la generación de una corriente electrónica polarizada por espín. Imagen adaptada de la ref³³¹ con permiso de ACS Publications.

Por tanto, el estudio del efecto CISS en moléculas orgánicas quirales, tiene como objetivo observar un cambio en la medida del transporte de electrones a través de la molécula en función de la quiralidad de las mismas. Para ello, una posibilidad es utilizar la magnetorresistencia (MR) en nanodispositivos electrónicos de dos

terminales, donde la capa quiral entra en contacto entre un electrodo magnético (como Ni) y uno no magnético (como Au) (Figura IV.3).³²⁸ El electrodo magnético sirve como fuente o sumidero de electrones polarizados de spin. De esta forma, en estos sistemas el efecto CISS se puede medir como un cambio en la resistencia eléctrica tras la inversión de la magnetización.³³² La resistencia del dispositivo (R) se mide para dos magnetizaciones opuestas ($\pm \hat{m}$) de Ni, y si se produce el efecto CISS, se observan valores de resistencias diferentes. El resultado se representa como $[R(-\hat{m}) - R(+\hat{m})] / \min [R(\pm \hat{m})] = \Delta$, donde la inversión de \hat{m} cambia la magnetización local, lo que da como resultado diferentes conductancias para $\pm \hat{m}$. Físicamente, la propagación de los portadores de carga en los sistemas quirales genera una polarización de espín dependiente de la quiralidad, que se transmite según la dirección de \hat{m} , lo que da lugar a un Δ distinto de cero.

En este contexto, Naaman y colaboradores desarrollaron un trabajo pionero, en el que demostraron que las uniones a nanoescala formadas al atrapar pocas moléculas de ADN entre una nanopartícula de Au y una superficie ferromagnética de Ni presentaban asimetrías de corriente en función de la dirección de la polarización magnética de Ni.³³³ Desde entonces, se han estudiado otros ejemplos, principalmente basados en secuencias de ADN,³³³ oligopéptidos,³³⁴ helicenos,³³⁵ polímeros,³³⁶ estructuras organometálicas,³³¹ cristales,³³⁷ nanofibras supramoleculares,³³⁸ etc.

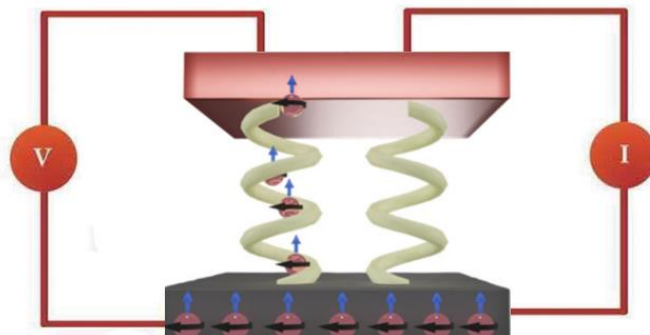


Figura IV.3. Esquema representativo del dispositivo usado para medir efecto CISS (el contacto de Au está representado en gris oscuro, y el de Ni ferromagnético delgado está representado en rojo. Imagen adaptada de la ref³³⁹ con permiso de Journal of Physics: Condensed Matter.

1.1.2. Material quiral con efecto CISS: nanotubos de carbono funcionalizados con péptidos aromáticos cortos

Aunque las moléculas orgánicas ofrecen la posibilidad de modificar su estructura química de forma prácticamente ilimitada, se comportan como aislantes en términos de sus propiedades electrónicas de largo alcance, lo que dificulta su integración directa con la electrónica convencional o la nanoelectrónica bidimensional (2D) emergente.^{340,341} Esto puede remediarse potencialmente utilizando nanotubos de carbono (CNT), que son más conductivos que las moléculas orgánicas, y podrían proporcionar una plataforma útil para dispositivos prácticos de espintrónica.

El transporte de espín en CNT se ha explorado debido a su posible aplicación en la tecnología de la información.^{342,343} Además, la funcionalización orgánica de CNT es una técnica común para diversas aplicaciones en nanotecnología.^{131,136,344-346} Una amplia gama de moléculas orgánicas puede formar una unión no covalente eficiente con CNT en agua a través de interacciones hidrófobas.^{344,347,348} Un ejemplo de ellos, sería la medida del efecto CISS en CNT aislados funcionalizados con ADN helicoidal monocatenario,³⁴⁹⁻³⁵⁴ pero se desconoce si este efecto persiste en una red de nanotubos 2D funcionalizada con moléculas quirales.

Los geles supramoleculares peptídicos son buenos candidatos para dispersar CNT y formar un hidrogel híbrido. En particular, los péptidos que poseen grupos Fmoc (estructura aromática, plana y aquiral), permiten unirse de manera eficiente con los CNT.^{324,348,355} Esto ocurre principalmente a través de interacciones de apilamiento π entre los grupos aromáticos de los aminoácidos formando una red tridimensional. Las interacciones hidrófobas adicionales provienen de las cadenas principales de aminoácidos. Además, se ha comprobado que el diámetro medio de los nanotubos es de $\sim 0,84$ nm, y poseen una circunferencia nominal de $\sim 2,64$ nm, mientras que las moléculas de dipéptido de Fmoc tienen aproximadamente ~ 2 nm de longitud.²⁴¹ Así, la pared de los nanotubos puede acomodar tanto al Fmoc como a su cadena lateral. Por todo lo comentado anteriormente, se han elegido los dipéptidos Fmoc como entidades de funcionalización adecuadas para este estudio.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Combinando las ventajas de los péptidos con las ventajas que ofrecen los CNT, podemos obtener nuevos materiales híbridos con excelentes propiedades dentro del campo de la espintrónica. Además, la capacidad de inducir polarización de espín en una red 2D de CNT aportará interesantes funcionalidades a innumerables dispositivos en espintrónica. Por ese motivo, se pretende estudiar y comprobar si una red en 2D constituida por un xerogel híbrido que contiene CNT y Fmoc-dipeptidos dispersos de manera aleatoria es capaz de actuar como un filtro de espín dependiente de la quiralidad.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Sintetizar de manera eficiente hidrogeles híbridos de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs) con diferentes Fmoc-dipéptidos de quiralidad opuesta y aquirales.
2. Estudiar el efecto CISS en xerogeles híbridos (CNT + Fmoc-dipéptidos) obtenidos a partir del secado de los correspondiente hidrogeles y comprobar que este valor es reproducible y verosímil.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Formación de los hidrogeles híbridos

Para la formación de los hidrogeles híbridos de SWCNTs se ha utilizado Fmoc-FF (L y D), Fmoc-AA (L y D) y Fmoc-GG. Se eligieron aminoácidos con cadenas laterales y quiralidad idénticas (es decir, $R_1 = R_2$, LL o DD) para facilitar la comparación entre diferentes conjuntos de datos. Fmoc-GG ($R_1 = R_2 = H$) es aquiral, mientras que Fmoc-AA ($R_1 = R_2 = -CH_3$) o Fmoc-FF ($R_1 = R_2 = -CH_2Ph$) es quiral y, por lo tanto, el efecto de filtrado de espín se puede estudiar en ambos enantiómeros

usando L- y D-aminoácidos (Figura IV.4a). La formación de los hidrogeles híbridos se describe en detalle en la *Sección Experimental* utilizando un protocolo modificado previamente descrito por nuestro grupo.³²⁴ Brevemente, se preparó una suspensión de SWCNT en una solución básica acuosa de Fmoc-dipéptido, seguido de sonicación y centrifugación. En este caso, la gelificación se llevó a cabo usando Na_2CO_3 (Figura IV.4b) en lugar de usar δ -gluconolactona para evitar moléculas quirales adicionales en el medio.^{230,232,237}

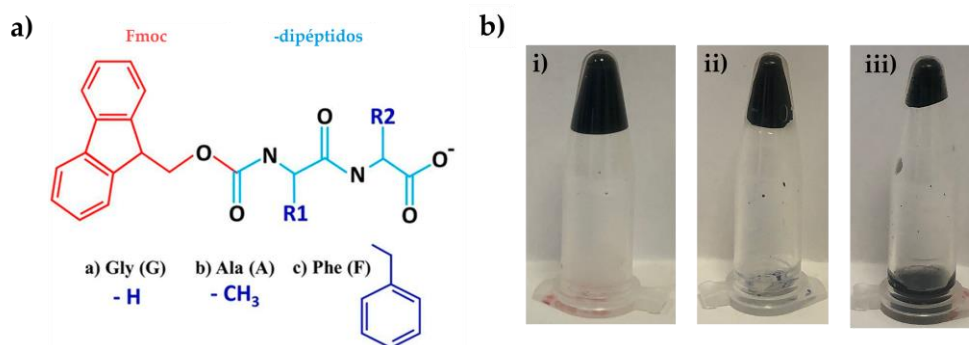


Figura IV.4. a) Estructura molecular de los dipéptidos Fmoc y los grupos laterales elegidos. b) Imágenes de los hidrogeles formados en un Eppendorf en presencia de carbonato de sodio i) con Fmoc-FF (L) + SWCNT (0,7 mg/mL); ii) con Fmoc-AA (L) + SWCNT (0,7 mg/mL) (después de la gelificación se observó una reducción en el tamaño del hidrogel). Con los aminoácidos D, el resultado es el mismo; iii) y con Fmoc-GG + SWCNT (0,7 mg/mL) (con Fmoc-GG se formó un gel inconsistente).

3.2. Análisis Raman

Con el objetivo de estudiar la capacidad que poseen las moléculas de Fmoc-dipéptidos para interactuar con los CNT, se caracterizaron los xerogeles de los hidrogeles híbridos mediante espectroscopía Raman (Figura IV.5). Se observó que la intensidad del pico G^- ($\sim 1540\text{ cm}^{-1}$, que surge debido a la vibración transversal de los átomos de carbono), se suprimió como resultado de la funcionalización (Figura IV.5a). Las moléculas de FF (tanto L como D) fueron más efectivas suprimiendo este pico, mientras que el efecto fue más débil para GG y AA ($\text{GG} < \text{AA} < \text{FF}$). Esta tendencia se resume en la Figura IV.5b, que muestra la relación de intensidad G^-/G^+ para cada

funcionalización. Dado que los picos G^+ y G^- representan vibraciones longitudinales y transversales de la red de grafito hexagonal de CNT respectivamente, se espera que la funcionalización suprima la vibración transversal y, por lo tanto, suprima el pico G^- , lo que da como resultado una G^-/G^+ más baja. A parte de la relación de intensidad, otros picos característicos como RBM (*Radial Breathing Mode*, $\sim 250\text{--}300\text{ cm}^{-1}$), y G^+ ($\sim 1590\text{ cm}^{-1}$), se desplazaron como resultado de la funcionalización (Figura IV.5a), lo que indica una transferencia de carga entre las moléculas y los nanotubos^{324,356} (Figura IV.5c y d).

Estos datos permiten concluir que Fmoc-FF está interactuando más fuertemente con los CNT que Fmoc-AA y Fmoc-GG. Entre las interacciones hidrofóbicas que unen los Fmoc-dipéptidos y los CNT, las interacciones de apilamiento π entre los grupos aromáticos de los aminoácidos y los CNT muestran valores más altos de energía de interacción.³⁴⁸ Las interacciones hidrófobas adicionales provienen de la cadena principal de aminoácidos, y la cadena principal de Fmoc-AA, más hidrófoba que la de Fmoc-GG, muestra interacciones más fuertes. Se puede observar además, la aparición de un pequeño pico D a $\sim 1320\text{ cm}^{-1}$ después de la funcionalización, y se debe a los extremos rotos de los tubos dispersos (defectos).

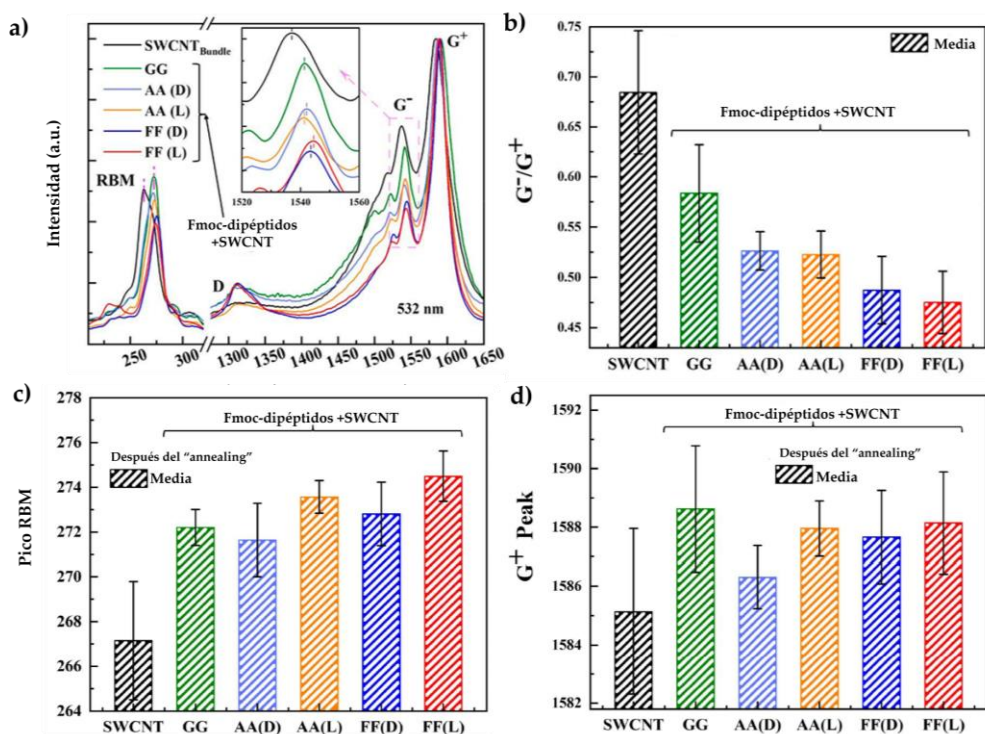


Figura IV.5. a y b) Caracterización Raman de los nanotubos funcionalizados. c y d) Posiciones del pico RBM y del pico G⁺ en función de la funcionalización molecular. Se ha observado un cambio significativo en comparación con los SWCNT desnudos, como resultado de la funcionalización.

3.3. Estudio de I-V de los CNT funcionalizados con Fmoc-dipéptidos.

En primer lugar, se estudió las características de corriente-voltaje (I-V) de las muestras de CNT funcionalizados con los diferentes Fmoc-dipéptidos en función de la temperatura y a campo magnético cero (Figura IV.7) utilizando un dispositivo de dos terminales (ver *Sección Experimental* para más información sobre el dispositivo utilizado). Se observa un comportamiento semiconductor típico a bajas temperaturas que en algunos casos cambia a un comportamiento metálico débil a altas temperaturas. Es un efecto común en redes 2D de SWCNT y ha sido reportado por varios grupos en el pasado.^{133–135,349,352,357} Esto es debido a que el transporte de electrones en los CNT se considera metálico, interrumpido por “hopping” o

“tunneling” a través de pequeñas barreras eléctricas que surgen de la funcionalización molecular, regiones enredadas, uniones entre tubos o defectos de los CNT.¹³³

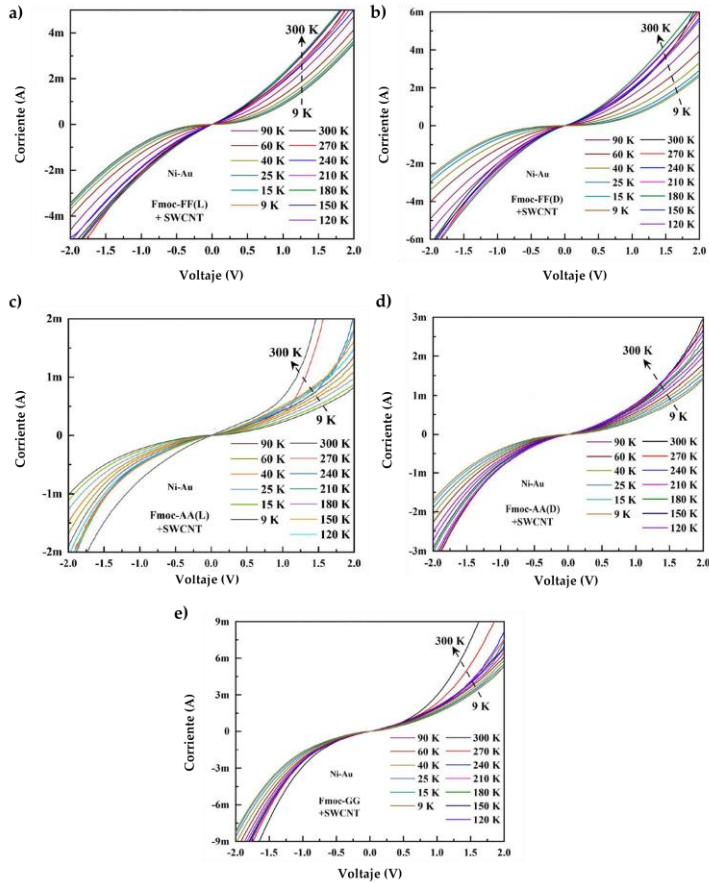


Figura IV.7. Características de corriente-voltaje (I-V) (a campo magnético cero) de (a) Fmoc-FF (L), (b) Fmoc-FF (D), (c) Fmoc-AA (L), (d) Fmoc-AA (D) y (e) Fmoc-GG funcionalizados con SWCNT con contactos Ni-Au.

Analizando los datos obtenidos de las gráficas de I-V anteriores, se representó la relación entre las resistencias a baja y alta temperaturas $R(9\text{ K})/R(300\text{ K})$ para las diferentes funcionalizaciones (Figura IV.8). Así, con Fmoc-FF se obtuvo una relación de ~ 10 , para Fmoc-GG la relación fue más pequeña de ~ 2 , mientras que para las muestras de Fmoc AA el valor fue medio. Esto es consistente con la tendencia de $GG < AA < FF$ observada anteriormente en los datos Raman. Debido a la fuerte interacción con los CNT, las muestras funcionalizadas con Fmoc-FF parecen suprimir la

conducción metálica en los tubos y contribuir con barreras potenciales adicionales, lo que hace que la conducción esté fuertemente activada térmicamente.

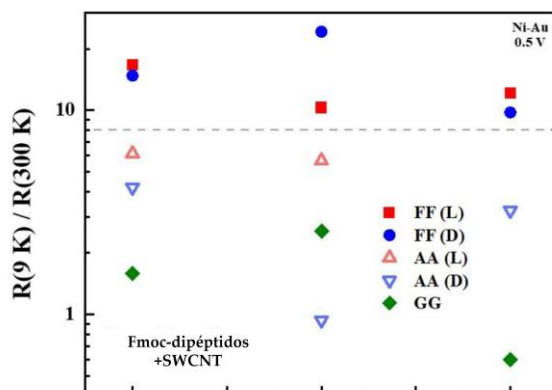


Figura IV.8. Distribución de valores $R(9K) / R(300K)$ medidos a campo magnético cero para diferentes funcionalizaciones.

3.4. Estudios de magnetorresistencia de los hidrogeles híbridos

Las mediciones de la magnetorresistencia (MR) con campo magnético (± 12 kG) y a distintas temperaturas (9, 12, 13, 15 K) se llevaron a cabo en las muestras de Fmoc-FF (L y D) y los datos obtenidos se recogen en la Figura IV.9a-d. Se emplearon magnetizaciones opuestas ($\pm m'$), que cambiaron la magnetización local (m') lo que dio como resultado diferentes conductancias para $\pm m'$. Al aplicar un campo magnético, se observó una MR negativa de base, que es un efecto común en redes de CNT^{134,135,349,354,357} y se origina por la dependencia del campo magnético a conductividades "hopping" en estas muestras.^{134,135,354,358,359} Se observó un Δ ($= R(-12 \text{ kG}) - R(+12 \text{ kG}) / \min [R(\pm 12 \text{ kG})]$) distinto de cero para cada funcionalización. Por tanto, la existencia de Δ en ambos enantiómeros se debe a la quiralidad de la muestra, pero no implica necesariamente que se está produciendo el efecto CISS. Sin embargo, sí es importante destacar el comportamiento opuesto de las medidas de magnetorresistencia entre ambos enantiómeros: para las muestras de Fmoc-FF (L), Δ es negativo, mientras que para las muestras Fmoc-FF (D), Δ es positivo. Esto sí demuestra inequívocamente que se observa efecto CISS en redes 2D CNT gracias a su

funcionalización con Fmoc-FF. Conforme aumenta la temperatura, se puede apreciar una disminución de esa diferencia entre ambos enantiómeros, hasta la obtención de curvas de magnetorresistencia iguales a 30K. Esto puede explicarse debido al aumento de movimiento, y por tanto choques, entre los electrones implicados. De esta forma al impactar mas unos con otros, los electrones pierden la polarización de espín inducida y por ellos no se observa Δ , ni diferencia alguna entre ambos enantiómeros. Esto es debido a que Δ depende tanto de la magnetización del Ni (m^{\prime}) como de la quiralidad, lo que es consistente con un modelo teórico reciente.³⁶⁰

Por último, se observó que este efecto es de "largo alcance", es decir, sobrevive a la longitud del canal de $\sim 2 \mu\text{m}$, incluso en presencia de un desorden de nanotubos significativo. Además, la señal de MR es del mismo rango que las obtenidas a partir de moléculas quirales ordenadas en condiciones comparables.³²⁸

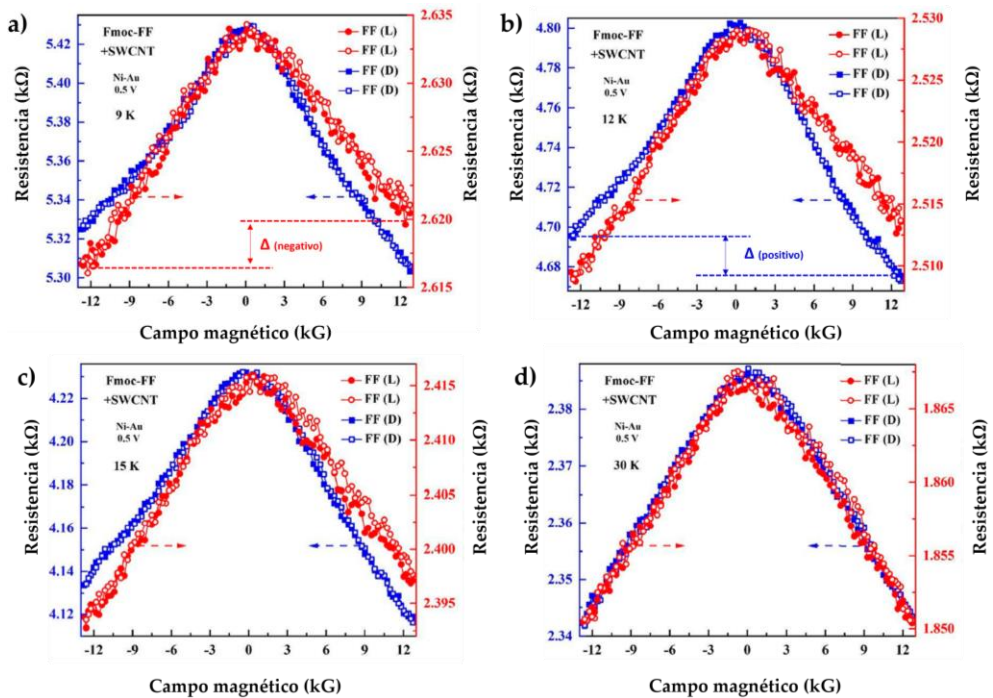


Figura IV.9. (a-d) MR asimétrica de SWCNT aquirales funcionalizados con Fmoc-FF (L o D) a varias temperaturas. La polarización aplicada en todas las muestras es 0,5 V en todos los casos.

En la Figura IV.10a, se muestra las respuestas de MR frente a la temperatura de ambos enantiómeros de Fmoc-FF, y se puede observar que la señal disminuye con la temperatura. Además, en la Figura IV.10b también se muestra los valores de Δ frente a la temperatura y se observa que son prácticamente opuestos hasta una temperatura aproximada de 30 K a partir de la cual Δ es prácticamente 0. Tal y como se ha comentado anteriormente, esto se debe presumiblemente a una mayor dispersión del espín a temperaturas más altas en los CNT, lo cual es conocido.³⁴²

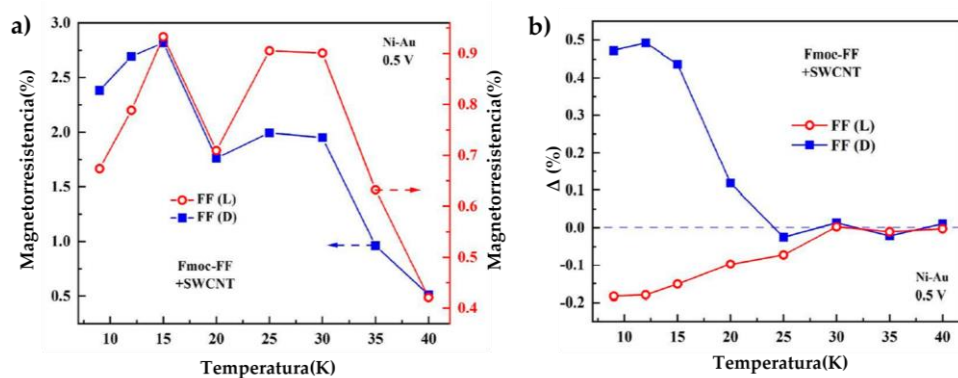


Figura IV.10. (a) Dependencia de la temperatura de la MR de base (en $\theta = 90^\circ$) para SWCNT funcionalizados con Fmoc-FF (L o D), (b) Asimetría MR Δ (%) en función de la temperatura. Se muestran las respuestas de dos muestras diferentes para cada funcionalización. La polarización aplicada es de 0,5 V en todos los casos.

Para explorar la existencia del efecto CISS con otros tipos de funcionalización molecular quiral, se eligió Fmoc-AA. Aunque Fmoc-AA es quiral, a diferencia de Fmoc-FF, su cadena lateral no es aromática y, por lo tanto, se esperaba que tuviera una interacción más débil con los CNT, tal y como fue confirmado con los datos Raman presentados anteriormente. La Figura IV.11 muestra las respuestas de MR de CNT funcionalizados con Fmoc-AA. Al igual que en el caso de Fmoc-FF, existe cierta MR de base. Además dicha MR es asimétrica, es decir, Δ es distinto de cero, lo cual indica una transmisión dependiente del espín a través del detector de espín de Ni. Sin embargo, a diferencia de Fmoc-FF, el signo de Δ es independiente de la quiralidad molecular y es positivo tanto para las muestras L como para las D.

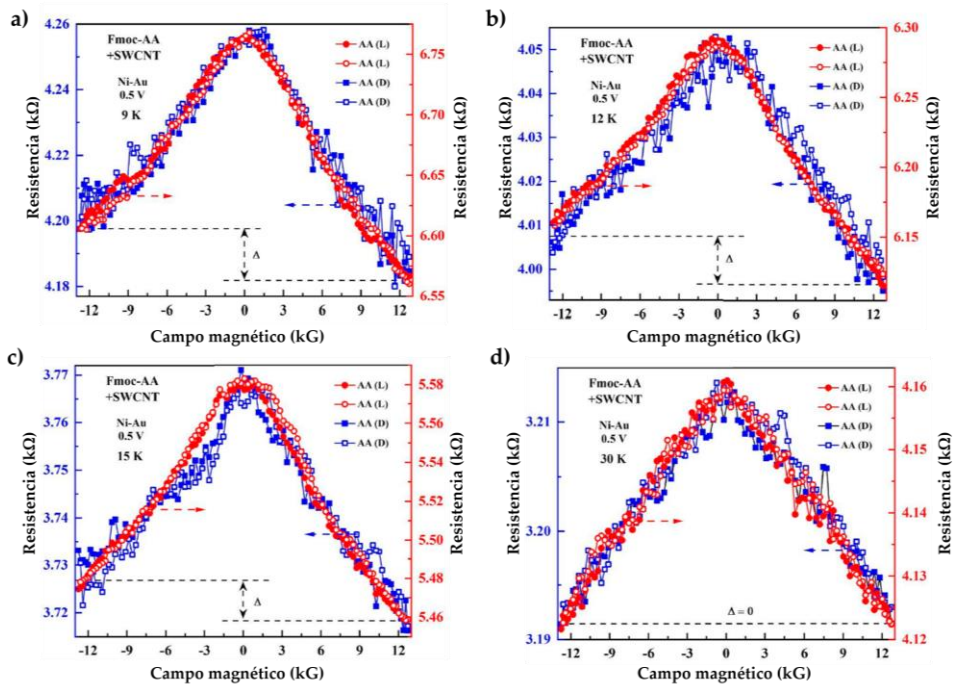


Figura IV.11. MR asimétrica de SWCNT funcionalizados con Fmoc-AA (L o D) usando contactos Ni-Au a varias temperaturas. La polarización aplicada es de 0,5 V en todos los casos. Los símbolos sólidos (abiertos) indican la exploración del campo magnético de campos negativos (positivos) a campos positivos (negativos). La asimetría de MR es independiente de la quiralidad molecular

Al igual que con Fmoc-FF, las medidas de MR de Fmoc-AA (L y D) dependientes de la temperatura se recogen en la Figura V.12 y se observa tanto una dependencia no lineal de la temperatura con la MR (Figura IV.12a), como una disminución gradual de Δ con la temperatura. Como he comentado anteriormente, la diferencia de Fmoc-FF, en el caso de Fmoc-AA, Δ tiene el mismo signo (positivo) para las funcionalizaciones L y D (Figura IV.12b). Por lo tanto, con esta funcionalización, observamos que la polarización de espín inducida no depende de la quiralidad molecular, como se ha demostrado para la muestra de Fmoc-FF, y por lo tanto no entra en la categoría de selectividad de espín "inducida por quiralidad" (CISS).^{361,362} Una posible explicación sería la interacción más débil de la cadena lateral quiral con los CNT, que impediría la adecuada y necesaria inducción quiral a los CNT para poder observar dicho fenómeno.

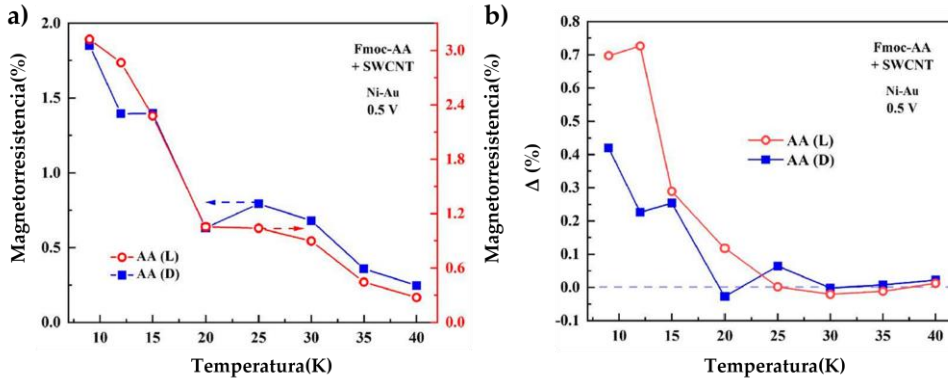


Figura IV.12. (a) Dependencia de la temperatura de la MR de base ($\theta = 90^\circ$) para SWCNT funcionalizados con Fmoc-AA (L o D). (b) Δ (%) en diferentes orientaciones de magnetización de Ni. Se muestran las respuestas de dos muestras diferentes para cada funcionalización. La polarización aplicada es de 0,5 V en todos los casos.

Dado que la interacción de la cadena lateral con los CNT parece tener una influencia en Δ , para corroborar este resultado, por último se eligió, Fmoc-GG como agente de funcionalización. Fmoc GG es aquiral y tiene la interacción más débil con los SWCNT en comparación con Fmoc-AA y Fmoc-FF, como se discutió anteriormente. La Figura IV.13 muestra las respuestas de MR de los SWCNT funcionalizados con Fmoc-GG. La MR negativa de base está presente, pero la asimetría de MR Δ no se pudo detectar, y dio valor de $\Delta=0$ para cualquier temperatura. Combinado con los datos de Fmoc-FF y Fmoc-AA presentados anteriormente, esto muestra que la interacción de la cadena lateral con SWCNT juega un papel central en la determinación de Δ , que está relacionado con la polarización de espín de los portadores.

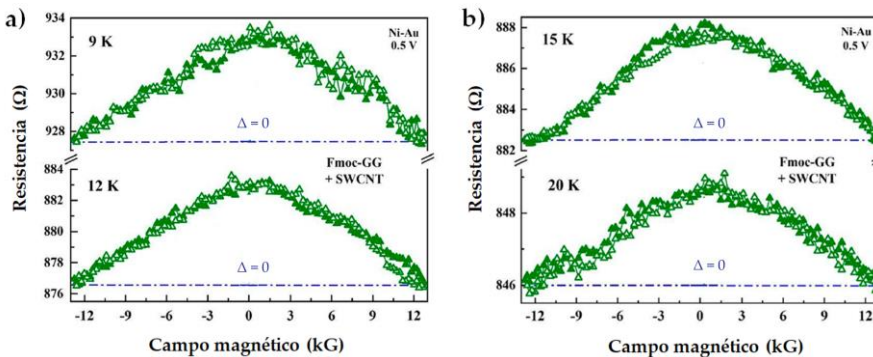


Figura IV.13. (a, b) MR simétrica de SWCNT funcionalizados con Fmoc-GG usando contactos Ni-Au a varias temperaturas .

Por lo tanto, hay dos fuentes principales de interacción entre los Fmoc-dipéptidos y los CNT: (a) la interacción de los anillos aromáticos que pertenecen al grupo Fmoc con los CNT y (b) la interacción de las cadenas laterales del dipéptido con los CNT. El primero es común para todas las moléculas discutidas anteriormente, y el último es variable con una tendencia $GG < AA < FF$. En el caso de Fmoc-GG, la interacción de la cadena lateral es insignificante y, por lo tanto, la ausencia de Δ en este caso indica que la interacción de los anillos aromáticos del grupo Fmoc con CNT no da como resultado ninguna polarización de espín de los portadores de carga.

4. CONCLUSIONS

In this chapter:

- We show that the CISS effect can be induced in 2D conductive SWCNT networks using appropriate chiral functionalizations. This effect is immune to nanotube disorder and does not require helical functionalization of individual nanotubes.
- The spin signal is “long-range” and routinely survives length scales significantly exceeding 1 μm . This observation effectively bridges the gap between molecular spintronics and carbon-based 2D nanoelectronics.
- The presence of an aromatic ring in the chiral side chain is necessary to observe the CISS effect, presumably due to their more efficient binding with CNTs.
- Surprisingly, a non-zero spin signal has been observed in the case of a non-aromatic chiral group side chain. This effect is *independent of molecular chirality* and hence cannot be ascribed to a “chirality induced” spin-selective effect.

5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.1. Reactivos y materiales

Fmoc-FF (L), Fmoc-AA (L) y Fmoc-diglicina (Fmoc-GG) se adquirieron de Bachem Co., Suiza, y se usaron sin previa purificación. Fmoc-FF (D) y Fmoc AA (D) se adquirieron de LifeTein, EE. UU., y se usaron sin purificación adicional. El carbonato de sodio, $\geq 99,9\%$, se adquirió de Alfa Aesar, Alemania. Se adquirió hidróxido de sodio (para análisis) de Merck, Alemania. SWCNT (aquirales) se adquirieron de Sigma-Aldrich, EE. UU. (nanotubos de carbono, 95 % de carbono de pared simple, n.º de producto 775533, n.º de registro CAS 308068-56-6, como SWCNT).

5.2. Preparación de los hidrogel híbridos

Los péptidos Fmoc-FF (L y D), Fmoc-AA (L y D) y Fmoc-GG se pesaron por separado en viales y se añadió agua desionizada para obtener una concentración final de 10 mM. La suspensión se sonicó (en un baño de ultrasonidos HSt Powersonic 603) durante 1 h. Luego, se añadió gota a gota una solución de NaOH (0,5 M) hasta obtener una solución transparente (pH 10,5). El pH se midió usando un medidor de pH HACH Sension PH 3. El medidor de pH se calibró utilizando soluciones tampón de pH 4, pH 7 y pH 10. A continuación, se pesó 0,7 mg de SWCNT en un vial (los SWCNT utilizados en este trabajo son aquirales). Los CNT se suspendieron en 1 ml de una solución básica acuosa de Fmoc-FF (L o D), Fmoc-AA (L o D) o Fmoc-GG al 0,5 % p/v (preparado anteriormente). La suspensión se sonicó durante 2 h en un baño ultrasónico frío y luego se centrifugó durante 5 min a 10 000 rpm (centrífuga Sigma 1-14). Finalmente, el sobrenadante se recogió cuidadosamente.³²⁴ Finalmente, se indujo la gelificación agregando carbonato de sodio a una concentración final de 25 mM y se mezcló usando un vórtex siguiendo el protocolo descrito en el apartado (II.5.2 del *Capítulo I* de la Tesis Doctoral).

5.3. Estudios Raman

Los espectros Raman de xerogeles se recolectaron en un microscopio Raman (Thermo Nicolet Almega XR Raman) con excitación láser de 532 nm (2,33 eV). La resolución espectral fue de $2,0 \text{ cm}^{-1}$ (utilizando una rejilla con 600 mm^{-1}) y cada espectro resultó de la media de 3 adquisiciones, con 100 s de acumulación cada una. Las muestras fueron sometidas a un proceso de “annealing” (tratamiento a vacío a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min) y se depositaron en portaobjetos de vidrio antes de la recolección de datos. (Estas medidas se han llevado a cabo en colaboración con el grupo Dr. Sandipan Pramanik de la Universidad de Alberta (Canadá)).

5.4. Síntesis del dispositivo híbrido de Fmoc-dipéptidos-SWCNT

Para llevar a cabo las medidas de I-V se colocó el gel entre un par de electrodos de Ni-Au ($\sim 100 \text{ nm}$ de espesor, espacio nominal entre electrodos $\sim 1\text{-}2 \text{ }\mu\text{m}$). Los electrodos se modelaron fotolitográficamente sobre SiO_2 / Si , se secaron a temperatura ambiente y la red de nanotubos 2D, funcionalizada con dipéptidos Fmoc, se encontraba conectada entre los contactos. Posteriormente, los dispositivos se secaron con nitrógeno y luego se sometieron a un proceso de “annealing” a vacío (tratamiento a vacío a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min) para mejorar los contactos entre los electrodos y Fmoc-dipéptidos-CNT. El recocido al vacío mejora los contactos eléctricos entre los electrodos y los Fmoc.dipéptidos-CNT y mejora la reproducibilidad de las mediciones de transporte de carga. Una imagen microscópica de iones de helio de la estructura final del dispositivo para las medidas del efecto CISS se muestra en la Figura IV.6. La red de nanotubos 2D, funcionalizada con dipéptidos Fmoc, está conectada entre los contactos Ni-Au. Para los estudios de magnetorresistencia, un electroimán aplica un campo magnético, y las mediciones se realizan utilizando un medidor de fuente Keithley de doble canal y un multímetro picotest. Estas medidas se han llevado a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Sandipan Pramanik de la Universidad de Alberta (Canadá).

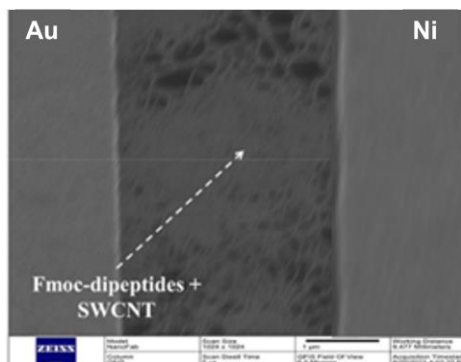


Figura IV.6. Imagen del microscopio de iones de helio (HiM) de un dispositivo típico. Las redes de nanotubos de carbono funcionalizados en 2D están conectadas entre electrodos de Au y Ni. Longitud del canal: $\sim 2 \mu\text{m}$.

5. Medidas de transporte

Para estudiar las propiedades de transporte de estos geles híbridos, variamos el sesgo de voltaje entre los electrodos de metal en un rango de $\pm 0,5\text{V}$ (medidor de fuente de sistema de doble canal Keithley Modelo 2636A). El campo magnético se varió en el rango de $\pm 12 \text{ kG}$ (fuente de alimentación de electroimán Lakeshore Model 642). La dirección del campo magnético está realizada a un ángulo de $\theta = 90^\circ$ respecto al plano de la película del electrodo de Ni. La temperatura de la muestra varía en un rango de 12 a 295 K mediante el controlador Cryotronics 332 (Lakeshore).

CAPÍTULO V

Participación en otros proyectos

V.A. CRISTALES DE INSULINA CRECIDOS EN HIDROGELES SUPRAMOLECULARES DE PÉPTIDOS CORTOS CON UNA MAYOR ESTABILIDAD TÉRMICA Y UN PERFIL DE LIBERACIÓN MÁS LENTO

Además de las numerosas aplicaciones de los hidrogeles supramoleculares comentadas durante el desarrollo de esta memoria, se ha evidenciado que este tipo de hidrogeles, en concreto los basados en péptidos cortos, son medios excelentes para la cristalización de proteínas, dando lugar a cristales que al crecer ocluyen en su interior el material orgánico componente del gel. Por tanto, sus características se ven influenciadas tanto por la proteína como por la composición y estereoquímica del hidrogel.^{363,364} Se ha demostrado que al utilizar hidrogeles de Fmoc-AA como soporte para el crecimiento de cristales de lisozima, estos hacen que aumente su tiempo de disolución.³⁶⁴ Por ello, se plantea una estrategia en la que se utilicen hidrogeles basados en Fmoc-AA como medio para cristalizar insulina (una proteína ampliamente usada en medicina destinada al tratamiento terapéutico de la diabetes) e intentar aumentar su estabilidad y modular su perfil de liberación.

Los cristales se han obtenido cristalizando insulina tanto en hidrogeles de agarosa (comúnmente empleada en la cristalización de proteínas) como de Fmoc-AA por el método de "batch" (Figura V.A.1).

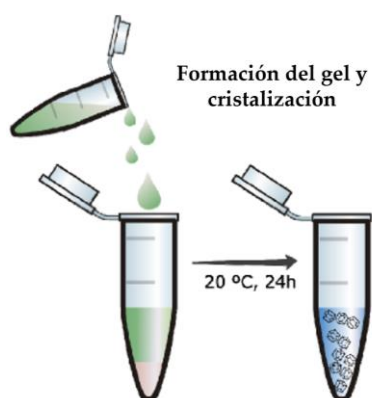


Figura V.A.1. Ilustración esquemática del método de cristalización en "batch" en el que se añade a la solución que contiene Fmoc-AA o agarosa en estado sol, las sales y la proteína. Pasadas 24 h se obtienen cristales de insulina.

Mediante este método se produce la mezcla directa de todos los componentes (gel en estado sol, precipitante y proteína) lo que facilita la manipulación y reduce el tiempo de espera para la formación de cristales. Una vez obtenidos pequeños cristales compuestos de insulina se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas para estudiar la influencia de la naturaleza del hidrogel.

Se midió la velocidad de disolución de ambos cristales compuestos de insulina y se comparó con la del cristal control (crecido sin el) en condiciones fisiológicas, es decir, 38 °C y pH 7,0. Como se puede observar en la Figura V.A.2, las velocidades de disolución en tiempos más cortos, es decir, por debajo de 10 min, fueron similares para todos los tipos de geles; sin embargo, después de esa fase inicial, el comportamiento de la disolución siguió caminos diferentes. Por lo tanto, los cristales control y de agarosa mostraron una mayor velocidad de disolución, estabilizándose a los 30 min, en cambio, los cristales de Fmoc-AA presentaron una velocidad de disolución más lenta, estabilizándose a los 120 min. En este caso, la pendiente de la curva fue menos pronunciada, mostrando un aumento más lineal de la concentración de insulina frente al tiempo. Estos resultados mostraron que la naturaleza del hidrogel dentro de los cristales de proteína modula la velocidad de disolución. Los cristales compuestos de insulina obtenidos en hidrogeles Fmoc-AA dieron lugar a cristales que tenían una velocidad de disolución más lenta. Esto podría explicarse por la formación de interacciones no covalentes más fuertes entre las fibras peptídicas y la proteína dentro del cristal.

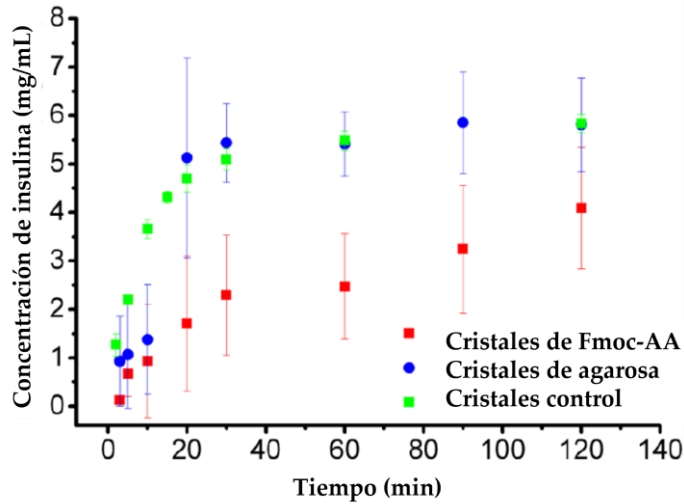


Figura V.A.2. Velocidad de disolución de los cristales de insulina

A continuación, las muestras de cristales se evaluaron mediante estudios de estabilidad acelerada incubando las suspensiones de los cristales en los hidrogeles a 50 °C durante 7 días. Está establecido que la incubación de cristales a 50 °C durante 4 días equivale a una estabilidad a temperatura ambiente de 2 años.³⁶⁵ La insulina en solución se degrada en menos de 24 h en estas condiciones. Así que se tomaron imágenes SEM para confirmar la calidad de los cristales (Figura V.A.2). Los cristales de Fmoc-AA y agarosa mantenidos a 50 °C durante 7 días (Figura V.A.2d y g) aún mostraban una buena transparencia y caras planas análogas a las conservadas a temperatura ambiente (Figura V.A.2a). Como puede verse en las imágenes, la morfología, la calidad y el tamaño de los cristales fueron similares a las muestras mantenidas a temperatura ambiente.

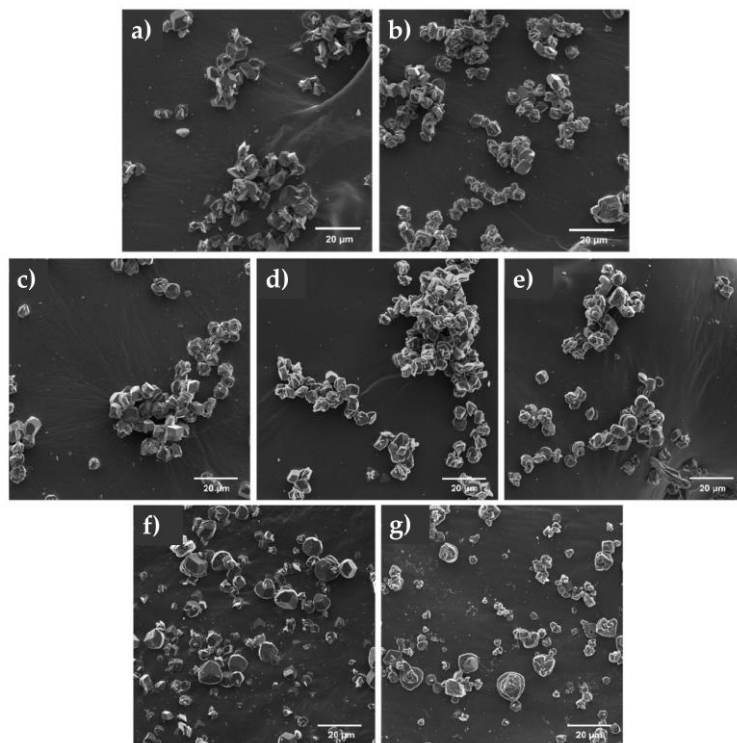


Figura V.A.2. Imágenes SEM de cristales de insulina: a) Cristales control a temperatura ambiente; b) Cristales control mantenidos a 50°C durante 7 días; c) Cristales de Fmoc-AA mantenidos a temperatura ambiente; d) Cristales de Fmoc-AA mantenidos a 50 °C durante 7 días; e) Cristales de Fmoc-AA mantenidos a 60 °C durante 24 horas; f) Cristales de agarosa mantenidos a temperatura ambiente; g) Cristales de agarosa mantenidos a 50 °C durante 7 días.

A continuación, se probó la estabilidad de las suspensiones de cristales a 60 °C. En este caso, después de 24 h, la agarosa y los cristales control se disolvieron a simple vista y no se observó nada mediante SEM, por el contrario, los cristales de Fmoc-AA se mantuvieron estables hasta 24 h sin degradación, según lo observado por microscopía óptica. Las imágenes SEM de los cristales de Fmoc-AA mantenidos durante 24 h a 60 °C mostraron cristales de calidad similar a los mantenidos a temperatura ambiente (Figura V.A.2e).

También se utilizó DSC para evaluar la resistencia frente a la disolución térmicamente inducida de los cristales a 1 mg/mL mantenidos a 50 °C durante 7 días. Sorprendentemente, las transiciones previas correspondientes a la disolución del cristal se desplazaron a una temperatura más alta para ambos hidrogeles, mientras

que sus áreas de pico se hicieron más grandes (Figura V.A.3), lo que indica una estabilización considerable de la estructura cristalina frente al tratamiento térmico. Una vez más, los cristales de Fmoc-AA eran más estables que los cristales de agarosa pero ambos se estabilizaron por el tratamiento térmico en un grado similar. Este aumento en la estabilidad sugiere que las interacciones entre las proteínas y las fibras de gel de proteína dentro del cristal aumentaron o se hicieron más fuertes después del tratamiento térmico.

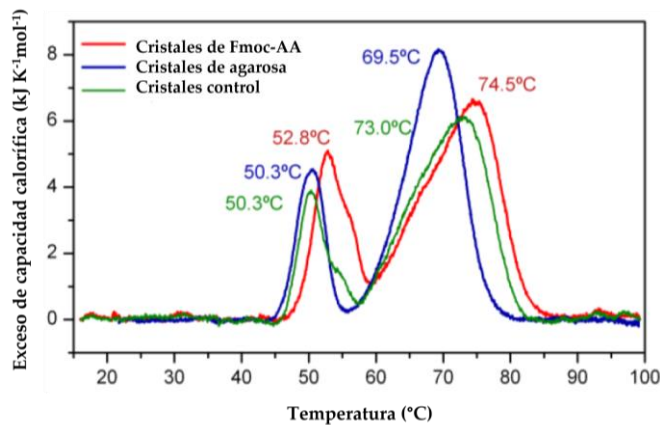


Figura V.A.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de cristales de insulina mantenidos a 50 °C durante 7 días. Las temperaturas de transición se muestran en los picos.

El efecto farmacológico de los nuevos cristales compuestos de insulina fue analizado *in vivo* en ratones, incluyendo muestras mantenidas a 50 y 60 °C. Se utilizó como referencia la insulina nativa en forma soluble. La insulina humana muestra bioactividad en roedores y, como en los humanos, la actividad hipoglucemiante está relacionada con la concentración de monómeros de insulina en sangre. Dado que la molécula de insulina era la misma en todas las preparaciones, la respuesta hipoglucémica está directamente relacionada con la tasa de liberación de insulina desde el lugar de la inyección. En este sentido, el ensayo es de naturaleza farmacocinética.

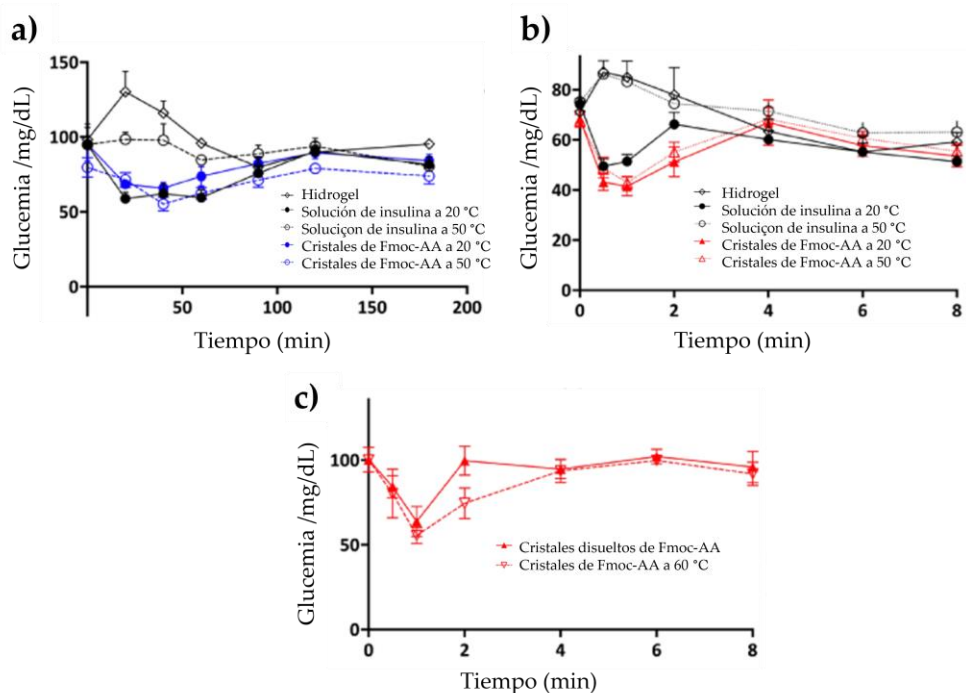


Figura V.A.4. (a) Perfil de glucemia de cristales de agarosa a 20 y 50 °C. (b) Perfil de glucemia de cristales de Fmoc-AA a 20 y 50 °C. (c) Perfil de glucemia de cristales de Fmoc-AA disueltos mantenidos a 50 °C y cristales de Fmoc-AA mantenidos a 60 °C. Insulina de referencia (negro), cristales de agarosa (azul) y cristales de Fmoc-AA (rojo).

La disminución de la glucosa comenzó 20-30 minutos después de la administración en todos los casos y duró poco más de una hora. Los grupos inyectados exhibieron una tendencia hacia un aumento inmediatamente después de la administración, lo que probablemente refleja una respuesta fisiológica a la inyección, como se esperaba en animales conscientes, y se atenúa en los grupos tratados con insulina. Como se muestra en la Figura V.A.4a, se logró una respuesta hipoglucémica similar cuando se administró la misma dosis de insulina en forma de cristales de agarosa, sin diferencias perceptibles en el tiempo de inicio o la duración total. El control de insulina mostró el mismo perfil de liberación que los cristales de agarosa. Por el contrario, no se observó respuesta en el caso de los cristales de Fmoc-AA (no mostrados). Como esta falta de efecto biológico sugería una tasa de liberación al torrente sanguíneo notablemente más lenta, se probaron dosis mayores, similares

a las que se utilizan para la insulina glargina de liberación lenta.³⁶⁶ Para obtener un efecto comparable al de la insulina de referencia, la dosis tuvo que aumentarse 5 veces, como se muestra en la Figura V.A.4b. El efecto tardó un poco más en establecerse; por lo tanto, se cambió el patrón de recolección de muestras para adaptarse a las diferentes respuestas y también para evaluar la posibilidad de una mayor duración de ese efecto.

De este trabajo se derivan las siguientes conclusiones: 1) Se han obtenido con éxito cristales de insulina cultivados en agarosa y en hidrogeles de Fmoc-AA. 2) La evaluación fisicoquímica ha demostrado que estos cristales son mucho más estables que la insulina en solución siendo farmacológicamente activos tras mantenerlos 50 °C durante 7 días. 3) Los cristales de insulina crecidos en Fmoc-AA mostraron una mayor estabilidad térmica, siendo estables hasta 60 °C durante 24 h. 4) Este aumento de la estabilidad también modifica el perfil de liberación de la insulina nativa, convirtiéndola en una de liberación lenta, sin alterar la estructura química de la proteína. Estos resultados muestran que la naturaleza del hidrogel tiene un gran impacto en las propiedades fisicoquímicas de los cristales resultantes. En este trabajo se han presentado dos nuevas formulaciones de insulina térmicamente estables que tienen diferentes perfiles de liberación usando la misma insulina nativa.

The following conclusions are derived from this work: 1) Insulin crystals grown in agarose and in Fmoc-AA hydrogels have been successfully obtained. 2) Physicochemical evaluation has shown that these crystals are much more stable than insulin in solution, being pharmacologically active after keeping them at 50 °C for 7 days. 3) Insulin crystals grown in Fmoc-AA showed greater thermal stability, being stable up to 60 °C for 24 h. 4) This increased stability also modifies the release profile of native insulin, turning it into a slow-release insulin, without altering the chemical structure of the protein. These results show that the nature of the hydrogel has a great impact on the physicochemical properties of the resulting crystals. In this work, two new thermally stable insulin formulations have been presented that have different release profiles using the same native insulin.

Este proyecto se ha realizado en colaboración con los grupos del Dr. Fermín Sánchez de Medina (Dpto. Farmacología, Facultad de Farmacia, UGR), Dra. Olga Martínez-Agustín (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). El artículo está publicado.

V.B.GRANDES NANOLÁMINAS SUPRAMOLECULARES ENSAMBLADAS A PARTIR DE NANOGRAFENOS QUE CONTIENEN HEPTÁGONOS ANFIFÍLICOS

Se realizó un estudio del autoensamblaje de un nuevo conjunto de tres nanografenos anfifílicos en forma de silla de montar (compuestos 1-3, Figura V.B.1). Considerando la alta solubilidad de los nanografenos distorsionados en la mayoría de disolventes orgánicos, la introducción de cadenas flexibles de etilenglicol en el núcleo permitió incrementar el carácter anfifílico de las moléculas y promover el autoensamblaje en disolventes orgánicos y/o en mezclas de disolventes orgánicos y agua para obtener polímeros supramoleculares mediante un proceso de autoensamblaje.

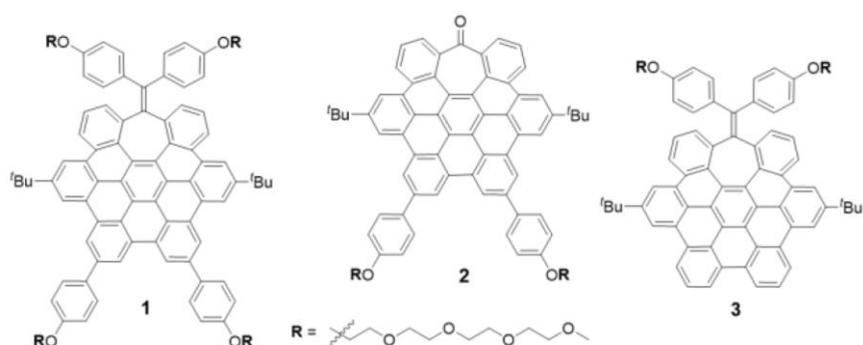


Figura V.B.1. Estructuras de los nanografenos anfifílicos 1-3 en forma de silla de montar que contienen heptágonos estudiados en este trabajo

Una vez sintetizados y caracterizados los compuestos 1-3, se evaluó su efecto de agregación aumentando el porcentaje de agua, un no solvente de estos compuestos, en soluciones de THF. Un aumento de la proporción de agua comenzó a producir suspensiones turbias que eran estables en el tiempo y en las que no se formaba precipitado. Se evaluó suspensiones de 1 en mezclas de THF/H₂O en proporción 3:7, 2:8 y 1:9 mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes TEM

de las muestras secadas al aire después de 24 h mostraron la presencia de diferentes agregados en los que se identificaron claramente las nanoesferas con diámetros entre 50 y 300 nm (Figura V.B.2 a, b, j). Curiosamente, la mezcla THF/H₂O en una proporción de 2:8 también mostró la aparición de nanoláminas cercanas a los agregados de nanoesferas (Figura V.B.2f). La presencia de estas láminas cerca de las nanoesferas sugiere que éstas pueden evolucionar a nanoláminas más estables, como se ha descrito previamente.^{174,367}

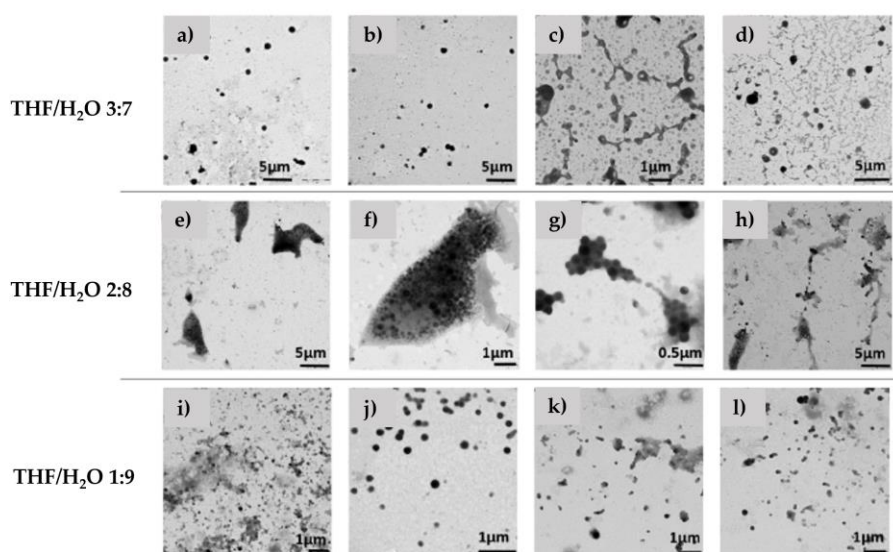


Figura V.B.2. Fotografías TEM tomadas después de 24 h del compuesto **1** obtenidas en diferentes proporciones de THF/H₂O como se indica en la imagen.

Tras estos resultados, se incubó la suspensión durante un período más largo (una semana) y luego se analizó por TEM. En este caso, la proporción de nanoláminas *vs* nanoesferas fue mayor y en algunas de las áreas exploradas solo se observaron nanoláminas (Figura V.B.3). Curiosamente, algunas de estas láminas eran extremadamente grandes, más de 15 μm, y comprendían un área superior a 150 μm² (Figura V.B.3 a). Los compuestos **2** y **3** también pudieron formar grandes nanoláminas (Figura V.B.3 d-i). En el caso de **3**, las imágenes TEM mostraron que algunas de las nanoláminas obtenidas se apilaban en más de una capa.

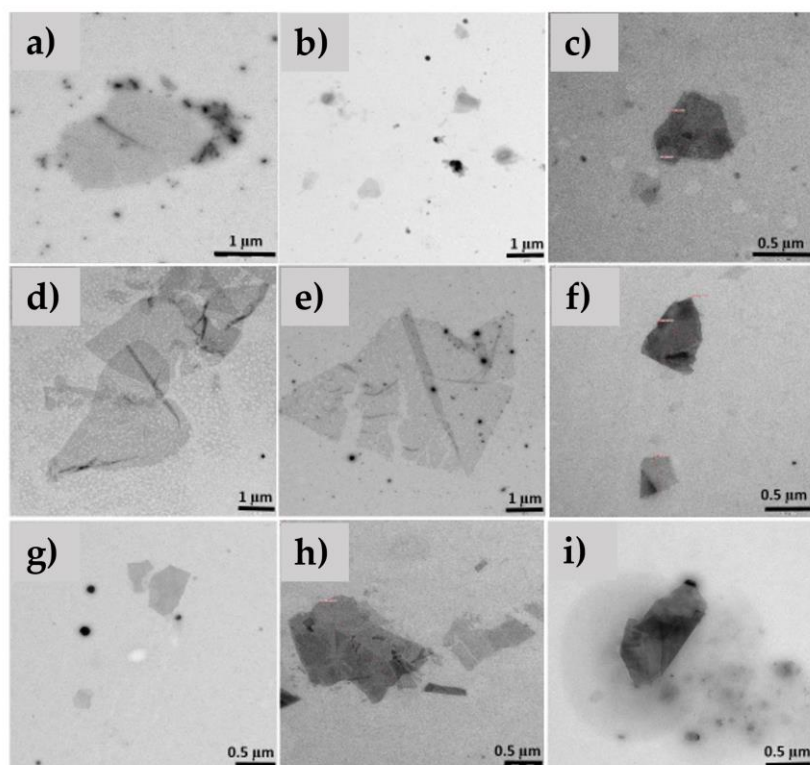


Figura V.B.3. Imágenes TEM de nanoláminas formadas por 1 (a-c), 2 (d-f) y 3 (g-i) en mezclas de THF/H₂O (2:8). Las imágenes se tomaron después de una semana de incubación.

También se realizaron mediciones de microscopía de fuerza atómica (AFM) de las nanoláminas obtenidas. Sin embargo, la observación de nanoláminas solo fue posible para el compuesto 3 (Figura V.B.4). Estas nanoláminas mostraron un espesor constante de $4 \pm 0,2$ nm correspondiente a una monocapa, como se analiza a continuación.

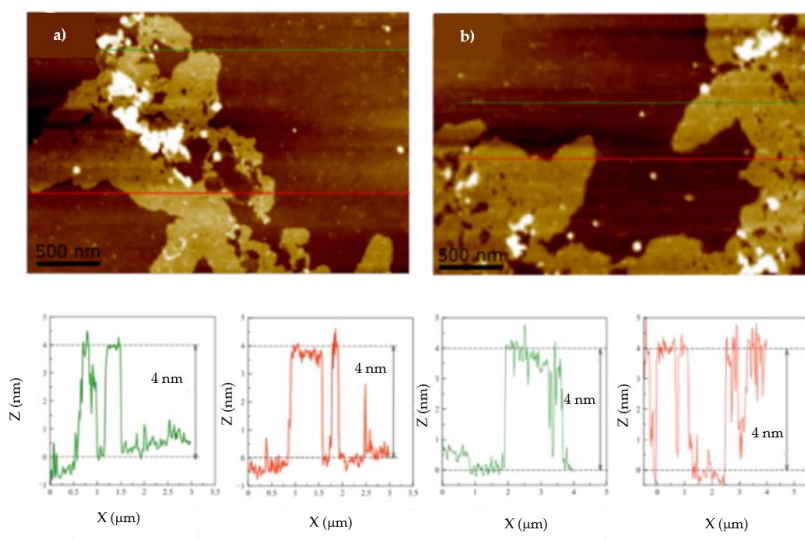


Figura V.B.4. Imágenes AFM de nanoláminas 2D representativas formadas a partir de **3** en THF/H₂O (2:8) (arriba). Espesor de los ensamblajes obtenidos (abajo).

De los resultados obtenidos en este trabajo se derivan las siguientes conclusiones: 1) Este es el primer ejemplo claro de autoensamblaje de nanografeno en láminas en lugar de en fibras que se encuentran comúnmente. 2) La interacción intermolecular que impulsa el proceso de autoensamblaje se atribuyó a las interacciones entre los núcleos curvos de nanografeno. Sorprendentemente, el núcleo en forma de silla de montar promovió la formación de nanoláminas 2D para todos los nanografenos, después de la incubación en una mezcla de THF/agua. 3) En las mezclas de THF/H₂O, los nanografenos curvos se autoensamblan en láminas notablemente grandes de hasta 150 μm^2 , formando polímeros 2D. Además, las nanoláminas obtenidas son persistentes y muestran una gran robustez.

From the results obtained in this work, the following conclusions are derived: 1) This is the first clear example of self-assembly of nanographene in sheets instead of in fibers that are commonly found. 2) The intermolecular interaction that drives the self-assembly process was attributed to the interactions between the curved nanographene cores. Surprisingly, the saddle-shaped core promoted the formation of 2D nanosheets for all nanographenes, after incubation in a THF/water mixture. 3) In

THF/H₂O mixtures, curved nanographenes self-assemble into remarkably large sheets of up to 150 μm^2 , forming 2D polymers. In addition, the nanosheets obtained are persistent and show great robustness.

Este trabajo se ha realizado en colaboración con los grupos de la Dra. Araceli González Campaña y del Dr. Víctor Blanco del departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias (UGR) y del Dr. Juan José Giner Casares del departamento de Química Física y T. Aplicada de la Universidad de Córdoba. El artículo está en fase de aceptación.

ANEXOS

LISTA DE PUBLICACIONES

En este apartado se recogen los artículos publicados como resultado del trabajo realizado durante la etapa predoctoral, ya sea para el desarrollo de la presente tesis doctoral o en colaboración con otros compañeros de nuestro grupo de investigación.

“Anisotropic magnetic hydrogels. Design, structure and mechanical properties”. Cristina Gila-Vilchez, Mari C. Mañas-Torres, Rafael Contreras-Montoya, Miguel Alaminos, Juan D. G. Duran, Luis Álvarez de Cienfuegos, Modesto T. Lopez-Lopez, *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **377**, 20180217 (2019).

“Biomedical applications of magnetic hydrogels”. Mari C Mañas-Torres, Cristina Gila-Vilchez, Juan DG Durán, Modesto T Lopez-Lopez, Luis Álvarez de Cienfuegos, in *Magnetic Nanoparticle-Based Hybrid Materials* 253-271 (Elsevier, 2021).

“Insulin crystals grown in short peptide supramolecular hydrogels show enhanced thermal stability and slower release”. Rafael Contreras-Montoya, María Arredondo-Amador, Guillermo Escolano-Casado, Mari C. Mañas-Torres, Mercedes González, Mayte Conejero-Muriel, Vaibhav Bhatia, Juan José Díaz, Olga Martínez Augustin, Fermin Sanchez de Medina, Modesto T Lopez-Lopez, Francisco Conejero-Lara, Jose Gavira, Luis Álvarez de Cienfuegos, *ACS Applied Materials & Interfaces*. **13**, 11672-11682 (2021).

“In situ real-time monitoring of the mechanism of self-assembly of short peptide supramolecular polymers”. Mari C. Mañas-Torres, Cristina Gila-Vilchez, Juan A. González-Vera, Francisco Conejero-Lara, Victor Blanco, Juan Manuel Cuerva, Modesto T. Lopez-Lopez, Angel Orte, Luis Álvarez de Cienfuegos. *Materials Chemistry Frontiers*. **5**, 5452-5462 (2021).

“Injectable Magnetic-Responsive Short-Peptide Supramolecular Hydrogels: Ex Vivo and In Vivo Evaluation”. Mari C. Mañas-Torres, Cristina Gila-Vilchez, Francisco J. Vazquez-Perez, Pavel Kuzhir, David Momier, Jean-Claude Scimeca, Arnaud Borderie, Marianne Goracci, Fanny Burel-Vandenbos, Cristina Blanco-Elices, Ismael

A. Rodriguez, Miguel Alaminos, Luis Álvarez de Cienfuegos, Modesto T. Lopez-Lopez, *ACS Applied Materials & Interfaces* **13**, 49692-49704 (2021).

"Insights into the co-assemblies formed by different aromatic short-peptides amphiphiles". Cristina Gila-Vilchez, Mari C. Mañas-Torres, Juan A. González-Vera, Francisco Franco-Montalban, Juan A. Tamayo, Francisco Conejero-Lara, Juan Manuel Cuerva, Modesto T. Lopez-Lopez, Angel Orte, Luis Álvarez de Cienfuegos, *Polymer Chemistry*. **12**, 6832-6845 (2021).

"Molecular Functionalization and Emergence of Long-Range Spin-Dependent Phenomena in Two-Dimensional Carbon Nanotube Networks". Md. Wazedur Rahman, Mari C. Mañas-Torres, Seyedamin Firouzeh, Juan Manuel Cuerva, Luis Álvarez de Cienfuegos, and Sandipan Pramanik, *ACS Nano*.**15**, 20056-20066 (2021).

"Organic/Inorganic hydrogels by simultaneous selfassembly and mineralization of aromatic shortpeptides". Mari C. Mañas-Torres, Gloria B. Ramírez Rodríguez, José I. García-Peiro, Belén Parra-Torrejón, Juan M. Cuerva, Modesto T. Lopez-Lopez, Luis Álvarez de Cienfuegos, José M. Delgado-López, *Inorganic Chemistry Frontiers*. **9**, 743-752 (2022).

Por otro lado, se citan los artículos que están en proceso de aceptación:

"Interactions between peptide assemblies and proteins for medicine". Mari C. Mañas-Torres, Sara Illescas-Lopez, José A. Gavira, Luis Álvarez de Cienfuegos, Silvia Marchesan (enviado).

"Supramolecular large nanosheets assembled from amphiphilic heptagon-containing nanographenes" Arthur H. G. David, Mari C. Mañas-Torres, Marcos D. Codesal, Irene López-Sicilia, María T. Martín-Romero, Luis Camacho, Juan M. Cuerva, Victor Blanco, Juan J. Giner-Casares, Luis Álvarez de Cienfuegos, Araceli G. Campaña (enviado).

BIBLIOGRAFÍA

1. Piepenbrock, M. M., Lloyd, G. O., Clarke, N. & Steed, J. W. Metal- and Anion-Binding Supramolecular Gels. *Chem. Rev.* **110**, 1960–2004 (2010).
2. Jordon, L. D. *Colloid Chemistry*. (Alexander J., 1926).
3. Flory, P. J. Introductory Lecture. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **57**, 1–282 (1974).
4. Terech, P. & Weiss, R. G. Low Molecular Mass Gelators of Organic Liquids and the Properties of Their Gels. *Chem. Rev.* **97**, 3133–3159 (1997).
5. Sangeetha, N. M. & Maitra, U. Supramolecular gels: Functions and uses. *Chem. Soc. Rev.* **34**, 821–836 (2005).
6. Ulijn, R. V. *et al.* Bioresponsive hydrogels. *Mater. Today* **10**, 40–48 (2007).
7. Okesola, B. O. & Smith, D. K. Applying low-molecular weight supramolecular gelators in an environmental setting-self-assembled gels as smart materials for pollutant removal. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 4226–4251 (2016).
8. Oda, R. SAFIN gels with amphiphilic molecules. in *Molecular Gels* 577–609 (Springer, 2006).
9. Yu, G., Yan, X., Han, C. & Huang, F. Characterization of supramolecular gels. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6697–6722 (2013).
10. Carretti, E. *et al.* New Frontiers in Materials Science for Art Conservation: Responsive Gels and Beyond. *Acc. Chem. Res.* **43**, 751–760 (2010).
11. Haines, S. R. & Harrison, R. G. Novel resorcinarene-based pH-triggered gelator. *Chem. Commun.* **23**, 2846–2847 (2002).
12. Tsuchiya, K. *et al.* Control of Viscoelasticity Using Redox Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 12282–12283 (2004).
13. Ogoshi, T., Takashima, Y., Yamaguchi, H. & Harada, A. Chemically-Responsive Sol - Gel Transition of Supramolecular Single-Walled Carbon Nanotubes (SWNTs) Hydrogel Made by Hybrids of SWNTs and Cyclodextrins. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 4878–4879 (2007).

14. Kohsaka, Y., Koyama, Y. & Takata, T. Graft Polyrotaxanes : A New Class of Graft Copolymers with Mobile Graft Chains. *Angew. Chemie Int. Ed.* **50**, 10417–10420 (2011).
15. Gortner, R. A. & Hoffman, W. F. An interesting colloidal gel. *J. Am. Chem. Soc.* **43**, 2199–2202 (1921).
16. Menger, F. M. *et al.* Anatomy of a Gel . Amino Acid Derivatives That Rigidify Water at Submillimolar Concentrations. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 11679–11691 (2000).
17. Abdallah, D. J. & Weiss, R. G. n -Alkanes Gel n -Alkanes (and Many Other Organic Liquids). *Langmuir* **16**, 352–355 (2000).
18. Astruc, D. & Boisselier, E. Dendrimers Designed for Functions : From Physical, Photophysical, and Supramolecular Properties to Applications in Sensing, Catalysis, Molecular Electronics, Photonics, and Nanomedicine. *Chem. Rev.* **110**, 1857–1959 (2010).
19. Lloyd, G. O. & Steed, J. W. Anion-tuning of supramolecular gel properties. *Nat. Chem.* **1**, 437–442 (2009).
20. Mandal, D., Kar, T. & Kumar, P. Pyrene-Based Fluorescent Ambidextrous Gelators : Scaffolds for Mechanically Robust SWNT – Gel Nanocomposites. *Chem. Eur. J.* **20**, 1349-1358. (2014).
21. Praveen, V. K., Ranjith, C. & Armaroli, N. White-Light-Emitting Supramolecular Gels. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, 365–368 (2014).
22. Ressouche, E., Pensec, S., Isare, B., Ducouret, G. & Bouteiller, L. Rational Design of Urea-Based Two-Component Organogelators. *ACS Macro Lett.* **5**, 244–247 (2016).
23. Gale, P., Gunnlaugsson, T. & Steed, J. W. Supramolecular chemistry of anionic species themed issue supramolecular chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 3595–3596 (2010).

24. Suzuki, M. & Hanabusa, K. L-Lysine-based low-molecular-weight gelators. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 967–975 (2009).
25. Weng, W., Beck, J. B., Jamieson, A. M. & Rowan, S. J. Understanding the Mechanism of Gelation and Stimuli-Responsive Nature of a Class of Metallo-Supramolecular Gels. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 11663–11672 (2006).
26. Hu, Z., Zhang, D. Y., Lu, S. T., Li, P. W., & Li, S. D. Chitosan-Based Composite Materials for Prospective. *Mar. Drugs* **16**, 273 (2018).
27. Du, X., Zhou, J. & Xu, B. Supramolecular Hydrogels Made of Basic Biological Building Blocks. *Chem. Asian J.* **9**, 1446–1472 (2014).
28. Singh, N., Kumar, M., Miravet, J. F., Ulijn, R. V. & Escuder, B. Peptide-Based Molecular Hydrogels as Supramolecular Protein Mimics. *Chem. - A Eur. J.* **23**, 981–993 (2017).
29. Reches, M., & Gazit, E. Self-Assembly of Peptide Nanotubes and Amyloid-like Structures by Charged-Termini-Capped Diphenylalanine Peptide Analogues. *Isr. J. Chem.* **45**, 363–371 (2005).
30. Zhang, Y., Gu, H., Yang, Z. & Xu, B. Supramolecular Hydrogels Respond to Ligand - Receptor Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13680–13681 (2003).
31. Mahler, B. A., Reches, M., Rechter, M., Cohen, S. & Gazit, E. Rigid , Self-Assembled Hydrogel Composed of a Modified Aromatic Dipeptide. *Adv. Mater.* **18**, 1365–1370 (2006).
32. Du, X., Zhou, J., Shi, J. & Xu, B. Supramolecular Hydrogelators and Hydrogels: From Soft Matter to Molecular Biomaterials. *Chem. Rev.* **115**, 13165–13307 (2015).
33. Zhang, Y., Kuang, Y., Gao, Y. & Xu, B. Versatile Small-Molecule Motifs for Self-Assembly in Water and the Formation of Biofunctional Supramolecular Hydrogels. *Langmuir* **27**, 529–537 (2011).

34. Chen, L., Revel, S., Morris, K., Serpell, L. C. & Adams, D. J. Effect of Molecular Structure on the Properties of Naphthalene - Dipeptide Hydrogelators. *Langmuir* **26**, 13466–13471 (2010).
35. Online, V. A. Single amino acid based thixotropic hydrogel formation and pH-dependent morphological change of gel nanofibers. *Soft Matter*. **9**, 4198–4208 (2013).
36. Jayawarna, V., Smith, A., Gough, J. E. & Ulijn, R. V. Three-dimensional cell culture of chondrocytes on modified di-phenylalanine scaffolds. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 535–537 (2007).
37. Martin, A. D., Robinson, A. B., Mason, A. F., Wojciechowski, J. P. & Thordarson, P. Exceptionally strong hydrogels through self-assembly of an indole-capped dipeptide. *Chem. Commun.* **50**, 15541–15544 (2014).
38. Ou, C., Zhang, J., Zhang, X., Yang, Z. & Chen, M. Phenothiazine as an aromatic capping group to construct a short peptide-based ‘super gelator’. *Chem. Commun.* **49**, 1853–1855 (2013).
39. Zhou, Y. *et al.* A supramolecular hydrogel based on carbamazepine. *Chem. Commun.* **51**, 15294–15296 (2015).
40. Amabilino, D. B. Chiral nanoscale systems: preparation, structure, properties and function. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 669–670 (2009).
41. Loos, M. De, Feringa, B. L. & Esch, J. H. Van. Design and Application of Self-Assembled Low Molecular Weight Hydrogels. *European J. Org. Chem.* **17**, 3615–3631 (2005).
42. Dasgupta, A., Mondal, J. H., & Das, D. Peptide hydrogels. *Rsc Adv.* **3**, 9117–9149 (2013).
43. Bushey, M. L., Nguyen, T., Zhang, W., Horoszewski, D. & Nuckolls, C. Using Hydrogen Bonds to Direct the Assembly of Crowded Aromatics. *Angew. Chemie Int. Ed.* **43**, 5446–5453 (2004).

44. Hamley, I. W. The Amyloid Beta Peptide : A Chemist 's Perspective . Role in Alzheimer 's and Fibrillization. *Chem. Rev.* **112**, 5147–5192 (2012).
45. Lee, J. *et al.* Water-Floating Giant Nanosheets from Helical Peptide Pentamers. *ACS Nano* **10**, 8263–8270 (2016).
46. Joseph, J. P., Singh, A., Gupta, D., Miglani, C. & Pal, A. Tandem Interplay of the Host-Guest Interaction and Photoresponsive Supramolecular Polymerization to 1D and 2D Functional Peptide Materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 28213–28220 (2019).
47. Xie, X. *et al.* Host-guest interaction driven peptide assembly into photoresponsive two-dimensional nanosheets with switchable antibacterial activity. *CCS Chem.* **3**, 1949–1962 (2021).
48. Clover, T. M. *et al.* Self-Assembly of Block Heterochiral Peptides into Helical Tapes. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 19809–19813 (2020).
49. Przybyla, D. E. & Chmielewski, J. Metal-triggered collagen peptide disk formation. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 7866–7867 (2010).
50. Przybyla, D. E., Rubert Pérez, C. M., Gleaton, J., Nandwana, V. & Chmielewski, J. Hierarchical assembly of collagen peptide triple helices into curved disks and metal ion-promoted hollow spheres. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 3418–3422 (2013).
51. Gao, Q. *et al.* Chlorin e6 (Ce6)-loaded supramolecular polypeptide micelles with enhanced photodynamic therapy effect against *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Eng. J.* **417**, 129334 (2021).
52. Thomson, A. R. *et al.* Computational design of water-soluble α -helical barrels. *Science (80-.).* **346**, 485–489 (2014).
53. Porter, S. L., Coulter, S. M., Pentlavalli, S., Thompson, T. P. & Laverty, G. Self-assembling diphenylalanine peptide nanotubes selectively eradicate bacterial biofilm infection. *Acta Biomater.* **77**, 96–105 (2018).

54. Nambiar, M., Nepal, M. & Chmielewski, J. Self-Assembling Coiled-Coil Peptide Nanotubes with Biomolecular Cargo Encapsulation. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **5**, 5082–5087 (2019).
55. Ma, X. *et al.* Ordered Packing of β -Sheet Nanofibrils into Nanotubes: Multi-hierarchical Assembly of Designed Short. *Nano Lett.* **21**, 10199–10207 (2021).
56. Freeman, R. *et al.* Reversible self-assembly of superstructured networks. *Science (80-.)*. **362**, 808–813 (2018).
57. Nguyen, P. K. *et al.* Self-Assembly of a Dentinogenic Peptide Hydrogel. *ACS Omega* **3**, 5980–5987 (2018).
58. Criado-Gonzalez, M. *et al.* Phase Separation in Supramolecular Hydrogels Based on Peptide Self-Assembly from Enzyme-Coated Nanoparticles. *Langmuir* **35**, 10838–10845 (2019).
59. Yang, S. & Dong, H. Modular design and self-assembly of multidomain peptides towards cytocompatible supramolecular cell penetrating nanofibers. *RSC Adv.* **10**, 29469–29474 (2020).
60. Zelzer, M. & Ulijn, R. V. Next-generation peptide nanomaterials: Molecular networks, interfaces and supramolecular functionality. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 3351–3357 (2010).
61. Takata, T. Supramolecular polymers. *Polymer (Guildf)*. **128**, 242 (2017).
62. Jung, S. H., Takeuchi, M. & Sugiyasu, K. Molecular self-assembly under kinetic control. in *Kinetic Control in Synthesis and Self-Assembly* 205–229 (Elsevier, 2019).
63. Wehner, M. & Würthner, F. Supramolecular polymerization through kinetic pathway control and living chain growth. *Nat. Rev. Chem.* **4**, 38–53 (2020).
64. Mabesoone, M. F. J., Palmans, A. R. A. & Meijer, E. W. Solute-Solvent Interactions in Modern Physical Organic Chemistry: Supramolecular

- Polymers as a Muse. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 19781–19798 (2020).
65. Vegners, R., Shestakova, I., Kawinsh, I., Euell, R. M. & Janmey, P. A. Use of a gel-forming dipeptide derivative as a carrier for antigen presentation. *J. Pept. Sci. an Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* **1**, 371–378 (1995).
66. Morris, K. L., Chen, L., Raeburn, J., Sellick, O. R., Cotanda, P., Paul, A., & Adams, D. J. Chemically programmed self-sorting of gelator networks. *Nat. Commun.* **4**, 1–6 (2013).
67. Chem, J. M. *et al.* pH-responsive branched peptide amphiphile hydrogel designed for applications in regenerative medicine with potential as injectable tissue scaffolds. *J. Mater. Chem.* **22**, 19447–19454 (2012).
68. Smith, A. M. *et al.* Fmoc-diphenylalanine self assembles to a hydrogel via a novel architecture based on π - π interlocked β -sheets. *Adv. Mater.* **20**, 37–41 (2008).
69. Adams, D. J., Butler, M. F., Frith, W. J., Kirkland, M. & Sanderson, P. A new method for maintaining homogeneity during liquid – hydrogel transitions using low molecular weight hydrogelators. *Soft Matter* **5**, 1856–1862 (2009).
70. Roy, S. *et al.* Dramatic Specific-Ion Effect in Supramolecular Hydrogels. *Chem. Eur. J.* **18**, 11723–11731 (2012).
71. Lo Nostro, P. & Ninham, B. W. Hofmeister phenomena: An update on ion specificity in biology. *Chem. Rev.* **112**, 2286–2322 (2012).
72. Moelbert, S., Normand, B. & De Los Rios, P. Kosmotropes and chaotropes: Modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability. *Biophys. Chem.* **112**, 45–57 (2004).
73. Yang, Z. & Xu, B. A simple visual assay based on small molecule hydrogels for detecting inhibitors of enzymes. *Chem. Commun.* **1**, 2424–2425 (2004).
74. Ren, C. *et al.* Carrier-Free Supramolecular Hydrogel Composed of Dual Drugs

- for Conquering Drug Resistance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 33706-33715. (2019).
75. Malkoch, M. *et al.* Synthesis of well-defined hydrogel networks using Click chemistry. *Chem. Commun.* **26**, 2774–2776 (2006).
76. Ikeda, M., Ochi, R., Kurita, Y. S., Pochan, D. J., & Hamachi, I. Heat-Induced Morphological Transformation of Supramolecular Nanostructures by Retro-Diels–Alder Reaction. *Chem. Eur. J.* **18**, 13091–13096 (2012).
77. Hu, B., Lian, Z., Zhou, Z., Shi, L. & Yu, Z. Reactive Oxygen Species-Responsive Adaptable Self-Assembly of Peptides toward Advanced Biomaterials. *ACS Appl. Bio Mater.* **3**, 5529–5551 (2020).
78. Pappas, C. G., Frederix, P. W., Mutasa, T., Fleming, S., Abul-Haija, Y. Pappas, C. G., Frederix, P. W., Mutasa, T., Fleming, S., Abul-Haija, Y. M., Kelly, S. M., & Bai, S. Alignment of nanostructured tripeptide gels by directional ultrasonication. *Chem. Commun.* **51**, 8465–8468 (2015).
79. Draper, E. R. & Adams, D. J. Low-Molecular-Weight Gels: The State of the Art. *Chem* **3**, 390–410 (2017).
80. Loebel, C., Rodell, C. B., Chen, M. H. & Burdick, J. A. Shear-thinning and self-healing hydrogels as injectable therapeutics and for 3D-printing. *Nat. Protoc.* **12**, 1521–1541 (2017).
81. Zuidema, J. M., Rivet, C. J., Gilbert, R. J. & Morrison, F. A. A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **102**, 1063–1073 (2013).
82. Denzer, B. R., Kulchar, R. J., Huang, R. B. & Patterson, J. Advanced methods for the characterization of supramolecular hydrogels. *Gels* **7**, 1–29 (2021).
83. Macosko, C. W. *Rheology principles*. (VCH Publishers, 1994).
84. Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J. & McDowell, A. W. Cryo-electron

- microscopy of viruses. *Nature* **308**, 32–36 (1984).
85. Trautmann, S., Buschmann, V., Orthaus, S., Koberling, F. & Ortmann, U. Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) in Confocal Microscopy Applications. *PicoQuant GmbH* **29**, 12489 (2013).
86. Chennell, G. *et al.* Imaging of metabolic status in 3D cultures with an improved AMPK FRET biosensor for FLIM. *Sensors (Switzerland)* **16**, 1–13 (2016).
87. Huang, B., Hirst, A. R., Smith, D. K., Castelletto, V. & Hamley, I. W. A direct comparison of one- and two-component dendritic self-assembled materials: Elucidating molecular recognition pathways. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 7130–7139 (2005).
88. Hirst, A. R., Smith, D. K., Feiters, M. C. & Geurts, H. P. M. Two-component dendritic gel: Effect of stereochemistry on the supramolecular chiral assembly. *Chem. - A Eur. J.* **10**, 5901–5910 (2004).
89. Gottarelli, G., Lena, S., Masiero, S., Pieraccini, S., & Spada, G. P. The use of circular dichroism spectroscopy for studying the chiral molecular self-assembly: an overview. *Chirality Pharmacol. Biol. Chem. Consequences Mol. Asymmetry* **20**, 471–485 (2008).
90. Xing, B. *et al.* Hydrophobic interaction and hydrogen bonding cooperatively confer a vancomycin hydrogel: A potential candidate for biomaterials. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14846–14847 (2002).
91. Bajar, B. T., Wang, E. S., Zhang, S., Lin, M. Z. & Chu, J. A guide to fluorescent protein FRET pairs. *Sensors (Switzerland)* **16**, 1–24 (2016).
92. Kapusta, P., Macháň, R., Benda, A. & Hof, M. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy (FLCS): Concepts, applications and outlook. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 12890–12910 (2012).
93. Contreras-Montoya, R. *et al.* Iron nanoparticles-based supramolecular hydrogels to originate anisotropic hybrid materials with enhanced mechanical

- strength. *Mater. Chem. Front.* **2**, 686–699 (2018).
94. Dresselhaus, M. S. & Eklund, P. C. Phonons in carbon nanotubes. *Adv. Phys.* **49**, 705–814 (2000).
95. Mittemeijer, E.J.; Welzel, U. S. *Modern Diffraction Methods*. (John Wiley & Sons, 2013).
96. Draper, E. R. *et al.* Using Small-Angle Scattering and Contrast Matching to Understand Molecular Packing in Low Molecular Weight Gels. *Matter* **2**, 764–778 (2020).
97. Yan, X., Zhu, P., & Li, J. Self-assembly and application of diphenylalanine-based nanostructures. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1877–1890 (2010).
98. Palmese, L. L., Thapa, R. K., Sullivan, M. O. & Kiick, K. L. Hybrid hydrogels for biomedical applications. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **24**, 143–157 (2019).
99. Buerkle, L. E. & Rowan, S. J. Supramolecular gels formed from multi-component low molecular weight species. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 6089–6102 (2012).
100. Mahapatra, R. D., Dey, J., & Weiss, R. G. Poly(vinyl alcohol)-induced thixotropy of an l-carnosine-based cytocompatible, tripeptidic hydrogel. *Soft Matter* **15**, 433–441 (2019).
101. Li, G., Wang, Y., Wang, L., Song, A. & Hao, J. Hydrogels of Superlong Helices to Synthesize Hybrid Ag-Helical Nanomaterials. *Langmuir* **32**, 12100–12109 (2016).
102. Adler-abramovich, L., Dvir, T. & Gazit, E. A Self-Healing, All-Organic, Conducting, Composite Peptide Hydrogel as Pressure Sensor and Electrogenic Cell Soft Substrate. *ACS Nano* **13**, 163–175 (2019).
103. Limón, D., Jiménez-Newman, C., Calpena, A. C., González-Campo, A., Amabilino, D. B., & Pérez-García, L. Microscale coiling in bis-imidazolium supramolecular hydrogel fibres induced by the release of a cationic serine

- protease inhibitor. *Chem. Commun* **53**, 4509–4512 (2017).
104. Cheng, B. *et al.* Cooperative Assembly of a Peptide Gelator and Silk Fibroin Afford an Injectable Hydrogel for Tissue Engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 12474–12484 (2018).
 105. San, B. H., Hwang, J., Sampath, S., Li, Y., Bennink, L. L., & Yu, S. M. Self-Assembled Water-Soluble Nano fibers Displaying Collagen Hybridizing Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 16640–16649 (2017).
 106. Li, H. *et al.* Folic Acid Derived Hydrogel Enhances the Survival and Promotes Therapeutic E ffi cacy of iPS Cells for Acute Myocardial Infarction. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 24459–24468 (2018).
 107. Zhan, H., & Löwik, D. W. A Hybrid Peptide Amphiphile Fiber PEG Hydrogel Matrix for 3D Cell Culture. *Adv. Funct. Mater.* **29**, 1808505 (2019).
 108. Thévenot, J., Oliveira, H., Sandre, O. & Lecommandoux, S. Magnetic responsive polymer composite materials. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7099–7116 (2013).
 109. Shin, M. K. *et al.* Controlled Magnetic Nanofiber Hydrogels by Clustering Ferritin. *Langmuir* **24**, 12107–12111 (2008).
 110. Beaune, G. & Ménager, C. Journal of Colloid and Interface Science In situ precipitation of magnetic fluid encapsulated in giant liposomes. *J. Colloid Interface Sci.* **343**, 396–399 (2010).
 111. Liang, Y., Zhang, L., Jiang, W. & Li, W. Embedding Magnetic Nanoparticles into Polysaccharide-Based Hydrogels for Magnetically Assisted Bioseparation. **510275**, 2367–2372 (2007).
 112. Bonhome-Espinosa, A. B. *et al.* Effect of particle concentration on the microstructural and macromechanical properties of biocompatible magnetic hydrogels. *Soft Matter* **13**, 2928–2941 (2017).
 113. Das, P., Yuran, S., Yan, J., Lee, P. S. & Reches, M. Sticky tubes and magnetic

- hydrogels co-assembled by a short peptide and melanin-like nanoparticles. *Chem. Commun.* **51**, 5432–5435 (2015).
114. Lakshmanan, A., Zhang, S. & Hauser, C. A. E. Short self-assembling peptides as building blocks for modern nanodevices. *Trends Biotechnol.* **30**, 155–165 (2012).
115. Rajagopal, K. & Schneider, J. P. Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 480–486 (2004).
116. Mann, S. Self-assembly and transformation of hybrid nano-objects and nanostructures under equilibrium and non-equilibrium conditions. *Nat. Mater.* **8**, 781–792 (2009).
117. Llusar, M. & Sanchez, C. Inorganic and hybrid nanofibrous materials templated with organogelators. *Chem. Mater.* **20**, 782–820 (2008).
118. Ono, Y., Nakashima, K., Sano, M., Kanekiyo, Y., Inoue, K., Shinkai, S., & Hojo, J. Organic gels are useful as a template for the preparation of hollow fiber silica. *Chem. Commun.* **14**, 1477–1478 (1998).
119. Ono, Y. *et al.* Organogels are useful as a template for the preparation of novel helical silica fibers. *J. Mater. Chem.* **11**, 2412–2419 (2001).
120. Ahmed, S., Mondal, J. H., Behera, N. & Das, D. Self-assembly of peptide-amphiphile forming helical nanofibers and in situ template synthesis of uniform mesoporous single wall silica nanotubes. *Langmuir* **29**, 14274–14283 (2013).
121. Wang, S. *et al.* Mechanistic process understanding of the self-assembling behaviour of asymmetric bolaamphiphilic short-peptides and their templating for silica and titania nanomaterials. *Nanoscale* **13**, 13318–13327 (2021).
122. Lee, H. *et al.* Redox-Active Tyrosine-Mediated Peptide Template for Large-Scale Single-Crystalline Two-Dimensional Silver Nanosheets. *ACS Nano* **14**, 1738–1744 (2020).

123. Georgakilas, V., Perman, J. A., Tucek, J. & Zboril, R. Broad Family of Carbon Nanoallotropes : Classification , Chemistry , and Applications of Fullerenes , Carbon Dots , Nanotubes , Graphene , Nanodiamonds , and Combined Superstructures. *Chem. Rev.* **115**, 4744–4822 (2015).
124. Mchedlov-petrosyan, N. O. Fullerenes in Liquid Media : An Unsettling Intrusion into the Solution Chemistry. *Chem. Rev.* **113**, 5149–5193 (2013).
125. Giordani, Silvia; Camisasca, Adalberto; Maffei, V. Carbon Nano-onions: A Valuable Class of Carbon Nanomaterials in Biomedicine. *Curr. Med. Chem.* **38**, 6915–6929 (2019).
126. Liu, J., Li, R. Liu, J., Li, R., & Yang, B. Carbon Dots : A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications. *ACS Cent. Sci.* **6**, 2179–2195 (2020).
127. Yang, F., Wang, M., Zhang, D., Yang, J., Zheng, M., & Li, Y. Chirality Pure Carbon Nanotubes : Growth , Sorting , and Characterization. *Chem. Rev.* **120**, 2693–2758 (2020).
128. Bottari, G., Herranz, M. Á., Wibmer, L., Volland, M., Rodríguez-Pérez, L., Guldi, D. M., & Torres, T. Chemical functionalization and characterization of graphene-based materials. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4464–4500 (2017).
129. Karousis, N., Suarez-Martinez, I., Ewels, C. P., & Tagmatarchis, N. Structure , Properties , Functionalization , and Applications of Carbon Nanohorns. *Chem. Rev.* **116**, 4850–4883 (2016).
130. Basso, L., Cazzanelli, M., Orlandi, M., & Miotello, A. Nanodiamonds: Synthesis and application in sensing, catalysis, and the possible connection with some processes occurring in space. *Appl. Sci.* **10**, 4094 (2020).
131. Rozhin, P., Charitidis, C. & Marchesan, S. Self-assembling peptides and carbon nanomaterials join forces for innovative biomedical applications. *Molecules* **26**, (2021).

132. Baughman, R. H., Zakhidov, A. A. & Heer, W. A. De. Carbon Nanotubes – the Route Toward Applications. *Science (80-.)*. **297**, 787–793 (2002).
133. Kaiser, A., Düsberg, G. & Roth, S. Heterogeneous model for conduction in carbon nanotubes. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **57**, 1418–1421 (1998).
134. Kim, G. *et al.* Magnetoresistance of an entangled single-wall carbon-nanotube network. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **58**, 16064–16069 (1998).
135. Jaiswal, M., Wang, W., Fernando, K. A. S., Sun, Y. P. & Menon, R. Magnetotransport in transparent single-wall carbon nanotube networks. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **76**, 2–5 (2007).
136. Wu, Y. *et al.* Application-Driven Carbon Nanotube Functional Materials. *ACS Nano* **15**, 7946–7974 (2021).
137. Tong, T., Wang, L., You, X., & Wu, J. Nano and microscale delivery platforms for enhanced oral peptide/protein bioavailability. *Biomater. Sci.* **8**, 5804–5823 (2020).
138. Katyal, P., Mahmoudinobar, F. & Montclare, J. K. ScienceDirect Recent trends in peptide and protein-based hydrogels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **63**, 97–105 (2020).
139. Iglesias, Daniel; Bosi, Susanna; Melchionna, Michele; Da Ros, Tatiana; Marchesan, S. The Glitter of Carbon Nanostructures in Hybrid/Composite Hydrogels for Medicinal Use. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 1976–1989 (2016).
140. Iglesias, D. *et al.* Oxidized Nanocarbons-Tripeptide Supramolecular Hydrogels: Shape Matters. *ACS Nano* **12**, 5530–5538 (2018).
141. Guilbaud-Chéreau, C. *et al.* Protected Amino Acid-Based Hydrogels Incorporating Carbon Nanomaterials for Near-Infrared Irradiation-Triggered Drug Release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 13147–13157 (2019).

142. Feliciano, A. J., van Blitterswijk, C., Moroni, L. & Baker, M. B. Realizing tissue integration with supramolecular hydrogels. *Acta Biomater.* **124**, 1–14 (2021).
143. Webber, M. J., Appel, E. A., Meijer, E. W. & Langer, R. Supramolecular biomaterials. *Nat. Mater.* **15**, 13–26 (2015).
144. Silva, G. A. *et al.* Selective Differentiation of Neural Progenitor Cells by High – Epitope Density Nanofibers. *Science (80-.).* **303**, 1352–1356 (2004).
145. Pierschbacher, M. D., & Ruoslahti, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**, 30–33 (1984).
146. Quan, C. *et al.* Bioactive gel self-assembled from phosphorylate biomimetic peptide: A potential scaffold for enhanced osteogenesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **121**, 1054–1060 (2019).
147. Zhou, S. *et al.* Bioactive peptide amphiphile nanofiber gels enhance burn wound healing. *Burns* **45**, 1112–1121 (2019).
148. Zhou, M. *et al.* Biomaterials Self-assembled peptide-based hydrogels as scaffolds for anchorage- dependent cells. *Biomaterials* **30**, 2523–2530 (2009).
149. Aye, S. S. S. *et al.* Scaffolds formed via the non-equilibrium supramolecular assembly of the synergistic ECM peptides RGD and PHSRN demonstrate improved cell attachment in 3D. *Polymers (Basel)*. **10**, 690 (2018).
150. Mohr, A., H. R. Supramolecular Drug-Delivery Systems. in *Applications of Supramolecular Chemistry* 341–362 (CRC Press, 2012).
151. Ficai, D., & Grumezescu, A. M. *Nanostructures for novel therapy: synthesis, characterization and applications.* (Elsevier, 2017).
152. Zarzhitsky, S. & Rapaport, H. Journal of Colloid and Interface Science The interactions between doxorubicin and amphiphilic and acidic β -sheet peptides towards drug delivery hydrogels. *J. Colloid Interface Sci.* **360**, 525–531

- (2011).
153. Liu, Y., Ran, Y., Ge, Y., Raza, F., Li, S., Zafar, H., & Li, F. pH-Sensitive Peptide Hydrogels as a Combination Drug Delivery System for Cancer Treatment. *Pharmaceutics* **14**, 652 (2022).
 154. Veloso, S. R. S. *et al.* Novel dehydropeptide-based magnetogels containing manganese ferrite nanoparticles as antitumor drug nanocarriers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **21**, 10377–10390 (2019).
 155. Sun, Y., Nan, D., Jin, H. & Qu, X. Recent advances of injectable hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. *Polym. Test.* **81**, 106283 (2020).
 156. Piantanida, E., Alonci, G., Bertucci, A. & De Cola, L. Design of Nanocomposite Injectable Hydrogels for Minimally Invasive Surgery. *Acc. Chem. Res.* **52**, 2101–2112 (2019).
 157. Toledano, S., Williams, R. J., Jayawarna, V. & Ulijn, R. V. Enzyme-triggered self-assembly of peptide hydrogels via reversed hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1070–1071 (2006).
 158. Uman, S., Dhand, A. & Burdick, J. A. Recent advances in shear-thinning and self-healing hydrogels for biomedical applications. *J. Appl. Polym. Sci.* **137**, 1–20 (2020).
 159. Cai, L., Liu, S., Guo, J. & Jia, Y. G. Polypeptide-based self-healing hydrogels: Design and biomedical applications. *Acta Biomater.* **113**, 84–100 (2020).
 160. Das, A. K. & Gavel, P. K. Low molecular weight self-assembling peptide-based materials for cell culture, antimicrobial, anti-inflammatory, wound healing, anticancer, drug delivery, bioimaging and 3D bioprinting applications. *Soft Matter* **16**, 10065–10095 (2020).
 161. Salick, D. A., Kretsinger, J. K., Pochan, D. J., & Schneider, J. P. Inherent Antibacterial Activity of a Peptide-Based -Hairpin Hydrogel. *J. Am. Chem. Soc.*

- 129, 14793–14799 (2007).
162. Ma, Q. Q. *et al.* Rational design of cationic antimicrobial peptides by the tandem of leucine-rich repeat. *Amino Acids* **44**, 1215–1224 (2013).
163. Ahmad, A., Azmi, S. & Ghosh, J. K. Studies on the assembly of a leucine zipper antibacterial peptide and its analogs onto mammalian cells and bacteria. *Amino Acids* **40**, 749–759 (2011).
164. Irwansyah, I. *et al.* Gram-Positive Antimicrobial Activity of Amino Acid-Based Hydrogels. *Adv. Mater.* **27**, 648–654 (2015).
165. Nitschke, J. R. Systems chemistry: Molecular networks come of age. *Nature* **462**, 736–738 (2009).
166. Aida, T., Meijer, E. W. & Stupp, S. I. Functional supramolecular polymers. *Science (80-.)*. **335**, 813–817 (2012).
167. Mattia, E. & Otto, S. Supramolecular systems chemistry. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 111–119 (2015).
168. Petkau-Milroy, K. & Brunsveld, L. Supramolecular chemical biology; Bioactive synthetic self-assemblies. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 219–232 (2013).
169. Lehn, J. M. Towards complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization. *Eur. Rev.* **17**, 263–280 (2009).
170. Weber, K. T., Sun, Y., Tyagi, S. C. & Cleutjens, J. P. M. Collagen network of the myocardium: Function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **26**, 279–292 (1994).
171. Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M. & Dobson, C. M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 384–396 (2014).
172. Korevaar, P. A. *et al.* Pathway complexity in supramolecular polymerization. *Nature* **481**, 492–496 (2012).

173. Korevaar, P. A., De Greef, T. F. A. & Meijer, E. W. Pathway complexity in π -conjugated materials. *Chem. Mater.* **26**, 576–586 (2014).
174. Fukui, T. *et al.* Control over differentiation of a metastable supramolecular assembly in one and two dimensions. *Nat. Chem.* **9**, 493–499 (2017).
175. Zhang, S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1171–1178 (2003).
176. Burnworth, M. *et al.* Optically healable supramolecular polymers. *Nature* **472**, 334–337 (2011).
177. Liu, Y., Wang, Z. & Zhang, X. Characterization of supramolecular polymers. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 5922–5932 (2012).
178. Döring, A., Birnbaum, W. & Kuckling, D. Responsive hydrogels – structurally and dimensionally optimized smart frameworks for applications in catalysis, micro-system technology and material science. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7391–7420 (2013).
179. Jones, C. D. & Steed, J. W. Gels with sense: Supramolecular materials that respond to heat, light and sound. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 6546–6596 (2016).
180. Wang, A., Shi, W., Huang, J. & Yan, Y. Adaptive soft molecular self-assemblies. *Soft Matter* **12**, 337–357 (2016).
181. Fichman, G. *et al.* Supramolecular Chemistry: Spontaneous structural transition and crystal formation in minimal supramolecular polymer model. *Sci. Adv.* **2**, 1–11 (2016).
182. Do, T. D., Kincannon, W. M. & Bowers, M. T. Phenylalanine oligomers and fibrils: The mechanism of assembly and the importance of tetramers and counterions. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 10080–10083 (2015).
183. Huang, X., Raghavan, S. R., Terech, P. & Weiss, R. G. Distinct kinetic pathways generate organogel networks with contrasting fractality and thixotropic

- properties. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15341–15352 (2006).
184. Ten Wolde, P. R. & Frenkel, D. Enhancement of protein crystal nucleation by critical density fluctuations. *Science (80-.)*. **277**, 1975–1978 (1997).
185. Knowles, T. P. J. *et al.* An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science (80-.)*. **326**, 1533–1537 (2009).
186. Adamcik, J. *et al.* Understanding amyloid aggregation by statistical analysis of atomic force microscopy images. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 423–428 (2010).
187. Cohen, S. I. A. *et al.* Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 9758–9763 (2013).
188. Morel, B., Carrasco, M. P., Jurado, S., Marco, C. & Conejero-Lara, F. Dynamic micellar oligomers of amyloid beta peptides play a crucial role in their aggregation mechanisms. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 20597–20614 (2018).
189. Sang, J. C. *et al.* Direct observation of prion protein oligomer formation reveals an aggregation mechanism with multiple conformationally distinct species. *Chem. Sci.* **10**, 4588–4597 (2019).
190. Michaels, T. C. T. *et al.* Dynamics of oligomer populations formed during the aggregation of Alzheimer's A β 42 peptide. *Nat. Chem.* **12**, 445–451 (2020).
191. Wei, G. *et al.* Self-assembling peptide and protein amyloids: From structure to tailored function in nanotechnology. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4661–4708 (2017).
192. Yuan, C. *et al.* Hierarchically oriented organization in supramolecular peptide crystals. *Nat. Rev. Chem.* **3**, 567–588 (2019).
193. Levin, A. *et al.* Biomimetic peptide self-assembly for functional materials. *Nat. Rev. Chem.* **4**, 615–634 (2020).
194. Lampel, A. Biology-Inspired Supramolecular Peptide Systems. *Chem* **6**, 1222–1236 (2020).

195. Levin, A. *et al.* Ostwalds rule of stages governs structural transitions and morphology of dipeptide supramolecular polymers. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
196. Yuan, C. *et al.* Nucleation and Growth of Amino Acid and Peptide Supramolecular Polymers through Liquid–Liquid Phase Separation. *Angew. Chemie* **131**, 18284–18291 (2019).
197. Albertazzi, L. *et al.* Probing exchange pathways in one-dimensional aggregates with super-resolution microscopy. *Science (80-.)*. **344**, 491–495 (2014).
198. Aliprandi, A., Mauro, M. & De Cola, L. Controlling and imaging biomimetic self-assembly. *Nat. Chem.* **8**, 10–15 (2016).
199. Onogi, S. *et al.* In situ real-time imaging of self-sorted supramolecular nanofibres. *Nat. Chem.* **8**, 743–752 (2016).
200. Liang, Y., Lynn, D. G. & Berland, K. M. Direct observation of nucleation and growth in amyloid self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6306–6308 (2010).
201. Huang, Z., Jiang, T., Wang, J., Ma, X. & Tian, H. Real-Time Visual Monitoring of Kinetically Controlled Self-Assembly. *Angew. Chemie* **133**, 2891–2896 (2021).
202. Ji, W. *et al.* Metal-Ion Modulated Structural Transformation of Amyloid-Like Dipeptide Supramolecular Self-Assembly. *ACS Nano* **13**, 7300–7309 (2019).
203. Shao, T., Falcone, N. & Kraatz, H. B. Supramolecular Peptide Gels: Influencing Properties by Metal Ion Coordination and Their Wide-Ranging Applications. *ACS Omega* **5**, 1312–1317 (2020).
204. Pal, V. K. & Roy, S. Cooperative Metal Ion Coordination to the Short Self-Assembling Peptide Promotes Hydrogelation and Cellular Proliferation. *Macromol. Biosci.* **2100462**, 1–17 (2022).
205. Adler-Abramovich, L. & Gazit, E. The physical properties of supramolecular peptide assemblies: From building block association to technological applications. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 6881–6893 (2014).

206. Colquhoun, C. *et al.* The effect of self-sorting and co-assembly on the mechanical properties of low molecular weight hydrogels. *Nanoscale* **6**, 13719–13725 (2014).
207. Panja, S., Dietrich, B., Shebanova, O., Smith, A. J. & Adams, D. J. Programming Gels Over a Wide pH Range Using Multicomponent Systems. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **60**, 9973–9977 (2021).
208. Panja, S., Seddon, A. & Adams, D. J. Controlling hydrogel properties by tuning non-covalent interactions in a charge complementary multicomponent system. *Chem. Sci.* **12**, 11197–11203 (2021).
209. Giuri, D. *et al.* Exploiting and controlling gel-to-crystal transitions in multicomponent supramolecular gels. *Chem. Sci.* **12**, 9720–9725 (2021).
210. Ardon, H. A. M. *et al.* Kinetically Controlled Coassembly of Multichromophoric Peptide Hydrogelators and the Impacts on Energy Transport. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 8685–8692 (2017).
211. Wijerathne, N. K., Kumar, M. & Ulijn, R. V. Fmoc-Dipeptide/Porphyrin Molar Ratio Dictates Energy Transfer Efficiency in Nanostructures Produced by Biocatalytic Co-Assembly. *Chem. - A Eur. J.* **25**, 11847–11851 (2019).
212. Brito, A. *et al.* Minimalistic supramolecular proteoglycan mimics by co-assembly of aromatic peptide and carbohydrate amphiphiles. *Chem. Sci.* **10**, 2385–2390 (2019).
213. Adelizzi, B., Van Zee, N. J., De Windt, L. N. J., Palmans, A. R. A. & Meijer, E. W. Future of Supramolecular Copolymers Unveiled by Reflecting on Covalent Copolymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 6110–6121 (2019).
214. Sijbesma, R. P. *et al.* Reversible polymers formed from self-complementary monomers using quadruple hydrogen bonding. *Science (80-.)*. **278**, 1601–1604 (1997).
215. Sivakova, S. & Rowan, S. J. Nucleobases as supramolecular motifs. *Chem. Soc.*

- Rev.* **34**, 9–21 (2005).
216. Das, A. & Ghosh, S. Supramolecular assemblies by charge-transfer interactions between donor and acceptor chromophores. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 2038–2054 (2014).
217. Taatjes, C. A. *et al.* mechanism in the troposphere (33). Current tropospheric models underpredict HO. *Science (80-.)*. **347**, 646–651 (2015).
218. Ogi, S., Sugiyasu, K., Manna, S., Samitsu, S. & Takeuchi, M. Living supramolecular polymerization realized through a biomimetic approach. *Nat. Chem.* **6**, 188–195 (2014).
219. Ogi, S., Stepanenko, V., Sugiyasu, K., Takeuchi, M. & Würthner, F. Mechanism of self-assembly process and seeded supramolecular polymerization of perylene bisimide organogelator. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 3300–3307 (2015).
220. Görl, D., Zhang, X., Stepanenko, V. & Würthner, F. Supramolecular block copolymers by kinetically controlled co-self-assembly of planar and core-twisted perylene bisimides. *Nat. Commun.* **6**, 1–8 (2015).
221. Tantakitti, F. *et al.* Energy landscapes and functions of supramolecular systems. *Nat. Mater.* **15**, 469–476 (2016).
222. Ryan, D. M., Doran, T. M. & Nilsson, B. L. Complementary π - π Interactions induce multicomponent coassembly into functional fibrils. *Langmuir* **27**, 11145–11156 (2011).
223. Raymond, D. M. & Nilsson, B. L. Multicomponent peptide assemblies. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 3659–3720 (2018).
224. Tang, Y., Yao, Y. & Wei, G. Expanding the structural diversity of peptide assemblies by coassembling dipeptides with diphenylalanine. *Nanoscale* **12**, 3038–3049 (2020).
225. Chakraborty, P. *et al.* Co-Assembly between Fmoc Diphenylalanine and

- Diphenylalanine within a 3D Fibrous Viscous Network Confers Atypical Curvature and Branching. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **59**, 23731–23739 (2020).
226. Ji, W. *et al.* Coassembly-Induced Transformation of Dipeptide Amyloid-Like Structures into Stimuli-Responsive Supramolecular Materials. *ACS Nano* **14**, 7181–7190 (2020).
227. Fleming, S. & Ulijn, R. V. Design of nanostructures based on aromatic peptide amphiphiles. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 8150–8177 (2014).
228. Fleming, S., Debnath, S., Frederix, P. W. J. M., Hunt, N. T. & Ulijn, R. V. Insights into the coassembly of hydrogelators and surfactants based on aromatic peptide amphiphiles. *Biomacromolecules* **15**, 1171–1184 (2014).
229. Draper, E. R., Wallace, M., Schweins, R., Poole, R. J. & Adams, D. J. Nonlinear Effects in Multicomponent Supramolecular Hydrogels. *Langmuir* **33**, 2387–2395 (2017).
230. Mañas-Torres, M. C. *et al.* In situ real-time monitoring of the mechanism of self-assembly of short peptide supramolecular polymers. *Mater. Chem. Front.* **5**, 5452–5462 (2021).
231. Fueyo-González, F. *et al.* Environment-Sensitive Probes for Illuminating Amyloid Aggregation in Vitro and in Zebrafish. *ACS Sensors* **5**, 2792–2799 (2020).
232. Chen, L. *et al.* Salt-induced hydrogelation of functionalised-dipeptides at high pH. *Chem. Commun.* **47**, 12071–12073 (2011).
233. Cardoso, A. Z. *et al.* Linking micellar structures to hydrogelation for salt-triggered dipeptide gelators. *Soft Matter* **12**, 3612–3621 (2016).
234. McAulay, K. *et al.* Controlling the properties of the micellar and gel phase by varying the counterion in functionalised-dipeptide systems. *Chem. Commun.* **56**, 4094–4097 (2020).

235. Tang, C., Smith, A. M., Collins, R. F., Ulijn, R. V. & Saiani, A. Fmoc-Diphenylalanine Self-ASsembly Mechanism Induces Apparent pK_a Shifts. *Langmuir* **25**, 9447–9453 (2009).
236. Fleming, S. *et al.* Assessing the utility of infrared spectroscopy as a structural diagnostic tool for β -sheets in self-assembling aromatic peptide amphiphiles. *Langmuir* **29**, 9510–9515 (2013).
237. Chen, L., McDonald, T. O. & Adams, D. J. Salt-induced hydrogels from functionalised-dipeptides. *RSC Adv.* **3**, 8714–8720 (2013).
238. Raeburn, J. *et al.* Fmoc-diphenylalanine hydrogels: Understanding the variability in reported mechanical properties. *Soft Matter* **8**, 1168–1174 (2012).
239. Alakpa, E. V. *et al.* Tunable Supramolecular Hydrogels for Selection of Lineage-Guiding Metabolites in Stem Cell Cultures. *Chem* **1**, 298–319 (2016).
240. Borzacchiello, A., Della Sala, F. & Ambrosio, L. A. Rheometry of polymeric biomaterials. in *Characterization of polymeric biomaterials* 233–253 (Elsevier, 2017).
241. Jayawarna, V. *et al.* Nanostructured hydrogels for three-dimensional cell culture through self-assembly of fluorenylmethoxycarbonyl-dipeptides. *Adv. Mater.* **18**, 611–614 (2006).
242. Arias, S., Rodríguez, R., Quiñoá, E., Riguera, R. & Freire, F. Chiral Coalition in Helical Sense Enhancement of Copolymers: The Role of the Absolute Configuration of Comonomers. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 667–674 (2018).
243. García, F. & Sánchez, L. Structural rules for the chiral supramolecular organization of OPE-based discotics: Induction of helicity and amplification of chirality. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 734–742 (2012).
244. Lekha, P. K., Ghosh, T. & Prasad, E. Utilizing dendritic scaffold for feasible formation of naphthalene excimer. *J. Chem. Sci.* **123**, 919–926 (2011).

245. Zhang, H. *et al.* Conformational switching fluorescent chemodosimeter for the selective detection of silver(i) ions. *New J. Chem.* **33**, 1478–1481 (2009).
246. Chen, L., Revel, S., Morris, K. & Adams, D. J. Energy transfer in self-assembled dipeptide hydrogels. *Chem. Commun.* **46**, 4267–4269 (2010).
247. Chen, L. *et al.* Self-assembly mechanism for a naphthalene-dipeptide leading to hydrogelation. *Langmuir* **26**, 5232–5242 (2010).
248. Yang, Z., Liang, G., Ma, M., Gao, Y. & Xu, B. Conjugates of naphthalene and dipeptides produce molecular hydrogelators with high efficiency of hydrogelation and superhelical nanofibers. *J. Mater. Chem.* **17**, 850–854 (2007).
249. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
250. Rüttinger, S., Kapusta, P., Patting, M., Wahl, M. & Macdonald, R. On the resolution capabilities and limits of fluorescence lifetime correlation spectroscopy (FLCS) measurements. *J. Fluoresc.* **20**, 105–114 (2010).
251. Chai, J. Da & Head-Gordon, M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 6615–6620 (2008).
252. Hay, P. J. & Wadt, W. R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.* **82**, 270–283 (1985).
253. Tomasi, J., Mennucci, B. & Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* **105**, 2999–3093 (2005).
254. Boys, S. F. & Bernardi, F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Mol. Phys.* **19**, 553–566 (1970).
255. Schrödinger. *Maestro, Schrödinger.* (2019).

256. Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
257. Phillips, J. C. *et al.* Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J. Chem. Phys.* **153**, 044130 (2020).
258. Jorgensen, W. L. & Tirado-Rives, J. Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6665–6670 (2005).
259. Dodda, L. S., De Vaca, I. C., Tirado-Rives, J. & Jorgensen, W. L. LigParGen web server: An automatic OPLS-AA parameter generator for organic ligands. *Nucleic Acids Res.* **45**, W331–W336 (2017).
260. Dodda, L. S., Vilseck, J. Z., Tirado-Rives, J. & Jorgensen, W. L. 1.14*CM1A-LBCC: Localized Bond-Charge Corrected CM1A Charges for Condensed-Phase Simulations. *J. Phys. Chem. B* **121**, 3864–3870 (2017).
261. Robertson, M. J.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Improved Peptide and Protein Torsional Energetics with the OPLS-AA Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3499–3509 (2015).
262. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G. & Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327–341 (1977).
263. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An N·log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089–10092 (1993).
264. Bussi, G., Donadio, D. & Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **126**, 014101-1-014101-7 (2007).
265. Parrinello, M. & Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **52**, 7182–7190 (1981).
266. Tuckerman, M., Berne, B. J. & Martyna, G. J. Reversible multiple time scale

- molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* **97**, 1990–2001 (1992).
267. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935 (1983).
268. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
269. Kretlow, J. D., Klouda, L. & Mikos, A. G. Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 263–273 (2007).
270. Li, Y., Yang, H. Y. & Lee, D. S. Biodegradable and Injectable Hydrogels in Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **330**, 151–160 (2021).
271. Guvendiren, M., Lu, H. D. & Burdick, J. A. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. *Soft Matter* **8**, 260–272 (2012).
272. Haines-Butterick, L. *et al.* Controlling hydrogelation kinetics by peptide design for three-dimensional encapsulation and injectable delivery of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7791–7796 (2007).
273. Yan, C. *et al.* Injectable solid hydrogel: Mechanism of shear-thinning and immediate recovery of injectable β -hairpin peptide hydrogels. *Soft Matter* **6**, 5143–5156 (2010).
274. Yan, C. *et al.* Injectable solid peptide hydrogel as a cell carrier: Effects of shear flow on hydrogels and cell payload. *Langmuir* **28**, 6076–6087 (2012).
275. Thota, C. K., Yadav, N. & Chauhan, V. S. A novel highly stable and injectable hydrogel based on a conformationally restricted ultrashort peptide. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
276. Muir, V. G. & Burdick, J. A. Chemically Modified Biopolymers for the Formation of Biomedical Hydrogels. *Chem. Rev.* **121**, 10908–10949 (2021).
277. Aviv, M. *et al.* Improving the Mechanical Rigidity of Hyaluronic Acid by

- Integration of a Supramolecular Peptide Matrix. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 41883–41891 (2018).
278. Lopez-Lopez, M. T. *et al.* Generation and characterization of novel magnetic field-responsive biomaterials. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
279. Weber, A. & Murray, J. M. Molecular control mechanisms in muscle contraction. *Physiol. Rev.* **53**, 612–672 (1973).
280. Huxley, A. F. The Journal of Physiology, Vol. 243, No. 1 Frontispiece. *J Physiol* **243**, 1–43 (1974).
281. Madison, K. C. Barrier function of the skin: ‘La Raison d’Être’ of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 231–241 (2003).
282. Proksch, E., Brandner, J. M. & Jensen, J. M. The skin: An indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* **17**, 1063–1072 (2008).
283. Poole, A. R. *et al.* Composition and structure of articular cartilage: A template for tissue repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **391**, 26–33 (2001).
284. Sophia Fox, A. J., Bedi, A. & Rodeo, S. A. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health* **1**, 461–468 (2009).
285. Bonhome-Espinosa, A. B. *et al.* Effect of particle concentration on the microstructural and macromechanical properties of biocompatible magnetic hydrogels. *Soft Matter* **13**, 2928–2941 (2017).
286. Rodriguez-Arco, L. *et al.* Biocompatible magnetic core-shell nanocomposites for engineered magnetic tissues. *Nanoscale* **8**, 8138–8150 (2016).
287. de Santis, R. *et al.* A route toward the development of 3D magnetic scaffolds with tailored mechanical and morphological properties for hard tissue regeneration: Preliminary study: A basic approach toward the design of 3D rapid prototyped magnetic scaffolds for hard-tissue reg. *Virtual Phys. Prototyp.* **6**, 189–195 (2011).

288. Bañobre-López, M. *et al.* Poly(caprolactone) based magnetic scaffolds for bone tissue engineering. *J. Appl. Phys.* **109**, 1–4 (2011).
289. Singh, R. K. *et al.* Potential of magnetic nanofiber scaffolds with mechanical and biological properties applicable for bone regeneration. *PLoS One* **9**, e91584 (2014).
290. Perez, R. A., Patel, K. D. & Kim, H. W. Novel magnetic nanocomposite injectables: Calcium phosphate cements impregnated with ultrafine magnetic nanoparticles for bone regeneration. *RSC Adv.* **5**, 13411–13419 (2015).
291. Seo YG, Park HJ, Kim YM, Park JG, Kim SH, K. M. *et al.* Method for bone regeneration with maximum treatment efficiency using electromagnetic field of magnetic nanoparticle. WO2015050315 A2 (2015).
292. Hao, S. *et al.* Macrophage phenotypic mechanomodulation of enhancing bone regeneration by superparamagnetic scaffold upon magnetization. *Biomaterials* **140**, 16–25 (2017).
293. Yun, H. M. *et al.* Magnetic nanocomposite scaffolds combined with static magnetic field in the stimulation of osteoblastic differentiation and bone formation. in *Biomaterials* 88–98 (Elsevier, 2016).
294. Tomás, A. R. *et al.* Magneto-mechanical actuation of magnetic responsive fibrous scaffolds boosts tenogenesis of human adipose stem cells. *Nanoscale* **11**, 18255–18271 (2019).
295. Zhang, N., Lock, J., Sallee, A. & Liu, H. Magnetic Nanocomposite Hydrogel for Potential Cartilage Tissue Engineering: Synthesis, Characterization, and Cytocompatibility with Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 20987–20998 (2015).
296. Mitsumata, T., Honda, A., Kanazawa, H. & Kawai, M. Magnetically tunable elasticity for magnetic hydrogels consisting of carrageenan and carbonyl iron particles. *J. Phys. Chem. B* **116**, 12341–12348 (2012).

297. Bonhome-Espinosa, A. B. *et al.* In vitro characterization of a novel magnetic fibrin-agarose hydrogel for cartilage tissue engineering. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **104**, (2020).
298. Chatterjee, J., Bettge, M., Haik, Y. & Jen Chen, C. Synthesis and characterization of polymer encapsulated Cu-Ni magnetic nanoparticles for hyperthermia applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **293**, 303–309 (2005).
299. Sommerfeldt, D. & Rubin, C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur. Spine J.* **10**, 86–95 (2001).
300. Weiner, S. & Wagner, H. D. The material bone: Structure-mechanical function relations. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **28**, 271–298 (1998).
301. Wegst, U. G. K., Bai, H., Saiz, E., Tomsia, A. P. & Ritchie, R. O. Bioinspired structural materials. *Nat. Mater.* **14**, 23–36 (2015).
302. George, A. & Veis, A. Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chem. Rev.* **108**, 4670–4693 (2008).
303. Martínez-Casado, F. J. *et al.* Bioinspired Citrate-Apatite Nanocrystals Doped with Divalent Transition Metal Ions. *Cryst. Growth Des.* **16**, 145–153 (2016).
304. Sprio, S. *et al.* Bone substitutes based on biomineralization. in *Bone Substitute Biomaterials* 3–29 (Elsevier, 2014).
305. Vieira, V. M. P., Hay, L. L. & Smith, D. K. Multi-component hybrid hydrogels—understanding the extent of orthogonal assembly and its impact on controlled release. *Chem. Sci.* **8**, 6981–6990 (2017).
306. Cavalli, S., Albericio, F. & Kros, A. Amphiphilic peptides and their cross-disciplinary role as building blocks for nanoscience. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 241–263 (2010).
307. Mitchison, T. J. *et al.* Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers. **294**, 1684–1689 (2001).

308. Schnepf, Z. A. C., Gonzalez-McQuire, R. & Mann, S. Hybrid biocomposites based on calcium phosphate mineralization of self-assembled supramolecular hydrogels. *Adv. Mater.* **18**, 1869–1872 (2006).
309. Ghosh, M. *et al.* Arginine-Presenting Peptide Hydrogels Decorated with Hydroxyapatite as Biomimetic Scaffolds for Bone Regeneration. *Biomacromolecules* **18**, 3541–3550 (2017).
310. Newcomb, C. J., Bitton, R., Velichko, Y. S., Snead, M. L. & Stupp, S. I. The role of nanoscale architecture in supramolecular templating of biomimetic hydroxyapatite mineralization. *Small* **8**, 2195–2202 (2012).
311. Zhang, R. & Ma, P. X. Biomimetic polymer/apatite composite scaffolds for mineralized tissue engineering. *Macromol. Biosci.* **4**, 100–111 (2004).
312. Wei, G. & Ma, P. X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **25**, 4749–4757 (2004).
313. Nudelman, F. & Sommerdijk, N. A. J. M. Biomineralization as an inspiration for materials chemistry. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 6582–6596 (2012).
314. Boskey, A. L. Biomineralization : Conflicts , Challenges , and Opportunities. **91**, 83–91 (1998).
315. Ramírez Rodríguez, G., Patrício, T. & Delgado López, J. Natural polymers for bone repair. in *Bone Repair Biomaterials* 199–232 (Elsevier, 2019).
316. Wang, Y. *et al.* The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nat. Mater.* **11**, 724–733 (2012).
317. Delgado-López, J. M. *et al.* Crystallization of bioinspired citrate-functionalized nanoapatite with tailored carbonate content. *Acta Biomater.* **8**, 3491–3499 (2012).
318. Delgado-López, J. M. *et al.* Crystal size, morphology, and growth mechanism

- in bio-inspired apatite nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* **24**, 1090–1099 (2014).
319. Delgado-López, J. M. *et al.* Crystallization of bioinspired citrate-functionalized nanoapatite with tailored carbonate content. *Acta Biomater.* **8**, 3491–3499 (2012).
320. Hu, Y. Y., Rawal, A. & Schmidt-Rohr, K. Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 22425–22429 (2010).
321. Gómez-Morales, J., Iafisco, M., Delgado-López, J. M., Sarda, S. & Drouet, C. Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **59**, 1–46 (2013).
322. Ramírez-Rodríguez, G. B. *et al.* Biomimetic mineralization of recombinant collagen type I derived protein to obtain hybrid matrices for bone regeneration. *J. Struct. Biol.* **196**, 138–146 (2016).
323. Ramírez-Rodríguez, G. B. *et al.* Biomimetic mineralization promotes viability and differentiation of human mesenchymal stem cells in a perfusion bioreactor. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–15 (2021).
324. Contreras-Montoya, R. *et al.* Catalytic and Electron Conducting Carbon Nanotube-Reinforced Lysozyme Crystals. *Adv. Funct. Mater.* **29**, 1–10 (2019).
325. Lu, H., Khan, A. & Smirniotis, P. G. Relationship between structural properties and CO₂ capture performance of CaO-based sorbents obtained from different organometallic precursors. *Ind. Eng. Chem. Res.* **47**, 6216–6220 (2008).
326. Zhang, Y., Guo, L., Zhu, X. & Sun, X. The Application of Organic Semiconductor Materials in Spintronics. *Front. Chem.* **8**, 1–8 (2020).
327. Naaman, R., Paltiel, Y. & Waldeck, D. H. Chiral molecules and the electron spin. *Nat. Rev. Chem.* **3**, 250–260 (2019).

328. Waldeck, D. H., Naaman, R. & Paltiel, Y. The spin selectivity effect in chiral materials. *APL Mater.* **9**, (2021).
329. Aiello, C. D. *et al.* A Chirality-Based Quantum Leap. *ACS Nano* **16**, 4989–5035 (2022).
330. Sharma, P. How to create a spin current. *Science (80-.)*. **307**, 531–533 (2005).
331. Huizi-Rayo, U. *et al.* An Ideal Spin Filter: Long-Range, High-Spin Selectivity in Chiral Helicoidal 3-Dimensional Metal Organic Frameworks. *Nano Lett.* **20**, 8476–8482 (2020).
332. Yang, X., Van Der Wal, C. H. & Van Wees, B. J. Detecting Chirality in Two-Terminal Electronic Nanodevices. *Nano Lett.* **20**, 6148–6154 (2020).
333. Xie, Z. *et al.* Spin specific electron conduction through DNA oligomers. *Nano Lett.* **11**, 4652–4655 (2011).
334. Kettner, M. *et al.* Spin Filtering in Electron Transport Through Chiral Oligopeptides. *J. Phys. Chem. C* **119**, 14542–14547 (2015).
335. Kiran, V. *et al.* Helicenes - A New Class of Organic Spin Filter. *Adv. Mater.* **28**, 1957–1962 (2016).
336. Mishra, S. *et al.* Spin Filtering Along Chiral Polymers. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **59**, 14671–14676 (2020).
337. Mondal, A. K. *et al.* Long-Range Spin-Selective Transport in Chiral Metal-Organic Crystals with Temperature-Activated Magnetization. *ACS Nano* **14**, 16624–16633 (2020).
338. Kulkarni, C. *et al.* Highly Efficient and Tunable Filtering of Electrons' Spin by Supramolecular Chirality of Nanofiber-Based Materials. *Adv. Mater.* **32**, 1–7 (2020).
339. Michaeli, K., Varade, V., Naaman, R. & Waldeck, D. H. A new approach towards spintronics-spintronics with no magnets. *J. Phys. Condens. Matter* **29**,

- (2017).
340. Fiori, G. *et al.* Electronics based on two-dimensional materials. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 768–779 (2014).
341. Ferrari, A. C. *et al.* Science and technology roadmap for graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems. *Nanoscale* **7**, 4598–4810 (2015).
342. Cottet, A. *et al.* Nanospintronics with carbon nanotubes. *Semicond. Sci. Technol.* **21**, S78–S95 (2006).
343. Hueso, L. E. *et al.* Transformation of spin information into large electrical signals using carbon nanotubes. *Nature* **445**, 410–413 (2007).
344. Gao, C., Guo, Z., Liu, J. H. & Huang, X. J. The new age of carbon nanotubes: An updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors. *Nanoscale* **4**, 1948–1963 (2012).
345. Marchesan, S., Melchionna, M. & Prato, M. Wire Up on Carbon Nanostructures! How To Play a Winning Game. *ACS Nano* **9**, 9441–9450 (2015).
346. Adorinni, S., Rozhin, P. & Marchesan, S. Smart hydrogels meet carbon nanomaterials for new frontiers in medicine. *Biomedicines* **9**, 1–22 (2021).
347. Tournus, F., Latil, S., Heggie, M. I. & Charlier, J. C. Π -Stacking Interaction Between Carbon Nanotubes and Organic Molecules. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **72**, 1–5 (2005).
348. Cousins, B. G. *et al.* Enzyme-activated surfactants for dispersion of carbon nanotubes. *Small* **5**, 587–590 (2009).
349. Rahman, M. W., Firouzeh, S., Mujica, V. & Pramanik, S. Carrier Transport Engineering in Carbon Nanotubes by Chirality-Induced Spin Polarization. *ACS Nano* **14**, 3389–3396 (2020).
350. Alam, K. M. & Pramanik, S. Spin filtering through single-wall carbon nanotubes functionalized with single-stranded DNA. *Adv. Funct. Mater.* **25**,

- 3210–3218 (2015).
351. Alam, K. M. & Pramanik, S. Spin filtering with poly-T wrapped single wall carbon nanotubes. *Nanoscale* **9**, 5155–5163 (2017).
352. Rahman, M. W., Alam, K. M. & Pramanik, S. Long Carbon Nanotubes Functionalized with DNA and Implications for Spintronics. *ACS Omega* **3**, 17108–17115 (2018).
353. Perlitz, Y. & Michaeli, K. Helical liquid in carbon nanotubes wrapped with DNA molecules. *Phys. Rev. B* **98**, 1–12 (2018).
354. Rahman, M. W., Firouzeh, S. & Pramanik, S. Carrier localization and magnetoresistance in DNA-functionalized carbon nanotubes. *Nanotechnology* **32**, (2021).
355. Roy, S. & Banerjee, A. Functionalized single walled carbon nanotube containing amino acid based hydrogel: A hybrid nanomaterial. *RSC Adv.* **2**, 2105–2111 (2012).
356. Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G., Saito, R. & Jorio, A. Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Phys. Rep.* **409**, 47–99 (2005).
357. Yanagi, K. *et al.* Transport mechanisms in metallic and semiconducting single-wall carbon nanotube networks. *ACS Nano* **4**, 4027–4032 (2010).
358. Raikh, M. E. & Wessels, G. F. Single-scattering-path approach to the negative magnetoresistance in the variable-range-hopping regime for two-dimensional electron systems. *Phys. Rev. B* **47**, 15609–15621 (1993).
359. Nguen, V. L., Spivak, B. Z. & Shklovskii, B. I. Tunnel hopping in disordered systems. *Sov. Phys. JETP* **62**, 1021–1029 (1985).
360. Liu, T. *et al.* Linear and nonlinear two-terminal spin-valve effect from chirality-induced spin selectivity. *ACS Nano* **14**, 15983–15991 (2020).
361. Liu, Y., Xiao, J., Koo, J. & Yan, B. Chirality-driven topological electronic

- structure of DNA-like materials. *Nat. Mater.* **20**, 638–644 (2021).
362. Guo, A. M., Pan, T. R., Fang, T. F., Xie, X. C. & Sun, Q. F. Spin selectivity effect in achiral molecular systems. *Phys. Rev. B* **94**, 1–5 (2016).
363. Conejero-Muriel, M. *et al.* Influence of the chirality of short peptide supramolecular hydrogels in protein crystallogenes. *Chem. Commun.* **51**, 3862–3865 (2015).
364. Conejero-Muriel, M., Contreras-Montoya, R., Díaz-Mochón, J. J., Álvarez De Cienfuegos, L. & Gavira, J. A. Protein crystallization in short-peptide supramolecular hydrogels: A versatile strategy towards biotechnological composite materials. *CrystEngComm* **17**, 8072–8078 (2015).
365. Shenoy, B., Wang, Y., Shan, W. & Margolin, A. L. Stability of crystalline proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 358–369 (2001).
366. Hofmann, T., Horstmann, G. & Stammberger, I. Evaluation of the reproductive toxicity and embryotoxicity of insulin glargine (LANTUS) in rats and rabbits. *Int. J. Toxicol.* **21**, 181–189 (2002).
367. Sasaki, N., Yuan, J., Fukui, T., Takeuchi, M. & Sugiyasu, K. Control over the Aspect Ratio of Supramolecular Nanosheets by Molecular Design. *Chem. - A Eur. J.* **26**, 7840–7846 (2020).