



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FÍSICA Y CIENCIAS DEL ESPACIO

Hidrogeles magnéticos para medicina regenerativa y aplicaciones tecnológicas

Cristina Gila Vílchez

Directores

Modesto Torcuato López López
Departamento de Física Aplicada, Universidad de Granada

Luis Álvarez de Cienfuegos Rodríguez
Departamento de Química Orgánica, Universidad de Granada

Grupo de Física de Interfases y Sistemas Coloidales
Departamento de Física Aplicada

—
Granada, 2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Cristina Gila Vílchez
ISBN: 978-84-1195-348-1
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92332>

La doctoranda / *The doctoral candidate* Cristina Gila Vílchez y los directores de la tesis / *and the tesis supervisors* Modesto Torcuato López López, Catedrático del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada y Luis Álvarez de Cienfuegos Rodríguez, Catedrático del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada.

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the supervisors and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Granada, 14 de junio de 2022

Doctoranda / *Doctoral candidate*

Fdo: Cristina Gila Vílchez

Los Directores de la Tesis / *Thesis supervisors*

Fdo: Modesto Torcuato López López

Fdo: Luis Álvarez de Cienfuegos Rodríguez

Saltó de verdad, desde muy alto, y en su primera acrobacia se rompió las costillas. Y así fue, después, en la vida y en el amor. Siempre volando, siempre rompiéndose las costillas.

El libro de los abrazos
Eduardo Galeano

Agradecimientos

A toda mi familia, y en especial a mis padres, que me enseñaron que si tenía que hacer algo debía tomarme mi tiempo y hacerlo bien. Todo esto hubiera sido inimaginable sin vuestro apoyo, que me entendisteis cuando nadie más lo hacía, incluso antes que yo misma. Mi gratitud y mi deuda con vosotros es eterna.

A Modesto y Luis, que confiaron en mí desde el principio. Siempre que alguien me pide consejo sobre el doctorado respondo que la clave es tener unos buenos directores de tesis, y yo nunca podría haber imaginado tener unos mejores. Gracias a ambos por hacer que todo esto resultara fácil cuando realmente no lo era.

A todas las personas del Departamento de Física Aplicada y del Grupo I6, que me acogieron desde que llegué como una gran familia. A Mari, por formar parte de este dúo en cada laboratorio que hemos visitado, por inyectarme siempre tanta energía y enseñarme las últimas novedades musicales del momento. A Mirja, por enseñarme tanto, tantas perspectivas diferentes, y por aportarme ese toque tan especial de alegría y de locura que le caracteriza. A Alberto, por ser el mejor compañero de despacho, por escuchar mi vida todos los días aunque no le interese y darme su opinión sincera. A Fran, por su sarcasmo y sus frases retorcidas, y por ayudarme siempre en todo lo que he necesitado, nunca podré agradecerle verdaderamente todo lo que he hecho por mí. A Alfredo, por la alegría, la música, los libros, los viajes y las charlas filosóficas a medianoche bajo la lluvia, por poner mi vida patas arriba y vivirla conmigo.

A todas las personas que de una u otra forma han estado presentes en mi recorrido por este camino. A las que siempre han estado ahí, desde el colegio, el instituto o la carrera. A todas las personas maravillosas que he conocido gracias a la tesis y que me han allanado el camino, en el departamento, en los laboratorios y en las estancias en el extranjero. A los que estuvieron de paso acompañándome durante un tiempo, y, sobre todo, a los que llegaron y se quedaron para siempre.

Financiación

La investigación que ha conducido a la realización de esta tesis doctoral se ha llevado a cabo gracias al proyecto FIS2017-85954-R financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER "Una manera de hacer Europa".

Esta tesis doctoral ha sido asimismo desarrollada gracias a la ayuda FPU17/00491 financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y FSE "El FSE invierte en tu futuro" y por la Universidad de Granada.

La estancia de investigación realizada en el *Institut für Mechatronischen Maschinenbau* de la *Technische Universität de Dresden* ha sido financiada por el Ministerio de Universidades en el programa de ayudas de movilidad para estancias breves en centros extranjeros a beneficiarios del Subprograma de Formación del Profesorado Universitario, convocatoria de 2020 (EST19/00403).



Resumen

Los hidrogeles se definen como redes tridimensionales (3D) formadas por cadenas poliméricas flexibles dispersas en un medio acuoso. Debido a su flexibilidad, consistencia blanda, alto contenido de agua y la versatilidad de sus propiedades mecánicas, los hidrogeles se utilizan para diversas aplicaciones en tecnología y biomedicina, algunas de ellas ya explotadas a nivel comercial [1]. Los hidrogeles pueden ser preparados con componentes naturales o sintéticos, tales como hidratos de carbono, proteínas, péptidos, tensioactivos y/o polímeros sintéticos. Por su composición, los hidrogeles magnéticos, que consisten en dispersiones de micro o nanopartículas magnéticas incrustadas dentro de un hidrogel, combinan en un solo material el comportamiento paramagnético o ferromagnético proporcionado por las partículas con la flexibilidad que aporta la matriz. Estos son por tanto de particular interés en muchas aplicaciones desde el punto de vista tecnológico y biomédico, tales como amortiguadores inteligentes, sensores de temperatura, presión y (bio)químicos, administración de fármacos, diseño de músculos artificiales e ingeniería tisular [2, 3, 7, 9]. Las propiedades de los hidrogeles magnéticos dependen de varios factores, incluidos el tipo de gelificante y de partícula magnética utilizados, la concentración del gelificante y de las partículas magnéticas, y el tamaño y distribución de las partículas magnéticas dentro de los hidrogeles. Además, las partículas magnéticas son sustratos sólidos que pueden ser recubiertos y funcionalizados con diferentes propósitos. La naturaleza química de la capa de recubrimiento puede modular las interacciones entre las partículas y los filamentos del polímero que forman los hidrogeles, lo que tiene un impacto directo en las propiedades finales de los hidrogeles resultantes [22].

Como consecuencia de las ventajas mencionadas anteriormente, se necesitan nuevos hidrogeles magnéticos que sean capaces de modificar, en gran medida, o modular reversiblemente sus propiedades mecánicas. Además, la comprensión de cómo controlar la organización celular y la vascularización con precisión en construcciones de tejidos complejos se encuentra todavía en un estado preliminar. Finalmente, es deseable que los hidrogeles sean inyectables, dado que la inyectabilidad es el principal requisito para poder implementar métodos quirúrgicos mínimamente invasivos. No puede olvidarse que un gel inyectable tiene que poseer además una microestructura que favorezca la proliferación celular. Así, la obtención de nuevos hidrogeles con estas características supondría un avance muy importante.

La hipótesis de partida de este trabajo es que es posible preparar hidrogeles magnéticos inyectables, basados en péptidos de cadena corta y/o en polímeros, con una microestructura y propiedades mecánicas adecuadas para su uso tanto en aplicaciones tecnológicas como en la creación de matrices extracelulares de tejidos artificiales blandos. Por tanto, en esta tesis doctoral se pretende resolver dos de las principales desventajas de los hidrogeles inyectables actuales: (i) la ausencia de una microestructura adecuada; (ii) el deficiente control sobre sus propiedades mecánicas. Se abordan estos objetivos generales de forma simultánea desde los puntos de vista físico y químico, con el fin de crear nuevos hidrogeles con mejores propiedades. Sintetizamos un espectro diverso de hidrogeles magnéticos supramoleculares y poliméricos con un adecuado orden interno gracias a la naturaleza de las fibras, su interacción con las partículas magnéticas y la disposición de las mismas. Con ello, dotamos a los hidrogeles de propiedades mecánicas ajustables mediante la concentración, forma y tamaño de las partículas y la intensidad del campo magnético aplicado. Se espera que estos hidrogeles posean las propiedades requeridas para poder ser utilizados en aplicaciones tecnológicas y biomédicas.

Índice general

1. Introducción	19
1.1. Hidrogeles magnéticos: definición, diseño y características	19
1.2. Aplicaciones de los hidrogeles magnéticos	24
1.3. Hipótesis y objetivos	26
1.4. Organización de la tesis	27
1.5. Declaración ética	28
I	29
2. Funcionalización y caracterización de la fase dispersa	31
2.1. Introducción	31
2.2. Materiales y métodos	32
2.2.1. Funcionalización de partículas de hierro micrométricas	32
2.2.2. Preparación de hidrogeles magnéticos de alginato con partículas de hierro micrométricas	33
2.2.3. Funcionalización de partículas de hierro nanométricas	33
2.2.4. Preparación de hidrogeles magnéticos supramoleculares de péptidos con partículas de hierro nanométricas	34
2.2.5. Caracterización físico-química de las partículas de hierro y los hidrogeles magnéticos	34
2.2.6. Caracterización reológica de los hidrogeles magnéticos	35
2.2.7. Ensayos de viabilidad celular	35
2.2.8. Análisis estadístico	36
2.3. Resultados y discusión	37

2.3.1. Caracterización de las partículas de hierro	37
2.3.2. Caracterización estructural de los hidrogeles magnéticos	39
2.3.3. Caracterización reológica de los hidrogeles magnéticos	42
2.3.4. Ensayos de viabilidad celular	43
2.4. Conclusiones	45

II

47

3. Síntesis y caracterización de hidrogeles de alginato isotropos 49

3.1. Introducción	49
3.2. Materiales y métodos	51
3.2.1. Preparación de hidrogeles y ferrogel de alginato	51
3.2.2. Apariencia macroscópica, grado de hinchamiento y estructura microscópica de los hidrogeles	52
3.2.3. Caracterización reológica de los hidrogeles	52
3.2.4. Estadística	53
3.3. Resultados y discusión	54
3.3.1. Apariencia macroscópica, grado de hinchamiento y estructura microscópica de los hidrogeles	54
3.3.2. Caracterización reológica en ausencia de campo magnético	56
3.3.3. Caracterización reológica en presencia de campo magnético	59
3.4. Conclusiones	61

4. Síntesis y caracterización de hidrogeles de alginato anisotropos 63

4.1. Introducción	63
4.2. Materiales y métodos	65
4.2.1. Preparación de hidrogeles de alginato	65
4.2.2. Estudios de hinchamiento y microestructura de los hidrogeles de alginato	67
4.2.3. Caracterización mecánica de los hidrogeles de alginato	68
4.3. Resultados y discusión	68
4.3.1. Estudios de hinchamiento de los hidrogeles no magnéticos de alginato	68

4.3.2. Caracterización mecánica de los hidrogeles de alginato bajo procesos de deshidratación controlados	70
4.3.3. Caracterización de los hidrogeles magnéticos anisótropos de alginato	71
4.4. Conclusiones	73
5. Aplicaciones de hidrogeles basados en alginato	75
5.1. Introducción	75
5.2. Materiales y métodos	77
5.2.1. Preparación de hidrogeles magnéticos de alginato	77
5.2.2. Análisis del efecto de actuación de los hidrogeles de alginato . . .	78
5.2.3. Estudio de inyectabilidad: Protocolos y caracterización	79
5.3. Resultados y discusión	80
5.3.1. Actuadores magnéticos basados en hidrogeles isótropos de alginato	80
5.3.2. Actuadores magnéticos basados en hidrogeles anisótropos de alginato	81
5.3.3. Estudio de inyectabilidad	85
5.4. Conclusiones	86
III	89
6. Síntesis y caracterización de hidrogeles basados en péptidos	91
6.1. Introducción	91
6.2. Materiales y métodos	93
6.2.1. Preparación de los hidrogeles de péptidos	93
6.2.2. Caracterización de las propiedades microscópicas	93
6.2.3. Caracterización del proceso de coagregación de los péptidos . . .	94
6.2.4. Caracterización de las propiedades mecánicas de los hidrogeles basados en péptidos	95
6.3. Resultados y discusión	96
6.3.1. Análisis del proceso de coagregación de los dipéptidos	96
6.3.2. Espectroscopía del coensamblaje de diferentes dipéptidos	98
6.3.3. Estados intermedios de coagregación de los dipéptidos	101
6.3.4. Propiedades mecánicas de los hidrogeles de péptidos	102

6.4. Conclusiones	104
7. Aplicaciones biomédicas de hidrogeles basados en péptidos	105
7.1. Introducción	105
7.2. Materiales y métodos	109
7.2.1. Preparación de hidrogeles de péptidos	109
7.2.2. Preparación de hidrogeles híbridos de fibrina y péptidos	110
7.2.3. Caracterización físicoquímica de los hidrogeles	110
7.2.4. Caracterización de las propiedades mecánicas	111
7.2.5. Evaluación de la biocompatibilidad <i>ex vivo</i>	112
7.2.6. Evaluación de la biocompatibilidad <i>in vivo</i>	113
7.3. Resultados y discusión	114
7.3.1. Hidrogeles magnéticos basados en péptidos	114
Caracterización microestructural	114
Caracterización mecánica	115
Evaluación de la biocompatibilidad <i>ex vivo</i>	117
Evaluación de la biocompatibilidad <i>in vivo</i>	119
7.3.2. Hidrogeles híbridos de fibrina y péptidos	121
Caracterización físicoquímica	121
Caracterización mecánica	122
Evaluación de la biocompatibilidad <i>ex vivo</i>	125
Evaluación de la biocompatibilidad <i>in vivo</i>	126
7.4. Conclusiones	127
IV	129
8. Conclusiones	131
9. Summary and conclusions	135
9.1. Introduction	136
9.1.1. Magnetic hydrogels	136
9.1.2. Magnetic hydrogels applications	137
9.2. Functionalization and characterization of the magnetic phase	139

9.2.1. Materials and methods	139
9.2.2. Results and discussion	141
9.3. Synthesis and characterization of isotropic alginate hydrogels	146
9.3.1. Materials and methods	146
9.3.2. Results and discussion	147
9.4. Synthesis and characterization of anisotropic alginate hydrogels	151
9.4.1. Materials and methods	151
9.4.2. Results and discussion	153
9.5. Alginate-based hydrogels applications	156
9.5.1. Materials and methods	156
9.5.2. Results and discussion	158
9.6. Synthesis and characterization of peptide-based hydrogels	162
9.6.1. Materials and methods	162
9.6.2. Results and discussion	163
9.7. Peptide-based hydrogels applications	167
9.7.1. Materials and methods	167
9.7.2. Results and discussion	169
9.8. Conclusions	176

Capítulo 1.

Introducción

1.1. Hidrogeles magnéticos: definición, diseño y características

Los hidrogeles se definen como redes tridimensionales (3D) formadas por cadenas poliméricas flexibles dispersas en un medio acuoso [1]. Desde un punto de vista fundamental, los hidrogeles son sistemas únicos que combinan una gran porosidad con un comportamiento mecánico propio de un sólido elástico. Debido a su flexibilidad, consistencia blanda, alto contenido de agua y la versatilidad de sus propiedades mecánicas, los hidrogeles se utilizan para diversas aplicaciones en tecnología y biomedicina, algunas de ellas ya explotadas a nivel comercial [1–8]. De hecho, siempre que la biocompatibilidad sea adecuada, los hidrogeles imitan la matriz extracelular de los tejidos vivos mejor que cualquier otro tipo de biomaterial sintético [1, 9]. Los hidrogeles pueden ser preparados con componentes naturales o sintéticos, tales como hidratos de carbono, proteínas, péptidos, tensioactivos y/o polímeros sintéticos. Además, los hidrogeles se pueden diseñar para tener una red densa y estable en el tiempo formada por enlaces covalentes entre cadenas poliméricas (hidrogeles químicos), pero también, para ser más fluidos y reversibles, entrelazando las cadenas a través de interacciones no covalentes (hidrogeles físicos). Los geles supramoleculares pertenecen a este último grupo [10]. Por lo general, estos hidrogeles están constituidos por agentes gelificantes de bajo peso molecular que interactúan entre sí mediante interacciones no covalentes, como la electrostática, enlaces de hidrógeno, interacciones π - π , etc. [11]. Las redes de polímeros convencionales interconectadas por enlaces covalentes no se pueden disolver, son térmicamente irreversibles y generalmente presentan dificultades a la hora

Parte del contenido de este capítulo ha sido publicado en:

M. C. Mañas-Torres, C. Gila-Vilchez, J. D.G. Durán, M. T. Lopez-Lopez, L. Álvarez de Cienfuegos. Biomedical applications of magnetic hydrogels, en *Magnetic Nanoparticle-Based Hybrid Materials*, Elsevier, pp. 253–271, 2021.

C. Gila-Vilchez, L. Rodriguez-Arco, M. C. Mañas-Torres, L. Álvarez de Cienfuegos, M. T. Lopez-Lopez. Self-assembly in magnetic supramolecular hydrogels, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, En revisión.

de experimentar grandes cambios en sus propiedades bajo estímulos externos. Por el contrario, la naturaleza dinámica, reversible y débil de las interacciones no covalentes en los hidrogeles supramoleculares hace factible modificar sus propiedades mediante la aplicación de estímulos externos [12, 13].

La investigación básica actual dentro de este campo se centra principalmente en los hidrogeles que responden a estímulos como la temperatura, los productos químicos o el pH, cambiando sus propiedades en respuesta a los mismos [14]. Este comportamiento inteligente permite aplicar los hidrogeles en la detección de analitos o como reservorios para la liberación controlada de un fármaco [15–17]. Una categoría importante entre estos geles inteligentes está constituida por los geles magnéticos (o ferrogeles), que desde el punto de vista estructural consisten en dispersiones de micro o nanopartículas magnéticas incrustadas dentro de un hidrogel [18–22]. Un factor clave para controlar el comportamiento de los hidrogeles magnéticos es su composición química, es decir, si es un hidrogel químico o físico. Los hidrogeles magnéticos químicos muestran la capacidad de modificar sus propiedades mecánicas, e incluso su aspecto macroscópico, tras la aplicación de un campo magnético externo, allanando el camino para desarrollar vehículos de transporte de fármacos [23–25]. Recientemente, han empezado a investigarse hidrogeles magnéticos físicos basados en el autoensamblaje de los agentes gelificantes de bajo peso molecular [26]. Estos sistemas ofrecen un mayor grado de interpenetración entre las partículas magnéticas y la matriz orgánica del hidrogel. La formación del hidrogel implica el autoensamblaje de los agentes gelificantes para producir fibras poliméricas. Si este proceso se produce en presencia de partículas magnéticas, estas pueden ser absorbidas por las fibras orgánicas. Además, dado que la matriz orgánica se autoensambla en presencia de las partículas, la aplicación de un campo magnético puede modificar la disposición estas que, a su vez, pueden modificar la matriz orgánica dando lugar a geles anisótropos [27].

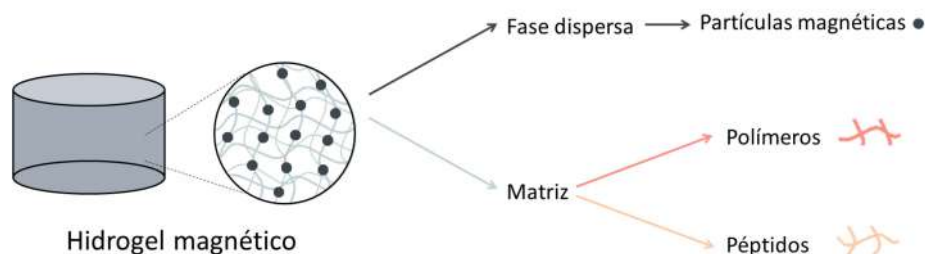


Figura 1.1: Esquema de los hidrogeles magnéticos y las partes que los componen.

Por su composición, los hidrogeles magnéticos combinan en un solo material el comportamiento paramagnético o ferromagnético proporcionado por las partículas con la flexibilidad que aporta la matriz (Figura 1.1). Estos son por tanto de particular interés en muchas aplicaciones desde el punto de vista tecnológico y biomédico, tales como amortiguadores inteligentes, sensores de temperatura, presión y (bio)químicos, administración de fármacos, diseño de músculos artificiales e ingeniería tisular. De hecho,

los ferrogel presentan algunas características interesantes en comparación con los hidrogeles no magnéticos:

1. Es posible actuar a distancia sobre materiales ferromagnéticos, incluidos los ferrogel, mediante la aplicación de campos magnéticos externos. Además, los tejidos humanos son permeables a los campos magnéticos habituales, que además son inocuos para las funciones y los tejidos del cuerpo humano, al menos para los campos estacionarios o de frecuencia extremadamente baja utilizados en las aplicaciones de estos materiales [28]. Como consecuencia, los hidrogeles magnéticos pueden ser manipulados y guiados dentro del cuerpo humano sin contacto mediante fuerzas magnéticas aplicadas externamente.
2. El carácter ferromagnético de los hidrogeles permite la visualización y el seguimiento *in vivo* mediante resonancia magnética [29].
3. Las propiedades mecánicas de los hidrogeles magnéticos pueden modificarse de forma controlable hasta varios órdenes de magnitud mediante campos magnéticos [30–32].

Como se ha comentado anteriormente, las propiedades de los hidrogeles magnéticos dependen de varios factores, incluidos el tipo de gelificante y de partícula magnética utilizados (Figura 1.1), la concentración del gelificante y de las partículas magnéticas, y el tamaño y distribución de las partículas magnéticas dentro de los hidrogeles. Además, las partículas magnéticas son sustratos sólidos que pueden ser recubiertos y funcionalizados con diferentes propósitos. La naturaleza química de la capa de recubrimiento puede modular las interacciones entre las partículas y los filamentos del polímero que forman los hidrogeles, lo que tiene un impacto directo en las propiedades finales de los hidrogeles resultantes [22]. De hecho, las partículas magnéticas con una superficie química adecuada pueden conjugar fármacos, proteínas, enzimas, anticuerpos o nucleótidos que se utilizarían en numerosas aplicaciones técnicas y biomédicas.

Los métodos desarrollados para preparar hidrogeles magnéticos son varios:

1. El más simple es la inmersión de un hidrogel no magnético en una suspensión magnética, de forma que se produzca la absorción de las partículas magnéticas en la red del polímero (Figura 1.2a) [33]. El principal inconveniente de este enfoque es que las partículas magnéticas se pueden desorber con bastante facilidad, ya que el disolvente se drena o se diluye.
2. Otro enfoque es la síntesis *in situ* de las partículas magnéticas dentro del hidrogel (Figura 1.2b) [34]. El principal obstáculo de este enfoque es proporcionar un recubrimiento biocompatible a las partículas magnéticas en las condiciones en las que se produce su síntesis, si se quiere hacer un ferrogel con la biocompatibilidad requerida para aplicaciones biomédicas. Además, podría resultar difícil eliminar del ferrogel los productos químicos tóxicos que se originan durante la síntesis. Por tanto, este método no parece apropiado para aplicaciones biomédicas en las que se requiere biocompatibilidad.

3. Un tercer enfoque consiste en mezclar las partículas con monómeros de hidrogel antes de la polimerización (Figura 1.2c) [35–37]. Este enfoque presenta varias ventajas. Por ejemplo, las partículas se pueden funcionalizar adecuadamente antes de mezclarlas con los monómeros del hidrogel, para proporcionarles biocompatibilidad, para cargarlas con un fármaco, células o factores de crecimiento y/o para servir como puntos adicionales de entrecruzamiento para las fibras del polímero. En particular, esto podría incluso dar lugar a hidrogeles en los que el entrecruzamiento se produce solo por las partículas [20, 21]. Nótese que al unir las partículas a la red polimérica se evitan los problemas de pérdida de partículas durante la manipulación, secado o hinchamiento de los hidrogeles. Alternativamente, las partículas pueden encapsularse simplemente dentro de la red polimérica si no están funcionalizadas adecuadamente para interactuar con los monómeros [38]. Otra ventaja de mezclar las partículas con los monómeros antes de la polimerización es la posibilidad de obtener un orden microestructural alineando las partículas y las fibras del polímero mediante la aplicación de un campo magnético externo [35, 39].

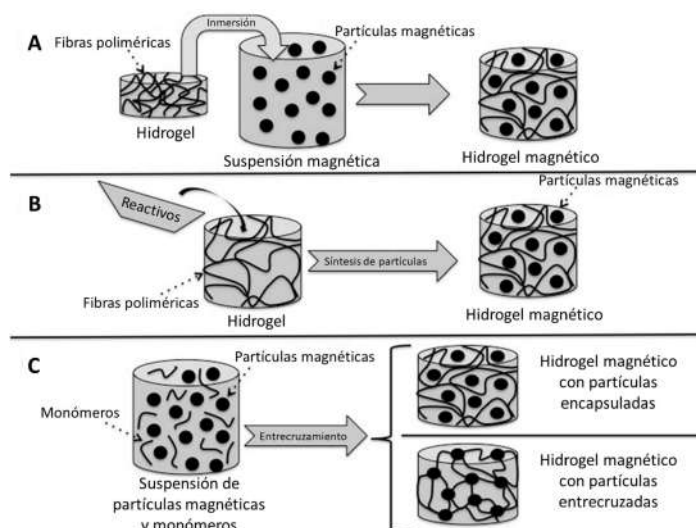


Figura 1.2: Diferentes estrategias para la preparación de hidrogeles magnéticos. (a) Método de mezcla: se sumerge un hidrogel no magnético en una suspensión magnética, de forma que absorbe las partículas magnéticas durante el hinchamiento [38]. (b) Método de precipitación in situ: las partículas magnéticas se sintetizan directamente dentro de un hidrogel no magnético [40]. (c) Método de injerto: el proceso de entrecruzamiento de los precursores poliméricos se realiza en presencia de partículas magnéticas, lo que puede dar como resultado la encapsulación de las partículas o su entrecruzamiento con las fibras poliméricas [41].

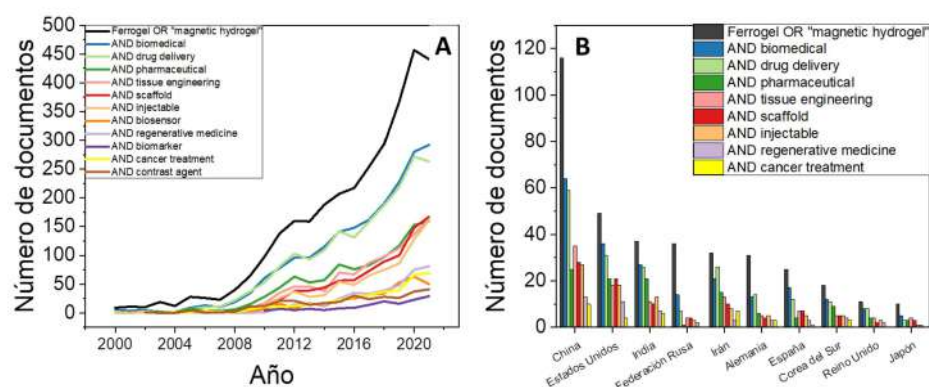


Figura 1.3: Número de documentos relacionados con los hidrogeles magnéticos y sus aplicaciones biomédicas publicados (a) por año (2000 - 2021) y (b) por país en 2019. Fuente: Base de datos de SCOPUS.

Como consecuencia de las ventajas mencionadas anteriormente de los hidrogeles magnéticos con respecto a los no magnéticos en aplicaciones tecnológicas y biomédicas, en los últimos años se ha dedicado mucho esfuerzo al diseño, preparación, caracterización y aplicación de estos materiales magnéticos blandos (Figura 1.3). Sin embargo, a pesar de los avances conseguidos, la inmensa mayoría de los hidrogeles magnéticos se basan principalmente en polímeros gelificantes en los que las moléculas de polímero de cadena larga (por ejemplo, colágeno, alginato, quitosano) forman la red requerida para la gelificación mediante reticulación covalente o no covalente. Al estar las cadenas poliméricas fuertemente entrecruzadas (particularmente aquellas con entrecruzamiento covalente), dan lugar a redes muy rígidas, lo que dificulta cualquier modificación posterior de su microestructura y propiedades mecánicas. Por ejemplo, en hidrogeles magnéticos de fibrina, solo se ha logrado una variación del 10 % en los valores de los módulos mecánicos por aplicación de campo magnético [35, 36]. Por tanto, se necesitan nuevos hidrogeles magnéticos que sean capaces de modificar, en gran medida, o modular reversiblemente sus propiedades mecánicas. Además, la comprensión de cómo controlar la organización celular y la vascularización con precisión en construcciones de tejidos complejos se encuentra todavía en un estado preliminar. Finalmente, es deseable que los hidrogeles sean inyectables, dado que la inyectabilidad es el principal requisito para poder implementar métodos quirúrgicos mínimamente invasivos. No puede olvidarse que un gel inyectable tiene que poseer además una microestructura que favorezca la proliferación celular. Así, la obtención de nuevos hidrogeles con estas características supondría un avance muy importante.

1.2. Aplicaciones de los hidrogeles magnéticos

Como se mencionó en la introducción, se han desarrollado muchas aplicaciones para los hidrogeles magnéticos, como la ingeniería de tejidos, soportes para la administración controlada de fármacos y células, amortiguadores controlados por campos magnéticos [42–44] sensores de temperatura, presión y (bio)químicos [45–47].

El uso cada vez más frecuente de los hidrogeles como vehículos de administración de fármacos se explica por su biocompatibilidad y la capacidad de modificar fácilmente sus propiedades físicas y químicas. Los hidrogeles pueden diseñarse con diferentes tamaños de poros, pueden permitir la administración de varios fármacos simultáneamente, crear entornos hidrofóbicos o hidrofílicos, contener nanopartículas y combinarse con otros materiales [48, 49]. Todos estos factores modifican la forma y la velocidad a la que se puede liberar un fármaco desde su interior. Asimismo, las partículas magnéticas pueden actuar como un vehículo de administración de fármacos. Gracias a sus características físicas únicas y su capacidad de actuar a nivel celular, se están utilizando en hipertermia, en resonancia magnética, como agentes de contraste, como vehículo para la distribución de fármacos, y en la detección y diagnóstico de enfermedades, especialmente cáncer [50]. Algunas de las ventajas de los hidrogeles magnéticos es que pueden utilizarse para controlar la distribución de fármacos mediante la aplicación de un campo magnético externo [23], permiten ajustar el perfil de liberación del fármaco [51, 52], y el control remoto de la frecuencia e intensidad del campo magnético aplicado mejora la capacidad de administración del fármaco [53]. Además, los geles supramoleculares tienden a exhibir propiedades de fluidificación y autocuración, ambas necesarias para desarrollar materiales inyectables, permitiendo así que estos hidrogeles se apliquen a través de una vía de administración mínimamente invasiva [54, 55]. La capacidad de deformarse bajo estímulos mecánicos pequeños los convierte también en materiales ideales para administrar cargas extremadamente delicadas, como las células [55].

Asimismo, los hidrogeles son materiales ideales para el desarrollo de sustitutos de tejidos para reparar o reconstruir tejidos y órganos en el campo de la ingeniería tisular [1]. Estudios recientes indican que cuando se utilizan materiales magnéticos en ingeniería tisular, la presencia de partículas magnéticas (con un diámetro aproximado de 50–100 nm) estimula la adhesión, proliferación y diferenciación de células *in vitro* e incluso la formación de hueso *in vivo* [56–59]. Por tanto, los hidrogeles magnéticos proporcionan ventajas añadidas siempre que las partículas magnéticas puedan ensamblarse, para formar construcciones complejas, y puedan funcionalizarse con factores de crecimiento u otros agentes biológicos, para promover la adhesión y proliferación celular [60]. Por ejemplo, se pueden aplicar campos magnéticos externos a los hidrogeles magnéticos para controlar el ensamblaje y la microestructura, creando construcciones tisulares complejas [61] y para organizar tejidos celulares [62]. Los campos magnéticos, solos o en combinación con partículas magnéticas, pueden usarse también para modificar el autoensamblaje de los hidrogeles supramoleculares, aportando un cierto orden estructural a nano y micro-escala que puede ser beneficioso en aplicaciones de ingeniería de tejidos. Por ejemplo, Radvar *et al.* [63] encontraron que las membranas supramoleculares nanofibrosas alineadas magnéticamente que utilizaron como soportes para el cultivo de células madre mesenquimales, mostraron una mejor adhesión de las células, así como una

elongación celular en la dirección de la anisotropía, sugiriendo por tanto el potencial de estas membranas anisótropas para aplicaciones en ingeniería tisular. Otra ventaja de la incorporación de partículas magnéticas en hidrogeles destinados a aplicaciones de ingeniería tisular es que se puede someter a las células a fuerzas y tensiones a nivel de microescala. Además, la aplicación de campos magnéticos cíclicos produce tensiones mecánicas que imitan el entorno biomecánico de algunos tejidos [64]. Esto es especialmente importante para las células de sistemas musculoesqueléticos, ya que estas fuerzas y tensiones simulan las condiciones mecánicas a nivel microscópico a las que se someten las células en los tejidos naturales, y pueden considerarse señales biomecánicas para la diferenciación celular [65]. Otra característica de los hidrogeles magnéticos es que pueden ser manipulados y movidos mediante fuerzas magnéticas, de manera que pueden ser implantados *in vivo* y arrastrados para rellenar un defecto o un hueco, así como ser modificados después [55, 66].

Por otro lado, los materiales blandos capaces de modificar sus propiedades en respuesta a estímulos magnéticos son la base para aplicaciones en el campo de la robótica magnética blanda (sensores y actuadores). Los sensores se basan principalmente en cambios de propiedades ópticas, mecánicas y eléctricas, mientras que los actuadores se basan en cambios de forma, tamaño y locomoción bajo estímulos externos. En este caso, los hidrogeles magnéticos suelen mostrar cambios rápidos y reversibles en su forma y propiedades mecánicas bajo estímulos magnéticos [67, 68]. Así, Nowak y Ravoo prepararon hidrogeles magnéticos supramoleculares que mostraban propiedades mecánicas magneto y fotosensibles [67]. Estos hidrogeles aumentaron su rigidez (módulo de almacenamiento) de forma reversible bajo la aplicación de un campo magnético, y se conseguían flexionar cuando el hidrogel se preparaba con forma alargada. Además, los cambios de forma de los hidrogeles magnéticos bajo un campo magnético también pueden ser aprovechados en la creación de actuadores blandos [69, 70]. En este sentido, Ma *et al.* [69] prepararon hidrogeles magnéticos de ADN que sufrían cambios de forma remotos, así como desplazamientos e incluso saltos en respuesta a campos magnéticos.

Por último, los hidrogeles inyectables son cada vez más importantes en biomedicina. El interés se basa en el hecho de que la inyectabilidad es uno de los principales requisitos para llevar a cabo procedimientos mínimamente invasivos, particularmente en aplicaciones de ingeniería tisular y administración de fármacos. Existen dos alternativas principales para la administración del hidrogel mediante una jeringa: (i) hidrogeles gelificantes *in situ*; (ii) hidrogeles fluidificantes (tixotrópicos). El primer enfoque se basa en la gelificación posterior a la inyección de una mezcla similar a un líquido que incluye los precursores del gel [71–73]. En el caso de los hidrogeles fluidificantes, la estrategia implica la formación de un hidrogel sólido con las propiedades mecánicas, morfológicas y biológicas deseadas *in vitro* que puede fluir como un material de baja viscosidad bajo tensión. Después de la inyección, el hidrogel debería experimentar una rápida recuperación del módulo elástico (autocuración) [74, 75]. Desafortunadamente, a pesar de los esfuerzos dedicados a la mejora de los hidrogeles inyectables, el desarrollo de hidrogeles magnéticos inyectables robustos es un desafío aún sin resolver. La generación de este tipo de hidrogeles permitiría combinar todas las características mencionadas anteriormente para los hidrogeles magnéticos con las de los hidrogeles inyectables.

1.3. Hipótesis y objetivos

La hipótesis de partida de este trabajo es que es posible preparar hidrogeles magnéticos inyectables, basados en péptidos de cadena corta (*hidrogeles supramoleculares*) y/o en polímeros, con una microestructura y propiedades mecánicas adecuadas para su uso tanto en aplicaciones tecnológicas como en la creación de matrices extracelulares de tejidos artificiales blandos.

La validez de esta hipótesis se basa en resultados recientes [22, 27]. Por un lado, para hidrogeles de fibrina (basados en enlaces covalentes y, por tanto, no inyectables) se ha comprobado que, incluso para una concentración minúscula de nanopartículas magnéticas, la estructura interna cambia radicalmente. Este cambio da lugar a un material más poroso y al mismo tiempo mucho más robusto [22]. Por otro lado, se han preparado hidrogeles magnéticos supramoleculares que, siendo inyectables, experimentan modificaciones muy importantes asociadas a la presencia de nanopartículas magnéticas [27].

Por tanto, en esta tesis doctoral se pretende resolver dos de las principales desventajas de los hidrogeles inyectables actuales: (i) la ausencia de una microestructura adecuada; (ii) el deficiente control sobre sus propiedades mecánicas.

Se abordarán estos objetivos generales de forma simultánea desde los puntos de vista físico y químico, con el fin de crear nuevos hidrogeles con mejores propiedades. Sintetizaremos un espectro diverso de hidrogeles magnéticos supramoleculares y poliméricos que tengan un adecuado orden interno gracias a la naturaleza de las fibras, su interacción con las partículas magnéticas y la disposición de las mismas. Con ello, dotaremos a los hidrogeles de propiedades mecánicas ajustables mediante la concentración, forma y tamaño de las partículas y la intensidad del campo magnético aplicado. Se espera que estos hidrogeles posean las propiedades requeridas para poder ser utilizados en aplicaciones tecnológicas y biomédicas.

Para conseguir estos objetivos generales, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. **Funcionalización de la superficie de las partículas magnéticas** mediante adsorción de moléculas adecuadas para: (i) hacerlas biocompatibles y evitar la respuesta inmunológica; (ii) conseguir su distribución homogénea en la estructura del hidrogel; (iii) conseguir cambios estructurales debido a su interacción con las fibras que forman el hidrogel.
2. **Generación de hidrogeles magnéticos** supramoleculares y poliméricos mediante combinación de partículas magnéticas y agentes gelificantes (principalmente péptidos de cadena corta, alginato y fibrina). De esta forma obtendremos hidrogeles magnéticos "blandos" que podrían ser inyectables. Además, su microestructura y propiedades mecánicas se podrían ajustar variando la concentración y tipo de partículas y mediante la aplicación de campos magnéticos.
3. **Caracterización de las propiedades microscópicas:** (i) forma, tamaño y composición de las partículas magnéticas mediante microscopía electrónica y otras

técnicas de análisis; (ii) naturaleza reticular de las fibras, su densidad y patrón interno, mediante diferentes técnicas espectroscópicas, microscopía electrónica, microscopio de fuerza atómica (AFM), técnicas de difracción de rayos X (SAXS, WAXS), FRET, FLIM, DSC, FTIR y Raman.

4. **Caracterización de las propiedades físicas macroscópicas de los hidrogeles:** propiedades magnéticas y mecánicas (tanto en presencia como en ausencia de campo magnético aplicado), cinética de gelificación, integridad macroscópica y grado de hidratación. Prestaremos también especial atención a si se satisfacen las condiciones de inyectabilidad.
5. **Modelización teórica de las propiedades mecánicas.** Trataremos de comprender el comportamiento macroscópico de los hidrogeles desde el punto de vista de los mecanismos físicos que lo gobiernan. Además, los modelos teóricos que desarrollemos permitirán predecir el comportamiento de los materiales en distintas condiciones experimentales, lo que nos servirá de orientación sobre las estrategias correctas para alcanzar los resultados deseados.
6. **Biocompatibilidad de los hidrogeles.** Evaluaremos la compatibilidad *ex vivo* de los hidrogeles que presenten una microestructura y propiedades mecánicas adecuadas. Para los casos en los que se obtenga una biocompatibilidad adecuada *ex vivo*, evaluaremos la biocompatibilidad *in vivo* usando modelos animales.

1.4. Organización de la tesis

La investigación desarrollada en este trabajo se encuentra estructurada en cuatro apartados:

Parte I. En este apartado se desarrollan varios tipos distintos de **funcionalizaciones** de partículas magnéticas micro- y nanométricas con el objetivo de utilizarlas en la generación de hidrogeles magnéticos. Además de la caracterización físico-química de las partículas magnéticas funcionalizadas, se lleva a cabo un estudio de la interacción de las mismas con la red y de cómo esta interacción afecta a las propiedades finales del hidrogel. Esta parte se desarrolla en el **capítulo 2**.

Parte II. Esta parte se centra en el diseño y caracterización de hidrogeles basados en **alginato**. Se compone de los **capítulos 3, 4 y 5**.

En el **capítulo 3** se diseña un protocolo de preparación de hidrogeles de alginato magnéticos **isótropos**. Para ello, se utilizan partículas de hierro micrométricas a distintas fracciones de volumen dentro del hidrogel de alginato. Se caracterizan los hidrogeles resultantes en cuanto a sus propiedades microestructurales y reológicas, con y sin campo magnético aplicado durante las medidas.

En el **capítulo 4** se describen distintos protocolos de preparación de hidrogeles de alginato **anisótropos** magnéticos y no magnéticos. De nuevo, se lleva a cabo el estudio completo de las propiedades mecánicas y microestructurales de los hidrogeles anisótropos resultantes en cada caso.

En el **capítulo 5** se presentan hidrogeles de alginato magnéticos con **aplicaciones** tecnológicas. Para ello, se estudia la aplicación de estos hidrogeles como actuadores magnéticos blandos, tanto para hidrogeles isotropos como anisotropos. Además, se propone un protocolo de inyectabilidad de los mismos.

Parte III. Esta parte se dedica al diseño y caracterización de hidrogeles supramoleculares basados en **péptidos** de cadena corta. Se compone de los **capítulos 6 y 7**.

En el **capítulo 6** se preparan hidrogeles supramoleculares basados en mezclas de distintos tipos de dipéptidos con fmoc-difenilalanina (Fmoc-FF) a varias proporciones. Se analiza el **mecanismo de formación** de las estructuras fibrilares que componen los hidrogeles desde un punto de vista químico, y se estudian las propiedades reológicas de los hidrogeles resultantes.

En el **capítulo 7** se diseñan hidrogeles magnéticos e híbridos basados en péptidos, con capacidad de ser inyectados para su uso en **medicina regenerativa**. Se lleva a cabo una caracterización completa de la estructura interna de los hidrogeles desde el punto de vista químico, así como la caracterización física de las propiedades reológicas. Además, se estudia el comportamiento de inyectabilidad y autocuración de los hidrogeles y cómo afecta la aplicación de un campo magnético a sus propiedades. Por último, se hacen ensayos *ex vivo* e *in vivo* de los hidrogeles magnéticos e híbridos para desarrollar una aplicación biomédica.

Parte IV. Por último, los **capítulos 8 y 9** incluyen, respectivamente, las principales **conclusiones** de la tesis y un resumen en inglés de los resultados más relevantes obtenidos en este trabajo para optar a la mención internacional.

1.5. Declaración ética

Los estudios de biocompatibilidad contaron con la aprobación del Comité de Ética de la Junta de Andalucía (España), en el marco de los proyectos de investigación FIS2017-85954-R (MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, España) y PE-0395-2019 (Consejería de Salud y Familias, Junta de Andalucía, España). Los estudios *ex vivo* con células humanas fueron autorizados por el Servicio Andaluz de Salud (Consejería de Salud, Junta de Andalucía). La caracterización *in vivo* se realizó de conformidad con las directrices éticas para el cuidado animal de la Unión Europea y el Gobierno de España (Directiva Europea no. 63/2010, RD 53/2013). Los experimentos *in vivo* fueron autorizados por la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera (18/12/2017/167 y 19/04/2021/053, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Junta de Andalucía).

Parte I

Capítulo 2.

Funcionalización y caracterización de la fase dispersa

2.1. Introducción

La correcta funcionalización de las partículas magnéticas es de vital importancia en tanto en cuanto permite modular las interacciones entre ellas y los filamentos poliméricos que forman los hidrogeles teniendo un impacto directo en las propiedades de los hidrogeles, como se ha demostrado recientemente [22]. Además, las partículas magnéticas con una superficie química adecuada pueden conjugar fármacos, proteínas, enzimas o anticuerpos, lo cual se requiere en numerosas aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, se ha demostrado recientemente que el tratamiento médico con partículas magnéticas conjugadas por un factor de crecimiento nervioso promueve significativamente el crecimiento de neuritas y aumenta la complejidad de los árboles ramificados neuronales [60].

Como puede comprobarse en la bibliografía más representativa sobre hidrogeles magnéticos, las partículas magnéticas se usan generalmente tal y como se reciben, es decir, sin ninguna funcionalización. La incorporación de partículas de tamaño nano o micrométrico en el hidrogel se basa simplemente en la incorporación física dentro del hidrogel, lo que conlleva la posible liberación continua de las partículas desde la matriz del hidrogel al medio [76]. Sin embargo, además del hierro que compone las partículas magnéticas y que proporciona la activación del campo magnético, la superficie de las mismas se puede utilizar para crear interacciones específicas o inespecíficas con los

Parte del contenido de este capítulo ha sido publicado en:
M. Barczak, P. Borowski, C. Gila-Vilchez, M. Alaminos, F. González-Caballero, M. T. López-López. Revealing importance of particles' surface functionalization on the properties of magnetic alginate hydrogels, *Carbohydrate Polymers*, **247**, 116747, 2020.
M. Barczak, P. Borowski¹, D. Pietras-Ożga, C. Gila-Vilchez, M. Alaminos, F. González-Caballero, L. Alvarez de Cienfuegos, M. T. López-López. Introducing amine groups to the surface of iron nanoparticles to modulate properties of supramolecular peptide-based magnetic hydrogels, *En preparación*.

hidrogeladores [77], que a su vez pueden afectar a las propiedades finales de los hidrogeles resultantes e incluso proporcionar más características favorables como una mejor adhesión de especies biológicas (por ejemplo, células). La funcionalización con el grupo amina con el uso de 3-aminopropiltriethoxisilano o 3-aminopropiltrimetoxisilano es una estrategia utilizada frecuentemente para modificar la superficie de las partículas y las propiedades de los hidrogeles resultantes [76, 78–82]. Sin embargo, en la bibliografía se encuentran pocos ejemplos de funcionalización química de partículas magnéticas utilizando grupos distintos de las aminas [77].

En este trabajo se buscó determinar el papel que juega la funcionalización superficial de partículas de hierro en las propiedades de hidrogeles magnéticos de alginato y péptidos. Para ello, se tomaron como punto de partida partículas de hierro micrométricas recubiertas por una capa de sílice (Fe-CC) y partículas de hierro nanométricas sin funcionalizar (nFe). Estas partículas control se funcionalizaron posteriormente con diferentes grupos funcionales que incluían hidroxilo, amina, glicidoxi, fenilo y tiocianato; donde muchas de estas modificaciones se han reportado por primera vez en este trabajo. Las distintas funcionalizaciones afectaron a la interacción química entre la matriz del hidrogel y la superficie de las partículas de hierro de manera diferente, contribuyendo a la aparición de diversas microestructuras, propiedades mecánicas y biocompatibilidad de los hidrogeles resultantes. Por ejemplo, los grupos amina en la superficie de las partículas de hierro micrométricas dieron como resultado hidrogeles de alginato bien formados, mientras que la presencia de grupos tiocianato o fenilo en estas mismas partículas dieron lugar a hidrogeles de alginato mal formados. Por tanto, estos resultados se pueden utilizar para ajustar las propiedades de hidrogeles basados en carbohidratos y péptidos.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Funcionalización de partículas de hierro micrométricas

Como partículas magnéticas se utilizaron partículas de hierro micrométricas recubiertas de sílice (Fe-CC, MP0) suministradas por BASF, Alemania. Estas consisten en partículas esféricas de $1.4 \pm 0.6 \mu\text{m}$ de diámetro, medido mediante imágenes de microscopía electrónica, y tienen una densidad de $7.71 \pm 0.19 \text{ g/cm}^3$, medida con un picnómetro. Además, presentan un comportamiento paramagnético típico con magnetización de saturación $M_S = 1587 \pm 2 \text{ kA/m}$, medido por magnetometría SQUID (Dispositivo Superconductor de Interferencia Cuántica).

El ácido clorhídrico (HCl, Sigal), aminopropiltriethoxisilano (APTES, 97 %, Sigma-Aldrich), (3-trimethoxysilylpropyl)diethylentriamina (TMSPD, 95 %, Fluorochem), N-fenilaminometiltriethoxisilano (PATES, 95 %, Fluorochem), glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS, 98 %, Sigma Aldrich) y feniltriethoxisilano (PTES, 97 %, Gelest), fueron utilizados sin ninguna purificación adicional.

Para llevar a cabo la funcionalización, se colocan 2 g de partículas MP0 en un vial y se mezclan con 40 mL de etanol absoluto, previamente acidificado con 0.57 mL de HCl 1.75 M. La suspensión se sonica durante 5 minutos. Pasado ese tiempo se añade 1 mmol

del alcoxisilano organofuncional correspondiente (APTES, TMSPD, PTES, GPTMS, PATES o TCTES) y la suspensión se somete seis veces a la siguiente secuencia: 5 minutos de sonicación y 25 minutos de agitación (en total 3 horas). Finalmente, las partículas se separan de la solución mediante decantación magnética, se lavan dos veces con etanol absoluto y se secan durante la noche a 40 °C. La numeración de las muestras junto con el alcoxisilano organofuncional utilizado en cada caso para su síntesis se recogen en la tabla 2.1.

2.2.2. Preparación de hidrogeles magnéticos de alginato con partículas de hierro micrométricas

Para la preparación de los hidrogeles magnéticos de alginato utilizando las partículas de hierro micrométricas se siguió un protocolo de dos pasos que permite la generación de hidrogeles magnéticos homogéneos [68]. Brevemente, se disolvió alginato (MW:20–40 kDa, Sigma Aldrich) en agua destilada para preparar una solución al 1 % p/v. Luego, se agregaron 9 mg de carbonato de calcio (CaCO_3 , Sigma Aldrich) a 6 ml de esta disolución y se agitó con vórtex durante 1 minuto. Después, se añadieron 32 mg de D-glucono- δ -lactona (GDL, Sigma Aldrich) y la mezcla se agitó nuevamente durante 1 min. A continuación se dejó la solución en un vial cerrado durante 90 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, la mezcla gelificante se transfirió a otro vial, se agitó en vórtex (1 min) y se transfirió el volumen necesario al vial de Eppendorf que contenía las partículas de hierro para alcanzar la concentración final requerida de 0.9 % v/v. La mezcla se sometió a los siguientes pasos para dispersar bien las partículas dentro del gel: (i) vórtex - 1 min, (ii) sonicación - 5 min, (iii) vortex - 1 min. Finalmente, la mezcla se transfirió a un vial abierto y se mantuvo durante la noche en una atmósfera saturada de agua hasta completar el proceso de gelificación. Una descripción más detallada del protocolo de preparación de los hidrogeles de alginato magnéticos y su caracterización se puede encontrar en el Capítulo 3 de este trabajo.

2.2.3. Funcionalización de partículas de hierro nanométricas

Se recubrieron nanopartículas de hierro (nFe, NP0), suministradas por BASF (Alemania), con tres tipos distintos de funcionalizaciones mediante un método de microemulsión. Estas consisten en partículas esféricas nanométricas de un diámetro de 90 ± 30 nm, según se obtuvo mediante imágenes de microscopía electrónica, y una magnetización de saturación $M_S = 1521 \pm 15$ kA/m, medida por magnetometría SQUID.

El PEG-400 (polietilenglicol, 400 g/mol, Sigma Aldrich), PEG' (polietilenglicol terminado en amina, Sigma-Aldrich JKA12009), aminopropiltriethoxisilano (APTES, 97 %, Sigma-Aldrich), n-Hexano (min 99 %, Scharlab S.L), aceite mineral (Sigma Aldrich), sorbitán sesquioleato (Sigma Aldrich), glutaraldehído (solución al 25 % en agua, Alfa Aesar), fueron utilizados sin ninguna purificación adicional.

Para funcionalizar estas partículas con PEG se dispersan 100 mg de nanopartículas NP0 en 7.5 mL de agua Mili-Q y se sonica durante 1 minuto. A continuación, se añaden

500 mg de PEG-400 y se homogeneiza mediante sonicación durante 7 minutos. Por separado, se prepara una fase oleosa compuesta por 225 mL de n-hexano, 75 mL de aceite mineral y 400 μ L de sorbitán sesquioleato. Posteriormente, las fases de agua y aceite se mezclan en un nuevo vial y se sonican durante 5 minutos para obtener una microemulsión de agua en aceite. Finalmente, para iniciar la polimerización del PEG, se agregan 75 mL de glutaraldehído bajo agitación mecánica. Después de 2 horas con una agitación mecánica fuerte, las partículas nanométricas funcionalizadas se separan por decantación magnética y se lavan repetidamente con etanol y n-hexano antes de secarlas a temperatura ambiente. En el caso de las partículas funcionalizadas con PEG' y APTES, se sigue el mismo protocolo pero añadiendo un 90 % de PEG-400 y un 10 % en peso del otro compuesto, PEG' o APTES. La numeración de las muestras junto con el alcoxilano organofuncional utilizado en cada caso para su síntesis se recogen en la tabla 2.1.

2.2.4. Preparación de hidrogeles magnéticos supramoleculares de péptidos con partículas de hierro nanométricas

Para la preparación de hidrogeles supramoleculares de péptidos utilizando las partículas de hierro nanométricas se siguió un protocolo previamente establecido [27]. Brevemente, se añadió N-fluorenilmetoxycarbonil difenilalanina (Fmoc-FF, Bachem Co.) en un vial con agua Mili-Q para obtener una concentración final del 0.3 % p/v. Esta suspensión se sonicó en un baño de ultrasonidos AL04-03-230 con el agua fría durante 20 minutos. A continuación, se añadió gota a gota (10 μ L) una solución de hidróxido de sodio (NaOH, Sigma Aldrich) 0.5 M utilizando una micropipeta y sonicando durante 1 minuto tras la adición de cada gota, hasta que se obtuvo una disolución transparente (pH~10.6). Después se añadió la fase magnética a una concentración 0.3 % v/v y se homogeneizó mediante sonicación durante 5 minutos. Luego se añadieron 20 μ L de una disolución de GDL a concentración 200 mg/mL y se homogeneizó mediante vórtex durante 5 segundos para iniciar la gelificación. Finalmente, la mezcla se transfirió a los recipientes de medida y se aplicó rápidamente un campo magnético externo de 15 kA/m durante 1 hora mientras se producía la gelificación. Los hidrogeles se dejaron reposar durante la noche en una atmósfera saturada de agua a temperatura ambiente para asegurar una gelificación completa. Una descripción más detallada sobre los protocolos de preparación de este tipo de hidrogeles se encuentra en el Capítulo 6 de este manuscrito.

2.2.5. Caracterización físico-química de las partículas de hierro y los hidrogeles magnéticos

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las partículas de hierro se realizaron en condiciones de alto vacío por medio de un microscopio FEI Quanta3DFEG con un voltaje de aceleración de 5/20 kV. La estructura microscópica de los hidrogeles de alginato seleccionados se analizó mediante un FEI Quanta400 ESEM, mientras que para los hidrogeles supramoleculares de péptidos se utilizó un FEI Quanta650F dotado de un sistema de criostación (crio-SEM).

Para determinar el pH, se suspendieron 0.1 g de partículas de hierro en 50 mL de agua y se estabilizaron durante la noche antes de la medida. A continuación, se midió el pH de la solución usando un medidor de pH 510 (Oakton Instruments).

El potencial zeta se evaluó utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Para ello, las suspensiones se prepararon dispersando 5 mg de partículas de hierro en 2 mL de KCl 1 mM.

2.2.6. Caracterización reológica de los hidrogeles magnéticos

Las propiedades reológicas de los hidrogeles de alginato magnéticos se determinaron a temperatura ambiente usando el magnetorreómetro MCR 300 (Physica Anton Paar) con una geometría plato-plato de 20 mm de diámetro.

Las propiedades reológicas de los hidrogeles magnéticos supramoleculares de péptidos se determinaron a una temperatura constante de 25.0 ± 0.1 °C usando el reómetro de esfuerzo controlado Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) con una geometría plato-plato de 35 mm de diámetro (sensor P35 Ti L S serrated).

La zona viscoelástica lineal (ZVL) de los hidrogeles estudiados en ambos casos se determinó sometiendo a pruebas de barrido de amplitud de deformación a una frecuencia constante de 1 Hz y aumentando gradualmente la amplitud de deformación por cizalla, γ_0 . A partir de estas medidas se determinaron los valores de los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') en función de γ_0 , junto con los valores promediados de G' y G'' dentro de la ZVL. Las pruebas de barrido de frecuencia se realizaron a una amplitud de deformación fija ($\gamma_0 = 0.03\%$ y $\gamma_0 = 0.02\%$, respectivamente) dentro de la ZVL, y una frecuencia creciente en el rango de 0.15 a 15 Hz. En el caso de los hidrogeles de alginato, tanto los barridos de amplitud como de frecuencia se llevaron también a cabo con la presencia de un campo magnético de dos intensidades distintas de 141 kA/m y 242 kA/m.

2.2.7. Ensayos de viabilidad celular

Para evaluar la citotoxicidad de los hidrogeles magnéticos se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular en los que se analizaron cultivos celulares de fibroblastos humanos que estuvieron en contacto con las distintas muestras durante 48 horas.

En primer lugar, se analizó la viabilidad de los fibroblastos mediante ensayos funcionales WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics, Alemania) basados en la transformación colorimétrica de la sal de tetrazolio (WST-1) en formazán, impulsada por la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial de células vivas, que es directamente proporcional al número de células viables (es decir, metabólicamente activas). Se midió la absorbancia de la reacción colorimétrica de cada muestra por triplicado con un espectrofotómetro Assay UVM 340.

Para determinar la integridad estructural de las células cultivadas en contacto con los biomateriales, se cuantificó el ADN total liberado por las células correspondiente a cada

condición con un espectrofotómetro UV-vis NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Se utilizaron 10 μL del medio de cultivo para determinar la cantidad de ADN liberada por cada condición. La liberación de ADN de las células al medio de cultivo se produce como resultado de un daño irreversible en la membrana celular. Por lo tanto, una mayor concentración de ADN en el medio de cultivo indica un mayor número de células muertas con la membrana alterada estructuralmente.

Por último, se realizaron ensayos de viabilidad de células vivas y muertas (Live/Dead). Este método combina un ensayo funcional basado en calceína AM, que se activa metabólicamente y se vuelve verde por las células vivas, y un ensayo estructural basado en el homodímero 1 de etidio, que solo puede penetrar en el núcleo celular si la célula está muerta. Por lo tanto, las células vivas están coloreadas en verde y las células muertas en rojo. Las células se cultivaron en presencia de cada material durante 48 horas y se lavaron con PBS. Luego, se agregaron calceína AM y homodímero-1 de etidio siguiendo las instrucciones del fabricante, y se tomaron imágenes representativas de los fibroblastos humanos utilizando un microscopio de fluorescencia A1R Nikon (Nikon). Las imágenes se analizaron utilizando el paquete de software NIS-Elements.

2.2.8. Análisis estadístico

Se utilizó el análisis paramétrico de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias entre los hidrogeles con respecto a su módulo de almacenamiento (G'). Después del análisis ANOVA, se realizó un análisis de comparaciones múltiples por pares utilizando las pruebas Tukey HSD y Dunnett post hoc de dos colas. Para la prueba de Dunnett, el hidrogel con partículas MP0 fue solo un control. Se consideró que una diferencia era estadísticamente significativa si el valor de p era inferior a 0.05. La biocompatibilidad de los hidrogeles (es decir, WST-1 y cuantificación del ADN liberado) debido a la falta de normalidad de las muestras (según lo confirmado por la prueba de Shapiro-Wilk), se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de múltiples comparaciones por pares basadas en la prueba de Conover-Iman post hoc. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa si el valor de p era inferior a 0.05 corregido por la corrección de Bonferroni.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Caracterización de las partículas de hierro

Las partículas micrométricas MP0 están recubiertas por una capa irregular de sílice, por lo que hay muchos grupos silanol presentes en la superficie que hacen que esta sea muy versátil y esté lista para ser modificada mediante la unión de grupos funcionales específicos. Por tanto, en este trabajo se eligió la funcionalización con diferentes monómeros de organosilicio como la estrategia más sencilla para la funcionalización de las partículas micrométricas. Para ello, se probaron seis monómeros diferentes, cuyos grupos funcionales se presentan en la figura 2.1. La razón para elegir una gama tan amplia de grupos funcionales fue doble: (i) comprobar si se puede lograr la funcionalización de la superficie de hierro utilizando monómeros distintos de APTES; y (ii) estudiar el efecto de la superficie química de las partículas en las propiedades de los hidrogeles magnéticos de alginato resultantes. Además, la elección de los grupos funcionales utilizados en este trabajo fue dictada por el hecho de que pueden interactuar con la red de alginato de varias formas. Por ejemplo, los grupos amino o tiocianato pueden formar enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo del alginato, mientras que se espera que los grupos fenilo interactúen de forma repulsiva con una red de hidrogel de alginato cargada negativamente.

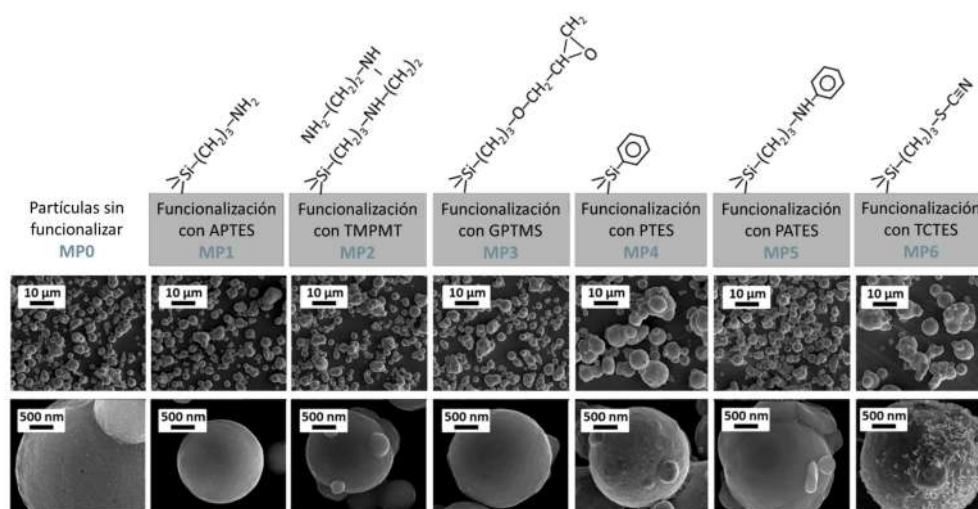


Figura 2.1: Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las partículas de hierro micrométricas con las distintas funcionalizaciones.

En la figura 2.1 se presentan las imágenes de SEM de las micropartículas resultantes. Como puede verse, la muestra MP0 está compuesta por partículas esféricas de múltiples tamaños y, a menudo, formando agregados. Después de la funcionalización, las partículas permanecen sin cambios; con la única excepción de la muestra MP6, donde se observa la formación de un complejo o corrosión a grandes aumentos. De hecho, los tiocianatos se

consideran altamente corrosivos para el hierro y el acero [83,84] y también pueden formar complejos rojos con el hierro. La aparición de esta corrosión confirma el hecho de que el recubrimiento de sílice de las partículas MP0 no es lo suficientemente perfecto como para proteger el núcleo de hierro del contacto con el entorno externo. El rápido proceso de corrosión de la muestra MP6 se confirmó mediante la observación de dispersiones de las distintas partículas en agua, las cuales se mantuvieron en viales cerrados durante 30 días. Pasado ese tiempo, se formó una capa de óxido de hierro rojizo en el caso de las muestras MP4 (después de 10 días aprox.) y MP6 (después del primer día), pero no en el caso de las muestras restantes. Estos experimentos demuestran claramente que las micropartículas de hierro tienen diferentes tipos de capas externas, algunas de las cuales inhiben y otras aceleran el proceso de corrosión. Desde el punto de vista de las aplicaciones biomédicas, la inhibición efectiva de la corrosión es muy importante debido al contacto permanente de las partículas de hierro con diferentes fluidos fisiológicos. Por tanto, los grupos funcionales que aceleran la corrosión no pueden utilizarse en esas aplicaciones independientemente de su utilidad funcional.

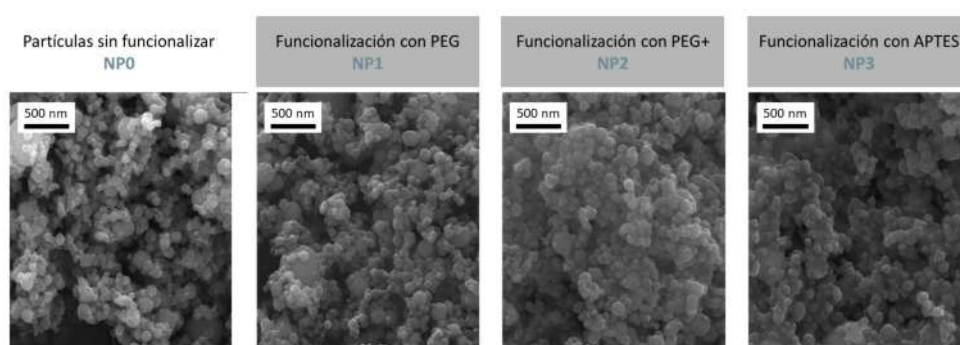


Figura 2.2: Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las partículas de hierro nanométricas con las distintas funcionalizaciones.

Por otro lado, las partículas de hierro nanométricas NP0 presentan una superficie desnuda. En este caso, se partió de trabajos previos en los que se prepararon hidrogeles supramoleculares de péptidos con este tipo de partículas recubiertas de PEG [27]. Partiendo de este recubrimiento, se estudiaron los casos en que se añadía una pequeña cantidad de PEG y de PEG heterobifuncional de forma que la cantidad de grupos funcionales hidroxilo cambia, y por otro lado se combina con grupos amina mediante la adición de APTES. De la misma forma que en el caso de las partículas micrométricas, aquí se pretende estudiar cómo afecta el grupo funcional en la interacción de las partículas magnéticas con los péptidos que forman la estructura supramolecular del hidrogel, ya que los grupos hidroxilo proporcionan una mejor hidrofilia, mientras que los grupos amina mejoran la interacción con el péptido. Para este tipo de partículas, vemos en las imágenes de SEM (Figura 2.2) que la muestra NP0 está compuesta por partículas esféricas polidispersas que forman agregados. Después de la funcionalización, las partículas permanecen sin cambios, con la única aparición de la capa de PEG y/o APTES que las recubre completamente.

Los valores del pH de la superficie y del potencial zeta también varían según las muestras, lo que demuestra los notables cambios del carácter químico de la superficie que se producen durante la funcionalización. Como puede verse en la tabla 2.1, en el caso de las muestras MP1 y MP2 los valores del potencial zeta se desplazan significativamente hacia valores más positivos, probablemente debido a la presencia de grupos amina protonados. Por el contrario, para la muestra MP4 el valor del potencial zeta es ligeramente negativo, debido a la presencia de electrones π de los anillos de fenilo introducidos durante la funcionalización. Asimismo, en el caso de la muestra NP3, el potencial zeta se desplaza hacia valores más negativos con respecto a las NP0 y las funcionalizaciones con PEG. Los cambios de los valores de pH son más sutiles; sin embargo, incluso esos pequeños cambios muestran que la superficie de las partículas magnéticas es diferente en cada caso. Por ejemplo, la reducción del pH de 5.8 para la muestra MP0 a 4.7, 5.2 y 5.2 para las muestras MP1, MP2 y MP5, respectivamente, atestigua la liberación de iones H_3O^+ a partir de la hidrólisis de los grupos amina protonados. La mayoría de los grupos amina de las partículas micrométricas están protonados porque durante la funcionalización (ver la sección 2.2.1 para más detalles) se usó una pequeña cantidad de ácido clorhídrico para catalizar la hidrólisis de los grupos alcoxi de los monómeros de sílice.

Tabla 2.1: Propiedades químicas y estructurales de las partículas de hierro funcionalizadas.

Muestra	Monómero	Grupo funcional	pH	$\zeta(\text{mV})$
MP0	-	-	5.80 ± 0.05	~ 7
MP1	APTES	amina I°	4.70 ± 0.03	~ 20
MP2	TMSPD	amina I° y II°	5.20 ± 0.03	~ 20
MP3	GPTMS	glicidoxi	5.60 ± 0.05	~ 3
MP4	PTES	fenilo	5.20 ± 0.02	~ -1
MP5	PATES	fenilamina	5.80 ± 0.04	~ 9
MP6	TCTES	tiocianato	6.30 ± 0.07	~ 3
NP0	-	-	6.50 ± 0.12	~ 26
NP1	PEG-400	hidroxilo	6.30 ± 0.03	~ 26
NP2	PEG-400/PEG'	hidroxilo	5.80 ± 0.02	~ 22
NP3	PEG-400/APTES	hidroxilo/amina I°	6.70 ± 0.08	~ 10

2.3.2. Caracterización estructural de los hidrogeles magnéticos

En primer lugar, los hidrogeles de alginato magnéticos con micropartículas de hierro funcionalizadas y no funcionalizadas se estudiaron visualmente. Como puede observarse en la figura 2.3, conservan la forma del recipiente utilizado para su preparación. Todos los ferrogeles eran negros, aunque con diferente apariencia macroscópica: los hidrogeles con MP1, MP2 y MP5 eran muy homogéneos, mientras que en el caso de las muestras restantes se observó una separación parcial del agua al día siguiente. En el caso del hidrogel con MP6, la estructura se colapsó y el color cambió debido a la formación de complejos rojos con el hierro y/o a la corrosión progresiva. Dado que todos los hidrogeles se obtuvieron al mismo tiempo utilizando la misma disolución

madre de alginato, los cambios resultantes en el aspecto físico se atribuyen sin duda a la diferente funcionalización química de las micropartículas magnéticas incorporadas. Para los hidrogeles bien formados (muestras con MP1, MP2 y MP5), las micropartículas magnéticas no solo quedaron atrapadas dentro de la red polimérica, sino que se unieron eficazmente a las cadenas de alginato y, en consecuencia, no se observaron fugas de micropartículas magnéticas en estos hidrogeles (incluso después de sumergir las muestras en agua durante varios días). Por el contrario, como se observa en la figura 2.3, se produjo una fuga de partículas para los otros hidrogeles.

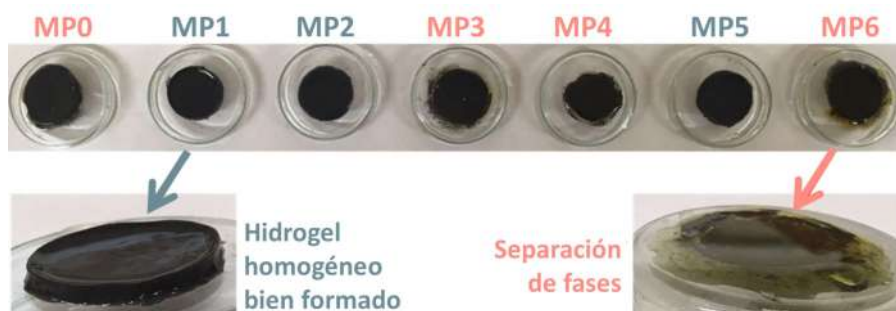


Figura 2.3: Apariencia física de los hidrogeles de alginato magnéticos. Nótese que en el caso de los hidrogeles con MP3, MP4 y MP6 se ve una fase líquida separada de la estructura de hidrogel.

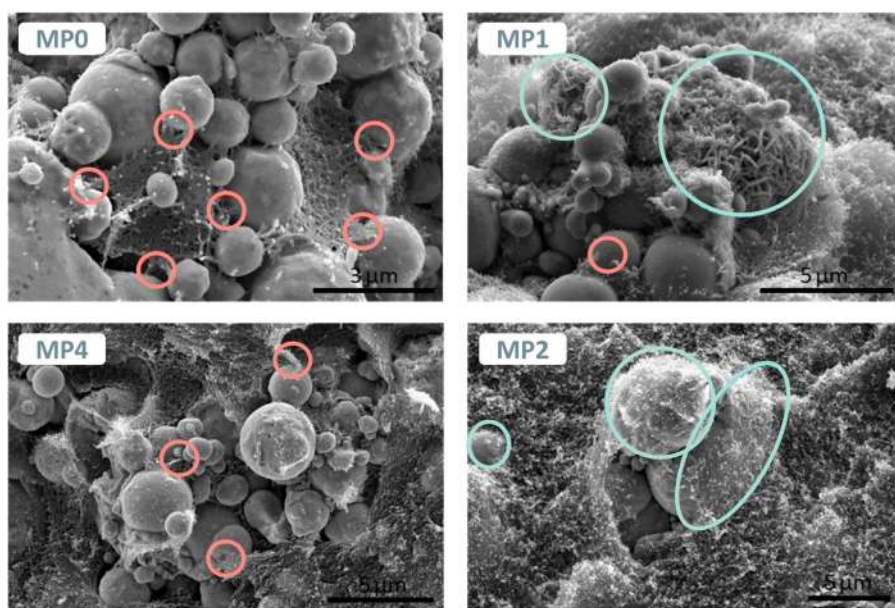


Figura 2.4: Imágenes SEM de los hidrogeles de alginato magnéticos seleccionados (los círculos rosas muestran uniones tipo telaraña en un solo punto, mientras que los círculos azules muestran uniones multipunto de las micropartículas con la red de alginato).

Se tomaron imágenes de SEM para comprobar si la funcionalización de las micropartículas afecta a la microestructura de los hidrogeles de alginato resultantes. En la figura 2.4 se muestran algunas de las imágenes más representativas seleccionadas, las cuales muestran que existen diferencias notables entre las formas de unión de las fibras de alginato a la superficie de las micropartículas para los sistemas considerados. En el caso de las partículas MP0 y MP4, es visible una red característica similar a una telaraña que está conectada solo a algunos puntos específicos de la superficie de las micropartículas (marcados con círculos rosas en la figura 2.4). Sin embargo, la mayor parte de la superficie está desnuda debido a una inadecuada funcionalización química. Por otro lado, en el caso de los hidrogeles con partículas MP1 y MP2 (es decir, partículas con abundancia de grupos amina en la superficie), existe un tipo de unión completamente diferente entre ambas fases. Las micropartículas están rodeadas por el hidrogel de alginato, sin una formación significativa de estructuras en forma de telaraña, sino que cubren la mayor parte de la superficie de las micropartículas (marcada con círculos azules). En el caso del hidrogel con partículas MP1, se observan cambios notables en la morfología de las cadenas de alginato que rodean a algunas micropartículas, es decir, en algunos lugares las cadenas de alginato son claramente más gruesas probablemente debido a fuertes interacciones atractivas entre ambas fases.

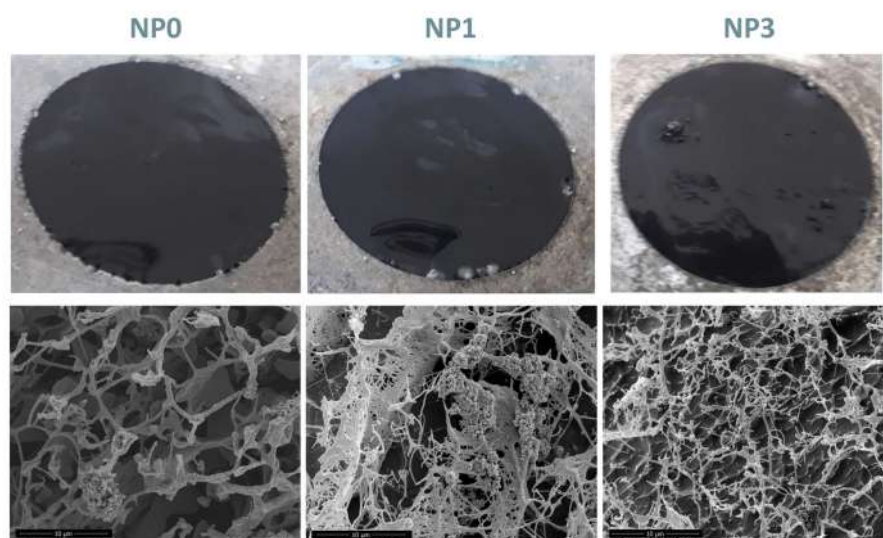


Figura 2.5: Apariencia física e imágenes de SEM de los hidrogeles magnéticos supramoleculares de péptidos seleccionados.

En cuanto a los hidrogeles magnéticos supramoleculares de péptidos, el estudio visual de los mismos muestra una apariencia macroscópica homogénea, de color negro debido a la presencia de las partículas magnéticas y sin diferencias entre los distintos grupos, tal y como puede observarse en la figura 2.5. Además, en todos los casos las partículas quedaron bien atrapadas en la red supramolecular, sin fugas de partículas al exterior y no se observaron cambios de color en el medio debido a la corrosión para ninguno de los

casos en los que las partículas fueron funcionalizadas (NP1, NP2 y NP3), incluso varios meses después de su preparación. Sin embargo, las partículas magnéticas sin funcionalizar (NP0), sí que muestran una oxidación de la superficie al no estar esta recubierta.

Finalmente, para comprobar si la funcionalización de las nanopartículas de hierro afecta a la microestructura de los hidrogeles supramoleculares de péptidos, se tomaron imágenes de crio-SEM (Figura 2.5). En todos los casos se observa que las partículas tienden a agruparse entre sí formando agregados que quedan atrapados en la red, de manera que se encuentran recubiertas por las fibras de péptidos a su alrededor. De hecho, la morfología abultada de las fibras de péptidos cuando se observan en detalle, da cuenta del hecho de que las partículas más pequeñas que no se encuentran formando agregados han quedado totalmente recubiertas dentro de las fibras. Sin embargo, no se observan grandes cambios en la morfología general de la red dependiendo del tipo de funcionalización de las partículas.

2.3.3. Caracterización reológica de los hidrogeles magnéticos

Se estudiaron las características reológicas de los hidrogeles magnéticos con todas las partículas de este estudio excepto las MP6 para el caso de los hidrogeles de alginato. En todos los casos, los barridos de amplitud de deformación de cizalla muestran la tendencia típica de un material viscoelástico similar a un sólido, caracterizado por valores constantes con $G' > G''$ dentro de la ZVL, y seguidos por una disminución drástica de los módulos viscoelásticos hasta que se alcanza una destrucción irreversible del material a amplitudes de deformación altas [68]. También se analizó la dependencia de los módulos viscoelásticos (G' y G'') en función de la frecuencia dentro de la ZVL, los cuales solo cambian ligeramente con la frecuencia de oscilación, manteniéndose $G' > G''$. En el caso de los hidrogeles supramoleculares de péptidos, los valores de G'' aumentan ligeramente con la frecuencia hasta experimentar una caída brusca en torno a una frecuencia de 5 Hz para después continuar con un valor constante hasta las frecuencias más elevadas. Además, para los hidrogeles de alginato los valores de G' y G'' aumentan notablemente cuando se aplica un campo magnético durante las medidas reológicas. Por simplicidad, los datos resultantes de estos experimentos no se muestran aquí. Una descripción más detallada al respecto se encuentra en el Capítulo 3 de esta tesis doctoral, dedicado exclusivamente a la preparación y caracterización de los hidrogeles de alginato magnéticos y homogéneos.

En la figura 2.6, se muestran los valores promedio de G' dentro de la ZVL para las distintas condiciones estudiadas. Para los hidrogeles de alginato, las diferencias observadas en los valores promedio de G' sin campo magnético aplicado (Figura 2.6a), son significativas en el caso de los hidrogeles con partículas MP1, MP2 y MP5 en comparación con las MP0 (prueba post hoc de Dunnett, $\alpha=0.05$) con valores p respectivamente 0.0001, 0.001 y 0.044. Sin embargo, para los hidrogeles con partículas MP3 y MP4, no se observaron diferencias significativas en comparación con las MP0. Por tanto, se puede ver que la incorporación de micropartículas MP1 y MP2 modificadas con amina da como resultado valores mucho más altos de G' en comparación con el hidrogel que incluye MP0. Por el contrario, los hidrogeles formados con partículas funcionalizadas con glicidoxi y fenilo (MP3 y MP4, respectivamente) tienen valores de G' muy similares.

Estos resultados concuerdan con las diferencias en la adhesión entre las cadenas poliméricas y las partículas observadas mediante microscopía electrónica (Figura 2.4), y demuestran claramente el papel crítico de la funcionalización adecuada de las partículas de hierro en el control de las propiedades mecánicas finales de los hidrogeles resultantes. Además, tal y como se muestra en la figura 2.6b, en presencia del campo magnético aparece un fuerte aumento de los módulos viscoelásticos debido a la reorganización de las partículas, que no fue obstaculizada por la matriz elástica del hidrogel de alginato, y por tanto de la estructura interna del hidrogel. De la misma manera, en la figura 2.6c se muestran los valores para los hidrogeles magnéticos supramoleculares de péptidos. En el caso de las muestras NP1 y NP2, es decir, las muestras funcionalizadas con PEG y por tanto con grupos hidroxilo, se obtienen valores promedio de G' más bajos que los del grupo control NP0. Por el contrario, las partículas funcionalizadas con APTES dan como resultados hidrogeles supramoleculares de péptidos con mejores propiedades mecánicas, ya que se obtienen valores similares a los que contienen partículas de tipo NP0. Así, estos resultados corroboran el hecho de que la funcionalización de las partículas magnéticas tiene un papel muy importante en las propiedades macroscópicas finales de los hidrogeles.

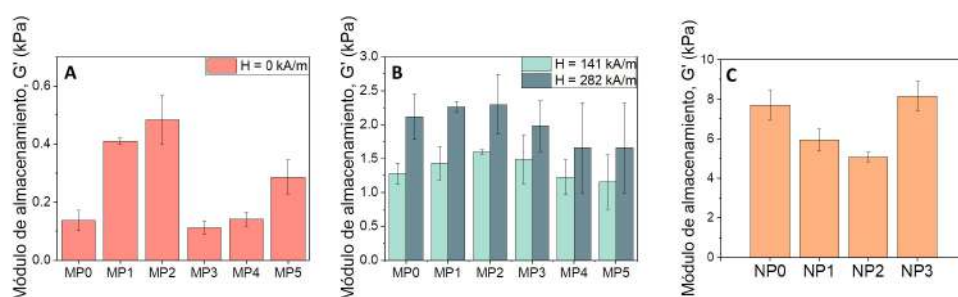


Figura 2.6: Comparación de los valores promedio de G' dentro de la ZVL para los distintos tipos de hidrogeles (a) de alginato sin campo magnético aplicado, (b) de alginato con campo magnético aplicado durante la medida, y (c) supramoleculares de péptidos sin campo magnético aplicado.

2.3.4. Ensayos de viabilidad celular

Por último, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular para los hidrogeles de alginato magnéticos seleccionados. En este punto, es importante aclarar que el objetivo fue simplemente comparar los hidrogeles seleccionados entre sí en lugar de evaluar la citotoxicidad absoluta. Esto se debe al hecho de que un estudio de citotoxicidad completo requeriría encontrar interrelaciones entre la viabilidad celular y la concentración de alginato, la densidad celular, la concentración de calcio y el tiempo de exposición, lo que conlleva un estudio demasiado extenso, no pudiendo ser abarcado durante la realización de esta tesis doctoral. En la figura 2.7 se muestran imágenes de fluorescencia representativas de células vivas teñidas con calceína-AM (verde) y células muertas teñidas con yoduro de propidio (rojo), correspondientes al ensayo Live/Dead. Como puede verse, el número de células vivas se redujo significativamente para todos los hidrogeles magnéticos de alginato estudiados en comparación con las células del grupo control. Lo

más importante es que se observan diferencias entre los hidrogeles estudiados: en el caso de la muestra de MP0, no se observaron células muertas, mientras que en el caso de la muestra con MP4, se encontró un número significativo de células muertas en algunas imágenes. El análisis estadístico de los ensayos funcionales de WST-1 (Figura 2.7b) mostró diferencias significativas entre los hidrogeles con partículas MP0 y MP4 (valor $p < 0.0001$) pero no entre MP0 y MP2 (valor $p = 0.016$). Esto significa que los grupos amina presentes en la superficie de la muestra MP2 no dan como resultado una menor viabilidad celular. Por el contrario, la funcionalización con grupos fenilo (muestra MP4) hace que el hidrogel resultante sea menos biocompatible. Por tanto, se puede concluir que la biocompatibilidad de los hidrogeles magnéticos depende también de la química superficial de las micropartículas funcionalizadas. Estos resultados se confirman mediante el análisis de cuantificación de ADN libre que muestra diferencias estadísticamente significativas entre todas las muestras comparadas. Como puede verse en la figura 2.7c, el hidrogel con partículas MP4 se asoció con los niveles más altos de daño celular y liberación de ADN al medio de cultivo, mientras que los hidrogeles con MP0 y MP2 mostraron una biocompatibilidad mucho mejor.

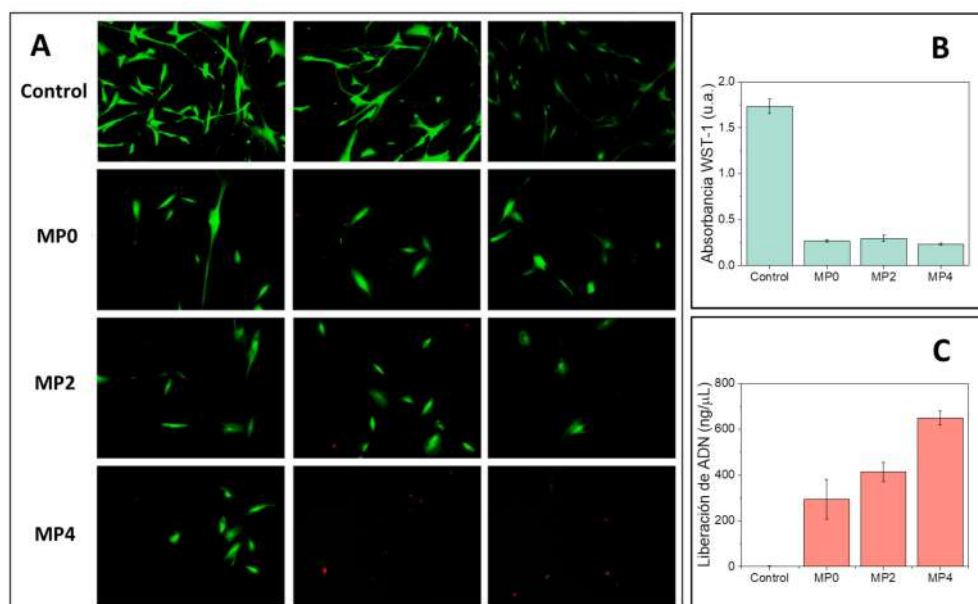


Figura 2.7: Citotoxicidad de los hidrogeles seleccionados revelada por (a) microscopía de fluorescencia en los ensayos de Live/Dead, (b) prueba de absorbancia WST-1, y (c) cuantificación de ADN liberado en el medio de cultivo celular.

2.4. Conclusiones

Las partículas de hierro se modificaron introduciendo una serie de funcionalizaciones en su superficie, que van desde grupos amina hasta grupos fenilo. Aunque las funcionalizaciones de la superficie no han afectado significativamente a las propiedades de las micropartículas en sí mismas, cambiaron notablemente las propiedades finales de los hidrogeles magnéticos obtenidos al incluirlas en una matriz de alginato o de péptidos. Así, la dispersión de las partículas funcionalizadas en los hidrogeles de alginato fue muy beneficiosa, ya que se logró mejorar las propiedades macroscópicas y mecánicas de los hidrogeles gracias a las interacciones del alginato con la superficie funcionalizada de las micropartículas. Entre todos los sistemas estudiados, los hidrogeles basados en micropartículas funcionalizadas con grupos amina exhibieron propiedades superiores en comparación con los hidrogeles preparados con partículas no funcionalizadas. Propiedades como la integridad o los módulos viscoelásticos de los hidrogeles a base de amina mejoraron significativamente en comparación con el hidrogel con partículas no funcionalizadas. Asimismo, las imágenes SEM revelaron que la falta de una funcionalización química superficial adecuada limita el contacto entre ambas fases, la cuales estarían unidas solo por un número limitado de puntos de anclaje. Por el contrario, la aminación de la superficie de las micropartículas de hierro da como resultado un recubrimiento más compacto mediante múltiples uniones entre las fibras de alginato y la superficie de las partículas. Así mismo, debido a la interacción atractiva entre los grupos carboxilo del péptido Fmoc-FF y los grupos amina protonados de las partículas recubiertas con APTES, se obtienen hidrogeles supramoleculares de péptidos con mejores propiedades mecánicas que aquellos en los que se funcionaliza con PEG. Por tanto, se ha demostrado que la correcta funcionalización de las partículas de hierro se puede utilizar para la modulación de las propiedades finales de los hidrogeles preparados con estas partículas.

Parte II

Capítulo 3.

Síntesis y caracterización de hidrogeles de alginato isótropos

3.1. Introducción

Los hidrogeles se definen como redes tridimensionales (3D) formadas por cadenas poliméricas flexibles dispersas en un medio acuoso [1]. Desde un punto de vista fundamental, los hidrogeles son sistemas únicos que combinan una gran porosidad con un comportamiento mecánico propio de un sólido elástico. Debido a su flexibilidad, consistencia blanda, alto contenido de agua y la versatilidad de sus propiedades mecánicas, los hidrogeles se utilizan para diversas aplicaciones en tecnología y biomedicina, algunas de ellas ya explotadas a nivel comercial [1–8]. Por ejemplo, los hidrogeles se han utilizado como músculos artificiales [85, 86], depósitos para el almacenamiento y suministro de células, fármacos o factores ambientales en medicina clínica [87, 88], así como matrices extracelulares artificiales en ingeniería tisular [89]. De hecho, siempre que la biocompatibilidad sea adecuada, los hidrogeles imitan la matriz extracelular de los tejidos vivos mejor que cualquier otro tipo de biomaterial sintético [1].

La investigación básica actual dentro de este campo se centra principalmente en los hidrogeles que responden a estímulos como la temperatura, los productos químicos o el pH, cambiando sus propiedades en respuesta a los mismos [14]. Una categoría importante dentro de estos geles inteligentes está constituida por los geles magnéticos (o ferrogeles), que desde el punto de vista estructural consisten en dispersiones de micro o nanopartículas magnéticas embebidas dentro de un gel polimérico [18–22]. Por su composición, los geles magnéticos combinan en un solo material el comportamiento paramagnético proporcionado por las partículas con la flexibilidad que aporta la red polimérica. La principal ventaja de los ferrogeles frente a los hidrogeles no magnéticos

Parte del contenido de este capítulo ha sido publicado en:

C. Gila-Vilchez, A. B. Bonhome-Espinosa, P. Kuzhir, A. Zubarev, J. D. G. Duran, M. T. Lopez-Lopez. Rheology of magnetic alginate hydrogels, *Journal of Rheology*, **62**, 1083-1096, 2018.

C. Gila-Vilchez, J. D. G. Duran, F. Gonzalez-Caballero, A. Zubarev, M. T. Lopez-Lopez. Magnetorheology of alginate ferrogels, *Smart Materials and Structures*, **28**, 035018, 2019.

es que pueden ser manipulados y controlados sin contacto mediante fuerzas magnéticas, cambiando tanto su microestructura como sus propiedades macroscópicas (forma, tamaño, comportamiento mecánico, etc.) [23, 35, 90, 91].

En cuanto a las propiedades específicas de cualquier gel magnético, estas dependen tanto del tipo de red polimérica como de las partículas magnéticas incluidas. Por un lado, la rigidez de los hidrogeles está predefinida principalmente por la red de polímeros, siendo las redes formadas por enlaces químicos bastante rígidas, mientras que las redes físicas (formadas por enlaces iónicos, enlaces por puentes de H, etc.) tienden a ser más flexibles e incluso inyectables [92]. Entre los polímeros utilizados para la preparación de hidrogeles magnéticos, el alginato es una de las opciones más usadas por muchos investigadores. Esto se debe al bajo precio y la biocompatibilidad de las sales de alginato, además de la facilidad de preparación de los hidrogeles de alginato iónicos [93]. Por otro lado, el tamaño de las partículas también juega un papel relevante, ya que las partículas pequeñas (nanométricas) sólo experimentan una débil atracción entre ellas bajo campos magnéticos moderados, mientras que las partículas grandes (micrométricas) interactúan fuertemente incluso con campos magnéticos bajos [94]. En el caso de los ferrogel, la migración y agregación de partículas magnéticas inducida por el campo magnético se ve parcialmente obstaculizada por las fuerzas elásticas de la red polimérica y, en consecuencia, el efecto magnetorreológico (MR - capacidad de modificar las propiedades mecánicas de una dispersión de partículas magnetizables mediante la aplicación de un campo magnético) desarrollado por los ferrogel suele ser débil en comparación con las suspensiones de partículas magnéticas en un portador líquido (o fluidos magnetorreológicos).

Teniendo todo esto en cuenta, se ha diseñado un nuevo protocolo de dos pasos para la preparación de hidrogeles magnéticos homogéneos formados por partículas de hierro micrométricas incluidas dentro de una red polimérica de alginato. Este protocolo permite obtener hidrogeles homogéneos con un porcentaje de partículas magnéticas de hasta el 33% en volumen que mostraron una gran sensibilidad ante la presencia de campos magnéticos. Se ha llevado a cabo una caracterización completa de la morfología, microestructura y propiedades mecánicas de los hidrogeles magnéticos resultantes. Además, se realizó un estudio completo desde un punto de vista experimental del comportamiento magnetorreológico de los ferrogel de alginato y analizamos los mecanismos detrás del efecto MR tan grande observado en estos sistemas. Como se mostrará, el fuerte efecto MR en los ferrogel de alginato es causado por la interacción, bajo un campo magnético, de grupos preexistentes de partículas magnéticas dentro de la red polimérica de alginato. Nótese también que, a diferencia del caso de los fluidos MR, en los que debe evitarse la agrupación de partículas, ya que conducen a una rápida separación de fases bajo la fuerza gravitatoria, la presencia de agrupaciones de partículas en los ferrogel no representa un inconveniente ya que la red polimérica confiere estabilidad coloidal frente a la sedimentación.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Preparación de hidrogeles y ferrohgeles de alginato

El método más simple para la preparación de hidrogeles de alginato magnéticos es la dispersión de partículas magnéticas en una solución de alginato de sodio, seguida de la adición de una fuente de iones de calcio (Ca^{2+}). Cada ión calcio puede unirse por interacción iónica a dos cadenas de alginato cargadas negativamente (valencia -1), dando lugar a la formación de una red de polímero iónico [93]. Cuando la fuente de iones de calcio es una sal altamente soluble, como el cloruro de calcio (CaCl_2), los hidrogeles resultantes carecen de homogeneidad debido a una densidad de reticulación no homogénea, la cual es apreciablemente mayor cerca del lugar de adición de la fuente de calcio [95]. Esta falta de homogeneidad se puede prevenir utilizando sales poco solubles (por ejemplo, carbonato de calcio - CaCO_3) como fuente de iones de calcio, lo que da lugar a una cinética de gelificación lenta que conlleva como resultado una densidad de reticulación homogénea [96]. Sin embargo, debe evitarse una cinética de gelificación lenta en el caso de hidrogeles magnéticos basados en partículas magnéticas de tamaño micrométrico, ya que estas partículas poseen una alta densidad y un movimiento browniano insignificante que provocan su sedimentación y, por lo tanto, gradientes de partículas no deseados, e incluso separación de fases en los hidrogeles resultantes, si la cinética de gelificación es demasiado lenta. Para resolver simultáneamente la falta de homogeneidad en la densidad de reticulación (si se usa sal de calcio altamente soluble) y los fuertes gradientes de partículas (si se usa sal de calcio poco soluble), se ha diseñado un nuevo protocolo de dos pasos que permite obtener hidrogeles magnéticos con una distribución homogénea de partículas y de densidad de reticulación.

Para ello, se sigue un procedimiento estándar de preparación de muestras para garantizar la reproducibilidad de los resultados. En primer lugar, se prepara una red polimérica utilizando alginato de sodio [fórmula empírica $(\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6)_n$] obtenido a partir de la matriz extracelular de algas pardas, con un peso molecular de 176.10 g/mol (Sigma Aldrich, EE. UU.). Se dispersó el alginato de sodio en agua destilada a una concentración del 1 % p/v. Luego, se usó CaCO_3 como fuente de iones de calcio para iniciar la gelificación en combinación con D-glucono- δ -lactona (GDL) (Sigma Aldrich, EE. UU.), teniendo en cuenta que la GDL se hidroliza en agua a ácido glucónico, lo que mejora la solubilidad del CaCO_3 como consecuencia de la acidificación resultante del medio. Para un volumen final de 5 mL de la solución de alginato de sodio, se añaden 7.5 mg de CaCO_3 y 26.7 mg de GDL, agitando la mezcla con vortex hasta que es macroscópicamente homogénea. A continuación, se coloca la mezcla en una placa Petri y se deja en reposo a temperatura ambiente y en una atmósfera saturada de agua para su gelificación. Para obtener un hidrogel magnético, se rompe la mezcla con vortex 90 minutos después de iniciada la gelificación. Después de romper el hidrogel, agregamos la fase magnética y sonicamos la mezcla resultante durante 10 minutos antes de volver a colocarla en reposo en una placa de Petri. Como fase magnética utilizamos partículas micrométricas de hierro recubiertas de sílice (Fe-CC), suministradas por BASF (Alemania), que fueron descritas en el Capítulo 2, subsección 2.2.1. Finalmente, se agregan 5 mL de CaCl_2 45 mM (Sigma Aldrich, EE. UU.) a la muestra magnética previamente colocada en una placa Petri, y se

guarda hasta el día siguiente a temperatura ambiente en una atmósfera saturada de agua. A modo de comparación, preparamos hidrogeles de alginato no magnéticos siguiendo el mismo protocolo sin la adición de partículas.

3.2.2. Apariencia macroscópica, grado de hinchamiento y estructura microscópica de los hidrogeles

Se analizó la apariencia macroscópica de los hidrogeles mediante observación directa y fotografía con una cámara digital. Se llevaron a cabo pruebas de hinchamiento para obtener información sobre la densidad de reticulación y la estructura porosa de los hidrogeles. Para este fin, se procedió de la siguiente manera: (i) colocamos los hidrogeles en placas de Petri secas y medimos su masa mediante una microbalanza digital, (ii) secamos los hidrogeles durante 24 horas a temperatura ambiente en contacto con papel secante para obtener su masa después de la deshidratación, (iii) rehidratamos los hidrogeles nuevamente sumergiéndolos en agua durante otras 24 horas y obtuvimos su masa. La estructura microscópica de los hidrogeles se analizó mediante imágenes de microscopía óptica conectada a una cámara CCD, así como mediante imágenes de SEM (microscopía electrónica de barrido), que se realizaron utilizando un FEI Quanta 400 ESEM.

3.2.3. Caracterización reológica de los hidrogeles

Se determinaron las propiedades reológicas bajo esfuerzos de cizalla de los hidrogeles tanto magnéticos como no magnéticos utilizando un (magneto)reómetro rotacional (Physica MCR 300) con una geometría plato-plato de 20 mm de diámetro y a una temperatura constante de $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Para ello, se colocan las muestras en forma de disco en el sistema de medición del reómetro, con la superficie inferior de las muestras en contacto con el plato inferior del sistema. En algunos experimentos específicos, y con el fin de investigar la influencia potencial de la existencia de un gradiente vertical en la concentración de partículas magnéticas dentro del hidrogel, giramos las muestras antes de colocarlas en el sistema de medición del reómetro; es decir, en estos casos, la superficie superior de los hidrogeles en forma de disco (como se ve con referencia a la dirección de la gravedad durante la gelificación) se colocó en contacto con el plato inferior del sistema de medición.

Primero, se determinó la zona viscoelástica lineal (ZVL) de los diferentes hidrogeles sometidos a pruebas de barrido de amplitud de deformación a una frecuencia constante de 1 Hz y aumentando gradualmente la amplitud de deformación de cizalla, γ_0 . A partir de estas medidas, se obtuvieron los valores de los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') en función de γ_0 . A partir de las curvas resultantes, se calculan los valores característicos de G' y G'' dentro de la ZVL promediando en la extensión total de la misma. Posteriormente, se realizaron pruebas de barrido de frecuencia a una amplitud de deformación de cizalla fija ($\gamma_0 = 0.03\%$) dentro de la ZVL y una frecuencia creciente en el rango de 0.15 - 15 Hz. A partir de estas medidas, se obtienen los valores de G' y G'' en función de la frecuencia de deformación. Tanto los barridos de amplitud como

de frecuencia se llevaron a cabo bajo la aplicación de campos magnéticos de diferentes intensidades dentro del rango 0 - 282 kA/m.

Por último, las diferentes muestras se sometieron a pruebas de barrido de campo magnético. Para ello, se sometieron las muestras a una deformación oscilatoria de amplitud ($\gamma_0=0.03\%$) y frecuencia ($f=1$ Hz) fijas, y se aumentó gradualmente la intensidad del campo magnético aplicado desde 0 hasta 282 kA/m. Durante la duración total del experimento (300 s), se hizo un seguimiento de los valores de los módulos viscoelásticos en función del tiempo.

Hay que tener en cuenta que los hidrogeles magnéticos experimentan magnetostricción, lo que podría resultar en la pérdida de contacto entre el plato superior y la muestra. Por tanto, durante las diferentes medidas reológicas llevadas a cabo, se impuso una fuerza normal de compresión constante de 0.1 N con el fin de asegurar que siempre hubiera contacto entre el plato superior del reómetro y los hidrogeles. Las diferencias en el espesor de las muestras dentro de un barrido de amplitud o frecuencia fueron siempre inferiores al 10 %. Además, durante la medida se creó una atmósfera saturada de vapor de agua alrededor de la muestra para evitar la pérdida de agua del hidrogel; y se utilizó una muestra nueva para cada experimento con el fin de descartar la influencia de cambios en la microestructura.

3.2.4. Estadística

Para cada conjunto de condiciones experimentales, se midieron al menos tres muestras diferentes. En el caso de algunas de las medidas reológicas, se realizaron tres repeticiones diferentes para cada muestra. Por lo tanto, para cada conjunto de condiciones experimentales se tienen en total al menos tres medidas distintas en general y nueve en el caso particular de algunas de las medidas reológicas. En este trabajo, se proporcionan los valores medios y las desviaciones estándar correspondientes a los distintos experimentos realizados.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Apariencia macroscópica, grado de hinchamiento y estructura microscópica de los hidrogeles

Tanto los hidrogeles magnéticos como los no magnéticos conservan la forma de disco del recipiente utilizado para su preparación (Figura 3.1). Los hidrogeles no magnéticos son transparentes, mientras que los magnéticos son de color negro debido a la inclusión de las partículas magnéticas. Ambos tipos de hidrogeles presentan un aspecto macroscópico homogéneo, incluso para una fracción de volumen de partículas magnéticas (ϕ) tan alta como 0.33. Es importante recalcar que, en general, los hidrogeles mantuvieron su forma e integridad bajo la manipulación y medidas realizadas en este trabajo. Una excepción fue la magnetostricción que experimentaban los hidrogeles magnéticos bajo una intensidad suficientemente alta de campo magnético aplicado (Tabla 3.1). Además de la magnetostricción, para una fracción de volumen de partículas igual o mayor a 0.09, los hidrogeles sufren roturas macroscópicas irreversibles cuando se someten a esfuerzos de cizalla fuera de la ZVL bajo la aplicación de un campo magnético (Figura 3.1c).

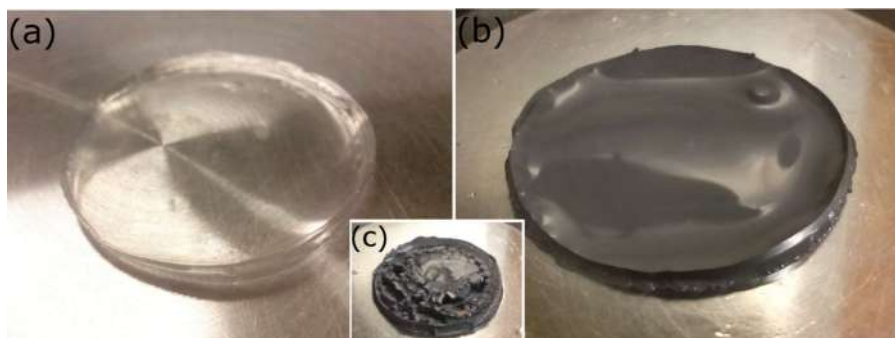


Figura 3.1: (a) Hidrogel no magnético, (b) hidrogel magnético que contiene una fracción en volumen de 0.29 de partículas magnéticas; los hidrogeles magnéticos que contienen diferentes concentraciones de partículas presentan un aspecto similar, (c) hidrogel magnético que contiene una fracción de volumen de 0.17 de partículas magnéticas después de haber sido sometido, bajo la presencia de un campo magnético aplicado de 282 kA/m, a una prueba de barrido de amplitud con una amplitud máxima de deformación por cizalla, $\gamma_{0-max}=100\%$.

Tabla 3.1: Cambio máximo de espesor experimentado por los hidrogeles magnéticos bajo el campo magnético máximo aplicado en este estudio (282 kA/m).

Fracción de volumen de partículas FeCC	0.046	0.09	0.17	0.23	0.29	0.33
Incremento de espesor (magnetostricción)	<10 %	<10 %	50 %	50 %	50 %	70 %

Tabla 3.2: Resultados correspondientes a los experimentos de hinchamiento de los hidrogeles. W_i es la masa inicial del hidrogel, W_d es la masa del hidrogel tras la deshidratación, y W_r es la masa del hidrogel rehidratado.

Fracción de volumen de FeCC	W_i (mg)	W_d (mg)	$\frac{W_d}{W_i}$ (%)	W_r (mg)	$\frac{W_r}{W_i}$ (%)
0	440±70	7.6±0.5	1.7±0.3	84.9±0.3	19±3
0.046	399±19	160±10	40±3	269±17	67±5
0.09	700±70	330±30	47±6	440±40	63±8

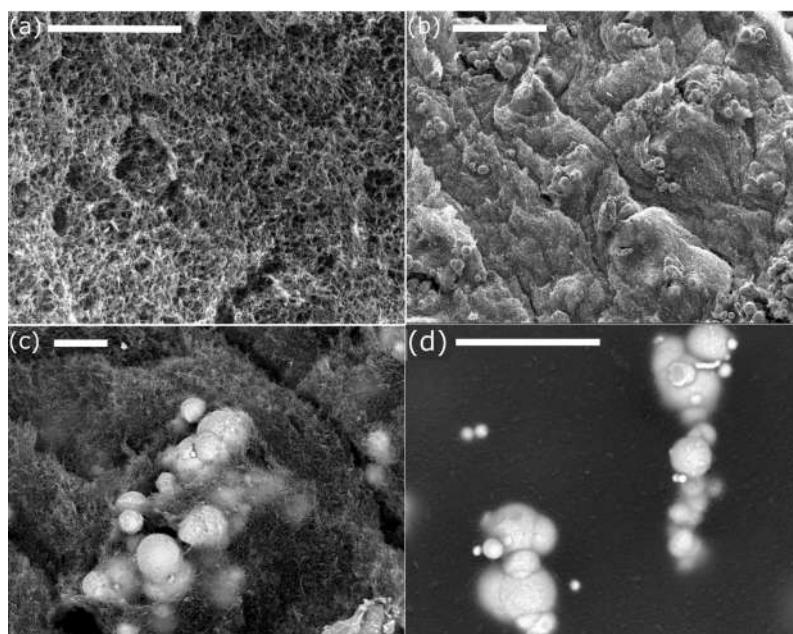


Figura 3.2: Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los hidrogeles. (a) Hidrogel no magnético; (b), (c) y (d) hidrogeles magnéticos que contienen una fracción de volumen de partículas Fe-CC de 0.01. El hidrogel (d) fue sometido a un campo magnético de aproximadamente 280 kA/m antes de tomar las imágenes. Longitud de la barra de escala: (a) 4 μm , (b) 30 μm , (c) 4 μm , (d) 10 μm .

También se analizó el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles (Tabla 3.2). Los hidrogeles totalmente hidratados presentan grandes diferencias de masa debido a la masa de las partículas incrustadas, siendo similar la cantidad de agua absorbida en todos los casos. La cantidad de agua absorbida está directamente relacionada con la porosidad de los hidrogeles, por lo que podemos concluir que esta no se ve afectada por la presencia de las partículas magnéticas. Es importante tener en cuenta que la porosidad de los hidrogeles juega un papel crucial en las aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, cuando se utilizan hidrogeles como matrices de soporte para la regeneración de tejidos, se requiere una gran porosidad y tamaño del poro adecuado para la correcta difusión de células, nutrientes y oxígeno, así como para la eliminación de desechos.

Todos los hidrogeles experimentaron una pérdida considerable de masa cuando se deshidrataron. La pérdida de masa fue aproximadamente del 98 % de la masa inicial en el caso de los hidrogeles no magnéticos y del 50 % para un hidrogel magnético que contiene una fracción de volumen de partículas magnéticas de 0.09. Estos resultados tienen sentido si se tiene en cuenta que, además de las partículas magnéticas, el agua era el principal compuesto de los hidrogeles en términos de masa. Después de la deshidratación, se intentó rehidratar los hidrogeles sumergiéndolos en agua. Sin embargo, tanto para los hidrogeles magnéticos como para los no magnéticos, hubo solo una rehidratación marginal, con la mayor parte del aumento de masa debido a la adsorción de agua (superficial) en los hidrogeles en lugar de su absorción. Debe tenerse también en cuenta que la rehidratación fue similar para los diferentes hidrogeles en términos de la masa recuperada. Esta reducida capacidad de rehidratación de los hidrogeles de alginato es una indicación de la posible formación de enlaces de hidrógeno estables entre las cadenas de polímeros durante el proceso de secado [97].

Con respecto a la microestructura, los hidrogeles de alginato no magnéticos presentan una microestructura densa y homogénea en forma de red (Figura 3.2a). Por otro lado, los hidrogeles magnéticos presentan una microestructura similar a una red interrumpida por la presencia de agregados de partículas magnéticas homogéneamente dispersos (Figuras 3.2b-c). Como se observa en las figuras 3.2c y d, las partículas se encuentran principalmente formando agregados encapsulados dentro de la red polimérica de alginato. Además, se confirmó que la aplicación de campos magnéticos suficientemente altos induce la formación de agregados secundarios permanentes en forma de cadena que permanecen estables incluso después de apagar el campo magnético (Figura 3.2d). En consecuencia, se puede concluir que los agregados de partículas pueden moverse en respuesta a un campo magnético aplicado. Finalmente, debido al tamaño mucho mayor de las partículas en comparación con el tamaño de los poros de la red polimérica, esta última puede considerarse como un medio continuo con respecto a las micropartículas de hierro (Figura. 3.2b).

3.3.2. Caracterización reológica en ausencia de campo magnético

En primer lugar, se analizó la dependencia de los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') en función de la amplitud de deformación en medidas oscilatorias de frecuencia fija de 1 Hz. Tanto para los hidrogeles magnéticos como para los no magnéticos, las curvas experimentales mostraron la tendencia típica de un material viscoelástico sólido, caracterizado por valores de G' mucho mayores que los valores de G'' a una amplitud de deformación baja (Figura 3.3a). Se puede observar que ambos módulos viscoelásticos presentan una región inicial plana, que se identifica con la ZVL. Después, a medida que aumenta la amplitud de la deformación, G' experimenta una fuerte disminución, acompañada por un aumento inicial de G'' hasta un máximo, seguido de una fuerte disminución para valores más altos de la amplitud de la deformación. Esta región donde los valores de G' y G'' ya no se mantienen constantes se conoce como región viscoelástica no lineal. Dentro de esta región, la estructura interna de los hidrogeles sufre deformaciones y roturas irreversibles, lo que provoca la disminución de elasticidad observada (evidenciada por la disminución de G'). Asimismo, se analizó la

dependencia de los módulos viscoelásticos (G' y G'') en función de la frecuencia de oscilación dentro de la ZVL. Algunas curvas representativas para hidrogeles magnéticos y no magnéticos se muestran en la figura 3.3b; obteniéndose resultados similares para otras concentraciones. Como se observa en esta figura, tanto G' como G'' aumentan ligeramente con la frecuencia de oscilación para el rango de frecuencias en estudio. Además, en todos los casos, G' fue considerablemente mayor que G'' . Estas tendencias son típicas de los sistemas de polímeros entrecruzados [98].

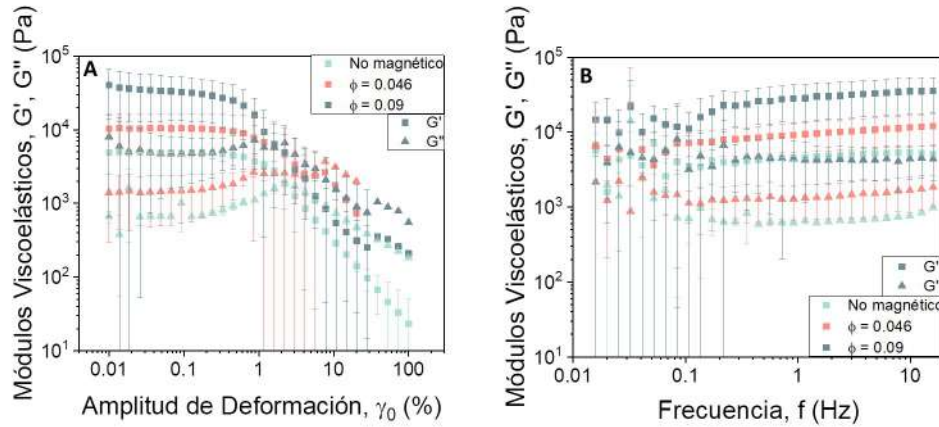


Figura 3.3: Módulos viscoelásticos (G' y G'') en función de (a) la amplitud de deformación de cizalla para medidas oscilatorias a una frecuencia fija de 1Hz; y (b) la frecuencia de oscilación para medidas a una amplitud de deformación fija del 0.03 % dentro de la ZVL.

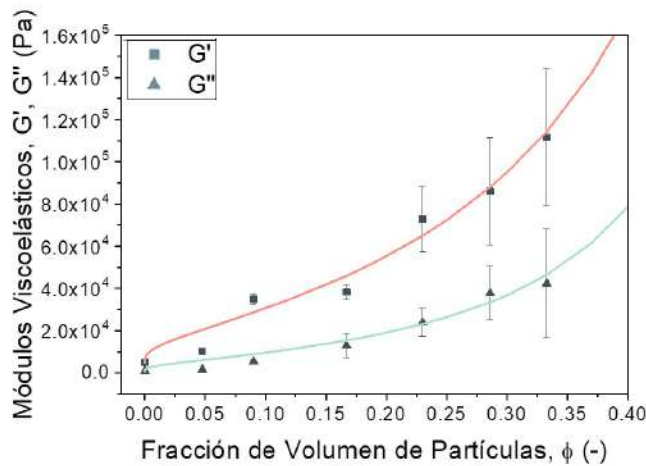


Figura 3.4: Valores medios de G' y G'' dentro de la ZVL en función de la fracción de volumen de partículas magnéticas del hidrogel. Las líneas continuas representan los mejores ajustes de G' y G'' a la ecuación 3.2.

Como se observa en las curvas de la figura 3.3, la inclusión de partículas magnéticas dentro de la composición de los hidrogeles conlleva un aumento de los módulos viscoelásticos. Para analizar mejor este efecto, se calcularon los valores medios de G' y G'' correspondientes a la ZVL en función de la concentración de partículas magnéticas (Figura 3.4). En este punto, es importante señalar que se pueden encontrar diferentes criterios a la hora de definir la extensión de la ZVL [99]. En este trabajo, se utilizó el criterio de [100], donde se define el límite de la ZVL como el punto donde G' se desvía un 10 % del valor de la zona plana inicial. Como se observa en la figura 3.4, hay un aumento de los módulos viscoelásticos con la concentración de partículas.

El efecto de las inclusiones sólidas sobre las propiedades mecánicas de los materiales compuestos es un tema muy estudiado desde el punto de vista teórico y experimental [101]. En el caso de inclusiones esféricas perfectamente rígidas, a baja concentración de la fase dispersa, la fórmula clásica de Einstein da una buena predicción. A medida que aumenta la concentración de la fase dispersa, la fórmula de Batchelor [102] primero (hasta una fracción de volumen de 0.09) y la ecuación de Krieger-Dougherty (KD) [103] para una concentración aún mayor, se convierten en expresiones adecuadas. Bajo la hipótesis de que el hidrogel es incompresible, lo que se espera puesto que el hidrogel está compuesto principalmente de agua (líquido incompresible) y de partículas magnéticas rígidas, la predicción de la ecuación KD dice lo siguiente [103]:

$$\begin{aligned} G' &= G'_0(1 - \phi/\phi_m)^{-[\eta]\phi_m} \\ G'' &= G''_0(1 - \phi/\phi_m)^{-[\eta]\phi_m} \end{aligned} \quad (3.1)$$

donde ϕ es la fracción de volumen de la fase dispersa (partículas individuales o sus agregados), ϕ_m es la fracción de volumen de empaquetamiento máxima, G'_0 y G''_0 son, respectivamente, los módulos de almacenamiento y pérdidas de la matriz de alginato, y $[\eta]$ es un parámetro que para inclusiones esféricas rígidas toma el valor $[\eta]=2.5$ [104].

La validez de esta ecuación para hidrogeles magnéticos ha sido demostrada previamente [32]. Sin embargo, para los hidrogeles magnéticos de este trabajo no se obtiene un buen ajuste con la ecuación KD, siendo la discrepancia mayor para concentraciones medias y altas de partículas. Se ha demostrado que las discrepancias con respecto a la ecuación KD en este trabajo son consecuencia de la existencia de agregados de partículas, que se podrían formar debido a interacciones coloidales y/o a su magnetización remanente. De hecho, la formación de agregados se corrobora en las imágenes SEM de los hidrogeles (Figura 3.2) y mediante observaciones por microscopía óptica de suspensiones diluidas de partículas de hierro en agua. La existencia de estos agregados daría lugar a una concentración efectiva de inclusiones rígidas dentro de los hidrogeles mayor que la real, ya que el volumen de un agregado es mayor que el volumen total de las partículas que lo constituyen. Esta hipótesis justificaría la subestimación de la ecuación KD con respecto a los resultados experimentales. Por tanto, para tener en cuenta este efecto se propuso la siguiente ecuación empírica (que tiene cierta similitud matemática con la ecuación KD) que se ajusta razonablemente bien a nuestros resultados experimentales:

$$\begin{aligned} G' &= G'_0(1 - \alpha' \cdot \phi^{n'})^{-\beta'} \\ G'' &= G''_0(1 - \alpha'' \cdot \phi^{n''})^{-\beta''} \end{aligned} \quad (3.2)$$

donde β' , β'' , α' , α'' , y n' , n'' son parámetros ajustables cuyos valores son $\beta' = \beta'' = 1.6$, $\alpha' = \alpha'' = 1.06 \pm 0.02$, $n' = 0.19 \pm 0.03$ y $n'' = 0.13 \pm 0.03$. Como se infiere de la figura 3.4, la ecuación proporciona un ajuste razonablemente bueno de la dependencia de los módulos viscoelásticos en el rango de fracciones de volumen de partículas 0.05 - 0.33. Sin embargo, esta ecuación no reproduce una dependencia lineal que sería la esperada a concentraciones más bajas, mientras que la extrapolación a concentraciones más altas no tiene sentido debido a la imposibilidad de preparar y manipular los hidrogeles por encima de una fracción de volumen de partículas de aproximadamente 0.35.

3.3.3. Caracterización reológica en presencia de campo magnético

En primer lugar, se analiza la dependencia de los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') de los hidrogeles magnéticos en función de la amplitud de deformación en medidas oscilatorias a frecuencia fija de 1Hz, bajo aplicación de campos magnéticos de diferente intensidad. De manera similar al caso en ausencia de campo, las curvas experimentales mostraron una tendencia típica de un material viscoelástico sólido, caracterizado por una región inicial plana, que se identifica como ZVL, y una fuerte disminución de ambos módulos para amplitudes de deformación altas (Figura 3.5a). Del análisis de la figura 3.5, podemos concluir que la aplicación de un campo magnético externo resulta en una mejora de los módulos viscoelásticos, que aumentan con la intensidad del campo magnético aplicado. Este fenómeno se conoce como efecto magnetorreológico (MR) [105]. Este aumento de los módulos viscoelásticos con la intensidad del campo magnético aplicado también se confirmó mediante medidas en función de la frecuencia (Figura 3.5b). Estos resultados de los barridos de frecuencia mostraron tendencias similares de G' y G'' a las obtenidas en ausencia de un campo magnético aplicado (Figura 3.3).

Para analizar el efecto magnetorreológico (MR) en función de la concentración de partículas, en la figura 3.6a se muestran los valores promedio de G' correspondientes a la ZVL en función de la concentración de partículas magnéticas tanto en ausencia de campo magnético como en presencia del campo magnético más intenso del estudio, $H = 282$ kA/m. Como se observa, cuanto mayor es la concentración de partículas magnéticas, mayor es el aumento de G' bajo la aplicación de un campo magnético. Esta mejora está relacionada con el carácter magnético de las partículas de Fe-CC, que se magnetizan y atraen entre sí bajo la aplicación de un campo magnético - debe tenerse en cuenta que estas partículas son multidominio desde el punto de vista magnético - dando lugar a estructuras en forma de columna de partículas alineadas en la dirección del campo. Así, estas estructuras de partículas se oponen a la deformación inducida por las fuerzas de cizalla, lo que da lugar al aumento de los módulos viscoelásticos [105].

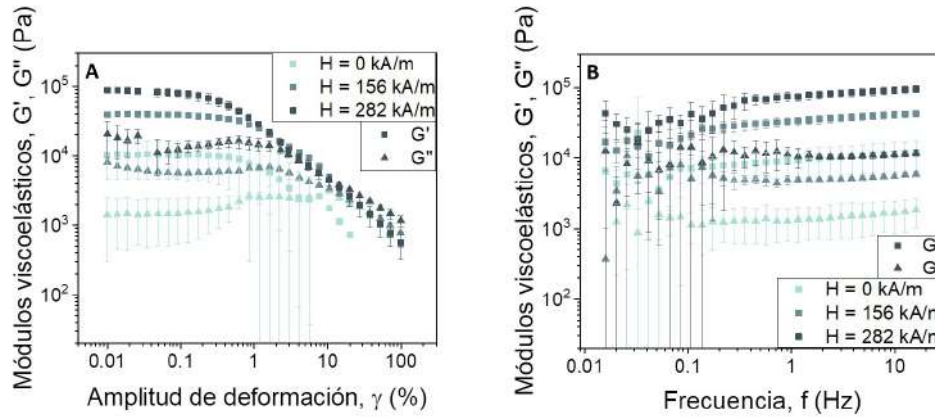


Figura 3.5: Módulos viscoelásticos (G' y G'') en función de (a) la amplitud de deformación de cizalla para medidas oscilatorias a una frecuencia fija de 1Hz; y (b) la frecuencia de oscilación para medidas a una amplitud de deformación fija del 0.03 % dentro de la ZVL, para hidrogeles magnéticos con una fracción de volumen de partículas de 0.046 y campos magnéticos aplicados de distinta intensidad.

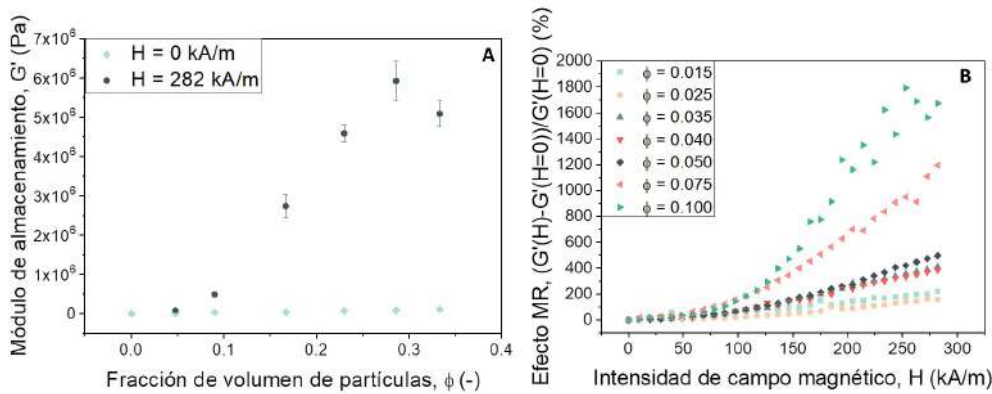


Figura 3.6: (a) Módulo de almacenamiento (G') en función de la fracción de volumen de partículas de Fe-CC en los hidrogeles magnéticos. Los valores representan el promedio de G' correspondiente a la ZVL, según lo determinado en los barridos de amplitud de deformación. (b) Efecto magnetorreológico (MR), cuantificado como el aumento relativo del módulo de almacenamiento bajo un campo magnético, $G'(H)$, con respecto al módulo de almacenamiento en ausencia de campo, $G'(H=0)$, para ferrogeles de alginato con distinta fracción de volumen de partículas Fe-CC.

Cuando las partículas se dispersan en un medio elástico, como un gel de polímero o elastómero, su migración y agregación inducida por el campo magnético se ve parcialmente obstaculizada por las fuerzas elásticas de la red polimérica [106]. Como consecuencia, el efecto MR desarrollado por los geles magnéticos y elastómeros suele ser mucho más débil que el desarrollado por los fluidos MR. Sin embargo, como se

observa en la figura 3.6, nuestros ferrogeles de alginato muestran un fuerte efecto MR, especialmente para las mayores fracciones de volumen en estudio, a pesar de la red de alginato relativamente robusta (aquí, el módulo de almacenamiento para hidrogeles no magnéticos es $G' = 4800 \pm 200 \text{ Pa}$). Este efecto MR tan fuerte en nuestros hidrogeles es una consecuencia de la existencia de agregados de partículas. De hecho, la fuerza de atracción magnética entre partículas (agregados) es aproximadamente proporcional al cubo del diámetro de la partícula (agregado), mientras que la fuerza de la resistencia elástica al desplazamiento de la partícula depende linealmente del diámetro. Por lo tanto, el balance entre las fuerzas magnéticas y las fuerzas elásticas es más favorable a la migración en el caso de agregados relativamente grandes en comparación con las partículas individuales. Además, la migración sería más fácil cuanto mayor sea el campo magnético aplicado, lo que justifica el aumento más rápido que lineal del módulo de almacenamiento con el campo magnético observado en la figura 3.6b a una intensidad de campo magnético baja y media. A las intensidades de campo más altas, el aumento de G' es aproximadamente lineal, muy probablemente como consecuencia de la tendencia a la saturación de la migración y de la magnetización de las partículas.

3.4. Conclusiones

En este trabajo se ha llevado a cabo un análisis exhaustivo de la estructura y las propiedades mecánicas de hidrogeles magnéticos de alginato, consistentes en partículas de hierro micrométricas dispersas en una red polimérica de alginato. Se ha diseñado un protocolo de dos pasos que permite obtener hidrogeles magnéticos de alginato macroscópicamente homogéneos, con una fracción de volumen de partículas de hasta 0.33. Sin embargo, a partir del análisis microscópico se ha encontrado que las micropartículas de hierro se agregan en clústeres irregulares. No obstante, estos agregados se encuentran dispersos homogéneamente dentro de la red de alginato.

A partir del análisis reológico bajo esfuerzos de cizalla en ausencia de campo magnético, se ha encontrado que los hidrogeles, tanto no magnéticos como magnéticos, presentan un comportamiento típico de un sistema polimérico entrecruzado, caracterizado por valores del módulo de almacenamiento superiores a los del módulo de pérdidas dentro de la ZVL. Además, los resultados experimentales han demostrado un gran aumento de los módulos viscoelásticos con la concentración de partículas magnéticas. A primera vista, este aumento parece más fuerte de lo esperado de acuerdo con las predicciones para esferas dispersas en un medio continuo, como la ley KD. Sin embargo, en base a la evidencia experimental, parece posible que el aumento más rápido de los módulos viscoelásticos con la concentración de partículas se debe a la formación de agregados, cuyo volumen es mayor que el volumen total de las partículas individuales. Se ha encontrado que una ecuación empírica que tiene cierta similitud matemática con la ecuación KD se ajusta bien a la dependencia experimental de los módulos viscoelásticos con la concentración de partículas dentro de la red de alginato.

Por otro lado, el análisis del comportamiento reológico de los hidrogeles magnéticos bajo campos magnéticos aplicados ha mostrado un intenso aumento de los módulos viscoelásticos con la intensidad del campo magnético, especialmente para altas fracciones

de volumen de partículas magnéticas (superiores a 0.15). Se ha llevado a cabo una investigación exhaustiva sobre las propiedades MR de los ferrogel de alginato, los cuales muestran un fuerte efecto MR a pesar del impedimento del movimiento de las partículas por las fuerzas elásticas de la red polimérica. Como ejemplo, para un ferrogel que contiene un 10 % en volumen de partículas magnéticas, el aumento de G' bajo un campo magnético de 250 kA/m con respecto al módulo en ausencia de campo alcanza aproximadamente el 1600 %. Los agregados de partículas formados en la etapa de preparación de los ferrogel podría justificar este efecto. De hecho, dentro de un medio elástico como el hidrogel, los agregados de partículas son más propensos al encadenamiento inducido por el campo magnético que las partículas aisladas individualmente. Además, dado que la fracción de volumen de los agregados es mayor que la fracción de volumen de las partículas, esto da como resultado que los agregados estén en promedio más cerca entre sí que las partículas aisladas, algo que también favorece la atracción magnética entre partículas y por lo tanto el encadenamiento.

En conclusión, en este trabajo se presenta una forma conveniente para la preparación de ferrogel homogéneos con un fuerte efecto MR, debido a la formación de agregados de partículas durante la etapa de preparación.

Capítulo 4.

Síntesis y caracterización de hidrogeles de alginato anisótropos

4.1. Introducción

A pesar del creciente interés que se ha producido en las últimas décadas en el desarrollo de materiales poliméricos, los hidrogeles sintéticos actualmente disponibles presentan todavía importantes deficiencias que limitan el pleno desarrollo de sus posibles aplicaciones en áreas tecnológicas [107–111] y biomédicas [112–117]. Entre ellas, destacan la falta de propiedades mecánicas adecuadas y una correcta disposición microestructural [118]. Dado que los hidrogeles se definen como redes poliméricas tridimensionales hidrofílicas hinchadas por un medio acuoso continuo [1], el grado de hinchamiento será decisivo no sólo en términos de su estructura interna sino también de sus propiedades mecánicas. Es bien sabido que, en equilibrio, los hidrogeles pueden alcanzar un contenido de agua de hasta el 99 % en volumen. Sin embargo, un proceso de deshidratación posterior conducirá a una disminución en el grado de hinchamiento del hidrogel y, por lo tanto, a un correspondiente aumento en la concentración de polímero. Este hecho, junto con las interacciones polímero-polímero resultantes, puede tener un impacto dramático en las propiedades mecánicas de estos materiales. Así como la resistencia mecánica y el grado de porosidad de los hidrogeles destinados a estas aplicaciones son factores muy importantes, no menos relevante es su anisotropía, que es un aspecto que generalmente se ignora en la mayoría de los estudios. De hecho, la mayoría de los hidrogeles se sintetizan mediante un entrecruzamiento homogéneo que da como resultado redes isotropas, en contraste con la mayoría de los sistemas biológicos, como el

Partes del contenido de este capítulo han sido publicadas en:
C. Gila-Vilchez, M. C. Mañas-Torres, R. Contreras-Montoya, M. Alaminos, J. D. G. Duran, L. Álvarez de Cienfuegos, M. T. Lopez-Lopez. Anisotropic magnetic hydrogels: design, structure and mechanical properties, *Phil. Trans. R. Soc. A*, **377**, 20180217, 2019.
A. Leon-Cecilla, C. Gila-Vilchez, L. Álvarez de Cienfuegos, M. T. Lopez-Lopez. Fabrication of anisotropic alginate hydrogels through a simple stress-controlled dehydration process: relationship between microstructure and mechanical properties, *En preparación*.

tejido muscular [119,120], el tejido cutáneo [121,122] o el tejido cartilaginoso [123,124], que presentan estructuras anisótropas jerárquicas bien definidas. En estos tejidos, la anisotropía juega un papel fundamental, posibilitando procesos particulares como la transferencia de masa, la lubricación superficial y la generación de fuerza. Por ejemplo, la contracción muscular es el resultado de la disposición anisótropa de actina-miosina dentro del sarcómero [119,120]. Además, es bien sabido que otros procesos, como la proliferación, migración y diferenciación celular, también están influenciados por la anisotropía de la matriz extracelular del tejido huésped [125–128].

Desafortunadamente, la preparación de hidrogeles anisótropos mediante procesos biocompatibles es una tarea difícil que requiere la aplicación de estímulos direccionales a los hidrogeles, ya sea durante las etapas de formación o después de la finalización del proceso de reticulación [129]. Algunos ejemplos incluyen la aplicación de esfuerzos mecánicos [97,130], fuerzas magnéticas o eléctricas [129,131,132], así como gradientes iónicos o de temperatura [129]. La aplicación de esfuerzos mecánicos es el método más común para inducir anisotropía y se puede realizar fácilmente sometiendo el hidrogel a compresión o tracción en una dirección determinada. Como cualquier material viscoelástico, los hidrogeles se deforman en respuesta a un esfuerzo mecánico, dando como resultado la aparición de anisotropía. Bajo ciertas condiciones, la deformación se mantiene después del cese de la fuerza, lo que resulta en una anisotropía permanente. Por ejemplo, en el trabajo de Scionti *et al.* [130], se demostró que cuando los hidrogeles basados en fibrina se sometían a compresión plástica entre membranas de filtro de nailon, estos se deshidrataban parcialmente, lo que resultaba en la alineación permanente de las fibras de polímero en capas paralelas. Del mismo modo, Mredha *et al.* [97] demostraron recientemente que en hidrogeles poliméricos sometidos a una alta tensión de tracción y procesos de deshidratación, se inducían estructuras fibrosas jerárquicas perfectamente alineadas. Estas estructuras anisótropas se mantuvieron después del cese de la tensión debido a la aparición de enlaces de hidrógeno laterales entre las fibras de polímero durante el secado. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de trabajos de investigación que estudian los efectos de la deshidratación sobre la microestructura resultante de los hidrogeles, sus consecuencias sobre las propiedades mecánicas de estos materiales suelen ser infravaloradas. Así, se hace evidente la falta de estudios reológicos completos a la hora de centrarse en el papel de la deshidratación en las propiedades mecánicas de los hidrogeles y la conexión con los cambios a nivel microscópico.

A diferencia del caso de la fuerza mecánica, los estímulos direccionales por aplicación de campos eléctricos o magnéticos no requieren contacto físico con los hidrogeles, lo que representa una clara ventaja. En el caso magnético, los estímulos direccionales suelen estar mediados por partículas magnéticas embebidas, capaces de orientarse de forma anisótropa por los campos aplicados. Un inconveniente de los campos eléctricos es que pueden provocar una descomposición electroquímica no deseada de los polímeros. Por el contrario, los campos magnéticos se pueden utilizar de forma segura en presencia de polímeros e incluso de células vivas [35]. Para lograr la manipulación de los geles por fuerzas magnéticas, las partículas magnéticas deben ser de un material magnetizable y su concentración debe ser lo suficientemente alta.

En este capítulo, en primer lugar, se presentan hidrogeles de alginato deshidratados por dos métodos diferentes (deshidratación bajo esfuerzos de tracción y deshidratación

bajo esfuerzos de compresión). Se analiza la influencia del proceso de deshidratación sobre las propiedades resultantes de estos hidrogeles, en términos de pérdida de agua, estructura microscópica y propiedades mecánicas. Así, se demuestra que el método de deshidratación tiene una influencia importante en las propiedades resultantes, ya que estas dependen no sólo del grado de hinchamiento y la concentración de polímero, sino también de las interacciones fibra-fibra y el reordenamiento microscópico. En segundo lugar, se presentan hidrogeles magnéticos de alginato, entrecruzados por enlaces electrostáticos, en los que la anisotropía es inducida por la aplicación de un campo magnético durante el proceso de entrecruzamiento del sistema, como consecuencia de la tendencia de las partículas magnéticas a alinearse en la dirección del campo magnético aplicado. En este caso, la anisotropía se obtiene sin deshidratar la muestra, lo que representa una ventaja con respecto a los métodos basados en la aplicación de esfuerzos mecánicos.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Preparación de hidrogeles de alginato

En este trabajo se utilizó alginato de sodio de bajo peso molecular (120.000 - 160.000 g/mol, Sigma Aldrich, USA). Los protocolos de preparación de los hidrogeles de alginato se han descrito en el Capítulo 3, y se han utilizado aquí con ligeras variaciones.

Preparación de hidrogeles anisótropos de alginato mediante esfuerzos controlados

Para el estudio de la generación de anisotropía mediante deshidratación, se preparó una disolución de alginato de sodio al 4 % p/p en agua destilada y se añadieron 36 mg de CaCO_3 (Sigma Aldrich, USA) y 128.2 mg de GDL (Sigma Aldrich, USA), homogeneizando con vortex. Después, se puso la mezcla en un molde cuadrado (80.85 mm x 80.85 mm) y se dejó reposar durante 2 horas. Finalmente, se añadieron 12 mL de una disolución 0.5 M de CaCl_2 (Sigma Aldrich, USA).

En este trabajo se deshidrataron los hidrogeles por separado bajo esfuerzos de tracción y compresión para generar diferentes reordenamientos en la estructura polimérica, generando una anisotropía en la red, y modificando así sus propiedades mecánicas. Como se verá más adelante, esta anisotropía se mantiene después de eliminar los esfuerzos debido a la creación de nuevos enlaces de hidrógeno estables entre los polímeros [97]. Los dos protocolos de deshidratación controlada por esfuerzo seguidos en este trabajo se basan en los métodos descritos en [97, 130].

Para deshidratar los hidrogeles de alginato bajo tracción, se utilizó un dispositivo de fabricación propia que permite fijar los dos extremos de la muestra y estirarla. En primer lugar, los hidrogeles se cortaron en forma rectangular (25 mm x 50 mm). Luego, dos de estos geles se fijaron simultáneamente y se estiraron ligeramente en el dispositivo. Posteriormente, el sistema se colocó en un desecador a temperatura ambiente y se

realizó un vacío parcial. Se deshidrataron las muestras durante 8, 14 y 24 horas para obtener diferentes pérdidas de agua. Durante el proceso, la humedad relativa dentro del desecador fue regulada mediante una disolución de hidróxido de sodio (NaOH, Sigma Aldrich, EE. UU.) al 25,02 % en peso en agua destilada, que mantuvo una humedad relativa del 60 % a 25°C [133]. Debe tenerse en cuenta que, debido a los largos tiempos de deshidratación, el control de la temperatura y la humedad relativa es crucial para obtener diferentes grados reproducibles de pérdida de agua. Durante el proceso descrito, los hidrogeles se contrajeron a causa de la evaporación del agua, generando un esfuerzo de tracción ascendente en la dirección longitudinal de la muestra, ya que los dos extremos del hidrogel permanecieron fijos. Por lo tanto, el esfuerzo de tracción creciente durante la deshidratación fue la razón detrás de la alineación de las fibras de alginato, y no la pequeña tensión inicial aplicada a los hidrogeles con nuestro dispositivo.

Para deshidratar los hidrogeles bajo esfuerzos de compresión, se colocaron muestras cuadradas (28 mm x 28 mm) de hidrogeles entre dos placas de vidrio rodeadas por 5 hojas de papel secante. Sobre la placa superior se colocó un peso aproximado de 6.5 kg. Luego, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10, 20 y 30 minutos, obteniendo así diferentes grados de deshidratación reproducibles.

Como muestras de control, se utilizaron hidrogeles de alginato no sometidos a deshidratación (isótropos).

Preparación de hidrogeles magnéticos de alginato

Para el estudio de la anisotropía generada mediante campo magnético, se prepararon hidrogeles magnéticos de alginato utilizando dos tamaños distintos de la fase magnética, partículas magnéticas de tamaño nano- y micrométrico. En el primer caso, utilizamos partículas de hierro recubiertas de PEG (NP1) como fase magnética, mientras que en el segundo se utilizaron partículas de hierro recubiertas de sílice (MP0) (Fe-CC, BASF, Alemania). Ambas se describieron anteriormente en el Capítulo 2. En el caso de los hidrogeles con las partículas micrométricas (MP0), se siguió el protocolo descrito en el Capítulo 3, y una vez añadidas las partículas, se esperó 15 minutos antes de poner la mezcla entre dos imanes de neodimio (NdFeB, Webcraft GmbH, Germany) de tamaño 30x30x15 mm³ para crear la anisotropía. La adición de la disolución 45mM de CaCl₂ se hizo 10 minutos después de poner la mezcla entre los imanes. Dependiendo de la posición de los imanes con respecto a la muestra, se obtuvieron las anisotropías llamadas "perpendicular" y "paralela" (ver figura 4.1), debido a la formación de cadenas de partículas en las direcciones del campo magnético. En cuanto a los hidrogeles de alginato con partículas magnéticas NP1, se preparó una disolución de alginato de sodio en agua miliQ a una concentración del 4 % p/p, se tomaron 2.6 mL de esta disolución y se agregaron 7.8 mg de carbonato de calcio y las partículas NP1 necesarias dependiendo de la concentración deseada. Esta mezcla se agitó mediante vórtex y se sonicó durante 20 minutos hasta que fue totalmente homogénea. Luego, se inició el proceso de gelificación mediante la adición de 27.8 mg de GDL. La mezcla final se colocó en una placa Petri y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de colocarla entre los imanes para crear la anisotropía. Finalmente, se añadió el mismo volumen (2.6 mL)

de una disolución 0.5 M de CaCl_2 después de 10 minutos con el fin de fortalecer la red polimérica.

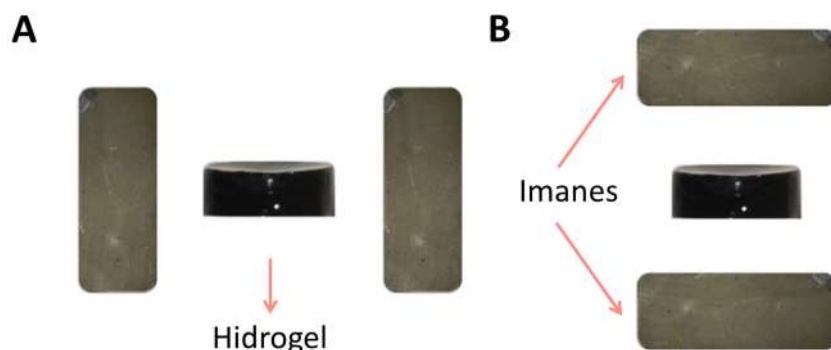


Figura 4.1: Esquema de la posición de los imanes con respecto a la muestra para obtener hidrogeles con anisotropía (a) "perpendicular" y (b) "paralela".

4.2.2. Estudios de hinchamiento y microestructura de los hidrogeles de alginato

Con el objetivo de evaluar el grado de hinchamiento y caracterizar la estructura porosa de los hidrogeles de alginato después de la aplicación de los procesos de deshidratación, se analizó su contenido de agua. Para las muestras deshidratadas en los procesos de deshidratación por esfuerzos de tracción y compresión, se midió la masa inicial y final con el fin de conocer la concentración de alginato tras la deshidratación parcial de los hidrogeles. Como control y para el estudio de la rehidratación, se cortaron tres muestras en forma de disco de 20 mm de diámetro con una concentración de alginato del 4 % en peso y se midió su masa con una microbalanza. Luego, se dejaron secar en contacto con papel secante en placas Petri durante 24h a temperatura ambiente y se volvieron a pesar. Finalmente, las muestras se rehidrataron en agua destilada durante otras 24h y se midió la masa después de la rehidratación. Este estudio se realizó con el objetivo de asegurar la formación de nuevos enlaces de hidrógeno estables entre las fibras de alginato, lo que se reflejará en una rehidratación parcial tras la deshidratación de las muestras.

La estructura microscópica de los hidrogeles de alginato bajo procesos de deshidratación se caracterizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un microscopio HITACHI S-510, mientras que para los hidrogeles de alginato magnéticos se utilizó microscopía óptica y microtomografía de rayos X (Xradia 510 VERSA ZEISS).

4.2.3. Caracterización mecánica de los hidrogeles de alginato

Para analizar el efecto de la deshidratación y la reestructuración microscópica asociada a cada uno de los procesos de deshidratación bajo esfuerzos, así como de la anisotropía formada por la aplicación de campo magnético sobre las propiedades mecánicas de los hidrogeles de alginato, estudiamos estos materiales bajo esfuerzos oscilatorios de cizalla. Esta caracterización se realizó utilizando un magneto-reómetro rotacional (Physica MCR 300, Anton Paar) con una geometría plato-plato de 20 mm de diámetro, a una temperatura constante de $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Para este propósito, los hidrogeles se colocaron en el plato inferior del sistema de medición y el plato superior descendió hasta el contacto con la superficie superior de la muestra. Con el fin de asegurar el contacto entre el hidrogel y la geometría durante toda la medición se fijó una fuerza normal constante de 0.1 N. Siguiendo el mismo protocolo establecido en el Capítulo 3, se determinó la zona viscoelástica lineal (ZVL) y se llevaron a cabo medidas de barridos de amplitud y de frecuencia para cada condición estudiada, obteniendo así los valores de los módulos elástico (G') y viscoso (G'').

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Estudios de hinchamiento de los hidrogeles no magnéticos de alginato

Con el fin de caracterizar la anisotropía microestructural creada mediante procesos de deshidratación en hidrogeles de alginato no magnéticos, se realizó en primer lugar un estudio de hinchamiento pesando la masa inicial y final de los hidrogeles tras la aplicación de cada uno de los dos protocolos de deshidratación en estudio. En estos procesos es crucial controlar el esfuerzo aplicado y las condiciones externas para reproducir aproximadamente la pérdida de agua en cada tipo de muestra. La Tabla 4.1 muestra la concentración final media de alginato en los hidrogeles después de ser deshidratados en tres tiempos diferentes para cada método seguido. Como se puede ver, se logra obtener grados de deshidratación similares (es decir, concentración final de alginato similar) controlando el tiempo de deshidratación para cada proceso. Mientras que la concentración inicial de alginato fue del 4% en peso en todos los casos, una vez deshidratados obtuvimos un rango de concentraciones de alginato entre el $4.67 \pm 0.07\%$ y $5.48 \pm 0.21\%$ en peso. Sin embargo, es de destacar que aunque las concentraciones finales de alginato no fueron muy diferentes, resultaron (como veremos más adelante) en diferencias notables desde el punto de vista de sus propiedades, dependiendo del método utilizado para llegar a este resultado final y del estado de deshidratación.

Además, se estudió la rehidratación de los hidrogeles siguiendo los pasos descritos en el apartado de metodología. En primer lugar, se observó que tras 24 horas de deshidratación natural, los hidrogeles perdían un alto porcentaje de agua que provocaba un encogimiento del material, alcanzando una concentración de alginato de $7.69 \pm 0.32\%$. Cuando estos hidrogeles altamente deshidratados se rehidrataron en agua durante 24

horas, los materiales recuperaron una parte del agua perdida, siendo la concentración de alginato en este caso de $5.23 \pm 0.17\%$ en peso, pero en ningún caso se recuperó el estado inicial. Por tanto, aunque hubo una rehidratación parcial de los hidrogeles, el hecho de que no se recuperara el estado inicial apunta a la formación de nuevos enlaces de hidrógeno estables entre las cadenas poliméricas [97], y la consiguiente creación de una nueva estructura interna estable.

Tabla 4.1: Concentración final de polímero en los hidrogeles anisótropos de alginato parcialmente deshidratados bajo esfuerzos de tracción y compresión, donde c es la concentración de alginato dentro del hidrogel tras el esfuerzo y tiempo indicados.

Esfuerzo aplicado	Tiempo	Concentración, c (%peso)
Compresión	10 min	4.72 ± 0.21
	20 min	5.00 ± 0.16
	30 min	5.32 ± 0.34
Tracción	8h	4.67 ± 0.07
	14h	4.86 ± 0.12
	24h	5.48 ± 0.21

Para contrastar la hipótesis de la formación de nuevos enlaces estables entre las cadenas de polímeros en los procesos de deshidratación controlada, se analizaron los cambios en la microestructura interna de los hidrogeles. En las imágenes SEM observamos una estructura porosa homogénea de los hidrogeles de alginato tras su preparación (Figura 4.2a), en la que las cadenas de polímero forman una red isotrópica sin ninguna organización preferencial de fibras. Por el contrario, se logran dos tipos diferentes de estructuras anisótropas de alginato siguiendo los protocolos de deshidratación descritos anteriormente. Los hidrogeles que se deshidrataron bajo compresión (Figura 4.2b) mostraron en su contorno estructuras planas formadas por el apilamiento de las fibras de alginato. Sin embargo, los hidrogeles deshidratados bajo esfuerzos de tracción (Figura 4.2c), para los que se esperaba observar una alineación paralela dominante de las fibras de alginato en la dirección de la tensión aplicada, sólo mostraron una estructura isotrópica similar a los hidrogeles no deshidratados.

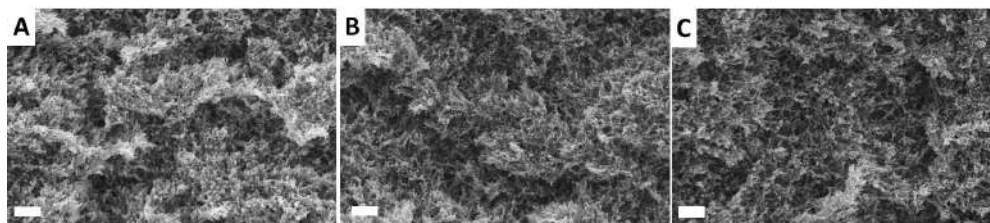


Figura 4.2: Imágenes de SEM de los hidrogeles de alginato (a) recién preparados, (b) tras la deshidratación controlada bajo esfuerzos de compresión durante 30 min y (c) tras la deshidratación controlada bajo esfuerzos de tracción durante 24h. Las barras de escala corresponden al tamaño de $1\mu\text{m}$.

4.3.2. Caracterización mecánica de los hidrogeles de alginato bajo procesos de deshidratación controlados

Se caracterizaron los hidrogeles bajo esfuerzo oscilatorio de cizalla. Desde el punto de vista reológico, estos materiales tienen un comportamiento viscoelástico sólido caracterizado por valores más altos del módulo elástico (G') que del módulo viscoso (G''), a valores bajos de deformación de cizalla (ZVL), seguido por la caída brusca de ambos módulos debido a la rotura del material (Figuras 4.3a-c).

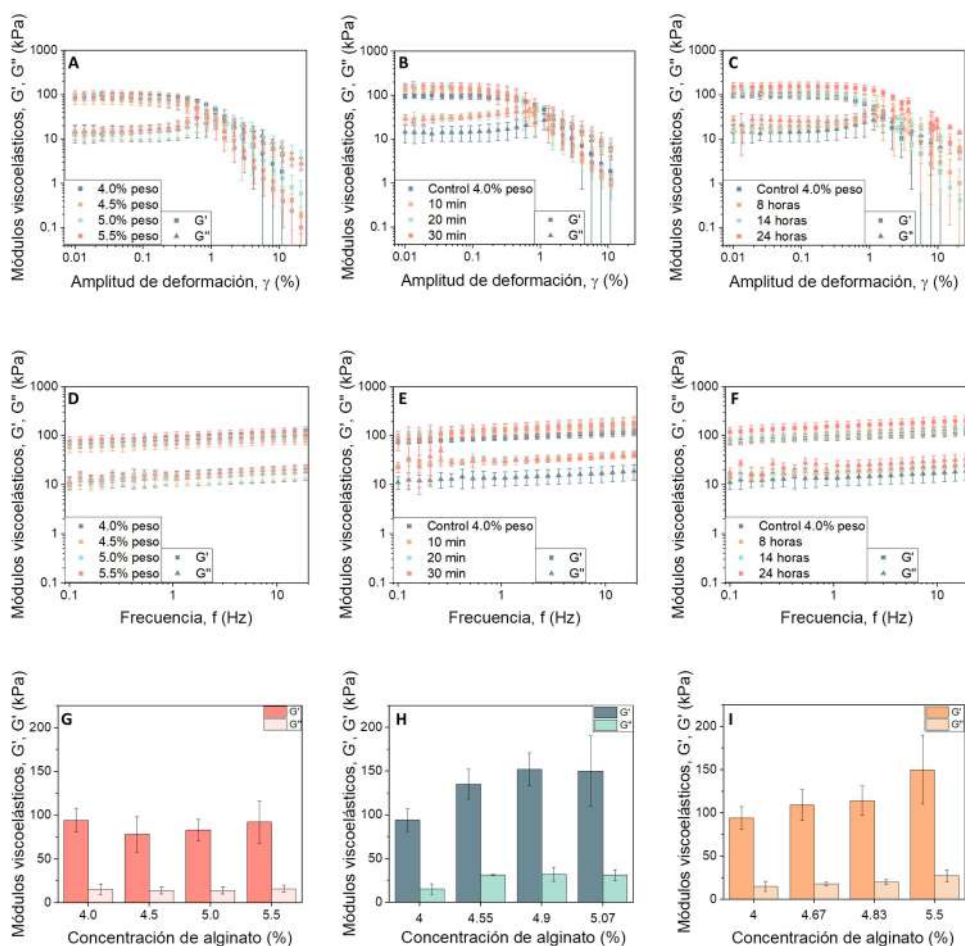


Figura 4.3: Módulos viscoelásticos (G' y G'') en función de la amplitud de deformación para hidrogeles (a) isotrópicos control, (b) anisótropos bajo compresión y (c) anisótropos bajo tracción. Módulos viscoelásticos en función de la frecuencia de oscilación para hidrogeles (d) isotrópicos control, (e) anisótropos bajo compresión y (f) anisótropos bajo tracción. Módulos viscoelásticos medios dentro de la ZVL para hidrogeles (g) isotrópicos control, (h) anisótropos bajo compresión e (i) anisótropos bajo tracción.

Con respecto al valor medio de los módulos viscoelásticos dentro de la ZVL, para los hidrogeles comprimidos ambos módulos muestran un aumento con respecto a los valores para los hidrogeles de control (Figuras 4.3g,h). Sin embargo, para los hidrogeles deshidratados bajo esfuerzos de tracción, aunque se observa un aumento, este no es estadísticamente significativo con respecto a las muestras de control (Figuras 4.3g,i). Nótese que este aumento es mayor para los hidrogeles deshidratados bajo esfuerzos de compresión, de acuerdo con un cambio más fuerte en su microestructura, como se evidenció en la figura 4.2.

Mediante medidas de barridos de frecuencia (Figuras 4.3d-f), se obtuvo la dependencia de los módulos viscoelásticos con la frecuencia. Todas estas curvas muestran una ligera dependencia con la frecuencia, aunque el cociente G''/G' se mantuvo por encima de 0.1 en todo el rango de frecuencias en estudio. Este comportamiento es típico de los geles físicos, como los hidrogeles de alginato del presente trabajo. Las cadenas de alginato interactúan a través de enlaces iónicos mediados por los cationes divalentes Ca^{2+} y enlaces de hidrógeno, lo que resulta en hidrogeles físicos. Teniendo en cuenta los resultados para los hidrogeles de alginato deshidratados, no hay diferencias estadísticamente significativas en sus espectros mecánicos, tal y como se esperaba. Por tanto, la reordenación de las fibras no cambia la naturaleza de las interacciones entre las cadenas poliméricas, que son las principales responsables de los espectros mecánicos del material.

Como era de esperar, el tipo de esfuerzo aplicado en el proceso de deshidratación y la concentración final de polímero alcanzada tienen un impacto crucial en la respuesta mecánica de estos materiales. Parece que la reorganización de la estructura interna de los hidrogeles es fundamental. Además, cuando se aplica un esfuerzo de compresión se refuerza notablemente este efecto, lo que confirma la existencia de una reorganización de la red polimérica y la formación de nuevos enlaces estables entre las fibras. En este caso, se logra obtener un material anisótropo cuando se aplica un esfuerzo de compresión, mientras que los hidrogeles deshidratados bajo un esfuerzo de tracción no muestran una anisotropía tan clara, como ya se comentó en la sección anterior. Por lo tanto, la selección de cualquiera de los procesos de deshidratación debe depender principalmente de la aplicación final del material, solo si el tipo de anisotropía es importante, como en el caso de una matriz extracelular sintetizada que imite los tejidos naturales.

4.3.3. Caracterización de los hidrogeles magnéticos anisótropos de alginato

En primer lugar, como se observa en la figura 4.4a para los hidrogeles con NP1, los hidrogeles anisótropos "perpendiculares" presentan los valores más bajos de G' , incluso inferiores a los de los hidrogeles no magnéticos; mientras que los hidrogeles anisótropos "paralelos" mostraron valores intermedios, superiores a los de los hidrogeles no magnéticos pero inferiores a los de los hidrogeles magnéticos isotrópicos. Aunque los valores son muy cercanos y las incertidumbres son pronunciadas, al aplicar pruebas t de Student de dos colas se verifica que, con un nivel de confianza de 0.05, la diferencia entre los valores medios es significativamente diferente en todos los casos. Como se observa

en las figuras 4.4 b y c, la disposición de las partículas NP1, alineadas en la dirección del campo magnético aplicado, proporciona la anisotropía buscada que explica las diferencias encontradas en las propiedades mecánicas. Sin embargo, la interacción entre las partículas magnéticas o entre las partículas magnéticas y las fibras de alginato probablemente no sea lo suficientemente fuerte como para asegurar un efecto sorprendente de la anisotropía inducida por este método.

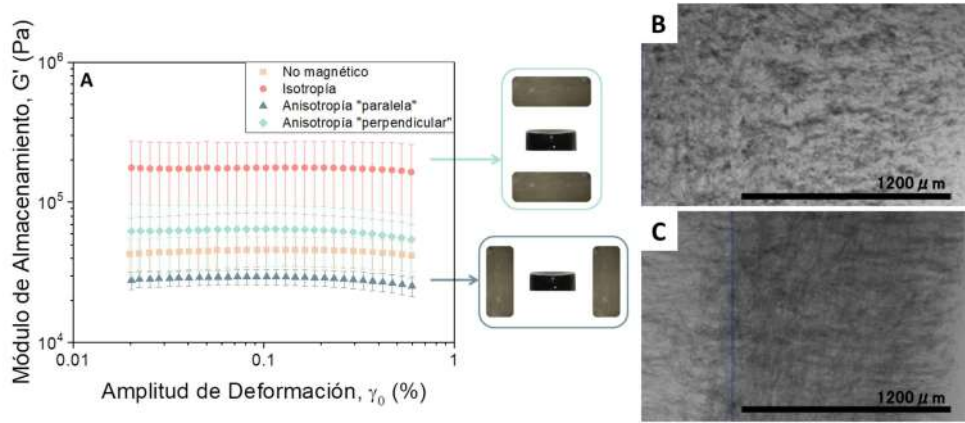


Figura 4.4: (a) Módulo de almacenamiento (G') en función de la amplitud de deformación de cizalla de los hidrogeles magnéticos con una fracción de volumen del 0.003 de partículas magnéticas NP1 y frecuencia fija de 1 Hz. (b) y (c) Imágenes de microtomografía de rayos X de un hidrogel magnético con una fracción de volumen del 0.003 de partículas magnéticas NP1. (b) Línea de observación paralela a la dirección de la anisotropía. (c) Línea de observación perpendicular a la dirección de la anisotropía.

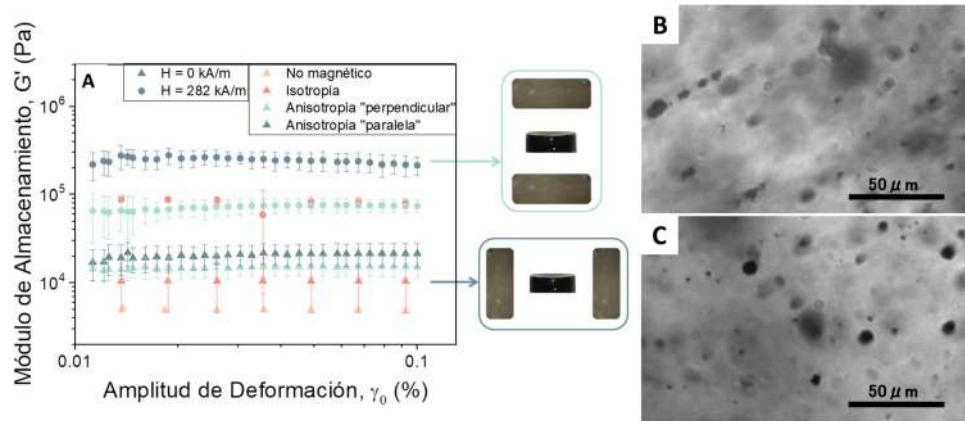


Figura 4.5: (a) Módulo de almacenamiento (G') en función de la amplitud de deformación de cizalla de los hidrogeles magnéticos con una fracción de volumen del 0.05 de partículas magnéticas MP0 y frecuencia fija de 1 Hz. (b) y (c) Imágenes de microscopía óptica de un hidrogel magnético con una fracción de volumen del 0.05 de partículas magnéticas MP0. (b) Línea de observación perpendicular a la dirección de la anisotropía. (c) Línea de observación paralela a la dirección de la anisotropía.

Asimismo, se midieron los módulos viscoelásticos de los hidrogeles de alginato anisótropos con partículas MP0 (Fe-CC), comparándolos con los obtenidos en el trabajo del Capítulo 3. En las figuras 4.5 b y c, se observa una vez más la formación de estructuras en cadena en la dirección del campo magnético aplicado durante la preparación de los hidrogeles. Así, se confirma que la anisotropía inducida surge de la disposición de las partículas magnéticas en la estructura interna del hidrogel. En este caso, y en ausencia de un campo magnético aplicado durante la medida (Figura 4.5a), siempre se obtuvieron valores más altos de G' para los hidrogeles magnéticos que para los no magnéticos. Además, los valores obtenidos para los hidrogeles anisótropos fueron muy similares a los de los isótropos. De hecho, no se observan diferencias significativas entre tener o no esta anisotropía inducida. Sin embargo, cuando se aplica un campo magnético externo de 282 kA/m de intensidad durante el proceso de medición, aparece un alto aumento en G' para los hidrogeles con anisotropía en la dirección perpendicular del campo magnético, mientras que no se observan diferencias entre los hidrogeles con anisotropía paralela al campo magnético y los hidrogeles magnéticos isótropos.

Este efecto corrobora la hipótesis de que no solo la anisotropía espacial es importante, sino que también es fundamental una fuerte interacción entre las partículas y las fibras del hidrogel (ver Capítulo 2) para proporcionar una mejora notable de sus propiedades mecánicas. En el caso de estos ferrogel de alginato, anteriormente se demostró que las partículas magnéticas quedan embebidas dentro de la red polimérica, sin la existencia de un enlace eficaz entre ellas y las cadenas de polímero. Así, podemos concluir que diferentes factores experimentales, como la naturaleza del polímero, el recubrimiento de las partículas o el proceso de gelificación, son determinantes para crear un sistema con las interacciones adecuadas y, por tanto, una anisotropía satisfactoria no solo a nivel estructural, sino también en cuanto a las propiedades mecánicas del material.

4.4. Conclusiones

En este capítulo, se ha investigado el efecto de distintos métodos de generación de hidrogeles anisótropos en las propiedades microestructurales y mecánicas resultantes. Para ello, se han seguido dos procedimientos distintos: (i) procesos de deshidratación parcial controlada, (ii) aplicación de campos magnéticos externos.

En primer lugar, se han analizado dos procesos de deshidratación controlados por esfuerzos para crear la anisotropía deseada, caracterizados por el tipo de esfuerzo aplicado durante la deshidratación de los hidrogeles de alginato: esfuerzo de tracción o compresión. Como muestras de control, se han estudiado hidrogeles de alginato que contienen concentraciones de polímero similares a aquellos que se sometieron a deshidratación. Se ha encontrado que los procesos de deshidratación parcial dan como resultado cambios apreciables en la disposición de los polímeros a nivel microscópico. Además, se ha demostrado que estos cambios a nivel microscópico se correlacionan con cambios en las propiedades mecánicas de los hidrogeles. Se ha encontrado que las propiedades mecánicas de los hidrogeles están influenciadas no solo por la pérdida de agua y la concentración final del polímero, sino también por el protocolo de deshidratación, que parece inducir la formación de nuevos enlaces estables entre las fibras del polímero como consecuencia

de la deshidratación bajo esfuerzos. Para concluir, estos resultados demuestran que la deshidratación parcial bajo esfuerzos de compresión es un método eficiente para inducir anisotropía en la red microscópica de hidrogeles de alginato, cambio que se refleja en las propiedades mecánicas macroscópicas de los hidrogeles.

Por otro lado, se estudiaron hidrogeles magnéticos anisótropos preparados por polimerización de una mezcla de partículas magnéticas y polímero de alginato. Dado que las partículas estaban recubiertas por PEG o por sílice, y los iones de alginato precursores estaban cargados negativamente en el agua, solo se esperaban enlaces de hidrógeno débiles entre las macromoléculas de alginato y las partículas. En consecuencia, cuando se persiguió la anisotropía mediante la aplicación de un campo magnético, en este caso no se obtuvieron resultados completamente satisfactorios, aunque se corroboró la existencia de estructuras alineadas a nivel microscópico. Sin embargo, las diferencias en las propiedades mecánicas macroscópicas en ausencia de un campo magnético aplicado durante las mediciones fueron marginales. Solo la aplicación de un campo magnético moderado durante las medidas reológicas da como resultado valores reológicos mucho más fuertes que aquellos para los hidrogeles no magnéticos y propiedades mecánicas claramente anisótropas. Por tanto, se podría afirmar que la anisotropía se puede lograr fácilmente en hidrogeles magnéticos mediante la aplicación de un campo magnético externo, evitando así los problemas derivados de la deshidratación parcial de los hidrogeles en cuanto a posible pérdida de porosidad. Sin embargo, sería necesaria la optimización del comportamiento anisótropo utilizando partículas funcionalizadas adecuadamente.

Capítulo 5.

Aplicaciones de hidrogeles basados en alginato

5.1. Introducción

El campo emergente de los actuadores basados en hidrogeles está evolucionando rápidamente en los últimos años, aprovechando las propiedades particulares de los hidrogeles sensibles a estímulos específicos como dispositivos que reemplacen o complementen muchas de las actuales máquinas convencionales basadas en materiales rígidos [134]. Gracias a su carácter blando, alto contenido en agua, capacidad de respuesta, biocompatibilidad y adaptabilidad, los hidrogeles pueden superar las limitaciones de las máquinas rígidas convencionales. Sin embargo, el diseño y la implementación de los hidrogeles como nuevos actuadores blandos aún se encuentra en las primeras etapas de desarrollo, dado que muchos sistemas aún tienen que demostrar una funcionalidad efectiva. Además de tener unas propiedades mecánicas adecuadas, para poder aplicar los hidrogeles de forma satisfactoria en el campo de los actuadores blandos, estos deben mostrar una respuesta significativa, fiable y controlable tras la aplicación de un estímulo. Para que sea posible el control mediante campos magnéticos de los hidrogeles, se requiere una combinación adecuada de partículas magnéticas con la red polimérica. Además de la composición del hidrogel, para maximizar la respuesta al estímulo magnético, los actuadores deben diseñarse teniendo en cuenta su naturaleza tridimensional, de tal manera que la aplicación del estímulo pueda conllevar una respuesta fuerte y efectiva. Se requiere un diseño preciso a microescala de la integración de las partículas magnéticas dentro de la red polimérica para permitir la activación magnética de los compuestos poliméricos [111]. A este respecto, se han probado varias técnicas diferentes para la preparación de hidrogeles magnéticos con un control espacial adecuado, como litografía, fotolitografía, micropatrones blandos guiados por láser, microfluídica o impresión 3D [135]. La respuesta de estas partículas al estímulo magnético depende

Parte del contenido de este capítulo ha sido publicado en:
C. Gila-Vilchez, A. B. Bonhome-Espinosa, P. Kuzhir, A. Zubarev, J. D. G. Duran, M. T. Lopez-Lopez. Rheology of magnetic alginate hydrogels, *Journal of Rheology*, **62**, 1083-1096, 2018.

obviamente de la rigidez macroscópica de todo el compuesto, pero también de la viscoelasticidad del medio a nivel de partícula y de la concentración y estado de agregación de las partículas, que gobiernan su movimiento en la microescala. Por ejemplo, en el Capítulo 3 de esta tesis doctoral, se encontraron cambios inesperadamente grandes en las propiedades viscoelásticas de los geles magnéticos, que atribuimos a la agrupación de las partículas constituyentes en agregados en la etapa de gelificación.

Algunos autores también han demostrado que un factor relevante que influye en la respuesta magnética de los materiales magnéticos poliméricos es una distribución de partículas prediseñada, de modo que las partículas pueden responder colectivamente al estímulo magnético [136–138]. De hecho, se requiere una distribución anisótropa de las partículas magnéticas dentro del hidrogel para programar movimientos complejos de los actuadores. En este sentido, algunos trabajos han demostrado que la alineación de las partículas magnéticas conduce al movimiento direccional de los actuadores blandos [139–141]. Por ejemplo, para hidrogeles magnéticos basados en una red química, el grupo del Prof. Sitti [142] demostró que la distribución anisótropa preestablecida de las partículas magnéticas en cadenas, permitía a unos actuadores en forma de cruz flexionar los extremos y hacer movimientos de agarre para coger y transportar pequeños objetos. Sin embargo, aún queda por explotar todo el potencial de la programación de la distribución de las partículas magnéticas. En particular, existe la necesidad de ejercer un control más preciso en la distribución de partículas y su estado de agregación, lo que debe resultar en la programación de deformaciones y movimientos de formas más complejas.

Este capítulo se centra en la investigación de hidrogeles magnéticos de alginato reticulados por interacción iónica mediada por iones de calcio. Nuestra elección de alginato estuvo motivada por su abundancia y bajo coste, así como por su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad [143]. En un capítulo anterior (Capítulo 2) se evaluó la citotoxicidad *ex vivo* y se encontró que los fibroblastos humanos permanecían viables después de 48 h de cultivo celular en contacto con los hidrogeles. En el presente capítulo, se investiga la capacidad de los hidrogeles magnéticos de alginato, tanto isotropos (ver Capítulo 3) como anisotropos (ver Capítulo 4), para su aplicación como actuadores blandos. Para ello, primero se llevó a cabo un análisis de la flexión de los brazos magnéticos en actuadores en forma de cruz que consisten en dos brazos magnéticos isotropos y homogéneos conectados a una sección rectangular no magnética. Los brazos magnéticos pueden sufrir flexiones y deformaciones reversibles por la aplicación de un campo magnético externo. Asimismo, se estudió el movimiento generado en un actuador magnético en forma de gusano alternando partes magnéticas isotropas con partes no magnéticas. Después, se realizó un análisis de la capacidad de actuación de hidrogeles magnéticos anisotropos. Para ello, se prepararon hidrogeles anisotropos de alginato gelificados bajo campos magnéticos formando distintos ángulos, de forma que se crea anisotropía por la formación de cadenas de partículas. Se estudió cómo afecta el ángulo de formación de las cadenas de partículas en la posterior actuación del hidrogel, para distintas estructuras y formaciones (hidrogeles con forma de disco, de gusano y en forma de cruz). La combinación de la forma del hidrogel con el ángulo que forman las cadenas de partículas permite crear movimientos más complejos que con hidrogeles isotropos. Este conocimiento permite diseñar actuadores blandos con las características específicas deseadas en función de su posterior aplicación en tecnología o biomedicina.

Finalmente, se describe una adaptación del protocolo de preparación de los hidrogeles de alginato magnéticos para ser inyectados, lo que podría ser una gran ventaja para su implementación *in vivo*.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Preparación de hidrogeles magnéticos de alginato

Se prepararon hidrogeles magnéticos basados en alginato siguiendo el protocolo establecido en el Capítulo 3, sección 3.2.1. Como fase magnética se utilizaron partículas micrométricas de hierro recubiertas de sílice (Fe-CC, MP0), a distintas fracciones de volumen según el caso.

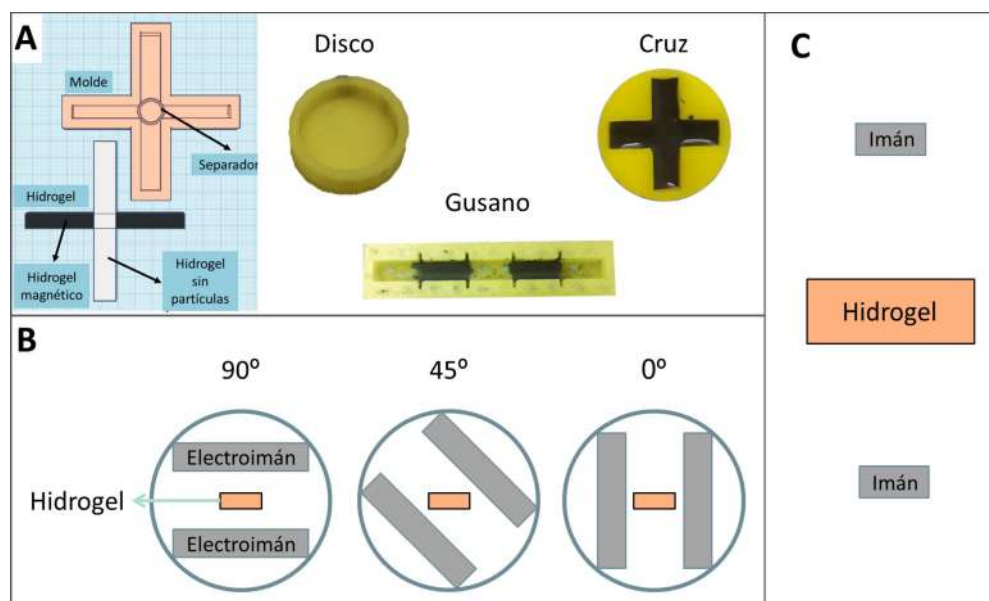


Figura 5.1: (a) Esquemas y fotografías del molde utilizado para la preparación de los distintos actuadores. (b) Esquema de la aplicación durante el proceso de gelificación de campos magnéticos a distintos ángulos utilizando un electroimán. (c) Esquema de la aplicación, durante la gelificación de la muestra en forma de cruz, de un gradiente de campo utilizando dos imanes.

Para el estudio de actuadores basados en hidrogeles isótropos de alginato, se prepararon actuadores en forma de cruz y de gusano (ver Figura 5.1a). Los actuadores isótropos en forma de cruz consisten en una parte pasiva (sin partículas magnéticas) y dos brazos activos (con partículas magnéticas dispersas de forma homogénea) a distintas concentraciones de partículas magnéticas. Como se muestra en la Figura 5.1a, para el estudio con hidrogeles anisótropos de alginato, se prepararon actuadores con forma de disco, de gusano y de cruz, aplicando durante el proceso de gelificación un campo magnético para agrupar a las partículas magnéticas en estructuras de cadenas.

La inclinación del campo magnético aplicado con respecto a los moldes donde gelifican las muestras, hace que se creen cadenas de partículas con distintos ángulos (Figura 5.1b). En el caso del actuador con forma de cruz, se creó un gradiente de ángulo utilizando dos imanes pequeños para alinear las partículas (Figura 5.1c).

5.2.2. Análisis del efecto de actuación de los hidrogeles de alginato

Para el análisis del comportamiento de actuación de los actuadores basados en hidrogeles isótropos de alginato, se colocaron los actuadores en forma de cruz o gusano (ver Figura 5.1a) en un recipiente con agua ubicado a media altura en el interior de un par de carretes de Helmholtz y se tomaron fotografías de los mismos cuando se aplicaban campos magnéticos de distintas intensidades.

Para el análisis del comportamiento de actuación de los actuadores basados en hidrogeles anisótropos de alginato, se llevaron a cabo dos tipos de caracterizaciones. Por un lado, se estudió el comportamiento macroscópico del actuador, analizando el movimiento realizado por el mismo a través de vídeos y fotografías tomados con una cámara digital mientras se aplicaban campos magnéticos externos de distintas intensidades y en varias direcciones utilizando un electroimán rotatorio. Por otro lado, se caracterizó la actuación de los hidrogeles a nivel de estructuración microscópica mediante un sistema de imágenes de tomografía de rayos X (microCT, GE Measurement and Control Solutions, Dresde, Alemania) que permitía escanear los hidrogeles para obtener información sobre la disposición de las partículas magnéticas dispersas en su interior. Las imágenes de proyección de las muestras se tomaron con un incremento angular de 0.25° , un voltaje de aceleración de 90 kV y un tiempo de exposición de 2 s. Para la aplicación de campos magnéticos durante las medidas de microCT se utilizaron dos imanes móviles, de forma que la muestra quedaba colocada entre ambos y mediante el control de la distancia entre ellos se podía cambiar la intensidad de campo. La reconstrucción de las imágenes de microCT se llevó a cabo con el programa VGStudio Max 2.1 (Volume Graphics GmbH). Por último, se estudiaron las curvas de magnetización de las muestras mediante un magnetómetro Lake Shore 7407. Los hidrogeles magnéticos de alginato se prepararon con una concentración en volumen de partículas de hierro Fe-CC del 1 % para microCT y del 5 % para los estudios de los movimientos de actuación y de magnetometría.

5.2.3. Estudio de inyectabilidad: Protocolos y caracterización

Se analizó la inyectabilidad de los hidrogeles magnéticos de alginato. Para ello, se eligieron hidrogeles magnéticos que contenían una fracción de volumen de partículas magnéticas de 0.046 y se sometieron a un protocolo de inyección con potencial para ser implementado en aplicaciones *in vivo*. Este protocolo consiste en los siguientes pasos:

1. Los hidrogeles se prepararon dentro de jeringas siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2.1, excepto por la adición final de la disolución de cloruro de calcio. Es posible almacenar estos hidrogeles magnéticos durante varios días hasta que se requiera su uso. Para el presente estudio, se almacenaron durante una noche en una atmósfera saturada de agua a temperatura ambiente.
2. Antes de la inyección, los hidrogeles se deshidratan hasta que pierden aproximadamente el 20 % de su masa total. Para ello, se extraen de las jeringas (por su abertura posterior) y se colocan en placas de Petri dentro de un horno a 35°C durante 2 horas. La razón de esta deshidratación parcial es ganar algo de espacio para la solución adicional que se debe agregar después de la inyección. En caso contrario, si no realizamos esta deshidratación parcial, queda una solución sobrenadante (no absorbida en los hidrogeles), algo indeseable desde el punto de vista de las aplicaciones *in vivo*.
3. Posteriormente, se colocan los hidrogeles nuevamente dentro de las jeringas (se debe tener en cuenta que los hidrogeles mantienen su forma durante la deshidratación parcial) y se inyectan en el lugar deseado.
4. Tras un tiempo dado después de ser inyectados (de 0 a 120 min.), se agrega por inyección un volumen total de una disolución de CaCl_2 igual al volumen de agua perdido durante la deshidratación parcial (paso 2). La concentración de CaCl_2 en esta disolución se ajustó de modo que la molaridad final en el hidrogel fuera 22.5 mM; es decir, la misma molaridad que en el protocolo descrito en la sección 3.2.1.

Mediante un sencillo estudio de laboratorio, se evaluó la viabilidad de la inyección del hidrogel magnético en una estructura macroporosa, que simula un modelo aproximado de tejido biológico. Para ello, se utilizó una espuma comercial de poliuretano (Procurus, España) con un módulo de compresión aproximado de 4600 ± 100 Pa. Se perforó un agujero en forma de copa de aproximadamente 1 cm de diámetro y 2 cm de profundidad en la espuma. Luego, se cubrió la superficie de la espuma que tenía el agujero con una espuma adicional del mismo tamaño y se mantuvieron en contacto durante la duración total de los experimentos. A continuación, se siguió el protocolo descrito anteriormente para la inyección del hidrogel magnético en el espacio perforado entre las dos espumas. Al final del experimento, se separaron las espumas y se recuperó el hidrogel magnético del agujero. Luego, se analizó su integridad macroscópica mediante observación directa y microscopía óptica con una cámara digital. También se caracterizaron las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles inyectados. Para ello, se siguió el protocolo descrito para la inyección del hidrogel magnético en una placa de Petri, con el fin de obtener un hidrogel con forma de disco, siguiendo los mismos protocolos de caracterización reológica descritos anteriormente en la sección 3.2.3.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Actuadores magnéticos basados en hidrogeles isotrópicos de alginato

Los hidrogeles estudiados en esta ocasión tenían forma de gusano o de cruz (ver Figura 5.1), compuestos por partes pasivas (hidrogel de alginato sin partículas) y partes activas (hidrogeles magnéticos de alginato). Así, la única diferencia entre las partes activas y pasivas del actuador es que las partes activas fueron dopadas con partículas magnéticas de hierro (Fe-CC, MP0) para que respondan a estímulos magnéticos externos. En el caso del actuador en forma de cruz, la finalidad de la parte pasiva era asegurar la adherencia entre el actuador y la superficie de contacto, ya que de lo contrario toda la muestra se desplazaría como consecuencia del débil gradiente de campo horizontal.



Figura 5.2: Fotografías de los actuadores basados en hidrogeles isotrópicos de alginato con forma de cruz y de gusano bajo campos magnéticos aplicados de distinta intensidad.

En primer lugar, se realizó un estudio de la respuesta magnética del actuador en forma de cruz en función de la concentración de partículas en sus partes activas. En general, existe un aumento del ángulo máximo que alcanzan los brazos magnéticos del actuador con la concentración de las partículas magnéticas. Por ejemplo, el actuador con un 5 % v/v de concentración de partículas en la parte activa, no consiguió flexionar los brazos ni siquiera para el máximo valor de intensidad de campo magnético alcanzada ($H \sim 49 \text{ kA/m}$), mientras que el que contenía un 20 % v/v (cuatro veces más de partículas magnéticas) alcanzó un ángulo máximo de 90° a $H \sim 45 \text{ kA/m}$ (Figura 5.2). Además, de estos resultados se infiere que la intensidad de campo magnético umbral necesaria para

obtener una respuesta del actuador disminuye al aumentar la concentración de partículas.

En segundo lugar, se analizó la capacidad de actuación de los hidrogeles con forma de gusano que alternan partes no magnéticas y partes magnéticas isotropas con una concentración de partículas del 5 % v/v (ver Figura 5.2). Estos actuadores exhiben un movimiento levantando las partes magnéticas en direcciones opuestas al aplicar campos magnéticos externos progresivamente de mayor intensidad. Así, el movimiento conseguido con esta configuración, consiste en la inclinación de las partes magnéticas conforme el campo magnético aumenta de intensidad, hasta quedar totalmente alineadas en la dirección vertical del campo para una intensidad de campo magnético $H \sim 42 \text{ kA/m}$. Es importante también notar que en la figura 5.2 se observa que la muestra con forma de gusano se inclina hacia un lado debido a los gradientes de campo horizontales.

5.3.2. Actuadores magnéticos basados en hidrogeles anisótropos de alginato

En primer lugar, se realizó un análisis de la actuación de estos hidrogeles a nivel microscópico mediante ensayos de tomografía de rayos X (microCT). En la Figura 5.3 se muestra la estructura en forma de cadenas de las partículas magnéticas incluidas en los hidrogeles de alginato con forma de disco, de forma que al aplicar un campo magnético durante su gelificación, se crean formaciones de cadenas a distintos ángulos (0° , 45° y 90°). En todos los casos se incluyen imágenes del hidrogel en una perspectiva general, acompañada de una captura del corte transversal de la misma, con la finalidad de observar en detalle las cadenas de partículas magnéticas. Como control (Ctr), se analizaron asimismo hidrogeles de alginato isotropos, es decir, hidrogeles a los que no se les aplicó campo magnético durante el proceso de gelificación y por tanto las partículas magnéticas quedaron dispersas en la red polimérica de forma homogénea. Una vez realizada la microCT de los hidrogeles, se les aplicó a estas mismas muestras un campo magnético de 100 kA/m utilizando dos imanes enfrentados y colocando la muestra entre los mismos, y se repitió la microCT con estas condiciones. Para la muestra control no se observan cambios en la estructuración de las partículas, lo cual indica que estas no tienen capacidad para moverse en la red polimérica; es decir, las fuerzas magnéticas no son capaces de superar la fuerza elástica que ejerce la red de alginato. Igualmente, el hidrogel con partículas alineadas a 90° tampoco sufre cambios con el campo magnético, ya que este se aplica en la misma dirección en la que las partículas ya se encuentran de antemano alineadas. Sin embargo, las muestras con alineación a 0° y 45° sí que sufren cambios al aplicar un campo magnético externo. Debido a que las partículas no tienen capacidad para moverse dentro de la red polimérica, al aplicar el campo magnético las cadenas tienden a alinearse en la dirección del campo y arrastran todo el conjunto del hidrogel, lo que conlleva un movimiento macroscópico de la muestra. Así, como se ve en la Figura 5.3, estos hidrogeles prealineados se flexionan de forma que las cadenas de partículas magnéticas quedan alineadas con el campo magnético externo, de forma que este movimiento macroscópico se puede controlar en función del ángulo inicial en que las partículas son alineadas.

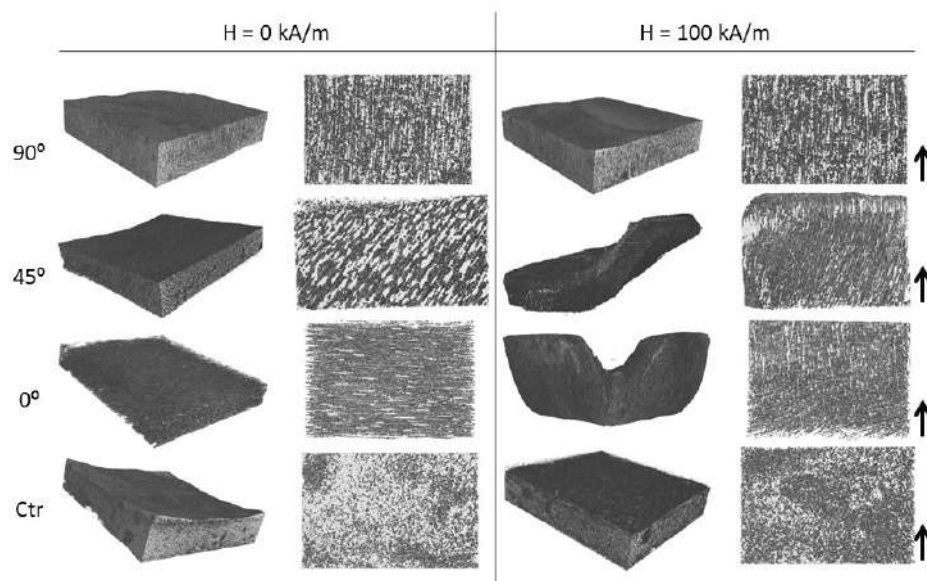


Figura 5.3: Imágenes de microCT de los hidrogeles en forma de disco con distintos ángulos de alineación de las partículas magnéticas (0° , 45° y 90°) y muestra de control isotrópica (partículas sin alinear - Ctr), con y sin campo magnético aplicado durante el análisis de tomografía. La concentración en volumen de partículas magnéticas es del 1 %. La dirección del campo magnético aplicado viene indicada con flechas.

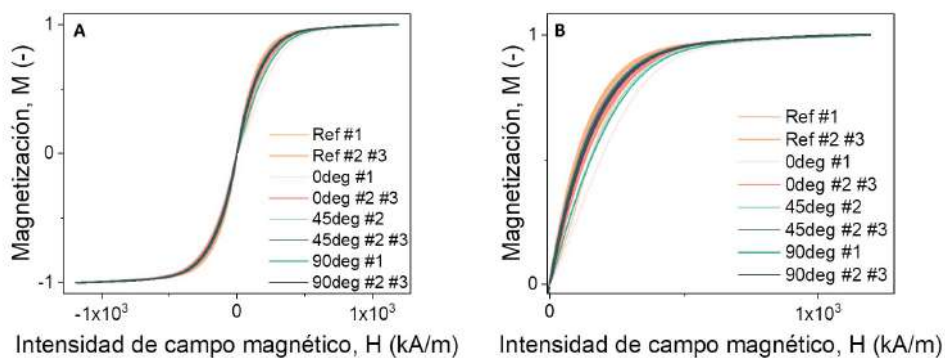


Figura 5.4: Curvas de magnetización normalizada de los hidrogeles anisótropos de alginato con prealineación de las partículas magnéticas a 0° , 45° y 90° . Como control, se midió una muestra isotrópica con las partículas dispersas de forma homogénea (sin alinear - Ref). Se realizaron tres ciclos de magnetización para cada muestra. La concentración en volumen de partículas es del 5%.

Estos resultados concuerdan con lo obtenido en las curvas de magnetización mostradas en la Figura 5.4a. Se puede ver que el primer ciclo de campo da, a campos inferiores a la saturación, valores de la magnetización normalizada más bajos que el segundo y tercer ciclo, los cuales coinciden entre sí. Esto se debe a que las cadenas de partículas magnéticas se alinean en la dirección del campo aplicado, disminuyendo la permeabilidad de la muestra, como se ha visto en la Figura 5.3. Nótese que la intensidad de campo magnético aplicado durante las medidas de magnetización es mucho más alta (varios órdenes de magnitud) que las utilizadas en los procesos de actuación. Además, en la Figura 5.4b se observa más claramente que el área existente entre la curva de primera magnetización y las siguientes es más grande para el ángulo de 0° y baja progresivamente, siendo la más baja la de la muestra con ángulo de 90° , cuyas partículas estaban prealineadas en la dirección del campo magnético aplicado durante las medidas de magnetización.

A continuación, se analizó la capacidad de actuación de estos hidrogeles anisótropos aprovechando la alineación de las partículas magnéticas a distintos ángulos y probando distintas morfologías para crear movimientos macroscópicos complejos. Para ello, se prepararon hidrogeles de alginato con forma de gusano alternando partes magnéticas anisótropas con partes no magnéticas (ver Figura 5.1a). La Figura 5.5 muestra cómo el actuador con alineación de 45° en las partes magnéticas realiza un movimiento parecido al de un gusano cuando se aplica un campo magnético, levantando las bandas magnéticas en la misma dirección. Conforme el campo aumenta de intensidad, las partes magnéticas del actuador se inclinan para alinear las cadenas de partículas en la dirección del campo, hasta llegar a formar un ángulo de 45° para la máxima intensidad aplicada al quedar las partículas totalmente alineadas con el campo magnético externo. Esto se corrobora con las imágenes de microCT que se tomaron de las partes magnéticas de estos actuadores con y sin campo magnético aplicado, y va en concordancia con lo observado anteriormente en la Figura 5.3. Igualmente, los actuadores con una prealineación de las partículas en cadenas a 0° crean un movimiento levantando las partes magnéticas, esta vez en direcciones contrarias, al aplicar campos externos progresivamente de mayor intensidad. Por tanto, para una misma morfología del actuador, un cambio en el ángulo de alineación de las cadenas de partículas conlleva un movimiento completamente distinto cuando se aplican campos magnéticos iguales. Además, no sólo el ángulo de alineación de las partículas es importante, sino también su dirección. Así, si las partículas están alineadas a un ángulo de 0° pero en la dirección perpendicular, se pueden conseguir movimientos de rotación del actuador manteniendo constante la intensidad del campo aplicado y girándolo para cambiar su dirección y dirigir el movimiento, tal y como se muestra en la última parte de la Figura 5.5. Al dejar de aplicarse el campo, los actuadores vuelven de nuevo a su estado inicial en todos los casos estudiados, pudiendo realizarse ciclos de encendido y apagado.



Figura 5.5: Fotografías del actuador con forma de gusano y partes magnéticas alineadas a 0° y 45° bajo campos magnéticos aplicados de distinta intensidad o dirección. Se incluyen las correspondientes imágenes de microCT para cada condición estudiada.

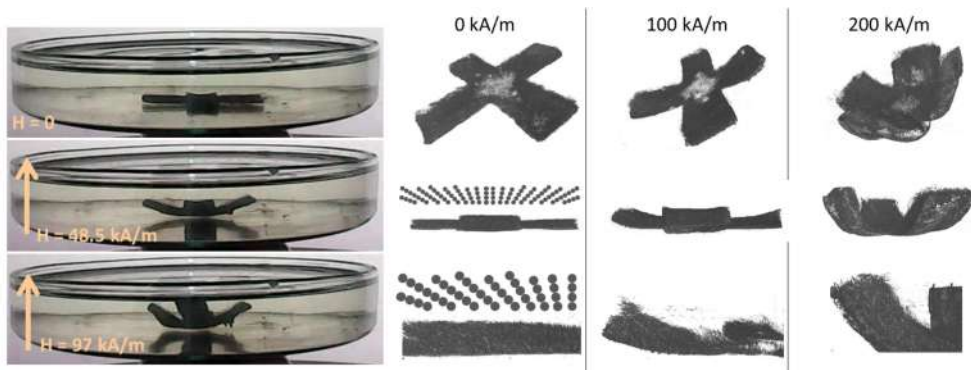


Figura 5.6: Fotografías del actuador con forma de cruz bajo campos magnéticos aplicados de distinta intensidad. Se incluyen imágenes de microCT para distintas intensidades de campos magnéticos y desde tres vistas o perspectivas distintas: de lado, vista lateral y detalle de una de las patas. Se incluyen también esquemas de la alineación inicial de las partículas inicial.

Por otro lado, se prepararon actuadores en forma de cruz bajo un gradiente de campo utilizando dos imanes enfrentados (ver Figura 5.1c). De esta forma se consigue que las cadenas de partículas formen un ángulo de 90° en el centro de la muestra y progresivamente vaya disminuyendo con un gradiente de ángulos hasta llegar a 0° en los extremos de las patas, tal y como se ve en las imágenes de microCT en ausencia de campo magnético y en los esquemas representados en la Figura 5.6. Mediante esta técnica, se consigue que la cruz flexione las patas y se cierre con una forma redondeada al aplicar campos magnéticos externos, en contraposición al movimiento recto de las patas que se conseguía con los actuadores isótropos estudiados en el apartado 5.3.1, y no se necesita de una parte pasiva (hidrogel sin partículas) para conseguir el movimiento

de flexión deseado, lo que supone otra ventaja frente al actuador isótropo. Además, este movimiento de flexión es reversible, volviendo a su estado inicial cuando se retira el campo magnético. Así, con un control preciso de la distribución de partículas en el hidrogel y del campo magnético externo aplicado, se puede dar utilidad tecnológica y biomédica a estos actuadores como robots blandos capaces de transportar pequeñas cargas [142]. Por tanto, se demuestra que mediante una combinación adecuada de morfología y disposición de partículas magnéticas, se pueden conseguir todo tipo de movimientos complejos que le dan distintas utilidades a estos hidrogeles dentro del campo de los actuadores magnéticos.

5.3.3. Estudio de inyectabilidad

Como se describe en la metodología, se recuperaron los hidrogeles magnéticos inyectados pasadas 24 horas desde la adición de la disolución de CaCl_2 , e inmediatamente después se analizó su integridad macroscópica y propiedades reológicas. Cabe señalar que si bien los hidrogeles resultantes presentaban un aspecto grumoso (Fig. 5.7a), cada uno de ellos consistía en una pieza maciza que podía manipularse sin fracturarse (Fig. 5.7b). En cuanto a sus propiedades reológicas, obtuvimos el promedio del módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdidas (G'') correspondientes a la ZVL, los cuales se representan en la figura 5.7c en función del tiempo (t_{aCa}) transcurrido desde el momento de la adición de la disolución de CaCl_2 .

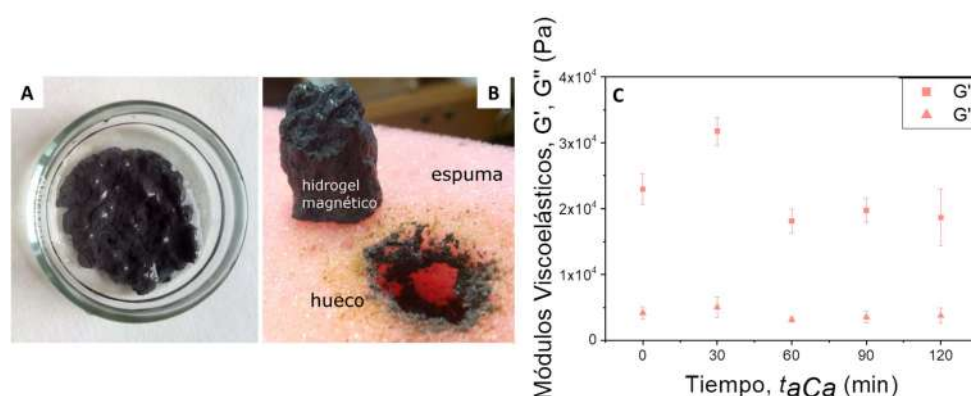


Figura 5.7: Hidrogel magnético inyectado pasadas 24 horas de la adición de CaCl_2 . La imagen (a) corresponde a un hidrogel magnético inyectado en una placa de Petri. La imagen (b) corresponde a un hidrogel magnético inyectado a través de una espuma en un orificio en forma de copa previamente perforado (no hubo difusión del hidrogel a las áreas circundantes). Se obtuvo un aspecto similar para diferentes valores de tiempo transcurrido desde el momento de la adición de la disolución de CaCl_2 (t_{aCa}). (c) Módulos promedio de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') correspondientes a la ZVL, de los hidrogeles magnéticos en función de t_{aCa} . La fracción de volumen de partículas magnéticas fue de 0.046 en todos los casos.

Como se puede observar, para todo el rango de t_{aCa} , los hidrogeles resultantes presentan un comportamiento viscoelástico de tipo sólido, caracterizado por valores de G' mayores que los de G'' . En cuanto al papel de t_{aCa} , fue despreciable sobre la magnitud de G'' , mientras que en el caso de G' se obtuvo un valor máximo para $t_{aCa}=30$ min. Además, en todos los casos, los valores de G' y G'' fueron del mismo orden de magnitud que los presentados en la sección 3.3.2 para hidrogeles magnéticos no sometidos a inyección. Por ejemplo, $G'=10.2\pm0.4$ kPa para el hidrogel no sometido a inyección, mientras que $G'=22\pm6$ kPa para los hidrogeles inyectados. Por lo tanto, el protocolo de inyección diseñado ha demostrado ser adecuado para conservar la morfología y las características mecánicas de los hidrogeles magnéticos de alginato y podría ser adecuado para su implementación *in vivo*. Debe tenerse en cuenta que los hidrogeles médicos inyectables ideales deben cumplir varios requisitos generales, incluidas la biocompatibilidad y biodegradabilidad, así como una fácil inyección a través de una jeringa para reducir las molestias del paciente, y una gelificación rápida después de la inyección para evitar la difusión a las áreas circundantes [144, 145]. Además, para determinadas aplicaciones, se necesitan otros requisitos específicos, como propiedades mecánicas similares a los tejidos diana en aplicaciones de ingeniería tisular.

5.4. Conclusiones

Se ha explorado la aplicación de los hidrogeles de alginato como actuadores magnéticos blandos. Para ello, se han preparado hidrogeles isotrópicos en forma de cruz y de gusano y se ha analizado la capacidad de actuación sobre las partes magnéticas de los actuadores en función de la intensidad de campo magnético aplicado y de la concentración de partículas. En el caso del actuador isotrópico en forma de cruz, las extremidades magnéticas se flexionan progresivamente con ángulos mayores conforme aumenta la intensidad de campo magnético aplicado y se ha obtenido una mejor respuesta de flexión para la mayor concentración de partículas magnéticas estudiadas. Por otro lado, el hidrogel isotrópico con forma de gusano ha realizado un movimiento de levantamiento de las partes magnéticas de forma progresiva, alineándose en la dirección del campo magnético aplicado al aumentar su intensidad. Asimismo, se han preparado hidrogeles anisótropos prealineando las partículas magnéticas en estructuras de cadenas mediante la aplicación de un campo magnético durante el proceso de gelificación. Se ha estudiado la capacidad de actuación de estos hidrogeles en función de la disposición de las partículas, la morfología del hidrogel y la intensidad del campo magnético aplicado. Tanto las observaciones a nivel macroscópico como los análisis de la microestructura por microCT, revelan que las cadenas de partículas, que no tienen capacidad de vencer la fuerza elástica de la matriz polimérica y por tanto de moverse en su interior, tienden a alinearse con las líneas del campo aplicado, generando un movimiento macroscópico de la estructura completa del hidrogel. Se ha demostrado que una combinación adecuada de la morfología del hidrogel con la disposición de las partículas en su interior es crucial a la hora de obtener distintos movimientos complejos para la aplicación de estos materiales como actuadores magnéticos. En conjunto, estos resultados evidencian el potencial de los hidrogeles magnéticos de alginato para aplicaciones como actuadores blandos, un campo que tradicionalmente ha estado dominado por elastómeros magnéticos.

Finalmente, se ha propuesto un protocolo para la inyección de los hidrogeles magnéticos de alginato. El punto de partida es un hidrogel magnético parcialmente deshidratado que se puede inyectar con una jeringa. Después de la inyección, el hidrogel se reconstruye con la adición de una solución de CaCl_2 . Todo esto, junto con la biocompatibilidad de los hidrogeles, convierte a estos materiales en una referencia para aplicaciones biomédicas y tecnológicas.

Parte III

Capítulo 6.

Síntesis y caracterización de hidrogeles basados en péptidos

6.1. Introducción

Durante las últimas dos décadas, el campo de los polímeros supramoleculares ha experimentado un gran avance que ha permitido el desarrollo de materiales funcionales blandos con aplicaciones que van desde la optoelectrónica hasta la biotecnología y la medicina [146–154]. La polimerización supramolecular ocurre a través de interacciones no covalentes entre monómeros, lo que hace que estos procesos sean reversibles y susceptibles a cambios ambientales. Por lo tanto, parámetros como la concentración, la temperatura, la composición del disolvente y la aplicación de estímulos externos tienen un gran impacto en el resultado final del correspondiente polímero supramolecular, dando lugar a materiales que muestran reversibilidad, autocuración y capacidad de respuesta a estímulos externos como temperatura, pH, luz, etc. [12, 13, 151–153, 155, 156]. A pesar de las diferentes estrategias implementadas para poder controlar la distribución relativa de los monómeros, muy pocos estudios han mostrado fuertes evidencias sobre el tipo de copolímero formado [157]. Además, la mayoría de estas estrategias de polimerización recientes se han explorado utilizando disolventes orgánicos [158–161], mientras que se han realizado menos estudios con moléculas biomiméticas que se autoensamblan en agua a temperatura ambiente [162, 163]. En concreto, los péptidos anfifílicos cortos como los que tienen grupos Fmoc- (fluorenilmetiloxycarbonilo) y Nap- (2-(naftalen-2-iloxi)acetilo) pueden autoensamblarse mediante un proceso cooperativo en el que, a partir de una fase inicial de nucleación, la polimerización suele ocurrir bajo un control cinético desencadenado por la aplicación de diferentes estímulos [164–168]. El ensamblaje de monómeros distintos tiene varias ventajas. Por ejemplo, permite la producción de

Parte del contenido de este capítulo ha sido publicado en:
C. Gila-Vilchez, M. C. Mañas-Torres, J. A. González-Vera, F. Franco-Montalban, J. A. Tamayo, F. Conejero-Lara, J. M. Cuerva, M. T. Lopez-Lopez, A. Orte, L. Álvarez de Cienfuegos. Insights into the co-assemblies formed by different aromatic short-peptides amphiphiles, *Polymer Chemistry*, **12**, 6832-6845, 2021.

polímeros novedosos con diferentes morfologías y de materiales con un amplio control sobre sus propiedades mecánicas [169–172]. Además, un control adecuado del proceso de ensamblaje permite diseñar materiales más sofisticados con funciones específicas como biomateriales [173] o para el transporte de energía [174, 175]. Sin embargo, el mecanismo de copolimerización de este tipo de péptidos no ha sido estudiado en detalle, y las pruebas sobre la distribución de los monómeros dentro de los copolímeros son escasas. Recientemente se ha demostrado que el mecanismo de polimerización de estos péptidos cortos anfifílicos pasa por un proceso cooperativo o de nucleación-elongación [176–178]. Esta fase de nucleación es un estado metaestable cuya persistencia en el tiempo depende de la hidrofobicidad y concentración del péptido. La formación de fibras supramoleculares solo ocurre cuando un cambio en las condiciones ambientales permite que el sistema supere la barrera de energía libre de la polimerización.

Teniendo esto en cuenta, en este capítulo se estudia en detalle el mecanismo de coensamblaje de péptidos cortos aromáticos que contienen grupos Fmoc- o Nap-, con la intención de comprender el proceso de polimerización de los mismos. Por tanto, se ha combinado el péptido Fmoc-FF con otros dipéptidos que contienen grupos Nap- con el fin de arrojar luz sobre el mecanismo de coensamblaje y estudiar la distribución relativa de los monómeros dentro del polímero supramolecular. Se ha podido demostrar que ambos tipos de monómeros poseen una gran tendencia a formar coensamblajes y dar lugar a copolímeros alternados. Para ello, se han estudiado los coensamblajes formados por la combinación de Fmoc-difenilalanina (Fmoc-FF, L) con Fmoc-dialanina (Fmoc-AA, L y D), Fmoc-diglicina (Fmoc-GG), Nap-dialanina (Nap-AA, L y D) y Nap-diglicina (Nap-GG). El proceso de autoensamblaje se ha estudiado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y dicroísmo circular (CD). Para obtener información sobre el proceso de copolimerización, se han realizado estudios de resonancia Förster de transferencia de energía (FRET) entre dipéptidos Fmoc- y Nap-. Se han llevado a cabo experimentos adicionales de FTIR, calorimetría diferencial de barrido (DSC), estudios cinéticos FRET y microscopía de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) con la mezcla particular de Fmoc-FF (L) y Nap -GG. Finalmente, las propiedades mecánicas de los copolímeros resultantes se han analizado mediante reología de cizalla.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Preparación de los hidrogeles de péptidos

Los péptidos N-Fluorenilmetoxycarbonil-difenilalanina (Fmoc-FF), N-Fluorenilmetoxycarbonil-dialanina (Fmoc-AA) y N-Fluorenilmetoxycarbonil-diglicina (Fmoc-GG) se adquirieron en Bachem Co., Suiza, mientras que los péptidos Nap-fueron sintetizados siguiendo el protocolo descrito en [179].

Se pesaron simultáneamente los péptidos en la proporción deseada y se añadió agua miliQ para obtener una concentración final de 10 mM. Esta suspensión se sonicó en un baño de ultrasonidos AL04-03-230 con agua fría durante 25 minutos, hasta que los péptidos se dispersaron totalmente y se obtuvo una mezcla homogénea. Luego, se agregó una disolución 0.5 M de NaOH, de 10 en 10 μL usando una micropipeta, sonicando durante 2 minutos cuando se agregó cada gota, hasta obtener una solución transparente. Para iniciar el proceso de gelificación, se añadieron 5 μL de una solución concentrada de D-glucono- δ -lactona (GDL, Sigma Aldrich) (200 mg/mL) por mL de solución básica de péptidos y se homogeneizó mediante vortex durante unos segundos. Finalmente, se dejó reposar la mezcla hasta el día siguiente en una atmósfera saturada de agua a temperatura ambiente para asegurar una gelificación completa.

Para los estudios de FLIM, los hidrogeles se prepararon añadiendo el fluoróforo AQui (9-(azetidin-1-yl)-5-butyl-4H-benzo[de][2,6]naphthyridine-4,6(5H)-dione) a la disolución transparente de péptidos con una concentración final del fluoróforo en la mezcla de 12.5 μM [180].

6.2.2. Caracterización de las propiedades microscópicas

La estructura interna de los hidrogeles se estudió utilizando un microscopio electrónico de transmisión electrónico (TEM) LIBRA 120 PLUS Carl Zeiss. Para ello, los hidrogeles se dispersaron en agua ultrapura a proporción 1:5 y se sonicaron durante 3 minutos. Se colocó una gota de esta suspensión en una rejilla de cobre de malla 300 y se utilizó acetato de uranilo al 2 % para realizar una tinción negativa. Después de 2 minutos, la muestra se lavó 3 veces con agua y se secó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Por otro lado, estos experimentos se llevaron a cabo utilizando un microscopio de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) MicroTime 200 (PicoQuant GmbH, Berlín, Alemania) [180]. La fuente de excitación fue un láser de diodo pulsado de 470 nm (LDH-PC-470, PicoQuant), operando en un tasa de repetición de 20 MHz. El haz de excitación se enfocó en la muestra a través de un objetivo de inmersión en aceite x100 de 1.4NA. Se recogió la emisión de fluorescencia, se filtró a través del espejo dicróico principal y un filtro de corte de limpieza (500LP) 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 I_{550} (filtro de paso de banda Thorlabs 550/40) e I_{630} (filtro de paso de banda Chroma 630/60). Se utilizaron

dos detectores de avalancha de un solo fotón (Perkin Elmer) para detectar fotones individuales y se utilizó un módulo de conteo de fotones TimeHarp 200 (PicoQuant) para el etiquetado de tiempo de fotones individuales. Se tomaron las imágenes FLIM con una resolución espacial de 19.5 nm/píxel y una resolución temporal de 29 ps/canal. Las imágenes se analizaron usando SymPhoTime 64 (PicoQuant) y scripts codificados en FIJI (distribución de ImageJ) [181]. Se obtuvieron las imágenes FLIM ajustando todos los píxeles de la imagen a una función de decaimiento monoexponencial, usando una función de respuesta de instrumento reconstruida, después de aplicar una agrupación espacial de 5 píxeles y agrupación temporal de 8 canales. La segmentación se realizó restando el fondo definido por un filtro mediano de 50 píxeles [182] y aplicando la herramienta *robust automatic threshold selection tool* en FIJI.

6.2.3. Caracterización del proceso de coagregación de los péptidos

Se utilizó un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum Two FTIR ATR para llevar a cabo las medidas de los espectros de infrarrojos (FTIR). Los hidrogeles se comprimieron sobre el cristal de diamante y los espectros se escanearon en el intervalo de números de onda de 4000 a 450 cm^{-1} . La evolución en el tiempo de los espectros FTIR de las mezclas de péptidos se estudió 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. Se escanearon los espectros de las muestras cada 5 minutos en el rango entre 4000 y 900 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} y 128 acumulaciones. Las contribuciones espectrales del vapor de agua residual se eliminaron utilizando el filtro de compensación atmosférica integrado en el software Bruker OPUS. Los espectros finales se suavizaron usando un filtro FFT con una ventana de 10 puntos. Los espectros FTIR se adquirieron primero con mezclas de péptidos recién preparadas disueltas en medio acuoso básico, como se describió en la sección 6.2.1. Luego, se añadió GDL y las mezclas se depositaron inmediatamente en la celda ATR. Los espectros de fondo medidos previamente en medio acuoso básico se restaron a los espectros de la muestra final para eliminar la contribución de las bandas de agua fuertes.

Además, los hidrogeles se prepararon dentro de una celda de cuarzo de 0.1 mm de longitud de trayectoria óptica (Hellma Suprasil) y se midieron sus espectros de dicroísmo circular (CD) usando un espectropolarímetro Jasco J-815 equipado con una lámpara de xenón de 150 W enfriada por aire. Se mantuvo una temperatura constante de 20°C durante las medidas utilizando un controlador Peltier PFD-425. Los espectros se registraron de 200 a 350 nm con un paso de 1 nm y 0.5 s de tiempo de integración por paso. Para cada condición experimental, tomamos el valor promedio de 100 medidas. Los espectros se realizaron a una concentración final de dipéptidos de 5 mM para evitar la saturación de las medidas.

Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofluorímetro Jasco FP-8300 (Jasco, Tokio, Japón), a una longitud de onda de excitación λ_{ex} de 280 nm.

Se realizaron medidas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un microcalorímetro DASM-4 equipado con celdas capilares de platino [183]. En la celda de referencia se introdujo una disolución salina en agua, y la celda de muestra se llenó con una mezcla recién preparada del precursor del hidrogel (sin GDL). Las muestras se escanearon hasta 100°C a una velocidad de escaneo de 2°C/min, se enfriaron y se volvieron a escanear para comprobar la reversibilidad de los termogramas. Las líneas de base instrumentales se registraron llenando ambas celdas con la disolución salina en agua y se restaron de los termogramas experimentales. Una vez corregidos, se normalizaron los termogramas a la capacidad calorífica en relación con el agua utilizando las concentraciones molares de Fmoc-FF.

6.2.4. Caracterización de las propiedades mecánicas de los hidrogeles basados en péptidos

Las propiedades reológicas bajo esfuerzos de cizalla de los hidrogeles peptídicos se determinaron utilizando un reómetro de esfuerzo controlado Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) con una geometría plato-plato de 35 mm de diámetro (sensor P35 Ti LS rugoso) y a una temperatura constante de 25°C. En primer lugar, los hidrogeles se sometieron a pruebas de barrido de amplitud de deformación a una frecuencia constante de 1 Hz y amplitud de deformación de cizalla creciente para determinar la zona viscoelástica lineal (ZVL). A partir de estas medidas, se obtuvieron los valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdidas (G'') en función de γ_0 . A partir de las curvas resultantes, los valores característicos G' y G'' dentro de la ZVL se calcularon promediando en la extensión total de la misma. La cinética de gelificación de los diferentes hidrogeles se estudió utilizando una geometría de doble cono-plato de 60 mm de diámetro y un ángulo de 2° (sensor DC60/2° Ti L) y también a 25°C. Para ello, se vertió la disolución de péptidos en el plato de medida inmediatamente después de la adición de la GDL y la mezcla se dejó gelificar durante 2 horas bajo parámetros fijos de 1 Hz de frecuencia y 0.02 % de amplitud de deformación de cizalla.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Análisis del proceso de coagregación de los dipéptidos

Siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.2.1, se disolvieron en agua mezclas de Fmoc-FF y otros dipéptidos [Fmoc-AA(L y D), Fmoc-GG, Nap-AA(L y D), Nap-GG] a una concentración total final de 10 mM y en proporciones 1:1 y 1:3, ajustando el pH a 10.35 con NaOH. Estas mezclas de péptidos forman disoluciones transparentes. La gelificación se desencadena mediante un cambio de pH añadiendo GDL a una concentración final de 1 mg/mL [179,184]. Como se muestra en la Figura 6.1u-z, en todos los casos se forman hidrogeles de diferente consistencia después de 24 horas [185]. Es importante señalar que el Fmoc-FF a 2.5 mM y los otros dipéptidos a 7.5 mM no forman geles por sí mismos, mientras que sí lo hacen a esta concentración cuando se encuentran en la mezcla 1:3. En una proporción de 1:4, ninguna de las mezclas formó geles, y a la concentración final de 10 mM, solo el Fmoc-FF y el Fmoc-AA(L) forman geles por sí mismos [185].

Para estudiar la capacidad de coensamblaje de los distintos péptidos, se analizaron mediante microscopía TEM las disoluciones de péptidos antes y después de agregar GDL. Como se observa en la Figura 6.1b-g, en ausencia de GDL las disoluciones de cada uno de los dipéptidos individuales muestran de forma predominante pequeñas nanoesferas, excepto en el caso del Nap-GG que también muestra pequeñas fibras. Por el contrario, en la Figura 6.1a se ve como el Fmoc-FF, a la misma concentración, muestra exclusivamente la presencia de fibras delgadas. Como era de esperar, estas imágenes muestran la mayor propensión del Fmoc-FF a agregarse en conjuntos fibrilares [178, 186–190]. Sorprendentemente, en la Figura 6.1h-m, las imágenes TEM de las disoluciones que contienen una mezcla de Fmoc-FF con otros dipéptidos en una proporción 1:3 muestran la presencia de pequeñas fibras en todos los casos, donde cada mezcla de péptidos muestra el predominio de un tipo de fibra con una morfología bien definida. Además, la morfología de las fibras es diferente para cada tipo de mezcla, lo que indica la formación preferencial de coensamblajes. La presencia de nanoesferas es residual en la mayoría de los casos y, en la Figura 6.1f, se puede ver que estas fibras se forman por la agregación y transformación de las nanoesferas preexistentes. Estos resultados muestran que los dipéptidos Fmoc-(AA y GG) y Nap-(AA y GG) son capaces de formar fibras en presencia del Fmoc-FF. Se sabe que este tipo de péptidos forman agregados micelares en presencia de sales metálicas; los cuales pueden evolucionar a fibras por un aumento de la concentración de péptidos o por la disminución del pH del medio [178,186–189,191]. En este caso, la formación de fibras cuando el Fmoc-FF se combina con otros péptidos sugiere que se han tenido que formar agregados micelares mixtos responsables de los coensamblajes de fibras a pH elevado. Tras la adición de GDL, las imágenes TEM de la Figura 6.1n-t de los hidrogeles formados por mezclas de los dipéptidos con Fmoc-FF muestran, en todos los casos, fibras de mayor tamaño con una morfología más similar entre sí y similar a las fibras formadas por el Fmoc-FF de forma individual.

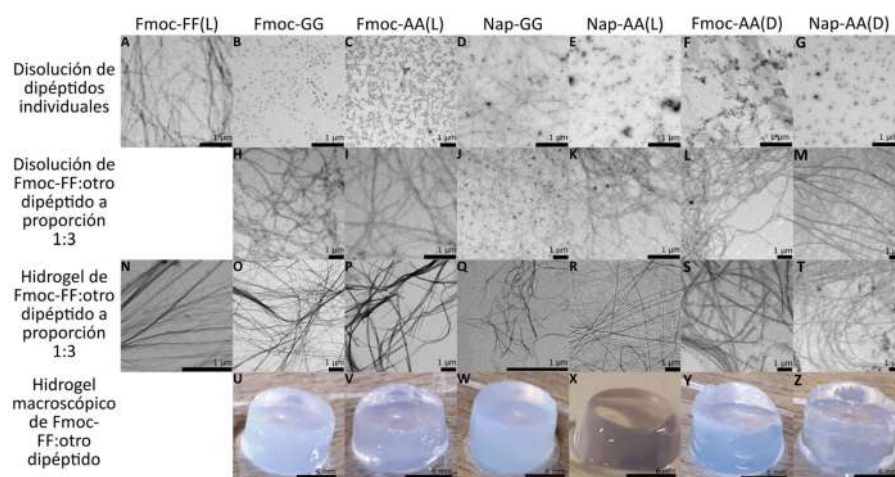


Figura 6.1: Imágenes TEM de (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) disoluciones de cada uno de los dipéptidos de forma individual; (h), (i), (j), (k), (l), (m) disoluciones a proporción 1:3 de Fmoc-FF y los distintos dipéptidos antes de añadir GDL; (n), (o), (p), (q), (r), (s), (t) hidrogeles a proporción 1:3 de Fmoc-FF y los distintos dipéptidos formados por la adición de GDL. (u), (v), (w), (x), (y), (z) Imágenes macroscópicas de los hidrogeles de Fmoc-FF y los distintos dipéptidos a una concentración final 10 mM.

A continuación, se obtuvieron imágenes de las fibras añadiendo un fluoróforo sensible a las condiciones ambientales (AQui) y utilizando microscopía de fluorescencia FLIM, con el fin de analizar más en profundidad el entorno intrafibrilar. El AQui tiene la capacidad de interactuar con las fibras, experimentando una mejora drástica en la emisión de fluorescencia e informando sobre los diferentes entornos a través del valor de vida media de la fluorescencia, τ . La Figura 6.2a muestra la estructura fibrilar de los hidrogeles formados por Fmoc-FF, mientras que la Figura 6.2b muestra las fibras de los hidrogeles formados por la mezcla de Fmoc-FF y Nap-GG en proporción 1:1. En estas figuras se observa claramente que los hidrogeles compuestos por Fmoc-FF y Nap-GG muestran una estructura fibrilar con una morfología parecida a las fibras de Fmoc-FF. Sin embargo, el AQui da valores de τ ligeramente más altos en la mezcla con respecto al Fmoc-FF solo; con valores promedio $\tau=4.4\pm0.1$ ns y $\tau=2.5\pm0.5$ ns, respectivamente, lo que sugiere que la coagregación de estos dipéptidos conlleva cambios en el microambiente fibrilar. Además, en algunas fibras se observa la presencia de patrones repetitivos con valores de τ altos, lo que puede deberse a la estructura helicoidal de las fibras, así como a la presencia de secciones hidrófobas que están más presentes en la mezcla del Fmoc-FF con el Nap-GG.

6.3.2. Espectroscopía del coensamblaje de diferentes dipéptidos

Se llevó a cabo un análisis adicional de la estructura secundaria de estas mezclas de péptidos, así como de la capacidad de interactuar entre sí para formar coensamblajes, mediante técnicas de FTIR (Figura 6.2c-d). En primer lugar, se estudió el proceso de autoensamblaje de los péptidos Fmoc-FF y Nap-GG en función del tiempo, tanto de forma individual como mezclados en proporción 1:3. El Fmoc-FF en disolución (sin GDL) presenta dos bandas fuertes en la región amida I a 1638 cm^{-1} y 1690 cm^{-1} , mientras que el Nap-GG presenta un pico más ancho a 1652 cm^{-1} y otro más agudo pero menos intenso a 1629.5 cm^{-1} (Figura 6.2c). El espectro de la disolución de los dos péptidos mezclados a proporción 1:3 exhibe características de ambos, lo que sugiere que estos influyen mutuamente en su estructura. Asimismo, el espectro teórico simulado de esta combinación de péptidos es similar al observado experimentalmente, lo que respalda aún más esta hipótesis.

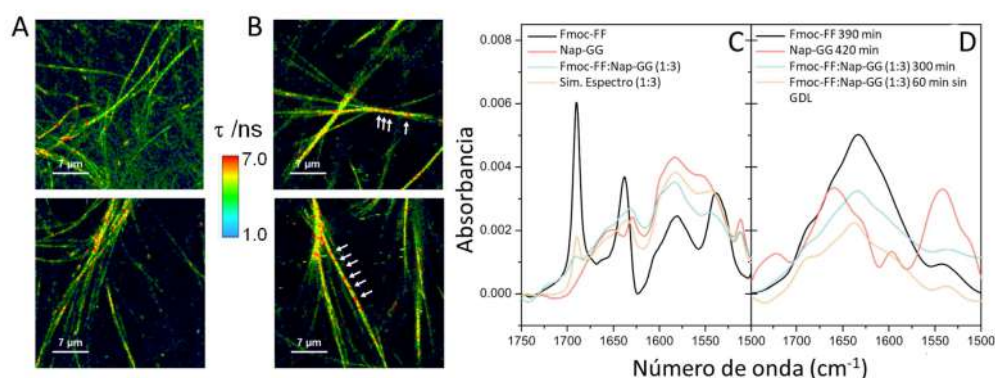


Figura 6.2: Imágenes FLIM del AQui interactuando con hidrogeles (a) Fmoc-FF 10 mM, (b) Fmoc-FF y Nap-GG a proporción 1:1 (5 mM: 5 mM). Las flechas señalan secciones repetitivas de alto tiempo de vida media del fluoróforo dentro de las fibras del hidrogel. (c) Espectros FTIR de disoluciones frescas de Fmoc-FF, Nap-GG y mezcla de Fmoc-FF con Nap-GG 1:3 (2.5 mM: 7.5 mM). El espectro simulado de la mezcla también se muestra a modo de comparación. (d) Espectros obtenidos restando el espectro inicial medido inmediatamente después de la adición de GDL del espectro medido después de la incubación de cada péptido en los tiempos indicados; también se muestra el espectro de la mezcla 1:3 después de la incubación sin GDL.

A continuación, se estudiaron los cambios en los espectros de FTIR a medida que se forman los hidrogeles (Figura 6.2d). Para ello, se siguió durante unas 5 horas la evolución de los espectros después de añadir GDL a las disoluciones precursoras. Por un lado, el espectro del Nap-GG mostró diferentes cambios, como un incremento en la intensidad de la banda a 1662 cm^{-1} , lo que concuerda con la incapacidad de este dipéptido para autoensamblarse en estructuras fibrilares de tipo β . Sin embargo, el espectro del Fmoc-FF de forma individual mostró el desarrollo de una banda ancha centrada en $\sim 1633\text{ cm}^{-1}$, la cual sí que se puede atribuir a la formación de estructuras de tipo β . En los espectros de la mezcla 1:3, una banda centrada en aproximadamente

1635 cm^{-1} , muy similar a los espectros del gel de Fmoc-FF solo, evolucionó con el tiempo de incubación. Este resultado, consistente con lo observado por TEM, sugiere la formación de coensamblajes en los que los agregados resultantes se reorganizan en láminas β . Finalmente, la espectroscopía FTIR del resto de las mezclas de péptidos en forma de geles a proporciones 1:1 y 1:3 muestra espectros prácticamente superpuestos para todas las mezclas y casi idénticos a los espectros Fmoc-FF solo, presentándose nuevamente una banda ancha centrada en aproximadamente 1635 cm^{-1} , de acuerdo con los resultados observados para la mezcla de Fmoc-FF y Nap-GG.

Posteriormente, se analizó mediante espectroscopía CD la quiralidad de las estructuras supramoleculares formadas en los hidrogeles de dipéptidos a proporciones 1:1 y 1:3 (Figura 6.3). Las distintas mezclas de dipéptidos muestran espectros de CD parecidos a los del Fmoc-FF de forma individual, para el cual se ha propuesto una conformación de tipo β antiparalela [192]. Así, todas las mezclas estudiadas presentan espectros con 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 . Esto concuerda con lo observado por TEM y FTIR, donde la estructura secundaria de tipo β del Fmoc-FF se conserva en las mezclas con otros dipéptidos. Sin embargo, es interesante observar que los dipéptidos de diferente quiralidad o aquirales no modifican la quiralidad supramolecular del copolímero. También es importante notar que los valores de CD para los hidrogeles a proporción 1:3 son más bajos que los medidos a proporción 1:1, lo que va en concordancia con el hecho de que la estructura secundaria queda definida por el Fmoc-FF, obteniéndose entonces valores de CD más altos cuanto mayor es la proporción de Fmoc-FF. Estos resultados demuestran también que los copolímeros y geles supramoleculares pueden formarse con péptidos de diferente quiralidad, como ya lo demostraron Adams *et al.*, [193] e implica que la principal fuerza impulsora que promueve la agregación son las interacciones π - π entre grupos aromáticos, potenciadas en agua por el efecto hidrofóbico [194–196].

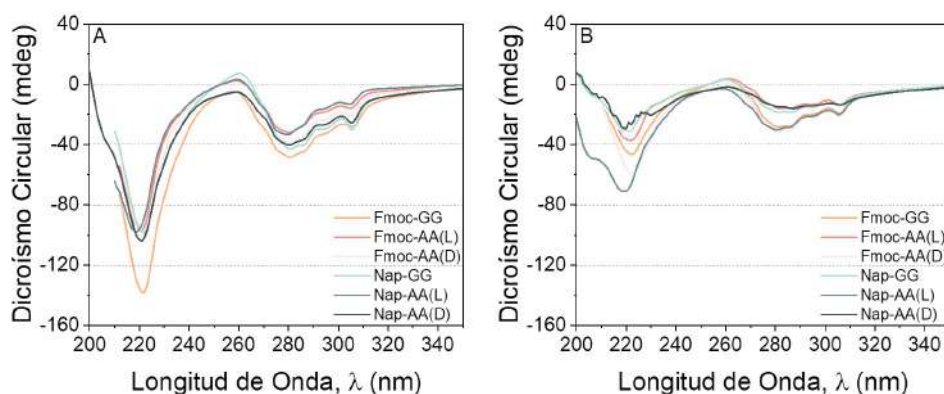


Figura 6.3: Espectros de CD en función de la longitud de onda incidente para los hidrogeles formados por Fmoc-FF y otros dipéptidos a proporción (a) 1:1 (2.5 mM: 2.5 mM) y (b) 1:3 (1.25 mM: 3.75 mM).

Por tanto, los resultados de TEM, FTIR y CD concuerdan y demuestran que los péptidos son capaces de interactuar entre sí a pH alto formando agregados micelares mixtos que pueden evolucionar y formar estructuras fibrilares mixtas al reducir el pH. Esto podría deberse al fuerte carácter hidrófobo del Fmoc-FF, el cual forma micelas estables que pueden acomodar otros dipéptidos.

Después, se realizaron estudios de fluorescencia con el fin de discernir el tipo de copolímeros que forman los dipéptidos, ya que a partir de la eficacia y de las propiedades de emisión del proceso FRET, se puede inferir la capacidad de coagregación del Fmoc-FF con los dipéptidos Nap-AA(D), Nap-AA(L) y Nap-GG [197]. Para ello, se aprovecharon las propiedades fluorescentes del grupo Fmoc-, que emite fluorescencia a 325 nm, y del grupo Nap-, que no solo emite fluorescencia a 350 nm, sino que también pueden formar excímeros dinámicos y estáticos [198, 199] con una luminiscencia desplazada al rojo ($\lambda > 400$ nm). Además, se puede producir la resonancia Förster de transferencia de energía (FRET) de los grupos Fmoc- a Nap- cuando están muy cerca, debido a la absorción de energía del Nap-. Para confirmar esta transferencia de energía en dipéptidos coagregados, se midieron los espectros de emisión de cada una de las disoluciones (sin GDL) de los dipéptidos individuales. En la Figura 6.4a, se observa la emisión típica debida al anillo aromático Fmoc a 325 nm, así como la emisión de monómeros de Nap- (~ 350 nm) y de excímeros estáticos (~ 400 nm). La formación de estos excímeros para los péptidos en disolución con grupos Nap-, da una idea de su grado de autointeracción, existiendo diferencias entre los distintos péptidos estudiados. Por ejemplo, el Nap-GG exhibe una contribución casi insignificante de monómeros a 350 nm en comparación con el Nap-AA(L). Así, el Nap-GG muestra un mayor grado de fibrilización, mientras que el Nap-AA(L) tendría una menor capacidad de auto-interacción (Figura 6.1d,e,g)).

Por último, se midieron los espectros de emisión de mezclas incubadas en proporción 1:3 de dipéptidos Fmoc-FF y Nap-. Se detectó FRET de Fmoc a Nap, como se identifica por la extinción casi total de la emisión de Fmoc y la mejora de la emisión de Nap, lo que confirma la coagregación efectiva de los dipéptidos, especialmente en las mezclas del Fmoc-FF con el Nap-AA(D) y el Nap-GG, lo que significa que estos péptidos quedan bien integrados dentro de la red de Fmoc-FF (Figura 6.4). Curiosamente, este efecto es mucho menos notable en la mezcla con el Nap-AA(L), donde el aumento de la emisión de excímero de Nap- fue bajo, lo que indica un menor grado de interacción y coagregación de este péptido con el Fmoc-FF (Figura 6.4b). Sin embargo, las imágenes de TEM muestran una fibrilización eficaz para la mezcla de Fmoc-FF y Nap-AA(L) (Figura 6.1k). Esto significa que el Nap-AA(L) todavía puede mantener cierta capacidad de autoagregación, independientemente de la presencia del Fmoc-FF. De hecho, los espectros de CD correspondientes a la mezcla de Fmoc-FF y Nap-AA(L) (Figura 6.3b) muestran una banda negativa distintiva alrededor de 205 nm que puede asignarse a una estructura desordenada [180, 200], lo que da como resultado una menor efectividad en la formación del excímero de Nap- y la consecuente transferencia de energía de Fmoc- a Nap-. Finalmente, se reconstruyeron los correspondientes espectros de emisión simulando la ausencia de FRET y de otras interacciones. Para ello, se sumaron los espectros de los péptidos individuales a proporción 1:3. En una situación de ausencia total de interacción entre los diferentes dipéptidos, las líneas experimentales y las simuladas deberían ser comparables.

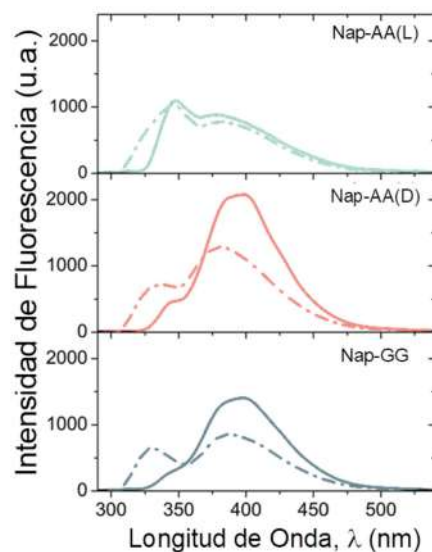


Figura 6.4: Espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 280$ nm) de las mezclas a proporción 1:3 de Fmoc-FF con los diferentes dipéptidos Nap- en disolución. Las líneas de puntos muestran los correspondientes espectros simulados en ausencia de FRET y otras interacciones.

6.3.3. Estados intermedios de coagregación de los dipéptidos

A continuación, se llevaron a cabo experimentos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) con disoluciones de Fmoc-FF y Fmoc-/Nap-GG recién preparadas (Figura 6.5), con el fin de analizar los intercambios de energía y los estados intermedios involucrados en los procesos de coensamblaje y de formación de los hidrogeles de péptidos [178]. Por un lado, el termograma del Fmoc-FF muestra un pico endotérmico fuerte cerca de $\sim 50^{\circ}\text{C}$ que se puede atribuir a la formación de nanoesferas metaestables. Estas nanoesferas pueden evolucionar después a un hidrogel fibrilar en una transición exotérmica a temperatura más alta (75°C). En el caso del Fmoc-GG, tanto los picos endotérmicos como exotérmicos son mucho más débiles, de manera consistente con una menor tendencia a formar geles (Figura 6.5a). Las mezclas de Fmoc-FF y Fmoc-GG muestran perfiles diferentes y más complejos, con dos picos endotérmicos agudos y una exotermia más intensa, consistente con una formación de gel más extensa. Los agudos picos endotérmicos a $\sim 44^{\circ}\text{C}$ y $\sim 50^{\circ}\text{C}$ podrían atribuirse a la aparición de pequeños agregados amorfos. El hecho de que el pico en $\sim 44^{\circ}\text{C}$ aparece solo en las mezclas y que su intensidad relativa con el otro pico varía con la proporción relativa de Fmoc-FF y Fmoc-GG, sugiere la formación de agregados mixtos.

Con respecto al péptido Nap-GG (Figura 6.5b), este no muestra ninguna transición, lo cual concuerda con su carácter de agregación débil. Sin embargo, las mezclas de Fmoc-FF y Nap-GG exhiben picos exotérmicos fuertes que indican la formación de hidrogeles. En cuanto a la aparición de picos endotérmicos, solo se observan débilmente en la proporción 1:1, la cual muestra una formación de hidrogel más fuerte. Estos resultados apoyan la

hipótesis de que el proceso de coensamblaje de los dipéptidos en estos hidrogeles es debido a la formación de precursores de agregados mixtos y concuerdan con los experimentos de fluorescencia de la sección anterior (Figura 6.4).

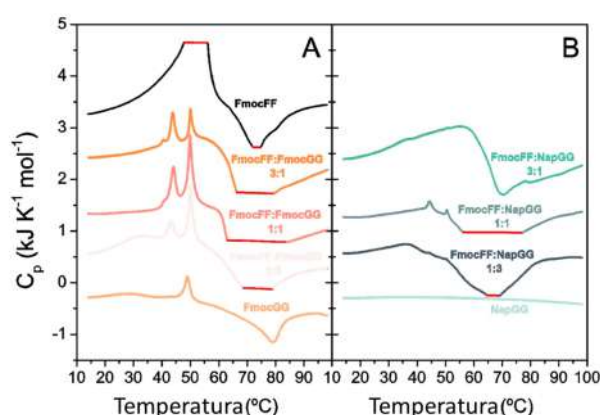


Figura 6.5: Medidas de DSC de las disoluciones recién preparadas a una concentración total 10 mM de Fmoc-FF y (a) Fmoc-GG, (b) Nap-GG. Las zonas planas rojas indican una saturación de la señal del calorímetro debido a la aparición de picos demasiado intensos. Los termogramas se han dispuesto verticalmente separados en intervalos de $1 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ para darle más claridad.

6.3.4. Propiedades mecánicas de los hidrogeles de péptidos

A partir de las medidas de barridos de deformación de amplitud bajo esfuerzos de cizalla, se calcularon los valores medios de los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') de los hidrogeles a diferentes proporciones entre el Fmoc-FF y los otros dipéptidos dentro de la ZVL, manteniendo siempre una concentración final de péptidos de 10 mM. En primer lugar, es importante notar que solo los péptidos Fmoc-FF y Fmoc-AA(L) son capaces de formar geles por sí mismos, mientras que otras muestras de dipéptidos individuales se comportan como disoluciones. Por tanto, se tomó como control el hidrogel formado solo por Fmoc-FF a concentración 10 mM, y se sustituyó parcialmente por otros dipéptidos a distintas proporciones, obteniéndose un aumento de G' en la mayoría de los casos (Figura 6.6a). Así, cuando la proporción entre el Fmoc-FF y los otros dipéptidos era de 3:1, todas las mezclas estudiadas aumentaron su valor medio del módulo de almacenamiento, obteniéndose un aumento máximo para la mezcla de Fmoc-FF con Nap-AA(D). Para los hidrogeles formados a proporción 1:1, solo la mezcla con Fmoc-GG resultó en un gel más débil, mientras que el resto de mezclas formaron hidrogeles más fuertes, con un aumento de hasta un orden de magnitud en G' para la mezcla con Nap-AA(D). Finalmente, para la proporción 1:3 se produce una mejora significativa con Fmoc-AA(L), seguida de Fmoc-GG y Fmoc-AA(D), mientras que se obtiene una disminución con el Nap-GG. A partir de estos resultados se puede concluir que es posible generar nuevos hidrogeles mediante la mezcla de dipéptidos a concentraciones que no dan como resultado hidrogeles en solitario [171] y, además, que estos hidrogeles donde el Fmoc-FF se mezcla con otros dipéptidos son significativamente más fuertes.

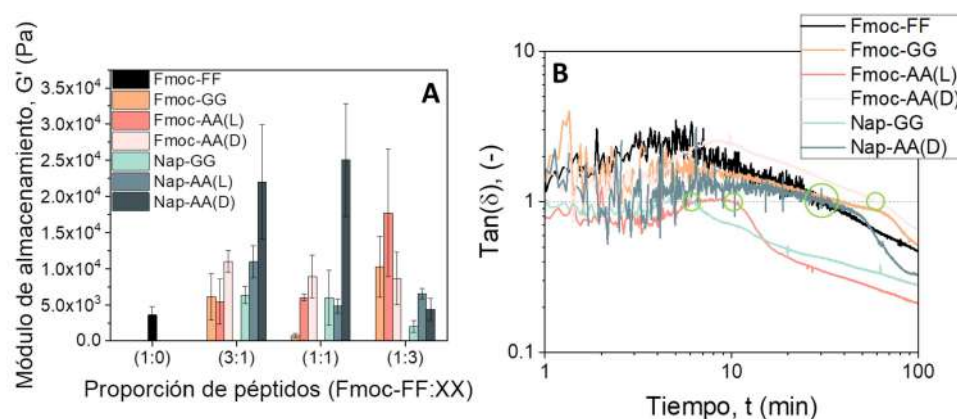


Figura 6.6: Caracterización reológica de los hidrogeles formados por Fmoc-FF y Fmoc-FF con otros dipéptidos a distintas proporciones, manteniendo una concentración total de 10 mM. (a) Valor medio de los módulos de almacenamiento (G') dentro de la ZVL en función de la proporción de dipéptidos. (b) Cinéticas de gelificación representativas para las mezclas a proporción 1:1. Las transiciones sol-gel están indicadas mediante círculos.

También se estudió la cinética de la transición sol-gel monitoreando los módulos viscoelásticos de las muestras en función del tiempo, que comienza justo después de la adición de GDL. Una primera idea aproximada de la cinética viene dada por la tendencia de la tangente de pérdidas, $\tan\delta = G''/G'$ (Figura 6.6b). A tiempos bajos, los valores de $\tan\delta$ son ruidosos y fluctúan alrededor de un valor de 1, que es típico de la región sol. A tiempos más largos, las oscilaciones de $\tan\delta$ desaparecen progresivamente y sus valores presentan una marcada disminución que define la transición sol-gel. Finalmente, a tiempos más prolongados, $\tan\delta$ tiende a valores constantes a medida que se completa el proceso de gelificación. A partir de estas curvas, se pueden obtener los valores del tiempo de gelificación de cada muestra, definido como el tiempo durante el cual $\tan\delta$ disminuye por debajo de 1 de manera estable. También se puede obtener información acerca de la dureza de los hidrogeles al final del proceso de gelificación mediante los valores correspondientes de $\tan\delta$. Como se observa en la figura 6.6b, las muestras presentan valores de $\tan\delta$ en el rango 0.2-0.6, los cuales son típicos de geles débiles [201]. Una excepción es la muestra de Fmoc-FF con Nap-AA(L), que se puede definir como gel fuerte ($\tan\delta < 0.1$), a pesar de su valor relativamente bajo de G' .

6.4. Conclusiones

En este capítulo se ha evaluado el comportamiento de coensamblaje del Fmoc-FF en agua y a temperatura ambiente, en presencia de diferentes dipéptidos con grupos Fmoc- y Nap-, utilizando una combinación de técnicas de microscopía y espectroscopía. Partiendo de las correspondientes disoluciones de dipéptidos en diferentes proporciones, se ha estudiado el proceso de coensamblaje antes y después de la adición de GDL desde el estado de disolución inicial a la fase de gel. El coensamblaje de estos péptidos sigue un mecanismo de nucleación-elongación, en el que, a partir de una fase de nucleación inicial, la formación de fibras se desencadena por un cambio en las condiciones iniciales [176–178]. Se ha demostrado que estos péptidos tienen una fuerte tendencia a interactuar entre sí en disolución a pH alto para formar estados intermedios híbridos que son responsables de la composición final de las fibras. Teniendo en cuenta que la principal fuerza impulsora de la interacción entre las moléculas aromáticas en el agua es el efecto hidrófobo [194–196], las moléculas con un alto porcentaje de grupos aromáticos interactuarían entre sí para formar agregados híbridos. La polimerización de las diferentes especies intermedias solo ocurre cuando estos intermedios son capaces de superar la barrera de energía libre de la polimerización. Los estudios de DSC demostraron que la copolimerización de los intermedios híbridos se favorece termodinámicamente, por tanto, el copolímero es la especie que predomina en la composición final. Por otro lado, el análisis reológico de los hidrogeles demostró que la sustitución parcial de Fmoc-FF por otros dipéptidos resulta en una fuerte mejora del módulo de almacenamiento de los mismos. Se ha demostrado que la relación entre ambos monómeros determina la cinética de autoensamblaje y la disposición de ambos monómeros dentro del copolímero. La tendencia de estos dipéptidos a formar coensamblajes abre la puerta para desarrollar una variedad de copolímeros supramoleculares que tienen diferentes características y geles que también tienen propiedades novedosas, ampliando el alcance e interés de estos materiales.

Capítulo 7.

Aplicaciones biomédicas de hidrogeles basados en péptidos

7.1. Introducción

Los hidrogeles inyectables pueden usarse en aplicaciones biomédicas avanzadas en los campos de la ingeniería de tejidos y la administración de fármacos, macromoléculas y células, y en cirugía como rellenos de huecos, bioadhesivos o antiadhesivos [202–204]. Estos hidrogeles muestran un gran potencial para su uso en terapias con procedimientos mínimamente invasivos y que, por lo tanto, reducen el tiempo quirúrgico, el dolor y las complicaciones médicas. Para fines clínicos, estos materiales deben cumplir con altos estándares que implican unos requisitos técnicos específicos para poder realizar con éxito sus funciones designadas [1,205,206]. Además, deben ser completamente biocompatibles y biodegradables porque están destinados a un uso en el interior del cuerpo humano. La biodegradabilidad dentro del cuerpo es un aspecto clave, ya que la liberación de fármacos y la adhesión o regeneración celular están controladas y pueden verse afectadas por la tasa de degradación del hidrogel; en consecuencia, los efectos fisiológicos y terapéuticos también quedan modulados por este proceso [207]. Así mismo, las propiedades físicas de estos materiales deben estar bien controladas, permanecer dentro de parámetros específicos para garantizar que los materiales sean lo suficientemente fluidos para ser inyectados y lo suficientemente rígidos o compactos para soportar y/o transportar células o fármacos. Además, deben permanecer localizados temporalmente dentro de un tejido específico para ejercer un efecto terapéutico dentro de un período específico [74]. Tanto la

Parte del contenido de este capítulo ha sido publicado en:

M. C. Mañas-Torres, C. Gila-Vilchez, F. J. Vazquez-Perez, P. Kuzhir, D. Momier, J. Scimeca, A. Borderie, M. Goracci, F. Burel-Vandenbos, C. Blanco-Elices, I. A. Rodriguez, M. Alaminos, L. Álvarez de Cienfuegos, M. T. Lopez-Lopez. Injectable Magnetic-Responsive Short-Peptide Supramolecular Hydrogels: Ex Vivo and In Vivo Evaluation, *ACS Applied Materials and Interfaces*, **13**, 49692-49704, 2021.

C. Gila-Vilchez, M. C. Mañas-Torres, V. Carriel, L. Álvarez de Cienfuegos, M. Alaminos, M. T. Lopez-Lopez, O. D. García-García (2022). *Hydrogel suitable to produce artificial tissues*. European patent, EP22382231.3.

biocompatibilidad como las propiedades físicas dependen de la estrategia química utilizada para desarrollar estos sistemas [207].

Para lograr la biocompatibilidad, los hidrogeles se han desarrollado principalmente con materiales de fuentes naturales como alginato, agarosa, colágeno, gelatina, fibroína de seda, ácido hialurónico, quitosano, celulosa y almidón, solos o en combinación con otros compuestos [208]. Debido a que los hidrogeles inyectables deben ser lo suficientemente fluidos para pasar a través de la aguja de una jeringa, la estrategia más común para garantizar la inyectabilidad es inyectar una mezcla de pregel que gelifica lentamente [202] o cuya gelificación puede desencadenarse en condiciones fisiológicas mediante enzimas, sales, cambios de temperatura u otros estímulos [74]. Sin embargo, estos materiales gelificantes *in situ* pueden tener algunos inconvenientes ya que, al ser líquidos, su contenido puede filtrarse al organismo; además, el proceso de gelificación, así como las propiedades biomecánicas finales, pueden verse afectadas por las condiciones *in vivo*. De forma alternativa, existen ciertos hidrogeles que presentan la interesante propiedad de fluir bajo un esfuerzo aplicado (fluidificantes) y recuperan fácilmente su rigidez original después de la eliminación del esfuerzo (autocuración) sin la intervención de ningún estímulo externo [74]. Los hidrogeles fluidificantes se forman mediante enlaces físicos reversibles e incluyen hidrogeles elaborados con péptidos autoensamblantes, en particular, los péptidos de horquilla β , que fueron estudiados en detalle por Pochan y Schneider [209–211], entre otros [74, 207, 212]. Debido a que esta última estrategia involucra la inyección de hidrogeles ya preexistentes, sus propiedades mecánicas y biológicas pueden caracterizarse y estudiarse bien. Además, la recuperación de las propiedades mecánicas puede ser más rápida y verse menos afectada por el medio que en los geles formados por cambios en las condiciones ambientales. La matriz de hidrogel también se puede utilizar para transportar cargas sensibles, como células humanas. En consecuencia, estos hidrogeles se han considerado excelentes candidatos para la terapia celular [209, 211].

Otro grupo de péptidos autoensamblantes que son capaces de formar hidrogeles físicos son los dipéptidos anfifílicos [213, 214], en particular, los que contienen un grupo fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) o naftaleno (Nap) [149, 164, 165, 215], estudiados anteriormente en el Capítulo 6 de esta tesis doctoral. Estos péptidos son fácilmente accesibles y económicamente competitivos y, por lo tanto, se han utilizado en muchas aplicaciones biotecnológicas importantes [167, 216, 217], incluidos los soportes tridimensionales (3D) para el cultivo celular, ya que muestran autocuración en condiciones específicas [218–222]. Sin embargo, la inyectabilidad de estos geles ha sido poco explorada. En el caso particular del Fmoc-difenilalanina (Fmoc-FF), se demostró que este gel sufre separación de fases durante la inyección [223]. En este sentido, una estrategia para mejorar las propiedades de algunos geles consiste en desarrollar hidrogeles compuestos o híbridos elaborados con diferentes materiales orgánicos u orgánicos en combinación con inorgánicos [203]. Esta estrategia también se ha aplicado con geles de Fmoc-dipéptido con el objetivo de mejorar sus propiedades mecánicas [216, 224–226]. Recientemente, Aviv *et al.* mostraron que la combinación de Fmoc-FF y ácido hialurónico daba lugar a hidrogeles compuestos con propiedades mecánicas mejoradas que, en proporciones específicas, se podían inyectar debido al proceso fluidificante, lo que convierte a estos geles en excelentes vehículos para aplicaciones de administración de fármacos [223]. Análogamente, Li *et al.* desarrollaron un hidrogel inyectable para

ingeniería de tejidos basado en la combinación de Nap-FF y fibroína de seda [227].

Por otro lado, en trabajos anteriores se ha demostrado que las propiedades mecánicas de los hidrogeles de Fmoc-FF pueden mejorarse significativamente mediante la incorporación de nanopartículas magnéticas (NPM) mientras la microporosidad del gel permanece inalterada. Además, la incorporación de NPM permite ejercer un control remoto sobre las propiedades mecánicas de forma remota mediante la aplicación de un campo magnético externo [27]. Recientemente se ha demostrado que los hidrogeles magnéticos (hidrogeles en los que se han incorporado micro o nanopartículas magnéticas) ofrecen ventajas específicas cuando se diseñan para aplicaciones biomédicas como la administración de fármacos y la ingeniería de tejidos [228]. Esto quedó igualmente reflejado en el Capítulo 2 de este manuscrito, donde se hizo un análisis exhaustivo de la importancia de la funcionalización de las partículas magnéticas (micro y nanométricas) en hidrogeles de alginato y péptidos. Estas ventajas reflejan el mayor grado de controlabilidad que pueden ofrecer los hidrogeles magnéticos. Además, las propiedades mecánicas o físicas se pueden controlar de forma remota, una característica que hace que estos materiales sean compatibles con aplicaciones *in vivo*. En este sentido, los hidrogeles magnéticos se han utilizado como vehículos pulsátiles de administración de fármacos [23] y en ingeniería de tejidos para la estimulación magnetomecánica de diferentes líneas celulares [229, 230], entre otras aplicaciones [25, 36, 231, 232].

En este capítulo se desarrollan dos tipos nuevos de hidrogeles inyectables siguiendo cada una de las dos estrategias expuestas: (i) hidrogeles híbridos de polímeros y péptidos inyectables en la etapa pregel; (ii) hidrogeles magnéticos supramoleculares que combinan en un solo sistema las ventajas de la inyectabilidad a través de un proceso de autocuración con la capacidad de modulación remota de sus propiedades mecánicas mediante la aplicación de un campo magnético externo (Figura 7.1).

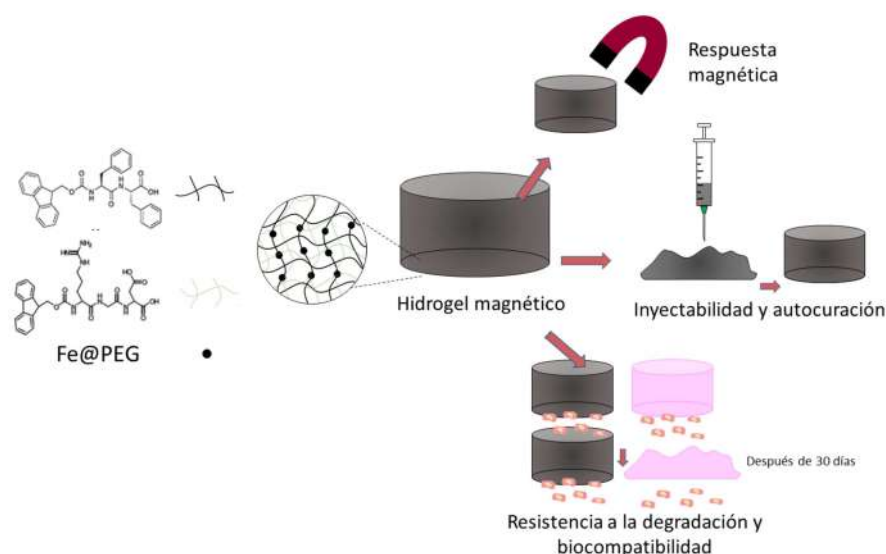


Figura 7.1: Resumen de las propiedades de los hidrogeles magnéticos basados en péptidos de cadena corta.

Los hidrogeles magnéticos supramoleculares se obtuvieron combinando Fmoc-FF, Fmoc-RGD (Fmoc-arginina-glicina-ácido aspártico) y NP1. Estos hidrogeles peptídicos tienen las siguientes características únicas: (1) alta biocompatibilidad y biodegradabilidad *ex vivo* e *in vivo*; (2) alta rigidez mecánica ($G' \geq 20$ kPa), lo que los hace adecuados como soporte para el crecimiento celular; (3) resistencia a la degradación con el tiempo; (4) inyectabilidad con propiedades de fluidificación y autocuración; y (5) capacidad de respuesta a un campo magnético externo. Así, estos hidrogeles pueden localizarse en un sitio específico o pueden moverse después de la inyección sin separación de fases o alterar su composición y, por lo tanto, pueden usarse para trasladar el gel o la carga del gel a un sitio particular por vía subcutánea. Estos nuevos materiales se probaron *in vitro* como soportes 3D para el crecimiento de osteoblastos y como vehículos de administración de fibroblastos inyectados. Además, la inyectabilidad, toxicidad y persistencia de estos hidrogeles se evaluaron *in vivo* mediante inyección subcutánea en ratones.

Por otro lado, los hidrogeles híbridos se prepararon combinando fibrina y los péptidos de cadena corta Fmoc-FF y Fmoc-RGD. Estos hidrogeles no solo son novedosos en cuanto a su composición, sino que además poseen propiedades mecánicas y biológicas que mejoran sustancialmente los biomateriales referenciados hasta el momento al combinar fibrina con los péptidos adecuados. Así, la interacción que se produce entre la fibrina y los péptidos, da lugar a la aparición de una estructura interna más adecuada, a la par que aportan una buena biocompatibilidad. En los trabajos existentes previamente al trabajo de esta tesis, los hidrogeles presentan una serie de limitaciones que los diferencian, en mayor o menor grado, de las matrices extracelulares nativas que se pretenden mimetizar, como la falta de una estructura interna bien organizada y controlada, o su debilidad desde el punto de vista biomecánico. Sin embargo, los hidrogeles híbridos presentados en este capítulo se basan en el uso de un polímero bien conocido hasta el momento para su aplicación en ingeniería tisular, como es la fibrina, combinada con péptidos que aportan a la vez biocompatibilidad y una nueva estructuración, que a su vez provoca un cambio en sus propiedades biomecánicas. Por último, se evaluó su inyectabilidad y toxicidad *in vivo* mediante la inyección subcutánea en ratas.

7.2. Materiales y métodos

7.2.1. Preparación de hidrogeles de péptidos

Para preparar las disoluciones precursoras de los hidrogeles de Fmoc-FF se siguieron los protocolos previamente descritos en el Capítulo 6. En primer lugar, se pesa la cantidad deseada de Fmoc-FF (Bachem Co., Bubendorf BL, Switzerland) y se añade agua desionizada hasta una concentración final de 20 mM. Luego se sonica la suspensión en un baño de ultrasonidos (HSt Powersonic 603) para lograr una dispersión homogénea de los péptidos (durante 1 h). Después, se agregan pequeñas cantidades de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 M con una pipeta hasta obtener una solución clara a un pH de aproximadamente 10.5. Por otro lado, se agrega la cantidad apropiada de Fmoc-RGD en agua desionizada en un vial a presión para obtener una concentración de péptido de 20 mM. Esta solución se vuelve transparente inmediatamente con un pH de aproximadamente 3.98. Para preparar soluciones mezcla de Fmoc-FF/Fmoc-RGD, estos se mezclan a proporción 7:3, mientras que para los hidrogeles Fmoc-FF puros (sin péptido Fmoc-RGD), se mezcla la solución de Fmoc-FF con agua a una proporción de 7:3. Finalmente, se induce la gelificación en las soluciones de péptidos Fmoc-FF/Fmoc-RGD o Fmoc-FF puros agregando volúmenes iguales de una mezcla 50:50 de DMEM y agua. El hidrogel de Fmoc-FF tiene un pH final de aproximadamente 7.4, mientras que el del hidrogel de Fmoc-FF/Fmoc-RGD es de aproximadamente 7.1.

Para preparar hidrogeles magnéticos, se modifica ligeramente el protocolo anterior agregando la cantidad necesaria de NP1 (ver Capítulo 2) a las soluciones de péptidos antes de agregar DMEM, obteniendo una concentración final de NP1 de 0.1 % en volumen. En algunos casos, se indujo la formación de estructuras de cadenas de NP1 en el interior del hidrogel mediante la aplicación de un campo magnético vertical ($H = 15 \text{ kA/m}$) durante la primera hora de gelificación después de la adición de DMEM. Se utilizó para ello una bobina conectada a una fuente de alimentación de CC. En todos los casos, las propiedades de los hidrogeles se caracterizaron pasadas 24 horas de la adición del DMEM con el fin de asegurar una gelificación completa. En la Tabla 7.1 se muestra un resumen de los diferentes hidrogeles peptídicos estudiados en este capítulo.

Tabla 7.1: Resumen de las características de los hidrogeles de péptidos preparados en este capítulo.

Muestra	Péptidos	Adición de NP1	Campo magnético
FF	Fmoc-FF	No	No
FF+NP1	Fmoc-FF	Sí	No
FF+NP1+H	Fmoc-FF	Sí	Sí
FF+RGD	Fmoc-FF + Fmoc-RGD	No	No
FF+RGD+NP1	Fmoc-FF + Fmoc-RGD	Sí	No
FF+RGD+NP1+H	Fmoc-FF + Fmoc-RGD	Sí	Sí

7.2.2. Preparación de hidrogeles híbridos de fibrina y péptidos

Para la preparación de hidrogeles híbridos de fibrina y péptidos, se procede de la siguiente manera. Los hidrogeles de fibrina (control) se preparan mezclando 3.8 mL de plasma humano, 875 μL de DMEM, 75 μL de amchafibrina (agente anti-fibrinolítico, Fides-Ecofarma, Valencia, España) y 250 μL de una disolución de CaCl_2 al 2 % en PBS (solución salina en tampón fosfato) para promover la gelificación de la fibrina, hasta un volumen final de 5 mL. En el caso de los hidrogeles híbridos de fibrina y péptidos, el precursor de los hidrogeles de fibrina se mezcla con la solución de péptido (sección 7.2.1) y una cantidad adicional de DMEM (para promover la gelificación del Fmoc-FF) igual al volumen de péptido, en diferentes proporciones (ver Tabla 7.2). Finalmente, la mezcla se deja reposar toda la noche a 37°C para asegurar la gelificación completa.

Para preparar los hidrogeles híbridos nanoestructurados, se sometieron a técnicas de compresión plástica. Así, los hidrogeles se colocaron entre un par de membranas de filtro de nailon con un tamaño de poro de 0.22 μm (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania) y un par de trozos de papel absorbente (ver Capítulo 4). Luego, los hidrogeles se comprimieron durante 3 minutos bajo una presión mecánica uniforme de 500 g distribuidos homogéneamente.

Tabla 7.2: Resumen de las proporciones de los precursores de fibrina y de péptidos de los hidrogeles híbridos preparados en este capítulo. La concentración de los precursores de péptidos es 20 mM en todos los casos. La proporción Fmoc-FF/Fmoc-RGD es 7:3.

Muestra	Fibrina	Péptidos	DMEM
Fibrina	5 mL	0	0
Fibrina-péptidos (6:1)	4.25 mL	357 μL	357 μL
Fibrina-péptidos (3:1)	3.57 mL	625 μL	625 μL

7.2.3. Caracterización físicoquímica de los hidrogeles

Se registraron los espectros FTIR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) usando un espectrómetro Perkin-Elmer Two FTIR ATR. Los hidrogeles se comprimieron en el cristal de diamante y los espectros se registraron en el intervalo de número de onda de 4000 a 450 cm^{-1} .

Se midieron los espectros de dicroísmo circular (CD) de las distintas muestras siguiendo los protocolos de caracterización descritos en el Capítulo 6. Se mantuvo una temperatura constante de 20°C durante las medidas utilizando un controlador Peltier PFD-425. Los espectros se registraron de 200 a 350 nm con un paso de 1 nm y 0.5 s de tiempo de integración por paso. Para cada condición experimental, se tomó el valor promedio de 100 medidas.

La microestructura de los hidrogeles se analizó por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) por medio de un microscopio electrónico FEI Quanta 400 SEM. Los hidrogeles se prepararon previamente según un protocolo bien establecido para someterlos a secado en punto crítico con CO_2 [233] y recubrirlos con Au-Pd (método Ion Sputtering).

Así mismo, la microestructura de los hidrogeles también se analizó por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) por medio de un microscopio LIBRA 120 PLUS Carl Zeiss. Para ello, los hidrogeles se sonicaron y diluyeron con agua a proporción 1:10, se colocaron en una rejilla de cobre de malla 300, se tiñeron con una solución acuosa de acetato de uranilo al 1 % y se secaron a temperatura ambiente durante 30 min. Se analizaron al menos seis áreas diferentes en cada condición experimental.

7.2.4. Caracterización de las propiedades mecánicas

Se analizó la cinética de gelificación de los hidrogeles mediante medidas reológicas, utilizando un reómetro de esfuerzo controlado Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) provisto de una geometría de doble cono-plato con un cono de 60 mm de diámetro y un ángulo de 2° (sensor DC60/ 2° Ti L). Para ello, se sigue el protocolo de preparación de los hidrogeles descrito anteriormente y se vierte la mezcla precursora en el sistema de medición del reómetro. Luego, se somete la muestra gelificante a una deformación de cizalla oscilatoria de frecuencia fija (1 Hz) y amplitud ($\gamma_0 = 0.001$), haciendo un seguimiento de los módulos viscoelásticos resultantes en función del tiempo y a una temperatura constante de 37°C . Para las muestras magnéticas, se aplica un campo magnético de 15 kA/m durante la gelificación usando una bobina conectada a una fuente de alimentación colocada coaxialmente al eje del reómetro. La amplitud de deformación utilizada en estas medidas es lo suficientemente baja como para garantizar que no se altere la formación de la microestructura del gel.

Por otro lado, se caracterizaron las propiedades mecánicas de los hidrogeles bajo esfuerzos oscilatorios de cizalla utilizando el mismo reómetro provisto de una geometría plato-plato de 35 mm de diámetro y superficies rugosas para evitar el deslizamiento de las muestras (sensor P35 Ti L S dentado, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). De nuevo, la caracterización se realizó a una temperatura constante de 37°C . En primer lugar, se sometieron los hidrogeles a barridos de amplitud de deformación, para los cuales la frecuencia de oscilación se mantuvo constante en 1 Hz y la amplitud de deformación, γ_0 , se incrementó gradualmente de 0.0001 a 2. A partir de estas medidas, se obtienen los valores del módulo de almacenamiento (G') y de pérdidas (G'') en función de γ_0 . Posteriormente, se realizaron barridos de frecuencia, para los cuales la amplitud de deformación se fijó en $\gamma_0 = 0.001$ (dentro de la ZVL), y la frecuencia de oscilación se incrementó gradualmente de 0.1 a 16 Hz. Para analizar el módulo de cizalla (G) de estos hidrogeles, se llevaron a cabo barridos de esfuerzos de cizalla de 0.1 a 300 Pa.

Para los hidrogeles peptídicos, se investigó el comportamiento de autocuración mediante medidas reológicas con el mismo reómetro equipado con una geometría de doble cono-plato (sensor DC60/ 2° Ti L) como se ha descrito para los estudios de gelificación. En este caso, el hidrogel se preparó de acuerdo con el protocolo de preparación descrito en la sección 7.2.1, se rompió con un vortex, se cogió con una jeringa con una aguja de calibre 20G y se inyectó en el sistema de medida del reómetro. La combinación de la agitación del vórtex junto con el esfuerzo producido durante la inyección, condujo a la ruptura completa de la muestra. La muestra se sometió inmediatamente después de ser inyectada a un esfuerzo oscilatorio de cizalla de frecuencia fija (1 Hz) y amplitud de

deformación ($\gamma_0 = 0.001$) mientras se registraban los módulos viscoelásticos resultantes en función del tiempo. Para las muestras magnéticas, se aplicó un campo magnético de 15 kA/m durante la gelificación con una bobina colocada coaxialmente al eje del reómetro.

Además, se caracterizaron las propiedades mecánicas de los hidrogeles híbridos bajo esfuerzos de tracción utilizando un reómetro híbrido Discovery (DHR1, TA Instruments). Para ello, se fijan los hidrogeles con las pinzas del reómetro y se someten a deformaciones axiales crecientes a una velocidad constante de 50 $\mu\text{m/s}$ hasta la rotura de la muestra y a temperatura ambiente. Luego, se analiza el módulo de Young obtenido a partir estos experimentos.

En todos los casos, se usó una muestra fresca para cada prueba y condición experimental, y se realizaron medidas para al menos tres muestras diferentes de la misma condición experimental. En este manuscrito se proporcionan los valores medios correspondientes y el error estándar de los mismos.

7.2.5. Evaluación de la biocompatibilidad *ex vivo*

En todos los procedimientos aquí descritos se esterilizaron todos los reactivos con el fin de llevar a cabo la preparación de los hidrogeles en condiciones estériles. Para los hidrogeles peptídicos, se modificó ligeramente el protocolo de preparación con el fin de incorporar las células, de forma que en lugar de DMEM, se agregaron osteoblastos humanos normales (hOB #35, pase 8) dispersos en α MEM completo. Para ello, se utilizó una densidad de 1 millón de células por pocillo de cultivo (osteoblastos primarios humanos, Lonza, Basilea, Suiza), se agregó α MEM complementado con Hyclone FBS al 10 %, U-Gln (2 mM) y penicilina/estreptomicina (100 U/mL y 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) y se cultivaron las muestras en condiciones de cultivo estándar durante dos períodos de cultivo diferentes de 12 y 38 días. Al final de cada período, se examinaron las muestras después de la tinción con hematoxilina y eosina (HE). Para ello, las muestras se fijaron durante 72 h en formaldehído a temperatura ambiente y luego se incluyeron en parafina; se realizaron secciones de 4 μm de espesor, se desparafinizaron en xileno, se hidrataron, y se tiñeron con HE. La proliferación celular para las muestras seleccionadas se analizó después de la inmunotinción con un anticuerpo contra el antígeno Ki-67 humano (antígeno Ki-67 antihumano monoclonal de ratón, clon MIB-1, de Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.).

Para los estudios de biocompatibilidad *ex vivo* de los hidrogeles híbridos, se cultivó una dispersión de fibroblastos derivados de piel humana (pase 13) de donantes sanos en DMEM en el fondo de pocillos de cultivo a una densidad de 15000 células por pocillo de cultivo y se mantuvo en cultivo durante 24 h. Luego, los hidrogeles se pusieron en contacto con las células cultivadas y se mantuvieron así durante 48h. Finalmente, se retiraron los hidrogeles y las células se sometieron a un ensayo de viabilidad Live/Dead (kit de viabilidad/citotoxicidad; Molecular Probes, Eugene, Oregón, EE. UU.) y un ensayo de sal de tetrazolio soluble en agua (WST-1). En todos los casos, se utilizaron como control hidrogeles donde no se cultivaron células en el fondo del pocillo de cultivo. Además, las células cultivadas en pocillos sin contacto con hidrogeles se utilizaron como control positivo, mientras que las células cultivadas en los pocillos e incubadas con Triton X-100

al 2 % se utilizaron como control negativo. Para el análisis estadístico se estudiaron tres muestras de cada condición. Para realizar el ensayo de viabilidad celular Live/Dead (L/D), los pocillos de cultivo se lavaron tres veces con PBS (5 minutos cada vez) y luego se incubaron con los reactivos de L/D durante 30 minutos. Después, se lavaron de nuevo con PBS y se analizaron con un microscopio invertido de luz y fluorescencia Nikon Eclipse Ti (Nikon) equipado con una cámara digital Nikon DXM 1200c (Nikon). De manera similar, después del cultivo celular y una vez retirados los hidrogeles y el medio, los pocillos de cultivo se lavaron con PBS y luego se incubaron con el reactivo WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) durante 4h a 37°C.

7.2.6. Evaluación de la biocompatibilidad *in vivo*

Primero, tanto la biocompatibilidad de las partículas magnéticas NP1 como de los hidrogeles peptídicos se evaluó en 12 ratones de laboratorio BALB/c. Los animales fueron profundamente anestesiados con ketamina y acepromacina, y se realizaron cuatro inyecciones subcutáneas en cada ratón (una por condición estudiada) que constaban cada una de 300 μ L de (i) solo solución salina (utilizada como control), (ii) NP1 diluidas en solución salina (0.1 % v/v), (iii) hidrogel de FF+RGD (FF/RGD en una proporción de 7:3), e (iv) hidrogel de FF+RGD+NP1 (0.1 % v/v de NP1). Cada animal recibió una inyección de cada uno de los cuatro materiales en diferentes partes del área dorsal, con una separación de 1 cm entre los sitios de implante (ver Figura 7.2a). Se sacrificaron seis animales mediante inyección intraperitoneal de una solución de eutanasia (Eutanax 200, Fatro Ibérica, Barcelona, España) después de 7 o 30 días de seguimiento, y los principales órganos (bazo, hígado, riñón, corazón y pulmón), junto con cada una de las cuatro áreas de inyección, fueron analizados histológicamente. Como control, se utilizó un ratón BALB/c sin implantes para cada uno de los dos períodos de seguimiento.

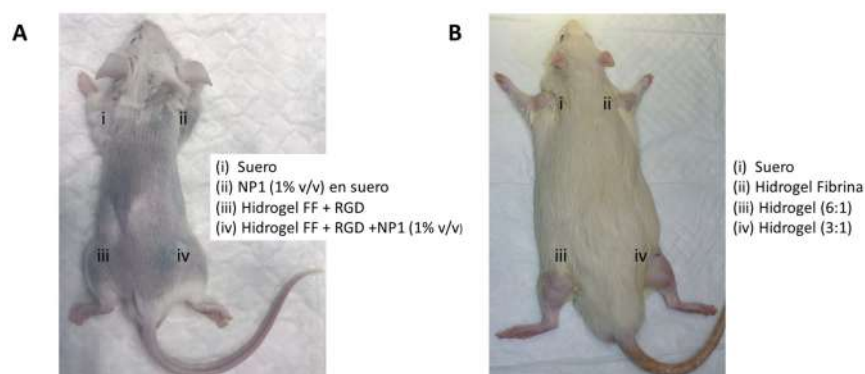


Figura 7.2: Imágenes de los animales utilizados para los ensayos *in vivo* y esquema de la posición y composición de las inyecciones subcutáneas.

De manera similar, se evaluó la biocompatibilidad *in vivo* de los hidrogeles híbridos usando 6 ratas de laboratorio Wistar macho. De nuevo, los animales fueron profundamente anestesiados con ketamina y acepromacina, y se realizaron cuatro inyecciones subcutáneas en cada rata (una por condición estudiada) que constaban cada una de 500 μL de (i) solo solución salina (utilizada como control), (ii) hidrogel de fibrina, (iii) hidrogel de fibrina-péptidos (6:1) (FF/RGD en una proporción de 7:3), e (iv) hidrogel de fibrina-péptidos (3:1) (FF/RGD en una proporción de 7:3). Cada animal recibió una inyección de cada uno de los cuatro materiales en diferentes partes del área dorsal (ver Figura 7.2b). Se sacrificaron tres animales mediante inyección intraperitoneal de una solución de eutanasia (Eutanax 200, Fatro Ibérica, Barcelona, España) después de 7 o 21 días de seguimiento, y los principales órganos junto con cada una de las cuatro áreas de inyección fueron analizados histológicamente.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Hidrogeles magnéticos basados en péptidos

Caracterización microestructural

Se estudió mediante microscopía TEM la morfología de las fibras de los hidrogeles de péptidos de Fmoc-FF (en adelante, Fmoc-FF = FF) y FF/Fmoc-RGD (en adelante, Fmoc-RGD = RGD) para muestras con y sin NP1. Estudios previos de TEM del péptido FF y de la mezcla FF/RGD han mostrado la presencia de fibras largas y en forma de cintas de diámetros que van de 10 a 150 nm, y varios micrómetros de longitud [192, 220, 234]. Como se ve en la Figura 7.3, las imágenes TEM del péptido FF (Figura 7.3a) muestran fibras similares a las expuestas anteriormente y similares a las que se muestran en la Figura 7.3b correspondientes a la mezcla FF/RGD, de acuerdo con los resultados de Zhou *et al.* [220]. Por último, la incorporación de NP1 en ambos casos (Figura 7.3c,d) no modifica apreciablemente la morfología de las fibras cuando se incluyeron [27].

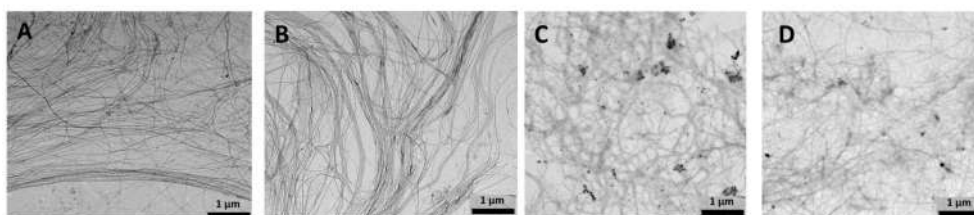


Figura 7.3: Imágenes representativas de TEM para los hidrogeles de (a) Fmoc-FF, (b) Fmoc-FF/Fmoc-RGD, (c) Fmoc-FF + NP1, (d) Fmoc-FF/Fmoc-RGD + NP1.

Caracterización mecánica

Primero, se estudiaron las cinéticas de gelificación de los hidrogeles haciendo un seguimiento de la evolución de los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') en función del tiempo. Como se observa en la Figura 7.4a, G' aumenta de forma brusca desde el inicio de la medida y continúa aumentando después de unos minutos de forma más suave y progresiva, lo que puede deberse a una formación rápida del hidrogel. De hecho, como se muestra en la Figura 7.4b para las curvas de las tangentes de pérdidas ($\tan(\delta) = G''/G'$) frente al tiempo, las mezclas presentan características similares a las de un gel desde el comienzo de las medidas. Cabe señalar que $0.1 < \tan(\delta) < 1$ es un intervalo típico de geles débiles, mientras que los geles fuertes presentan valores de $\tan(\delta) < 0.1$. Por lo tanto, estas muestras exhiben un comportamiento límite entre geles débiles y fuertes con una cinética de gelificación similar entre las distintas condiciones.

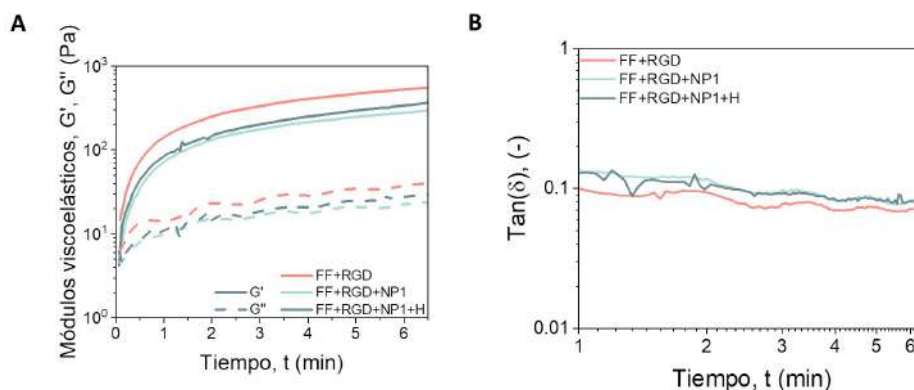


Figura 7.4: Curvas representativas (a) del módulo de almacenamiento (G') y (b) de la tangente de pérdidas en función del tiempo de gelificación de los hidrogeles.

También se caracterizaron las propiedades mecánicas de los hidrogeles bajo esfuerzos oscilatorios de cizalla después de la gelificación completa. En la Figura 7.5a, se observan dos regiones identificables para los barridos de amplitud. Por un lado, la zona viscoelástica lineal (ZVL), caracterizada por valores de G' y G'' prácticamente independientes de la amplitud de deformación y con $G' > G''$, tal y como se espera para materiales con comportamiento de tipo gel. Por otro lado, a valores más altos de la amplitud de deformación, G'' aumenta hasta un valor máximo, conocido como punto de fluencia, mientras que G' disminuye constantemente. Estos cambios de tendencia marcan el inicio de la segunda región denominada zona viscoelástica no lineal (ZVNL). Dentro de la ZVNL, los módulos viscoelásticos disminuyen notablemente en relación con la destrucción de la red supramolecular y, finalmente, se produce la transición a un comportamiento similar al líquido ($G' < G''$). Además, como se observa en la Figura 7.5b, los barridos de frecuencia ($\gamma_0 = 0.001$, dentro de la ZVL) muestran tendencias casi independientes de la frecuencia para G' , comportamiento típico de geles densamente reticulados; mientras que G'' muestra una tendencia débil a aumentar hasta una frecuencia de 4 Hz y luego disminuye. Por último, de la comparación de los módulos viscoelásticos para diferentes muestras (Figura 7.5c) se concluye que los hidrogeles de FF son los más débiles desde

el punto de vista mecánico (valores más pequeños de G' y G'' dentro de la ZVL) y la adición de RGD resulta en una ligera mejora, mientras que la adición de NP1 mejora notablemente la dureza de los hidrogeles al producir un aumento de G' y G'' de casi 7 veces. El efecto en las propiedades mecánicas de la inclusión de partículas sólidas en la formulación de hidrogeles poliméricos es bien conocido. Así, el fortalecimiento mecánico de los hidrogeles proviene de cambios en la reticulación o en la microestructura de la red polimérica, bien debido a la inclusión de las partículas sólidas, o bien por una combinación de todos estos efectos [22, 27, 32, 235], tal y como se ha comprobado en capítulos anteriores de esta tesis doctoral. Sin embargo, la aplicación de un campo magnético durante la gelificación (muestra FF+RGD+NP1+H) resulta en una gran disminución de G' y G'' en comparación con las muestras con NP1 gelificadas en ausencia de campo magnético (muestra FF+RGD+NP1).

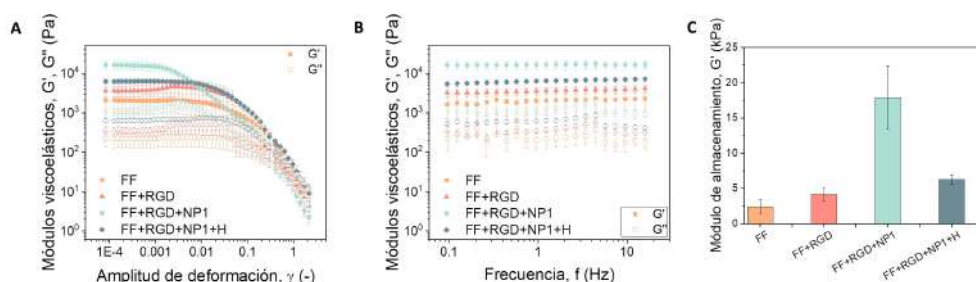


Figura 7.5: (a) Barridos de amplitud de deformación, (b) barridos de frecuencia, y (c) valores medios de los módulos viscoelásticos en la ZVL para los distintos hidrogeles peptídicos. Los datos representan los valores medios y los errores estándar de al menos tres medidas independientes para cada condición.

Finalmente, se estudió si los hidrogeles recuperan sus características de gel tras ser inyectados a través de una jeringa. Para ello, se inyectaron los hidrogeles directamente en el sistema de medida del reómetro y se hizo un seguimiento de la evolución de los módulos viscoelásticos en función del tiempo. En la Figura 7.6a se observa que todas las condiciones muestran un aumento constante de G' tras la inyección, aunque sólo la muestra gelificada en presencia de campo magnético alcanza valores de G' del mismo orden de magnitud que antes de ser inyectada. Para otras muestras no sujetas a un campo magnético durante el paso posterior a la inyección, el módulo de almacenamiento después de 120 min de autocuración es casi dos órdenes de magnitud menor que antes de la inyección. Esta recuperación incompleta de la elasticidad de los hidrogeles después de la inyección también es evidente en las curvas $\tan(\delta)$. Como se observa en la Figura 7.6b, los valores de $\tan(\delta)$ son apreciablemente superiores a 0.1 y, por lo tanto, típicos de geles débiles, especialmente en los tiempos más cortos y para muestras no sujetas a un campo magnético en el paso posterior a la inyección, en contraste con los valores de $\tan(\delta) \approx 0.1$ observados en las cinéticas de gelificación (Figura 7.4b). Aunque los valores previos a la inyección no se recuperaron por completo, los hidrogeles mostraron una clara autocuración.

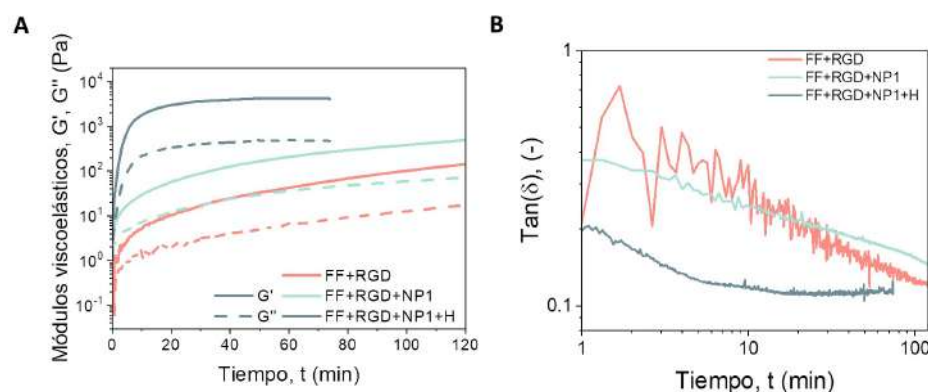


Figura 7.6: Curvas representativas (a) del módulo de almacenamiento (G') y (b) de la tangente de pérdidas, en función del tiempo de autocuración de los hidrogeles tras ser inyectados.

Evaluación de la biocompatibilidad *ex vivo*

Se prepararon cultivos celulares 3D de osteoblastos en las distintas condiciones de este estudio con el fin de analizar la biocompatibilidad *ex vivo* de los hidrogeles de péptidos a dos tiempos de cultivo diferentes. Debe tenerse en cuenta que los hidrogeles de péptidos sin partículas magnéticas no se pudieron evaluar a los 38 días de cultivo celular puesto que se degradaron por completo. En la Figura 7.7 se muestran los resultados de los experimentos con tinción HE, los cuales revelaron un aumento estadísticamente significativo en el número de células vivas entre los días 12 y 38 de cultivo. La presencia de NP1 y/o RGD pareció tener un efecto positivo en la supervivencia o proliferación de los osteoblastos para ambas condiciones temporales. Este efecto positivo del RGD en cultivos celulares no es sorprendente, ya que se sabe que es un promotor de la adhesión celular [220, 236]. Con respecto al papel de las NP1, y de acuerdo con varios estudios previos, cuando se agregan partículas magnéticas a los soportes poliméricos para aplicaciones de ingeniería tisular, se estimulan la adhesión, proliferación y diferenciación de células *in vitro* e incluso formaciones óseas *in vivo* [56, 57, 237]. Además, es importante notar que en este trabajo, la proliferación celular en los distintos tipos de hidrogeles estudiados está correlacionada con las propiedades mecánicas de los mismos, de forma que se observa un mayor número de células vivas cuanto mayor es el valor de G' . Este resultado no es sorprendente, ya que las propiedades mecánicas del medio condicionan la viabilidad celular. De hecho, unas propiedades mecánicas adecuadas suelen considerarse una característica esencial para la biocompatibilidad de los biomateriales [238]. Por lo tanto, los resultados mostrados en este capítulo parecen indicar que la mejora en la proliferación celular de los hidrogeles magnéticos se debió, al menos parcialmente, a las mejores propiedades mecánicas de los mismos.

Además, se utilizó una tinción inmunohistoquímica para analizar la expresión del antígeno Ki-67, una proteína que se expresa durante las fases activas del ciclo celular, y contrastar así los resultados de proliferación celular en los hidrogeles de péptidos. De los resultados de este ensayo se infiere que a los 38 días de cultivo celular, entre el 15 y el 20 % de las células se encontraban en fases activas del ciclo celular para los hidrogeles

magnéticos en general. En conjunto, estos resultados respaldan aún más la idea de que los hidrogeles de péptidos que contienen partículas magnéticas son adecuados para promover el crecimiento de osteoblastos.

En experimentos separados, se cuantificó el ADN liberado por los fibroblastos cultivados en hidrogeles de FF + RGD después de 24 h, 72 h y 1 semana de cultivo celular. Los resultados mostraron una liberación de ADN de 566.2 ± 178.47 ng/ μ L en fibroblastos cultivados durante 24 h en presencia de estos hidrogeles, 628.76 ± 192.95 ng/ μ L a las 72 h y 439.55 ± 159.41 ng/ μ L pasada una semana. Estos hallazgos confirman la presencia de células dentro de los hidrogeles después de diferentes períodos de cultivo celular y sugieren que pudieron proliferar dentro de los hidrogeles. En este sentido, trabajos previos de nuestro grupo demostraron que las células permanecían viables y podían proliferar dentro de hidrogeles que contenían partículas magnéticas, según lo determinado por la cuantificación del ADN y la actividad del WST-1 [36, 239].

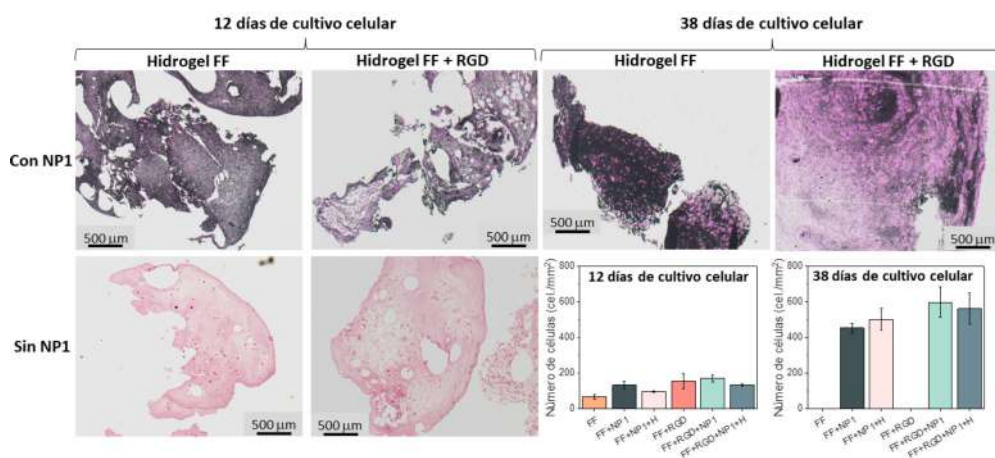


Figura 7.7: Tinción con hematoxilina y eosina. Los puntos rosas brillantes representan células. Las áreas de color rosa pálido son los hidrogeles que no contienen nanopartículas magnéticas (NP1). Los hidrogeles que contienen NP1 son en su mayoría de color oscuro. Debe tenerse en cuenta que los hidrogeles que no contienen NP1 se degradaron por completo a los 38 días de cultivo celular, lo que imposibilitó realizar análisis histoquímicos. Las fotografías son imágenes representativas de cada condición experimental. Los datos de los gráficos representan los valores medios $\pm$ los errores estándar del recuento de células de cuatro secciones transversales diferentes de un solo hidrogel.

Evaluación de la biocompatibilidad *in vivo*

En primer lugar, se usaron métodos histológicos para analizar los cinco órganos principales (bazo, hígado, riñón, corazón y pulmón), y se encontró que los implantes no estaban asociados con alteraciones estructurales significativas en ningún órgano después de 1 semana y 1 mes de seguimiento *in vivo* (Figura 7.8a). La estructura histológica del bazo era compatible con un órgano normal en todos los casos, con abundantes células linfoides organizadas en pulpa blanca y pulpa roja como se conoce para el bazo normal. El análisis del hígado reveló la presencia de numerosos hepatocitos formando lobulillos normales alrededor de una vena central. En el riñón se encuentran abundantes corpúsculos renales y tubos colectores sin alteraciones detectables. El análisis histológico del corazón mostró una estructura normal consistente en cardiomiocitos interconectados, y la estructura del pulmón también era compatible con un órgano normal, con abundantes alvéolos revestidos por neumocitos aplanados en todos los animales. Por tanto, ninguno de los órganos mostró signos microscópicos de migración de partículas magnéticas o alteraciones detectables. Estos resultados sugieren que las partículas y los diferentes hidrogeles analizados aquí eran seguros para el animal huésped y no estaban asociados con ningún efecto secundario sistémico.

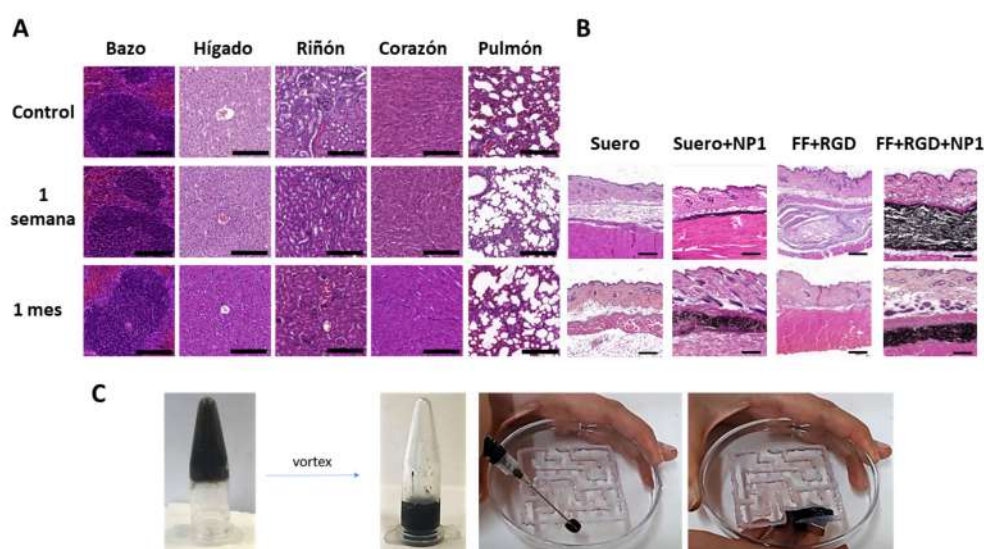


Figura 7.8: Análisis histológico con tinción de hematoxilina y eosina de (a) cinco órganos principales en ratones (bazo, hígado, riñón, corazón y pulmón) y (b) la zona del implante, una semana y un mes después de la inyección *in vivo*. Barra de escala, 200 μ m. Las fotografías son imágenes representativas de cada condición experimental. (c) Prueba de inyectabilidad. Imagen de un hidrogel magnético formado en un tubo Eppendorf antes y después de la rotura por vortex. A continuación se muestra el hidrogel magnético inyectado y conducido a través de un laberinto con un imán.

En segundo lugar, se analizaron las zonas del implante para buscar efectos locales de cada condición inyectada. Como se encontró en los estudios hematológicos e

histológicos de los órganos, ninguno de los ratones inyectados mostró signos histológicos de inflamación, necrosis, infección, tumorigénesis o hemorragia ni una semana y ni un mes tras ser inyectados, lo que confirma la biocompatibilidad de estas partículas e hidrogeles (Figura 7.8b). Debe tenerse en cuenta también que no se observaron signos de corrosión de las NP1 en ninguna de las condiciones estudiadas. Las imágenes de la zona donde se inyectó la solución salina son compatibles con un tejido subcutáneo normal, que consiste en tejido conjuntivo fibroso y adipocitos. Las zonas dorsales donde se inyectaron NP1 dispersas en solución salina muestran una capa subcutánea delgada donde las NP1 ocupan un área relativamente grande de tejido subcutáneo. No obstante, no se observaron partículas en otras estructuras circundantes, observándose el encapsulamiento de las NP1 por el tejido conectivo denso tras un mes de seguimiento. En las zonas inyectadas con FF + RGD, se encontró que tras una semana los hidrogeles eran detectables en la zona del implante, formando una estructura fibrilar homogénea en el tejido subcutáneo donde fueron inyectados, mientras que tras un mes la muestra se reabsorbió por completo. Cuando los hidrogeles FF + RGD + NP1 se implantaron por vía subcutánea, permanecieron encapsulados en la zona donde se inyectaron y no se dispersaron a los tejidos circundantes, tanto después de una semana como después de un mes de seguimiento. Así mismo, el análisis morfométrico preliminar de las muestras de control y los tejidos injertados con los diferentes biomateriales no mostró diferencias significativas entre los grupos en tamaño celular, tamaño nuclear o densidad nuclear.

Finalmente, los resultados de los análisis *in vivo* también brindan información valiosa sobre la estabilidad de las NP1 en los hidrogeles y su biodistribución en animales. La estabilidad es un parámetro clave relacionado con la biocompatibilidad y, en este sentido, los resultados de este trabajo sugieren que las NP1 permanecen estables dentro del hidrogel y no migran a otros tejidos o estructuras. Específicamente, se detectaron NP1 en la zona de la inyección, donde se encapsularon, pero no en tejidos periféricos ni en órganos distales. Además, el análisis de los órganos principales no reveló signos de migración de las partículas, lo que es consistente con los resultados de los análisis de sangre, y sugiere que la función se conservó en estos órganos principales.

Por otro lado, como se observa en la Figura 7.8c, ni los hidrogeles magnéticos ni los no magnéticos muestran signos apreciables de separación de fases tras ser inyectados. Además, la aplicación de un campo magnético sin contacto permite el desplazamiento controlado de los hidrogeles magnéticos a través de un laberinto sin que se observe una separación de fases, lo cual es potencialmente útil en aplicaciones biomédicas con el fin de rellenar lesiones internas o de liberar y dispersar cargas de forma completa en un área interna específica. En trabajos previos se demuestra que los hidrogeles fluidificantes pueden utilizarse como plataformas para el suministro de células a través de su inyección para posibles aplicaciones *in vivo* [74, 209–211]. En los experimentos desarrollados en este capítulo, se corrobora que los hidrogeles magnéticos supramoleculares estudiados aquí, también podrían usarse para este propósito con un daño celular mínimo durante la inyección, junto con la característica adicional de la capacidad de activación magnética sin contacto.

7.3.2. Hidrogeles híbridos de fibrina y péptidos

Caracterización físicoquímica

En primer lugar, las imágenes SEM de los hidrogeles de fibrina y fibrina-péptidos (Figura 7.9a,b) muestran una red tridimensional porosa formada por fibras. Ambos hidrogeles, con y sin péptidos en su composición, mostraron una estructura interna y una morfología de las fibras muy similar, lo que indica que los péptidos están bien integrados en las fibras de fibrina. Sin embargo, se observa un aumento de la porosidad cuando se incluyen péptidos en la composición de los hidrogeles. Así, se puede observar claramente que en la Figura 7.9a aparece una mayor densidad de fibras, en comparación con la red de la Figura 7.9b. Por tanto, la inclusión de péptidos en la composición, mejora la porosidad de los hidrogeles sin cambiar la estructura interna de la fibrina.

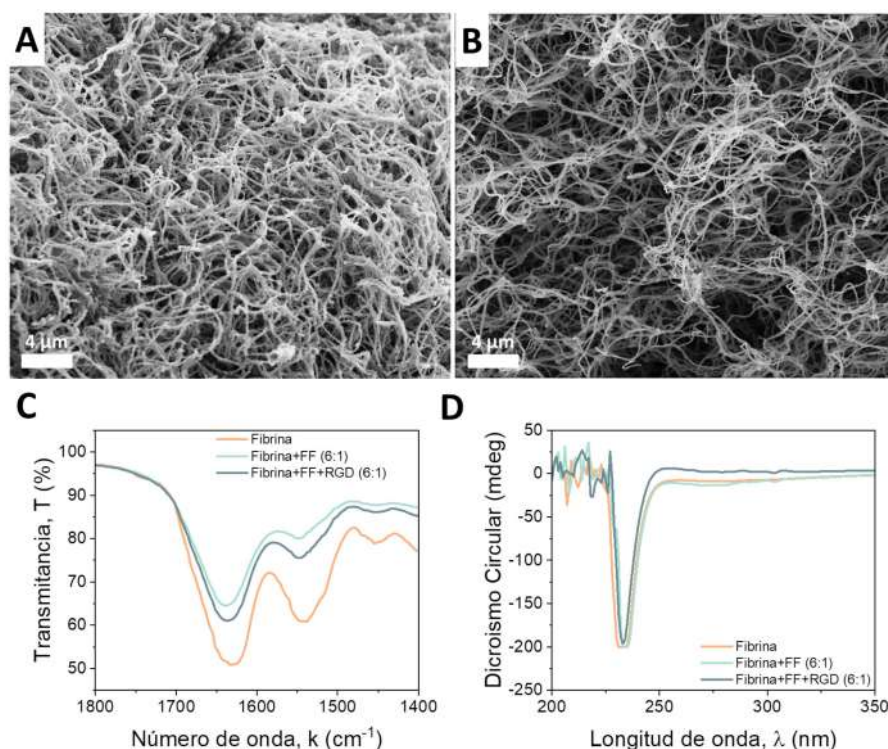


Figura 7.9: Imágenes representativas de SEM de un hidrogel de (a) fibrina y (b) fibrina+FF+RGD (6:1). Espectros de (c) FTIR y (d) CD de hidrogeles de fibrina y fibrina-péptidos (6:1).

Los espectros de FTIR (Figura 7.9c) y de CD (Figura 7.9d) mostraron un análisis adicional de la estructura secundaria de estos hidrogeles, así como la capacidad de la fibrina y los péptidos para interactuar entre sí. La espectroscopía FTIR de los hidrogeles de fibrina-péptidos mostró espectros prácticamente superpuestos para todas las mezclas y casi idénticos a los espectros de fibrina solos (Figura 7.9c), los cuales exhiben bandas intensas de amida I en 1633 cm^{-1} y amida II en 1541 cm^{-1} . Estas bandas de amidas

corresponden a la formación de estructuras de tipo lamina beta originadas por la fibrina. Los geles constituidos por la mezcla fibrina-péptidos conservaron estas dos bandas prácticamente inalteradas, lo cual sugiere que la integración de la fibrina con los péptidos origina fibras en forma de laminas β muy similares a las formadas por la fibrina sola, como puede apreciarse en las imágenes de TEM. De igual modo, los espectros de CD de los hidrogeles de fibrina-péptidos son casi idénticos a los espectros del hidrogel de fibrina sola. En todos los casos, los espectros presentaron una banda principal negativa en la región ultravioleta lejana alrededor de 235 nm. Este resultado es consecuente con lo observado mediante FTIR, considerando que estos péptidos, similares a las proteínas, presentan bandas de CD en la región ultravioleta lejana (210-240 nm) derivadas principalmente de los grupos amida y relacionadas con la estructura secundaria de las fibras.

Por tanto, el análisis de los datos obtenidos por SEM, FTIR y CD son todos concordantes si se considera que los péptidos están interactuando con la fibrina, dando lugar a fibras de similares características morfológicas en forma de lamina beta.

Caracterización mecánica

Se estudiaron los cambios de masa y altura de los distintos hidrogeles tras la aplicación de diferentes fuerzas normales, utilizando para ello la geometría plato-plato del reómetro Haake Mars III. En la Figura 7.10a, se puede observar que en general la masa inicial de los hidrogeles que incluyen péptidos es ligeramente más alta que los de fibrina sola. Esta tendencia se mantiene tras la aplicación de las diferentes fuerzas normales, siendo las diferencias entre las distintas condiciones mayores a medida que aumenta la fuerza normal, con la única excepción de los hidrogeles de fibrina-péptidos que incluyen Fmoc-RGD y para las fuerzas normales más bajas. En la Figura 7.10b se observa una situación similar para la altura de los hidrogeles, mientras que en este caso las diferencias entre los hidrogeles de fibrina y los hidrogeles híbridos que incluyen péptidos es aún mayor. Estos resultados concuerdan con el aspecto macroscópico de los hidrogeles (Figura 7.10c-e), ya que se observa que los hidrogeles de fibrina-péptidos presentan una mejor consistencia que los que solo contienen fibrina. Esto también está relacionado con las imágenes de microscopía SEM, ya que la mayor porosidad dada por la presencia de los péptidos puede hacer que los hidrogeles retengan más líquido y muestren mayor masa, mejor consistencia y mayor resistencia a una fuerza externa. Esto puede deberse al carácter polianiónico de los péptidos Fmoc-FF, que a pH fisiológico pueden estar parcialmente ionizados. La repulsión electrónica puede ser la responsable de la mayor porosidad en estos geles y de la mayor retención de agua.

Se siguió la evolución de los módulos de almacenamiento (G') y pérdidas (G'') en función del tiempo para estudiar las cinéticas de gelificación de los hidrogeles. En todos los casos, se observó un fuerte aumento de los módulos viscoelásticos relacionado con una formación de gel rápida, así como un carácter similar a gel al comienzo de los experimentos, seguido de un aumento más lento después de unos minutos relacionado con la formación completa del gel. Así, para tiempos de gelificación bajos, se obtienen geles débiles con valores de $\tan(\delta) = G''/G'$ entre 1 y 0.1. Además, las curvas de la tangente de pérdidas evidencian que la gelificación completa de los hidrogeles de fibrina

es más rápida en comparación con aquellos que contienen péptidos en su composición. Sin embargo, los hidrogeles de fibrina presentan valores finales de $\tan(\delta) \approx 0.1$, mientras que los hidrogeles de fibrina-péptidos presentan valores de $\tan(\delta) < 0.1$, lo que corresponde a un comportamiento típico de geles fuertes en comparación con los de fibrina sola (Figura 7.11a).

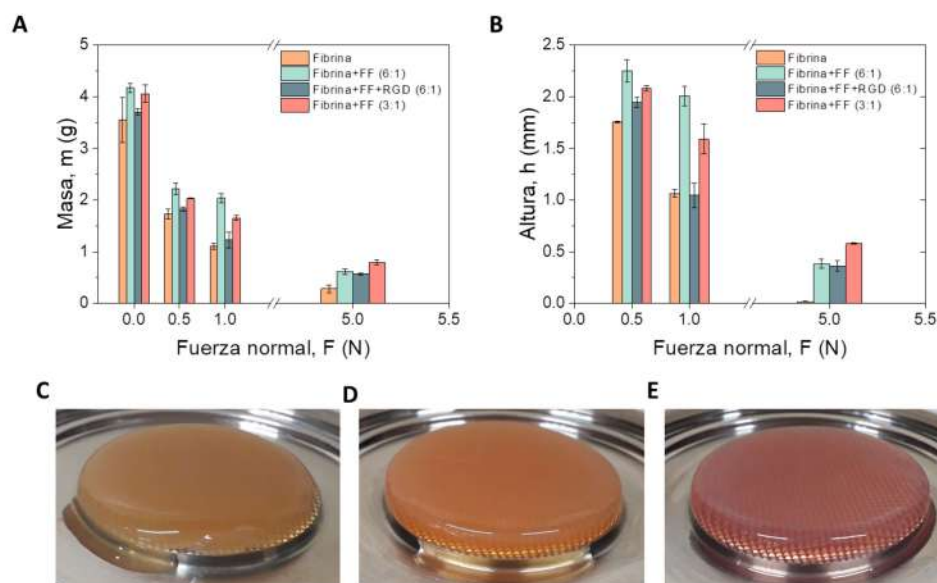


Figura 7.10: (a) Masa y (b) altura de los hidrogeles tras la aplicación de una fuerza normal dada. Apariencia macroscópica de un hidrogel recién preparado de (c) fibrina, (d) fibrina+FF (6:1), y (e) fibrina+FF (3:1).

También se caracterizaron las propiedades mecánicas de los hidrogeles híbridos bajo esfuerzos oscilatorios de cizalla después de la gelificación completa de los mismos. Mientras que los hidrogeles frescos (recién preparados, sin nanoestructurar) muestran pequeñas diferencias en sus valores medios del módulo de almacenamiento (G') dentro de la zona viscoelástica lineal (ZVL), después de la compresión plástica, los hidrogeles nanoestructurados que contienen péptidos en su formulación alcanzan valores de G' de un orden de magnitud mayor que los de fibrina sola (Figura 7.11b). Además, el módulo de cizalla (G) de estos hidrogeles va desde 0.13 kPa para los hidrogeles nanoestructurados de fibrina hasta 16 kPa para los que contienen péptidos, es decir, la inclusión de los péptidos en la formulación mejora el módulo de cizalla de los hidrogeles nanoestructurados en dos órdenes de magnitud (Figura 7.11c). De hecho, en comparación con los hidrogeles de fibrina-agarosa analizados en trabajos previos [130], que alcanzan valores de G' y G en torno a 5 kPa y 3 kPa, respectivamente, para la mayor concentración de agarosa (0.5 %), los hidrogeles de fibrina-péptidos nanoestructurados presentan una mejora considerable en las propiedades mecánicas. Finalmente, se analizaron las propiedades mecánicas de los hidrogeles bajo esfuerzos estáticos de tracción para obtener el módulo de Young (E) de cada hidrogel, tanto frescos como nanoestructurados. En la Figura 7.11d, se observa

ahora cómo el módulo de Young disminuye cuando se incluyen péptidos para el caso de los hidrogeles frescos, mientras que se obtuvieron valores más similares entre ellos y más altos después de la nanoestructuración. Debe tenerse en cuenta que se obtuvieron valores altos de $E \approx 100$ kPa para los hidrogeles híbridos de fibrina+FF a proporción (6:1) e incluso más altos para aquellos que incluyen Fmoc-RGD en esa proporción.

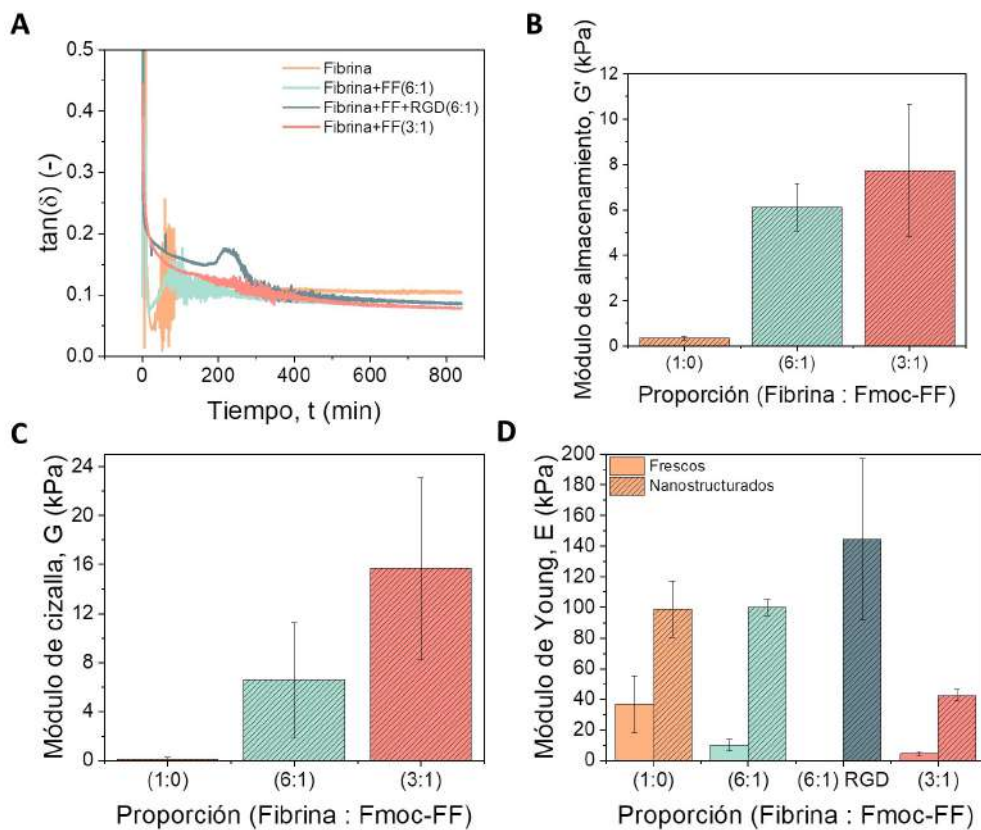


Figura 7.11: (a) Tangente de pérdidas en función del tiempo de gelificación de los distintos hidrogeles. Valores medios (b) del módulo de almacenamiento (G') dentro de la ZVL y (c) del módulo de cizalla (G) para los distintos hidrogeles nanoestructurados. (d) Módulo de Young (E) para los distintos hidrogeles antes y después de la nanoestructuración.

Evaluación de la biocompatibilidad *ex vivo*

Para el análisis de la biocompatibilidad *ex vivo* de los hidrogeles, se realizaron cultivos celulares 2D de fibroblastos en pocillos de cultivo que se pusieron en contacto con los diferentes grupos experimentales durante 48 h. A partir del análisis L/D de las muestras, quedó claro que la inclusión de Fmoc-RGD en la formulación de los hidrogeles híbridos de fibrina y péptidos resulta en un gran aumento en el número de células vivas (Figura 7.12a,b), en comparación con aquellos hidrogeles híbridos que contienen solo el péptido Fmoc-FF en su composición. De hecho, la adición de Fmoc-FF (sin Fmoc-RGD) resultó en una reducción del número de células vivas con respecto a los cultivos celulares del control positivo y a los que estaban en contacto con hidrogeles de fibrina —obsérvese que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los hidrogeles de fibrina y el control positivo. Así, la presencia de Fmoc-RGD en la formulación de los hidrogeles de fibrina-péptidos resultó en un aumento del número de células vivas con respecto a las muestras que no contenían Fmoc-RGD. Como ya se comentó en la sección anterior, el efecto positivo del Fmoc-RGD en los cultivos celulares no es sorprendente, ya que se sabe que es un promotor de la adhesión celular [220, 236]. Con respecto al papel de los péptidos, los mejores resultados del ensayo *ex vivo* se obtuvieron para aquellos hidrogeles en los que los péptidos se encuentran en una pequeña proporción (6:1) con respecto a la fibrina.

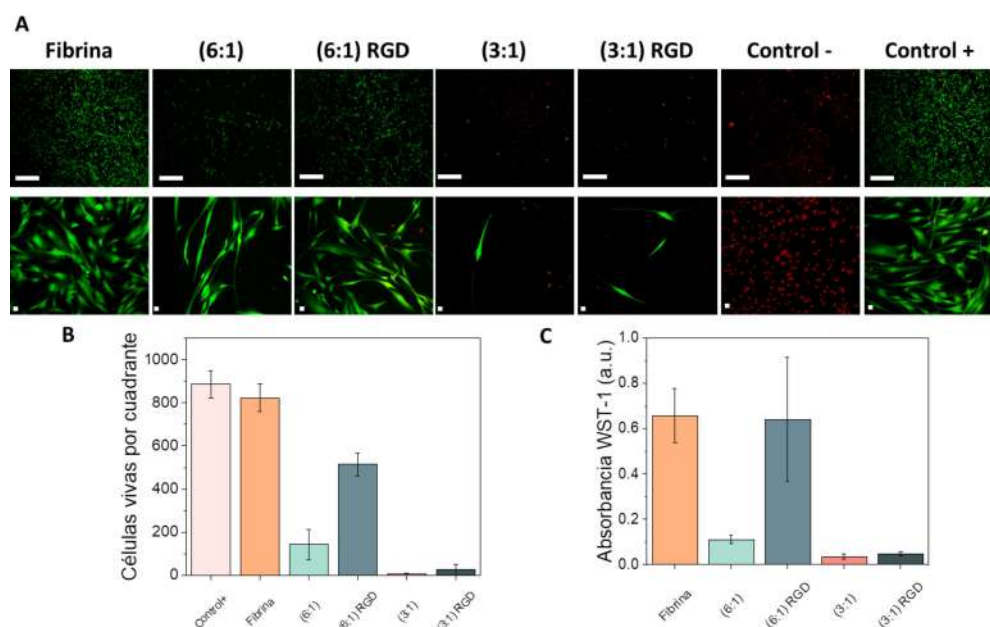


Figura 7.12: (a) Imágenes de microscopía de las células en los ensayos de Live/Dead. Barra de escala 200 μm . Análisis estadístico de (b) el número de células vivas en los ensayos de Live/Dead y (c) los ensayos de WST-1.

Para analizar más a fondo la biocompatibilidad de los hidrogeles, se llevaron a cabo ensayos basados en la transformación colorimétrica de la sal de tetrazolio (WST-1) en formazán impulsada por la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas, que es directamente proporcional al número de células viables (es decir, metabólicamente activas). Los resultados de la Figura 7.12c demuestran que no existen diferencias estadísticas entre los hidrogeles de fibrina y los hidrogeles de fibrina-péptidos (6:1) que contienen Fmoc-RGD. Por el contrario, los hidrogeles de fibrina-péptidos (6:1) sin Fmoc-RGD y los hidrogeles de fibrina-péptidos en proporción (3:1) redujeron considerablemente la viabilidad celular. Aun así, la inclusión de Fmoc-RGD mejora la viabilidad celular en las dos proporciones estudiadas de hidrogeles híbridos, comparadas con aquellos geles que incluyen solo el péptido Fmoc-FF. Nuevamente, los mejores resultados para la viabilidad de los hidrogeles híbridos de fibrina-péptidos se obtuvieron en los casos en los que los péptidos estaban presentes en una pequeña proporción en comparación con la fibrina. Por lo tanto, la inclusión de una pequeña cantidad de péptidos en la formulación de hidrogeles híbridos crea un ambiente adecuado para la viabilidad de las células y una gran mejora en sus propiedades mecánicas. Debe tenerse en cuenta que no solo la biocompatibilidad, sino también la estructura interna y las propiedades mecánicas adecuadas se consideran características esenciales de los biomateriales para un potencial uso en aplicaciones biomédicas [238].

Evaluación de la biocompatibilidad *in vivo*

Para determinar la biocompatibilidad *in vivo* de los hidrogeles híbridos, se inyectaron por vía subcutánea en ratas de laboratorio las distintas condiciones estudiadas. Para ello, se inyectaron las mezclas precursoras recién preparadas de forma subcutánea y gelificaron en el lugar del implante. Se comprobó que las distintas mezclas precursoras gelificaban una vez inyectadas en placas petri a modo de prueba. Pasadas unas horas tras el paso por la jeringa, todas las condiciones formaron geles en las placas petri donde fueron inyectadas. Los animales implantados no mostraron signos detectables de alteraciones sistémicas determinadas por pruebas hematológicas. Además, se analizaron tanto los órganos principales como las zonas del implante para buscar efectos locales de cada condición inyectada pasadas 1 y 3 semanas de la inyección. En ningún caso se encontró rastro de los hidrogeles inyectados en las zonas del implante, los cuales se degradaron con el tiempo. Por tanto, estos resultados preliminares sugieren que los diferentes hidrogeles analizados eran seguros para el animal huésped y no estaban asociados con ningún efecto secundario sistémico.

7.4. Conclusiones

Se prepararon y estudiaron nuevos hidrogeles inyectables basados en péptidos que muestran propiedades físicas mejoradas para aplicaciones biomédicas. Para ello, se siguieron dos estrategias de preparación diferentes: (i) hidrogeles magnéticos supramoleculares que combinan péptidos de cadena corta y partículas magnéticas; (ii) hidrogeles híbridos formados por una combinación de fibrina y péptidos.

En el primer caso, la inclusión de partículas magnéticas en la matriz supramolecular mejoró significativamente las propiedades mecánicas y la estabilidad de los hidrogeles y, al mismo tiempo, permitió la inyectabilidad a través de un proceso de fluidificación por cizalla y autocuración. Estas propiedades físicas hacen que los materiales probados aquí sean candidatos ideales y versátiles para numerosas aplicaciones biomédicas. Se probaron estos hidrogeles como soportes para el crecimiento 3D de osteoblastos y los resultados demostraron que no solo promueven el crecimiento celular, sino que además no se degradan después de 30 días de cultivo. La inyectabilidad de estos biomateriales se evaluó *in vivo* mediante inyecciones subcutáneas en ratones. Se demostró que estos hidrogeles permanecen localizados en el área de inyección sin degradarse hasta un mes después de la administración. Durante este tiempo, los hidrogeles no produjeron toxicidad y promovieron el crecimiento celular y la migración celular a través de la matriz de hidrogel. Además, como propiedad adicional de estos hidrogeles se encuentra la capacidad de movilización en respuesta a fuerzas magnéticas sin contacto. Por tanto, los hidrogeles magnéticos analizados en este capítulo también son candidatos potenciales para atrapar y administrar cargas sensibles, como células, con una vía de administración mínimamente invasiva.

Por otro lado, la combinación de un polímero (en este caso, fibrina) con péptidos de cadena corta para dar hidrogeles híbridos, aumentó la consistencia y la resistencia a fuerzas externas, así como mejoró considerablemente las propiedades mecánicas y estructurales, en comparación con aquellos hidrogeles formados solo por polímeros como la fibrina o fibrina-agarosa. Además, se probó la biocompatibilidad *ex vivo* de estos hidrogeles híbridos para el crecimiento de fibroblastos y los resultados demostraron que una proporción adecuada entre la fibrina y los péptidos conlleva una adecuada viabilidad y proliferación celular para su uso en aplicaciones como la ingeniería tisular. Por último, se evaluó la inyectabilidad de los hidrogeles híbridos *in vivo* mediante inyecciones subcutáneas en ratas de laboratorio. Se demostró que se puede inyectar una mezcla precursora de estos hidrogeles y que en unas pocas horas gelifica en la zona del implante. Los hidrogeles se degradaron en menos de una semana sin producir toxicidad.

Parte IV

Capítulo 8.

Conclusiones

El objetivo principal de este trabajo ha sido la preparación de hidrogeles magnéticos inyectables, basados en péptidos de cadena corta y/o en polímeros, que tengan una microestructura y propiedades mecánicas adecuadas para su uso en aplicaciones tecnológicas y biomédicas como matrices extracelulares para medicina regenerativa e ingeniería tisular. Para ello, se ha sintetizado un amplio espectro de hidrogeles magnéticos supramoleculares y poliméricos, se ha analizado el efecto de la inclusión de distintos tipos de partículas magnéticas con diferentes funcionalizaciones, se ha conseguido controlar la estructura interna de los hidrogeles cambiando la naturaleza de las fibras y la disposición de las mismas, y se han estudiado las propiedades mecánicas resultantes. Esta tesis se ha dividido en cuatro partes, de las cuales:

La **primera** parte de la tesis consistió en la funcionalización de partículas de hierro para su posterior uso como fase magnética en hidrogeles de alginato y de péptidos. Las principales conclusiones de esta primera parte de la tesis son las siguientes:

1. Ha sido posible modificar la superficie de partículas de hierro micro- y nanométricas introduciendo una serie de funcionalizaciones en su superficie, que van desde grupos amina hasta grupos fenilo.
2. Ha sido posible mejorar las propiedades macroscópicas (integridad) y mecánicas (módulos viscoelásticos) de los hidrogeles de alginato gracias a las interacciones del polímero con la superficie funcionalizada de las micropartículas de hierro, especialmente aquellas con grupos amina.
3. Debido a la interacción atractiva entre los grupos carboxilo del péptido Fmoc-FF y los grupos amina protonados de las partículas recubiertas con APTES, se obtienen hidrogeles supramoleculares de péptidos con mejores propiedades mecánicas que aquellos en los que se funcionalizan las partículas con PEG.
4. La funcionalización de la superficie de las partículas es crucial a la hora de determinar la toxicidad de las mismas, lo cual influye a su vez en la posterior biocompatibilidad de los hidrogeles magnéticos para su uso en aplicaciones biomédicas.

5. La falta de una funcionalización química superficial adecuada limita la interacción entre las partículas magnéticas y las fibras del hidrogel. Por tanto, la correcta funcionalización de las partículas se puede utilizar para la modulación de las propiedades finales de los hidrogeles magnéticos resultantes.

En la **segunda** parte de la tesis se han estudiado hidrogeles magnéticos basados en alginato. Para ello, se dividió el trabajo en tres apartados: (i) hidrogeles isotrópicos de alginato (con una dispersión homogénea de la fase magnética), (ii) hidrogeles anisótropos de alginato (con una estructuración interna de la red y/o la fase magnética), (iii) aplicaciones de los hidrogeles magnéticos de alginato. Las principales conclusiones derivadas de esta segunda parte de la tesis son las siguientes:

1. Ha sido posible obtener hidrogeles de alginato magnéticos macroscópicamente homogéneos que contienen una fracción de volumen de partículas de hierro micrométricas de hasta 0.33, mediante un protocolo de preparación de dos pasos.
2. Los resultados experimentales han demostrado una gran mejora de los módulos viscoelásticos con la concentración de partículas magnéticas.
3. Se ha demostrado que el comportamiento de la dependencia de los módulos viscoelásticos con la concentración de partículas se ve fuertemente influenciado por la formación de agregados de partículas, cuyo volumen es mayor que el volumen total de las partículas individuales, encontrando una ecuación empírica que ajusta esta dependencia.
4. Los hidrogeles magnéticos desarrollados presentan un intenso aumento de los módulos viscoelásticos con la intensidad del campo magnético aplicado, especialmente para altas fracciones de volumen de partículas magnéticas. Los agregados de partículas formados en la etapa de preparación de los hidrogeles de alginato isotrópicos podrían estar detrás de este efecto.
5. Se han preparado hidrogeles anisótropos de alginato siguiendo dos procedimientos distintos: (i) procesos de deshidratación parcial controlada; (ii) aplicación de campos magnéticos externos. Se han investigado dos procesos de deshidratación parcial controlados por esfuerzos para crear la anisotropía deseada, caracterizados por el tipo de esfuerzo aplicado durante la deshidratación: esfuerzo de tracción o compresión.
6. Los procesos de deshidratación parcial dan como resultado cambios apreciables en la disposición de los polímeros a nivel microscópico y que se correlacionan con cambios en las propiedades mecánicas macroscópicas de los hidrogeles.
7. Las propiedades mecánicas de los hidrogeles están influenciadas no sólo por la pérdida de agua y la concentración final del polímero, sino también por el protocolo de deshidratación, que parece inducir la formación de nuevos enlaces estables entre las fibras del polímero como consecuencia de la deshidratación bajo esfuerzos.
8. La anisotropía se puede lograr fácilmente en hidrogeles magnéticos mediante la aplicación de un campo magnético externo, creando estructuras de partículas alineadas a nivel microscópico, y evitando así los problemas derivados de la deshidratación parcial de los hidrogeles en cuanto a posible pérdida de porosidad.

9. Es posible preparar actuadores isótropos basados en hidrogeles de alginato con forma de cruz y de gusano, cuyas partes magnéticas se flexionan progresivamente con ángulos mayores conforme aumenta la intensidad de campo magnético aplicado. Es posible obtener una mejor respuesta de flexión para el hidrogel en forma de cruz al aumentar la concentración de partículas.
10. La alineación de las partículas magnéticas en forma de cadenas y la anisotropía en el hidrogel resultante permiten obtener distintos movimientos complejos, lo que es una ventaja para la aplicación de estos materiales como actuadores magnéticos blandos. Es crucial a la hora de obtener movimientos complejos una combinación adecuada de la morfología del hidrogel con la disposición de las partículas en su interior.
11. Es posible inyectar los hidrogeles de alginato magnéticos mediante la adaptación del protocolo de preparación, lo que aporta a estos materiales la capacidad de implementarse *in vivo*.

La **tercera** parte de la tesis se dedica al estudio de hidrogeles basados en péptidos de cadena corta. Para ello, se ha llevado a cabo un análisis exhaustivo del proceso de formación de estos hidrogeles mediante el coensamblaje de distintos dipéptidos. Después, se han desarrollado hidrogeles basados en péptidos para su uso en aplicaciones biomédicas. Las principales conclusiones de esta tercera parte de la tesis son las siguientes:

1. Se ha evaluado el comportamiento de coensamblaje del Fmoc-FF en presencia de diferentes dipéptidos con grupos Fmoc- y Nap- en agua y a temperatura ambiente. Estos péptidos tienen una fuerte tendencia a interactuar entre sí en disolución a pH alto para formar estados intermedios híbridos que son responsables de la composición final de las fibras.
2. La sustitución parcial de Fmoc-FF por otros dipéptidos resulta en una fuerte mejora del módulo de almacenamiento de los mismos.
3. La relación de proporción entre ambos monómeros determina la cinética de autoensamblaje y la disposición de ambos monómeros dentro del copolímero. La gran tendencia de estos dipéptidos a formar coensamblajes abre la puerta a desarrollar una variedad de copolímeros supramoleculares con diferentes características y geles que también tienen propiedades novedosas, ampliando el alcance e interés de estos materiales blandos.
4. La inclusión de partículas magnéticas en la matriz supramolecular mejoró significativamente las propiedades mecánicas y la estabilidad de los hidrogeles peptídicos y, al mismo tiempo, fue posible su inyectabilidad a través de un proceso de fluidificación y autocuración.
5. Estos hidrogeles de péptidos se usaron como soportes para el crecimiento 3D de osteoblastos, y los resultados demostraron que no solo promueven el crecimiento celular, sino que además no se degradan después de 30 días de cultivo.

6. La inyectabilidad de los hidrogeles de péptidos se evaluó *in vivo* mediante inyecciones subcutáneas en ratones. La inclusión de partículas magnéticas permitió que los hidrogeles permanecieran localizados en el área de inyección sin degradarse hasta un mes después de la administración. Durante este tiempo, los hidrogeles no produjeron toxicidad y promovieron el crecimiento celular y la migración celular a través de la matriz de hidrogel.
7. La posibilidad de controlar los hidrogeles magnéticos de péptidos de forma remota mediante fuerzas magnéticas sin contacto, los hace candidatos potenciales para atrapar y administrar cargas sensibles, como células, con una vía de administración mínimamente invasiva.
8. La mezcla de fibrina y péptidos mejora significativamente la estructura interna y las propiedades mecánicas de los hidrogeles de fibrina o de otras mezclas previamente estudiadas como fibrina-agarosa.
9. Una proporción adecuada entre la fibrina y los péptidos conlleva una adecuada viabilidad y proliferación celular para su uso en ingeniería tisular. Además, es posible inyectar una mezcla precursora de estos hidrogeles que gelifique en la zona del implante. Los hidrogeles se degradaron en menos de una semana sin producir toxicidad.

Por último, en la **cuarta** parte se exponen las principales conclusiones derivadas de esta tesis doctoral, así como un resumen en inglés.

Capítulo 9.

Summary and conclusions

Part of the content of this chapter was published in:

- C. Gila-Vilchez, A. B. Bonhome-Espinosa, P. Kuzhir, A. Zubarev, J. D. G. Duran, M. T. Lopez-Lopez. Rheology of magnetic alginate hydrogels, *Journal of Rheology*, **62**, 1083-1096, 2018.
- C. Gila-Vilchez, M. C. Mañas-Torres, R. Contreras-Montoya, M. Alaminos, J. D. G. Duran, L. Álvarez de Cienfuegos, M. T. Lopez-Lopez. Anisotropic magnetic hydrogels: design, structure and mechanical properties, *Phil. Trans. R. Soc. A*, **377**, 20180217, 2019.
- C. Gila-Vilchez, J. D. G. Duran, F. Gonzalez-Caballero, A. Zubarev, M. T. Lopez-Lopez. Magnetorheology of alginate ferrogels, *Smart Materials and Structures*, **28**, 035018, 2019.
- M. Barczak, P. Borowski, C. Gila-Vilchez, M. Alaminos, F. González-Caballero, M. T. López-López. Revealing importance of particles' surface functionalization on the properties of magnetic alginate hydrogels, *Carbohydrate Polymers*, **247**, 116747, 2020.
- M. C. Mañas-Torres, C. Gila-Vilchez, J. D.G. Durán, M. T. Lopez-Lopez, L. Álvarez de Cienfuegos. Biomedical applications of magnetic hydrogels, in *Magnetic Nanoparticle-Based Hybrid Materials*, Elsevier, pp. 253-271, 2021.
- M. C. Mañas-Torres, C. Gila-Vilchez, F. J. Vazquez-Perez, P. Kuzhir, D. Momier, J. Scimeca, A. Borderie, M. Goracci, F. Burel-Vandenbos, C. Blanco-Elices, I. A. Rodriguez, M. Alaminos, L. Álvarez de Cienfuegos, M. T. Lopez-Lopez. Injectable Magnetic-Responsive Short-Peptide Supramolecular Hydrogels: Ex Vivo and In Vivo Evaluation, *ACS Applied Materials and Interfaces*, **13**, 49692-49704, 2021.
- C. Gila-Vilchez, M. C. Mañas-Torres, J. A. González-Vera, F. Franco-Montalban, J. A. Tamayo, F. Conejero-Lara, J. M. Cuerva, M. T. Lopez-Lopez, A. Orte, L. Álvarez de Cienfuegos. Insights into the co-assemblies formed by different aromatic short-peptides amphiphiles, *Polymer Chemistry*, **12**, 6832-6845, 2021.
- C. Gila-Vilchez, M. C. Mañas-Torres, V. Carriel, L. Álvarez de Cienfuegos, M. Alaminos, M. T. Lopez-Lopez, O. D. García-García (2022). *Hydrogel suitable to produce artificial tissues*. European patent, EP22382231.3.
- C. Gila-Vilchez, L. Rodriguez-Arco, M. C. Mañas-Torres, L. Álvarez de Cienfuegos, M. T. Lopez-Lopez. Self-assembly in magnetic supramolecular hydrogels, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Under review.
- M. Barczak *et al.* Introducing amine groups to the surface of iron nanoparticles to modulate properties of supramolecular peptide-based magnetic hydrogels, *In progress*.
- A. Leon-Cecilla, C. Gila-Vilchez, L. Álvarez de Cienfuegos, M. T. Lopez-Lopez. Fabrication of anisotropic alginate hydrogels through a simple stress-controlled dehydration process: relationship between microstructure and mechanical properties, *In progress*.

9.1. Introduction

9.1.1. Magnetic hydrogels

Hydrogels are defined as three-dimensional networks (3D) formed by flexible polymer chains dispersed in an aqueous medium [1]. From a fundamental point of view, hydrogels are unique systems that combine a high porosity with a mechanical behavior typical of an elastic solid. Due to their flexibility, soft consistency, high water content and the versatility of their mechanical properties, hydrogels are used for various applications in technology and biomedicine, some of them already commercially exploited [1–8]. In fact, as long as biocompatibility is adequate, hydrogels mimic the extracellular matrix of living tissues better than any other type of synthetic biomaterial [1,9].

Current basic research in this field focuses mainly on hydrogels that respond to stimuli such as temperature, chemicals or pH, changing their properties in response to them [14]. An important category among these intelligent gels consists of magnetic gels (or ferrogels), which from the structural point of view consist of dispersions of magnetic micro or nanoparticles embedded within a hydrogel [18–22]. Due to their composition, magnetic hydrogels combine in a single material the paramagnetic behavior provided by the particles with the flexibility provided by the matrix. These are therefore of particular interest in many applications from the technological and biomedical point of view.

The properties of magnetic hydrogels depend on several factors, including the type of gelling agent and magnetic particles used, the concentration of the gelling agent and magnetic particles, and the size and distribution of the magnetic particles within the hydrogels. In addition, magnetic particles are solid substrates that can be coated and functionalized for different purposes. The chemical nature of the coating layer can modulate the interactions between particles and polymer filaments that form hydrogels, which has a direct impact on the final properties of the resulting hydrogels [22]. In fact, magnetic particles with a suitable chemical surface can conjugate drugs, proteins, enzymes, antibodies or nucleotides that would be used in numerous technical and biomedical applications.

However, despite the advances made, new magnetic hydrogels that are capable of modifying, to a large extent, or reversibly modulating their mechanical properties, are needed. In addition, understanding how to control cell organization and vascularization accurately in complex tissue constructions is still in a preliminary state. Finally, it is desirable that hydrogels are injectable, since injectability is the main requirement to implement minimally invasive surgical methods. Note that an injectable gel must also have a microstructure that favors cell proliferation. Thus, obtaining new hydrogels with these characteristics would be a very important advance.

9.1.2. Magnetic hydrogels applications

The increasing use of hydrogels as drug delivery vehicles (Figure 9.1) is explained by their biocompatibility and ability to easily modify their physical and chemical properties. Hydrogels can be designed with different pore sizes, can allow the administration of several drugs simultaneously, create hydrophobic or hydrophilic environments and contain nanoparticles [48,49]. All of these factors change the way and speed of the drug release. In addition, magnetic particles can act as a drug delivery vehicle. Some of the advantages of magnetic hydrogels are that they can be used to control drug delivery by applying an external magnetic field [23], adjusting the drug release profile [51, 52], the remote control of the frequency and the intensity of the applied magnetic field improves the drug administration capacity [53].

Likewise, hydrogels are ideal materials for the development of tissue substitutes to repair or rebuild tissues and organs in the field of tissue engineering [1]. Recent studies indicate that when magnetic materials are used in tissue engineering, the presence of magnetic particles (with a diameter of approximately 50–100 nm) stimulates the adhesion, proliferation and differentiation of cells *in vitro* and even bone formation *in vivo* [56–59]. In addition, external magnetic fields can be applied to magnetic hydrogels to control the assembly and microstructure, creating complex tissue constructions [61] and to organize cellular tissues [62]. Moreover, the application of cyclic magnetic fields produces mechanical stresses that mimic the biological behavior of some tissues [64].

Finally, injectable hydrogels are increasingly important in biomedicine (Figure 9.1). The interest is based on the fact that injectability is one of the main requirements for carrying out minimally invasive procedures, particularly in tissue engineering and drug delivery applications. There are two main alternatives for the administration of the hydrogel by a syringe: (i) *in situ* gelling hydrogels [71–73]; (ii) shear-thinning hydrogels (tixotropics) [74, 75]. Unfortunately, despite efforts to improve injectable hydrogels, the development of robust injectable magnetic hydrogels is an ongoing challenge.

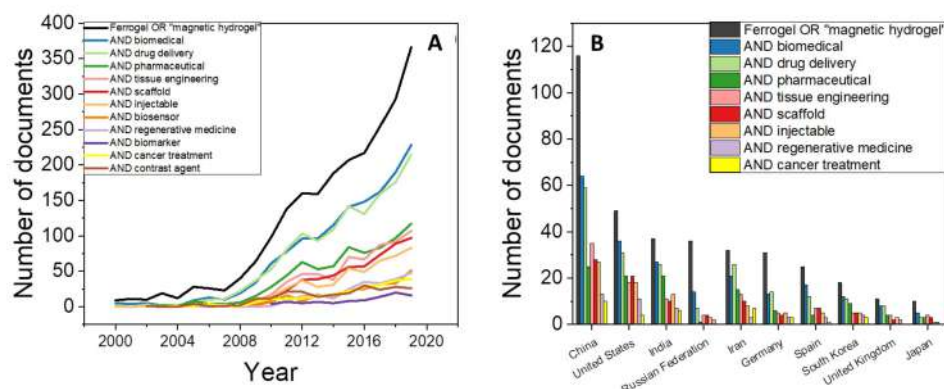


Figure 9.1: Number of documents related to magnetic hydrogels and their biomedical applications published (a) by year (2000 - 2021) and (b) by country in 2019. Source: SCOPUS database.

The main objective of this work was the preparation of injectable magnetic hydrogels, based on short-chain peptides and/or polymers, having a microstructure and mechanical properties suitable for their use in both, technological and biomedical applications, in the creation of extracellular matrices for regenerative medicine and tissue engineering. To this end, a broad spectrum of peptide and polymeric magnetic hydrogels was synthesized, the effect of the inclusion of different types of magnetic particles with different functionizations was analyzed, the internal structure of the hydrogels was controlled by changing the nature of the fibres and their arrangement, and the resulting mechanical properties was studied.

9.2. Functionalization and characterization of the magnetic phase

In this work, we determined the role of the surface functionalization of iron particles in the properties of alginate-based and peptide-based magnetic hydrogels. To do this, micron-sized silica-coated iron particles (Fe-CC) and bare nanosized iron particles (nFe) were taken as the starting magnetic phase. These control particles were later functionalized with different functional groups including hydroxyl, amine, glycidoxyl, phenyl and thiocyanate. The different functionalizations affected the chemical interaction between the hydrogel matrix and the surface of the iron particles in different ways, contributing to the appearance of various microstructures, mechanical properties and biocompatibility of the resulting hydrogels.

9.2.1. Materials and methods

Functionalization of iron particles

Micrometric silica-coated iron particles (Fe-CC, MP0) were used as magnetic phase (BASF, Germany). They consist of spherical particles of $1.4 \pm 0.6 \mu\text{m}$ in diameter, $7.71 \pm 0.19 \text{ g/cm}^3$ of density and a typical paramagnetic behavior with saturation magnetization $M_S = 1587 \pm 2 \text{ kA/m}$. To carry out the functionalization, 2 g of MP0 particles were placed in a vial and mixed with 40 mL of absolute ethanol, previously acidified with 0.57 mL of hydrochloric acid (HCl) 1.75 M. The suspension was sonicated for 5 minutes and 1 mmol of the corresponding organo-functional alcoxylane (APTES, TMSPD, PTES, GPTMS, PATES or TCTES) was added. Then, the suspension was subjected six times to the following sequence: 5 minutes of sonication and 25 minutes of agitation. Finally, the particles were separated from the solution by a magnet, washed twice with absolute ethanol and dried overnight at 40°C .

Iron nanoparticles (nFe, NP0), supplied by BASF (Germany), were coated with three different functionalizations using a microemulsion method. They consist of nanometric spherical particles with a diameter of $90 \pm 30 \text{ nm}$ and a saturation magnetization $M_S = 1521 \pm 15 \text{ kA/m}$. To functionalize these particles with PEG, 100 mg of NP0 nanoparticles were dispersed in 7.5 mL of Milli-Q water and sonicated for 1 minute. Then, 500 mg of PEG-400 were added and homogenized by sonication for 7 minutes. Separately, an oily phase consisting of 225 mL of n-hexane, 75 mL of mineral oil and 400 μL of sorbitan sesquioleate, was prepared. Subsequently, the water and oil phases are mixed in a new vial and sonicated for 5 minutes to obtain a microemulsion of water in oil. Finally, 75 mL of glutaraldehyde was added under mechanical stirring to initiate PEG polymerization. After 2 hours with strong mechanical stirring, functionalized nanometric particles were separated by magnet washed repeatedly with ethanol and n-hexane before drying at room temperature. In the case of particles functionalized with PEG' and APTES, the same protocol was followed but adding 90 % PEG-400 and 10 % in weight of the other compound, PEG' or APTES.

The numbering of the samples together with the organo-functional alkoxyane used in each case for their synthesis is shown in the table 9.1.

Preparation of magnetic hydrogels

For the preparation of alginate magnetic hydrogels using micron-sized iron particles, sodium alginate (MW:20-40 kDa, Sigma Aldrich) was dissolved in distilled water to prepare a 1 % w/v solution. Then, 9 mg of calcium carbonate (CaCO_3 , Sigma Aldrich) was added to 6 mL of this solution and vortexed for 1 minute. Afterwards, 32 mg of D-glucono- δ -lactone (GDL, Sigma Aldrich) was added and the mixture was vortexed again for 1 min. The solution was then left in a closed vial for 90 min at room temperature. After that time, the gelling mixture was vortexed (1 min) and the necessary volume was transferred to the Eppendorf vial containing the iron particles to reach the required final concentration of 0.9 % v/v. The mixture was subjected to the following steps to properly disperse the particles in the gel: (i) vortex - 1 min, (ii) sonication - 5 min, (iii) vortex - 1 min. Finally, the mixture was transferred to an open vial and remained in a water-saturated atmosphere until the gelling process was completed.

For the preparation of peptide hydrogels using nanosized iron particles, N-fluorenylmethoxycarbonyl diphenylalanine (Fmoc-FF, Bachem Co.) was weighted in a vial and Milli-Q water was added to obtain a final concentration of 0.3 % w/v. This suspension was sonicated in cold water for 20 minutes. Then, a sodium hydroxide solution (NaOH, Sigma Aldrich) 0.5 M (10 μL) was added, using a micropipette and sonicating for 1 minute after the addition of each drop, until a transparent solution ($\text{pH} \sim 10.6$) was obtained. The magnetic phase was then added to a concentration of 0.3 % v/v and homogenized by sonication for 5 minutes. Then, 20 μL of a solution of GDL 200 mg/mL was added and homogenized by vortex for 5 seconds to start the gelation process. Finally, the mixture was transferred to the measuring plate and an external magnetic field of 15 kA/m was applied during the first hour of gelation. The hydrogels were allowed to stand overnight in a water-saturated atmosphere at room temperature to ensure complete gelation.

Physico-chemical and mechanical characterization of the iron particles and magnetic hydrogels

Scanning electron microscopy (SEM) images of iron particles were made under high vacuum conditions by means of a Quanta3DFEG FEI microscope with an acceleration voltage of 5/20 kV. The microscopic structure of the selected alginate hydrogels was analyzed using a FEI Quanta400 ESEM, while for peptide hydrogels a FEI Quanta650F with a cryostatic system (cryo-SEM) was used.

To determine the pH of the surface, 0.1 g of iron particles were suspended in 50 mL of water and stabilized overnight before measurement. The zeta potential was evaluated using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). To do this, the suspensions were prepared by dispersing 5 mg of iron particles into 2 mL of KCl 1 mM.

The rheological properties of magnetic alginate hydrogels were determined at room temperature using a MCR 300 magnetorheometer (Physica, Anton Paar) with a plate-plate geometry of 20 mm diameter. The rheological properties of magnetic peptide hydrogels were determined at a constant temperature of 25.0 ± 0.1 °C using a Haake MARS III rheometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with a plate-plate geometry of 35 mm diameter. The linear viscoelastic region (LVR) of the hydrogels studied in both cases was determined by undergoing amplitude sweep tests at a constant frequency of 1 Hz and gradually increasing the shear strain amplitude, γ_0 . From these measurements the values of the storage (G') and loss (G'') moduli were determined as a function of γ_0 together with the average values of G' and G'' within the LVR. Frequency sweep tests were performed at a fixed shear strain amplitude ($\gamma_0 = 0.03\%$ and $\gamma_0 = 0.02\%$, respectively) within the LVR, and increasing frequency from 0.15 to 15 Hz.

Cell viability assessments

In order to evaluate the cytotoxicity of the magnetic hydrogels, cell viability assessments were carried out, and cell cultures of human fibroblasts in contact with the different samples for 48 hours were analyzed. First, the viability of fibroblasts was analyzed using functional tests (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics, Germany) based on the colorimetric transformation of tetrazolium salt (WST-1) in formazan driven by the mitochondrial dehydrogenase activity of living cells. The absorbance of the colorimetric reaction of each sample was measured in triplicate with an Assay UVM 340 spectrophotometer. To determine the structural integrity of the cultured cells, the total DNA released corresponding to each condition was quantified with a UV-vis NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) spectrophotometer. Finally, the Live/Dead viability tests were analyzed. Representative images of human fibroblasts were taken using a Nikon A1R fluorescence microscope (Nikon) and the images were analyzed using the NIS-Elements software package.

9.2.2. Results and discussion

Characterization of the iron particles

According to the SEM images, the MP0 sample was composed of spherical particles of multiple sizes and often forming aggregates. After functionalization, the particles remained unchanged; with the only exception of the MP6 sample, where the formation of a complex or corrosion was observed. In fact, thiocyanates are considered highly corrosive to iron and steel [83,84] and can also form red complexes with iron. From the point of view of biomedical applications, effective corrosion inhibition is very important due to the permanent contact of iron particles with different physiological fluids. Therefore, functional groups that accelerate corrosion cannot be used in such applications regardless of their functional utility.

Nanometric iron particles (NP0) have a bare surface. Based on previous work in which supramolecular peptide hydrogels were prepared with this type of coated PEG particles

[27], we studied the cases in which a small amount of PEG and heterobifunctional PEG was added so that the number of hydroxyl functional groups changed, as well as it was combined with amine groups by the addition of APTES. It was intended to study how the functional group affects the interaction of magnetic particles with the peptides that form the supramolecular structure of the hydrogel, since hydroxyl groups provide better hydrophilia, while amine groups improve interaction with the peptide. For this type of particles, we see in the SEM images that the NP0 sample was composed of polydisperse spherical particles that form aggregates. After functionalization, the particles remained unchanged, with the only appearance of the PEG and/or APTES layer covering them completely.

Surface pH and zeta potential values also vary from sample to sample, demonstrating the significant changes in the chemical character of the surface that occur during functionalization. As can be seen in the table 9.1, in the case of the MP1 and MP2 samples the zeta potential values move significantly towards more positive values, probably due to the presence of protonated amine groups. In contrast, for sample MP4 the zeta potential value is slightly negative, due to the presence of π electrons of the phenyl rings introduced during functionalization. Likewise, in the case of the NP3 sample, the zeta potential moves towards more negative values with respect to the NP0 and the functionalizations with PEG. Changes in pH values are more subtle; however, even these small changes show that the surface of the magnetic particles is different in each case.

Tabla 9.1: Chemical and structural properties of the functionalized iron particles.

Sample	Monomer	Functional group	pH	ζ (mV)
MP0	-	-	5.80 ± 0.05	~ 7
MP1	APTES	I° amine	4.70 ± 0.03	~ 20
MP2	TMPMT	I° and II° amine	5.20 ± 0.03	~ 20
MP3	GPTMS	glycydoxy	5.60 ± 0.05	~ 3
MP4	PTES	phenyl	5.20 ± 0.02	~ -1
MP5	PATES	aminophenyl	5.80 ± 0.04	~ 9
MP6	TCTES	thiocyanato	6.30 ± 0.07	~ 3
NP0	-	-	6.50 ± 0.12	~ 26
NP1	PEG-400	hydroxyl	6.30 ± 0.03	~ 26
NP2	PEG-400/PEG'	hydroxyl	5.80 ± 0.02	~ 22
NP3	PEG-400/APTES	hydroxyl/I° amine	6.70 ± 0.08	~ 10

Structural characterization of the magnetic hydrogels

Magnetic alginate hydrogels retained the shape of the mold used for their preparation. All ferrogels were black, although with different macroscopic appearance: the hydrogels with MP1, MP2 and MP5 were very homogeneous, while in the case of the remaining samples a partial separation of the water was observed after 24 h. In the case of hydrogel with MP6, the structure collapsed and the color changed due to the formation of red complexes with iron and/or progressive corrosion. Figure 9.2 shows that there were notable differences between the binding forms of alginate fibres to the surface of the

microparticles. In the case of MP0 and MP4, a characteristic network similar to a spider net was visible and it was connected only to some specific points on the surface of the microparticles (marked with pink circles in Figure 9.2). However, most of the surface was bare due to inadequate chemical functionalization. In the case of hydrogels with particles MP1 and MP2 (i.e., particles with an abundance of amine groups on the surface), the microparticles were surrounded by alginate, without significant formation of spider-web-like structures, but cover most of the surface of the microparticles (marked with blue circles).

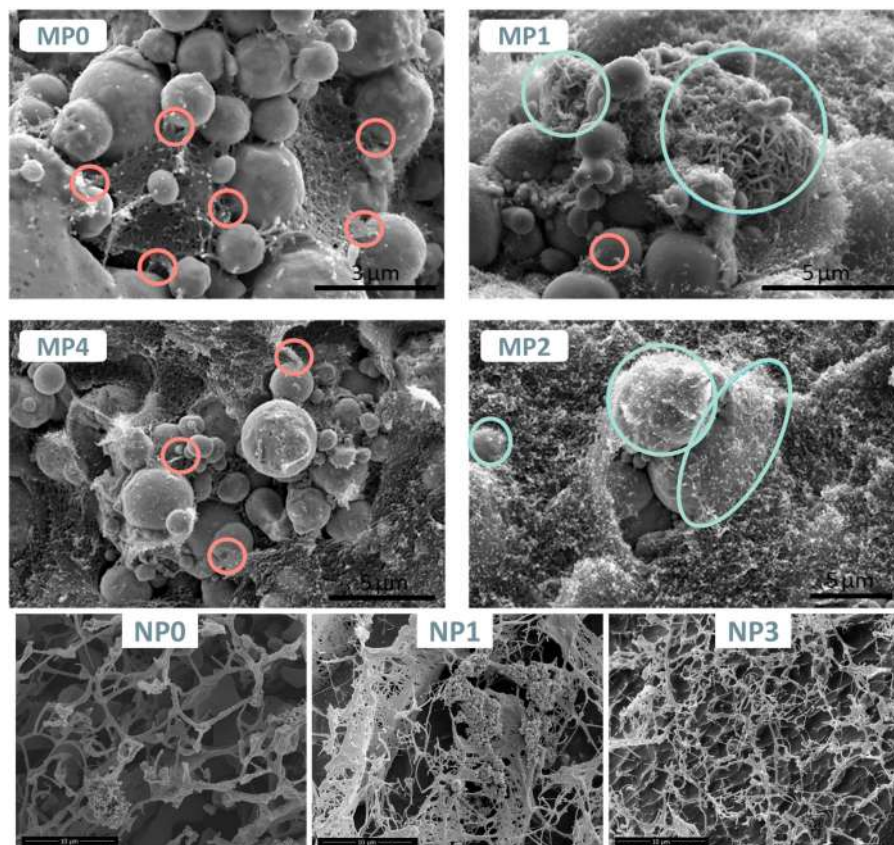


Figura 9.2: SEM images of selected magnetic hydrogels. Pink circles show net-like junctions at a single point, while blue circles show multipoint junctions of microparticles with the alginate network.

Magnetic peptide hydrogels showed a homogeneous, black macroscopic appearance due to the presence of magnetic particles. In all cases the particles were well trapped in the supramolecular network, no leakage of particles to the outside and no color changes were observed in the medium due to corrosion for any of the cases in which the particles were functionalized (NP1, NP2 and NP3) even several months after its preparation. However, non-functional magnetic particles (NP0) do show an oxidation of the surface. All SEM images (Figure 9.2) show that the particles tend to clump together forming

aggregates that are trapped in the network, so that they are coated by the peptide fibers around them. In fact, the bulging morphology of peptide fibers when observed in detail accounts for the fact that smaller particles that are not forming aggregates have been completely coated within the fibers. However, no major changes in the overall network morphology were observed depending on the type of particle functionalization.

Rheological characterization of the magnetic hydrogels

Figure 9.3 shows the average values of G' within the LVR for the different conditions under study. For alginate hydrogels, the observed differences in average values of G' without applied magnetic field (Figure 9.3a) are significant for hydrogels with MP1, MP2 and MP5 particles compared to MP0. However, for hydrogels with MP3 and MP4 particles, no significant differences were observed compared to MP0. These results agree with the differences in adhesion between polymer chains and particles observed by SEM (Figure 9.2), and clearly demonstrate the critical role of proper iron particle functionalization in controlling the final mechanical properties of the resulting hydrogels. In addition, as shown in Figure 9.3b, in the presence of the magnetic field there appears a strong increase of the viscoelastic moduli due to the reorganization of the particles, which was not hindered by the elastic matrix of the alginate hydrogel, and therefore the internal structure of the hydrogel. Similarly, Figure 9.3c shows that in the case of NP1 and NP2 samples, that is, the samples functionalized with PEG and therefore with hydroxyl groups, average values of G' are lower than those of the control group NP0. In contrast, particles functionalized with APTES give supramolecular peptide hydrogels with better mechanical properties, since values similar to those containing NP0-type particles are obtained.

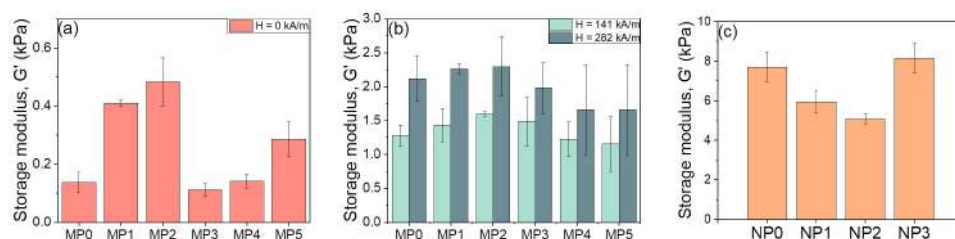


Figure 9.3: Comparison of average values of G' within the LVR for the different types of hydrogels (a) alginate-based in the absence of magnetic field, (b) alginate-based with applied magnetic field during measurement, and (c) supramolecular peptides without applied magnetic field.

Cell viability assessments

Finally, cell viability tests were carried out for the selected magnetic alginate hydrogels. As can be seen in Figure 9.4a, the number of live cells was significantly reduced for all the alginate magnetic hydrogels studied compared to the control group cells. The most important thing is that differences are observed between the hydrogels under study: in the case of the MP0 sample, no dead cells were observed, while in the case of the MP4 sample, a significant number of dead cells were found in some images. Statistical analysis of WST-1 functional tests (Figure 9.4b) showed significant differences between hydrogels with MP0 and MP4 particles but not between MP0 and MP2. This means that the amine groups present on the surface of the MP2 sample do not result in lower cell viability. In contrast, functionalization with phenyl groups (sample MP4) makes the resulting hydrogel less biocompatible. It can therefore be concluded that the biocompatibility of magnetic hydrogels also depends on the surface chemistry of functionalized microparticles. These results are confirmed by the analysis of free DNA quantification, showing statistically significant differences between all the samples compared. As can be seen in Figure 9.4c, hydrogel with MP4 particles was associated with higher levels of cell damage and DNA release to the culture medium, while hydrogels with MP0 and MP2 showed much better biocompatibility.

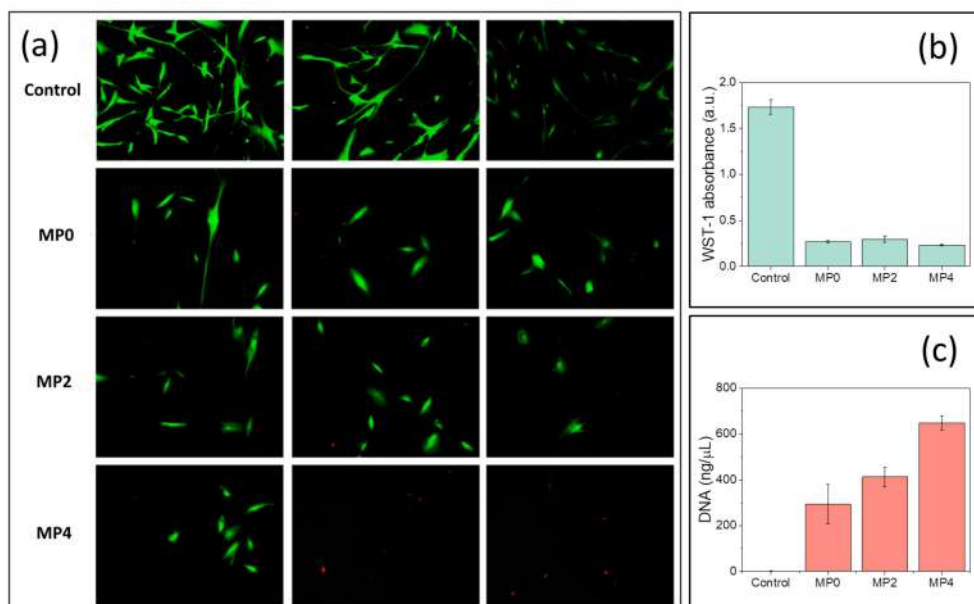


Figure 9.4: Cytotoxicity of selected hydrogels revealed by (a) fluorescence microscopy in the Live/Dead assays, (b) WST-1 absorbance test, and (c) quantification of DNA released in the cell culture medium.

9.3. Synthesis and characterization of isotropic alginate hydrogels

A new two-step protocol was designed for the preparation of homogeneous magnetic hydrogels formed by micron-sized iron particles included within an alginate polymer network. This protocol allows obtaining homogeneous hydrogels with a percentage of magnetic particles of up to 33 % in volume, that showed a high sensitivity to the presence of magnetic fields. A complete characterization of the morphology, microstructure and mechanical properties of the resulting magnetic hydrogels was carried out. In addition, a complete study of the magnetoreological (MR) behavior of alginate ferrogels was carried out and we analyzed the mechanisms behind the large MR effect observed in these systems.

9.3.1. Materials and methods

Preparation of magnetic alginate hydrogels

First, a polymer network was prepared using sodium alginate obtained from the extracellular matrix of brown algae (Sigma Aldrich, EE. UU.). Sodium alginate was dispersed in distilled water at a concentration of 1 % w/v. CaCO_3 was then used as a source of calcium ions to initiate gelation in combination with D-glucono- δ -lactone (GDL) (Sigma Aldrich, EE. UU.). GDL is hydrolysed in water to gluconic acid, which improves the solubility of CaCO_3 as a result of the acidification of the environment. For a final volume of 5 mL of the sodium alginate solution, we added 7.5 mg of CaCO_3 and 26.7 mg of GDL, stirring the mixture with a vortex mixer until a macroscopically homogeneous system was obtained. The mixture was then placed in a petri dish and left at rest at room temperature and in a water-saturated atmosphere for gelation. To obtain a magnetic hydrogel, the mixture was broken with a vortex mixer 90 minutes after gelation began. After breaking the hydrogel, we added the magnetic phase and sonicated the resulting mixture for 10 minutes before placing it at rest in a petri dish. As a magnetic phase we used micron-sized particles of silica-coated iron (Fe-CC, MP0), supplied by BASF (Germany), which were described in the previous section. Finally, 5 mL of CaCl_2 45 mM (Sigma Aldrich, USA) was added to the magnetic sample previously placed in a petri dish, and stored until the next day at room temperature in a water-saturated atmosphere. For comparison, we prepared non-magnetic alginate hydrogels following the same protocol without the addition of particles.

Structural and rheological characterization of the magnetic alginate hydrogels

The microscopic structure of the hydrogels was analyzed using SEM (scanning electron microscopy) images, which were performed using an FEI Quanta 400 ESEM.

Rheological properties under shear stresses of both magnetic and non-magnetic hydrogels were determined using a rotational (magneto)rheometer (Physica MCR 300) with a plate-plate geometry of 20 mm diameter and at a constant temperature of 25.0 ± 0.1 °C. First, the linear viscoelastic region (LVR) was determined by undergoing amplitude sweep tests at a constant frequency of 1 Hz and gradually increasing the shear strain amplitude, γ_0 , and thus obtaining the values of the storage (G') and loss (G'') moduli. The characteristic values of G' and G'' were calculated as the mean values within the LVR. Subsequently, frequency sweep tests were performed at a fixed shear strain amplitude ($\gamma_0 = 0.03\%$) within the LVR and an increasing frequency in the range of 0.15 - 15 Hz. Both amplitude and frequency sweeps were carried out under the application of magnetic fields of different intensities within the range 0 - 282 kA/m. Finally, the different samples were subjected to magnetic field sweep tests. For this purpose, the samples were subjected to a fixed oscillating strain amplitude ($\gamma_0 = 0.03\%$) and frequency ($f = 1$ Hz), and the applied magnetic field intensity was gradually increased from 0 to 282 kA/m.

9.3.2. Results and discussion

Structural properties of the magnetic alginate hydrogels

Both magnetic and non-magnetic hydrogels retained the disc shape of the mold used for their preparation. Non-magnetic hydrogels were transparent, while magnetic ones were black in color due to the inclusion of magnetic particles. Both types of hydrogels had a homogeneous macroscopic appearance, even for a volume fraction of magnetic particles as high as 0.33. In general, the hydrogels kept their shape and integrity under the manipulation and measurements carried out in this work. An exception was the magnetostriction that magnetic hydrogels experienced under a sufficiently high intensity of applied magnetic field. In addition, for a particle volume fraction equal to or greater than 0.09, hydrogels underwent irreversible macroscopic breakage when subjected to shear stresses outside the LVR under the application of a magnetic field.

According to SEM images of Figure 9.2a, non-magnetic alginate hydrogels had a dense and homogeneous microstructure similar to a network. On the other hand, magnetic hydrogels had a microstructure similar to a network disrupted by the presence of homogeneously dispersed magnetic particles (Figures 9.2b-c). As shown in figures 9.2c and d, the particles were mainly forming encapsulated aggregates within the alginate polymer network. In addition, it was confirmed that the application of sufficiently high magnetic fields induced the formation of permanent secondary aggregates in the form of a chain that remained stable even after switching off the field (Figure 9.2d).

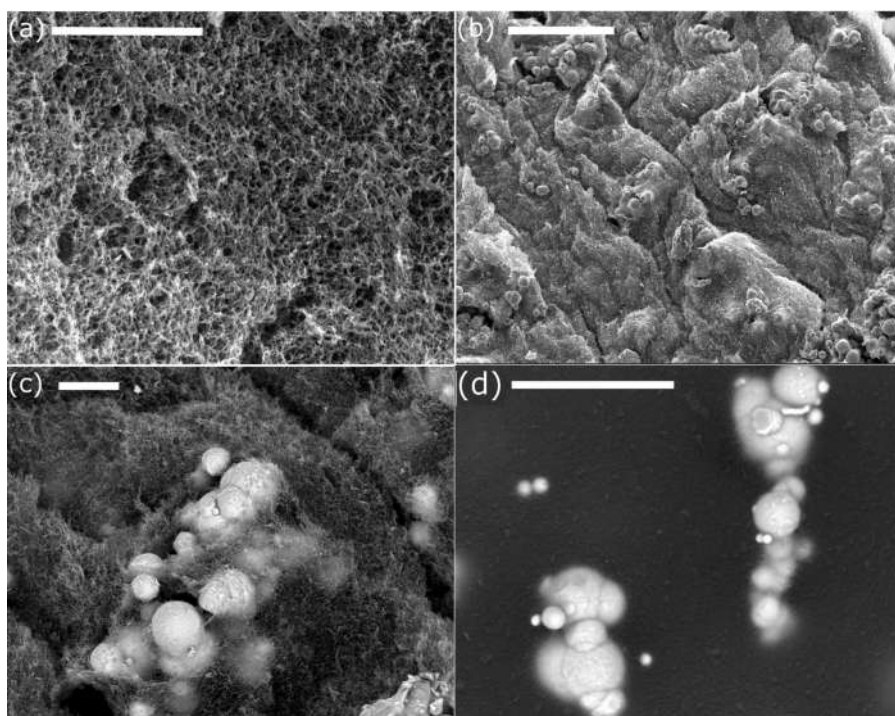


Figura 9.5: Scanning electron microscopy (SEM) images of (a) non-magnetic hydrogel; (b), (c) and (d) magnetic hydrogels containing a volume fraction of 0.01 Fe-CC particles. The hydrogel (d) was subjected to a magnetic field of approximately 280 kA/m before the images were taken. Length of the scale bar: (a) 4 μm , (b) 30 μm , (c) 4 μm , (d) 10 μm .

Rheological properties of the magnetic alginate hydrogels

For both magnetic and non-magnetic hydrogels, the curves in figure 9.6a showed the typical trend of a solid-like viscoelastic material, characterized by values of G' much higher than the values of G'' at a low strain amplitude. It can be observed that both viscoelastic moduli presented an initial plateau region, which was identified with the linear viscoelastic region (LVR). Then, as the strain amplitude increases, G' undergoes a sharp decrease, accompanied by an initial increase of G'' to a maximum, followed by a sharp decrease for higher values of the strain amplitude. This region where the values of G' and G'' no longer remain constant is known as a nonlinear viscoelastic region. Within this region, the internal structure of the hydrogels undergoes deformations and irreversible breakage. Also, the dependence of viscoelastic modules (G' and G'') was analyzed as a function of the oscillatory frequency within the LVR. As shown in Figure 9.6b, both G' and G'' increased slightly with the frequency for the range under study. In addition, in all cases, G' was considerably greater than G'' . These trends are typical of cross-linked polymer systems [98]. As shown in the curves in figure 9.6, the inclusion of magnetic particles within the hydrogels leads to an enhancement of the viscoelastic moduli.

Then, the mean values of G' and G'' corresponding to the LVR were calculated as a function of the concentration of magnetic particles (Figure 9.6c). The effect of solid inclusions on the mechanical properties of composite materials is an studied subject from the theoretical and experimental point of view [101]. The validity of the equation of Krieger-Dougherty (KD) [103] for magnetic hydrogels has been previously demonstrated [32]. However, for the magnetic hydrogels of this work there was not a good fit with the KD equation, being the largest discrepancy for medium and high concentrations of particles. The discrepancies with respect to the KD equation in this work may be due to the existence of particle aggregates. The existence of these aggregates results in a higher effective concentration of rigid inclusions within the hydrogels than the actual concentrations; since the volume of an aggregate is greater than the total volume of the constituent particles. Therefore, to take this effect into account, the following empirical equation was proposed (which has some mathematical similarity to the KD equation) which fitted reasonably well with our experimental results:

$$\begin{aligned} G' &= G'_0(1 - \alpha' \cdot \phi^{n'})^{-\beta'} \\ G'' &= G''_0(1 - \alpha'' \cdot \phi^{n''})^{-\beta''} \end{aligned} \quad (9.1)$$

where β' , β'' , α' , α'' , and n' , n'' are adjustable parameters that take the values $\beta' = \beta'' = 1.6$, $\alpha' = \alpha'' = 1.06 \pm 0.02$, $n' = 0.19 \pm 0.03$ y $n'' = 0.13 \pm 0.03$. As inferred from figure 9.6c, the equation provided a reasonably good fit to the dependence of viscoelastic moduli to the particle volume fraction in the range 0.05 - 0.33. However, this equation did not reproduce a linear dependence that would be expected at lower concentrations, while extrapolation to higher concentrations made no sense due to the impossibility of preparing and handling hydrogels above a particle volume fraction of about 0.35.

Similarly, in the presence of an external magnetic field, the experimental curves of G' and G'' as a function of the deformation amplitude and frequency showed a typical trend of a viscoelastic material similar to a solid ($G' > G''$). The application of an external magnetic field resulted in an enhancement of the viscoelastic moduli, that increased with the intensity of the applied magnetic field. This phenomenon is known as magnetorheological effect (MR) [105]. The figure 9.7a shows the average values of G' corresponding to the LVR as a function of the concentration of magnetic particles both in the absence of a magnetic field and in the presence of the most intense magnetic field under study, $H = 282$ kA/m. As observed, the higher the concentration of magnetic particles, the greater the increase of G' under the application of a magnetic field. This improvement must be related to the magnetic character of Fe-CC particles, which are magnetized and attracted to each other under the application of a magnetic field, giving rise to column-like structures of particles aligned in the direction of the field. Thus, these particle structures were opposed to deformation induced by shear forces, resulting in the improvement of viscoelastic modules [105]. As seen in figure 9.7b, our alginate ferrogels showed a strong MR effect, especially at the highest volume fractions under study, as a likely consequence of the existence of particle aggregates. In fact, the force of magnetic attraction between particles (aggregates) was approximately proportional to the cube of particle size (aggregates), while the force of elastic resistance to particle displacement

depended linearly on this size.

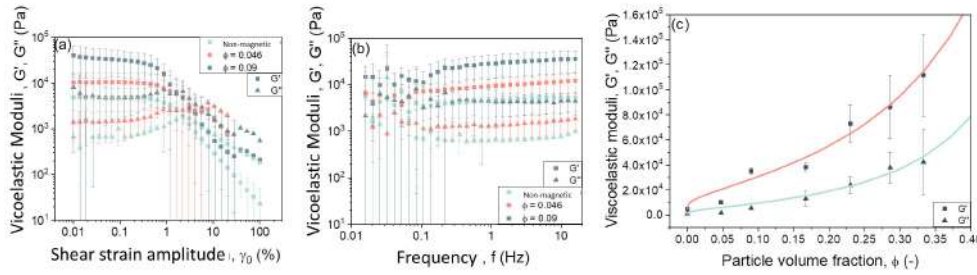


Figure 9.6: Viscoelastic moduli (G' and G'') as a function of (a) the shear strain amplitude ($f=1\text{Hz}$); and (b) the frequency for measurements at a fixed shear strain amplitude of 0.03 % within the LVR. (c) Mean values of G' and G'' within the LVR as a function of the volume fraction of the magnetic particles within the hydrogel. Continuous lines represent the best fits of G' and G'' to equation 9.1.

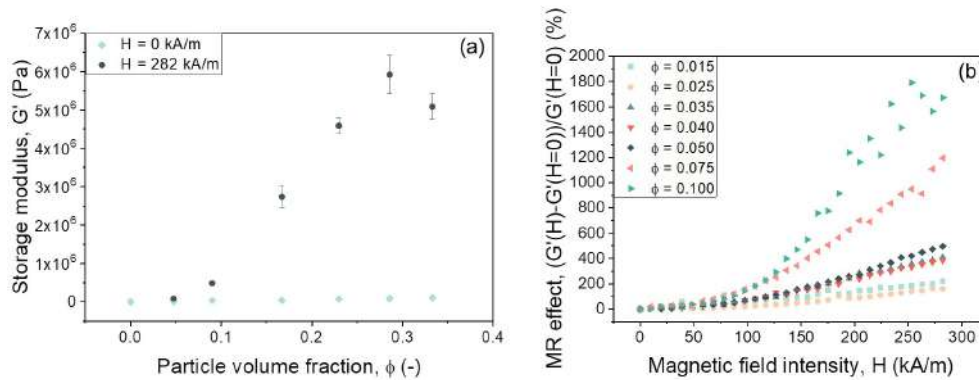


Figure 9.7: (a) Storage modulus (G') as a function of the volume fraction of Fe-CC particles in magnetic hydrogels. The values represent the average of G' corresponding to the LVR, as determined in the amplitude sweep tests. (b) Magnetorheological effect (MR), quantified as the relative increase of the elastic modulus under a magnetic field, $G'(H)$, with respect to the storage modulus in the absence of a field, $G'(H=0)$, for alginate ferrogels with different particle volume fractions.

9.4. Synthesis and characterization of anisotropic alginate hydrogels

In this section we present anisotropic alginate hydrogels dehydrated by two different methods (dehydration under tensile stresses and dehydration under compressive stresses). The influence of the dehydration process on the resulting properties of these hydrogels is analyzed, in terms of water loss, microscopic structure and fiber rearrangement, paying special attention to their mechanical properties. It was found that the method of dehydration has an influence on the resulting properties, since they depend not only on the degree of swelling and the concentration of polymer, but also on the fiber interactions and microscopic rearrangement. Then, we present magnetic alginate hydrogels in which anisotropy was induced by the application of a magnetic field during the gelation process, as a consequence of the tendency of magnetic particles to align in the direction of the applied magnetic field. In this case, anisotropy was obtained without dehydrating the sample, which represents an advantage over methods based on the application of mechanical stresses.

9.4.1. Materials and methods

Preparation of anisotropic alginate hydrogels

The preparation protocols for alginate hydrogels were those described in the section 9.3, with slight variations.

For the study of anisotropy generated by magnetic field, magnetic alginate hydrogels were prepared using two different sizes of magnetic phase (nanometric, NP1; and micrometric, MP0), previously described in the section 9.2. For this purpose, once the particles were added, we waited 15 minutes before placing the mixture between two neodymium magnets (NdFeB, Webcraft GmbH, Germany) of size 30x30x15 mm³ to create anisotropy. The CaCl₂ solution was added after placing the mixture between the magnets. Depending on the position of the magnets with respect to the sample, anisotropies called "perpendicular" and "parallel" were obtained (see Figure 9.8), by the formation of particle chains in the directions of the magnetic field.

For the study of dehydration, hydrogels with low molecular weight sodium alginate (120.000 - 160.000 g/mol, Sigma Aldrich, USA) were prepared. To this end, the corresponding solution of 4 % w/w sodium alginate was prepared in distilled water and 36 mg of CaCO₃ and 128.2 mg of GDL (Sigma Aldrich, USA) were added, homogenizing by vortex mixer. The mixture was then placed into a square mould and left at rest for 2 hours. Finally, 12 mL of a 0.5 M solution of CaCl₂ were added. Then, the hydrogels were dehydrated separately under tensile and compressive stresses. These processes allow to restructure and rearrange the alginate fibres in a certain direction, generating an anisotropy in the polymer network, which modifies its mechanical properties [97, 130]. To dehydrate the alginate hydrogels under traction, a home-made device was used to fix the two ends of the sample and stretch it. The system was placed in a desiccator at

room temperature and a partial vacuum was performed. The samples were dehydrated for 8, 14 and 24 hours to obtain different water losses. During the process, the relative humidity inside the desiccator was regulated by a solution of sodium hydroxide (NaOH) at 25.02 % w/w in distilled water, which maintained a relative humidity of 60 % at 25 °C [133]. To dehydrate the hydrogels under compressive stresses, square samples (28 x 28 mm) of hydrogels were placed between two glass plates surrounded by 5 sheets of blotting paper. An approximate weight of 6.5 kg was placed on the upper plate. They were then left to dry at room temperature for 10, 20 and 30 minutes, thus obtaining different degrees of reproducible dehydration.

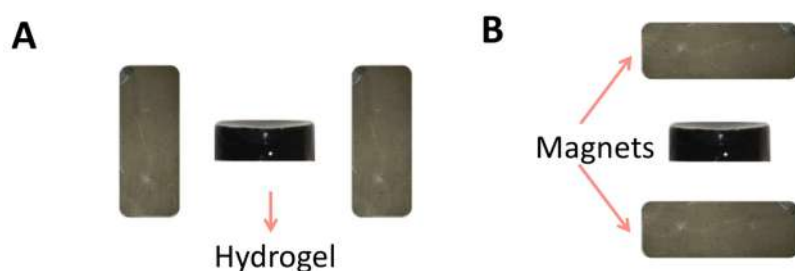


Figure 9.8: Diagram of the position of the magnets with respect to the sample to obtain hydrogels with anisotropy (a) "perpendicular" and (b) "parallel".

Microstructural and mechanical characterization of anisotropic alginate hydrogels

In order to evaluate the degree of swelling and characterize the porous structure of the alginate hydrogels after the application of the dehydration processes, the initial and final masses were measured. The microscopic structure of alginate hydrogels under dehydration processes was characterized by scanning electron microscopy (SEM) using a HITACHI S-microscope510, while optical microscopy and X-ray microtomography (Xradia 510 VERSA ZEISS) were used for magnetic alginate hydrogels.

The characterization of the viscoelastic behavior of the hydrogels under oscillatory shear stresses was performed using a rotational magneto-rheometer (Physica MCR 300, Anton Paar) with a plate-plate geometry of 20 mm diameter, at a constant temperature of 25.0 ± 0.1 °C. Following the same protocol established in the section 9.3, the linear viscoelastic region (LVR) was determined and measurements of amplitude and frequency sweeps were carried out.

9.4.2. Results and discussion

Swelling tests of anisotropic alginate hydrogels prepared by partial dehydration

Table 9.2 shows the average final concentration of alginate in the hydrogels after being dehydrated at three different times for each method. While the initial concentration of alginate was 4 % w/w in all cases, once dehydrated we obtained a range of alginate concentrations between 4.41 ± 0.04 % and 5.48 ± 0.21 % w/w. However, it should be noted that although the final alginate concentrations were not very different, they resulted (as we will see below) in differences from a mechanical point of view, depending on the method used to arrive to this final result and the dehydration state of the hydrogel.

The SEM images show a homogeneous porous structure of alginate hydrogels after preparation (Figure 9.9a), in which polymer chains form an isotropic network without any preferential organization of fibres. In contrast, two different types of alginate anisotropic structures were obtained by following the dehydration protocols described above. The hydrogels that were dehydrated under compression (Figure 9.9b) showed in their contour flat structures formed by the stacking of alginate fibers. However, the dehydrated hydrogels under tensile stresses (Figure 9.9c) showed an isotropic structure, although a dominant parallel alignment of alginate fibres in the direction of the applied tension was expected.

Tabla 9.2: Degree of hydration of anisotropic alginate hydrogels under tensile and compressive stresses, where c is the concentration of alginate within the hydrogel after the indicated stress and time.

Stress	Time	Concentration, c (% w/w)
Compressive	10 min	4.72 ± 0.21
	20 min	5.00 ± 0.16
	30 min	5.32 ± 0.34
Tensile	8h	4.67 ± 0.07
	14h	4.86 ± 0.12
	24h	5.48 ± 0.21

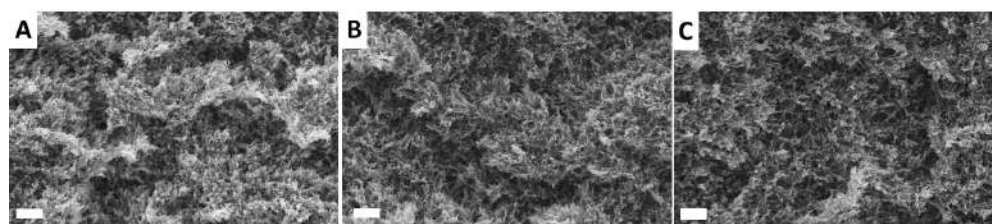


Figura 9.9: SEM images of alginate hydrogels; (a) freshly prepared, (b) after controlled dehydration under compressive stress for 30 min, and (c) after controlled dehydration under tensile stress for 24 h. The scale bars correspond to the size of 1 μm .

Mechanical characterization of anisotropic alginate hydrogels under dehydration

Regarding the mean values of the viscoelastic moduli within the LVR, for the compressed hydrogels both modules showed an increase with respect to the values for the control hydrogels (Figures 9.10a,b). However, for dehydrated hydrogels under tensile stress, although an increase was observed, this was not statistically significant with respect to control samples (Figures 9.10a,c). Note that this increase was greater for dehydrated hydrogels under compressive stresses, according to a stronger change in their microstructure, as evidenced by SEM.

As expected, the type of stress applied in the dehydration process and the final polymer concentration achieved have an impact on the mechanical response of these materials. The reorganization of the internal structure of the hydrogels is crucial. In addition, when a compressive stress was applied, this effect was significantly reinforced, confirming the existence of a reorganization of the polymer network and the formation of new stable bonds between the fibres. In this case, an anisotropic material was obtained when a compressive effort was applied, while the dehydrated hydrogels under a tensile effort did not show such a clear anisotropy, as already discussed in the previous section. Therefore, the selection of any of the dehydration processes should depend mainly on the final application of the material, only if the type of anisotropy is important, as in the case of a synthesized extracellular matrix that mimics natural tissues.

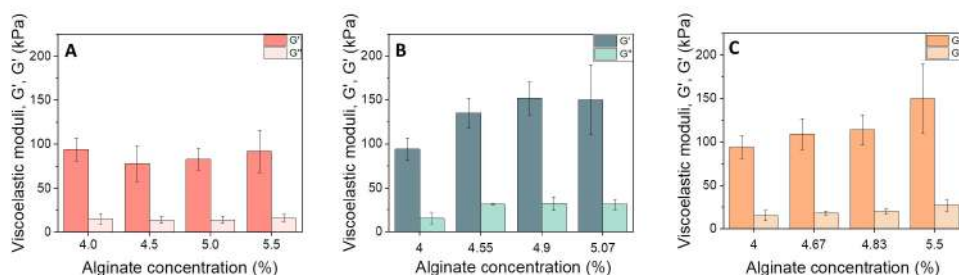


Figura 9.10: Average viscoelastic moduli (G' and G'') of alginate hydrogels of different concentrations as (a) control, (b) dehydrated under compressive stress and (c) dehydrated under tensile stress.

Characterization of anisotropic magnetic alginate hydrogels

As shown in Figure 9.11a for hydrogels with NP1, anisotropic "perpendicular" hydrogels had the lowest values of G' , even lower than those of non-magnetic hydrogels, while anisotropic "parallel" hydrogels showed intermediate values, higher than those of non-magnetic hydrogels but lower than those of magnetic isotropic hydrogels. As shown in figure 9.11c, the arrangement of the NP1 particles, aligned in the direction of the applied magnetic field, provided the anisotropy that explains the differences found in mechanical properties. However, the interaction between magnetic particles or between magnetic particles and alginate fibers is probably not strong enough to ensure a surprising effect of anisotropy induced by this method. Moreover, in figure 9.11d, the formation of chain structures in the direction of the magnetic field applied during the preparation of the hydrogels with MP0 is observed again. In this case, and in the absence of a magnetic field applied during the measurement (Figure 9.11b), higher values of G' were always obtained for magnetic than for non-magnetic hydrogels. In addition, the values obtained for the anisotropic hydrogels were very similar to those of the isotropic samples. However, when an external magnetic field of 282 kA/m was applied during the measurement process, a high increase in G' appeared for anisotropic hydrogels in the perpendicular direction of the magnetic field, while no differences were observed between hydrogels with anisotropy parallel to the magnetic field and isotropic magnetic hydrogels. This effect corroborates the hypothesis that not only spatial anisotropy is important, but also a strong interaction between particles and fibres of the hydrogel is essential (see section 9.2) to provide a noticeable enhancement in their mechanical properties.

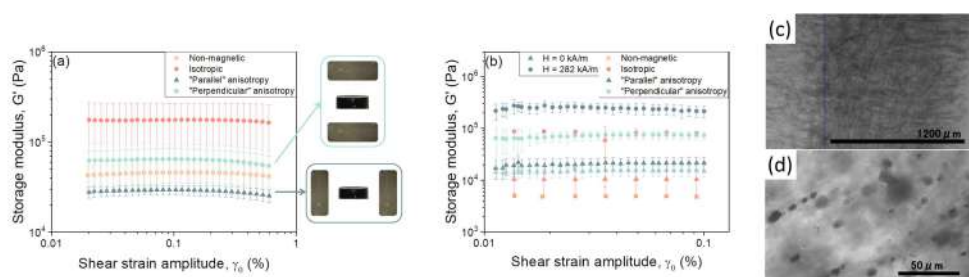


Figura 9.11: Storage modulus (G') as a function of the shear strain amplitude and at a fixed frequency of 1 Hz, for magnetic (a) peptide-based and (b) alginate-based hydrogels. Optical microscopy images of a magnetic (c) peptide-based and (d) alginate-based hydrogels. Line of observation perpendicular to the direction of anisotropy.

9.5. Alginate-based hydrogels applications

In this section, we investigate the ability of magnetic alginate hydrogels, both isotropic and anisotropic (see sections 9.3 and 9.4), for applications as soft actuators. Finally, an adaptation of the protocol of preparation of the magnetic alginate hydrogels to inject them is described, which could be a great advantage for their *in vivo* implementation.

9.5.1. Materials and methods

Preparation of magnetic alginate hydrogels

Alginate-based magnetic hydrogels were prepared following the protocol set out in the section 9.3 and using as a magnetic phase the silica-coated iron microparticles (Fe-CC, MP0).

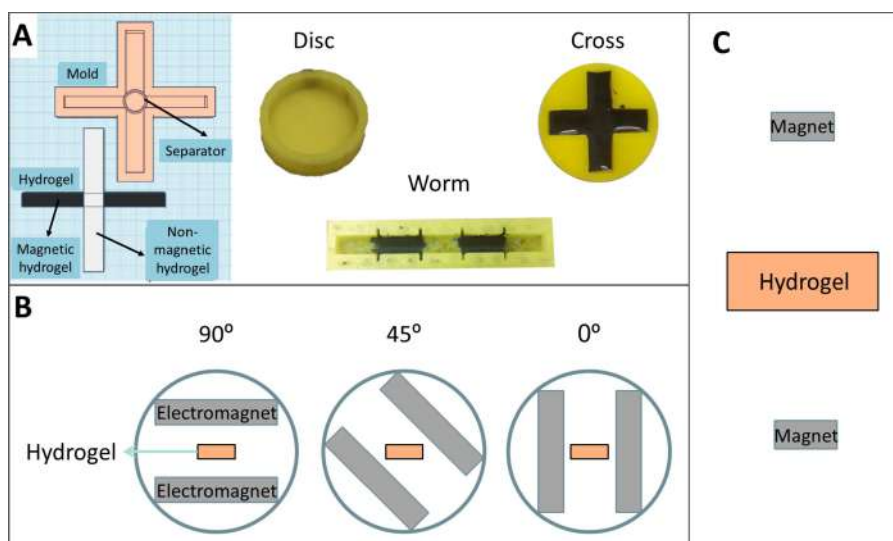


Figure 9.12: (a) Diagrams and photographs of the mould used for the preparation of the different actuators. (b) Sketch of the applications of magnetic fields at different angles during the gelation. (c) Outline of the application during the gelation of the cross-shaped sample of a magnetic field gradient using two magnets.

For the study of soft actuators based on isotropic alginate hydrogels, cross-shaped and worm-shaped actuators were prepared (see Figure 9.12a), with passive parts (without magnetic particles) and active parts (with homogeneously dispersed magnetic particles) at different concentrations of magnetic particles. As shown in Figure 9.12a, disc, worm and cross-shaped actuators were prepared based on anisotropic alginate hydrogels. To this end, a magnetic field was applied during the gelation process to group the magnetic particles into chain-like structures. The angle of inclination of the applied magnetic field

with respect to the moulds where the samples were gelled induced chains of particles aligned with different angles (Figure 9.12b). In the case of the cross-shaped actuator, an angle gradient was created using two small magnets to align the particles (Figure 9.12c).

Analysis of the actuation of magnetic alginate hydrogels

The macroscopic behavior of the actuators was studied by analyzing the movement through videos and photographs taken with a digital camera while applying external magnetic fields of different intensities and in various directions. In addition, the anisotropic hydrogels were characterized at the microscopic structuring level by means of an X-ray tomography imaging system (microCT, GE Measurement and Control Solutions, Dresden, Germany) which allowed to scan the hydrogels to obtain information on the arrangement of the embedded magnetic particles. The projected images of the samples were taken with an angular increment of 0.25° , an acceleration voltage of 90 kV and an exposure time of 2 s. For the application of magnetic fields during microCT measurements two moving magnets were used, so that the sample was placed between them and by controlling the distance between them the field intensity could be changed too. The reconstruction of the microCT images was carried out with the VGStudio Max 2.1 (Volume Graphics GmbH) program. The magnetic alginate hydrogels were prepared with a volume concentration of Fe-CC iron particles of 1 % for microCT and 5 % for actuation studies.

Injectability study: Protocols and characterization

Magnetic hydrogels containing a magnetic particle volume fraction of 0.046 were chosen and submitted to an injection protocol with potential to be implemented in *in vivo* applications. This protocol consisted of the following steps:

1. The hydrogels were prepared inside syringes following the protocol described in section 9.3, except for the final addition of the calcium chloride solution.
2. Before injection, hydrogels were dehydrated until they lost about 20 % of their total mass. To do this, they were extracted from the syringes (by its posterior opening) and placed in petri dishes inside an oven at 35°C for 2 hours. The reason for this partial dehydration was to gain some space for the additional solution to be added after injection. Otherwise, if we did not make this partial dehydration, a supernatant solution remained (not absorbed in the hydrogels), something undesirable from the point of view of *in vivo* applications.
3. The hydrogels were then placed back into the syringes (note that the hydrogels maintained their shape during partial dehydration) and injected at the desired location.
4. A given time (from 0 to 120 min.) after injection, a total volume equal to the volume of water lost during the partial dehydration (step 2) of a CaCl_2 solution was added by injection. The concentration of CaCl_2 in this solution was adjusted

so that the final molarity in the hydrogel was 22.5 mM; that is, the same molarity as in the protocol described in the section 9.3.

A commercial polyurethane foam (Procurusur, Spain) with a compression module of approximately 4600 ± 100 Pa was used. A cup-shaped hole approximately 1 cm in diameter and 2 cm in depth in the foam was drilled. The protocol described above was then followed for the injection of the magnetic hydrogel into the perforated space in the foam. After 24 h, the magnetic hydrogel was recovered from the hole. Then, its macroscopic integrity was analyzed by direct observation and the viscoelastic properties of the injected hydrogels were characterized.

9.5.2. Results and discussion

Isotropic alginate-based hydrogels as magnetic actuators

First, we studied the magnetic response of the cross-shaped actuator as a function of the concentration of magnetic particles in their active parts. In general, there was an increase in the maximum angle reached by the actuator's magnetic arms with the concentration of magnetic particles. For example, the actuator with a 5 % v/v particle concentration in the active part failed to flex the arms even for the maximum magnetic field intensity reached ($H \sim 49$ kA/m), while the one containing 20 % v/v reached a maximum angle of 90° at $H \sim 45$ kA/m (Figure 9.13). In this case, the purpose of the passive part was to ensure the adhesion between the actuator and the contact surface, otherwise the entire sample would shift as a result of the weak horizontal field gradient. Secondly, the ability of actuation of worm-shaped hydrogels with a particle concentration of 5 % v/v was analyzed (Figure 9.13). These actuators lifted the magnetic parts in opposite directions by applying progressively stronger external magnetic fields, until fully aligned in the vertical direction at $H \sim 42$ kA/m.

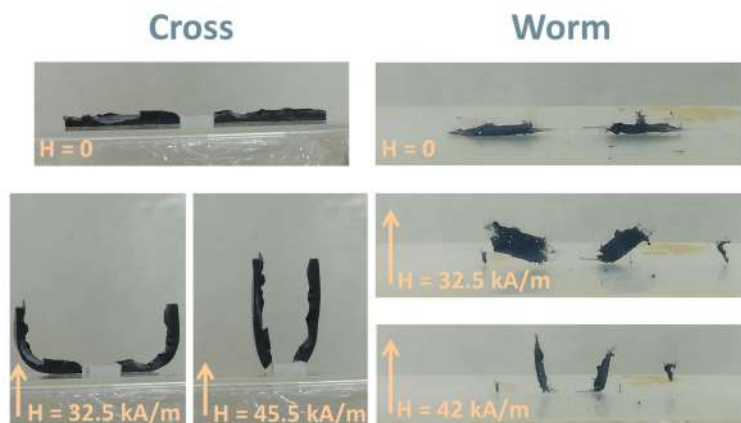


Figure 9.13: Photographs of the cross-shaped and worm-shaped actuators based on isotropic alginate hydrogels under applied magnetic fields of different intensities.

Anisotropic alginate-based hydrogels as magnetic actuators

The actuation of anisotropic alginate hydrogels was analyzed by taking advantage of the alignment of magnetic particles at different angles and testing different morphologies to create complex macroscopic movements. To this end, alginate hydrogels were prepared in the form of a worm alternating anisotropic magnetic parts with non-magnetic parts (see Figure 9.12b). Figure 9.14 shows that the actuator with alignment of 45° in the magnetic parts performs a worm-like motion when a magnetic field was applied, lifting the magnetic parts in the same direction. As the field increased in intensity, the magnetic parts of the actuator tilted to align the particle chains in the direction of the field, until they formed an angle of 45° for the maximum intensity applied when the particles were fully aligned with the external magnetic field. This was corroborated by microCT images of the magnetic parts of these actuators with and without an applied magnetic field. Similarly, actuators with a prealignment of particles in chains at 0° created a movement by lifting the magnetic parts, this time in opposite directions, by applying progressively higher magnetic field intensities. Therefore, for the same actuator morphology, a change in the angle of alignment of the particle chains led to the appearance of a completely different movement when applying external magnetic fields. In addition, not only the angle of alignment of particles was important, but also their direction. Thus, if the particles were aligned at an angle of 0° but in the perpendicular direction, rotational movements of the actuator were achieved by keeping the intensity of the applied field constant and rotating it to change its direction and direct the movement, as shown in the last part of Figure 9.14. When the field was no longer applied, the actuators returned to their initial state in all the cases, and on and off cycles were performed.



Figura 9.14: Photographs of the worm-shaped actuator with the magnetic parts aligned at 0° and 45° under applied magnetic fields of different intensities or directions. Corresponding microCT images are included for each condition.

On the other hand, cross-shaped actuators were prepared under a field gradient using two opposing magnets (see Figure 9.12d). In this way, the chains of particles formed an angle of 90° in the center of the sample and progressively decreased with a gradient of angles until reaching 0° at the ends of the legs, as confirmed by microCT images in the absence of magnetic field in Figure 9.15. This technique allows the cross to flex the legs and close with a rounded shape when applying external magnetic fields, as opposed to the straight movement of the legs that was achieved with the isotropic actuators studied above and shown in Figure 9.12a. In addition, this bending motion was reversible, returning to its initial state when the magnetic field was removed. Thus, with a precise control of the particle distribution within the hydrogel and the applied magnetic field, technological and biomedical utility can be given to these actuators as soft robots capable of deliver small loads [142].

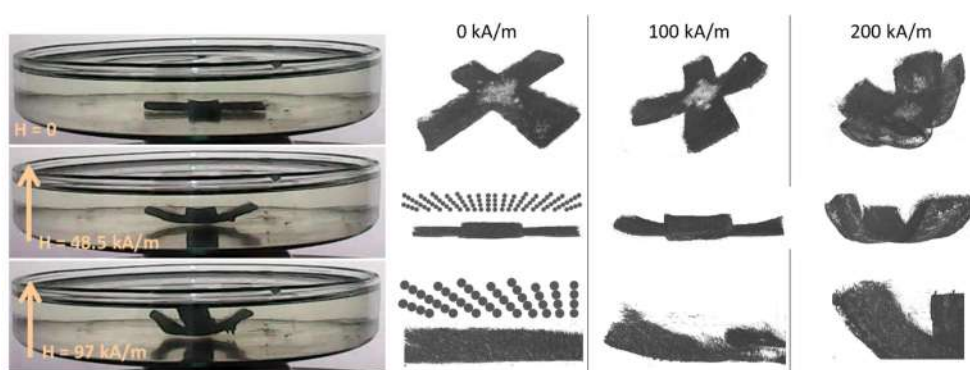


Figure 9.15: Photographs of the cross-shaped actuator under applied magnetic fields of different intensities. MicroCT images are included for different magnetic field strengths and from three different views or perspectives: side view, lateral view and detail of one of the legs.

Injectability study

Although the injected hydrogels had a lumpy appearance (Figure 9.16a), each of them consisted of a solid piece that could be handled without fracture (Figure 9.16b). From the rheological measurements, we obtained the average viscoelastic moduli (G' and G'') corresponding to the LVR, which are represented in the figure 9.16c as a function of the time (t_{Ca}) elapsed from the time of addition of the dissolution of CaCl_2 . In all cases, the values of G' and G'' were of the same order of magnitude as those presented in the section 9.3 for magnetic hydrogels not subjected to injection, obtaining a maximum value of G' when $t_{Ca}=30 \text{ min}$. For example, $G'=10.2\pm0.4 \text{ kPa}$ for hydrogels not subjected to injection, while $G'=22\pm6 \text{ kPa}$ for hydrogels injected. Therefore, the designed injection protocol has proven to be suitable for retaining the morphology and mechanical characteristics of magnetic alginate hydrogels and could be suitable for *in vivo* implementation.

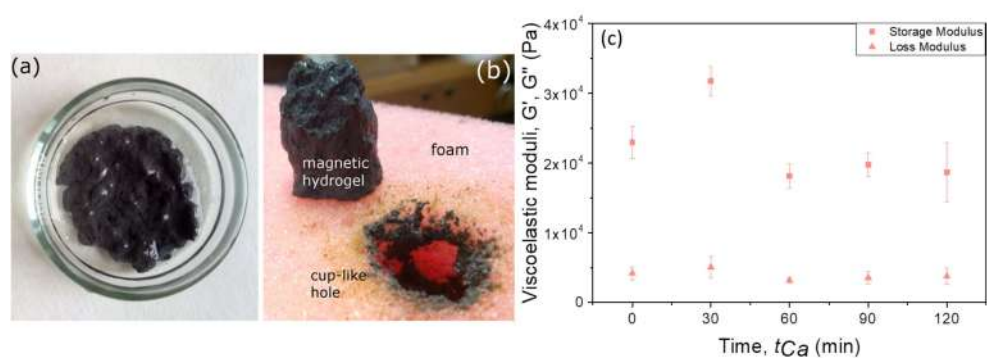


Figura 9.16: Injected magnetic hydrogel after 24 hours of addition of CaCl_2 . The image (a) corresponds to a magnetic hydrogel injected in a petri dish. Image (b) corresponds to a magnetic hydrogel injected through a foam into a previously perforated cup-shaped hole (there was no diffusion of the hydrogel to the surrounding areas). (c) Average viscoelastic moduli (G' and G'') corresponding to the LVR of the magnetic hydrogels as a function of t_{Ca} . The volume fraction of magnetic particles was 0.046 in all cases.

9.6. Synthesis and characterization of peptide-based hydrogels

This section studies in detail the mechanism of co-assembly of short aromatic peptides containing Fmoc- (fluorenylmethyloxycarbonyl) or Nap- (2-(naphthalen-2-yl)acetyl) groups, with the intention of understanding their polymerization process. Thus, the Fmoc-FF peptide was combined with other dipeptides containing Nap- groups in order to shed light on the co-assembly mechanism and to study the relative distribution of the monomer within the resulting supramolecular polymer.

9.6.1. Materials and methods

Preparation of supramolecular hydrogels

The peptides N-Fluorenylmethoxycarbonyl-diphenylalanine (Fmoc-FF), N-Fluorenylmethoxycarbonyl-dialanine (Fmoc-AA) and N-Fluorenylmethoxycarbonyl-diglycine (Fmoc-GG) were supplied by Bachem Co., Switzerland, while the peptides Nap- were synthesized following the protocol described in [179]. The peptides were simultaneously weighted in the desired proportion and milliQ water was added to obtain a final concentration of 10 mM. This suspension was sonicated in an AL04-03-230 ultrasound bath with cold water for 25 minutes, until the peptides were fully dispersed and a homogeneous mixture was obtained. Then, a 0.5 M NaOH solution was added, drop by drop using a micropipette, sonicating for 2 minutes when each drop was added, until a transparent solution was obtained. To start the gelation process, 5 μ L of a concentrated solution of D-glucono- δ -lactone (GDL, Sigma Aldrich) (200 mg/mL) per mL of basic peptide solution was added and homogenized by vortex for a few seconds. Finally, the mixture was left at rest until the next day in an atmosphere saturated with water at room temperature to ensure complete gelation.

Characterization of the microscopic properties

The internal structure of the hydrogels was studied both, using an electronic transmission microscope (TEM) LIBRA 120 PLUS Carl Zeiss, and using a fluorescence lifetime microscope (FLIM) MicroTime 200 (PicoQuant GmbH, Berlin, Germany) [180].

Characterization of the process of co-assembly of the peptides

A Perkin-Elmer Spectrum Two FTIR ATR spectrometer was used to perform infrared spectra (FTIR) measurements. The time evolution of the FTIR spectra of peptide mixtures was studied using a Bruker IFS-66 spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with an MCT detector cooled with liquid nitrogen and an attenuated total reflection accessory (BioATR-II) thermostated to 25°C. FTIR spectra were first

acquired with freshly prepared peptide mixtures dissolved in basic aqueous medium. Then GDL was added and the mixtures were immediately deposited in the ATR cell. Background spectra previously measured in basic aqueous medium were subtracted from the spectra of the final sample to eliminate the contribution of strong water bands. Fluorescence emission spectra were obtained in a Jasco FP-8300 spectrophotometer (Jasco, Tokyo, Japan), at an excitation wavelength of λ_{ex} 280 nm. Differential scanning calorimetry (DSC) experiments were performed on a DASM-4 microcalorimeter equipped with platinum capillary cells [183]. The reference cell was filled with a saline solution in water, and the sample cell was filled with a mixture of the prepared hydrogel precursor immediately prior to its introduction into the instrument.

Characterization of the mechanical properties of peptide-based hydrogels

The rheological properties under shear stress of peptide hydrogels were determined using a controlled stress rheometer Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) with a 35 mm diameter plate-plate geometry and at a constant temperature of 25 °C. First, the hydrogels underwent amplitude sweep tests at a constant frequency of 1 Hz and increasing shear strain amplitude. From the resulting curves, the characteristic values of G' and G'' within the LVR were calculated by averaging the total extension of the LVR. The gelation kinetics of the different hydrogels were studied using a double cone-plate geometry of 60 mm in diameter and an angle of 2 °. To do this, the peptide solution was poured into the measuring plate immediately after the addition of the GDL and the mixture was allowed to gelate for 2 hours under fixed parameters of 1 Hz of frequency and 0.02 % of shear strain amplitude.

9.6.2. Results and discussion

Analysis of the dipeptides co-assembly process

As shown in Figure 9.17u-z, in all cases hydrogels of different consistency were formed after 24 hours [185]. It is important to note that the Fmoc-FF at 2.5 mM and the other dipeptides at 7.5 mM did not form gels by themselves, whereas they did at this concentration when they were in the 1:3 mixture (2.5 mM of Fmoc-FF and 7.5 mM of the other dipeptide). In a ratio of 1:4, none of the mixtures formed gels, and at the final concentration of 10 mM, only Fmoc-FF and Fmoc-AA(L) formed gels by themselves [185]. As seen in Figure 9.17b-g, in the absence of GDL the solutions of each of the individual dipeptides predominantly showed small nanospheres, except in the case of Nap-GG which also showed small fibres. In contrast, Figure 9.17a shows that Fmoc-FF, at the same concentration, showed only the presence of thin fibres. As expected, these images show the increased propensity of Fmoc-FF to be added in fibrillary arrays [178, 186–190]. Interestingly, in Figure 9.17h-m, TEM images of solutions containing a mixture of Fmoc-FF with other dipeptides in a 1:3 ratio showed the presence of small fibres in all cases, where each peptide mixture showed the predominance of a type of fibre with a well-defined morphology. In addition, the morphology of the fibres was

different for each type of mixture, indicating the preferential formation of coassemblies. The presence of nanospheres was residual in most cases and, in Figure 9.17f, it can be seen that these fibres were formed by the aggregation and transformation of pre-existing nanospheres. These results show that Fmoc-(AA and GG) and Nap-(AA and GG) dipeptides were able to form fibres in the presence of Fmoc-FF. In this case, the formation of fibres when Fmoc-FF was combined with other peptides suggests that mixed micellar aggregates had to be responsible for fiber co-assemblies at high pH. After the addition of GDL, the TEM images in Figure 9.17n-t of the hydrogels formed by mixtures of dipeptides with Fmoc-FF show, in all cases, larger fibres with a morphology more similar to each other and similar to the fibres formed by Fmoc-FF alone.

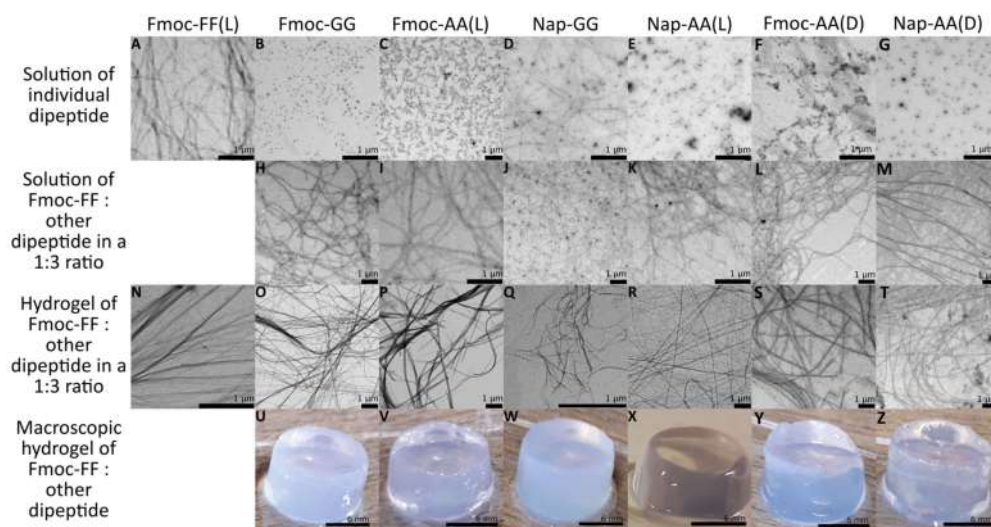


Figure 9.17: TEM images of (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) individual solutions of each dipeptide; (h), (i), (j), (k), (l), (m) solution of Fmoc-FF and the other dipeptides at 1:3 proportion in the absence of GDL; (n), (o), (p), (q), (r), (s), (t) hydrogels of Fmoc-FF and the other dipeptides at 1:3 proportion after the addition of GDL. (u), (v), (w), (x), (y), (z) Macroscopic images of the hydrogels formed by Fmoc-FF and the other dipeptides at a 10 mM final concentration.

Before the addition of GDL, the dissolved Fmoc-FF presented two strong bands in the amide I region at 1638 cm^{-1} and 1690 cm^{-1} , while the Nap-GG had a wider peak at 1652 cm^{-1} and a sharper but less intense one at 1629.5 cm^{-1} (Figure 9.18a). The spectrum of the 1:3 mixture shows characteristics of both peptides. In fact, the simulated theoretical spectrum of the 1:3 mixture is similar, though not identical, to the observed spectrum, suggesting that the two peptides influenced each other's dissolving structure. Subsequently, the evolution of the spectra was followed (for about 5 hours) after adding GDL, in order to observe the changes that occurred as the gels were formed (Figure 9.18b). In the case of the Fmoc-FF alone, spectral changes showed the development of a broadband centered at approximately 1633 cm^{-1} , attributable to the formation of a β type structure. In contrast, the Nap-GG showed different spectral changes, presenting an increase in band intensity to 1662 cm^{-1} , which is consistent with the lack of ability of this peptide to self-assemble into a β sheet. In the 1:3 mixture spectra, a band centered

at approximately 1635 cm^{-1} , very similar to the Fmoc-FF gel spectra alone, evolved with incubation time. This result, consistent with the TEM observations, suggests the formation of co-assemblages in which the resulting aggregates were rearranged into β sheets. Finally, FTIR spectroscopy of the rest of the gel-shaped peptide mixtures at ratios 1:1 and 1:3 shows virtually overlapping spectra for all mixtures and almost identical to the Fmoc-FF spectra, again presenting a broadband centered at approximately 1635 cm^{-1} , according to the observed results for the mixture of Fmoc-FF and Nap-GG.

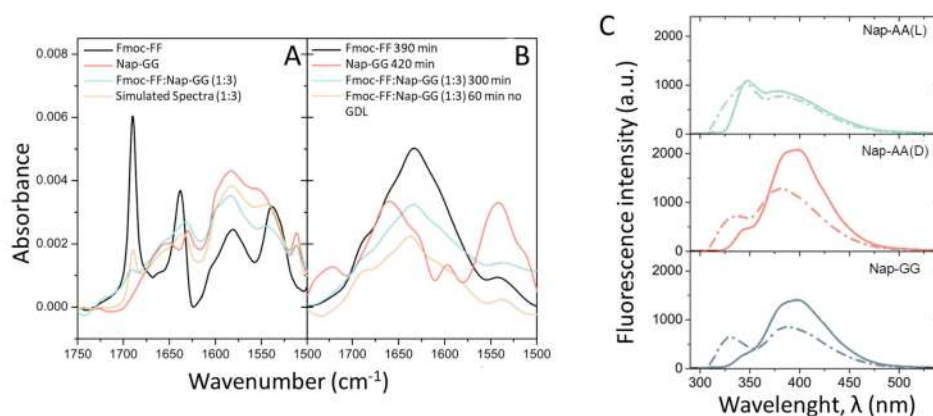


Figure 9.18: (a) FTIR spectra of fresh Fmoc-FF, Nap-GG and Fmoc-FF mixture with Nap-GG 1:3 (2.5 mM: 7.5 mM). The simulated spectrum of the mixture is also shown as a comparison. (b) Spectra obtained by subtracting the initial spectrum measured immediately after addition of GDL from the spectrum measured after incubation of each peptide at the indicated times; the spectrum of the mixture 1:3 after incubation without GDL is also shown. (c) Fluorescence emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 280\text{ nm}$) of Fmoc-FF 1:3 mixtures with different Nap- dipeptides in solution. The dotted lines show the corresponding simulated spectra in the absence of FRET and other interactions.

Then the emission spectra of incubated mixtures were measured in 1:3 ratio of dipeptides Fmoc-FF and Nap-. FRET was detected from Fmoc to Nap, as identified by the near total extinction of the Fmoc emission (Fmoc-FF presents the typical emission due to the aromatic ring Fmoc, centered at 325 nm) and the improvement of the emission of Nap, which confirms the effective coaggregation of dipeptides, especially in mixtures of Fmoc-FF with Nap-AA(D) and Nap-GG, which means that these peptides were well integrated within the Fmoc-FF network (Figure 9.18c). Interestingly, this effect is much less noticeable in the mixture with Nap-AA(L), where the increase in Nap-excimer emission was low, indicating a lower degree of interaction and coaggregation of this peptide with Fmoc-FF. However, TEM images show effective fibrilization for the mixture of Fmoc-FF and Nap-AA(L) (Figure 9.17k). This means that Nap-AA(L) could still maintain some self-assembly capability, regardless of the presence of the Fmoc-FF. Finally, the corresponding emission spectra were reconstructed simulating the absence of FRET and other interactions. To this end, the spectra of the individual peptides were added to 1:3 ratio. In a situation where there was no interaction between the different dipeptides, the experimental and simulated lines should be comparable.

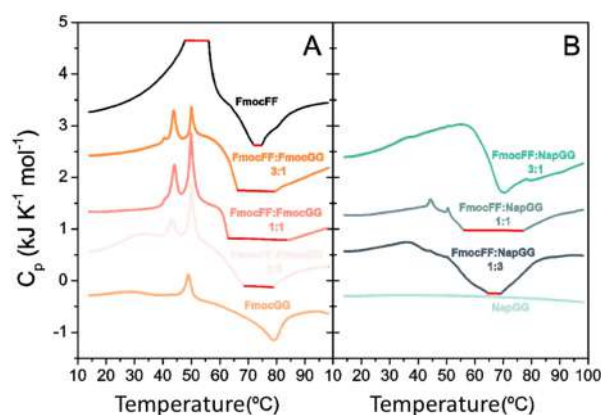


Figura 9.19: DSC measurements of freshly prepared solutions at a total concentration of 10 mM Fmoc-FF and (a) Fmoc-GG, (b) Nap-GG. The flat red areas indicate a saturation of the calorimeter signal due to the appearance of too intense peaks. Thermograms have been arranged vertically apart in intervals of $1 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ to give more clarity.

To investigate energy exchanges and intermediate states involved in the formation of hydrogels [178], differential scanning calorimetry (DSC) experiments were performed with freshly prepared Fmoc-FF and Fmoc-/Nap-GG solutions. The individual Fmoc-FF thermogram shows an initial strong endothermic peak near $\sim 50^\circ\text{C}$ attributable to the disaggregation of metastable nanospheres that then evolved into fibrillar gel in an exothermic transition to higher temperature (75°C). In the case of Fmoc-GG, both endothermic and exothermic peaks were much weaker, consistently with a lower tendency to form gels (Figure 9.19a). The mixtures of Fmoc-FF and Fmoc-GG showed different and more complex profiles, with two acute endothermic peaks and a more intense exothermia, consistent with a more extensive gel formation. The acute endothermic peaks at $\sim 44^\circ\text{C}$ and $\sim 50^\circ\text{C}$ could be attributed to the appearance of small amorphous aggregates. The fact that the peak at $\sim 44^\circ\text{C}$ appeared only in mixtures and that its relative intensity with the other peak varies with the relative ratio of Fmoc-FF and Fmoc-GG, suggests the formation of mixed aggregates. For Fmoc-FF and Nap-GG mixtures (Figure 9.19b), while the individual Nap-GG peptide showed no transitions, according to its weak aggregation character, mixtures showed significant exothermic peaks indicating the formation of gels. However, acute endothermic peaks only appeared weakly for the 1:1 mixture, which in fact shows a stronger gel formation. These results support the hypothesis that the assembly of peptides in mixed hydrogels was promoted by the formation of precursors of mixed aggregates and agrees with the fluorescence experiments (Figure 9.18c).

9.7. Peptide-based hydrogels applications

This section develops two new types of injectable hydrogels following two different strategies: (i) hybrid hydrogels based on polymer and peptides, injectable at the pregel stage; (ii) supramolecular magnetic hydrogels combining in a single system the advantages of injectability through a self-healing process with the ability to remotely modulate their mechanical properties by applying an external magnetic field.

9.7.1. Materials and methods

Preparation of peptide hydrogels

To prepare the peptide hydrogels, the protocols previously described in section 9.6 were followed. First, we weighted the desired amount of Fmoc-FF and deionised water was added up to a final concentration of 20 mM. Then the suspension was sonicated in an ultrasound bath (HSt Powersonic 603) to achieve a homogeneous dispersion of the peptide. Then, we added small amounts of a 0.5 M NaOH solution until a clear solution was obtained at a pH of about 10.5. On the other hand, the appropriate amount of Fmoc-RGD was solved in deionised water at a concentration of 20 mM. To prepare Fmoc-FF/Fmoc-RGD solutions, they were mixed at a ratio of 7:3, while for pure Fmoc-FF hydrogels (without Fmoc-RGD), the Fmoc-FF peptide solution was mixed with water at a ratio 7:3. Finally, gelation was induced by adding an equal volume of a 50:50 mixture of DMEM and water. To prepare magnetic hydrogels, the above protocol was slightly modified by adding the desired amount of NP1 (see section 9.2) to the peptide solution before adding DMEM, at a concentration of 0.1 % v/v. In some cases, the formation of elongated anisotropic structures of NP1 was induced by the application of a magnetic field ($H = 15 \text{ kA/m}$) during the first hour of gelation.

Preparation of hybrid fibrin-peptide hydrogels

Fibrin hydrogels (control) were prepared by mixing 3.8 mL of human plasma, 875 μL of DMEM, 75 μL of amchafibrin (anti-fibrinolytic agent) and 250 μL of a solution of CaCl_2 at 2% in PBS (phosphate buffer salt) to promote fibrin gelation up to a final volume of 5 mL. In the case of fibrin-peptide hybrid hydrogels, the fibrin precursor was mixed with the peptide solution (previous section) and an additional amount of DMEM equal to the peptide volume (to promote gelation of Fmoc-FF), at proportions (3:1) and (6:1). Finally, the mixture was left to stand overnight at 37 °C to ensure complete gelation. To prepare the nanostructured hybrid hydrogels, they were placed between a pair of nylon filter membranes and a couple of pieces of absorbent paper. The hydrogels were then compressed for 3 minutes under a uniform mechanical pressure of 500 g evenly distributed.

Characterization of the structural and mechanical properties

The microstructure of the hydrogels was analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) using a FEI Quanta 400 SEM electron microscope.

Hydrogel gelation kinetics were analyzed using a controlled stress rheometer Haake MARS III (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.) provided with a double cone-plate geometry. To this end, the gelling sample was subjected to a fixed shear strain amplitude of $\gamma_0 = 0.001$ and a fixed frequency of 1 Hz, monitoring the resulting viscoelastic moduli as a function of time and at a constant temperature of 37°C. For peptide hydrogels, self-healing behavior was investigated by breaking them with a vortex mixer, then they were inserted into a syringe with a 20G gauge needle and were injected into the measuring system of the rheometer. The mechanical properties of the hydrogels under oscillatory shear forces were characterized using the same rheometer provided with a 35 mm diameter plate-plate geometry and rough surfaces to prevent slippage of the samples and at a constant temperature of 37°C. To analyze the shear modulus (G) of these hydrogels, shear force sweep tests of 0.1 to 300 Pa were carried out. In addition, the mechanical properties of hybrid hydrogels under tensile stress were characterized using a Discovery hybrid rheometer (DHR1, TA Instruments). The hydrogels were fixed with the rheometer clamps and subjected to increasing axial deformations at a constant speed of 50 $\mu\text{m/s}$ until the sample broke at room temperature. Then, Young's modulus was obtained from these experiments.

Ex vivo biocompatibility

For peptide hydrogels, normal human osteoblasts were added (hOB #35, pass 8) scattered at complete αMEM . A density of 1 million cells per culture well was chosen and samples were grown under standard culture conditions during two different culture periods of 12 and 38 days. At the end of each period, samples were examined after staining with hematoxylin and eosin (HE). For hybrid hydrogels, a dispersion of fibroblasts derived from human skin (pass 13) from healthy donors in DMEM at the bottom of culture wells was grown at a density of 15000 cells per culture well and remained in culture for 24 h. Then, the hydrogels were kept in contact with the cultured cells and remained in contact for 48h. Finally, the hydrogels were removed and the cells underwent a live/dead cell viability test and a water-soluble tetrazolium salt (WST-1) test. In all cases, hydrogels without cells at the bottom of the culture well were used as control. In addition, cells grown in wells without contact with hydrogels were used as a positive technical control, while cells grown in wells and incubated with Triton X-100 at 2 % were used as a negative control.

In vivo biocompatibility

First, both the biocompatibility of NP1 magnetic particles and peptide hydrogels were evaluated in 12 BALB/c laboratory mice. The animals were deeply anesthetized with ketamine and acepromazine, and four subcutaneous injections were made in each mouse (one per condition studied) consisting each one of 300 μL of (i) saline solution (used as control), (ii) NP1 diluted in saline solution (0.1 % v/v), (iii) FF+RGD hydrogel, and (iv) hydrogel of FF+RGD+NP1 (0.1 % v/v of NP1). Six animals were sacrificed by intraperitoneal injection of a euthanasia solution after 7 or 30 days, and the main organs (spleen, liver, kidney, heart and lung), together with each of the four injection areas, were histologically analyzed. As a control, a BALB/c mouse without implants was used for each of the two follow-up periods. Similarly, *in vivo* biocompatibility of hybrid hydrogels was evaluated in 6 laboratory rats. Four subcutaneous injections were performed in each rat (one per condition studied), each consisting of 500 μL of (i) saline solution (used as control), (ii) fibrin hydrogel, (iii) fibrin-peptide hydrogel (6:1), and (iv) fibrin-peptide hydrogel (3:1). Three animals were slaughtered by intraperitoneal injection of a euthanasia solution after 7 or 21 days, and major organs along with each of the four injection areas were histologically analyzed.

9.7.2. Results and discussion

Peptide-based hydrogels characterization

As seen in Figure 9.20a, gel kinetics revealed that G' increased abruptly over time from the beginning of measurement and continued to increase more softly after a few minutes, which can be attributed to rapid gel formation. As shown in Figure 9.20b, these samples exhibited a boundary behavior between weak gels ($0.1 < \tan(\delta) < 1$) and strong gels ($\tan(\delta) < 0.1$) with similar gelation kinetics among different conditions. Comparison of viscoelastic moduli for different samples (Figure 9.20c) shows that Fmoc-FF hydrogels exhibited the weakest response (smaller values of G' and G'' within the LVR) and the addition of Fmoc-RGD resulted in a slight improvement, while the addition of NP1 significantly improved the strength of the hydrogels by inducing an increase of almost 7 times in G' and G'' . However, the application of a magnetic field during gelation (sample FF+RGD+NP1+H) results in a large decrease of G' and G'' compared to samples gelled in the absence of a magnetic field (sample FF+RGD+NP1). In addition, it was studied whether hydrogels recover their gel characteristics after being injected through a syringe. To this end, the hydrogels were injected directly in the rheometer measuring system and the evolution of the viscoelastic moduli was monitored as a function of time. Figure 9.20d shows that all conditions showed a constant increase of G' after injection, although only the sample subjected to a magnetic field during this process achieved values of G' of the same order of magnitude as those before injection, probably due to the combined effect of magnetic attraction between particles and the recovery of supramolecular interactions between peptides. Although pre-injection values were not fully recovered, the hydrogels showed a clear self-healing behavior.

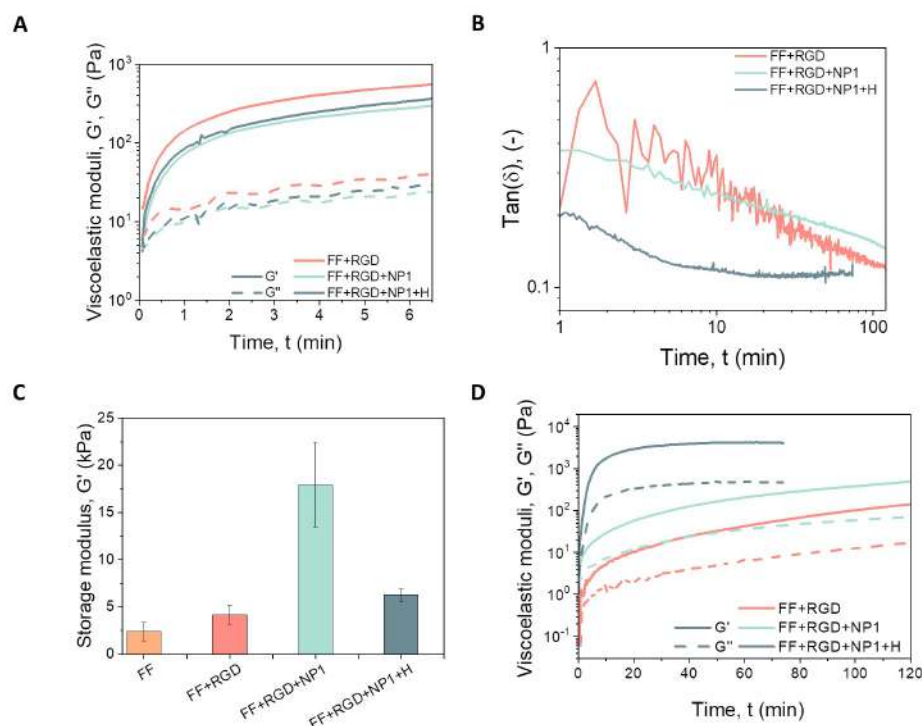


Figure 9.20: Representative curves of the (a) viscoelastic moduli (G' and G'') and (b) loss tangent as a function of the gelation time of the hydrogels. (c) Average values of the storage modulus in the LVR for the different peptide hydrogels. (d) Representative curves of G' and G'' as a function of the self-healing time of the hydrogels after injection.

To analyze the *ex vivo* biocompatibility of the hydrogels, 3D cell cultures of osteoblasts were prepared in the different experimental groups during two different culture periods (Figure 9.21). First, it should be noted that samples without magnetic particles were completely degraded at 38 days of cell culture and therefore could not be evaluated at this culture time. Visualization with HE staining revealed a statistically significant increase in the number of cells between day 12 and day 38. In both temporal conditions, the addition of RGD and/or NP1 seemed to have a positive effect on cell survival or proliferation. This positive effect of RGD in cell cultures is not surprising, as it is known to be a promoter of cell adhesion [220, 236]. With respect to the role of NP1, and according to our previous results, several previous studies concluded that when magnetic particles are added to polymeric supports for tissue engineering applications, adhesion, proliferation and differentiation of cells *in vitro* is stimulated and even bone formations *in vivo* [56, 57, 237]. In this work, differences between cell proliferation in different samples correlate well with differences in mechanical properties, *i.e.*, stronger hydrogels (greater G') showed a higher number of live cells in a given cell culture period. This result is not unexpected, given that cells are sensitive to the mechanical properties of the environment around them. In fact, adequate mechanical properties are often considered an essential feature for the biocompatibility of biomaterials [238].

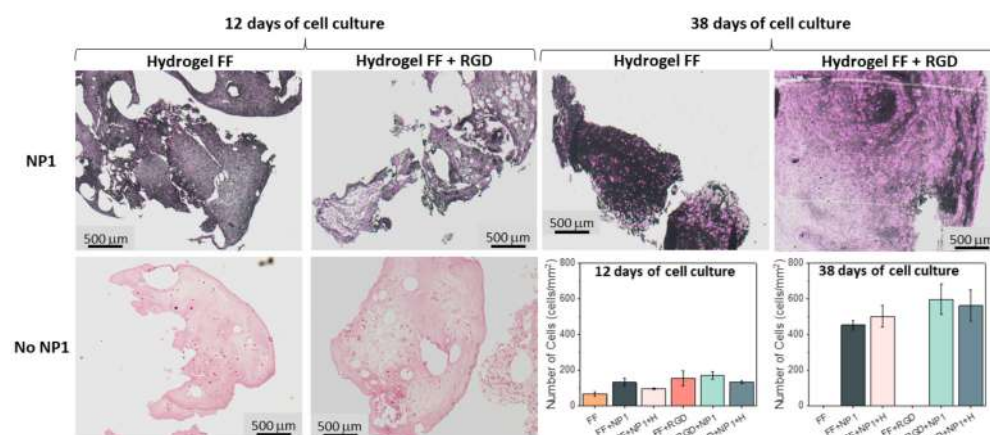


Figura 9.21: Hematoxylin and eosin staining. Bright pink dots represent cells. Pale pink areas are hydrogels that do not contain magnetic nanoparticles (NP1). Hydrogels containing NP1 are mostly dark in color. NP1: hydrogels containing NP1; No NP1: hydrogels without NP1. It should be noted that hydrogels that do not contain NP1 were completely degraded at 38 days of cell culture, which made histochemical analysis impossible. The photographs are representative images of each experimental condition. The data in the graphs represent the average values $\pm$ the standard errors of the cell count of four different cross sections of a single hydrogel.

Regarding the *in vivo* biocompatibility, the mice that received implants did not show detectable signs of systemic alterations determined by hematological tests. In addition, histological methods showed that the implants were not associated with significant structural alterations in any organ after 1 week and 1 month (Figure 9.22a). None of the organs showed microscopic signs of magnetic particle migration or detectable alterations. These results suggest that the particles and the different hydrogels analyzed here were safe for the host animal and were not associated with any systemic side effects. In addition, implant sites were analyzed for local effects of each injected condition. As found in hematological and histological studies of organs, the results confirmed the biocompatibility of particles and hydrogels, as well as that none of the injected animals showed histological signs of inflammation, infection, necrosis, bleeding or tumorigenesis one week and one month after injection (Figure 9.22b). It should also be noted that no signs of NP1 corrosion were observed in any of the implants. The implant areas in which NP1 was injected dispersed in saline showed a thin subcutaneous layer consisting of NP1 that occupied a relatively large area of subcutaneous tissue, although no particles were observed in other neighboring structures. Interestingly, after a month, NP1 was encapsulated by dense connective tissue. In FF+RGD hydrogel implants, injected materials were detectable at the implant site, where they formed a homogeneous fibrillary structure restricted to the injection site in subcutaneous tissue after one week. However, the hydrogel was completely reabsorbed and was not detected in the samples examined after one month. When FF+RGD+NP1 hydrogels were implanted subcutaneously, it was found that the particles remained concentrated in the injection site after a week and did not disperse to neighbouring tissues. The findings after a month were very similar, although it was found that the host cells could encapsulate the implanted

material subcutaneously and migrate within the material. Finally, as seen in Figure 9.22c, both magnetic and non-magnetic hydrogels maintain their homogeneity after injection, without appreciable signs of phase separation. In addition, the application of a non-contact magnetic field allows the controlled displacement of magnetic hydrogels through a maze without phase separation, a property that is potentially useful in biomedical applications [74, 209–211].

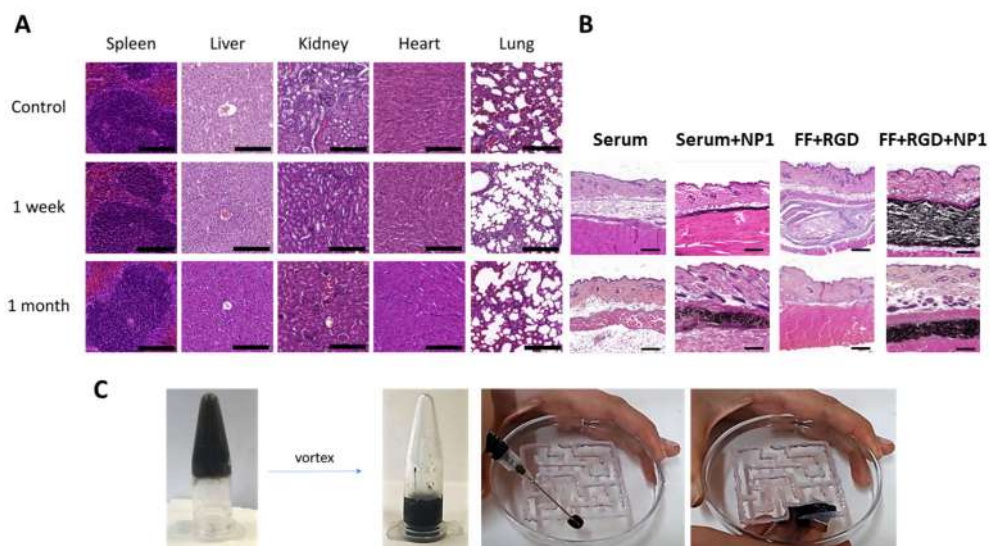


Figura 9.22: Histological analysis with hematoxylin and eosin staining of (a) five main organs in mice (spleen, liver, kidney, heart and lung) and (b) the implant area, one week and one month after injection *in vivo*. Each animal in the one-week and one-month groups was injected with NP1 dispersed in saline solution (serum+NP1), a hydrogel of FF+RGD and a hydrogel of FF+RGD+NP1 in different regions of the dorsal area, while controls were non-injected native mice. Scale bar, 200 μm . The photographs are representative images of each experimental condition. (c) Injection test. Image of a magnetic hydrogel formed in an Eppendorf tube before and after vortex breakage. Below is the magnetic hydrogel injected and driven through a maze with a magnet.

Characterization of the hybrid fibrin-peptide hydrogels

First, SEM images of fibrin and fibrin-peptide hydrogels (Figure 9.23a,b) showed a porous three-dimensional network formed by fibres. Both hydrogels, with and without peptides in their composition, showed a very similar internal structure and fibre morphology, indicating that peptides were well integrated into fibrin fibers. However, an increase in porosity was observed when peptides were included in the composition of hydrogels. Thus, it can be clearly observed that in Figure 9.23a a higher density of fibers appeared, compared to the network of Figure 9.23b. Thus, in Figure 9.23c-e, it can be observed that fibrin-peptide hydrogels had a better consistency than fibrin hydrogels. This is related to SEM microscopy images, as the higher porosity given by the presence of peptides can cause hydrogels to retain more liquid and show greater mass, better consistency and higher resistance to an external force. This may be due to the polyanionic character of Fmoc-FF peptides, which at physiological pH may be partially ionized. Electronic repulsion can be responsible for increased porosity in these gels and increased water retention.

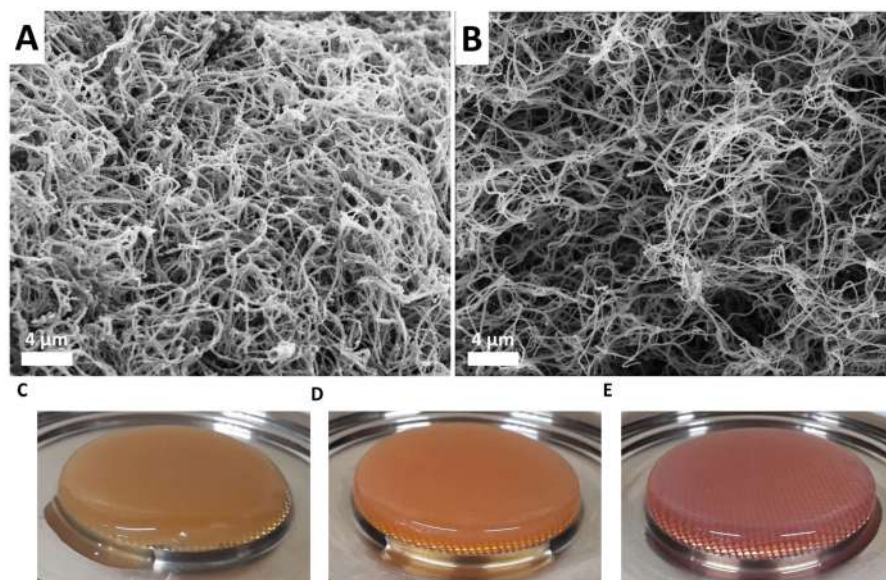


Figura 9.23: Representative SEM images of a hydrogel of (a) fibrin and (b) fibrin+FF+RGD (6:1). Macroscopic appearance of a freshly prepared hydrogel of (c) fibrin, (d) fibrin+FF (6:1), and (e) fibrin+FF (3:1).

Then, the evolution of the viscoelastic moduli was followed as a function of time to study the gelation kinetics of the hydrogels. The loss tangent curves showed that the complete gelation of fibrin hydrogels was faster compared to those containing peptides in their composition. However, fibrin hydrogels had final values of $\tan(\delta) \approx 0.1$, while fibrin-peptide hydrogels had values of $\tan(\delta) < 0.1$, which corresponds to a typical behavior of strong gels compared to those of fibrin (Figure 9.24a). While fresh hydrogels (freshly prepared, without nanostructuring) showed small differences in their mean values

of the storage modulus (G') within the linear viscoelastic region (LVR), after plastic compression, nanostructured hydrogels containing peptides in their formulation reached G' values of an order of magnitude greater than those of fibrin (Figure 9.24b). In addition, the shear modulus (G) of these hydrogels ranges from 0.13 kPa for nanostructured fibrin hydrogels to 16 kPa for peptide-containing hydrogels, that is, the inclusion of peptides in the formulation improved the shear modulus of nanostructured hydrogels in two orders of magnitude (Figure 9.24c). Likewise, Figure 9.24d shows how Young's modulus decreased when peptides were included for fresh hydrogels, while higher and more similar values were obtained after nanostructuring. It should be noted that high values of $E \approx 100$ kPa were obtained for fibrin+FF hybrid hydrogels at a proportion (6:1) and even higher for those that include Fmoc-RGD in that proportion.

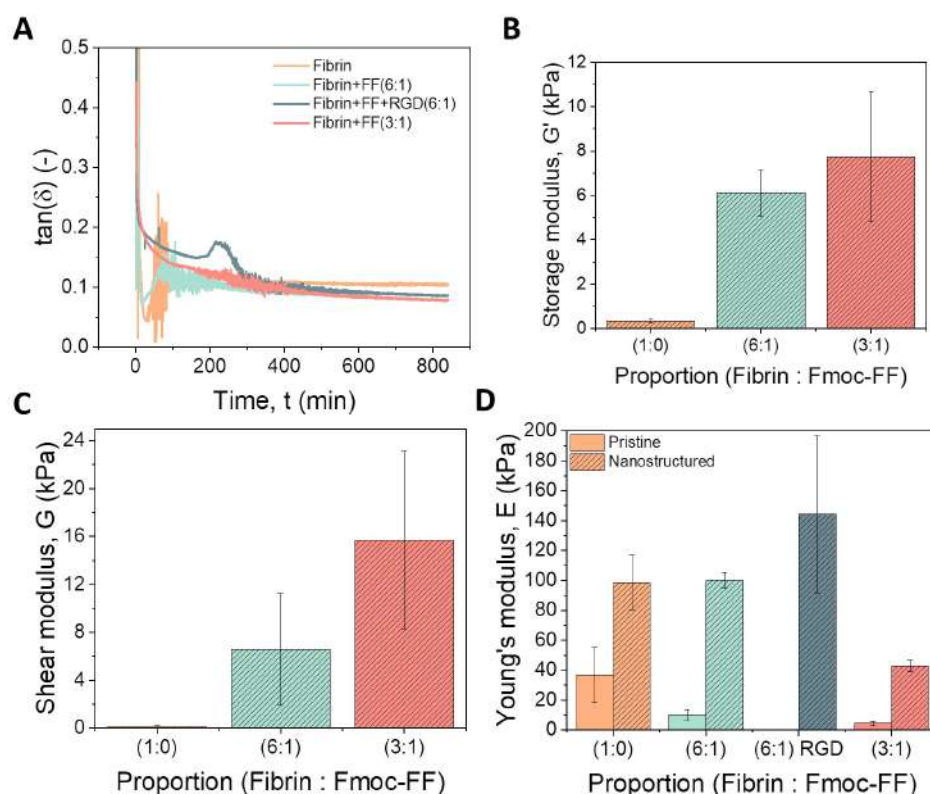


Figure 9.24: (a) Loss tangent as a function of the gelation time of the different hydrogels. Mean values of the (b) storage modulus (G') within the LVR and (c) shear modulus (G) for the different nanostructured hydrogels. (d) Young's modulus (E) for the different hydrogels before and after nanostructuring.

With regards to *ex vivo* biocompatibility, from the Live/Dead analysis it became clear that the inclusion of Fmoc-RGD in the formulation of fibrin-peptide hybrid hydrogels resulted in a large increase in the number of live cells (Figure 9.25a,b), compared to those hybrid hydrogels containing only the peptide Fmoc-FF in their composition. In fact, the addition of Fmoc-FF (without Fmoc-RGD) resulted in a reduction in the number of live

cells compared to positive control cell cultures and those in contact with fibrin hydrogels. Regarding the role of peptides, the best results were obtained for those hydrogels in which the peptides were in a small proportion (6:1) with respect to fibrin. In addition, the WST-1 tests (Figure 9.25c) show that there were no statistical significant differences between fibrin hydrogels and fibrin-peptide hydrogels (6:1) containing Fmoc-RGD. In contrast, fibrin-peptide hydrogels (6:1) without Fmoc-RGD and fibrin-peptide hydrogels in proportion (3:1) significantly reduced cell viability. Even so, the inclusion of Fmoc-RGD improved cell viability in the two studied proportions of hybrid hydrogels, compared with those gels that included only the Fmoc-FF peptide. Therefore, the inclusion of a small amount of peptides in the formulation of hybrid hydrogels created a good environment for cell viability and a great enhancement in their mechanical properties, which is considered essential for a potential use in biomedical applications [238].

Finally, to determine the *in vivo* biocompatibility of the hybrid hydrogels, the different conditions studied were injected subcutaneously into laboratory rats. The different precursor mixtures were found to be capable of gelling once injected into petri dishes as a test. After a few hours from their injection through the syringe, all conditions formed gels in the petri dishes where they were injected. The implanted animals showed no detectable signs of systemic alterations determined by hematological tests. In addition, both the main organs and the implant areas, were analyzed to look for local effects of each injected condition. In no case were found traces of hydrogels injected into the implant areas, which degraded over time. Therefore, these preliminary results suggest that the different hydrogels analyzed were safe for the host animal and were not associated with any systemic side effects.

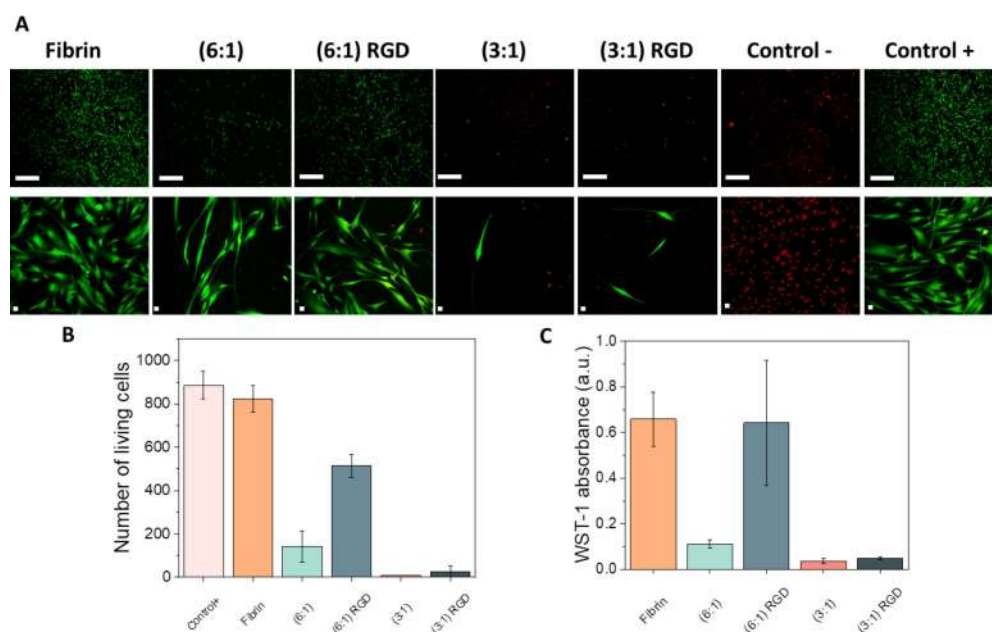


Figura 9.25: (a) Microscopy images of cells in Live/Dead tests. Scale bar 200 μm . Statistical analysis of (b) the number of live cells in the Live/Dead assays and (c) the WST-1 assays.

9.8. Conclusions

The main goal of this work was the preparation of injectable magnetic hydrogels, based on short-chain peptides and/or polymers, having a microstructure and mechanical properties suitable for their use in both, technological and biomedical applications as extracellular matrices for regenerative medicine and tissue engineering. To this end, a broad spectrum of peptide and polymeric magnetic hydrogels was synthesized, the effect of the inclusion of different types of magnetic particles with different functionizations was analyzed, the internal structure of the hydrogels was modified by changing the nature of the fibres and their arrangement, and the resulting mechanical properties were studied. This thesis has been divided into three parts, of which:

The **first** part of the thesis consisted of the functionalization of iron particles for their later use as a magnetic phase in alginate and peptide hydrogels. The main conclusions of this first part of the thesis are the following:

1. It was possible to modify the surface of micron and nanosized iron particles by introducing different functionizations on its surface, ranging from amine to phenyl groups.
2. It was possible to enhance the macroscopic (integrity) and mechanical (viscoelastic moduli) properties of alginate hydrogels by polymer interactions with the functionalized surface of iron microparticles, especially those with amine groups.
3. Due to the attractive interaction between the carboxyl groups of the peptide Fmoc-FF and the protonated amine groups of the particles coated with APTES, supramolecular peptide hydrogels with better mechanical properties than those in which PEG particles are functionalized could be obtained.
4. The functionalization of the particles' surface is crucial in determining the toxicity of the particles, which in turn influences the subsequent biocompatibility of the magnetic hydrogels for their use in biomedical applications.
5. The lack of an adequate chemical functionalization limits the interaction between the magnetic particles and the hydrogel fibres. Therefore, the correct functionalization of the particles can be used for the modulation of the final properties of the resulting magnetic hydrogels.

In the **second** part of the thesis magnetic alginate-based hydrogels have been studied. To this end, the work was divided into three sections: (i) isotropic alginate hydrogels (with a homogeneous dispersion of the magnetic phase), (ii) anisotropic alginate hydrogels (with an internal structure of the network and/or the magnetic phase), (iii) biomedical and technological applications of magnetic alginate hydrogels. The main conclusions drawn from this second part of the thesis are as follows:

1. It was possible to produce macroscopically homogeneous magnetic alginate hydrogels containing a volume fraction of micron-sized iron particles up to 0.33 by a two-step protocol.

2. The experimental results showed a great enhancement of the viscoelastic moduli with the concentration of magnetic particles.
3. It has been shown that the behaviour of dependence of the viscoelastic moduli with the particle concentration is due to the formation of particle aggregates, whose volume is greater than the total volume of individual particles, finding an empirical equation that fits this dependence.
4. An intense increase in viscoelastic moduli with the intensity of the applied magnetic field has been found, especially for high magnetic particle volume fractions. It has been discovered that the aggregates of particles formed in the preparation stage of isotropic alginate hydrogels may be behind this effect.
5. Anisotropic alginate hydrogels were prepared following two different procedures: (i) controlled partial dehydration processes; (ii) application of external magnetic fields. Two processes of partial dehydration controlled by efforts to create the desired anisotropy were investigated, characterized by the type of effort applied during dehydration: tensile stress or compressive stress.
6. Partial dehydration processes resulted in appreciable changes in the arrangement of polymers at the microscopic level that correlate with changes in the mechanical properties of the hydrogels.
7. The mechanical properties of hydrogels were influenced not only by the loss of water and the final concentration of the polymer, but also by the dehydration protocol, which seemed to induce the formation of new stable bonds between the polymer fibres as a result of the dehydration under stress.
8. Anisotropy can be easily achieved in magnetic hydrogels by applying an external magnetic field, creating microscopically aligned particle structures, and thus avoiding the problems arising from the partial dehydration of the hydrogels in terms of possible loss of porosity.
9. It is possible to prepare isotropic actuators based on cross- and worm-shaped alginate hydrogels, whose magnetic parts were progressively flexed at higher angles as the applied magnetic field strength increased. It is possible to obtain a better bending response for cross-shaped hydrogels by increasing the concentration of particles.
10. The alignment of the magnetic particles in chain-like structures, and the anisotropy generated in the resulting hydrogels, allowed obtaining different complex movements, which is an advantage for the application of these materials as soft magnetic actuators. An appropriate combination of the morphology of the hydrogels with the disposition of the particles was crucial to obtain complex movements.
11. It is possible to inject magnetic alginate hydrogels by adapting the preparation protocol, which gives these materials the capacity to be implemented *in vivo*.

The **third** part of the thesis is devoted to the study of hydrogels based on short-chain peptides. To do this, a thorough analysis of the process of formation of these

hydrogels has been carried out through the coaggregation of the peptides. Subsequently, peptide-based hydrogels have been developed for use in biomedical applications. The main conclusions of this third part of the thesis are the following:

1. The co-assembling behavior of Fmoc-FF in water and at room temperature was evaluated, in the presence of different dipeptides with Fmoc- and Nap-groups. These peptides had a strong tendency to interact with each other in solution at high pH to form hybrid intermediate states that were responsible for the final composition of the fibres.
2. The partial replacement of Fmoc-FF by other dipeptides resulted in a strong enhancement of their storage modulus.
3. The ratio between both monomers determines the self-assembly kinetics and the arrangement of both monomers within the copolymer. The great tendency of these dipeptides to form co-assemblages opens the path to develop a variety of supramolecular copolymers that have different characteristics and gels that also have novel properties, expanding the scope and interest of these soft materials.
4. The inclusion of magnetic particles in the supramolecular matrix significantly increased the strength and stability of peptide hydrogels and, at the same time, improved the injectability properties through a process of shear-thinning and self-healing.
5. These peptide hydrogels were tested as scaffolds for 3D growth of osteoblasts and the results showed that they not only promoted cell growth, but also did not degrade after 30 days of culture.
6. The injectability of the peptide hydrogels was evaluated *in vivo* by subcutaneous injections in mice. These hydrogels remained localized in the injection area without degrading until one month after administration. During this time, hydrogels produced no toxicity and promoted cell growth and cell migration through the hydrogel matrix.
7. The ability of magnetic peptide hydrogels to be controlled in response to non-contact magnetic forces was evaluated, making them potential candidates for trapping and administering sensitive loads, such as cells, with a minimally invasive route of administration.
8. The mixture of fibrin and peptides for the creation of hybrid hydrogels significantly enhanced the internal structure and mechanical properties of fibrin hydrogels or other mixtures previously studied as fibrin-agarose.
9. An adequate ratio between fibrin and peptides led to adequate cell viability and proliferation for use in tissue engineering. In addition, it was possible to inject a precursor mixture of these hydrogels that gelled in the implant area. The hydrogels degraded in less than a week without producing toxicity.

Bibliografía

- [1] E. Caló and V. V. Khutoryanskiy. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65:252–267, 2015.
- [2] R. Langer. New methods of drug delivery. *Science*, 249(4976):1527–1533, 1990.
- [3] S. Mitragotri and J. Lahann. Physical approaches to biomaterial design. *Nature Materials*, 8(1):15–23, 2009.
- [4] H. Yang, S. B. Hong, C. W. Park, K. Lee, Y. S. Choi, J. Yu, B. Seo, and J. Moon. Magnetic adsorbents embedded in hydrogel bead for surface decontamination. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(8):8569–8574, 2016.
- [5] A. K. Gaharwar, N. A. Peppas, and A. Khademhosseini. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(3):441–453, 2013.
- [6] A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, I. A. Rodriguez, V. Carriel, J. A. Marins, A. Zubarev, J. D. G. Duran, and M. T. Lopez-Lopez. Effect of particle concentration on the microstructural and macromechanical properties of biocompatible magnetic hydrogels. *Soft Matter*, 13(16):2928–2941, 2017.
- [7] N. W. Choi, M. Cabodi, B. Held, J. P. Gleghorn, L. J. Bonassar, and A. D. Stroock. Microfluidic scaffolds for tissue engineering. *Nature Materials*, 6(11):908–915, 2007.
- [8] A. Atala, S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo, and A. B. Retik. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *The Lancet*, 367(9518):1241–1246, 2006.
- [9] N. Boucard, C. Viton, D. Agay, E. Mari, T. Roger, Y. Chancerelle, and A. Domard. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*, 28(24):3478–3488, 2007.
- [10] R. Hua and Z. Li. Sulfhydryl functionalized hydrogel with magnetism: Synthesis, characterization, and adsorption behavior study for heavy metal removal. *Chemical Engineering Journal*, 249:189–200, 2014.
- [11] Ruijiao Dong, Yan Pang, Yue Su, and Xinyuan Zhu. Supramolecular hydrogels: synthesis, properties and their biomedical applications. *Biomaterials Science*, 3(7):937–954, 2015.

- [12] J. Y. C. Lim, Q. Lin, K. Xue, and X.J. Loh. Recent advances in supramolecular hydrogels for biomedical applications. *Materials Today Advances*, 3:100021, 2019.
- [13] C. D. Jones and J. W. Steed. Gels with sense: supramolecular materials that respond to heat, light and sound. *Chemical Society Reviews*, 45(23):6546–6596, 2016.
- [14] A. Wang, W. Shi, J. Huang, and Y. Yan. Adaptive soft molecular self-assemblies. *Soft Matter*, 12(2):337–357, 2016.
- [15] M. C. Koetting, J. T. Peters, S. D. Steichen, and N. A. Peppas. Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 93:1–49, 2015.
- [16] H. R. Culver, J. R. Clegg, and N. A. Peppas. Analyte-responsive hydrogels: Intelligent materials for biosensing and drug delivery. *Accounts of Chemical Research*, 50(2):170–178, 2017.
- [17] A. Luchini, D. H. Geho, B. Bishop, D. Tran, C. Xia, R. L. Dufour, C. D. Jones, V. Espina, A. Patanarut, W. Zhou, M. M. Ross, A. Tessitore, E. F. Petricoin, and L. A. Liotta. Smart hydrogel particles: biomarker harvesting: one-step affinity purification, size exclusion, and protection against degradation. *Nano Letters*, 8(1):350–361, 2007.
- [18] L. Yan, Z. Zhu, Y. Zou, Y. Huang, D. Liu, S. Jia, D. Xu, M. Wu, Y. Zhou, S. Zhou, and C. J. Yang. Target-responsive “sweet” hydrogel with glucometer readout for portable and quantitative detection of non-glucose targets. *Journal of the American Chemical Society*, 135(10):3748–3751, 2013.
- [19] M. T. Lopez-Lopez, J. D. G. Durán, L. Yu. Iskakova, and A. Zubarev. Mechanics of magnetopolymer composites: A review. *Journal of Nanofluids*, 5(4):479–495, 2016.
- [20] R. Weeber, M. Hermes, A. M. Schmidt, and C. Holm. Polymer architecture of magnetic gels: a review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 30(6):063002, 2018.
- [21] R. Messing, N. Frickel, L. Belkoura, R. Strey, H. Rahn, S. Odenbach, and A. M. Schmidt. Cobalt ferrite nanoparticles as multifunctional cross-linkers in PAAm ferrohdrogels. *Macromolecules*, 44(8):2990–2999, 2011.
- [22] P. Ilg. Stimuli-responsive hydrogels cross-linked by magnetic nanoparticles. *Soft Matter*, 9(13):3465, 2013.
- [23] X. Zhao, J. Kim, C. A. Cezar, N. Huebsch, K. Lee, K. Bouhadir, and D. J. Mooney. Active scaffolds for on-demand drug and cell delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1):67–72, 2010.
- [24] N. A. Jalili, M. Muscarello, and A. K. Gaharwar. Nanoengineered thermoresponsive magnetic hydrogels for biomedical applications. *Bioengineering & Translational Medicine*, 1(3):297–305, 2016.

- [25] M. C. Mañas-Torres, C. Gila-Vilchez, J. D.G. Durán, M. T. Lopez-Lopez, and L. Álvarez de Cienfuegos. Biomedical applications of magnetic hydrogels. In *Magnetic Nanoparticle-Based Hybrid Materials*, pages 253–271. Elsevier, 2021.
- [26] S. R. S. Veloso, R. G. D. Andrade, and E. M. S. Castanheira. Review on the advancements of magnetic gels: towards multifunctional magnetic liposome-hydrogel composites for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 288:102351, 2021.
- [27] R. Contreras-Montoya, A. B. Bonhome-Espinosa, A. Orte, D. Miguel, J. M. Delgado-López, J. D. G. Duran, J. M. Cuerva, M. T. Lopez-Lopez, and L. Álvarez de Cienfuegos. Iron nanoparticles-based supramolecular hydrogels to originate anisotropic hybrid materials with enhanced mechanical strength. *Materials Chemistry Frontiers*, 2(4):686–699, 2018.
- [28] Y. Touitou and B. Selmaoui. The effects of extremely low-frequency magnetic fields on melatonin and cortisol, two marker rhythms of the circadian system. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 14(4):381–399, 2012.
- [29] O. Ziv-Polat, Skaat, Shahar, and S. Margel. Novel magnetic fibrin hydrogel scaffolds containing thrombin and growth factors conjugated iron oxide nanoparticles for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, page 1259, 2012.
- [30] T. Mitsumata and N. Abe. Magnetic-field sensitive gels with wide modulation of dynamic modulus. *Chemistry Letters*, 38(9):922–923, 2009.
- [31] H. An, S. J. Picken, and E. Mendes. Enhanced hardening of soft self-assembled copolymer gels under homogeneous magnetic fields. *Soft Matter*, 6(18):4497, 2010.
- [32] T. Mitsumata, A. Honda, H. Kanazawa, and M. Kawai. Magnetically tunable elasticity for magnetic hydrogels consisting of carrageenan and carbonyl iron particles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(40):12341–12348, 2012.
- [33] N. Bock, A. Riminucci, C. Dionigi, A. Russo, A. Tampieri, E. Landi, V. A. Goranov, M. Marcacci, and V. Dediu. A novel route in bone tissue engineering: Magnetic biomimetic scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 6(3):786–796, 2010.
- [34] O. Ozay, S. Ekici, Y. Baran, N. Aktas, and N. Sahiner. Removal of toxic metal ions with magnetic hydrogels. *Water Research*, 43(17):4403–4411, 2009.
- [35] M. T. Lopez-Lopez, G. Scionti, A. C. Oliveira, J. D. G. Duran, A. Campos, M. Alaminos, and I. A. Rodriguez. Generation and characterization of novel magnetic field-responsive biomaterials. *PLOS ONE*, 10(7):e0133878, 2015.
- [36] L. Rodriguez-Arco, I. A. Rodriguez, V. Carriel, A. B. Bonhome-Espinosa, F. Campos, P. Kuzhir, J. D. G. Duran, and M. T. Lopez-Lopez. Biocompatible magnetic core-shell nanocomposites for engineered magnetic tissues. *Nanoscale*, 8(15):8138–8150, 2016.
- [37] J. Qin, I. Asempah, S. Laurent, A. Fornara, R. N. Muller, and M. Muhammed. Injectable superparamagnetic ferrogels for controlled release of hydrophobic drugs. *Advanced Materials*, 21(13):1354–1357, 2009.

- [38] M. K. Shin, S. I. Kim, S. J. Kim, S. Y. Park, Y. H. Hyun, Y. Lee, K. E. Lee, S. Han, D. Jang, Y. Kim, Z. Cho, I. So, and G. M. Spinks. Controlled magnetic nanofiber hydrogels by clustering ferritin. *Langmuir*, 24(21):12107–12111, 2008.
- [39] M. T. López-López, J. D. G. Durán, M. Alaminos, I. A. Rodríguez, and G. Scionti. Elaboración de tejidos artificiales que comprenden partículas magnéticas. *World Patent*, 2016.
- [40] G. Beaune and C. Ménager. In situ precipitation of magnetic fluid encapsulated in giant liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 343(1):396–399, 2010.
- [41] Y. Liang, L. Zhang, W. Jiang, and W. Li. Embedding magnetic nanoparticles into polysaccharide-based hydrogels for magnetically assisted bioseparation. *ChemPhysChem*, 8(16):2367–2372, 2007.
- [42] S. J. Dyke, B. F. Spencer, M. K. Sain, and J. D. Carlson. Modeling and control of magnetorheological dampers for seismic response reduction. *Smart Materials and Structures*, 5(5):565–575, 1996.
- [43] A. Occhiuzzi, M. Spizzuoco, and G. Serino. Experimental analysis of magnetorheological dampers for structural control. *Smart Materials and Structures*, 12(5):703–711, 2003.
- [44] A. Boczkowska and S. F. Awietjan. Tuning active magnetorheological elastomers for damping applications. *Materials Science Forum*, 636-637:766–771, 2010.
- [45] B. Lundberg and B. Sundqvist. Resistivity of a composite conducting polymer as a function of temperature, pressure, and environment: Applications as a pressure and gas concentration transducer. *Journal of Applied Physics*, 60(3):1074–1079, 1986.
- [46] M. P. B. van Bruggen and J. B. A. van Zon. Theoretical description of a responsive magneto-hydrogel transduction principle. *Sensors and Actuators A: Physical*, 158(2):240–248, 2010.
- [47] S. Ha, Y. Yang, Y. S. Kim, S. Kim, Y. J. Kim, and S. M. Cho. Environmental temperature-independent gas sensor array based on polymer composite. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108(1-2):258–264, 2005.
- [48] C. A. Dreiss. Hydrogel design strategies for drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 48:1–17, 2020.
- [49] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, and R. Langer. Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Advanced Materials*, 18(11):1345–1360, 2006.
- [50] C. Sun, J. S. H. Lee, and M. Zhang. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11):1252–1265, 2008.
- [51] T. Liu, S. Hu, T. Liu, D. Liu, and S. Chen. Magnetic-sensitive behavior of intelligent ferrogels for controlled release of drug. *Langmuir*, 22(14):5974–5978, 2006.

- [52] C. A. Cezar, S. M. Kennedy, M. Mehta, J. C. Weaver, L. Gu, H. Vandenburg, and D. J. Mooney. Biphasic ferrogels for triggered drug and cell delivery. *Advanced Healthcare Materials*, 3(11):1869–1876, 2014.
- [53] S. Kennedy, C. Roco, A. Délérís, P. Spoerri, C. Cezar, J. Weaver, H. Vandenburg, and D. Mooney. Improved magnetic regulation of delivery profiles from ferrogels. *Biomaterials*, 161:179–189, 2018.
- [54] S. R. S. Veloso, E. Tiryaki, C. Spuch, L. Hilliou, C. O. Amorim, V. S. Amaral, P. J. G. Coutinho, P. M. T. Ferreira, V. Salgueiriño, M. A. Correa-Duarte, and E. M. S. Castanheira. Tuning the drug multimodal release through a co-assembly strategy based on magnetic gels. *Nanoscale*, 14(14):5488–5500, 2022.
- [55] M. C. Mañas-Torres, C. Gila-Vilchez, F. J. Vazquez-Perez, P. Kuzhir, D. Momier, J. Scimeca, A. Borderie, M. Goracci, F. Burel-Vandenbos, C. Blanco-Elises, I. A. Rodriguez, M. Alaminos, L. Álvarez de Cienfuegos, and M. T. Lopez-Lopez. Injectable magnetic-responsive short-peptide supramolecular hydrogels: Ex vivo and in vivo evaluation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(42):49692–49704, 2021.
- [56] R. A. Perez, K. D. Patel, and H. Kim. Novel magnetic nanocomposite injectables: calcium phosphate cements impregnated with ultrafine magnetic nanoparticles for bone regeneration. *RSC Advances*, 5(18):13411–13419, 2015.
- [57] R. K. Singh, K. D. Patel, J. H. Lee, E. Lee, J. Kim, T. Kim, and H. Kim. Potential of magnetic nanofiber scaffolds with mechanical and biological properties applicable for bone regeneration. *PLoS ONE*, 9(4):e91584, 2014.
- [58] M. Bañobre-López, Y. Piñeiro-Redondo, R. De Santis, A. Gloria, L. Ambrosio, A. Tampieri, V. Dediu, and J. Rivas. Poly(caprolactone) based magnetic scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Applied Physics*, 109(7):07B313, 2011.
- [59] R. De Santis, A. Gloria, T. Russo, U. D'Amora, S. Zeppetelli, A. Tampieri, T. Herrmannsdörfer, and L. Ambrosio. A route toward the development of 3d magnetic scaffolds with tailored mechanical and morphological properties for hard tissue regeneration: Preliminary study. *Virtual and Physical Prototyping*, 6(4):189–195, 2011.
- [60] M. Marcus, H. Skaat, N. Alon, S. Margel, and O. Shefi. NGF-conjugated iron oxide nanoparticles promote differentiation and outgrowth of PC12 cells. *Nanoscale*, 7(3):1058–1066, 2015.
- [61] F. Xu, C. M. Wu, V. Rengarajan, T. D. Finley, H. O. Keles, Y. Sung, B. Li, U. A. Gurkan, and U. Demirci. Three-dimensional magnetic assembly of microscale hydrogels. *Advanced Materials*, 23(37):4254–4260, 2011.
- [62] S. P. Grogan, D. D. D'Lima, C. W. Jr. Colwell, and S. Jin. In situ tissue engineering using magnetically guided three dimensional cell patterning. *US patent*, 2012.
- [63] E. Radvar, Y. Shi, S. Grasso, C. J. C. Edwards-Gayle, X. Liu, M. S. Mauter, V. Castelletto, I. W. Hamley, M. J. Reece, and H. S. Azevedo. Magnetic field-induced alignment of nanofibrous supramolecular membranes: A molecular design

- approach to create tissue-like biomaterials. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(20):22661–22672, 2020.
- [64] A. J. H. El-Haj and J. P. Dobson. Culturing tissue using magnetically generated mechanical stresses. *US patent*, 2004.
- [65] W. Huang and I. Chu. Injectable polypeptide hydrogel/inorganic nanoparticle composites for bone tissue engineering. *PLOS ONE*, 14(1):e0210285, 2019.
- [66] H. Wu, L. Song, L. Chen, W. Zhang, Y. Chen, F. Zang, H. Chen, M. Ma, N. Gu, and Y. Zhang. Injectable magnetic supramolecular hydrogel with magnetocaloric liquid-conformal property prevents post-operative recurrence in a breast cancer model. *Acta Biomaterialia*, 74:302–311, 2018.
- [67] B. P. Nowak and B. J. Ravoo. Magneto- and photo-responsive hydrogels from the co-assembly of peptides, cyclodextrins, and superparamagnetic nanoparticles. *Faraday Discussions*, 219:220–228, 2019.
- [68] C. Gila-Vilchez, A. B. Bonhome-Espinosa, P. Kuzhir, A. Zubarev, J. D. G. Duran, and M. T. Lopez-Lopez. Rheology of magnetic alginate hydrogels. *Journal of Rheology*, 62(5):1083–1096, 2018.
- [69] X. Ma, Z. Yang, Y. Wang, G. Zhang, Y. Shao, H. Jia, T. Cao, R. Wang, and D. Liu. Remote controlling DNA hydrogel by magnetic field. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(3):1995–2000, 2017.
- [70] F. J. Vazquez-Perez, C. Gila-Vilchez, J. D. G. Duran, A. Zubarev, L. Alvarez de Cienfuegos, L. Rodriguez-Arco, and M. T. Lopez-Lopez. Composite polymer hydrogels with high and reversible elongation under magnetic stimuli. *Polymer*, 230:124093, 2021.
- [71] I. Koonar, C. Zhou, M. A. Hillmyer, T. P. Lodge, and R. A. Siegel. ABC triblock terpolymers exhibiting both temperature- and pH-sensitive micellar aggregation and gelation in aqueous solution. *Langmuir*, 28(51):17785–17794, 2012.
- [72] G. Tae, J. A. Kornfield, and J. A. Hubbell. Sustained release of human growth hormone from in situ forming hydrogels using self-assembly of fluoroalkyl-ended poly(ethylene glycol). *Biomaterials*, 26(25):5259–5266, 2005.
- [73] L. Zhang, E. M. Furst, and K. L. Kiick. Manipulation of hydrogel assembly and growth factor delivery via the use of peptide–polysaccharide interactions. *Journal of Controlled Release*, 114(2):130–142, aug 2006.
- [74] M. Guvendiren, H. D. Lu, and J. A. Burdick. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. *Soft Matter*, 8(2):260–272, 2012.
- [75] L. Shi, Y. Zeng, Y. Zhao, B. Yang, D. Ossipov, C. Tai, J. Dai, and C. Xu. Biocompatible injectable magnetic hydrogel formed by dynamic coordination network. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(49):46233–46240, 2019.
- [76] R. Barbucci, G. Giani, S. Fedi, S. Bottari, and M. Casolaro. Biohydrogels with magnetic nanoparticles as crosslinker: Characteristics and potential use for controlled antitumor drug-delivery. *Acta Biomaterialia*, 8(12):4244–4252, 2012.

- [77] E. Tanasa, C. Zaharia, I. Radu, V. Surdu, B. S. Vasile, C. Damian, and E. Andronescu. Novel nanocomposites based on functionalized magnetic nanoparticles and polyacrylamide: Preparation and complex characterization. *Nanomaterials*, 9(10):1384, 2019.
- [78] S. Čampelj, D. Makovec, and M. Drofenik. Functionalization of magnetic nanoparticles with 3-aminopropyl silane. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321(10):1346–1350, 2009.
- [79] G. Giani, S. Fedi, and R. Barbucci. Hybrid magnetic hydrogel: A potential system for controlled drug delivery by means of alternating magnetic fields. *Polymers*, 4(2):1157–1169, 2012.
- [80] J. Long, X. Li, Z. Wu, E. Xu, X. Xu, Z. Jin, and A. Jiao. Immobilization of pullulanase onto activated magnetic chitosan/fe₃o₄ nanoparticles prepared by in situ mineralization and effect of surface functional groups on the stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 472:69–77, 2015.
- [81] S. Park, Y. Lee, D. N. Kim, S. Park, E. Jang, and W. Koh. Entrapment of enzyme-linked magnetic nanoparticles within poly(ethylene glycol) hydrogel microparticles prepared by photopatterning. *Reactive and Functional Polymers*, 69(5):293–299, 2009.
- [82] Y. Zhu, Y. Zheng, F. Wang, and A. Wang. Fabrication of magnetic macroporous chitosan- g -poly (acrylic acid) hydrogel for removal of cd²⁺ and pb²⁺. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93:483–492, 2016.
- [83] C.A. Melendres, T.J. O'Leary, and J. Solis. Effect of thiocyanate on the corrosion and passivation behaviour of copper and iron: laser raman spectroscopy and photoelectrochemical studies. *Electrochimica Acta*, 36(3-4):505–511, 1991.
- [84] L. A. Raval, J. W. Chilver, and R. Williams. The corrosion of mild steel by aqueous ammonium thiocyanate. *Journal of Applied Chemistry*, 7(3):113–117, 2007.
- [85] Y. A. Ismail, J. G. Martínez, A. S. Al Harrasi, S. J. Kim, and T. F. Otero. Sensing characteristics of a conducting polymer/hydrogel hybrid microfiber artificial muscle. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 160(1):1180–1190, 2011.
- [86] B. Tondu, R. Emirkhanian, S. Mathé, and A. Ricard. A pH-activated artificial muscle using the McKibben-type braided structure. *Sensors and Actuators A: Physical*, 150(1):124–130, 2009.
- [87] K. M. Park, S. Y. Lee, Y. K. Joung, J. S. Na, M. C. Lee, and K. D. Park. Thermosensitive chitosan-pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. *Acta Biomaterialia*, 5(6):1956–1965, 2009.
- [88] B. Yang, Y. Zhang, X. Zhang, L. Tao, S. Li, and Y. Wei. Facilely prepared inexpensive and biocompatible self-healing hydrogel: a new injectable cell therapy carrier. *Polymer Chemistry*, 3(12):3235, 2012.
- [89] M. W. Tibbitt and K. S. Anseth. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3d cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(4):655–663, 2009.

- [90] J. Wu, X. Gong, Y. Fan, and H. Xia. Physically crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels with magnetic field controlled modulus. *Soft Matter*, 7(13):6205, 2011.
- [91] R. V. Ramanujan and L. L. Lao. The mechanical behavior of smart magnet-hydrogel composites. *Smart Materials and Structures*, 15(4):952–956, 2006.
- [92] L. S. Nair. *Injectable Hydrogels for Regenerative Engineering*. IMPERIAL COLLEGE PR, 2016.
- [93] K. Y. Lee and D. J. Mooney. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1):106–126, 2012.
- [94] G. Bossis, O. Volkova, S. Lacis, and A. Meunier. Magnetorheology: Fluids, structures and rheology. In *Ferrofluids*, pages 202–230. Springer Berlin Heidelberg, 2002.
- [95] S. Utech, R. Prodanovic, A. S. Mao, R. Ostafe, D. J. Mooney, and D. A. Weitz. Microfluidic generation of monodisperse, structurally homogeneous alginate microgels for cell encapsulation and 3d cell culture. *Advanced Healthcare Materials*, 4(11):1628–1633, 2015.
- [96] W. H. Tan and S. Takeuchi. Monodisperse alginate hydrogel microbeads for cell encapsulation. *Advanced Materials*, 19(18):2696–2701, 2007.
- [97] M. Mredha, Y. Z. Guo, T. Nonoyama, T. Nakajima, T. Kurokawa, and J. P. Gong. A facile method to fabricate anisotropic hydrogels with perfectly aligned hierarchical fibrous structures. *Advanced Materials*, 30(9):1704937, 2018.
- [98] Macosko. *Rheology*. John Wiley & Sons, 1994.
- [99] I. Aguirre-Olabide, M. J. Elejabarrieta, and M. M. Bou-Ali. Matrix dependence of the linear viscoelastic region in magnetorheological elastomers. *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, 26(14):1880–1886, 2015.
- [100] N. M. Wereley, A. Chaudhuri, J. H. Yoo, S. John, S. Kotha, A. Suggs, R. Radhakrishnan, B. J. Love, and T. S. Sudarshan. Bidisperse magnetorheological fluids using fe particles at nanometer and micron scale. *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, 17(5):393–401, 2006.
- [101] R. M. Christensen. *Mechanics of composite materials*. Wiley, New York, 1979.
- [102] G. K. Batchelor and J. T. Green. The determination of the bulk stress in a suspension of spherical particles to order c^2 . *Journal of Fluid Mechanics*, 56(03):401, 1972.
- [103] I. M. Krieger and T. J. Dougherty. A mechanism for non-newtonian flow in suspensions of rigid spheres. *Transactions of the Society of Rheology*, 3(1):137–152, 1959.
- [104] R. Larson. *The structure and rheology of complex fluids*. Oxford University Press, New York, 1999.
- [105] G. Bossis, S. Lacis, A. Meunier, and O. Volkova. Magnetorheological fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 252:224–228, 2002.

- [106] A. M. Biller, O. V. Stolbov, and Yu. L. Raikher. Modeling of particle interactions in magnetorheological elastomers. *Journal of Applied Physics*, 116(11):114904, 2014.
- [107] M. A. C. Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G. B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov, and S. Minko. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nature Materials*, 9(2):101–113, 2010.
- [108] X. Wang, M. Jiang, Z. Zhou, J. Gou, and D. Hui. 3d printing of polymer matrix composites: A review and prospective. *Composites Part B: Engineering*, 110:442–458, 2017.
- [109] S. S. Nair, S. K. Mishra, and D. Kumar. Recent progress in conductive polymeric materials for biomedical applications. *Polymers for Advanced Technologies*, 30(12):2932–2953, 2019.
- [110] R. A. Surmenev, T. Orlova, R. V. Chernozem, A. A. Ivanova, A. Bartasyte, S. Mathur, and M. A. Surmeneva. Hybrid lead-free polymer-based nanocomposites with improved piezoelectric response for biomedical energy-harvesting applications: A review. *Nano Energy*, 62:475–506, 2019.
- [111] J. Thévenot, H. Oliveira, O. Sandre, and S. Lecommandoux. Magnetic responsive polymer composite materials. *Chemical Society Reviews*, 42(17):7099, 2013.
- [112] L. S. Nair and C. T. Laurencin. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 32(8-9):762–798, 2007.
- [113] R. Ravichandran, S. Sundarrajan, J. R. Venugopal, S. Mukherjee, and S. Ramakrishna. Advances in polymeric systems for tissue engineering and biomedical applications. *Macromolecular Bioscience*, 12(3):286–311, 2012.
- [114] A. J. T. Teo, A. Mishra, I. Park, Y. Kim, W. Park, and Y. Yoon. Polymeric biomaterials for medical implants and devices. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2(4):454–472, 2016.
- [115] R. Song, M. Murphy, C. Li, K. Ting, C. Soo, and Z. Zheng. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 12:3117–3145, 2018.
- [116] Y. Zhang, X. Liu, L. Zeng, J. Zhang, J. Zuo, J. Zou, J. Ding, and X. Chen. Polymer fiber scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Functional Materials*, 29(36):1903279, 2019.
- [117] X. Chen and J. Li. Bioinspired by cell membranes: functional polymeric materials for biomedical applications. *Materials Chemistry Frontiers*, 4(3):750–774, 2020.
- [118] S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, and E. Schacht. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review. *Biomacromolecules*, 12(5):1387–1408, 2011.
- [119] A. Weber and J. M. Murray. Molecular control mechanisms in muscle contraction. *Physiological Reviews*, 53(3):612–673, 1973.

- [120] A. F. Huxley. Muscular contraction. *Journal of Physiology*, 243(1):1–43, 1974.
- [121] K. C. Madison. Barrier function of the skin: “la raison d'être” of the epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(2):231–241, 2003.
- [122] E. Proksch, J. M. Brandner, and J. Jensen. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12):1063–1072, 2008.
- [123] A. R. Poole, T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, and S. Laverty. Composition and structure of articular cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 391:S26–S33, 2001.
- [124] A. J. S. Fox, A. Bedi, and S. A. Rodeo. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health*, 1(6):461–468, 2009.
- [125] P. Prang, R. Muller, A. Eljaouhari, K. Heckmann, W. Kunz, T. Weber, C. Faber, M. Vroemen, U. Bogdahn, and N. Weidner. The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials*, 2006.
- [126] S. Zhang, M. A. Greenfield, A. Mata, L. C. Palmer, R. Bitton, J. R. Mantei, C. Aparicio, M. Olvera de la Cruz, and S. I. Stupp. A self-assembly pathway to aligned monodomain gels. *Nature Materials*, 9(7):594–601, 2010.
- [127] M. T. McClendon and S. I. Stupp. Tubular hydrogels of circumferentially aligned nanofibers to encapsulate and orient vascular cells. *Biomaterials*, 33(23):5713–5722, 2012.
- [128] B. Marelli, C. E. Ghezzi, M. James-Bhasin, and S. N. Nazhat. Fabrication of injectable, cellular, anisotropic collagen tissue equivalents with modular fibrillar densities. *Biomaterials*, 37:183–193, 2015.
- [129] K. Sano, Y. Ishida, and T. Aida. Synthesis of anisotropic hydrogels and their applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(10):2532–2543, 2018.
- [130] G. Scionti, M. Moral, M. Toledano, R. Osorio, J. D. G. Durán, M. Alaminos, A. Campos, and M. T. López-López. Effect of the hydration on the biomechanical properties in a fibrin-agarose tissue-like model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(8):2573–2582, 2013.
- [131] Q. Lu, S. Bai, Z. Ding, H. Guo, Z. Shao, H. Zhu, and D. L. Kaplan. Hydrogel assembly with hierarchical alignment by balancing electrostatic forces. *Advanced Materials Interfaces*, 3(8):1500687, 2016.
- [132] S. Chen, N. Hirota, M. Okuda, M. Takeguchi, H. Kobayashi, N. Hanagata, and T. Ikoma. Microstructures and rheological properties of tilapia fish-scale collagen hydrogels with aligned fibrils fabricated under magnetic fields. *Acta Biomaterialia*, 7(2):644–652, 2011.
- [133] D. S. Madge. The control of relative humidity with aqueous solutions of sodium hydroxide. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 4(2):143–147, 1961.
- [134] X. Liu, J. Liu, S. Lin, and X. Zhao. Hydrogel machines. *Materials Today*, 36:102–124, 2020.

- [135] M. K. Nichols, R. K. Kumar, P. G. Bassindale, L. Tian, A. C. Barnes, B. W. Drinkwater, A. J. Patil, and S. Mann. Fabrication of micropatterned dipeptide hydrogels by acoustic trapping of stimulus-responsive coacervate droplets. *Small*, 14(26):1800739, 2018.
- [136] H. Böse. Viscoelastic properties of silicone-based magnetorheological elastomers. *International Journal of Modern Physics B*, 21(28n29):4790–4797, 2007.
- [137] H. Böse and R. Röder. Magnetorheological elastomers with high variability of their mechanical properties. *Journal of Physics: Conference Series*, 149:012090, 2009.
- [138] S. R. Mishra, M. D. Dickey, O. D. Velev, and J. B. Tracy. Selective and directional actuation of elastomer films using chained magnetic nanoparticles. *Nanoscale*, 8(3):1309–1313, 2016.
- [139] J. Kim, S. E. Chung, S. Choi, H. Lee, J. Kim, and S. Kwon. Programming magnetic anisotropy in polymeric microactuators. *Nature Materials*, 10(10):747–752, 2011.
- [140] H. Huang, M. S. Sakar, A. J. Petruska, S. Pané, and B. J. Nelson. Soft micromachines with programmable motility and morphology. *Nature Communications*, 7(1), 2016.
- [141] C. Bi, M. Guix, B. Johnson, W. Jing, and D. Cappelleri. Design of microscale magnetic tumbling robots for locomotion in multiple environments and complex terrains. *Micromachines*, 9(2):68, 2018.
- [142] S. R. Goudu, I. C. Yasa, X. Hu, H. Ceylan, W. Hu, and M. Sitti. Biodegradable untethered magnetic hydrogel milli-grippers. *Advanced Functional Materials*, 30(50):2004975, 2020.
- [143] J. Sun and H. Tan. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials*, 6(4):1285–1309, 2013.
- [144] L. Yu and J. Ding. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society Reviews*, 37(8):1473, 2008.
- [145] S. Yan, T. Wang, X. Li, Y. Jian, K. Zhang, G. Li, and J. Yin. Fabrication of injectable hydrogels based on poly(L-glutamic acid) and chitosan. *RSC Advances*, 7(28):17005–17019, 2017.
- [146] J. R. Nitschke. Molecular networks come of age. *Nature*, 462(7274):736–738, 2009.
- [147] E. Mattia and S. Otto. Supramolecular systems chemistry. *Nature Nanotechnology*, 10(2):111–119, 2015.
- [148] F. S. Kim, G. Ren, and S. A. Jenekhe. One-dimensional nanostructures of π -conjugated molecular systems: Assembly, properties, and applications from photovoltaics, sensors, and nanophotonics to nanoelectronics. *Chemistry of Materials*, 23(3):682–732, 2010.
- [149] L. Adler-Abramovich and E. Gazit. The physical properties of supramolecular peptide assemblies: from building block association to technological applications. *Chemical Society Reviews*, 43(20):6881–6893, 2014.

- [150] L. Brunsveld, B. J. B. Folmer, E. W. Meijer, and R. P. Sijbesma. Supramolecular polymers. *Chemical Reviews*, 101(12):4071–4098, 2001.
- [151] S. Zhang. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature Biotechnology*, 21(10):1171–1178, 2003.
- [152] S. Mann. Self-assembly and transformation of hybrid nano-objects and nanostructures under equilibrium and non-equilibrium conditions. *Nature Materials*, 8(10):781–792, 2009.
- [153] Y. Liu, Z. Wang, and X. Zhang. Characterization of supramolecular polymers. *Chemical Society Reviews*, 41(18):5922, 2012.
- [154] E. Busseron, Y. Ruff, E. Moulin, and N. Giuseppone. Supramolecular self-assemblies as functional nanomaterials. *Nanoscale*, 5(16):7098, 2013.
- [155] M. Burnworth, L. Tang, J. R. Kumpfer, A. J. Duncan, F. L. Beyer, G. L. Fiore, S. J. Rowan, and C. Weder. Optically healable supramolecular polymers. *Nature*, 472(7343):334–337, 2011.
- [156] A. Döring, W. Birnbaum, and D. Kuckling. Responsive hydrogels – structurally and dimensionally optimized smart frameworks for applications in catalysis, micro-system technology and material science. *Chemical Society Reviews*, 42(17):7391, 2013.
- [157] B. Adelizzi, N. J. Van Zee, L. N. J. de Windt, A. R. A. Palmans, and E. W. Meijer. Future of supramolecular copolymers unveiled by reflecting on covalent copolymerization. *Journal of the American Chemical Society*, 141(15):6110–6121, 2019.
- [158] M. Wehner and F. Würthner. Supramolecular polymerization through kinetic pathway control and living chain growth. *Nature Reviews Chemistry*, 4(1):38–53, 2019.
- [159] S. Ogi, K. Sugiyasu, S. Manna, S. Samitsu, and M. Takeuchi. Living supramolecular polymerization realized through a biomimetic approach. *Nature Chemistry*, 6(3):188–195, 2014.
- [160] S. Ogi, V. Stepanenko, K. Sugiyasu, M. Takeuchi, and F. Würthner. Mechanism of self-assembly process and seeded supramolecular polymerization of perylene bisimide organogelator. *Journal of the American Chemical Society*, 137(9):3300–3307, 2015.
- [161] D. Görl, X. Zhang, V. Stepanenko, and F. Würthner. Supramolecular block copolymers by kinetically controlled co-self-assembly of planar and core-twisted perylene bisimides. *Nature Communications*, 6(1), 2015.
- [162] F. Tantakitti, J. Boekhoven, X. Wang, R. V. Kazantsev, T. Yu, J. Li, E. Zhuang, R. Zandi, J. H. Ortony, C. J. Newcomb, L. C. Palmer, G. S. Shekhawat, M. O. de la Cruz, G. C. Schatz, and S. I. Stupp. Energy landscapes and functions of supramolecular systems. *Nature Materials*, 15(4):469–476, 2016.

- [163] S. Wang, F. Liu, N. Ma, Y. Li, Q. Jing, X. Zhou, and Y. Xia. Mechanistic process understanding of the self-assembling behaviour of asymmetric bolaamphiphilic short-peptides and their templating for silica and titania nanomaterials. *Nanoscale*, 13(31):13318–13327, 2021.
- [164] G. Wei, Z. Su, N. P. Reynolds, P. Arosio, I. W. Hamley, E. Gazit, and R. Mezzenga. Self-assembling peptide and protein amyloids: from structure to tailored function in nanotechnology. *Chemical Society Reviews*, 46(15):4661–4708, 2017.
- [165] E. R. Draper and D. J. Adams. Low-molecular-weight gels: The state of the art. *Chem*, 3(3):390–410, 2017.
- [166] C. Yuan, W. Ji, R. Xing, J. Li, E. Gazit, and X. Yan. Hierarchically oriented organization in supramolecular peptide crystals. *Nature Reviews Chemistry*, 3(10):567–588, 2019.
- [167] A. Levin, T. A. Hakala, L. Schnaider, G. J. L. Bernardes, E. Gazit, and T. P. J. Knowles. Biomimetic peptide self-assembly for functional materials. *Nature Reviews Chemistry*, 4(11):615–634, 2020.
- [168] A. Lampel. Biology-inspired supramolecular peptide systems. *Chem*, 6(6):1222–1236, 2020.
- [169] C. Colquhoun, E. R. Draper, E. G. B. Eden, B. N. Cattoz, K. L. Morris, L. Chen, T. O. McDonald, A. E. Terry, P. C. Griffiths, L. C. Serpell, and D. J. Adams. The effect of self-sorting and co-assembly on the mechanical properties of low molecular weight hydrogels. *Nanoscale*, 6(22):13719–13725, 2014.
- [170] S. Panja, B. Dietrich, O. Shebanova, A. J. Smith, and D. J. Adams. Programming gels over a wide pH range using multicomponent systems. *Angewandte Chemie International Edition*, 60(18):9973–9977, 2021.
- [171] S. Panja, A. Seddon, and D. J. Adams. Controlling hydrogel properties by tuning non-covalent interactions in a charge complementary multicomponent system. *Chemical Science*, 12(33):11197–11203, 2021.
- [172] D. Giuri, L. J. Marshall, B. Dietrich, D. McDowall, L. Thomson, J. Y. Newton, C. Wilson, R. Schweins, and D. J. Adams. Exploiting and controlling gel-to-crystal transitions in multicomponent supramolecular gels. *Chemical Science*, 12(28):9720–9725, 2021.
- [173] A. Brito, Y. M. Abul-Haija, D. Soares da Costa, R. Novoa-Carballal, R. L. Reis, R. V. Ulijn, R. A. Pires, and I. Pashkuleva. Minimalistic supramolecular proteoglycan mimics by co-assembly of aromatic peptide and carbohydrate amphiphiles. *Chemical Science*, 10(8):2385–2390, 2019.
- [174] H. A. M. Ardoña, E. R. Draper, F. Citossi, M. Wallace, L. C. Serpell, D. J. Adams, and J. D. Tovar. Kinetically controlled coassembly of multichromophoric peptide hydrogelators and the impacts on energy transport. *Journal of the American Chemical Society*, 139(25):8685–8692, 2017.
- [175] N. K. Wijerathne, M. Kumar, and R. V. Ulijn. Fmoc-dipeptide/porphyrin molar ratio dictates energy transfer efficiency in nanostructures produced by biocatalytic co-assembly. *Chemistry: A European Journal*, 25(51):11847–11851, 2019.

- [176] A. Levin, T. O. Mason, L. Adler-Abramovich, A. K. Buell, G. Meisl, C. Galvagnion, Y. Bram, S. A. Stratford, C. M. Dobson, T. P. J. Knowles, and E. Gazit. Ostwald's rule of stages governs structural transitions and morphology of dipeptide supramolecular polymers. *Nature Communications*, 5(1), 2014.
- [177] C. Yuan, A. Levin, W. Chen, R. Xing, Q. Zou, T. W. Herling, P. K. Challa, T. P. J. Knowles, and X. Yan. Nucleation and growth of amino acid and peptide supramolecular polymers through liquid–liquid phase separation. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(50):18116–18123, dec 2019.
- [178] M. C. Mañas-Torres, C. Gila-Vilchez, J. A. González-Vera, F. Conejero-Lara, V. Blanco, J. M. Cuerva, M. T. Lopez-Lopez, A. Orte, and L. Álvarez de Cienfuegos. In situ real-time monitoring of the mechanism of self-assembly of short peptide supramolecular polymers. *Materials Chemistry Frontiers*, 5(14):5452–5462, 2021.
- [179] L. Chen, K. Morris, A. Laybourn, D. Elias, M. R. Hicks, A. Rodger, L. Serpell, and D. J. Adams. Self-assembly mechanism for a naphthalene-dipeptide leading to hydrogelation. *Langmuir*, 26(7):5232–5242, 2009.
- [180] F. Fueyo-González, J. A. González-Vera, I. Alkorta, L. Infantes, M. L. Jimeno, P. Aranda, D. Acuña-Castroviejo, A. Ruiz-Arias, A. Orte, and R. Herranz. Environment-sensitive probes for illuminating amyloid aggregation in vitro and in zebrafish. *ACS Sensors*, 5(9):2792–2799, 2020.
- [181] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7):676–682, 2012.
- [182] P. Kapusta, R. Macháň, A. Benda, and M. Hof. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy (FLCS): Concepts, applications and outlook. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12):12890–12910, 2012.
- [183] P. L. Privalov and V. V. Plotnikov. Three generations of scanning microcalorimeters for liquids. *Thermochimica Acta*, 139:257–277, 1989.
- [184] D. J. Adams, M. F. Butler, W. J. Frith, M. Kirkland, L. Mullen, and P. Sanderson. A new method for maintaining homogeneity during liquid–hydrogel transitions using low molecular weight hydrogelators. *Soft Matter*, 5(9):1856, 2009.
- [185] D. J. Adams, L. M. Mullen, M. Berta, L. Chen, and W. J. Frith. Relationship between molecular structure, gelation behaviour and gel properties of fmoc-dipeptides. *Soft Matter*, 6(9):1971, 2010.
- [186] L. Chen, G. Pont, K. Morris, G. Lotze, A. Squires, L. C. Serpell, and D. J. Adams. Salt-induced hydrogelation of functionalised-dipeptides at high pH. *Chemical Communications*, 47(44):12071, 2011.
- [187] L. Chen, T. O. McDonald, and D.J. Adams. Salt-induced hydrogels from functionalised-dipeptides. *RSC Advances*, 3(23):8714, 2013.

- [188] A. Z. Cardoso, L. L. E. Mears, B. N. Cattoz, P. C. Griffiths, R. Schweins, and D. J. Adams. Linking micellar structures to hydrogelation for salt-triggered dipeptide gelators. *Soft Matter*, 12(15):3612–3621, 2016.
- [189] K. McAulay, P. A. Ucha, H. Wang, A. M. Fuentes-Caparrós, L. Thomson, O. Maklad, N. Khunti, N. Cowieson, M. Wallace, H. Cui, R. J. Poole, A. Seddon, and D. J. Adams. Controlling the properties of the micellar and gel phase by varying the counterion in functionalised-dipeptide systems. *Chemical Communications*, 56(29):4094–4097, 2020.
- [190] W. Ji, C. Yuan, S. Zilberzwige-Tal, R. Xing, P. Chakraborty, K. Tao, S. Gilead, X. Yan, and E. Gazit. Metal-ion modulated structural transformation of amyloid-like dipeptide supramolecular self-assembly. *ACS Nano*, 13(6):7300–7309, 2019.
- [191] C. Tang, A. M. Smith, R. F. Collins, R. V. Ulijn, and A. Saiani. Fmoc-diphenylalanine self-assembly mechanism induces apparent pKa shifts. *Langmuir*, 25(16):9447–9453, 2009.
- [192] A. M. Smith, R. J. Williams, C. Tang, P. Coppo, R. F. Collins, M. L. Turner, A. Saiani, and R. V. Ulijn. Fmoc-diphenylalanine self assembles to a hydrogel via a novel architecture based on π - π interlocked β -sheets. *Advanced Materials*, 20(1):37–41, 2008.
- [193] K. McAulay, B. Dietrich, H. Su, M. T. Scott, S. Rogers, Y. K. Al-Hilaly, H. Cui, L. C. Serpell, A. M. Seddon, E. R. Draper, and D. J. Adams. Using chirality to influence supramolecular gelation. *Chemical Science*, 10(33):7801–7806, 2019.
- [194] H. Weissman and B. Rybtchinski. Noncovalent self-assembly in aqueous medium: Mechanistic insights from time-resolved cryogenic electron microscopy. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(6):330–342, 2012.
- [195] E. Krieg, M. M. C. Bastings, P. Besenius, and B. Rybtchinski. Supramolecular polymers in aqueous media. *Chemical Reviews*, 116(4):2414–2477, 2016.
- [196] M. F. J. Mabeoone, A. R. A. Palmans, and E. W. Meijer. Solute-solvent interactions in modern physical organic chemistry: Supramolecular polymers as a muse. *Journal of the American Chemical Society*, 142(47):19781–19798, 2020.
- [197] L. Chen, S. Revel, K. Morris, and D. J. Adams. Energy transfer in self-assembled dipeptide hydrogels. *Chemical Communications*, 46(24):4267, 2010.
- [198] H. Zhang, L. Xie, W. Yan, C. He, X. Cao, and C. Duan. Conformational switching fluorescent chemodosimeter for the selective detection of silver(i) ions. *New Journal of Chemistry*, 33(7):1478, 2009.
- [199] P. K. Lekha, T. Ghosh, and E. Prasad. Utilizing dendritic scaffold for feasible formation of naphthalene excimer. *Journal of Chemical Sciences*, 123(6):919–926, 2011.
- [200] V. V. Andrushchenko, H. J. Vogel, and E. J. Prenner. Solvent-dependent structure of two tryptophan-rich antimicrobial peptides and their analogs studied by FTIR and CD spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(10):1596–1608, 2006.

- [201] A. Borzacchiello, F. Della Sala, and L. A. Ambrosio. *Rheometry of polymeric biomaterials*. Woodhead Publishing, 2017.
- [202] J. Li and D. J. Mooney. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 1(12), 2016.
- [203] E. Piantanida, G. Alonci, A. Bertucci, and L. De Cola. Design of nanocomposite injectable hydrogels for minimally invasive surgery. *Accounts of Chemical Research*, 52(8):2101–2112, 2019.
- [204] Y. Sun, D. Nan, H. Jin, and X. Qu. Recent advances of injectable hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. *Polymer Testing*, 81:106283, 2020.
- [205] S. C. Lee, I. K. Kwon, and K. Park. Hydrogels for delivery of bioactive agents: A historical perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1):17–20, 2013.
- [206] A. Mandal, J. R. Clegg, A. C. Anselmo, and S. Mitragotri. Hydrogels in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*, 5(2), apr 2020.
- [207] V. G. Muir and J. A. Burdick. Chemically modified biopolymers for the formation of biomedical hydrogels. *Chemical Reviews*, 121(18):10908–10949, 2020.
- [208] K. Y. Lee and D. J. Mooney. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews*, 101(7):1869–1880, 2001.
- [209] L. Haines-Butterick, K. Rajagopal, M. Branco, D. Salick, R. Rughani, M. Pilarz, M. S. Lamm, D. J. Pochan, and J. P. Schneider. Controlling hydrogelation kinetics by peptide design for three-dimensional encapsulation and injectable delivery of cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19):7791–7796, 2007.
- [210] C. Yan, A. Altunbas, T. Yucel, R. P. Nagarkar, J. P. Schneider, and D. J. Pochan. Injectable solid hydrogel: mechanism of shear-thinning and immediate recovery of injectable β -hairpin peptide hydrogels. *Soft Matter*, 6(20):5143, 2010.
- [211] C. Yan, M. E. Mackay, K. Czymmek, R. P. Nagarkar, J. P. Schneider, and D. J. Pochan. Injectable solid peptide hydrogel as a cell carrier: Effects of shear flow on hydrogels and cell payload. *Langmuir*, 28(14):6076–6087, 2012.
- [212] C. K. Thota, N. Yadav, and V. S. Chauhan. “a novel highly stable and injectable hydrogel based on a conformationally restricted ultrashort peptide”. *Scientific Reports*, 6(1), 2016.
- [213] T. Aida, E. W. Meijer, and S. I. Stupp. Functional supramolecular polymers. *Science*, 335(6070):813–817, 2012.
- [214] K. Tao, A. Levin, L. Adler-Abramovich, and E. Gazit. Fmoc-modified amino acids and short peptides: simple bio-inspired building blocks for the fabrication of functional materials. *Chemical Society Reviews*, 45(14):3935–3953, 2016.
- [215] S. Fleming and R. V. Ulijn. Design of nanostructures based on aromatic peptide amphiphiles. *Chem. Soc. Rev.*, 43(23):8150–8177, 2014.

- [216] R. Contreras-Montoya, G. Escolano, S. Roy, M. T. Lopez-Lopez, J. M. Delgado-López, J. M. Cuerva, J. J. Díaz-Mochón, N. Ashkenasy, J. A. Gavira, and L. Álvarez de Cienfuegos. Catalytic and electron conducting carbon nanotube–reinforced lysozyme crystals. *Advanced Functional Materials*, 29:1807351, 2018.
- [217] R. Contreras-Montoya, M. Arredondo-Amador, G. Escolano-Casado, M. C. Mañas-Torres, M. González, M. Conejero-Muriel, V. Bhatia, J. J. Díaz-Mochón, O. Martínez-Augustin, F. Sánchez de Medina, M. T. Lopez-Lopez, F. Conejero-Lara, J. A. Gavira, and L. Álvarez de Cienfuegos. Insulin crystals grown in short-peptide supramolecular hydrogels show enhanced thermal stability and slower release profile. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(10):11672–11682, 2021.
- [218] V. Jayawarna, A. Smith, J. E. Gough, and R. V. Ulijn. Three-dimensional cell culture of chondrocytes on modified di-phenylalanine scaffolds. *Biochemical Society Transactions*, 35(3):535–537, 2007.
- [219] V. Jayawarna, S. M. Richardson, A. R. Hirst, N. W. Hodson, A. Saiani, J. E. Gough, and R. V. Ulijn. Introducing chemical functionality in fmoc-peptide gels for cell culture. *Acta Biomaterialia*, 5(3):934–943, 2009.
- [220] M. Zhou, A. M. Smith, A. K. Das, N. W. Hodson, R. F. Collins, R. V. Ulijn, and J. E. Gough. Self-assembled peptide-based hydrogels as scaffolds for anchorage-dependent cells. *Biomaterials*, 30(13):2523–2530, 2009.
- [221] E. V. Alakpa, V. Jayawarna, A. Lampel, K. V. Burgess, C. C. West, S. C. J. Bakker, S. Roy, N. Javid, S. Fleming, D. A. Lamprou, J. Yang, A. Miller, A. J. Urquhart, P. W. J. M. Frederix, N. T. Hunt, B. Péault, R. V. Ulijn, and M. J. Dalby. Tunable supramolecular hydrogels for selection of lineage-guiding metabolites in stem cell cultures. *Chem*, 1(2):298–319, 2016.
- [222] X. Dou and C. Feng. Amino acids and peptide-based supramolecular hydrogels for three-dimensional cell culture. *Advanced Materials*, 29(16):1604062, 2017.
- [223] M. Aviv, M. Halperin-Sternfeld, I. Grigoriants, L. Buzhansky, I. Mironi-Harpaz, D. Seliktar, S. Einav, Z. Nevo, and L. Adler-Abramovich. Improving the mechanical rigidity of hyaluronic acid by integration of a supramolecular peptide matrix. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(49):41883–41891, 2018.
- [224] B. Adhikari and A. Banerjee. Short peptide based hydrogels: incorporation of graphene into the hydrogel. *Soft Matter*, 7(19):9259, 2011.
- [225] S. Roy and A. Banerjee. Functionalized single walled carbon nanotube containing amino acid based hydrogel: a hybrid nanomaterial. *RSC Advances*, 2(5):2105, 2012.
- [226] J. Nanda, B. Adhikari, S. Basak, and A. Banerjee. Formation of hybrid hydrogels consisting of tripeptide and different silver nanoparticle-capped ligands: Modulation of the mechanical strength of gel phase materials. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(40):12235–12244, 2012.
- [227] B. Cheng, Y. Yan, J. Qi, L. Deng, Z. Shao, K. Zhang, B. Li, Z. Sun, and X. Li. Cooperative assembly of a peptide gelator and silk fibroin afford an

- injectable hydrogel for tissue engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(15):12474–12484, 2018.
- [228] Y. Li, G. Huang, X. Zhang, B. Li, Y. Chen, T. Lu, T. J. Lu, and F. Xu. Magnetic hydrogels and their potential biomedical applications. *Advanced Functional Materials*, 23(6):660–672, 2012.
- [229] N. Zhang, J. Lock, A. Sallee, and H. Liu. Magnetic nanocomposite hydrogel for potential cartilage tissue engineering: Synthesis, characterization, and cytocompatibility with bone marrow derived mesenchymal stem cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(37):20987–20998, 2015.
- [230] A. R. Tomás, A. I. Gonçalves, E. Paz, P. Freitas, R. M. A. Domingues, and M. E. Gomes. Magneto-mechanical actuation of magnetic responsive fibrous scaffolds boosts tenogenesis of human adipose stem cells. *Nanoscale*, 11(39):18255–18271, 2019.
- [231] R. Tognato, A. R. Armiento, V. Bonfrate, R. Levato, J. Malda, M. Alini, D. Eglin, G. Giancane, and T. Serra. A stimuli-responsive nanocomposite for 3d anisotropic cell-guidance and magnetic soft robotics. *Advanced Functional Materials*, 29(9):1804647, 2018.
- [232] A. Pardo, M. Gómez-Florit, S. Barbosa, P. Taboada, R. M. A. Domingues, and M. E. Gomes. Magnetic nanocomposite hydrogels for tissue engineering: Design concepts and remote actuation strategies to control cell fate. *ACS Nano*, 15(1):175–209, 2021.
- [233] T. F. Anderson. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *New York Academy of Sciences. Transactions*, 13:130–134, 1951.
- [234] A. Mahler, M. Reches, M. Rechter, S. Cohen, and E. Gazit. Rigid, self-assembled hydrogel composed of a modified aromatic dipeptide. *Advanced Materials*, 18(11):1365–1370, 2006.
- [235] C. Gila-Vilchez, M. C. Mañas-Torres, R. Contreras-Montoya, M. Alaminos, J. D. G. Duran, L. Álvarez de Cienfuegos, and M. T. Lopez-Lopez. Anisotropic magnetic hydrogels: design, structure and mechanical properties. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 377(2143):20180217, 2019.
- [236] P. Chakraborty, H. Oved, D. Bychenko, Y. Yao, Y. Tang, S. Zilberzwige-Tal, G. Wei, T. Dvir, and E. Gazit. Nanoengineered peptide-based antimicrobial conductive supramolecular biomaterial for cardiac tissue engineering. *Advanced Materials*, 33(26):2008715, 2021.
- [237] T. K. Jain, M. K. Reddy, M. A. Morales, D. L. Leslie-Pelecky, and V. Labhasetwar. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Molecular Pharmaceutics*, 5(2):316–327, 2008.
- [238] L. Draghi. Static and uniaxial characterization of polymer biomaterials. In *Characterization of Polymeric Biomaterials*, pages 177–202. Elsevier, 2017.

- [239] F. Campos, A. B. Bonhome-Espinosa, R. Carmona, J. D.G. Durán, P. Kuzhir, M. Alaminos, M. T. López-López, I. A. Rodríguez, and V. Carriel. In vivo time-course biocompatibility assessment of biomagnetic nanoparticles-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 118:111476, 2021.

