



**UNIVERSITAT
JAUME I**

**Estudio del autoensamblaje de aminoácidos
modificados con Fmoc a través de distintas vías
complejas**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster Química Aplicada y Farmacológica

Curso 2023/2024

Autora: Silvia Garre Martín

Tutor: Nishant Singh

Departamento de Química Inorgánica y Orgánica

Grupo de Materiales Dinámicos y Sistemas de Autoensamblaje

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al grupo de investigación “Materiales Dinámicos y Sistemas de Autoensamblaje” por acogerme en su equipo y haberme aportado tantas cosas, tanto académicas como personales. He aprendido muchísimo sobre una rama de la química que nunca antes había explorado y estoy orgullosa de haber ampliado mis conocimientos. Me sentí integrada desde el primer momento en el grupo y es algo que valoro mucho. También quiero destacar las reuniones de grupo, en las que siempre aprendía cosas nuevas. Gracias a todos los miembros del grupo por su ayuda, comprensión y simpatía en todo momento.

Quiero hacer un agradecimiento especial a mi tutor Nishant Singh, quien siempre ha estado disponible para cualquier duda y problema que pudiera surgir. Me ha enseñado a ver la ciencia más allá de lo que conocía y me ha ayudado a desarrollar una forma de pensar más crítica y reflexiva. También quiero agradecer la ayuda de Kousik Gayen, miembro del grupo de investigación, quien me asistió en la parte experimental durante el desarrollo de este trabajo.

Gracias a todos los profesores de este máster, quienes han contribuido a que profundice ampliamente mis conocimientos de química médica. Me matriculé en este máster porque me llamaba la atención y sin tener demasiada idea, y he terminado completamente enamorada de la química médica. Especial mención a Pedro Miguel Cardá, que ha sido como un padre para nosotros durante la estancia en el máster.

También quiero agradecer a mis padres, a mi hermano y a mi incondicional amiga María José, que aunque no estuvieron cerca de mí durante este curso, siempre me han apoyado y comprendido en los momentos difíciles.

Por último, pero no menos importante, quiero darle las gracias a todos los amigos que me ha brindado este máster. Nunca pensé que me fuese a llevar tantos buenos recuerdos y tan buenos amigos. Gracias por todos los momentos compartidos, desde las comidas y las fiestas, hasta el apoyo y la motivación. Sin vosotros, este año no hubiera sido lo mismo y habéis hecho que mi experiencia en Castellón sea inolvidable. Quiero agradecer especialmente a Rosario, mi compañera de laboratorio y gran descubrimiento de este año, por su alegría, motivación e increíble amistad. Estoy segura de que vas a lograr todo lo que te propongas.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
LLPS	Separación de fases líquido-líquido
LSPS	Separación de fases líquido-sólido
NH₃	Amoniacó
HMTA	Hexametilentetramina
NaCl	Cloruro de sodio
FL	N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-leucina
FI	N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-isoleucina
FS	N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-serina Hidratada
FAM	Ácido (S)-2-(((9H-Fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2,4-dimetilpentanoico
FNM	N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N-metil-L-leucina
°C	Grados centígrados
H₂O	Agua destilada
T	Temperatura
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
mg	Miligramos
μL	Microlitros
mM	Milimolar
AA	Aminoácido
LS	Baja concentración de sal
HS	Alta concentración de sal

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
<i>2.1. Autoensamblaje de aminoácidos y química supramolecular</i>	<i>2</i>
<i>2.2. Separación de fases líquido-líquido y líquido-sólido</i>	<i>3</i>
<i>2.3. Procesos de coacervación</i>	<i>4</i>
<i>2.4. Complejidad de la vía</i>	<i>8</i>
<i>2.5. Aminoácidos modificados con Fmoc</i>	<i>9</i>
3. OBJETIVOS	11
4. RESULTADOS	13
<i>4.1. Estudios macroscópicos y microscópicos</i>	<i>13</i>
4.1.1. <i>Estudio del autoensamblaje de FL</i>	13
4.1.2. <i>Estudio del autoensamblaje de FI</i>	21
4.1.3. <i>Estudio del autoensamblaje de FS</i>	28
4.1.4. <i>Estudio del autoensamblaje de FAM</i>	35
4.1.5. <i>Estudio del autoensamblaje de FNM</i>	39
<i>4.2. Reología</i>	<i>45</i>
<i>4.3. Difracción de rayos X en polvo</i>	<i>47</i>
5. CONCLUSIONES	49
6. MATERIALES Y MÉTODOS	51
<i>6.1. Materiales</i>	<i>51</i>
6.1.1. <i>Material básico</i>	51
6.1.2. <i>Reactivos</i>	51
<i>6.2. Métodos</i>	<i>53</i>
6.2.1. <i>Estudios macroscópicos</i>	53
6.2.2. <i>Estudios microscópicos</i>	56
6.2.3. <i>Reología</i>	57
6.2.4. <i>Difracción de rayos X en polvo</i>	57
7. BIBLIOGRAFÍA	58
8. ANEXOS	61

1. RESUMEN

El autoensamblaje de aminoácidos y péptidos es un fenómeno de gran relevancia tanto en la biología funcional como en el desarrollo de nuevas tecnologías. Este trabajo se enfoca en estudiar los procesos de autoensamblaje de aminoácidos modificados con el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). La importancia de entender estos mecanismos radica en que el autoensamblaje puede formar diversas estructuras supramoleculares, influenciadas por la “complejidad de vías” y las condiciones de separación de fases líquido-líquido (LLPS) y líquido-sólido (LSPS).

En este estudio se investigaron cinco aminoácidos: Fmoc-L-leucina, Fmoc-L-isoleucina, Fmoc-L-serina, Fmoc-alfa-metil-L-leucina y Fmoc-N-metil-L-leucina. Se analizaron sus comportamientos a nivel macroscópico y microscópico bajo diferentes condiciones experimentales. Se realizaron experimentos adicionales de reología y difracción de rayos X en polvo para caracterizar las propiedades estructurales y dinámicas de los ensamblajes formados. Se quiere destacar la importancia de comprender los comportamientos de nucleación, si siguen un modelo clásico o no clásico, y la formación de estructuras intermedias a lo largo del proceso. Este trabajo enfatiza la importancia de los sistemas simples y el potencial del autoensamblaje como herramienta para la creación de nuevos materiales funcionales.

Los resultados indican que los aminoácidos modificados con Fmoc presentan una rápida cinética de autoensamblaje y formaciones estructurales estables. Cada aminoácido presenta dinámicas únicas de nucleación y ensamblaje, proporcionando información relevante para el diseño de sistemas biomiméticos y aplicaciones biomédicas y nanotecnológicas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Autoensamblaje de aminoácidos y química supramolecular

La creación de sistemas supramoleculares a través del autoensamblaje de aminoácidos y péptidos es un fenómeno omnipresente en la naturaleza, relevante tanto para la biología como para la ciencia de materiales. Estas estructuras se presentan en una gran variedad de sistemas biológicos y sintéticos.¹

Este autoensamblaje mencionado se refiere a la organización autónoma de componentes individuales en patrones o estructuras sin necesidad de intervención humana. Es un fenómeno muy potente que los científicos han adoptado de la naturaleza para fabricar nuevos sistemas supramoleculares. Este proceso se define como la organización espontánea de moléculas en estructuras definidas y estables a través de interacciones no covalentes.²

Los enlaces no covalentes que intervienen pueden ser enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de apilamiento π - π , interacciones electrostáticas e interacciones de Van der Waals.³ Debido a la naturaleza débil de estas interacciones y a la flexibilidad de las moléculas involucradas, los productos del autoensamblaje son reversibles y pueden ensamblarse y desensamblarse en respuesta a estímulos como el pH o la temperatura. Esto permite que los autoensamblajes sean muy dinámicos.⁴

Algunas estructuras autoensambladas que se encuentran en sistemas biológicos incluyen la bicapa de fosfolípidos en las membranas celulares humanas,² los complejos de ADN y ARN,^{5,6} el acoplamiento entre antígenos y anticuerpos,⁷ y los filamentos de actina.³ Estos autoensamblajes son esenciales para la maquinaria celular básica de la vida. Sin embargo, la agregación descontrolada de proteínas en filamentos puede llevar a la formación de fibrillas amiloides, las cuales están vinculadas al desarrollo de varias enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson.⁸

Por lo tanto, entender los mecanismos moleculares que controlan la formación de estos sistemas supramoleculares es crucial no solo para la biología funcional y su mal funcionamiento, sino también para desarrollar estrategias efectivas para prevenir la fibrilación

asociada a ciertas enfermedades.⁹ Además, este conocimiento puede abrir nuevas posibilidades en la nanotecnología y el diseño de sistemas biomiméticos autoensamblados.³

2.2. Separación de fases líquido-líquido y líquido-sólido

Un paso clave en el autoensamblaje de aminoácidos y péptidos es la separación de fases líquido-líquido (LLPS), un fenómeno en el cual una disolución líquida de aminoácidos se divide en dos fases líquidas distintas e inmiscibles, cada una con concentraciones diferentes de solutos, formándose una fase rica en solutos y otra pobre en solutos.¹⁰ Este proceso es crucial para la formación de estructuras organizadas y juega un papel importante en la regulación de diversas funciones biológicas.³

Las gotas ricas en soluto representan una fase líquida metaestable y pueden actuar como lugares de nucleación, donde se forman nuevas estructuras en el sistema, como agregados sólidos o nanofibrillas, dando lugar a la nucleación no clásica y a la separación de fases líquido-sólido (LSPS). Las moléculas tienden a agruparse en áreas con alta concentración de soluto, aumentando la probabilidad de colisiones moleculares y facilitando la nucleación.¹¹

La conversión de las gotas en estructuras sólidas (LSPS) es mediada por interacciones entálpicas y se caracteriza por una reorganización estructural, por lo que este proceso tiene lugar debido a las interacciones energéticas entre las moléculas.³ Estas interacciones hacen que el producto final sea termodinámicamente más favorable que el estado inicial de las gotas líquidas según la regla de Ostwald, observándose una transición gradual que permite una reducción efectiva de la barrera de nucleación y facilita la formación de estructuras supramoleculares ordenadas y estables.¹²

A diferencia de la nucleación clásica de un solo paso, que tiene lugar en una etapa sin fases intermedias, la nucleación mediada por LLPS involucra múltiples eventos moleculares y la formación de intermedios.¹³ La Figura 1 ilustra las diferencias entre el mecanismo tradicional de nucleación-elongación y el proceso de LLPS seguido de LSPS.³ En este último, la separación en fases líquidas con altas y bajas concentraciones de soluto es un paso crucial antes de la nucleación de nanofibrillas supramoleculares formadas por el autoensamblaje de aminoácidos anfífilicos o péptidos cortos.¹⁴

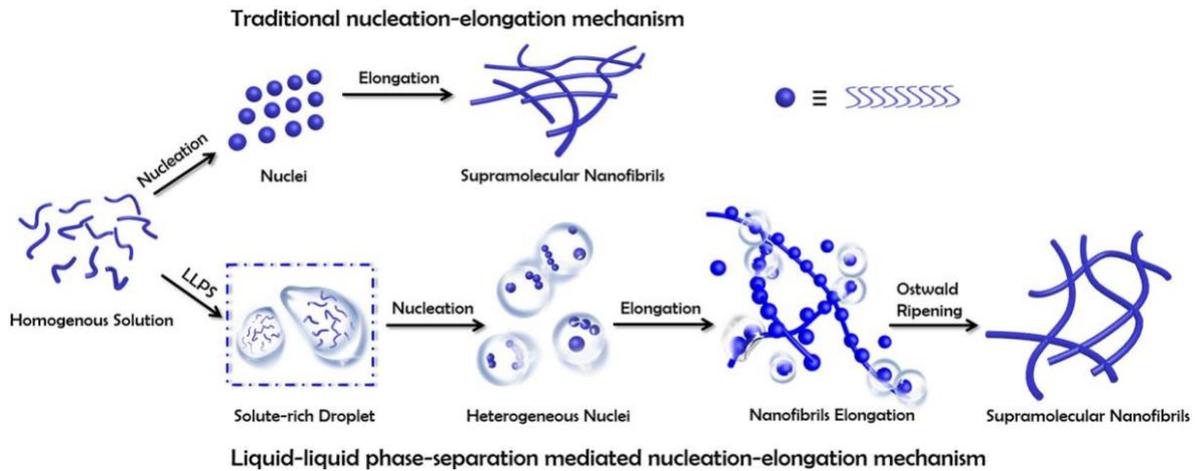


Figura 1. Esquema de la formación de nanofibrillas supramoleculares autoensambladas por aminoácidos o péptidos cortos ³

Sin embargo, a pesar de que esta separación de fases juega un papel crucial en el autoensamblaje biomolecular y es de vital importancia para comprender fenómenos biológicos, los factores moleculares exactos que inician la LLPS y que transforman las gotas intermedias en autoensamblajes (LSPS) siguen siendo hoy en día poco comprendidos.¹⁰

2.3. Procesos de coacervación

La separación de fases líquido-líquido (LLPS) da lugar a la formación de gotas ricas en soluto, también conocidas como coacervados. Estos coacervados son compartimentos sin membrana que se forman espontáneamente mediante diversas interacciones asociativas débiles. Estos compartimentos pueden concentrar biomoléculas específicas y desempeñar roles importantes en la organización y regulación de procesos biológicos dentro de la célula. Existen diferentes tipos de coacervados, que pueden variar según las moléculas involucradas y las condiciones ambientales.¹⁵

El proceso de LLPS es similar a la separación de aceite y agua, pero con una diferencia crucial: mientras que en las emulsiones de aceite en agua el aceite forma la fase interna y el agua la fase externa, en los coacervados el agua actúa como la fase continua tanto dentro como fuera de las gotas de coacervado.¹⁶ En la Figura 2 se observa una imagen obtenida mediante observación microscópica de estos coacervados.

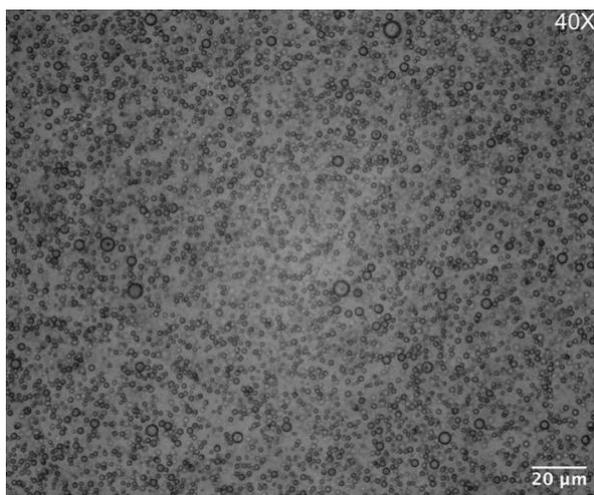


Figura 2. Imagen de coacervados utilizando el microscopio de luz transmitida

Esta ausencia de membrana de los coacervados es importante, ya que permite que los coacervados interactúen de manera única con su entorno al no existir una barrera física que los separe del medio circundante, absorbiendo y concentrando solutos del medio. Esto les permite actuar como microambientes concentrados, facilitando el intercambio dinámico de moléculas con su entorno. La alta concentración de componentes fundamentales y el entorno químicamente distinto dentro de los coacervados pueden acelerar las reacciones que ocurren en su interior y localizar diferentes reacciones en el mismo compartimento, otorgándoles propiedades catalíticas.¹⁶ Sin embargo, la ausencia de membrana hace que los coacervados sean propensos a la coalescencia, es decir, a fusionarse entre sí, lo que puede llevar a la pérdida de la estructura coacervada y a la dispersión de los solutos. Además, los coacervados tienen una estabilidad limitada y pueden desintegrarse con el tiempo.¹⁷

Se distinguen tres tipos principales de separación de fases líquido-líquido: segregativa, asociativa y simple. En la Figura 3 se puede observar una ilustración que muestra un esquema de estos tipos de separación líquido-líquido.¹⁶

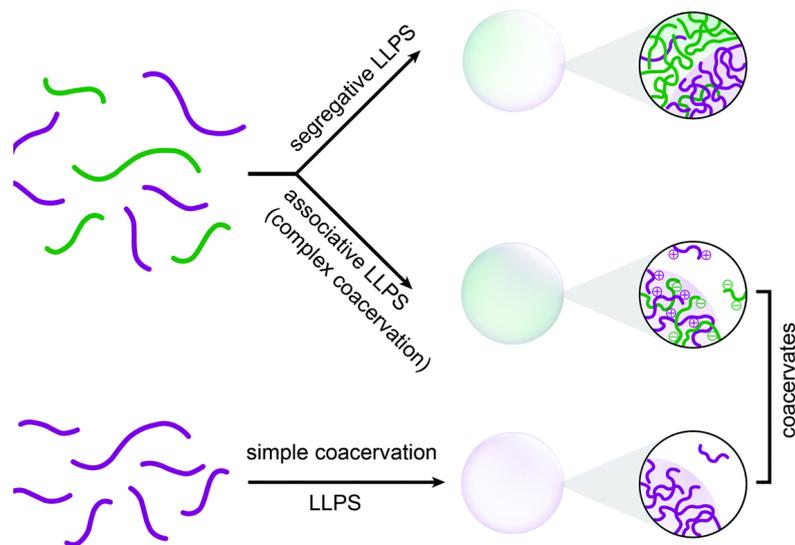


Figura 3. Tipos de separación de fases líquido-líquido y formación de coacervados ¹⁶

En la separación de fases segregativa, dos moléculas solubles, como polímeros o péptidos, no se mezclan debido a interacciones repulsivas, a pesar de una entropía de mezcla favorable, resultando en dos fases separadas. Un ejemplo clásico es el sistema de poli(etilenglicol) y dextrano.¹⁸

En la separación de fases asociativa, también conocida como coacervación compleja, dos moléculas solubles se concentran en la misma fase debido a interacciones atractivas. Esto forma una fase de coacervado complejo. Un ejemplo clásico es el de dos polímeros de carga opuesta.¹⁹

En la separación de fases simple una sola molécula presenta interacciones atractivas que la hacen insoluble a ciertas condiciones de temperatura, pH y concentración de sal. Con esta separación de fases también se obtiene una fase condensada, denominada coacervado simple, que tiene propiedades parecidas a las de los coacervados complejos.¹⁶ A diferencia de los coacervados complejos, los coacervados simples contienen un único componente y la separación de fases puede inducirse con componentes deshidratantes, como sales inorgánicas o alcoholes. Por lo tanto, la coacervación simple puede realizarse cambiando la deshidratación molecular de las macromoléculas.¹⁰

Se ha encontrado que numerosas proteínas con regiones desordenadas sufren una separación de fases simple. Este fenómeno es impulsado por una variedad de interacciones

atractivas débiles, como π - π , catión- π , enlaces de hidrógeno, dipolo-dipolo y cargas. En la Figura 4 se pueden observar las interacciones que pueden estar involucradas en la creación de coacervados.¹⁶

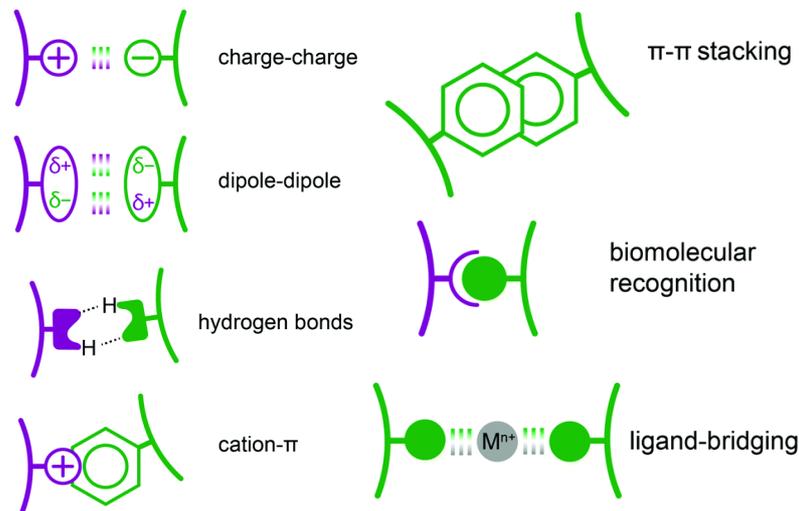


Figura 4. Posibles interacciones implicadas en la formación de coacervados a base de péptidos¹⁶

Asimismo, estudios recientes han revelado que los coacervados pueden originarse a partir de moléculas considerablemente más simples en comparación con otros tipos de compartimentos.²⁰

La teoría de Flory-Huggins modela la coacervación simple como la segregación entre un polímero y un disolvente, considerando tanto las interacciones energéticas (entalpía) como el desorden molecular (entropía). La separación de fases es favorecida cuando las interacciones entre las moléculas de polímero o aminoácido y el disolvente son desfavorables, resultando en una alta entalpía. Esto lleva al sistema a separarse en dos fases, minimizando la energía libre de Gibbs y aumentando la entropía global al permitir mayor movilidad dentro de sus respectivas fases.²¹

Por tanto, los coacervados se forman por separación de fases asociativa (coacervación compleja) o simple (coacervación simple).²² Esta separación puede proceder mediante nucleación y crecimiento de gotas de coacervado, superando una barrera energética, o por descomposición espinodal, donde la formación de coacervados es energéticamente favorable en todo el sistema.¹⁶

La neutralización de la carga, la formación de enlaces de hidrógeno y el apilamiento π - π pueden hacer que ciertas regiones del interior condensado de los coacervados sean hidrofóbicas, favoreciendo la concentración de muchas moléculas orgánicas huéspedes.²³ Los estudios han demostrado que los coacervados pueden incrementar la velocidad de reacción de moléculas grandes y pequeñas concentrando los reactivos, disminuyendo la barrera de reacción o estabilizando los productos intermedios.²⁴

Lo más destacable de estos coacervados es su capacidad de dividirse y autoorganizarse, lo que les confiere propiedades muy interesantes. Tienen aplicaciones en encapsulación avanzada, liberación controlada de fármacos, imitaciones celulares, tratamiento de aguas residuales, purificación de proteínas, formulación de alimentos y adhesivos subacuáticos.^{17,25}

2.4. Complejidad de la vía

La naturaleza utiliza interacciones no covalentes para construir estructuras supramoleculares precisas y funcionales. Sin embargo, el proceso de autoensamblaje molecular no siempre produce una única estructura deseada debido a las rutas complejas implicadas, que pueden dar lugar a estados cinéticamente atrapados o fuera de equilibrio.²⁶

Estas rutas permiten la creación de diversas estructuras funcionales que no se encuentran en equilibrio. En los sistemas supramoleculares artificiales, recientes investigaciones muestran que incluso los sistemas más simples se ven afectados por estas rutas complejas. Dependiendo de las condiciones, pueden formarse diferentes estructuras supramoleculares, incluso lejos del equilibrio. Una comprensión adecuada de estos procesos de autoensamblaje permite un mayor control sobre el tamaño y la estructura de los agregados supramoleculares.²⁶⁻²⁸

El control de estos procesos se logra evitando el pozo termodinámico, el estado de equilibrio en que un sistema alcanza su mínima energía libre. En este estado, las moléculas están en su configuración más estable y menos energética. En sistemas sintéticos, manejar la complejidad de las rutas para lograr autoensamblajes fuera del equilibrio sigue siendo un desafío. Las rutas de autoensamblaje dirigen a las biomoléculas a formar diversas estructuras fuera del equilibrio y aunque estén compuestas de los mismos monómeros, las funciones y morfologías de estos ensamblajes difieren de la de sus homólogos termodinámicamente estables.^{27,29}

En sistemas biológicos, las moléculas no siempre alcanzan directamente el estado de equilibrio más bajo. En cambio, se desplazan a través de un paisaje energético complejo, deteniéndose en varios estados metaestables antes de alcanzar el estado más estable. Este proceso permite una alta adaptabilidad, obteniendo estructuras biológicas que funcionen en diversas condiciones de manera adecuada.³⁰

Esta capacidad de seguir diferentes rutas para ensamblar estructuras, conocida como "complejidad de vías", permite una gran versatilidad y adaptación en los sistemas biológicos. Controlar con precisión diferentes rutas cinéticas y termodinámicas en sistemas artificiales permite acceder selectivamente a diferentes ensamblajes metaestables y de equilibrio con diversas propiedades.³¹

La "complejidad de vías" en sistemas supramoleculares se caracteriza por la presencia de ensamblajes metaestables intermedios antes de que el sistema alcance su equilibrio final, el estado termodinámicamente favorable. Las condiciones iniciales, con claves químicas y térmicas específicas, determinan las rutas de autoensamblaje y los resultados obtenidos.³²

2.5. Aminoácidos modificados con Fmoc

El estudio de bloques de construcción elementales ha sido clave para comprender los principios generales que gobiernan el autoensamblaje fibrilar de sistemas más complejos.² Los péptidos que consisten en secuencias de menos de cinco aminoácidos, e incluso aquellos formados por un solo aminoácido, han suscitado considerable interés debido a su menor costo de síntesis y su relativa facilidad de ajuste en comparación con biomacromoléculas más grandes.³³

Los aminoácidos anfifílicos y los péptidos cortos que están protegidos con grupos aromáticos como el 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), un grupo protector ampliamente utilizado en la síntesis de péptidos, muestran excelentes propiedades de autoensamblaje. Esta capacidad se debe a la hidrofobicidad y la aromaticidad del Fmoc, lo que les da un notable potencial para diversas aplicaciones.³⁴ En la Figura 5 se puede ver la estructura de este grupo aromático.

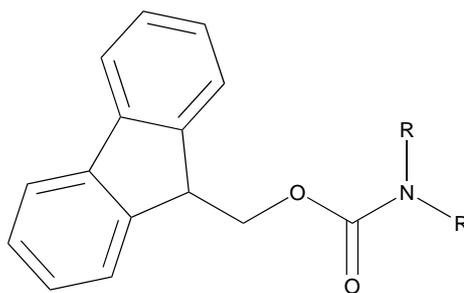


Figura 5. Estructura química del grupo Fmoc

La introducción del grupo Fmoc proporciona fuerzas motrices adicionales, incluyendo el enlace de hidrógeno del grupo carbonilo,³⁵ otras interacciones aromáticas e hidrofóbicas del anillo fluorenilo³⁶ y la optimización estérica del grupo metoxicarbonilo.³⁷ Estas interacciones únicas permiten que el autoensamblaje ocurra de manera rápida desde el punto de vista cinético y sea estable desde el punto de vista termodinámico.³⁴

Estos aminoácidos y péptidos poseen tanto componentes hidrofílicos como hidrofóbicos, lo que facilita la formación de estructuras fibrosas altamente ordenadas.³⁸ Estas estructuras se generan a través de la interacción cooperativa de enlaces de hidrógeno, apilamiento π - π e interacciones hidrofóbicas.²

Por lo tanto, muchos aminoácidos y péptidos cortos modificados con Fmoc tienen una rápida cinética de autoensamblaje y exhiben propiedades fisicoquímicas notables, además de tener un gran potencial de aplicación en áreas como el cultivo celular, la administración de fármacos y la catálisis.³⁴

3. OBJETIVOS

El presente proyecto se basa en un trabajo publicado recientemente por nuestro grupo, en el cual se investigó la nucleación no clásica de autoensamblajes de Fmoc-L-leucina capaces de formar coacervados simples mediante el cambio de disolvente. El estudio abordó el efecto de un cambio brusco de pH (utilizando NH_3) o un cambio gradual (utilizando HMTA), así como los efectos de las sales, sus concentraciones, la temperatura y el efecto combinado de estas variables. Se descubrió que el sistema podía seguir diferentes rutas para formar diferentes estructuras y materiales blandos, resultando en distintas estructuras metaestables (hidrogeles transitorios), cinéticas (hidrogeles estables) y termodinámicas (policristales y láminas 2D). La cinética del cambio de pH y las concentraciones de sal influyeron directamente en la cinética de hidrogelación y en la estabilidad, dando lugar a polimorfos distintos del termodinámico. Un hallazgo clave fue que las sales son capaces de tamizar las cargas entre moléculas, minimizando la repulsión entre ellas, y favoreciendo así la cinética del autoensamblaje.²⁷

El objetivo principal del presente trabajo es estudiar y comprender los procesos de autoensamblaje de diferentes aminoácidos variando las condiciones experimentales, explorando una gama más amplia de moléculas similares con distintas propiedades de hidrofobicidad y propensión al enlace de hidrógeno: Fmoc-L-leucina (FL), Fmoc-L-isoleucina (FI), Fmoc-L-serina (FS), Fmoc-alfa-metil-L-leucina (FAM) y Fmoc-N-metil-L-leucina (FNM). Este objetivo principal se desglosa en varios objetivos específicos:

1. Estudiar macroscópicamente el comportamiento de los aminoácidos al cambiar el disolvente. Esto incluye observar cómo la adición de agua a una disolución de aminoácido en metanol afecta al sistema, así como el impacto del cambio gradual de pH al añadir HMTA, y el efecto de los iones al añadir NaCl. También se investigará el efecto combinado de HMTA y NaCl para evaluar cómo el aumento de pH y la presencia de iones afectan al autoensamblaje. Además, se analizará cómo las variaciones en la concentración de estas sustancias, así como en la concentración de los aminoácidos y en la temperatura, influyen en el autoensamblaje.
2. Analizar microscópicamente las muestras que suscitan mayor interés, obteniendo conclusiones sobre cómo se produce su autoensamblaje. Se pretende determinar si los procesos siguen una nucleación clásica o no clásica, y si se producen ensamblajes

metaestables intermedios antes de que el sistema alcance el equilibrio y forme los ensamblajes termodinámicos finales.

3. Realizar experimentos reológicos en aquellos sistemas que formaron hidrogeles para determinar el tiempo de iniciación de gelificación y la estabilidad de la red de fibras.
4. Obtener los espectros de difracción de rayos X en polvo para determinar el orden estructural de los ensamblajes formados.

4. RESULTADOS

4.1. Estudios macroscópicos y microscópicos

4.1.1. *Estudio del autoensamblaje de FL*

En primer lugar, se van a analizar los resultados obtenidos para el estudio del autoensamblaje de FL. Al cambiar el disolvente (añadiendo agua a FL en metanol) a 24 °C, se observó que, para la concentración base de aminoácido, la disolución clara de metanol se vuelve inmediatamente turbia y blanquecina. En aproximadamente 20 minutos comenzaron a observarse los primeros agregados de naturaleza cristalina, los cuales crecieron con el tiempo y, tras 50 minutos, se sedimentaron dejando una disolución clara en la parte superior (Anexo Figura S1a).

Al reducir la concentración de aminoácido a la mitad, se vuelve a obtener inmediatamente una disolución turbia de color blanco al añadir agua. Sin embargo, en este caso, los agregados tardaron más tiempo en empezar a formarse (aproximadamente 30 minutos), siendo de menor tamaño y sin sedimentarse como ocurre en el caso anterior con la concentración base (Anexo Figura S1b).

Para las concentraciones equivalentes a un tercio y a un cuarto, al añadir agua, se observó nuevamente el cambio inmediato de una disolución clara a una disolución turbia. Los agregados comenzaron a formarse tras 60 minutos y 75 minutos, respectivamente. En estos casos, no se apreció una sedimentación clara de los agregados, si no que se encuentran en toda la disolución, siendo de menor tamaño que con la concentración base y la mitad de concentración (Anexo Figuras S1c y S1d).

Por lo tanto, a partir de estos estudios macroscópicos se puede concluir que, en el caso de FL, una disminución en la concentración de aminoácido ralentiza el proceso de formación de los agregados y resulta en agregados más pequeños.

Para estudiar cómo se produce el autoensamblaje de FL al añadir agua, se ha observado la evolución de la muestra 1 (tabla de muestras en el Anexo, Tabla S1) con la concentración base de aminoácido bajo el microscopio. El proceso seguido es el mismo que tiene lugar al

añadir una disolución acuosa de NaCl, el cual se explica más adelante (formación de láminas 2D plegadas). Las imágenes de la muestra 1 se pueden encontrar en el Anexo (Figura S2).

Al dejar los viales en un baño a 27 °C durante 3 horas, se observó lo siguiente: con la concentración base, se formaron múltiples agregados de menor tamaño que no se sedimentaron (Anexo Figura S3a). Con la mitad de concentración, la cantidad de agregados observados fue mucho menor que a 24 °C, y estos se sedimentaron, dejando una disolución clara en la parte superior (Anexo Figura S3b). Por otro lado, para las disoluciones correspondientes a un tercio y un cuarto de concentración, se obtuvieron disoluciones turbias, siendo la correspondiente a un cuarto de concentración menos turbia, y no se formaron agregados (Anexo Figuras S3c y S3d).

Como conclusión de estos resultados se puede decir que una mayor temperatura posiblemente mejora la solubilidad e impide el proceso de autoensamblaje.

Al añadir una disolución acuosa de HMTA a diferentes concentraciones a la disolución de FL en metanol con la concentración base, se observó un cambio inmediato de la disolución clara a una disolución turbia y blanquecina. Después de aproximadamente 20 minutos, se comenzaron a apreciar pequeños agregados cristalinos en todos los casos, los cuales aumentaron de tamaño con el tiempo. Tras aproximadamente 60 minutos, estos agregados se sedimentaron en la parte inferior del vial, dejando una disolución clara en la parte superior (Anexo Figura S4).

Cuando se añadió la disolución de HMTA a diferentes concentraciones para la concentración de aminoácido equivalente a un tercio, hubo una disminución considerable de agregados y el proceso de formación comenzó más tarde, sobre los 45 minutos. Las imágenes de estos estudios se pueden observar en el Anexo (Figura S5).

Para tener una visión más concreta de cómo se produce el ensamblaje al añadir HMTA, se estudió la muestra 49 (adición de una disolución acuosa que contenía 3 equivalentes de HMTA) bajo el microscopio óptico. En cuestión de minutos, a partir de una disolución turbia inicial compuesta de coacervados (Figura 6a), se formaron conjuntos similares a un erizo de mar (Figura 6b). Estas estructuras consumieron las partículas circundantes, lo que resultó en un aumento de tamaño y en la desaparición de las partículas que representaban los coacervados.

Después de 1 hora, estas estructuras con aspecto de erizo de mar cambiaron de forma a esferulitas policristalinas (Figura 6c). Finalmente, al observar la muestra pasadas las 24 horas, estas esferulitas habían crecido notablemente y los coacervados habían desaparecido por completo, alcanzando un tamaño en la escala milimétrica (Figura 6d).

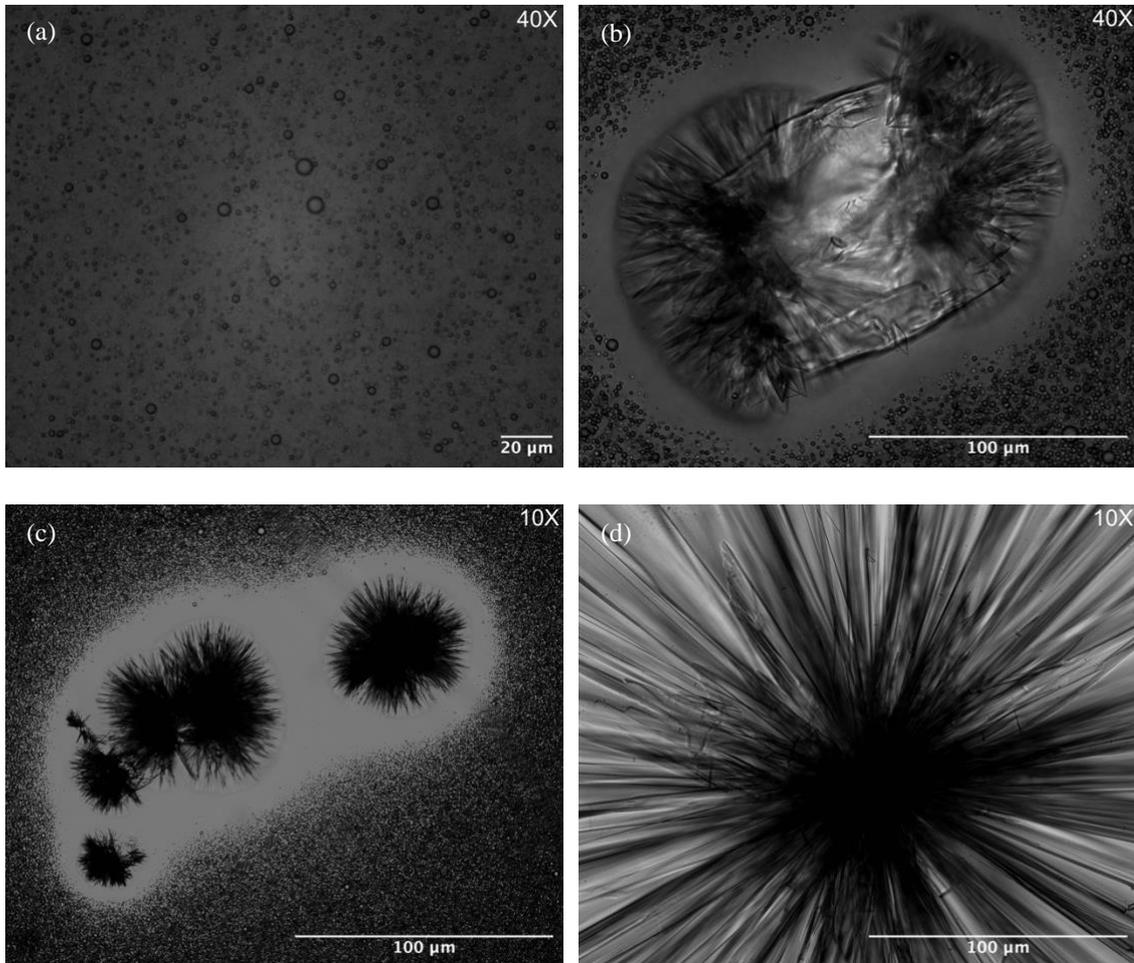


Figura 6. Imagen de la muestra 49 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 20 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

Cuando se añadió una disolución acuosa de NaCl a la disolución de FL en metanol con la concentración base se apreció una turbidez inmediata. Al añadir 0,25, 0,5 y 1 equivalentes de NaCl, el sistema se comportó de manera similar a cuando se añadió agua, comenzando el proceso de formación de agregados a los 20 minutos aproximadamente. Con 2 equivalentes, esta formación se aceleró a 10 minutos.

Con 0,25 y 1 equivalentes (Anexo Figuras S6a y S6c), se observó una gran cantidad de sólido cristalino en la parte inferior del vial, con la disolución sobre este material sólido turbia.

Con 0,5 y 2 equivalentes (Anexo Figuras S6b y S6d), se observó una capa fina de sólido en la parte inferior del vial y una gran cantidad de pequeños agregados en la disolución que queda por encima de esta fina capa.

Las imágenes de los estudios macroscópicos al añadir la disolución acuosa de NaCl a diferentes concentraciones de sal para un tercio de la concentración de aminoácido se encuentran en el Anexo (Figura S7), observándose una disminución considerable de agregados en todos los casos, como ocurría al añadir la disolución acuosa de HMTA.

Para comprender cómo se producía el autoensamblaje de FL en estos casos, se observó la evolución de la muestra 57 en el microscopio óptico de luz transmitida al añadir una disolución acuosa que contenía 0,25 equivalentes de sal. Inmediatamente se produjo la LLPS, lo que originó la disolución turbia observada en el vial. Esta separación de fases dio lugar a una gran cantidad de coacervados tras 5 minutos, los cuales se observaron como partículas opacas polidispersas de tamaño micrométrico (Figura 7a). Tras 15 minutos, se observó un gran aumento en la población de coacervados, con algunos de ellos alcanzando un diámetro de 9 μm debido a su crecimiento. Esto se debe a la coalescencia, un proceso característico de los coacervados después de la LLPS, que se refiere a la fusión directa de las partículas (Figura 7b). Después de 30 minutos, se pudo apreciar la formación de láminas 2D translúcidas que se encontraban plegadas, como se evidenciaba en las arrugas y pliegues. La formación de estas láminas se produjo a expensas de los coacervados que desaparecían (Figura 7c). Estas finas láminas continuaron creciendo a lo largo de varios mm^2 y, a las 24 horas, todos los coacervados habían desaparecido (Figura 7d). A diferencia de los demás sistemas que se discutirán posteriormente, en el caso de FL al añadir agua y NaCl, se formaron las láminas 2D que comenzaron a crearse desde un único lugar y se expandieron, sin que aparecieran en múltiples lugares.

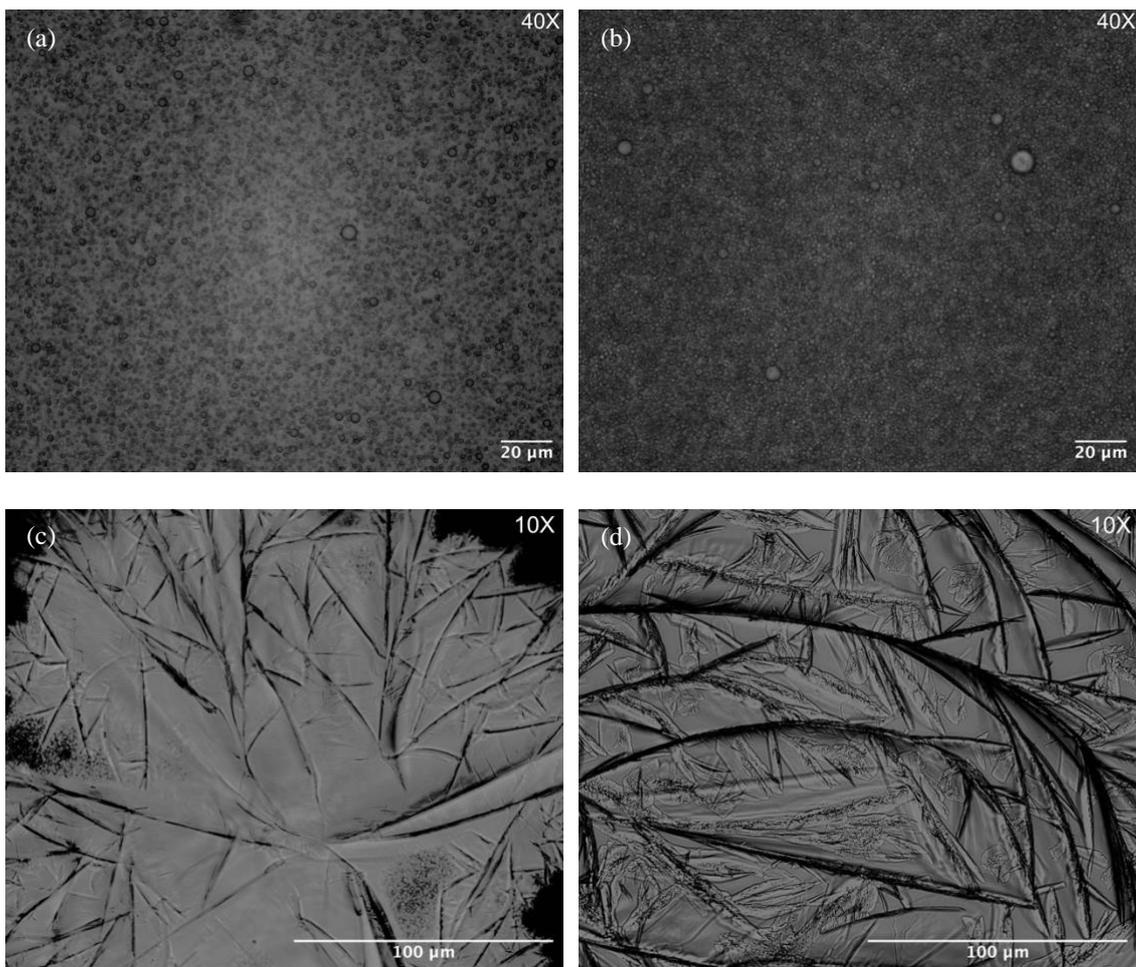


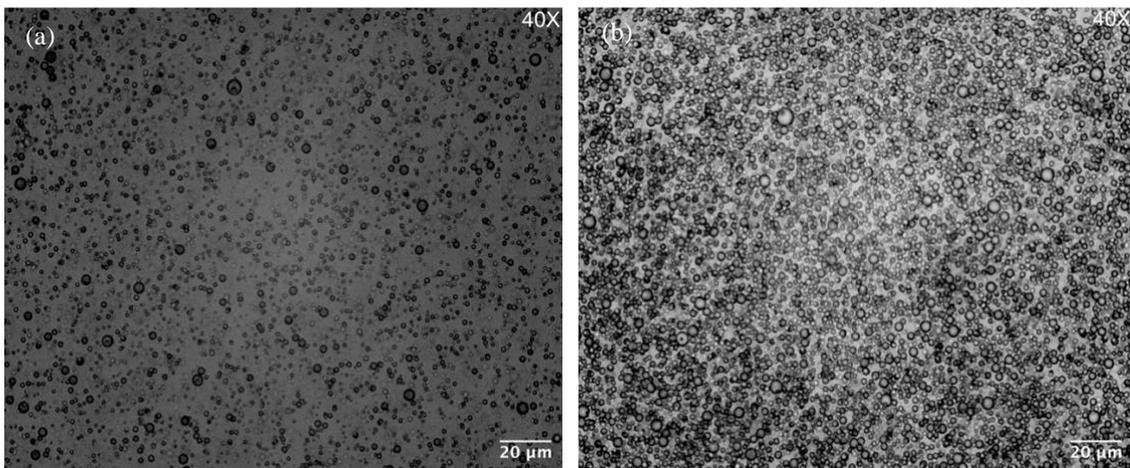
Figura 7. Imagen de la muestra 57 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c) y 24 horas (d)

Cuando se añadieron las disoluciones con 0,5 equivalentes de NaCl y 1 equivalente de HMTA y con 2 equivalentes de NaCl y 1 equivalente de HMTA, se formaron agregados sólidos aproximadamente a los 20 minutos, los cuales se sedimentaron en el fondo del vial tras 50 minutos, dejando una disolución clara en la parte superior (Anexo Figuras S8a y S8b). Al añadirse la disolución que contiene 0,5 equivalentes de NaCl y 4 equivalentes de HMTA también se formaron agregados, pero fueron de mucho mayor tamaño que en los casos anteriores (Anexo Figura S8c). Por otro lado, al adicionar la disolución con la mezcla de 2 equivalentes de NaCl y 4 equivalentes de HMTA, se formó un hidrogel a los 15 minutos que, al invertir el vial, era capaz de soportar su peso (Anexo Figuras S8d y S8e). Curiosamente, este hidrogel fue transitorio, ya que a las 24 horas en su lugar se encontraron agregados (Anexo Figura S8f).

Al añadir las disoluciones con las mezclas de NaCl y HMTA a las disoluciones de FL en metanol con un tercio de la concentración base de aminoácido, no se formó un hidrogel en ningún caso. En su lugar, se formaron agregados en poca cantidad para todas las diferentes concentraciones de las mezclas. Estas imágenes se encuentran en el Anexo (Figura S9).

Para estos casos, se analizaron bajo el microscopio las muestras 97 y 113. La muestra 97 contenía una disolución acuosa con una mezcla de 0,5 equivalentes de NaCl y 4 equivalentes de HMTA, mientras que la muestra 113 contenía una disolución acuosa con una mezcla de 2 equivalentes de NaCl y 4 equivalentes de HMTA. En el caso de la muestra 97, se observaron numerosos coacervados cinco minutos después de la adición de la mezcla de HMTA y NaCl (Figura 8a), con un drástico aumento en la cantidad tras solo 15 minutos (Figura 8b). A los 30 minutos, ya se observaron numerosas estructuras con forma de erizo de mar, similares a las que se formaron al añadir HMTA (Figura 8c). Estos conjuntos crecieron y se desarrollaron rápidamente al consumir las partículas que los rodeaban (Figura 8d).

Lo más interesante de este sistema es que, tras 90 minutos, las estructuras con forma de erizo de mar evolucionaron hacia esferulitas policristalinas (Figura 8e) y, además, se observaron numerosas fibras concentradas principalmente en dominios parcheados adyacentes (Figura 8f). Después de 24 horas, se pudo apreciar un considerable crecimiento de los policristales (Figura 8g), así como las fibras mencionadas en numerosas regiones (Figura 8h).



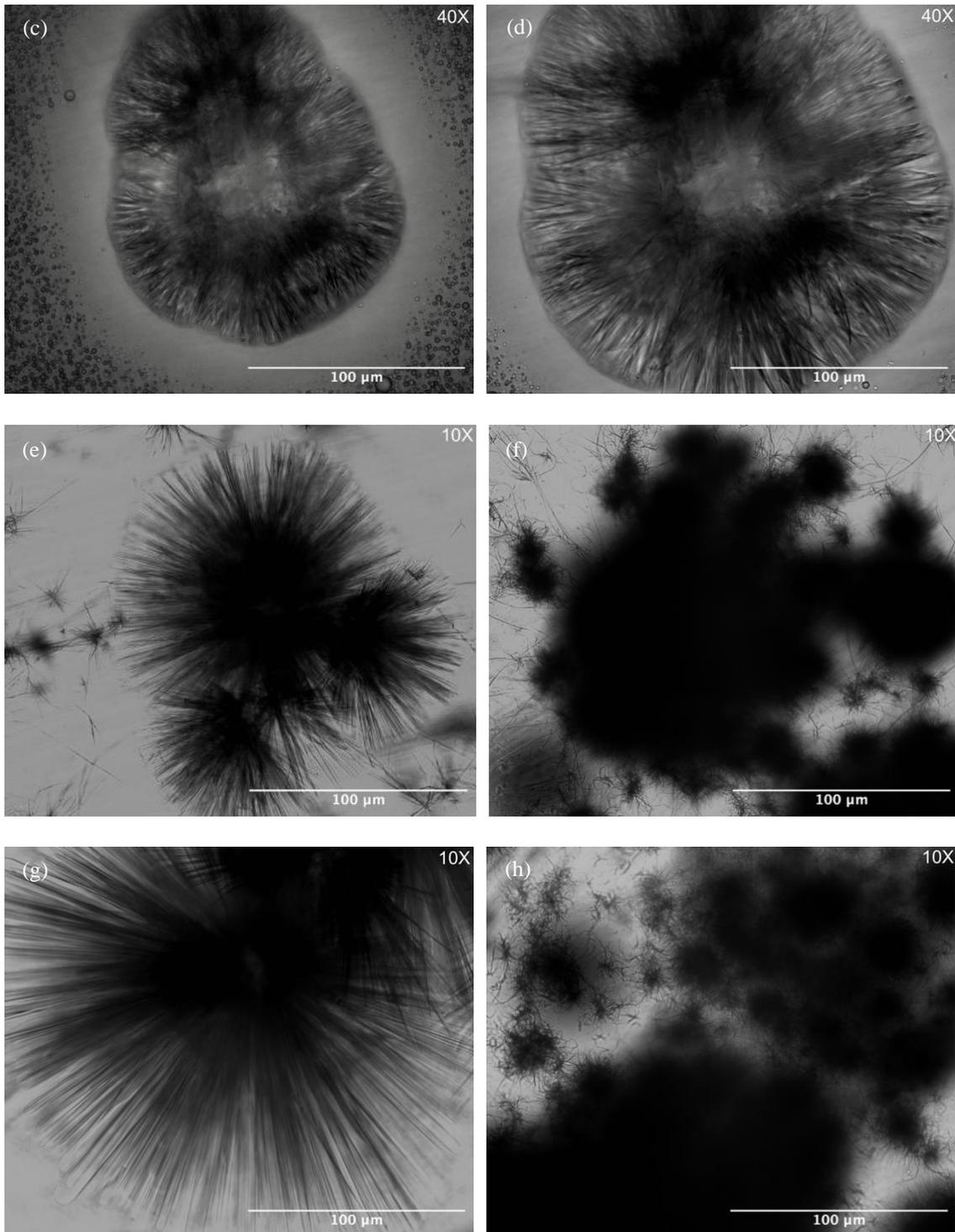


Figura 8. Imagen de la muestra 97 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c), 60 minutos (d), 90 minutos (e y f) y 24 horas (g y h)

Al estudiar la muestra 113, se observó la rapidez con la que tenía lugar el ensamblaje en este caso. Después de solo 5 minutos, los coacervados alcanzaron un tamaño considerable, con un diámetro de aproximadamente 10 μm (Figura 9a). A los 15 minutos, se detectaron numerosas regiones con fibras, que como en el caso anterior, se concentraban en dominios

distribuidos de manera discontinua, mientras que los coacervados empezaron a desaparecer (Figura 9b). Tras 30 minutos, todos los coacervados habían desaparecido completamente, dando lugar a la red de fibras que forma el hidrogel macroscópico (Figura 9c). Después de 24 horas, en algunas áreas donde antes había fibras, se observó la aparición de policristales, indicando que el hidrogel fibroso transitorio es la fase metaestable y el estado termodinámico final corresponde los policristales (Figura 9d).

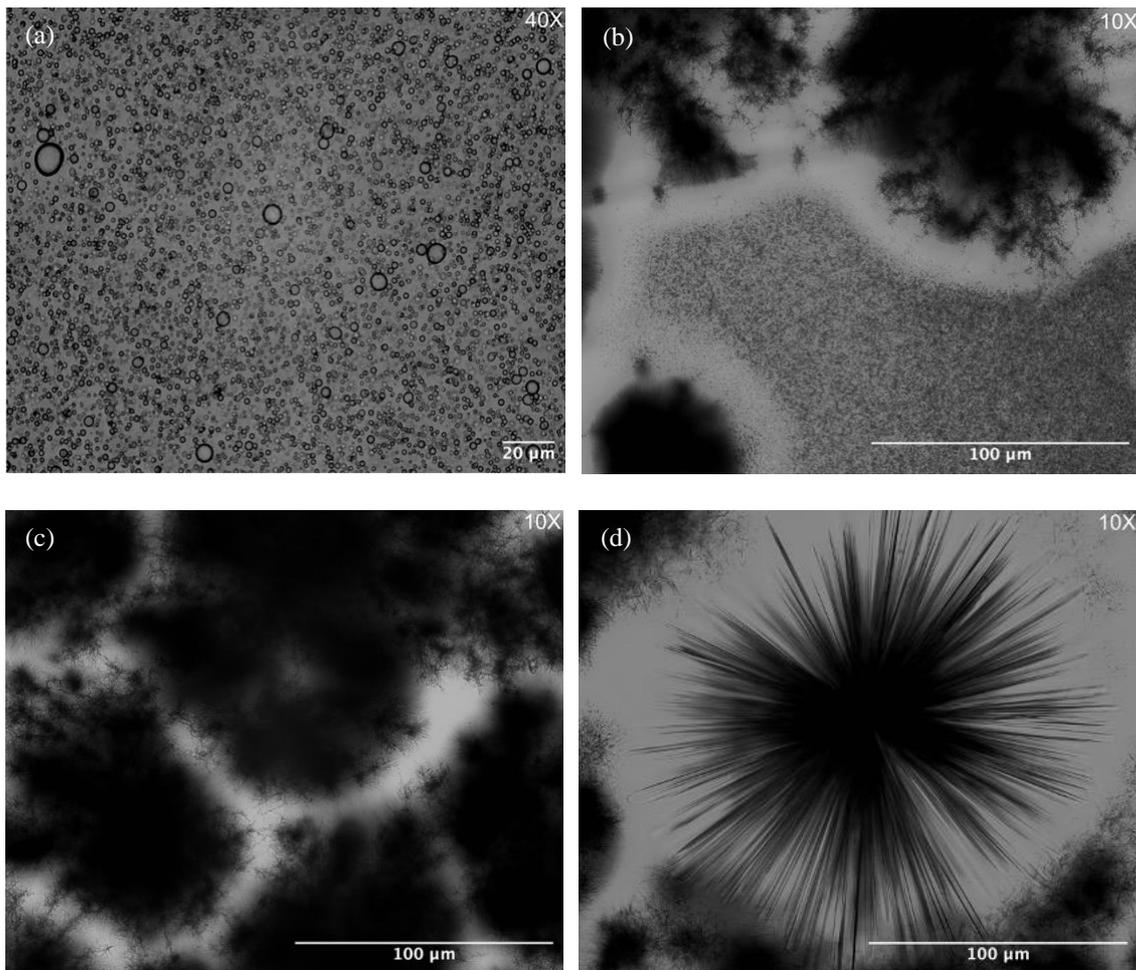


Figura 9. Imagen de la muestra 113 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c) y 24 horas (d)

En otras investigaciones publicadas recientemente, se utilizó la misma cantidad de sal que en mi estudio y 6 equivalentes de HMTA. En esos estudios, para 0,5 equivalentes de sal se obtenía un hidrogel metaestable transitorio que finalmente evolucionaba al estado termodinámico más favorable que eran los policristales, mientras que para 2 equivalentes de sal se obtenía un hidrogel que era estable durante días.²⁷

En mis estudios, al utilizar 4 equivalentes de HMTA, se obtiene un hidrogel transitorio para 2 equivalentes de NaCl, mientras que con 0,5 equivalentes de NaCl no se forma un hidrogel, aunque se observan áreas con fibras microscópicamente. Estos hechos sugieren la importancia del cambio gradual de pH producido por la hidrólisis de HMTA en NH_3 (Figura 10). Si el pH no aumenta a niveles óptimos no se consigue un hidrogel metaestable con 0,5 equivalentes de NaCl ni un hidrogel estable para 2 equivalentes de NaCl. Por tanto, el autoensamblaje y los estados termodinámicos finales pueden ajustarse y controlarse si fuese necesario.

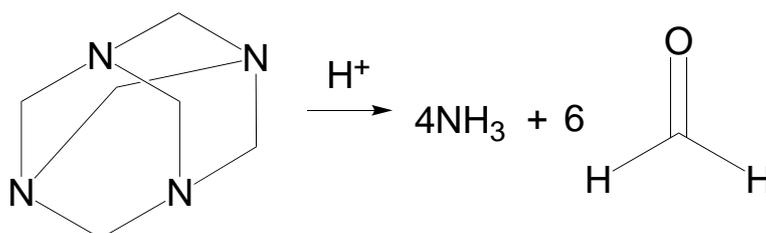


Figura 10. Reacción de hidrólisis de HMTA en medio acuoso ácido

4.1.2. Estudio del autoensamblaje de FI

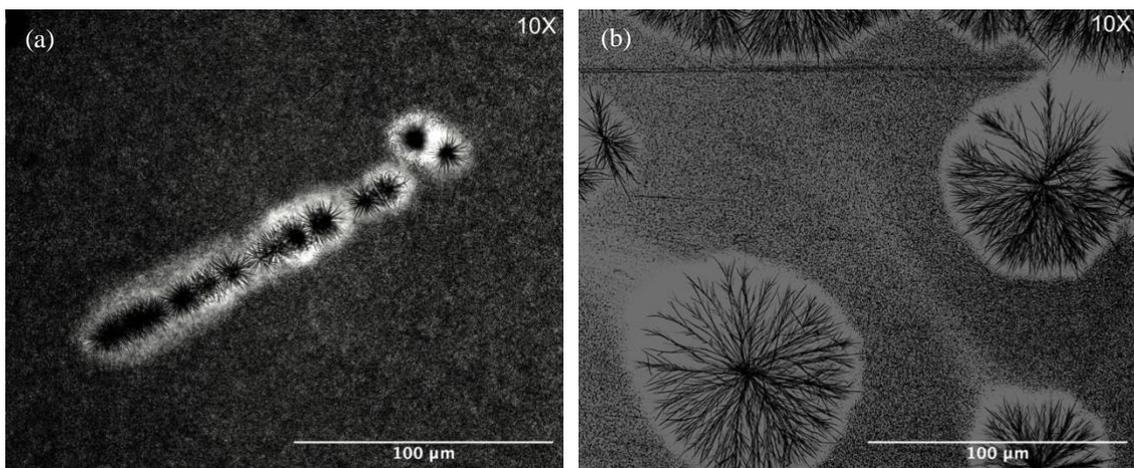
A continuación, se evaluará el autoensamblaje de FI a partir de los resultados que se obtuvieron por los diferentes estudios. Al añadir agua a la disolución de FI en metanol con la concentración base de aminoácido a 24 °C, la disolución se volvió turbia y en cuestión de 10 minutos se formó un hidrogel capaz de soportar su peso mediante la prueba del vial invertido (Anexo Figuras S10a y S10b). Cuando se adicionó agua a la disolución con la mitad de concentración, ocurrió lo mismo: la disolución se volvió turbia de inmediato y eventualmente se formó un hidrogel. La diferencia es que en este caso el hidrogel tardó más tiempo en formarse, alrededor de 20 minutos (Anexo Figuras S10c y S10d).

Sin embargo, al añadir agua a las disoluciones de FI con un tercio y un cuarto de la concentración de aminoácido, no se formó un hidrogel como en los casos anteriores. En su lugar, se observó la formación de agregados sólidos que crecieron rápidamente en tamaño. Para un tercio de la concentración, estos agregados comenzaron a formarse a los 30 minutos, mientras que, para un cuarto de la concentración, lo hicieron a los 50 minutos (Anexo Figura S11).

Estos resultados nos muestran que, con FI, una concentración menor de aminoácido también ralentiza el proceso de autoensamblaje, ya que los geles que se forman con la

concentración base y con la mitad de concentración no se observan al reducirse a un tercio y un cuarto.

Para estudiar en profundidad cómo se producía el autoensamblaje de FI al añadir agua en el sistema, se analizó la muestra 2 con la concentración base de aminoácido en el microscopio óptico de luz transmitida. Cinco minutos después de la adición de agua, se observó una gran cantidad de coacervados, así como pequeñas formaciones iniciales con apariencia de ramas ramificadas, que indicaban los primeros pasos en la formación de la red supramolecular del hidrogel observado en el estudio macroscópico (Figura 11a). Transcurridos 15 minutos, se pudo apreciar que las estructuras ramificadas se habían extendido y densificado, lo cual ocurría a medida que los coacervados desaparecían. Estas formaciones dendríticas mostraron un mayor grado de conexión y organización (Figura 11b). Estas estructuras ramificadas se desarrollaron considerablemente, formando una red más compleja y extendida tras 30 minutos, lo que señalaba un avance significativo en el proceso de gelificación (Figura 11c). Después de 45 minutos, las formaciones dendríticas alcanzaron una complejidad y densidad máximas, formando una red continua y densa en la que los coacervados se habían desvanecido por completo. Esta red es característica de un hidrogel bien formado, donde las estructuras supramoleculares ramificadas se entrelazaban completamente. Este hidrogel se mantuvo estable macroscópicamente tras 24 horas, mostrando en el microscopio la misma red que se había formado a los 45 minutos (Figura 11d).



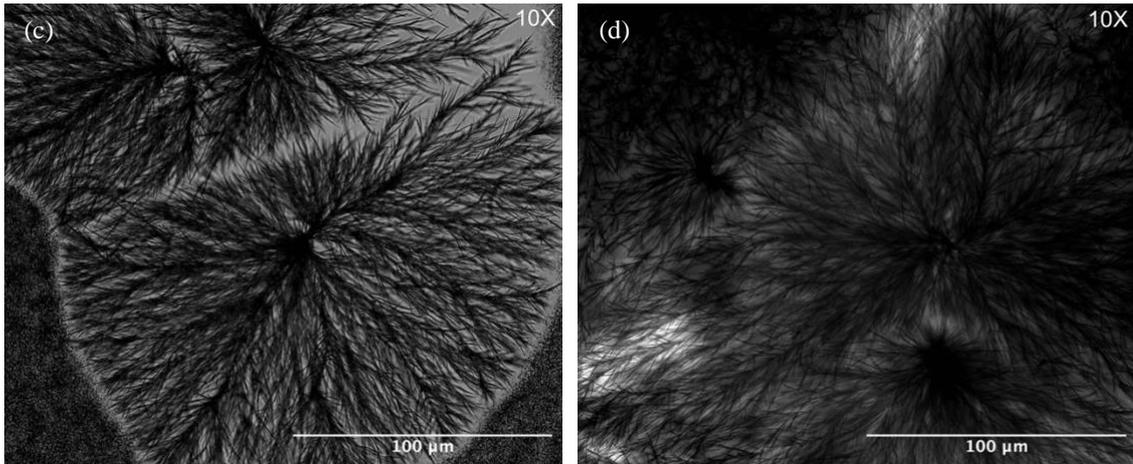


Figura 11. Imagen de la muestra 2 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c) y 45 minutos (d)

Para evaluar el efecto de la temperatura en el autoensamblaje, se dejaron los viales con diferentes concentraciones de FI en un baño a 27 °C durante 3 horas. Con la concentración base y la mitad de concentración, se formó un hidrogel, al igual que a 24 °C (Anexo Figuras S12a-S12d). La única diferencia encontrada al aumentar la temperatura fue que la cantidad de agregados sólidos con un tercio y un cuarto de la concentración era ligeramente menor (Anexo Figuras S12e y S12f).

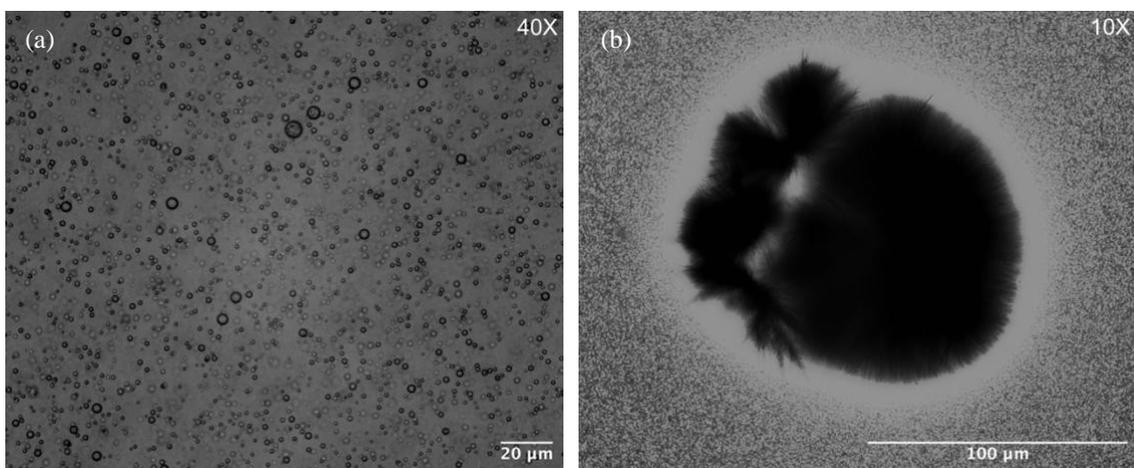
Por lo tanto, aunque con FI no se observe gran diferencia al variar la temperatura, se puede decir que un aumento en esta produce una menor capacidad de autoensamblaje del aminoácido en el sistema.

Al adicionar una disolución acuosa de HMTA a la disolución de FI en metanol con la concentración base se observó un cambio inmediato a una disolución turbia de color blanco. Cuando pasaron 15 minutos desde la adición de HMTA se empezaron a observar pequeños agregados que rápidamente crecieron en cantidad y tamaño. Sin embargo, en este caso no se formó un hidrogel, a diferencia de lo que sucedió en el sistema anterior al añadir solo agua (Anexo Figura S13).

Al añadirse la disolución de HMTA a diferentes concentraciones para la concentración de aminoácido equivalente a un tercio, se observó de nuevo el cambio a una disolución turbia y comenzaron a formarse pequeños agregados, aproximadamente a los 15 minutos, similar a lo observado con la concentración base. Sin embargo, estos agregados no crecieron mucho más,

resultando en agregados de menor tamaño y en menor cantidad. Las imágenes de estos viales se encuentran en el Anexo (Figura S14).

Se estudió la muestra 50 (adición de una disolución acuosa que contenía 3 equivalentes de HMTA) en el microscopio óptico para tener una visión de cómo se produce el autoensamblaje al añadir HMTA. Al añadir la disolución, se observó el cambio a una disolución turbia, confirmándose bajo el microscopio que esta turbidez se debía a la LLPS, resultando en la presencia de numerosos coacervados polidispersos de tamaño micrométrico (Figura 12a). Con el paso del tiempo, la población de coacervados aumentó significativamente, observándose la fusión de estas gotas que representan los coacervados y dando lugar a gotas solidificadas. Estas gotas solidificadas dieron paso a la formación de ensamblajes ordenados y termodinámicamente estables, generando grandes agregados de naturaleza cristalina que se observaron a los 20 minutos (Figura 12b). A medida que avanzaba el tiempo, estos sólidos cristalinos aumentaron considerablemente de tamaño y la población de coacervados disminuyó, aunque aún se podían observar en la muestra una hora después (Figura 12c). Finalmente, después de 24 horas, los coacervados habían desaparecido completamente y los policristales obtenidos eran de gran tamaño (varios mm) (Figura 12d).



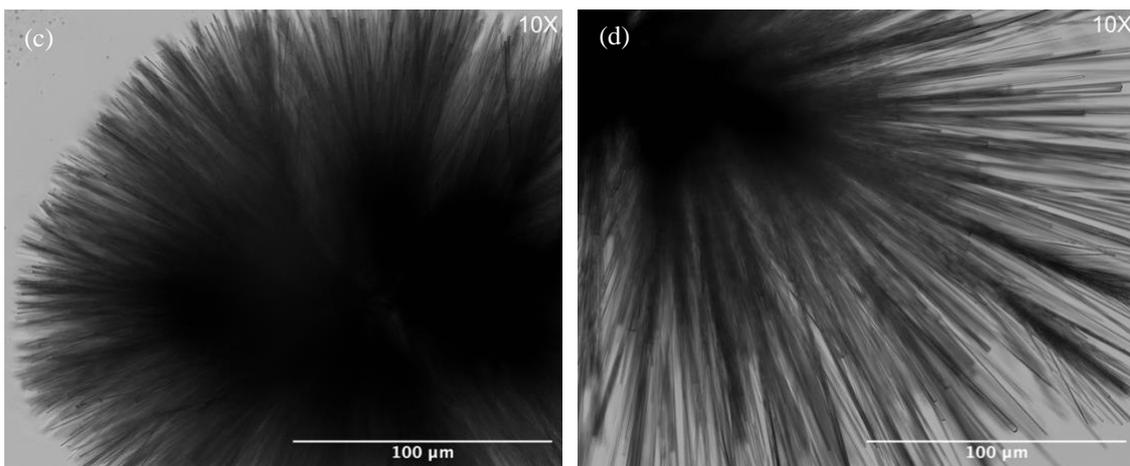


Figura 12. Imagen de la muestra 50 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 20 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

Al agregar una disolución acuosa de NaCl a la disolución de FI en metanol con la concentración base, la disolución se tornó turbia y blanquecina al igual que en los casos anteriores. Aquí el sistema evolucionó hacia un hidrogel que se formaba más rápidamente a medida que aumentaba la concentración de NaCl: 30 minutos para 0,25 equivalentes (Anexo Figuras S15a y S15b), 25 minutos para 0,5 equivalentes (Anexo Figuras S15c y S15d), 20 minutos para 1 equivalente (Anexo Figuras S15e y S15f) y 15 minutos para 2 equivalentes (Anexo Figuras S15g y S15h). Estos hidrogeles se verificaron al invertir el vial y observar que podían soportar su peso.

Sin embargo, al añadir la disolución de NaCl a diferentes concentraciones para la concentración equivalente a un tercio, no se formó un hidrogel en ningún caso. En su lugar, comenzaron a formarse agregados 15 minutos después de la adición, los cuales aumentaron progresivamente en tamaño. Las imágenes de los viales para estos estudios macroscópicos se encuentran en el Anexo (Figura S16).

Se observó en el microscopio la muestra 58 tras añadir una disolución acuosa que contenía 0,25 equivalentes de sal para ver cómo evolucionaba este sistema. Tras cinco minutos de la adición, se observó una gran población de coacervados dispersos y las primeras formaciones de estructuras ramificadas, indicando el inicio del proceso de autoensamblaje (Figura 13a). Pasados 20 minutos, estas estructuras con apariencia de ramas ramificadas habían crecido significativamente, a medida que los coacervados se fusionaban y desaparecían al participar en el proceso de formación de estas estructuras. Además, aparecieron policristales

transitorios con formas muy definidas que parecían integrarse progresivamente en las fibras ramificadas, sugiriendo un estado intermedio en el proceso de formación del hidrogel (Figura 13b). Esta integración de los policristales en las fibras se muestra en el Anexo (Figura S17), la cual fue estudiada para el sistema de FI con la mitad de concentración tras añadir agua. Lo más curioso de estos policristales transitorios obtenidos para FI es que solo se observaron en estas dos muestras, mientras que al añadir agua con la concentración base y al añadir una disolución acuosa con 2 equivalentes de NaCl, no se pudieron detectar. Después de una hora, las estructuras dendríticas se habían desarrollado y formado completamente, y no se encontraron cristales visibles en la muestra, indicando una fase avanzada y estable del hidrogel (Figura 13c). Finalmente, tras 24 horas, algunas de estas estructuras habían desaparecido y se habían formado cristales en las inmediaciones de las fibras. Esto sugiere que los cristales representan el estado termodinámico más favorable y que el sistema evoluciona hacia una cristalización más completa con el tiempo (Figura 13d).

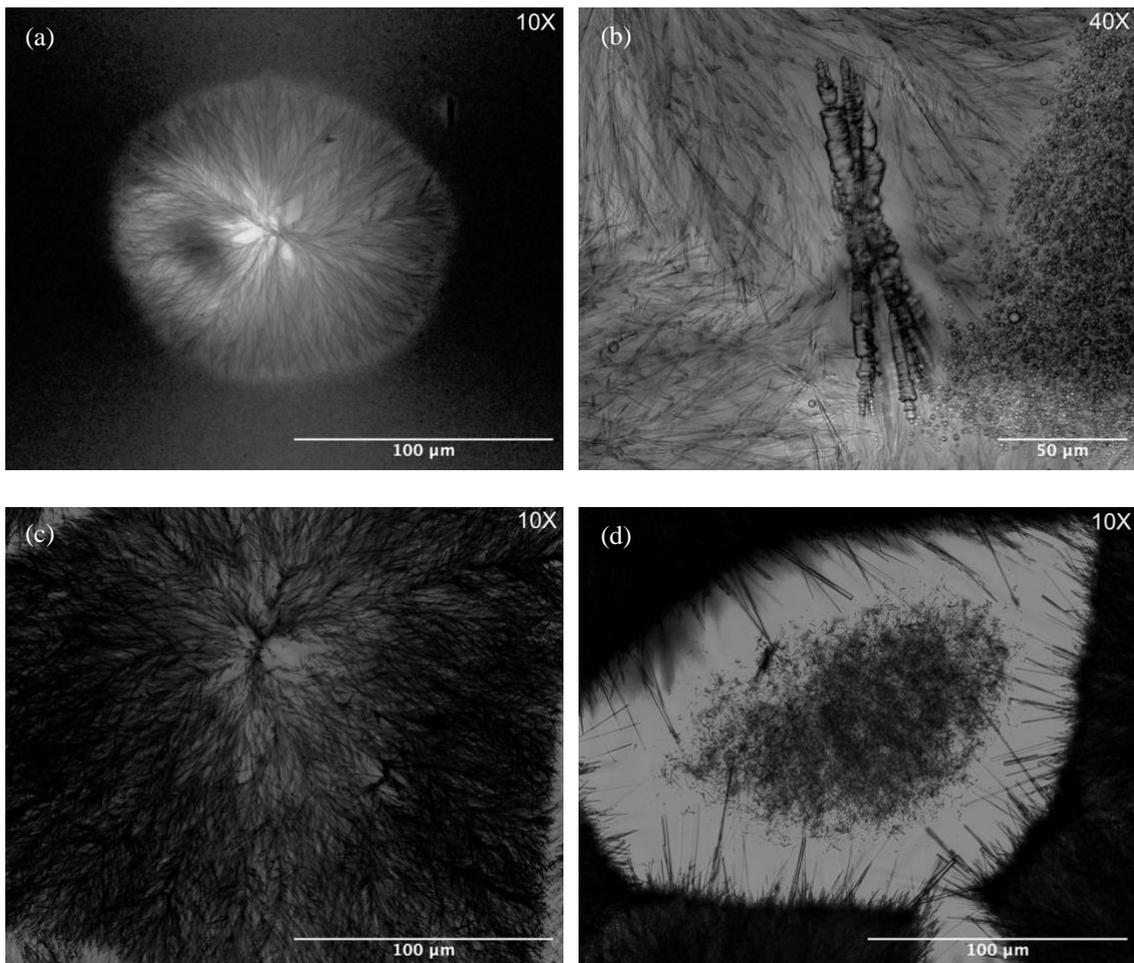


Figura 13. Imagen de la muestra 58 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 20 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

También se estudió la muestra 82 (con 2 equivalentes de NaCl) en el microscopio para identificar diferencias en el proceso de autoensamblaje y formación del hidrogel al cambiar de baja a alta concentración de NaCl. Se observó el mismo proceso de formación de las estructuras ramificadas y el inicio de la cristalización después de 24 horas. La diferencia, como se ha mencionado anteriormente, es que no se formaron los policristales intermedios. Estas imágenes se pueden ver en el Anexo (Figura S18).

Un aspecto interesante de estos sistemas es que, al añadir NaCl, después de 24 horas se observaba la formación de cristales en las inmediaciones de las fibras, mientras que al añadir agua las estructuras ramificadas que se habían formado permanecían intactas.

Al añadir una disolución que contiene una mezcla de HMTA y NaCl a la disolución de FI en metanol, se obtuvo una disolución turbia de color blanco. En todos los casos se formaron agregados aproximadamente 15 minutos después, los cuales aumentaron considerablemente de tamaño, especialmente en el caso de la muestra 106 (Anexo Figura S19).

Para la concentración equivalente a un tercio, también se formaron agregados en todos los casos al mismo tiempo que para la concentración base (15 minutos). Sin embargo, la cantidad de estos fue significativamente menor que en los casos anteriores. Estas imágenes se pueden encontrar en el Anexo (Figura S20).

Para analizar la evolución del autoensamblaje de FI al añadir mezclas de HMTA y NaCl, se examinaron las muestras 98 y 114 bajo el microscopio. La muestra 98 se obtuvo al añadir una disolución acuosa que contenía una mezcla de 0,5 equivalentes de NaCl y 4 equivalentes de HMTA, mientras que la muestra 114 resultó de añadir una disolución acuosa con una mezcla de 2 equivalentes de NaCl y 4 equivalentes de HMTA. Se siguió el mismo proceso de autoensamblaje que al añadir solo HMTA: se produjo la separación de fases líquido-líquido, dando lugar a numerosos coacervados que crecieron en tamaño y número en cuestión de minutos, produciéndose la fusión de unos con otros. Con el tiempo, estos coacervados desaparecieron y dieron lugar a la formación de agregados cristalinos que continuaron creciendo. La principal diferencia observada respecto a la adición de una disolución acuosa que contenía únicamente HMTA es que los agregados formados con las mezclas de NaCl y HMTA eran más pequeños (Anexo Figuras S21 y S22).

4.1.3. Estudio del autoensamblaje de FS

En tercer lugar, se discutirán los resultados obtenidos acerca del autoensamblaje de FS. Al adicionar agua a la disolución de FS en metanol con la concentración base de aminoácido a 24 °C, la disolución se volvió turbia y blanquecina, formándose un hidrogel tras 15 minutos, lo cual se verificó al invertir el vial (Anexo Figuras S23a y S23b).

Al reducir la concentración a la mitad, al añadir agua, no se formó un hidrogel. En su lugar, en la disolución turbia comenzaron a formarse agregados a los 25 minutos, que con el tiempo se hicieron más grandes, ocupando prácticamente toda la disolución (Anexo Figura S23c). Cuando se añadió agua a la disolución con la concentración de aminoácido equivalente a un tercio, se formaron agregados tras 60 minutos que fueron aumentando en tamaño, aunque la cantidad de sólidos obtenidos fue menor que en el caso anterior (Anexo Figura S23d).

Por último, al adicionar agua a la disolución de FS en metanol que contiene una concentración de aminoácido equivalente a un cuarto, la disolución pasó de ser clara a adquirir cierta turbidez, aunque esta era mucho menor que para el resto de las concentraciones. Después de 75 minutos, se observó la aparición de unos agregados muy pequeños que no crecieron en tamaño (Anexo Figura S23e).

Estos resultados muestran que una mayor concentración de aminoácido en la disolución favorece la formación de geles y de agregados. La gelificación ocurre a concentraciones más altas, mientras que la agregación puede observarse a concentraciones menores, siendo este proceso más lento a medida que se disminuye la concentración.

Para estudiar en profundidad cómo se producía el autoensamblaje de FS al añadir agua en el sistema, se analizó la muestra 3 con la concentración base de aminoácido en el microscopio óptico de luz transmitida. Después de 5 minutos de la adición de agua, la estructura comenzó a formar una red fibrilar, indicando un rápido inicio del proceso de autoensamblaje. Se observaron numerosos puntos dispersos en el fondo de la imagen, que correspondían a las gotas ricas en soluto (Figura 14a). Después de 15 minutos, se pudo apreciar que la red de fibras era más densa y que estas fibras estaban más definidas y entrelazadas. Además, la cantidad de coacervados se había reducido notablemente, indicando que los coacervados iniciales eran una fase metaestable que había sido incorporada en la red fibrilar (Figura 14b). La red de fibras

continuó evolucionando, alcanzado un mayor grado de complejidad y densidad, con las fibras más uniformemente distribuidas. Los coacervados habían desaparecido casi por completo tras 1 hora (Figura 14c). A las 24 horas, se pudo ver que la red de FS había alcanzado su máxima densidad y complejidad, y los coacervados habían desaparecido totalmente, evidenciando su integración en la red fibrilar (Figura 14d).

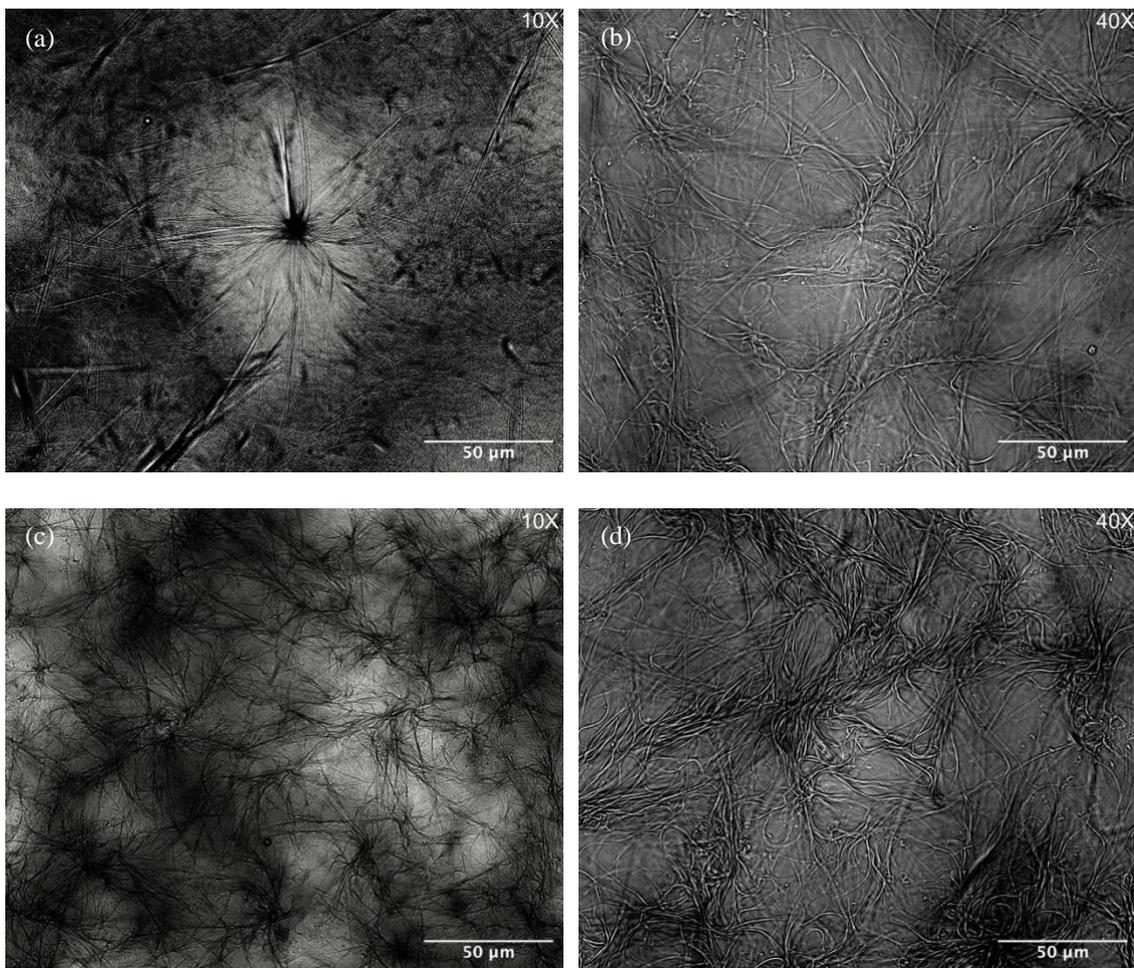


Figura 14. Imagen de la muestra 3 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 15 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

Para estudiar el efecto de la temperatura, después de añadir agua, los viales se dejaron en un baño a 27 °C durante 3 horas. Con la concentración base, al igual que a 24 °C, se formó un hidrogel, lo cual se comprobó al observar que podía soportar su peso al invertir el vial (Anexo Figuras S24a y S24b). Con la mitad y con un tercio de la concentración base, se observaron los mismos resultados que a menor temperatura (Anexo Figuras S24c y S24d). El cambio ocurrió con la concentración equivalente a un cuarto, ya que se obtuvo una disolución

con poca turbidez, similar a la observada a 24 °C, pero no se formaron agregados (Anexo Figura S24e).

Por tanto, con estos resultados podemos concluir que un aumento de la temperatura afecta a la capacidad del autoensamblaje en concentraciones menores.

Cuando se añadió una disolución acuosa de 1 equivalente de HMTA a la disolución de FS en metanol, la disolución cambió a una disolución poco turbia. Durante las próximas 2 horas, no se observó la formación de agregados, pero a las 24 horas se podían encontrar numerosos pequeños agregados repartidos por toda la disolución (Anexo Figura S25a). Sorprendentemente, al aumentar la concentración de HMTA a 2 y 3 equivalentes, no se observó ningún cambio y la disolución permaneció clara (Anexo Figuras S25b y S25c).

Al disminuir la concentración de aminoácido a un tercio, se obtuvo una disolución clara en todos los casos al añadir la disolución acuosa de HMTA. Se pueden encontrar estas imágenes en el Anexo (Figura S26).

Se estudió la muestra 35 bajo el microscopio para examinar cómo se formaban los agregados de FS al añadir 1 equivalente de HMTA. Como se observó macroscópicamente, no se apreció la formación de agregados en las primeras 2 horas, ni se encontraron coacervados. Al analizar la muestra después de 24 horas, se detectaron múltiples agregados fibrosos repartidos por la muestra (Figura 15). Estas observaciones sugieren que el autoensamblaje de FS al añadir 1 equivalente de HMTA es consistente con la nucleación clásica, ya que se apreció la formación de agregados de naturaleza fibrosa a partir de una disolución homogénea sin evidencia de LLPS. No se encontraron coacervados, que serían las gotas ricas en soluto que se observarían antes de formar estructuras más organizadas. Por tanto, la adición de HMTA probablemente induce un cambio en el entorno químico (aumento de pH, formaldehído y amoníaco presentes en el sistema) que favorece la formación de pequeños núcleos de FS, los cuales, con el tiempo, crecen y se organizan en agregados.

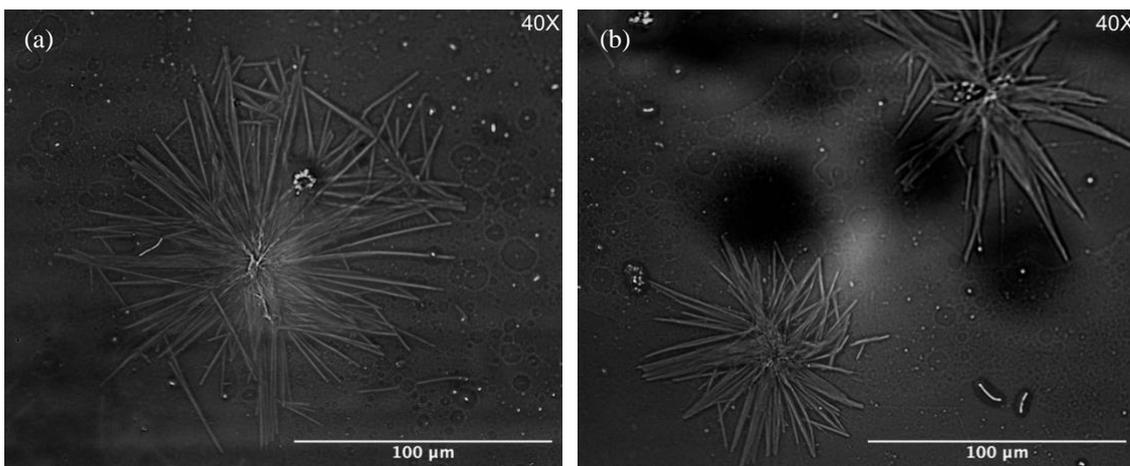


Figura 15. Imágenes de la muestra 35 tras 24 horas

Al añadir una disolución acuosa de NaCl a la disolución de FS en metanol con la concentración base, se observó una turbidez inmediata. El sistema evolucionó hacia un hidrogel que, al igual que ocurría con FI, se formaba más rápidamente al aumentar la concentración de NaCl: 20 minutos para 0,25 equivalentes (Anexo Figuras S27a y S27b), 15 minutos para 0,5 equivalentes (Anexo Figura S27c y Figura S27d) y aproximadamente 10 minutos para 1 y 2 equivalentes de NaCl (Anexo Figuras S27e-S27h). Estos hidrogeles se verificaron al invertir el vial. Interesantemente, el hidrogel que se formó con 2 equivalentes de NaCl fue transitorio, ya que después 24 horas en el vial se encontraron grandes agregados.

Sin embargo, al añadir la disolución de NaCl a diferentes concentraciones a la disolución de FS con una concentración equivalente a un tercio, no se formó un hidrogel en ningún caso. En su lugar, se obtuvo una disolución poco turbia que evolucionó hacia la formación de agregados para 0,25 y 0,5 equivalentes, aproximadamente 35 minutos después de la adición (Anexo Figuras S28a y S28b). Por otro lado, con 1 equivalente de NaCl se observaron pequeños agregados tras 60 minutos (Anexo Figura S28c). Finalmente, para 2 equivalentes de NaCl no se formaron agregados, sino que se obtuvo una disolución turbia que no evolucionó (Anexo Figura S28d).

Se estudiaron las muestras 59 (Anexo Figura S29) y 83 (Figura 16) con el microscopio óptico para analizar el autoensamblaje de FS en presencia de baja y alta cantidad de NaCl. Con los resultados obtenidos se puede concluir que el proceso ocurre de igual manera en ambos, aunque es más acelerado cuando se utilizan 2 equivalentes de NaCl. Para esta última concentración, después de 10 minutos ya no se observaban coacervados (Figura 16b), mientras

que para 0,25 equivalentes a los 15 minutos todavía existían coacervados (Anexo Figura S29b). En ambos casos se formó una red densa y organizada, consistente con el hidrogel observado macroscópicamente. Este proceso de autoensamblaje tiene lugar mediante nucleación no clásica, donde se produce la LLPS, dando lugar a gotas ricas en soluto que evolucionan hacia estructuras más ordenadas, en este caso, fibras.

La diferencia principal radica en que, tras 24 horas, la red de fibras se mantuvo intacta para 0,25 equivalentes (Anexo Figura S29d), mientras que en el caso de 2 equivalentes se observó que la red de fibras ya no era tan compacta y aparecieron algunos agregados cristalinos en zonas donde antes había fibras, indicando que en este caso el hidrogel era una fase transitoria que evolucionó hacia el estado termodinámico más estable, los policristales (Figura 16d). Estos hallazgos son realmente interesantes, ya que controlando la concentración de NaCl se puede obtener un hidrogel estable o un hidrogel cinéticamente atrapado que evoluciona hacia ensamblajes termodinámicos estables.

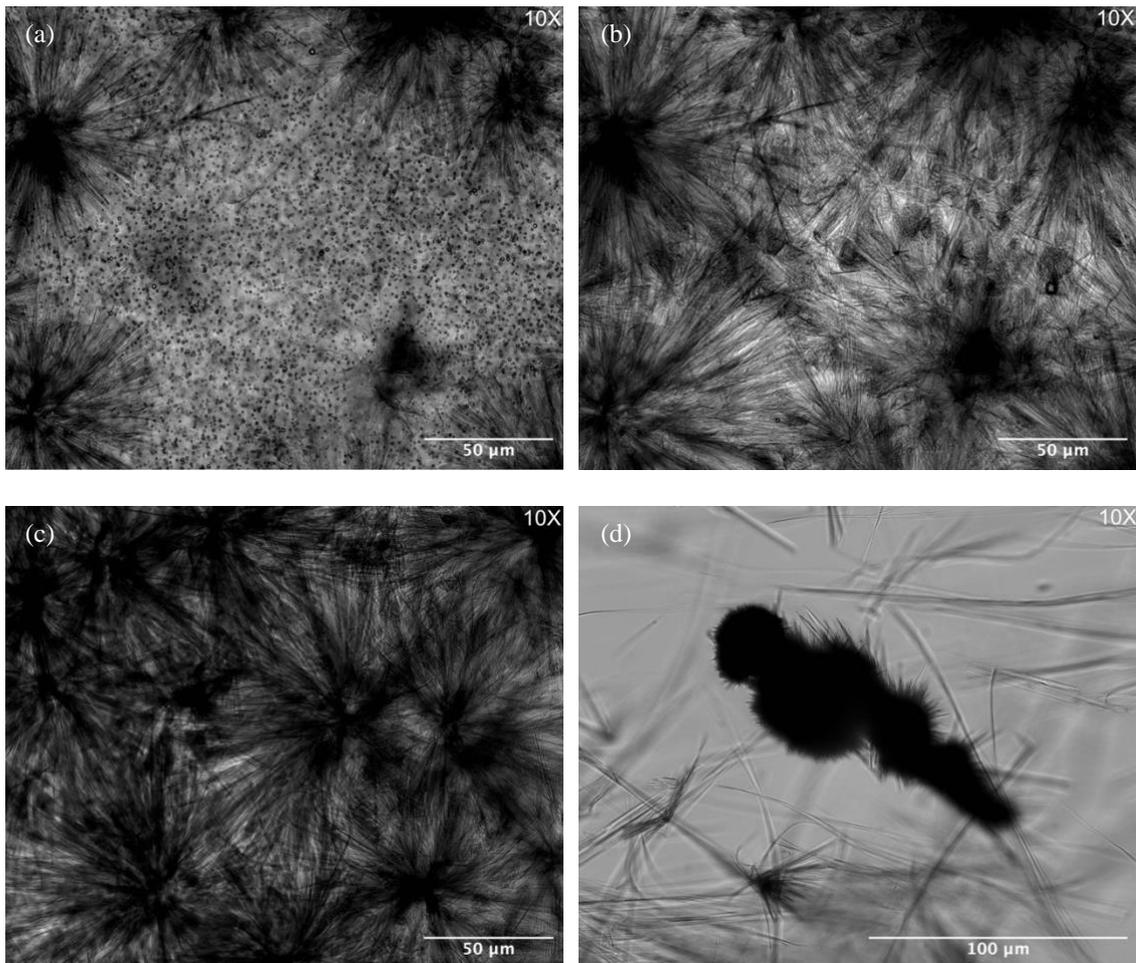


Figura 16. Imagen de la muestra 83 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 10 minutos (b), 40 minutos (c) y 24 horas (d)

Para los casos en los que se añadió una disolución que contenía una mezcla de baja cantidad de HMTA (1 equivalente) y baja (0,5 equivalentes) o alta (2 equivalentes) concentración de NaCl a la disolución de FS en metanol con la concentración base, se obtuvo inicialmente una disolución con poca turbidez. Esta disolución evolucionó hacia la formación de agregados tras aproximadamente 20 minutos, los cuales se sedimentaron en el fondo, dejando una disolución clara en la parte superior del vial (Anexo Figuras S30a y S30c). Sin embargo, cuando se adicionaron las disoluciones con una alta concentración de HMTA (4 equivalentes) con 0,5 y 2 equivalentes de NaCl, no se observaron cambios y la disolución permaneció clara, igual que antes de haber añadido la disolución (Anexo Figuras S30b y S30d).

Al añadir las disoluciones con diferentes concentraciones de NaCl y HMTA, la disolución permaneció clara en todos los casos. Las imágenes correspondientes se encuentran en el Anexo (Figura S31).

Para analizar cómo ocurría la formación de agregados al añadir disoluciones con mezclas de HMTA y NaCl que contenían una baja concentración de HMTA (1 equivalente), se estudiaron las muestras 91 (con 0,25 equivalentes de NaCl) y 107 (con 2 equivalentes de NaCl) bajo el microscopio. En ambos casos no se observó la formación de coacervados, lo que indica que los procesos no involucran la separación de fases, sino que siguen un mecanismo de nucleación clásica, sugiriendo que inicialmente se forman pequeños núcleos a partir de los cuales los agregados crecen, sin la formación de intermedios.

En el caso de la muestra 91, tras 10 minutos se observó la formación de agregados con una estructura más bien fibrosa (Figura 17a y 17b). La formación de estos agregados indicó que los núcleos formados comenzaron a crecer al agregar más monómeros desde la disolución circundante. Estos agregados no crecieron significativamente durante las siguientes 2 horas. Al observar la muestra bajo el microscopio después de 24 horas, los agregados se encontraban en estructuras aparentemente más grandes y organizadas (Figura 17c y 17d).

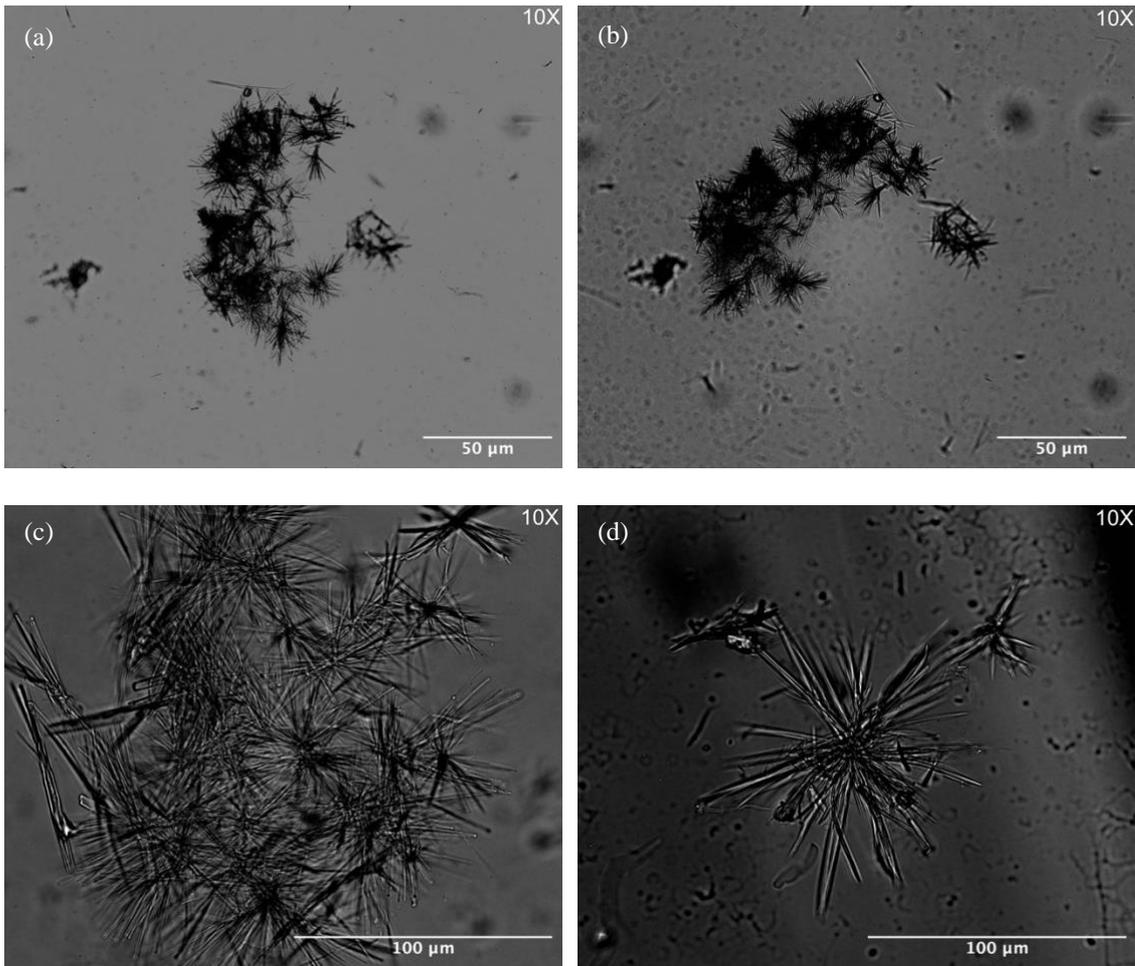


Figura 17. Imagen de la muestra 91 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a y b) y 24 horas (c y d)

Para la muestra 107 tras solo 5 minutos se observaron numerosos agregados con apariencia cristalina (Figura 18a). Con el paso del tiempo, los núcleos formados crecieron y comenzaron a formar estructuras más definidas y alargadas observándose un aumento significativo de los agregados (Figura 18b). Los agregados continuaron creciendo, mostrando una mayor definición y complejidad en su estructura (Figura 18c). Después de 24 horas, estos agregados alcanzaron un mayor tamaño y complejidad, encontrándose numerosos agregados por toda la muestra (Figura 18d).

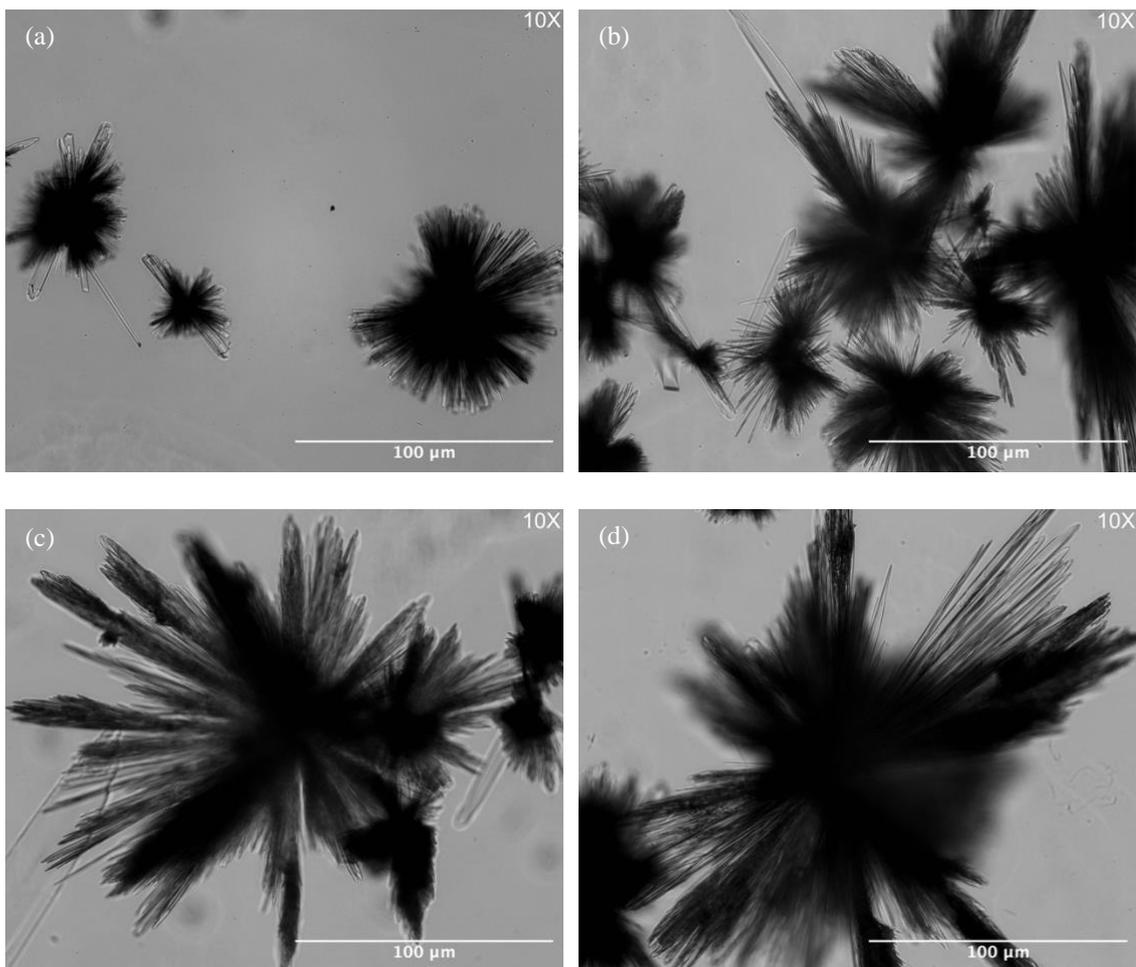


Figura 18. Imagen de la muestra 107 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

4.1.4. Estudio del autoensamblaje de FAM

En los estudios macroscópicos, se observó que la disolución de FAM en metanol se volvía inmediatamente turbia y blanquecina al añadir una disolución acuosa en todos los casos, independientemente de las sustancias añadidas, sus concentraciones, la concentración de aminoácido y la temperatura. Macroscópicamente, esta disolución turbia no evolucionó en ningún caso en agregados o hidrogel, a diferencia de los casos anteriores. Las imágenes de los viales para los diferentes casos estudiados se encuentran en el Anexo (Figuras S32-S36).

Para evaluar si, aunque no había variaciones macroscópicas, existían diferencias a nivel microscópico, se estudiaron las muestras 4, 52, 60, 84, 100 y 116 con el microscopio óptico.

Todos los sistemas son similares durante la primera hora después de la adición de agua, disoluciones acuosas de NaCl, HMTA o sus combinaciones, a la disolución de FAM en

metanol: se observaron numerosos coacervados polidispersos de tamaño micrométrico que aumentaron considerablemente en cantidad con el tiempo. Además, algunos coacervados se fusionaron, resultando en una población muy amplia tras una hora, destacándose algunos por su mayor tamaño al obtener un diámetro entre 6 y 9 μm . La principal diferencia entre los sistemas se observó después de 24 horas.

En cuanto a la muestra 4, tras agregar agua al sistema, se observaron coacervados superestructurados después de 24 horas. Muchos de estos coacervados se agruparon y permanecieron unidos como una sola unidad. Es posible que estos presentaran algún grado de solidificación, lo que podría haber impedido su mezcla y hacer que dejaran de comportarse como gotas. Es decir, podría haber una membrana exterior o la estructura esférica podría estar totalmente solidificada (Figura 19d).

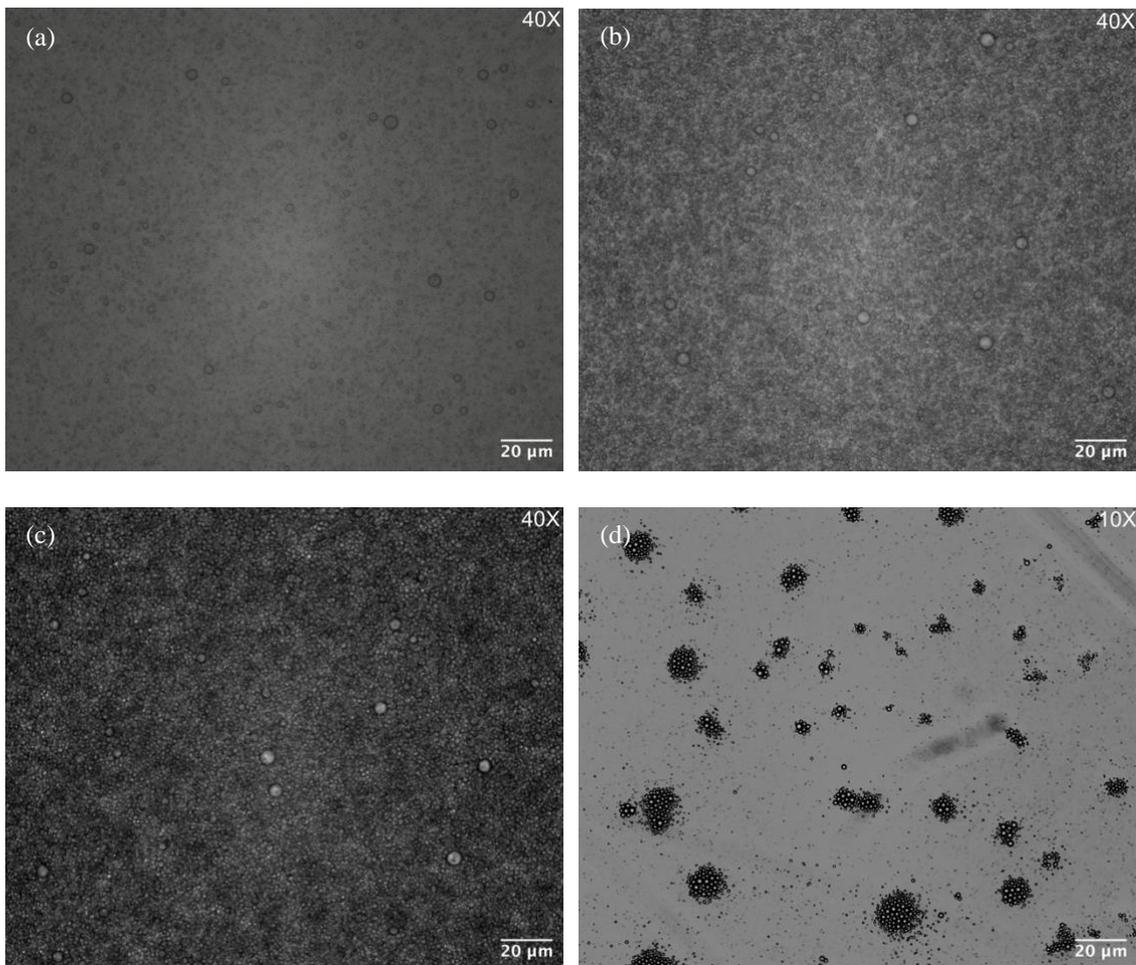


Figura 19. Imagen de la muestra 4 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

Al estudiar la muestra 52 después de la adición de una disolución acuosa que contenía 3 equivalentes de HMTA, se observó que, tras 24 horas, la población de coacervados era grande y la mayoría de ellos había aumentado considerablemente de tamaño, presentando diámetros entre 10 y 14 μm . Este aumento de tamaño puede deberse a la coalescencia de las gotas, que se refiere a la fusión directa de las partículas (Figura 20d). Además, este comportamiento podría estar relacionado con el cambio de pH producido por la liberación de NH_3 por parte de HMTA, lo que favorece un comportamiento más similar al de las gotas y previene la solidificación. Este fenómeno requerirá más estudio.

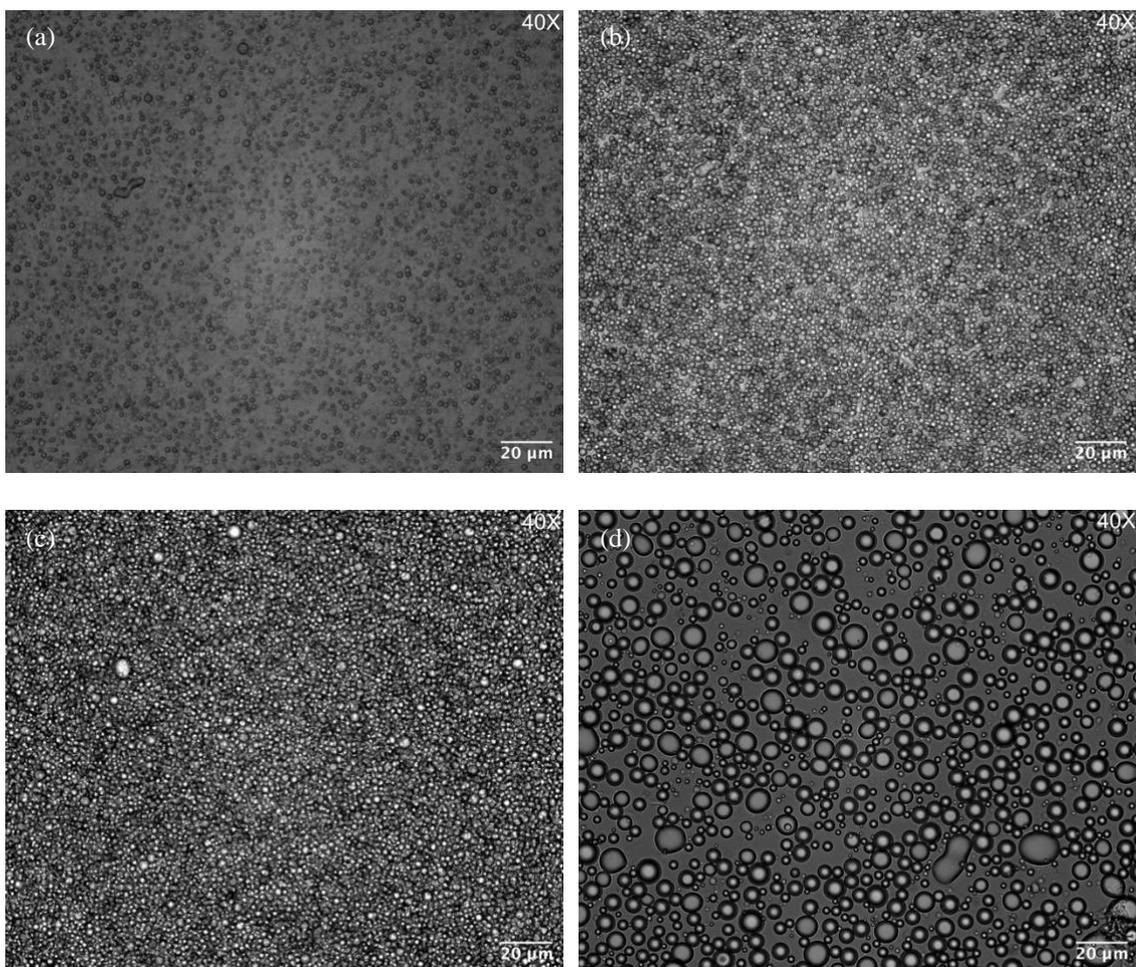


Figura 20. Imagen de la muestra 52 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

Al añadir NaCl en el sistema, se observó que, después de 24 horas, la población de coacervados disminuyó significativamente. Sin embargo, todavía permanecían numerosos coacervados pequeños, así como algunos de mayor tamaño, con diámetros de aproximadamente 7 μm (Figura 21d, Anexo Figura S37d).

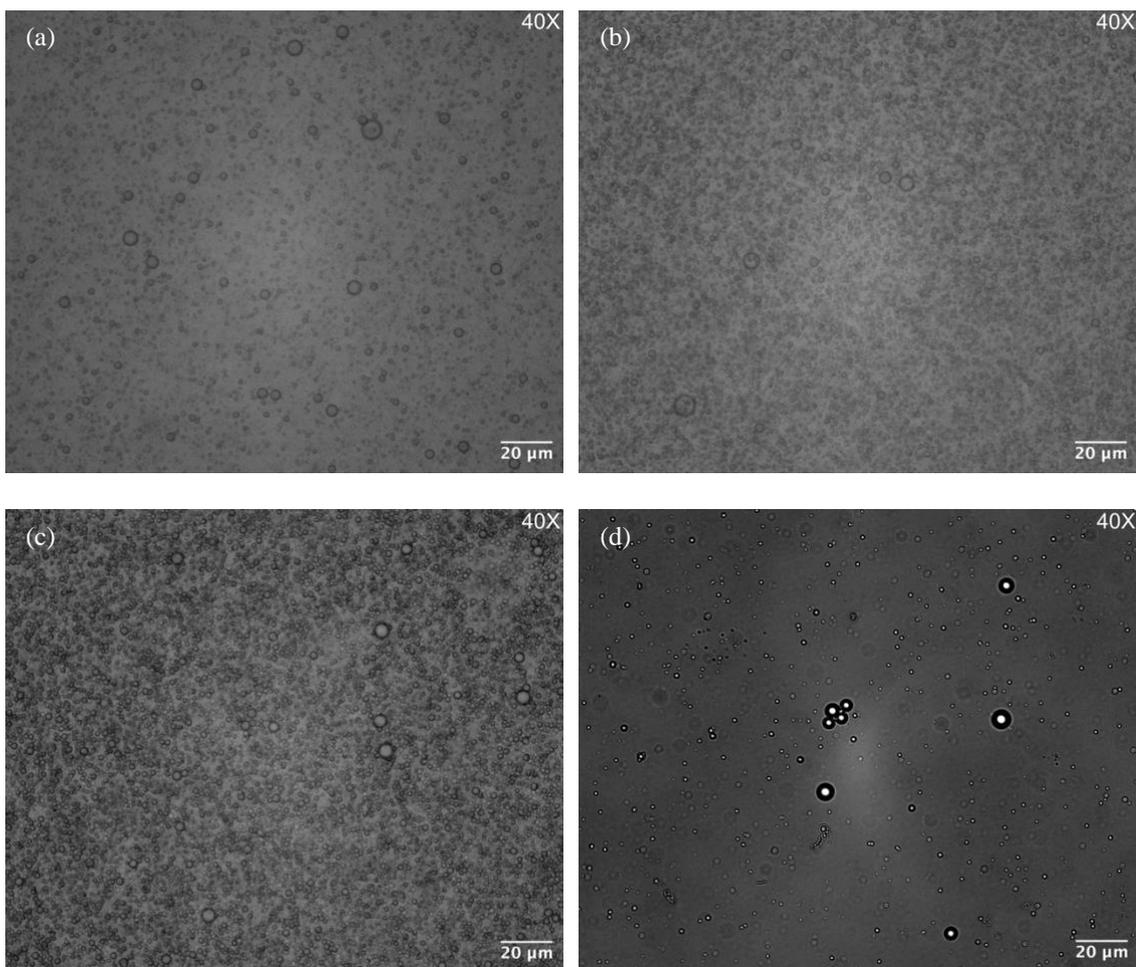


Figura 21. Imagen de la muestra 84 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

Al analizar las muestras 100 (adición de una disolución que contenía 0,5 equivalentes de NaCl y 4 equivalentes de HMTA) y 116 (adición de una disolución que contenía 2 equivalente de NaCl y 4 equivalentes de HMTA), la cantidad de coacervados también disminuyó después de 24 horas, aunque en menor medida que al añadir solo NaCl, especialmente en el caso de la muestra 116, donde la muestra presentaba muchos coacervados pequeños. Esto puede deberse al efecto contrario que producen en el sistema HMTA y NaCl: con HMTA los coacervados que se obtienen tras 24 horas son mucho más grandes, mientras que la población con NaCl se reduce considerablemente (Figura 22d, Anexo Figura S38d).

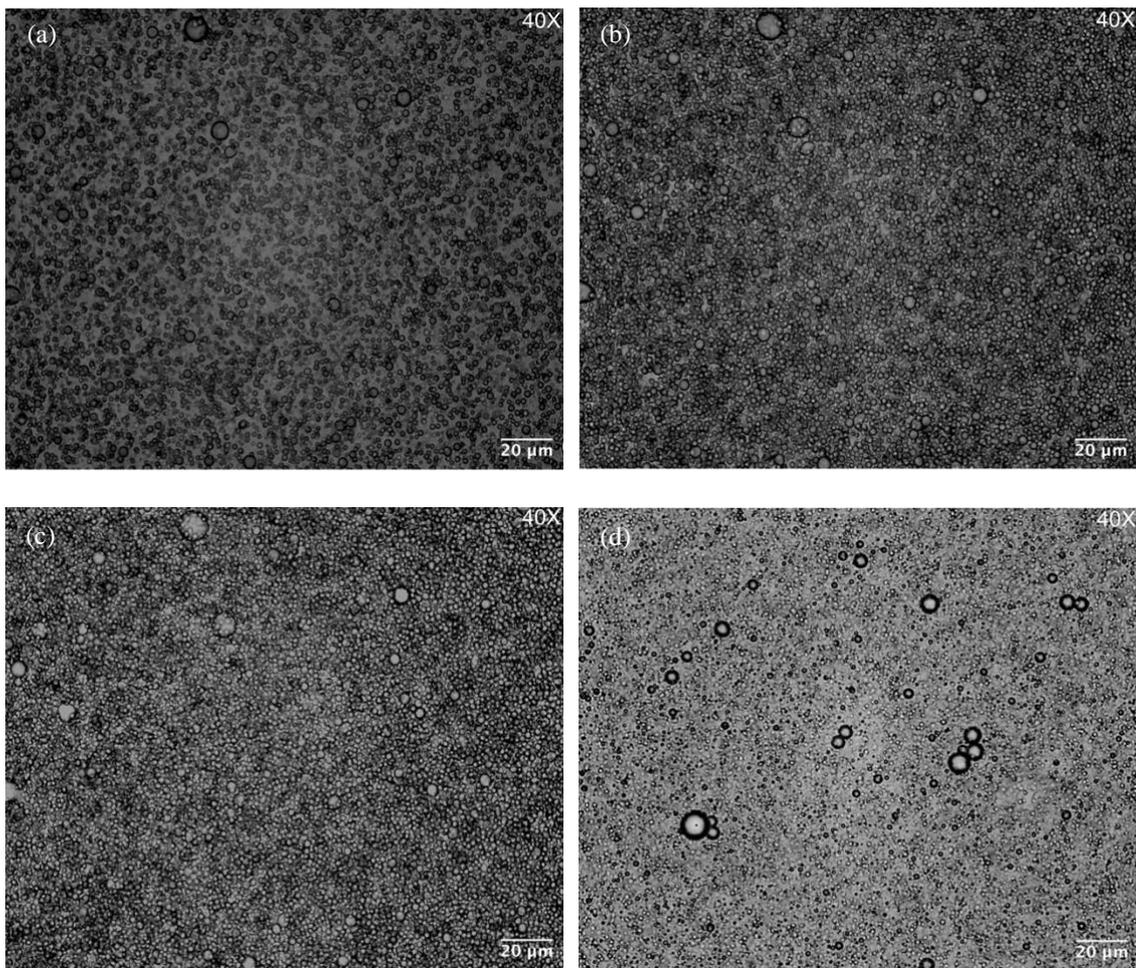


Figura 22. Imagen de la muestra 116 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

4.1.5. Estudio del autoensamblaje de FNM

Para finalizar, se van a analizar los resultados obtenidos para el estudio del autoensamblaje de FNM.

Cuando se añadió agua en el sistema, se produjo de manera instantánea la LLPS, dando lugar a numerosos coacervados de tamaño variado, pero, en general, estas estructuras eran bastante pequeñas y estaban distribuidas de manera homogénea en la disolución. Esta etapa temprana marcó el inicio del autoensamblaje (Figura 23a). Los coacervados comenzaron a unirse, formando estructuras más grandes con un diámetro de aproximadamente $5 \mu\text{m}$, indicando una fase de nucleación y crecimiento, donde las pequeñas estructuras iniciales se fusionaban para formar coacervados de mayor tamaño (Figura 23b). A la hora, se identificaron varios coacervados grandes, algunos de hasta $13 \mu\text{m}$ de diámetro. Estos coacervados presentaban otros más pequeños en su interior, lo que indica que los coacervados estaban en

constante movimiento y fusión, formando estructuras más complejas y grandes (Figura 23c). Después de 24 horas, se observó una gran estructura. Además, los coacervados eran muy grandes y numerosos, con un diámetro en torno a $14\ \mu\text{m}$, y parecían integrarse poco a poco en el agregado más complejo. Por tanto, los coacervados se habían fusionado en una estructura dominante, y la presencia de la gran estructura formada indicaba un nivel adicional de organización (Figura 23d).

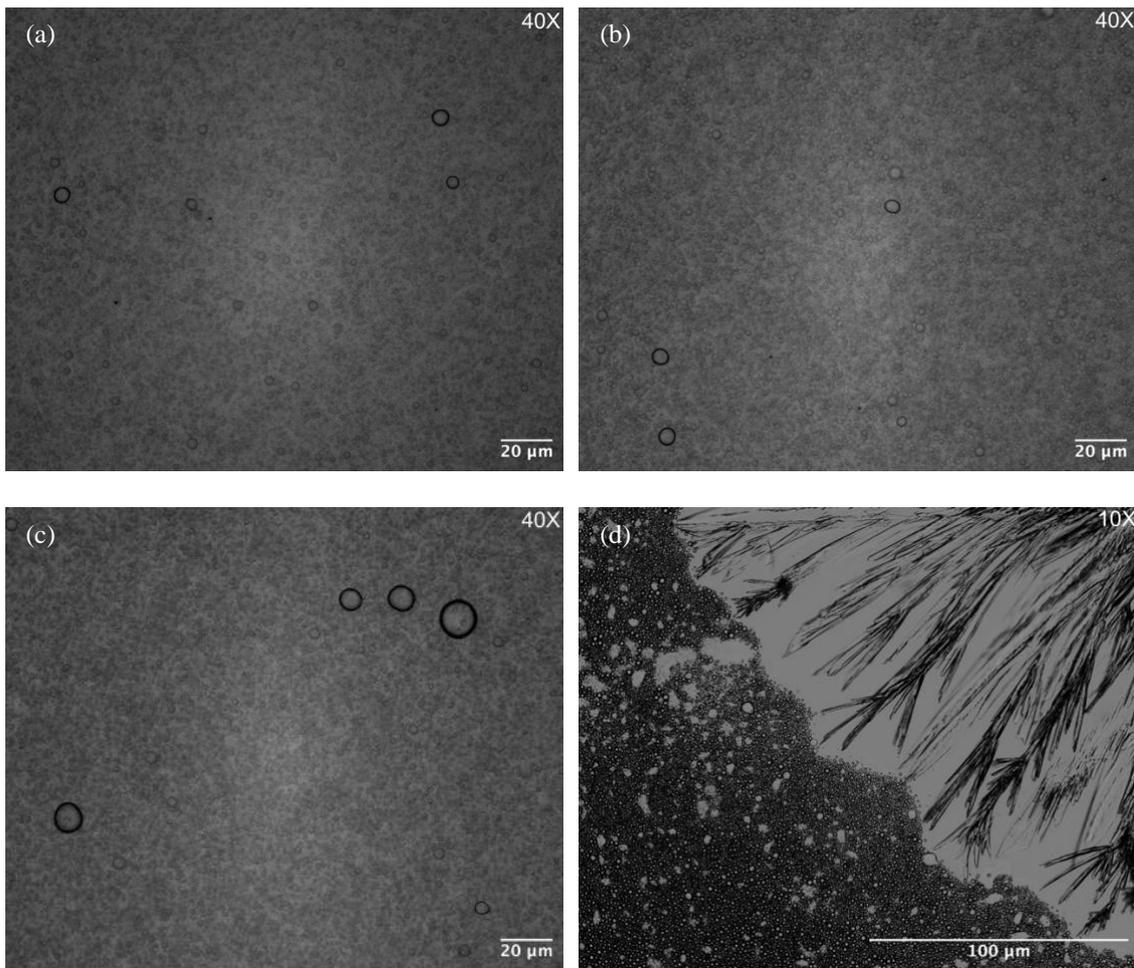


Figura 23. Imagen de la muestra 121 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

Cuando se adicionó una disolución acuosa que contenía 3 equivalentes de HMTA a la disolución de FNM en metanol, se observaron numerosos coacervados polidispersos, destacándose algunos de mayor tamaño, y comenzó a observarse la coalescencia de unos coacervados con otros (Figura 24a). La población de coacervados fue creciendo progresivamente, observándose una gran cantidad de estos por toda la muestra (Figura 24b y 24c). Después de 24 horas, se habían formado algunos agregados cristalinos pequeños y la

cantidad de coacervados disminuyó significativamente, lo que podría sugerir que han participado en el proceso de formación de los agregados (Figura 24d).

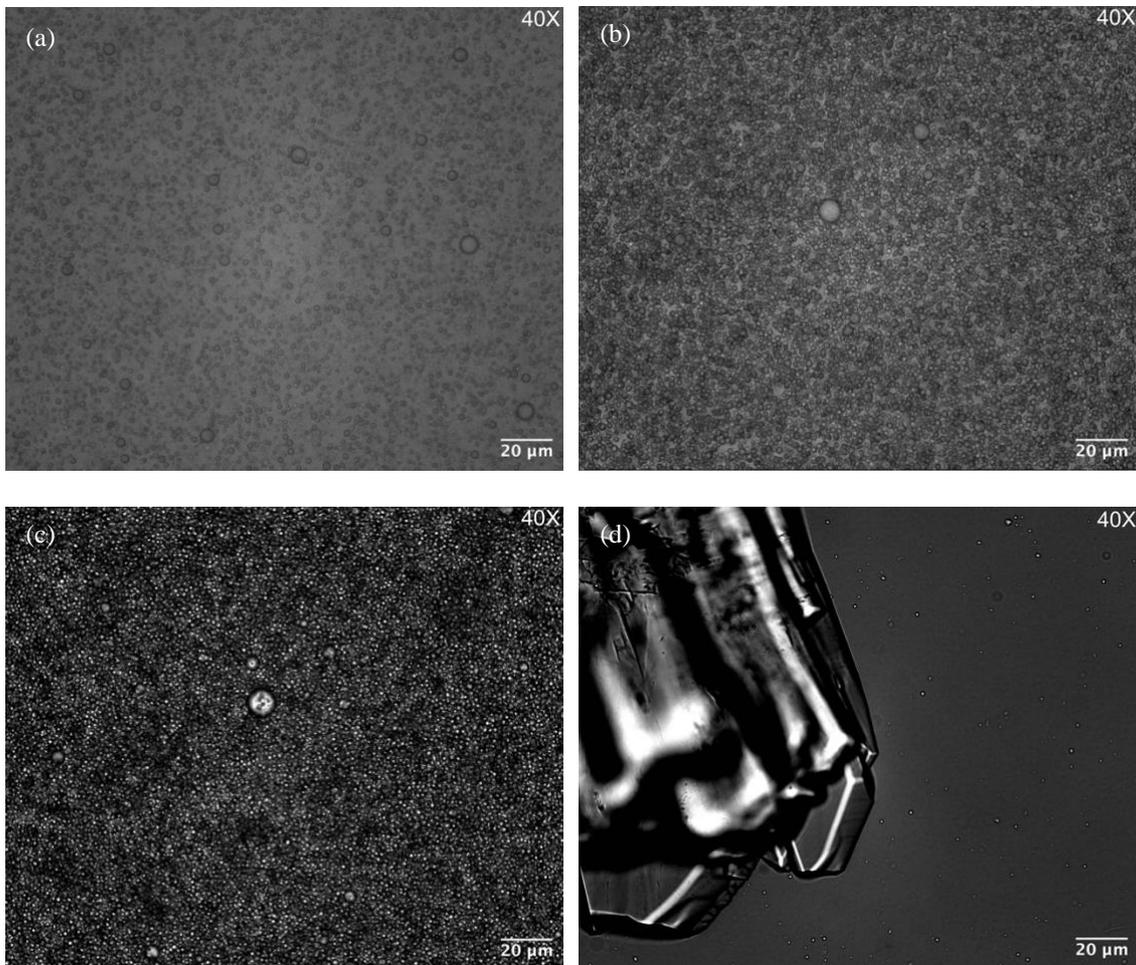


Figura 24. Imagen de la muestra 122 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

Diez minutos después de añadir una disolución acuosa salina con 0,25 equivalentes de NaCl a la disolución de FNM, se observaron numerosos coacervados de diversos tamaños, desde 0,1 μm hasta 7 μm de diámetro. Sin embargo, inicialmente la cantidad de coacervados fue menor comparada con los casos anteriores al añadir agua y HMTA al sistema (Figura 25a). Con el paso del tiempo, la población de coacervados aumentó significativamente y se observaron más coacervados de mayor tamaño (Figura 25b). Después de 1 hora, la cantidad de coacervados seguía aumentando y aunque la mayoría eran de tamaño pequeño, algunos alcanzaron un diámetro considerable de aproximadamente 8 μm debido a la coalescencia entre ellos (Figura 25c). Tras 24 horas, se pudieron observar agrupaciones densas y granulares de

coacervados, indicando una estructura más compleja y organizada que no se había observado en muestras anteriores (Figura 25d).

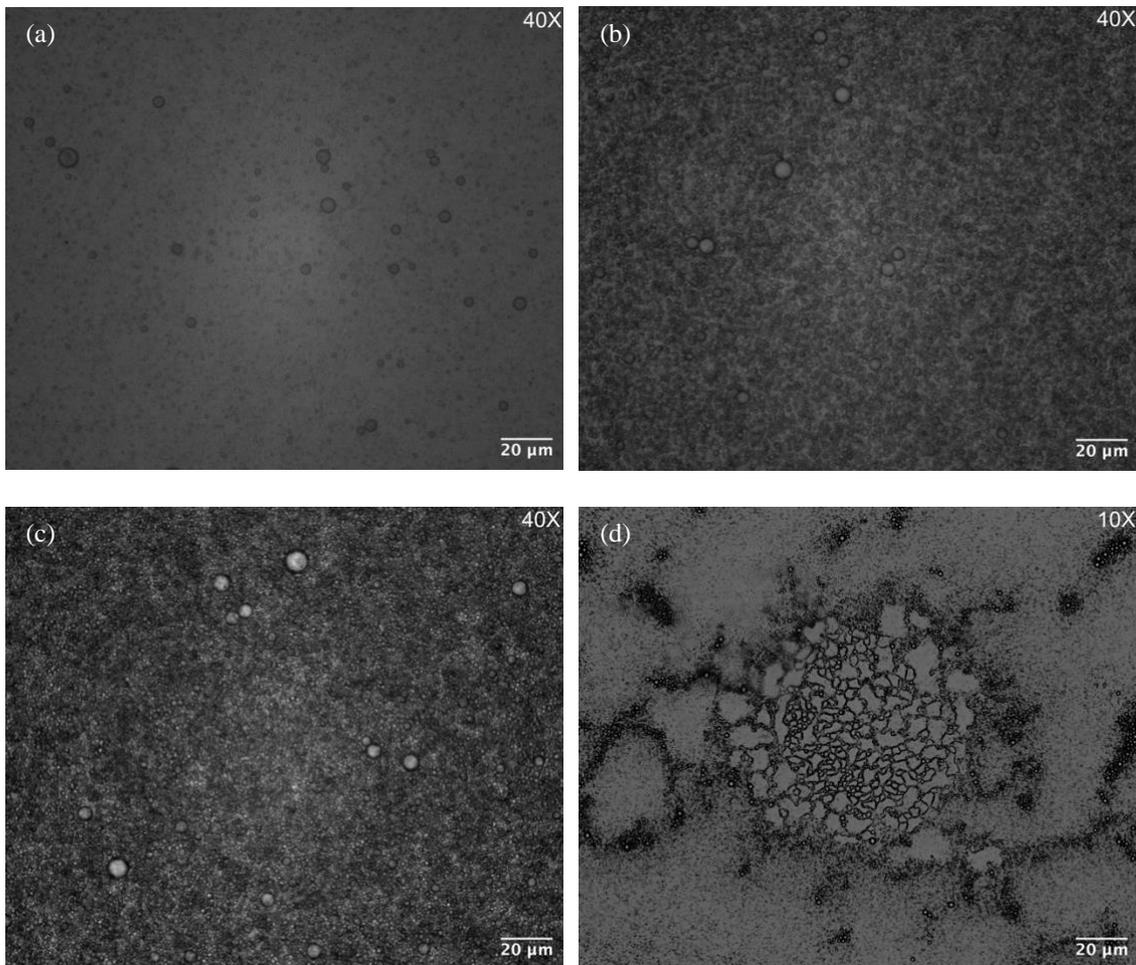


Figura 25. Imagen de la muestra 123 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

Al añadir una disolución acuosa que contenía 2 equivalentes de NaCl a la disolución de FNM en metanol, se produjo instantáneamente una LLPS, resultando en numerosos coacervados por toda la muestra (Figura 26a). Estos coacervados aumentaron en cantidad con el tiempo, aunque no en tamaño (Figura 26b). Después de 1 hora, además de una gran población de coacervados de pequeño tamaño, se pudo apreciar la formación de una estructura amorfa (Figura 26c). Tras 24 horas, los coacervados eran prácticamente inexistentes y se había formado una estructura cristalina acicular de gran tamaño, lo que sugiere que los coacervados participaron en el proceso de formación de esta estructura (Figura 26d).

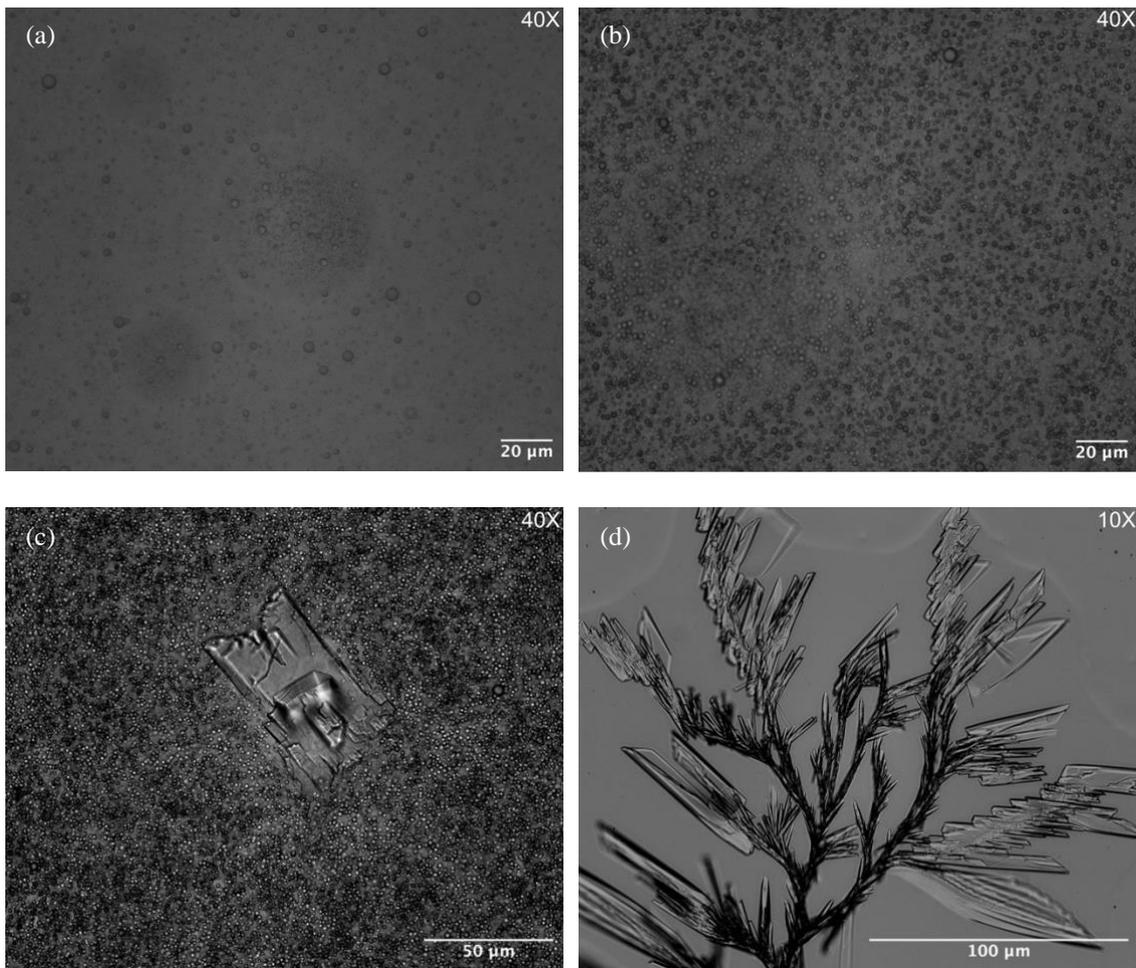


Figura 26. Imagen de la muestra 124 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

Cuando se añadió una disolución acuosa que contenía una mezcla de 0,5 equivalentes de NaCl y 4 equivalentes de HMTA, como en los casos anteriores, se formaron coacervados de manera inmediata, consistente con el proceso de LLPS (Figura 27a). Estos coacervados aumentaron mucho en cantidad y, debido a su constante movimiento y fusión, se formaron algunos coacervados muy grandes con un diámetro de hasta 13 μm (Figura 27b). Después 1 hora, la población de coacervados era todavía mayor y se observaron numerosas agrupaciones de estos (Figura 27c). Curiosamente, después de 24 horas, la cantidad de coacervados había disminuido significativamente y los que todavía permanecían en la muestra generalmente estaban agrupados (Figura 27d). Además, se observaron algunos agregados similares a los encontrados en la muestra 126 tras 24 horas (Figura 28d).

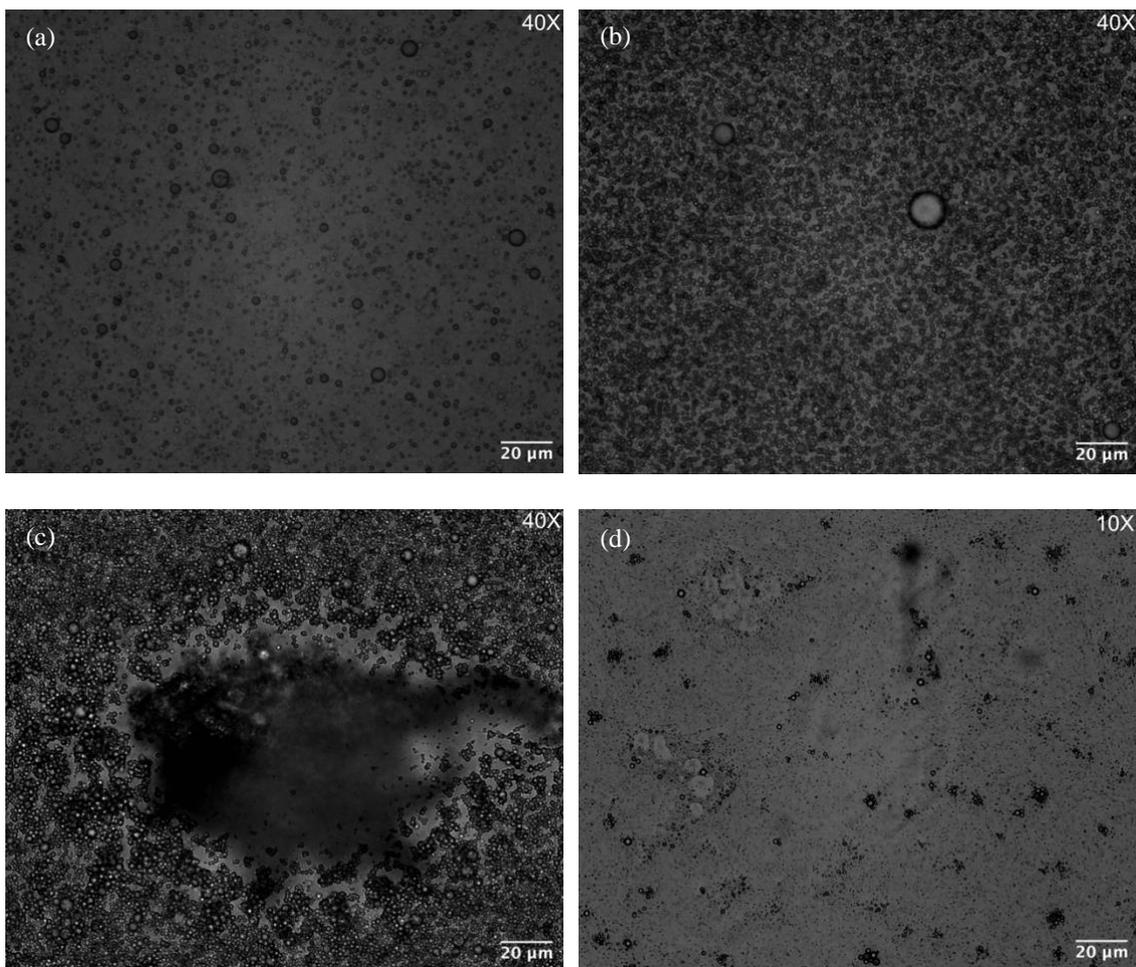


Figura 27. Imagen de la muestra 125 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

Cuando se adicionó una disolución acuosa de 2 equivalentes de NaCl y 4 equivalentes de HMTA a la disolución de FNM en metanol, se formaron coacervados de manera instantánea (Figura 28a). Estos coacervados aumentaron en tamaño y número con el paso de los minutos (Figuras 28b y 28c). Después de 24 horas, la población de coacervados disminuyó notablemente, y aunque en general eran de pequeño tamaño, se observaron algunos de hasta 14 μm de diámetro. También se detectaron numerosos agregados (Figura 28d).

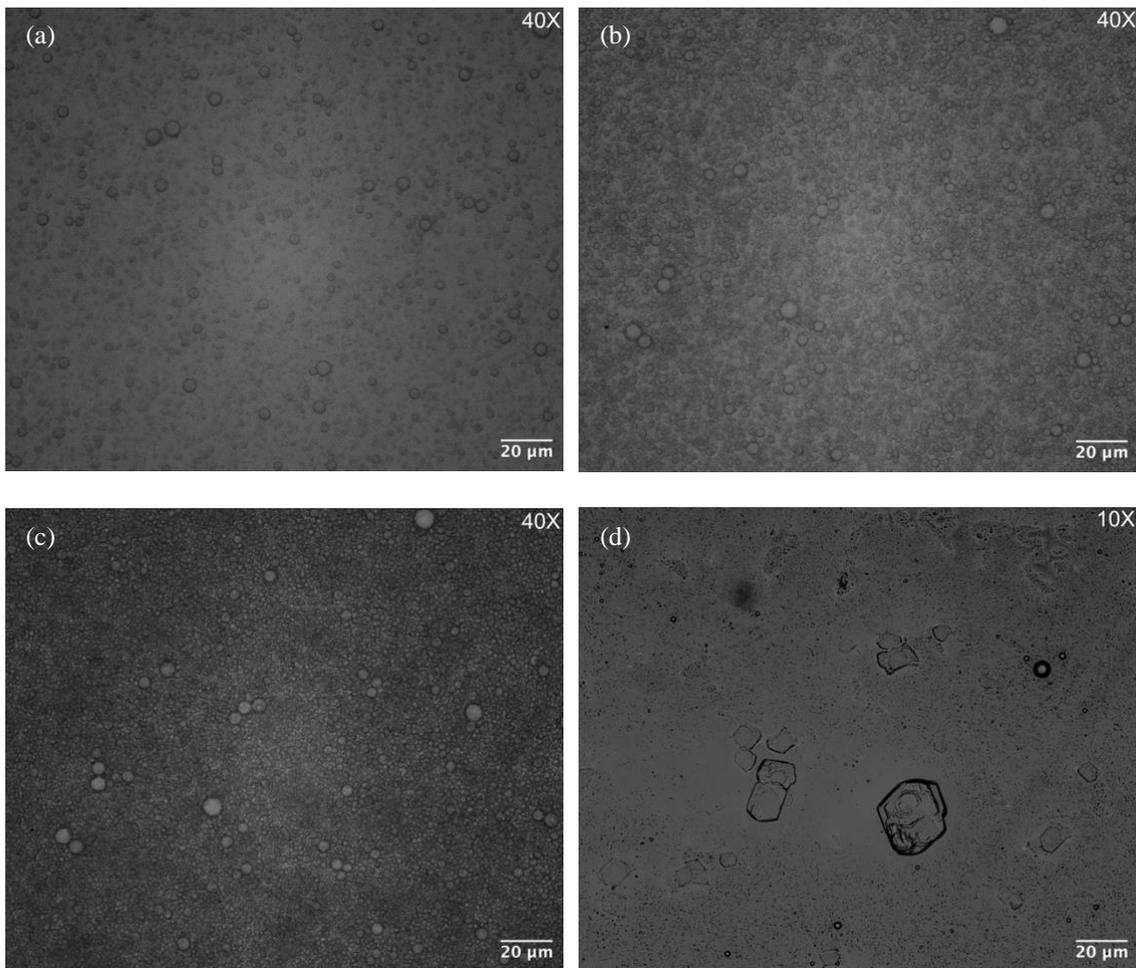


Figura 28. Imagen de la muestra 126 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

4.2. Reología

En este estudio, se evaluó la respuesta mecánica de los sistemas que forman hidrogeles utilizando la técnica de reología. Los módulos G' y G'' fueron medidas clave obtenidas mediante estas pruebas.

G' corresponde al módulo elástico y refleja la cantidad de energía elástica almacenada en el material durante la deformación y es una medida directa de su elasticidad. Un valor elevado de G' indica que el material tiene un comportamiento más sólido o elástico. Durante el proceso de gelificación, se espera un aumento significativo en el módulo elástico a medida que el material se estructura y forma una red tridimensional, reflejando así su transición hacia un estado más rígido y gelificado.³⁹

G'' es el módulo viscoso y representa la cantidad de energía que se disipa como calor durante la deformación, indicando el comportamiento viscoso o líquido del material. Aunque durante la gelificación también puede observarse un incremento en G'' , este aumento suele ser menos pronunciado en comparación con G' . Esto sugiere que, a medida que el material se vuelve más sólido, también conserva cierta capacidad de fluir o deformarse viscosamente.⁴⁰

Estos módulos proporcionan una descripción de cómo los sistemas estudiados cambian mecánicamente con el tiempo durante la formación del gel. En el Anexo se presentan las gráficas de módulo G' y G'' en función del tiempo, que ilustran estos cambios y permiten una evaluación cuantitativa de la gelificación. Los símbolos sólidos representan el módulo de almacenamiento (G') y los símbolos vacíos representan el módulo de pérdida (G'').

Para el sistema de FL con 2 equivalentes de NaCl y 4 equivalentes de HMTA, el tiempo de iniciación del gel ocurre a aproximadamente 7 minutos, obteniéndose un valor máximo de G' de 217,2 Pa (Anexo Figura S39).

Para el sistema de FI, el tiempo de iniciación de gelificación se observó a aproximadamente 16 minutos con agua, alcanzando un valor máximo de G' de 180,6 Pa. Con 0,25 equivalentes de NaCl, el tiempo de iniciación del gel ocurre a unos 13 minutos, logrando un máximo de G' de 668 Pa. Utilizando 2 equivalentes de NaCl, la gelificación se inició a los 11 minutos, obteniendo un valor máximo de G' de 214,9 Pa (Anexo Figura S40).

Respecto al sistema de FS, la gelificación se inició aproximadamente a los 15 minutos con agua, alcanzando un máximo de G' de 822,5 Pa. Con 0,25 equivalentes de NaCl, el tiempo de iniciación del gel ocurre a aproximadamente 6 minutos, obteniéndose un valor máximo de G' de 1416 Pa. Con 2 equivalentes de NaCl, la gelificación comenzó en menos de 5 minutos, con un valor máximo de G' de 45,07 Pa (Anexo Figura S41).

En todos los casos se observa que al principio se tiene un comportamiento predominantemente líquido, con ambos módulos teniendo valores similares. A medida que avanza el tiempo, G' es mayor que G'' , lo que indica que el material adquiere propiedades sólidas.

Los valores más altos de G' están asociados con hidrogeles que presentan una red de fibras más robusta y estable, siendo el caso de FI y FS con baja concentración de NaCl (668 Pa y 1415 Pa, respectivamente). Por otro lado, los sistemas con valores más bajos de G' son aquellos donde se añadió agua en el caso de FI y 2 equivalentes de NaCl en el caso de FS (180,6 y 47,07 Pa, respectivamente). Destaca especialmente el valor tan bajo en este último caso, ya que además macroscópicamente es un hidrogel transitorio, indicando la baja estabilidad de la red de fibras.

Un hallazgo notable es que los sistemas que forman hidrogeles transitorios (FL y FS con 2 equivalentes de NaCl) muestran tiempos de inicio de gelificación muy cortos, especialmente en el caso de FS. Esto sugiere que estos sistemas son capaces de formar estructuras de gel rápidamente, pero también son menos estables a largo plazo. Por otro lado, el sistema que presenta un valor más alto de G' (FS con 0,25 equivalentes de NaCl) también muestra un tiempo de inicio de gelificación muy corto, indicando una rápida formación de una red de fibras de gel y una alta estabilidad al alcanzar un valor alto de G' .

4.3. Difracción de rayos X en polvo

En el espectro de difracción de rayos X en polvo de la muestra 2, se observa al minuto los picos obtenidos son débiles y anchos, lo que indica una fase inicial amorfa. Esto es consistente con la disolución turbia observada macroscópicamente y los coacervados observados microscópicamente, que representan una fase metaestable indicativa de una nucleación rápida pero desordenada. Después de 6 horas, la intensidad y definición en los picos aumentan, lo que sugiere una cristalización progresiva con la formación de estructuras más ordenadas. Tras 24 horas, se observan exactamente los mismos picos, lo que indica que la red tridimensional responsable de la formación del hidrogel es estable (Anexo Figura S42).

En el espectro de difracción de rayos X en polvo de la muestra 58 (Anexo Figura S43) y de la muestra 82 (Anexo Figura S44), ocurre lo mismo que para la muestra anterior: se obtienen picos débiles inicialmente, y a las 6 horas y 24 horas, los picos son muy definidos y prácticamente idénticos en estos dos tiempos. La diferencia con respecto a la muestra 4 es que estos sistemas son más estables inicialmente, ya que para la muestra 4 no se podían distinguir picos, mientras que para las muestras 58 y 82 sí.

El espectro de la muestra 3 muestra que inicialmente, a un minuto, el patrón de difracción presenta picos débiles, indicando una nucleación inicial desordenada. A las 6 horas, se obtienen picos de difracción más definidos debido a la formación de una estructura más ordenada, lo que da lugar al hidrogel observado macroscópicamente. A las 24 horas, se observa una mayor intensidad de los picos, lo que indica que la red tridimensional se ha estabilizado (Anexo Figura S45).

En el espectro de la muestra 59 (Anexo Figura S46), se observa que inicialmente se tienen algunos picos visibles, y una mayor definición y nitidez de los picos después de 6 horas, lo cual se mantiene tras 24 horas. Esto indica una mayor estabilidad y un mayor orden estructural, lo que es consistente con los datos obtenidos en reología, que indicaban que la red de fibras más robusta se encontraba en este sistema.

El espectro de la muestra 83 muestra que este sistema es el más estable inicialmente de los estudiados para FS, ya que se observan picos más nítidos que en cualquier otra muestra. Tras 6 horas, aumenta la intensidad y definición de los picos, lo que indica la formación de estructuras más ordenadas, consistentes con el hidrogel que se forma. Sin embargo, después de 24 horas, el hidrogel desaparece, lo cual se refleja en una disminución en la intensidad de los picos, indicando la desestabilización de la red del gel. Sin embargo, los picos son los mismos (aunque menos intensos), lo que indica que las dos estructuras obtenidas son polimorfos (Anexo Figura S47). Esta desaparición del gel puede explicarse por una reorganización estructural inducida por una alta concentración de NaCl o por un cambio en las interacciones moleculares que dan lugar a la desestabilización del hidrogel.

Si se comparan los espectros de FI y FS, se observa que los picos de difracción obtenidos para FI son de mayor intensidad y más definidos, lo que indica una estructura cristalina altamente ordenada y estable. En contraste, para FS se observan picos más anchos y menos intensos, lo que sugiere una estructura menos cristalina y más desordenada. Por tanto, las fibras formadas pueden ser ordenadas pero contienen regiones amorfas. Esta diferencia puede atribuirse a la naturaleza de las interacciones moleculares y la flexibilidad intrínseca de las moléculas de FS, que podría resultar en una organización más amorfa y una cristalización menos eficiente que la de FI.

5. CONCLUSIONES

Tras finalizar los ensayos experimentales y el análisis y discusión de los resultados obtenidos, a continuación, se enumeran las conclusiones extraídas del presente trabajo:

1. A concentraciones más bajas de aminoácido, el proceso de autoensamblaje se ralentiza. Adicionalmente, un aumento en la temperatura disminuye la eficiencia del autoensamblaje, sugiriendo que temperaturas más altas interfieren con la formación de estructuras ordenadas.
2. Con FL, se obtienen ensamblajes muy variados dependiendo del sistema: con agua y con NaCl se forman láminas 2D plegadas, con HMTA se forman esferulitas policristalinas, con mezclas de HMTA y NaCl con baja concentración se obtienen esferulitas cristalinas y fibras, y con mezclas con una alta concentración de NaCl se forma un hidrogel transitorio con fibras concentradas en grandes dominios que eventualmente evolucionan hacia esferulitas cristalinas. Estos procesos son consistentes con una nucleación no clásica, implicando un paso de nucleación menos ordenado y la formación de estructuras metaestables como intermedios.
3. En cuanto al autoensamblaje de FI, se forman hidrogeles al añadir agua y NaCl, caracterizados por la formación de policristales intermedios que dan lugar a una red enorme de estructuras ramificadas responsables del hidrogel, siendo la diferencia entre estos geles la presencia de cristales tras 24 horas con NaCl. Con HMTA y con mezclas de NaCl y HMTA se obtuvieron grandes estructuras cristalinas. Estos procesos también siguen una nucleación no clásica.
4. Respecto al autoensamblaje de FS, al igual que con FI, se forman hidrogeles con agua y NaCl, aunque estos geles son muy diferentes microscópicamente, ya que en este caso están compuestos por una gran red fibrilar. Es de particular interés el hidrogel transitorio obtenido con alta concentración de NaCl. Con HMTA se forman agregados fibrosos y con mezclas de HMTA y NaCl se obtienen también agregados, todos muy diferentes en forma y distribución. En presencia de HMTA, los autoensamblajes se forman mediante nucleación clásica, sin la formación de fases intermedias, sugiriendo que los núcleos ordenados se forman directamente a partir de disoluciones sobresaturadas de

monómeros, mientras que en el resto de los procesos siguen una nucleación no clásica.

5. Los autoensamblajes de FAM pueden ser más simples, pero igualmente interesantes. En todos los casos tiene lugar una LLPS que da lugar a numerosos coacervados. Con agua finalmente se obtienen unas agrupaciones de coacervados muy concretas; con HMTA, coacervados de gran tamaño; con NaCl disminuye considerablemente la población de coacervados; y con mezclas de HMTA y NaCl la cantidad de coacervados también disminuye, aunque en menor medida que con solo NaCl, lo que puede deberse al efecto de dos sustancias juntas que por separado dan lugar a sistemas totalmente diferentes.
6. En el caso de FNM, todos los procesos siguieron una nucleación no clásica produciéndose la separación de fases, destacando la variabilidad entre los sistemas. Con agua se obtiene una gran estructura; con HMTA, pequeños agregados cristalinos; con baja concentración de NaCl, agrupaciones densas y granulares de coacervados; mientras que con alta concentración de NaCl se forma una gran estructura cristalina acicular. Con mezcla de HMTA y baja concentración de NaCl se obtienen coacervados agrupados y pequeños agregados, similar a lo ocurrido con mezcla de HMTA y alta concentración de NaCl.
7. Los estudios reológicos confirmaron la formación de los hidrogeles en los sistemas estudiados. Los hidrogeles mostraron diferentes niveles de estabilidad y robustez, siendo más robustos aquellos formados con baja concentración de NaCl.
8. Mediante difracción de rayos X en polvo, se observó que los sistemas de FI producen estructuras altamente ordenadas y estables, mientras que FS tiende a formar estructuras menos cristalinas y más desordenadas. Esto indica una diferencia fundamental en las interacciones moleculares y la flexibilidad intrínseca. Además, para ambos aminoácidos, las estructuras eran más ordenadas inicialmente para los sistemas en presencia de NaCl.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

6.1.1. *Material básico*

Durante el desarrollo de la parte experimental se ha usado material básico de laboratorio como espátulas, viales HPLC, jeringas, micropipetas, balanza de precisión, vasos de precipitados, portaobjetos μ -Slides (variedad I Luer), Parafilm y nevera a 5 °C.

6.1.2. *Reactivos*

- N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-leucina (Fmoc-L-leucina, FL). Adquirido de Thermo Scientific. Peso molecular: 353,42 g/mol. Fórmula molecular: $C_{21}H_{23}NO_4$.

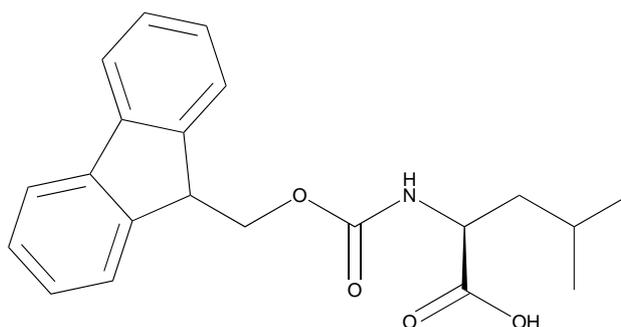


Figura 29. Estructura química de Fmoc-L-leucina (FL)

- N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-isoleucina (Fmoc-L-isoleucina, FI). Proporcionado por TCI chemicals. Peso molecular: 353,42 g/mol. Fórmula molecular: $C_{21}H_{23}NO_4$.

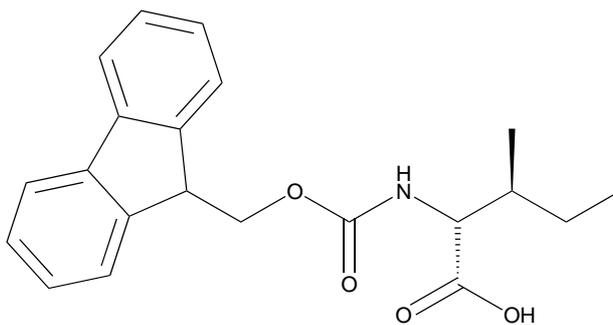


Figura 30. Estructura química de Fmoc-L-isoleucina (FI)

- N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-L-serina Hidratada (Fmoc-L-serina, FS).
Obtenido de TCI chemicals. Fórmula molecular: $C_{18}H_{17}NO_5 \cdot xH_2O$.

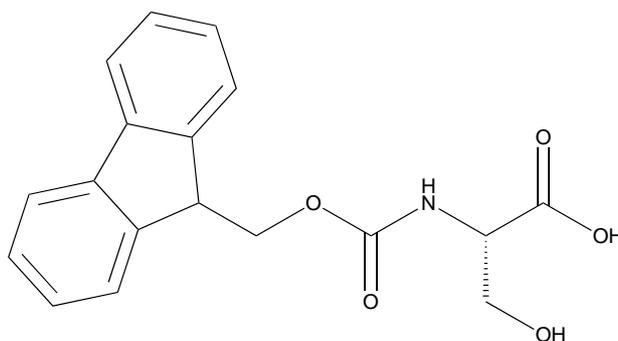


Figura 31. Estructura química de Fmoc-L-serina (FS)

- Ácido (S)-2-(((9H-Fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2,4-dimetilpentanoico (Fmoc-alfa-metil-L-leucina, FAM). Adquirido de Fluorochem. Peso molecular: 367,445 g/mol. Fórmula molecular: $C_{22}H_{25}NO_4$.

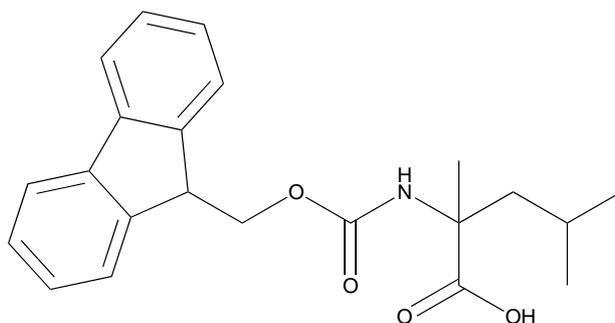


Figura 32. Estructura química de Fmoc-L-alfa-metil-L-leucina (FAM)

- N-[(9H-Fluoren-9-ilmetoxi)carbonil]-N-metil-L-leucina (Fmoc-N-metil-L-leucina, FNM). Proporcionado por TCI chemicals. Peso molecular: 367,445 g/mol. Fórmula molecular: $C_{22}H_{25}NO_4$.

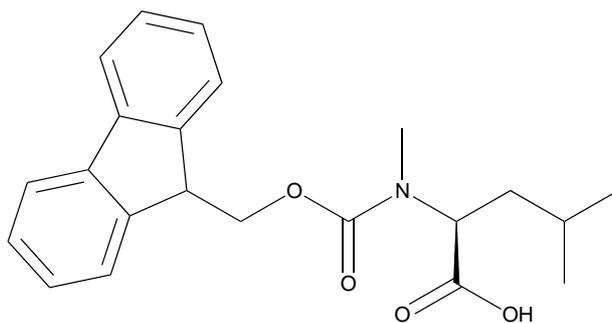


Figura 33. Estructura química de *Fmoc-N-metil-L-leucina (FNM)*

- Hexametilentetramina (HMTA). Obtenido de Thermo Scientific. Peso molecular: 140,19 g/mol. Fórmula molecular: $C_6H_{12}N_4$.

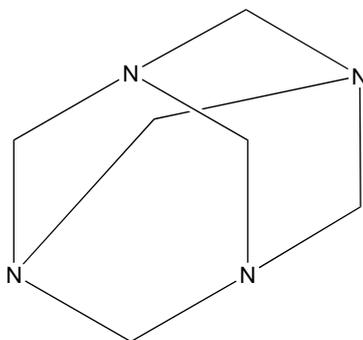


Figura 34. Estructura química de *hexametilentetramina (HMTA)*

- Cloruro de sodio (NaCl). Adquirido de VWR. Peso molecular: 58,44 g/mol.

6.2. Métodos

En este apartado se detallan los procedimientos llevados a cabo para comprender los procesos de autoensamblaje de los distintos aminoácidos.

6.2.1. *Estudios macroscópicos*

En primer lugar, se realizaron una serie de estudios macroscópicos en los que se evaluó el comportamiento de cada aminoácido en función de la sustancia añadida a la disolución, la concentración de dicha sustancia, la concentración de aminoácido y la temperatura. Los aminoácidos utilizados para estos estudios fueron FL, FI, FS y FAM. Se analizaron un total de

120 muestras mediante estudios macroscópicos, las cuales se presentan en el Anexo (Tabla S1). Todos estos estudios se llevaron a cabo a 24 °C excepto en aquellos en los que se analizó el efecto de la temperatura.

Para la preparación de las disoluciones de aminoácidos, se utilizaron disoluciones stock de 6 mg de cada aminoácido (6,25 mg en caso de FAM) disueltos en 100 µL de metanol en viales HPLC. De estas disoluciones stock, se tomaron 30 µL y se añadieron a 125 µL de otra sustancia (agua destilada, disolución acuosa de HMTA, disolución acuosa de NaCl, o una disolución acuosa que contiene una mezcla de NaCl y HMTA), resultando en un volumen total de 155 µL en un nuevo vial HPLC. La concentración final de aminoácido en estas disoluciones fue de 32,86 mM (5,1 µmol). Esta concentración es la que se denominará “concentración base”.

Para iniciar los estudios macroscópicos, se añadió agua destilada (125 µL para cada aminoácido), lo que resultó en las muestras 1, 2, 3 y 4. Posteriormente, se prepararon disoluciones con concentraciones reducidas del aminoácido, a las que también se añadieron 125 µL de agua destilada. Para obtener una concentración de aminoácido reducida a la mitad, se emplearon 15 µL de la disolución de aminoácido y 15 µL de metanol, generando las muestras 5, 6, 7 y 8 con una concentración de 16,43 mM. Para una concentración equivalente a un tercio, se utilizaron 10 µL de la disolución de aminoácido y 20 µL de metanol, obteniendo las muestras 9, 10, 11 y 12 con una concentración de 10,95 mM. Finalmente, para una concentración de un cuarto, se usaron 7,5 µL de la disolución de aminoácido y 22,5 µL de metanol, resultando en las muestras 13, 14, 15 y 16 con una concentración de 8,22 mM.

A continuación, se evaluó el efecto la temperatura en los aminoácidos. Para ello, se realizaron las mismas muestras mencionadas anteriormente y se introdujeron en un baño a 27 °C durante 3 horas. Las muestras 17, 18, 19 y 20 corresponden a las muestras con la concentración base; las muestras 21, 22, 23 y 24 a la mitad de concentración; las muestras 25, 26, 27 y 28 corresponden a un tercio de concentración, y las muestras 29, 30, 31 y 32 a un cuarto de concentración.

Tras estos análisis, se escogieron la concentración base de aminoácido y la equivalente a un tercio de la concentración para continuar con los estudios macroscópicos. Ahora, en lugar de añadir agua destilada, se adicionó HMTA disuelto en 125 µL de agua destilada a diferentes concentraciones:

1 equivalente. Relación 1: 1 (AA: HMTA). 5,1 μmol (32,86 mM): 5,1 μmol (32,86 mM) para la concentración base (muestras 33, 34, 35 y 36) y 1,7 μmol (10,95 mM): 1,7 μmol (10,95 mM) para un tercio de la concentración (muestras 37, 38, 39 y 40).

2 equivalentes. Relación 1: 2 (AA: HMTA). 5,1 μmol (32,86 mM): 10,2 μmol (65,72 mM) para la concentración base (muestras 41, 42, 43 y 44) y 1,7 μmol (10,95 mM): 3,4 μmol (21,9 mM) para un tercio de la concentración (muestras 45, 46, 47 y 48).

3 equivalentes. Relación 1: 3 (AA: HMTA). 5,1 μmol (32,86 mM): 15,3 μmol (98,58 mM) para la concentración base (muestras 49, 50, 51 y 52) y 1,7 μmol (10,95 mM): 5,1 μmol (32,85 mM) para un tercio de la concentración (muestras 53, 54, 55 y 56).

Es importante tener en cuenta que las disoluciones de HMTA deben ser frescas, ya que esta sustancia se descompone con el tiempo en amoníaco y formaldehído.

Posteriormente, se realizaron los estudios macroscópicos añadiendo NaCl disuelto en 125 μL de agua destilada, también a diferentes concentraciones:

0,25 equivalentes. Relación 1: 0,25 (AA: NaCl). 5,1 μmol (32,86 mM): 1,3 μmol (8,22 mM) para la concentración base (muestras 57, 58, 59 y 60) y 1,7 μmol (10,95 mM): 0,4 μmol (2,74 mM) para un tercio de la concentración (muestras 61, 62, 63 y 64).

0,5 equivalentes. Relación 1: 0,5 (AA: NaCl). 5,1 μmol (32,86 mM): 2,6 μmol (16,43 mM) para la concentración base (muestras 65, 66, 67 y 68) y 1,7 μmol (10,95 mM): 0,9 μmol (5,48 mM) para un tercio de la concentración (muestras 69, 70, 71 y 72).

1 equivalente. Relación 1: 1 (AA: NaCl). 5,1 μmol (32,86 mM): 5,1 μmol (32,86 mM) para la concentración base (muestras 73, 74, 75 y 76) y 1,7 μmol (10,95 mM): 1,7 μmol (10,95 mM) para un tercio de la concentración (muestras 77, 78, 79 y 80).

2 equivalentes. Relación 1: 2 (AA: NaCl). 5,1 μmol (32,86 mM): 10,2 μmol (65,72 mM) para la concentración base (muestras 81, 82, 83 y 84) y 1,7 μmol (10,95 mM): 3,4 μmol (21,9 mM) para un tercio de la concentración (muestras 85, 86, 87 y 88).

Después de conocer el comportamiento de los aminoácidos en presencia de HMTA y NaCl por separado, se estudió este comportamiento en presencia de mezclas de NaCl y HMTA, probando con diferentes concentraciones de ambas sustancias. En estos casos, se disolvía la cantidad requerida de NaCl en agua destilada en un vial HPLC y se transferían 125 μL de esta disolución acuosa salina a otro vial en el que se encontraba la cantidad necesaria de HMTA, preparando así la disolución para añadir el aminoácido correspondiente. Las mezclas empleadas fueron las siguientes:

0,5 equivalentes de NaCl y 1 equivalente de HMTA. Las muestras que corresponden a la concentración base son las 89, 90, 91 y 92, y aquellas que son de un tercio de la concentración son las 93, 94, 95 y 96.

0,5 equivalentes de NaCl y 4 equivalentes de HMTA. La cantidad de HMTA necesaria para tener 4 equivalentes con respecto al aminoácido es 20,4 μmol (131,44 mM) para la concentración base y 6,8 μmol (43,8 mM) para un tercio de la concentración. Las muestras 97, 98, 99 y 100 corresponden a la concentración base, mientras que las muestras 101, 102, 103 y 104 son de un tercio de la concentración.

2 equivalentes de NaCl y 1 equivalente de HMTA. Las muestras que son de concentración base son las 105, 106, 107 y 108, mientras que las muestras que corresponden a un tercio de la concentración son las 109, 110, 111 y 112.

2 equivalentes de NaCl y 4 equivalentes de HMTA. Las muestras 113, 114, 115 y 116 corresponden a la concentración base, y las muestras 117, 118, 119 y 120 son de un tercio de la concentración.

6.2.2. Estudios microscópicos

Estos estudios se realizaron mediante microscopía de luz transmitida con el Microscopio Revolve de la empresa ECHO. Se inyectaron aproximadamente 300 μL de muestra en el interior de los canales perfectamente herméticos de los portaobjetos μ -Slides (variedad I Luer), que son capaces de impedir cualquier evaporación de disolventes para mediciones prolongadas. Para ello, en lugar del volumen final de 155 μL utilizado en los estudios macroscópicos, se prepararon 310 μL de muestra. Se tomaron 60 μL de la disolución stock de aminoácido (6 mg

en 100 μL de metanol) y se añadieron 250 μL de agua destilada, disolución de NaCl, HMTA, o una mezcla de NaCl y HMTA. Se tomaron imágenes de las siguientes muestras: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 35, 49, 50, 52, 57, 58, 59, 60, 82, 83, 84, 91, 97, 98, 100, 107, 113, 114, 116, 121, 122, 123, 124, 125 y 126.

6.2.3. *Reología*

Las mediciones reológicas se realizaron en un reómetro NETZSCH utilizando una geometría de placa a placa (diámetro de la placa 20 mm) con una distancia entre placas de 1,0 mm, frecuencia 0,1592 Hz a 24 °C. Se utilizaron 320 μL de la muestra para las mediciones. Para ello, se prepararon 350 μL de muestra tomando 68 μL de la disolución stock de aminoácido (6 mg en 100 μL de metanol) y añadiendo 282 μL de agua destilada, disolución de NaCl, HMTA, o una mezcla de NaCl y HMTA. El número de medidas tomadas para cada muestra fue de 120, con un intervalo de muestreo de 1 minuto entre cada medición. Se realizaron estas medidas para las muestras 2, 3, 58, 59, 82, 83 y 113.

6.2.4. *Difracción de rayos X en polvo*

Se realizaron estas mediciones en un difractómetro de rayos X en polvo BrukerD4 Endeavor para muestras liofilizadas, utilizando radiación $\text{CuK}\alpha$ filtrada con Ni (λ 1,54 Å). Para las mediciones, se utilizaron 450 μL de muestra. Para ello, se tomaron 87 μL de la disolución de stock de aminoácido (6 mg en 100 μL de metanol) y se añadieron 364 μL de agua destilada, disolución de NaCl o una mezcla de NaCl y HMTA. Se estudiaron los patrones de difracción de rayos X de las muestras 2, 3, 58, 59, 82 y 83 tras 1 minuto, 6 horas y 24 horas desde su preparación.

Para liofilizar las muestras, primero se congelaron utilizando nitrógeno líquido, el cual tiene una temperatura extremadamente baja (alrededor de -196 °C), lo que permite congelar rápidamente la muestra. Luego, la muestras congeladas se colocaron en una cámara de vacío. Al reducir la presión en la cámara, el hielo se sublima, pasando directamente de sólido a vapor, lo que elimina la mayor parte del agua de la muestra. Finalmente, se baja aún más la presión y se eleva ligeramente la temperatura para eliminar las moléculas de agua restantes que no se eliminaron en la fase de sublimación, asegurando que la muestra esté completamente seca. Es importante que las muestras que contienen sal se laven con agua antes de la liofilización para evitar las posibles interferencias que la sal pueda causar en las mediciones.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Aida, T., Meijer, E. W. & Stupp, S. I. Functional supramolecular polymers. *Science* **335**, 813–817 (2012).
2. Hosseinkhani, H., Hong, P. Da & Yu, D. S. Self-assembled proteins and peptides for regenerative medicine. *Chem Rev* **113**, 4837–4861 (2013).
3. Yuan, C. *et al.* Nucleation and Growth of Amino Acid and Peptide Supramolecular Polymers through Liquid–Liquid Phase Separation. *Angewandte Chemie International Edition* **58**, 18116–18123 (2019).
4. Brown, N. *et al.* Structural Polymorphism in a Self-Assembled Tri-Aromatic Peptide System. *ACS Nano* **12**, 3253–3262 (2018).
5. Won, J. *et al.* Self-assembled DNA composite membranes. *J Memb Sci* **249**, 113–117 (2005).
6. Nasalean, L., Baudrey, S., Leontis, N. B. & Jaeger, L. Controlling RNA self-assembly to form filaments. *Nucleic Acids Res* **34**, 1381–1392 (2006).
7. Wang, Z., Guo, Y. & Xianyu, Y. Applications of self-assembly strategies in immunoassays: A review. *Coord Chem Rev* **478**, 214974 (2023).
8. Hasecke, F. *et al.* Origin of metastable oligomers and their effects on amyloid fibril self-assembly. *Chem Sci* **9**, 5937–5948 (2018).
9. Li, Y. *et al.* Amino Acid Coordination Driven Self-Assembly for Enhancing both the Biological Stability and Tumor Accumulation of Curcumin. *Angewandte Chemie International Edition* **57**, 17084–17088 (2018).
10. Yuan, C. *et al.* Multistep Desolvation as a Fundamental Principle Governing Peptide Self-Assembly Through Liquid–Liquid Phase Separation. *CCS Chemistry* **6**, 255–265 (2024).
11. Zhou, P. *et al.* Steering phase-separated droplets to control fibrillar network evolution of supramolecular peptide hydrogels. *Matter* **6**, 1945–1963 (2023).
12. Levin, A. *et al.* Ostwald’s rule of stages governs structural transitions and morphology of dipeptide supramolecular polymers. *Nat Commun* **5**, (2014).
13. Elizebath, D. *et al.* Nonclassical Crystal Growth of Supramolecular Polymers in Aqueous Medium. *Small* **20**, 2306175 (2024).
14. Hsieh, M. C., Lynn, D. G. & Grover, M. A. Kinetic Model for Two-Step Nucleation of Peptide Assembly. *J Phys Chem B* **121**, 7401–7411 (2017).

15. Bohidar, H. B. Coacervates : A novel state of soft matter-an overview. *J. Surface Sci. Technol* **24**, 105–124 (2008).
16. Abbas, M., Lipiński, W. P., Wang, J. & Spruijt, E. Peptide-based coacervates as biomimetic protocells. *Chem Soc Rev* **50**, 3690–3705 (2021).
17. Zhou, L., Shi, H., Li, Z. & He, C. Recent Advances in Complex Coacervation Design from Macromolecular Assemblies and Emerging Applications. *Macromol Rapid Commun* **41**, 2000149 (2020).
18. Edelman, M. W., Van Der Linden, E. & Tromp, R. H. Phase separation of aqueous mixtures of poly(ethylene oxide) and dextran. *Macromolecules* **36**, 7783–7790 (2003).
19. Jha, P. K., Desai, P. S., Li, J. & Larson, R. G. pH and Salt Effects on the Associative Phase Separation of Oppositely Charged Polyelectrolytes. *Polymers 2014, Vol. 6, Pages 1414-1436* **6**, 1414–1436 (2014).
20. Chung, W. J. *et al.* Biomimetic self-templating supramolecular structures. *Nature* **478**, 364–368 (2011).
21. Zhao, Y., Inbar, P., Chokshi, H. P., Malick, A. W. & Choi, D. S. Prediction of the Thermal Phase Diagram of Amorphous Solid Dispersions by Flory–Huggins Theory. *J Pharm Sci* **100**, 3196–3207 (2011).
22. Nakashima, K. K., Vibhute, M. A. & Spruijt, E. Biomolecular chemistry in liquid phase separated compartments. *Front Mol Biosci* **6**, 434326 (2019).
23. Ban, E. & Kim, A. Coacervates: Recent developments as nanostructure delivery platforms for therapeutic biomolecules. *Int J Pharm* **624**, (2022).
24. Jacobs, M. I., Jira, E. R. & Schroeder, C. M. Understanding How Coacervates Drive Reversible Small Molecule Reactions to Promote Molecular Complexity. *Langmuir* **37**, 14323–14335 (2021).
25. Johnson, N. R. & Wang, Y. Coacervate delivery systems for proteins and small molecule drugs. *Expert Opin Drug Deliv* **11**, 1829–1832 (2014).
26. Haedler, A. T. *et al.* Pathway Complexity in the Enantioselective Self-Assembly of Functional Carbonyl-Bridged Triarylamine Trisamides. *J Am Chem Soc* **138**, 10539–10545 (2016).
27. Paul, S., Gayen, K., Cantavella, P. G., Escuder, B. & Singh, N. Complex Pathways Drive Pluripotent Fmoc-Leucine Self-Assemblies. *Angew Chem Int Ed Engl* (2024) doi:10.1002/ANIE.202406220.
28. Mukhopadhyay, R. D. & Ajayaghosh, A. Living supramolecular polymerization. *Science (1979)* **349**, 241–242 (2015).

29. Shin, Y. & Brangwynne, C. P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science* **357**, (2017).
30. Das, K., Gabrielli, L. & Prins, L. J. Chemically Fueled Self-Assembly in Biology and Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **60**, 20120–20143 (2021).
31. Matern, J., Dorca, Y., Sánchez, L. & Fernández, G. Revising Complex Supramolecular Polymerization under Kinetic and Thermodynamic Control. *Angewandte Chemie International Edition* **58**, 16730–16740 (2019).
32. Korevaar, P. A. *et al.* Pathway complexity in supramolecular polymerization. *Nature* **481**, 492–496 (2012).
33. Adler-Abramovich, L. & Gazit, E. The physical properties of supramolecular peptide assemblies: from building block association to technological applications. *Chem Soc Rev* **43**, 6881–6893 (2014).
34. Tao, K., Levin, A., Adler-Abramovich, L. & Gazit, E. Fmoc-modified amino acids and short peptides: simple bio-inspired building blocks for the fabrication of functional materials. *Chem Soc Rev* **45**, 3935–3953 (2016).
35. Fleming, S. *et al.* Assessing the utility of infrared spectroscopy as a structural diagnostic tool for β -sheets in self-assembling aromatic peptide amphiphiles. *Langmuir* **29**, 9510–9515 (2013).
36. Smith, A. M. *et al.* Fmoc-Diphenylalanine Self Assembles to a Hydrogel via a Novel Architecture Based on p-p Interlocked β -Sheets. *Adv. Mater* **20**, 37–41 (2008).
37. Fleming, S., Sisir, D., Frederix, P. W. J. M., Tuttle, T. & Ulijn, R. V. Aromatic peptide amphiphiles: significance of the Fmoc moiety. *Chemical Communications* **49**, 10587–10589 (2013).
38. Whitesides, G. M. & Grzybowski, B. Self-Assembly at All Scales. *Science (1979)* **295**, 2418–2421 (2002).
39. Roy, N., Saha, N., Kitano, T. & Saha, P. Importance of Viscoelastic Property Measurement of a New Hydrogel for Health Care. *AIP Conf Proc* **1152**, 210–216 (2009).
40. Chaudhuri, O. Viscoelastic hydrogels for 3D cell culture. *Biomater Sci* **5**, 1480–1490 (2017).

8. ANEXOS

Tabla S1. Muestras estudiadas macroscópicamente y/o microscópicamente

Muestra	Aminoácido	Concentración de aminoácido	Condición o sustancia añadida
1	FL	32,86 mM	125 µL H ₂ O
2	FI	32,86 mM	125 µL H ₂ O
3	FS	32,86 mM	125 µL H ₂ O
4	FAM	32,86 mM	125 µL H ₂ O
5	FL	16,43 mM	125 µL H ₂ O
6	FI	16,43 mM	125 µL H ₂ O
7	FS	16,43 mM	125 µL H ₂ O
8	FAM	16,43 mM	125 µL H ₂ O
9	FL	10,95 mM	125 µL H ₂ O
10	FI	10,95 mM	125 µL H ₂ O
11	FS	10,95 mM	125 µL H ₂ O
12	FAM	10,95 mM	125 µL H ₂ O
13	FL	8,22 mM	125 µL H ₂ O
14	FI	8,22 mM	125 µL H ₂ O
15	FS	8,22 mM	125 µL H ₂ O
16	FAM	8,22 mM	125 µL H ₂ O
17	FL	32,86 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C

18	FI	32,86 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
19	FS	32,86 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
20	FAM	32,86 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
21	FL	16,43 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
22	FI	16,43 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
23	FS	16,43 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
24	FAM	16,43 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
25	FL	10,95 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
26	FI	10,95 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
27	FS	10,95 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
28	FAM	10,95 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
29	FL	8,22 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
30	FI	8,22 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
31	FS	8,22 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
32	FAM	8,22 mM	125 µL H ₂ O; T= 27 °C
33	FL	32,86 mM	1 equivalente HMTA (32,86 mM)
34	FI	32,86 mM	1 equivalente HMTA (32,86 mM)
35	FS	32,86 mM	1 equivalente HMTA (32,86 mM)
36	FAM	32,86 mM	1 equivalente HMTA (32,86 mM)
37	FL	10,95 mM	1 equivalente HMTA (10,95 mM)
38	FI	10,95 mM	1 equivalente HMTA (10,95 mM)
39	FS	10,95 mM	1 equivalente HMTA (10,95 mM)

40	FAM	10,95 mM	1 equivalente HMTA (10,95 mM)
41	FL	32,86 mM	2 equivalentes HMTA (65,72 mM)
42	FI	32,86 mM	2 equivalentes HMTA (65,72 mM)
43	FS	32,86 mM	2 equivalentes HMTA (65,72 mM)
44	FAM	32,86 mM	2 equivalentes HMTA (65,72 mM)
45	FL	10,95 mM	2 equivalentes HMTA (21,9 mM)
46	FI	10,95 mM	2 equivalentes HMTA (21,9 mM)
47	FS	10,95 mM	2 equivalentes HMTA (21,9 mM)
48	FAM	10,95 mM	2 equivalentes HMTA (21,9 mM)
49	FL	32,86 mM	3 equivalentes HMTA (98,58 mM)
50	FI	32,86 mM	3 equivalentes HMTA (98,58 mM)
51	FS	32,86 mM	3 equivalentes HMTA (98,58 mM)
52	FAM	32,86 mM	3 equivalentes HMTA (98,58 mM)
53	FL	10,95 mM	3 equivalentes HMTA (32,85 mM)
54	FI	10,95 mM	3 equivalentes HMTA (32,85 mM)
55	FS	10,95 mM	3 equivalentes HMTA (32,85 mM)
56	FAM	10,95 mM	3 equivalentes HMTA (32,85 mM)
57	FL	32,86 mM	0,25 equivalentes NaCl (8,22 mM)
58	FI	32,86 mM	0,25 equivalentes NaCl (8,22 mM)
59	FS	32,86 mM	0,25 equivalentes NaCl (8,22 mM)
60	FAM	32,86 mM	0,25 equivalentes NaCl (8,22 mM)
61	FL	10,95 mM	0,25 equivalentes NaCl (2,74 mM)
62	FI	10,95 mM	0,25 equivalentes NaCl (2,74 mM)
63	FS	10,95 mM	0,25 equivalentes NaCl (2,74 mM)

64	FAM	10,95 mM	0,25 equivalentes NaCl (2,74 mM)
65	FL	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl (16,43 mM)
66	FI	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl (16,43 mM)
67	FS	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl (16,43 mM)
68	FAM	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl (16,43 mM)
69	FL	10,95 mM	0,5 equivalentes NaCl (5,48 mM)
70	FI	10,95 mM	0,5 equivalentes NaCl (5,48 mM)
71	FS	10,95 mM	0,5 equivalentes NaCl (5,48 mM)
72	FAM	10,95 mM	0,5 equivalentes NaCl (5,48 mM)
73	FL	32,86 mM	1 equivalente NaCl (32,86 mM)
74	FI	32,86 mM	1 equivalente NaCl (32,86 mM)
75	FS	32,86 mM	1 equivalente NaCl (32,86 mM)
76	FAM	32,86 mM	1 equivalente NaCl (32,86 mM)
77	FL	10,95 mM	1 equivalente NaCl (10,95 mM)
78	FI	10,95 mM	1 equivalente NaCl (10,95 mM)
79	FS	10,95 mM	1 equivalente NaCl (10,95 mM)
80	FAM	10,95 mM	1 equivalente NaCl (10,95 mM)
81	FL	32,86 mM	2 equivalentes NaCl (65,72 mM)
82	FI	32,86 mM	2 equivalentes NaCl (65,72 mM)
83	FS	32,86 mM	2 equivalentes NaCl (65,72 mM)
84	FAM	32,86 mM	2 equivalentes NaCl (65,72 mM)
85	FL	10,95 mM	2 equivalentes NaCl (21,9 mM)
86	FI	10,95 mM	2 equivalentes NaCl (21,9 mM)
87	FS	10,95 mM	2 equivalentes NaCl (21,9 mM)

88	FAM	10,95 mM	2 equivalentes NaCl (21,9 mM)
89	FL	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
90	FI	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
91	FS	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
92	FAM	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
93	FL	10,95 mM	0,5 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
94	FI	10,95 mM	0,5 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
95	FS	10,95 mM	0,5 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
96	FAM	10,95 mM	0,5 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
97	FL	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
98	FI	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
99	FS	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
100	FAM	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
101	FL	10,95 mM	0,5 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
102	FI	10,95 mM	0,5 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
103	FS	10,95 mM	0,5 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
104	FAM	10,95 mM	0,5 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
105	FL	32,86 mM	2 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
106	FI	32,86 mM	2 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
107	FS	32,86 mM	2 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
108	FAM	32,86 mM	2 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
109	FL	10,95 mM	2 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
110	FI	10,95 mM	2 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA

111	FS	10,95 mM	2 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
112	FAM	10,95 mM	2 equivalentes NaCl + 1 equivalentes HMTA
113	FL	32,86 mM	2 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
114	FI	32,86 mM	2 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
115	FS	32,86 mM	2 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
116	FAM	32,86 mM	2 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
117	FL	10,95 mM	2 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
118	FI	10,95 mM	2 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
119	FS	10,95 mM	2 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
120	FAM	10,95 mM	2 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
121	FNM	32,86 mM	125 μ L H ₂ O
122	FNM	32,86 mM	3 equivalentes HMTA (98,58 mM)
123	FNM	32,86 mM	0,25 equivalentes NaCl (8,22 mM)
124	FNM	32,86 mM	2 equivalentes NaCl (65,72 mM)
125	FNM	32,86 mM	0,5 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA
126	FNM	32,86 mM	2 equivalentes NaCl + 4 equivalentes HMTA

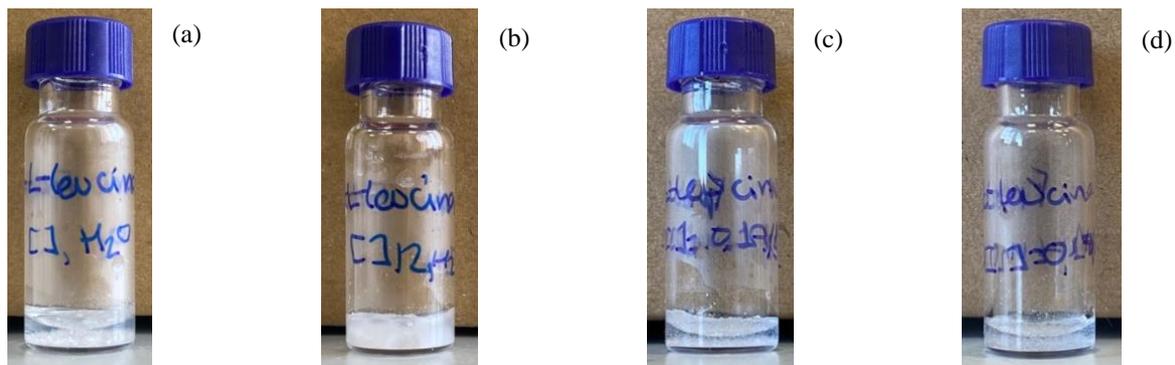


Figura S1. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 1 (a), muestra 5 (b), muestra 9 (c) y muestra 13 (d) tras 120 minutos

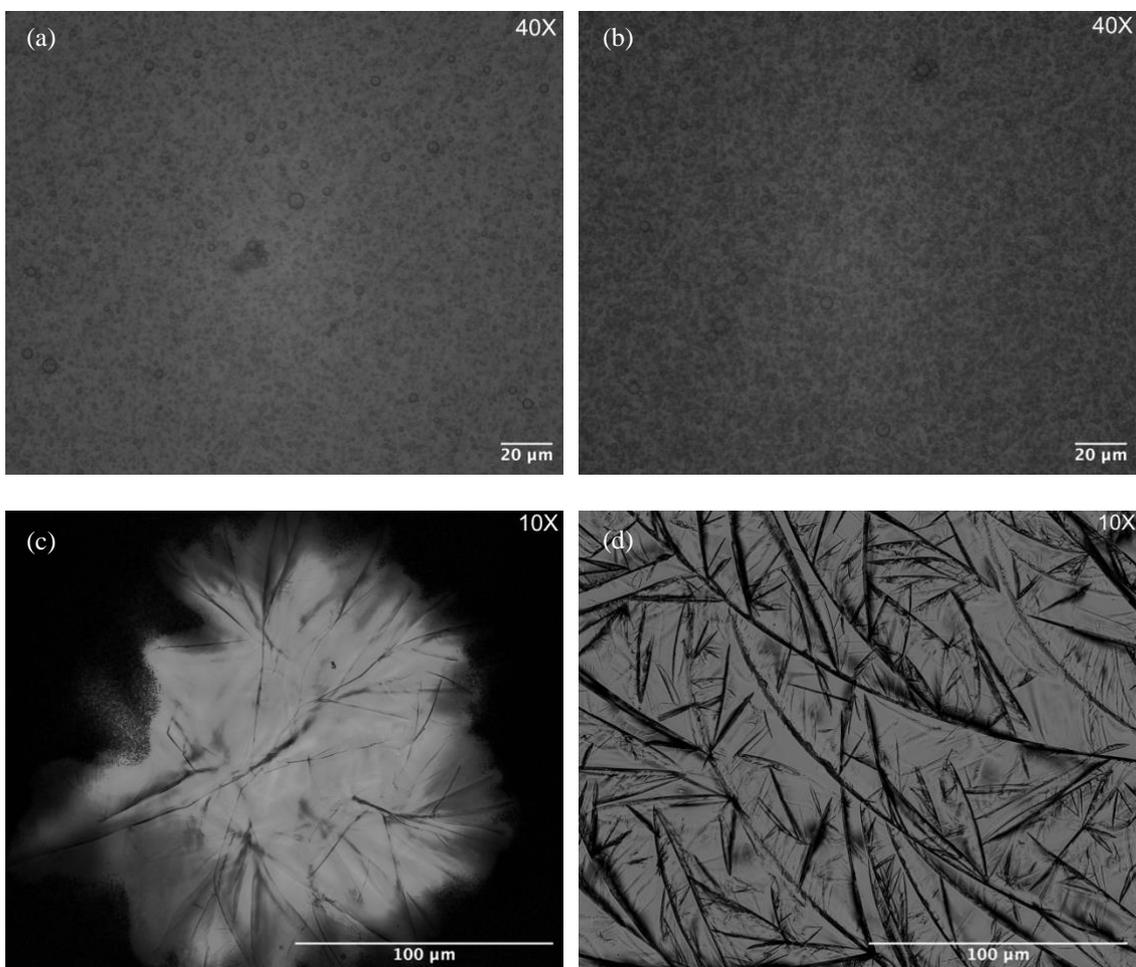


Figura S2. Imagen de la muestra 1 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c) y 24 horas (d)

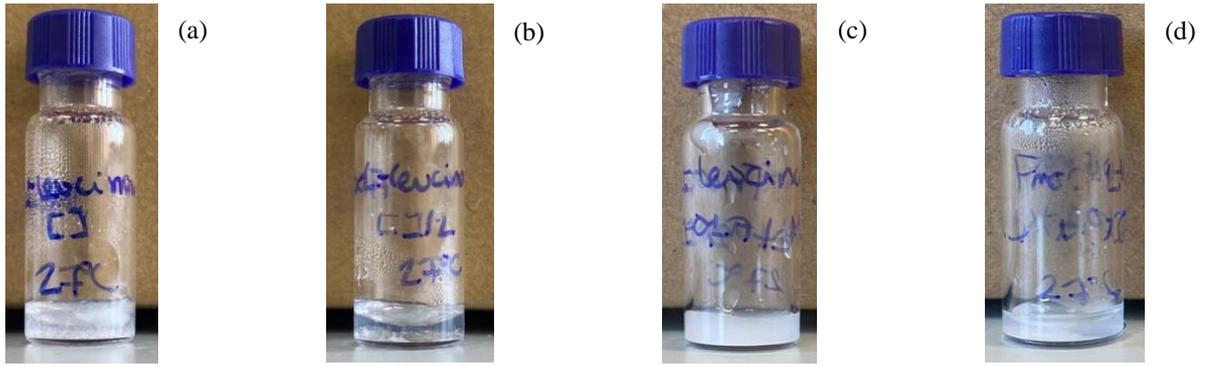


Figura S3. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 17 (a), muestra 21 (b), muestra 25 (c) y muestra 29 (d) tras 120 minutos



Figura S4. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 33 (a), muestra 41 (b) y muestra 49 (c) tras 120 minutos

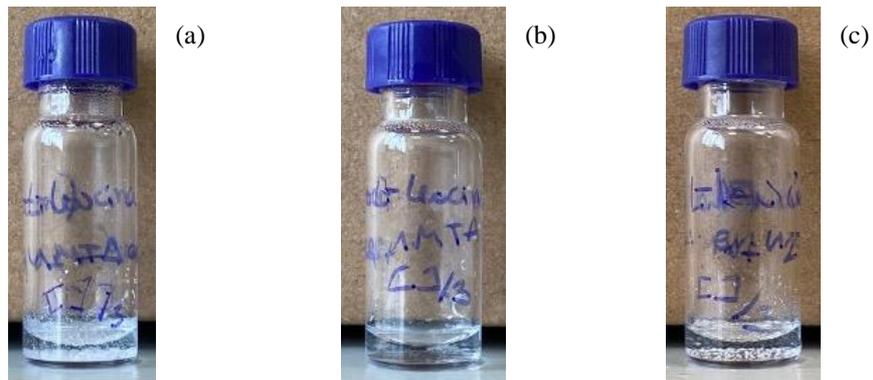


Figura S5. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 37 (a), muestra 45 (b) y muestra 53 (c) tras 120 minutos

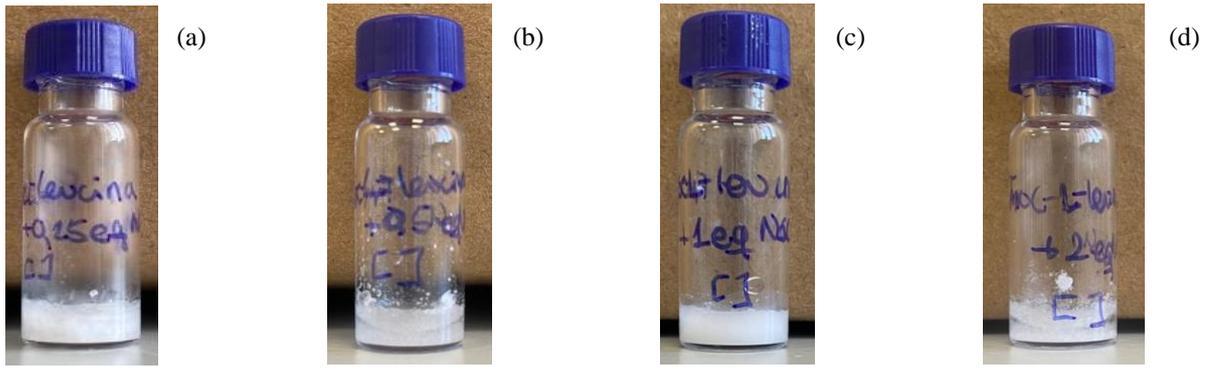


Figura S6. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 57 (a), muestra 65 (b), muestra 73 (c) y muestra 81 (d) tras 120 minutos

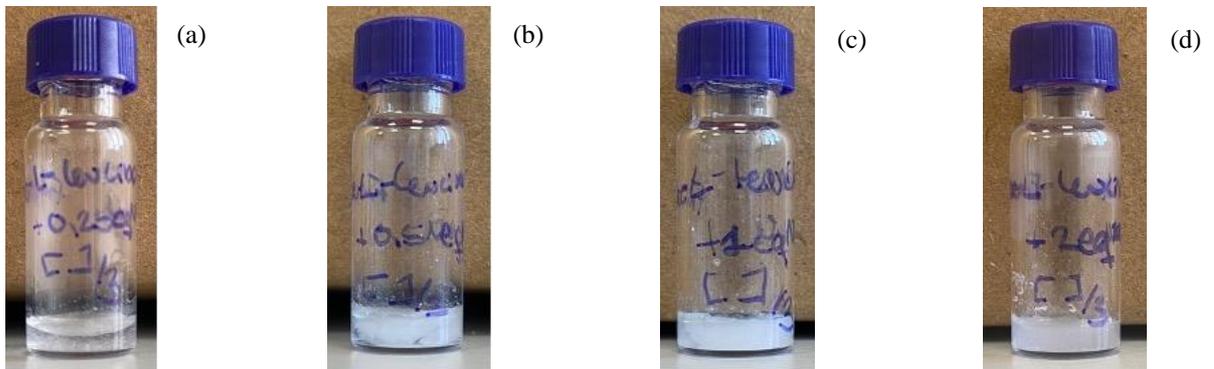
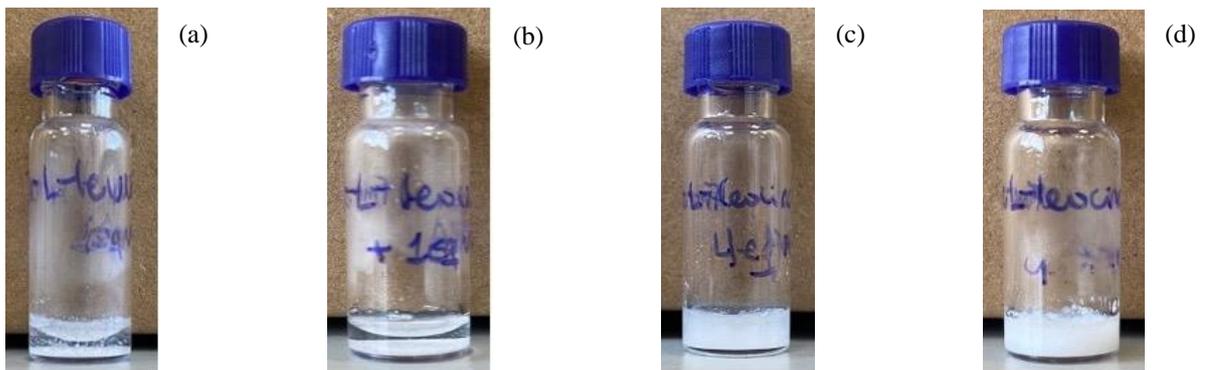


Figura S7. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 61 (a), muestra 69 (b), muestra 77 (c) y muestra 85 (d) tras 120 minutos



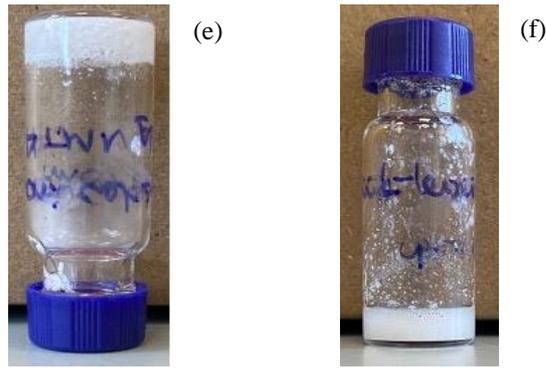


Figura S8. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 89 (a) tras 120 minutos, de la muestra 105 (b) tras 120 minutos, de la muestra 97 (c) tras 120 minutos, de la muestra 113 (d) tras 120 minutos, del vial invertido para la muestra 113 (e) tras 120 minutos y de la muestra 113 tras 24 horas (f)

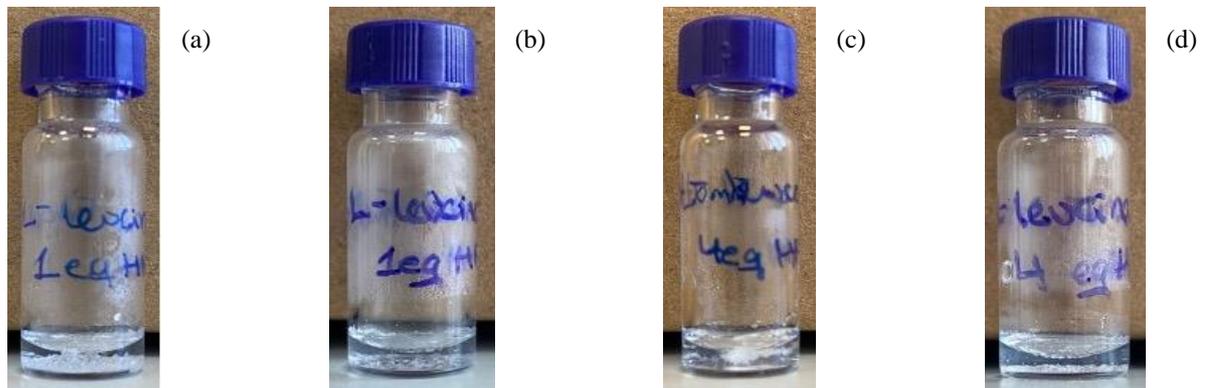


Figura S9. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 93 (a), muestra 109 (b), muestra 101 (c) y muestra 117 (d) tras 120 minutos

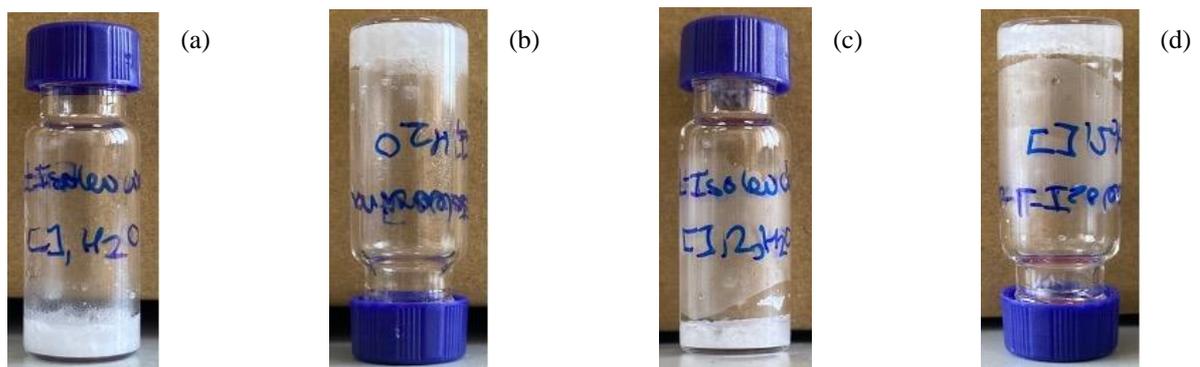


Figura S10. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 2 (a), del vial invertido para la muestra 2 (b), de la muestra 6 (c) y del vial invertido para la muestra 6 (d) tras 120 minutos

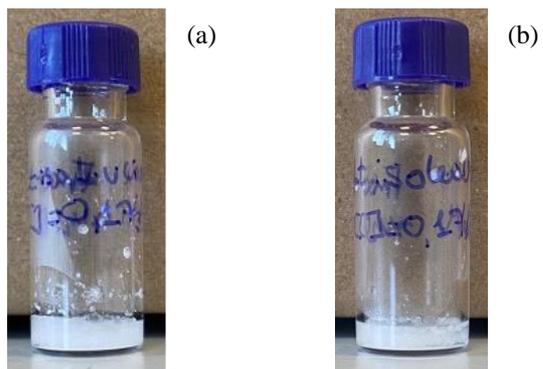


Figura S11. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 10 (a) y la muestra 14 (b) tras 120 minutos

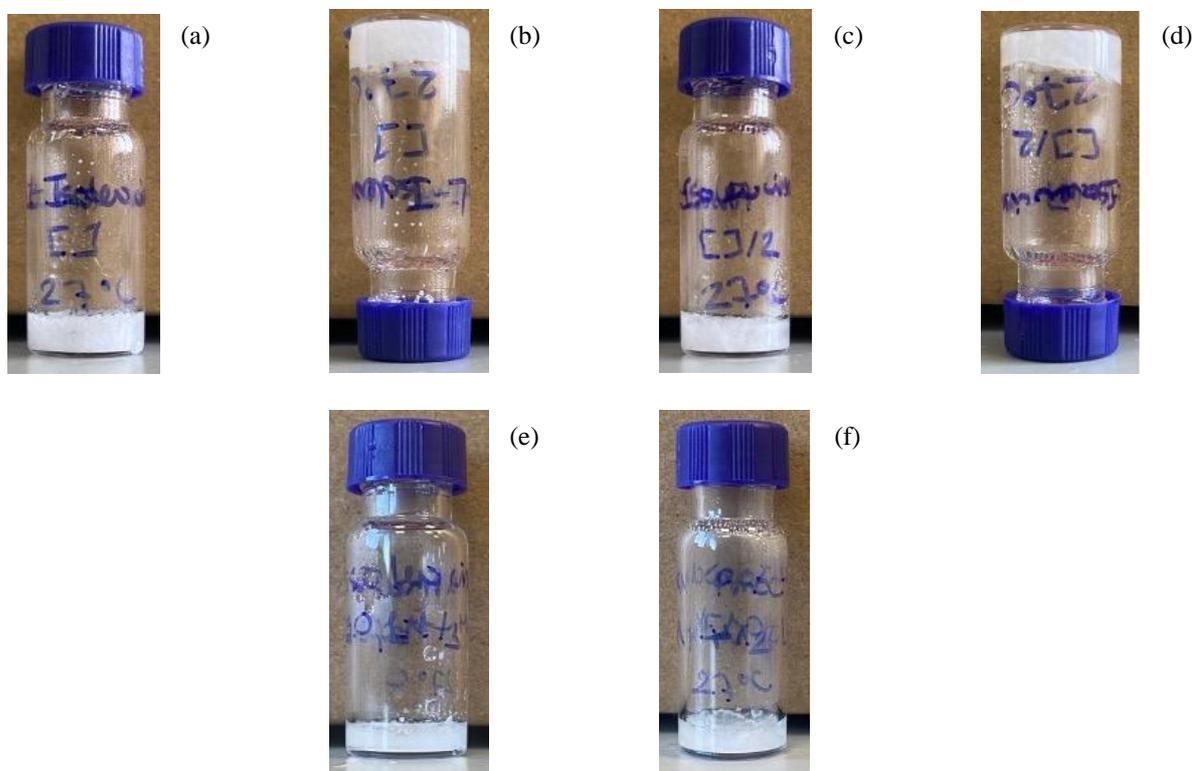


Figura S12. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 18 (a), del vial invertido para la muestra 18 (b), de la muestra 22 (c), del vial invertido para la muestra 22 (d), de la muestra 26 (e) y de la muestra 30 (f) tras 120 minutos

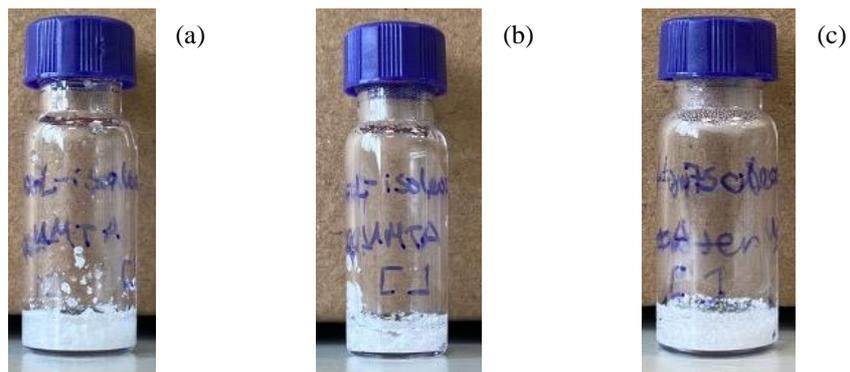


Figura S13. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 34 (a), muestra 42 (b) y muestra 50 (c) tras 120 minutos

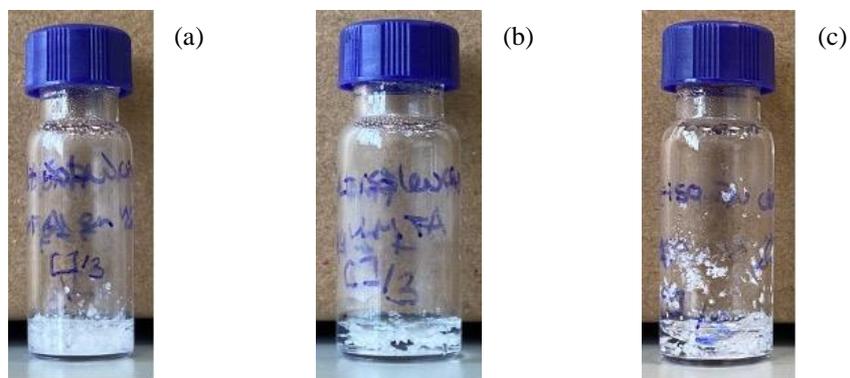
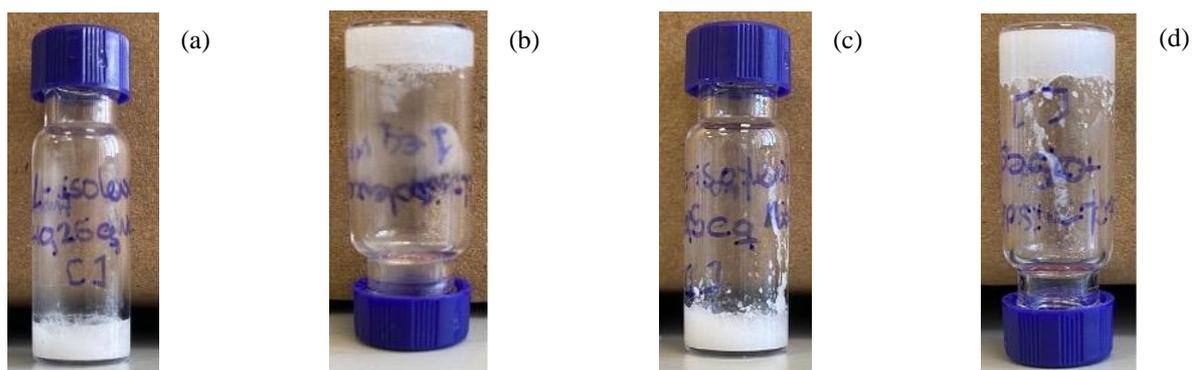


Figura S14. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 38 (a), muestra 46 (b) y muestra 50 (c) tras 120 minutos



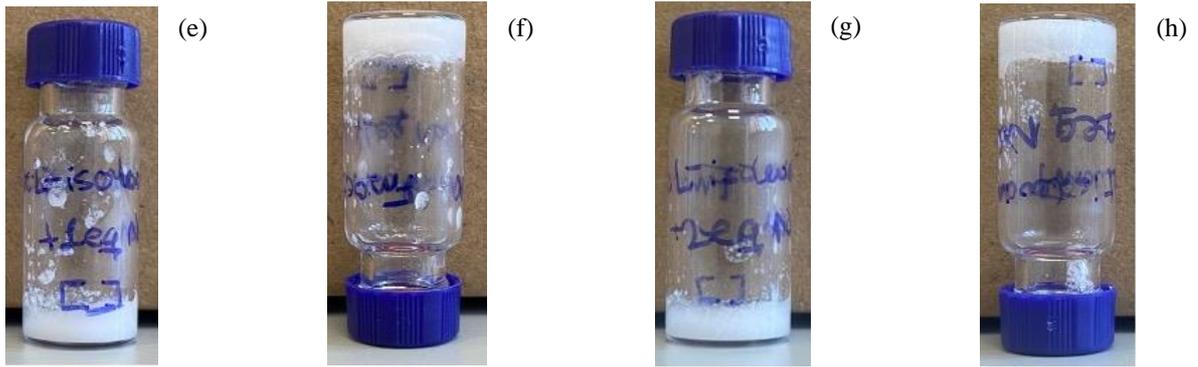


Figura S15. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 58 (a), del vial invertido para la muestra 58 (b), de la muestra 66 (c), del vial invertido para la muestra 66 (d), de la muestra 74 (e), del vial invertido para la muestra 74 (f), de la muestra 82 (g) y del vial invertido para la muestra 82 (h) tras 120 minutos

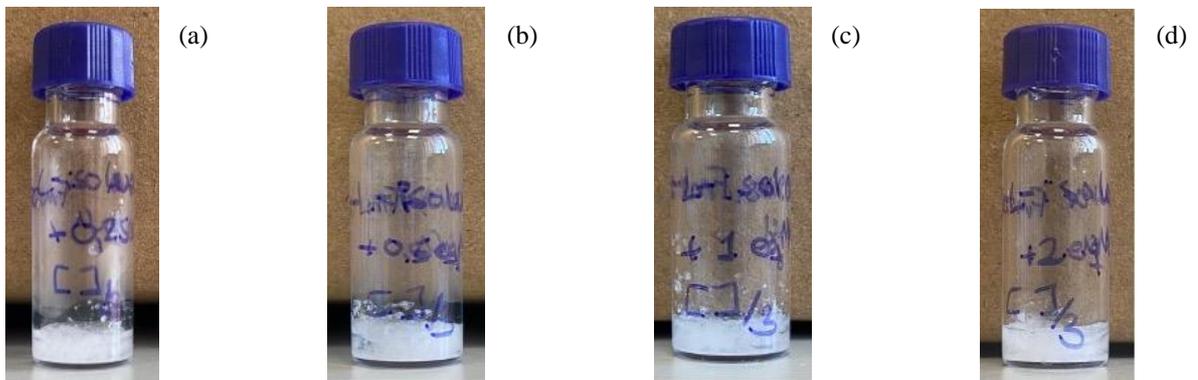
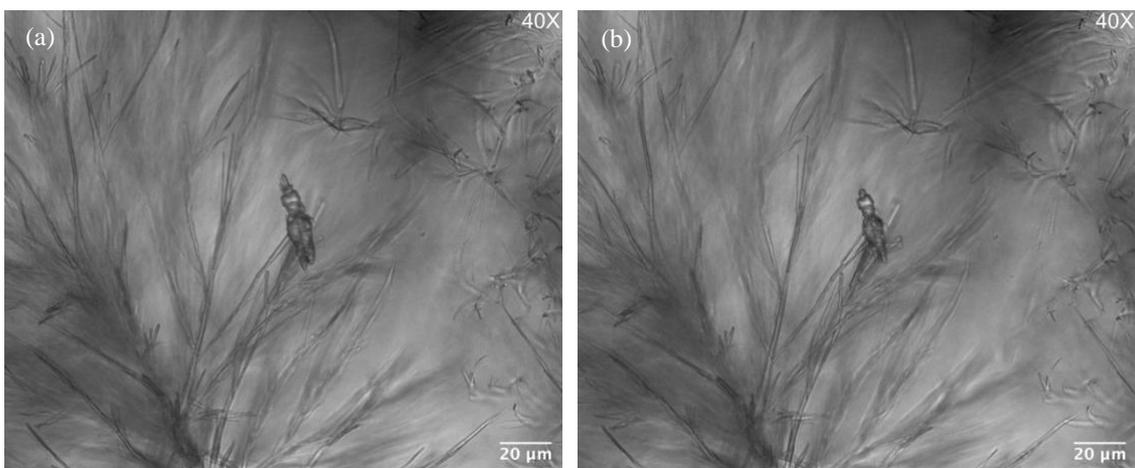


Figura S16. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 62 (a), muestra 70 (b), muestra 78 (c) y muestra 86 (d) tras 120 minutos



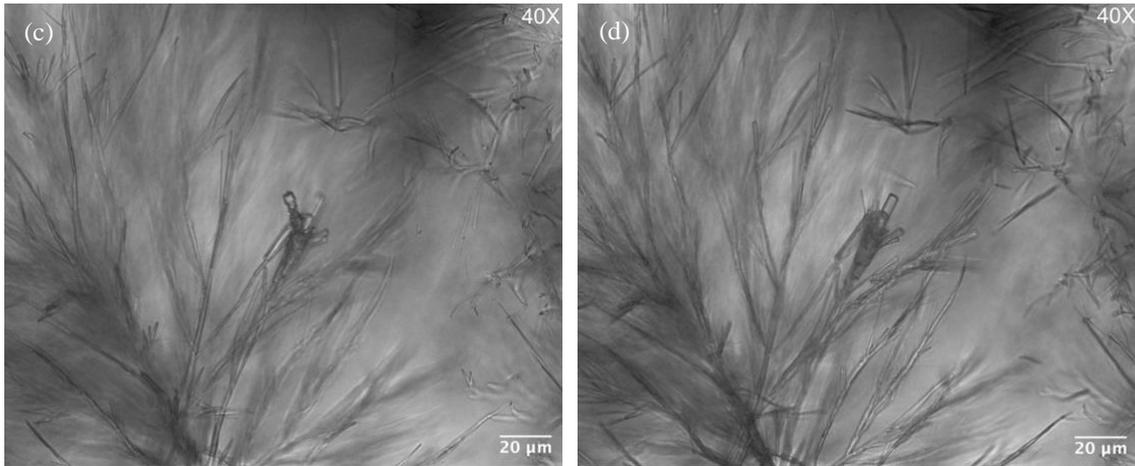


Figura S17. Imagen de la muestra 6 en el microscopio de luz transmitida tras 25 minutos (a), 30 minutos (b), 35 minutos (c) y 40 minutos (d)

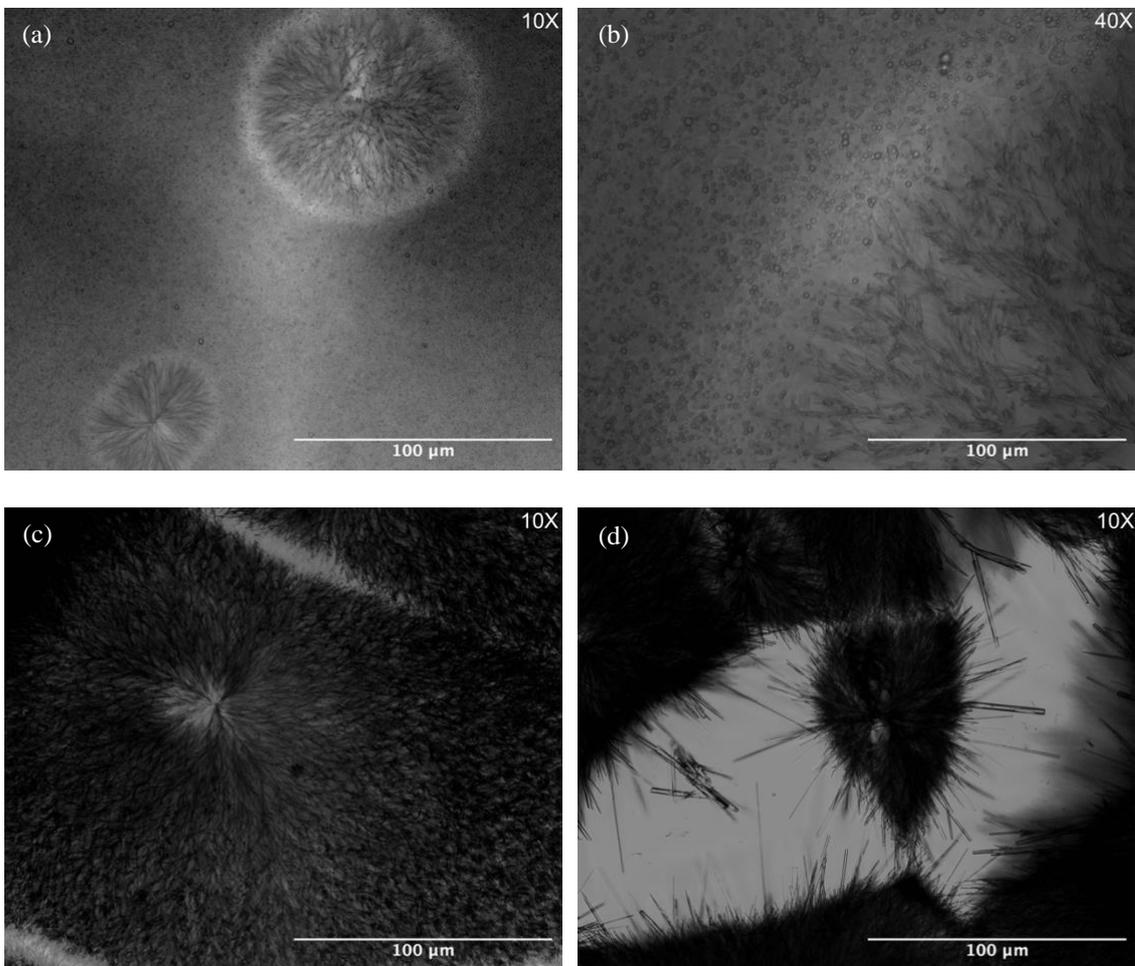


Figura S18. Imagen de la muestra 82 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 15 minutos (b), 40 minutos (c) y 24 horas (d)

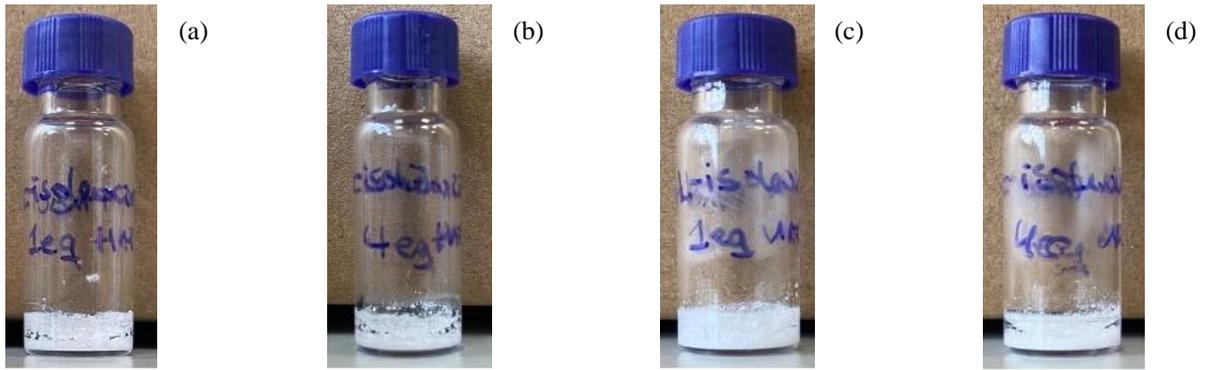


Figura S19. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 90 (a), muestra 98 (b), muestra 106 (c) y muestra 114 (d) tras 120 minutos

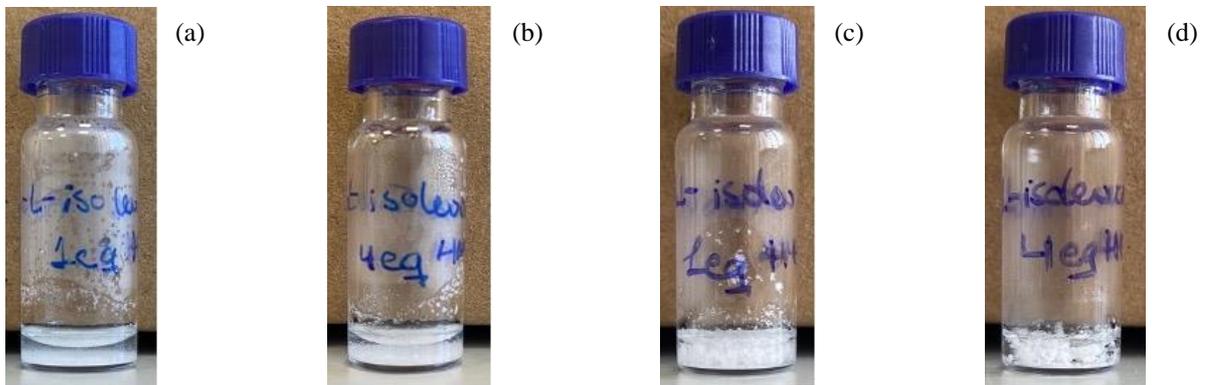
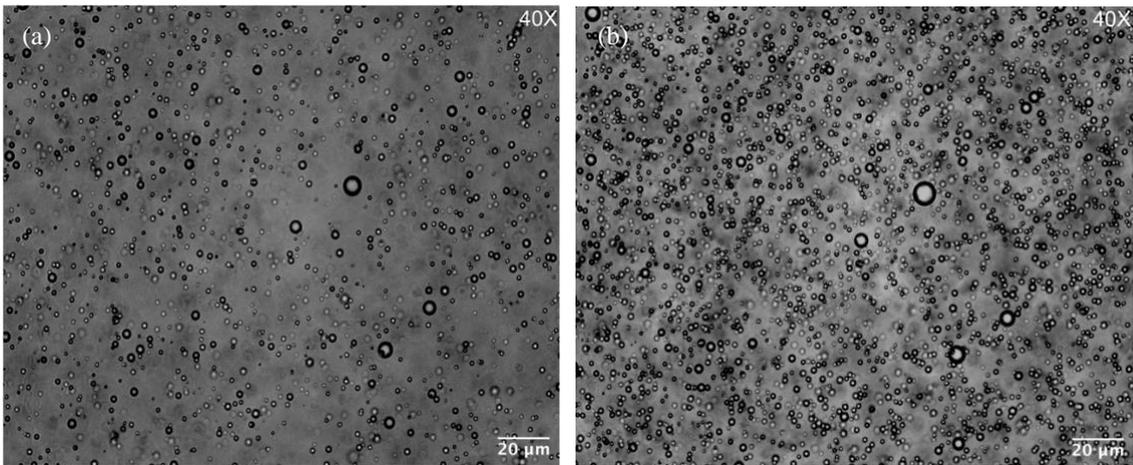


Figura S20. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 94 (a), muestra 102 (b), muestra 110 (c) y muestra 118 (d) tras 120 minutos



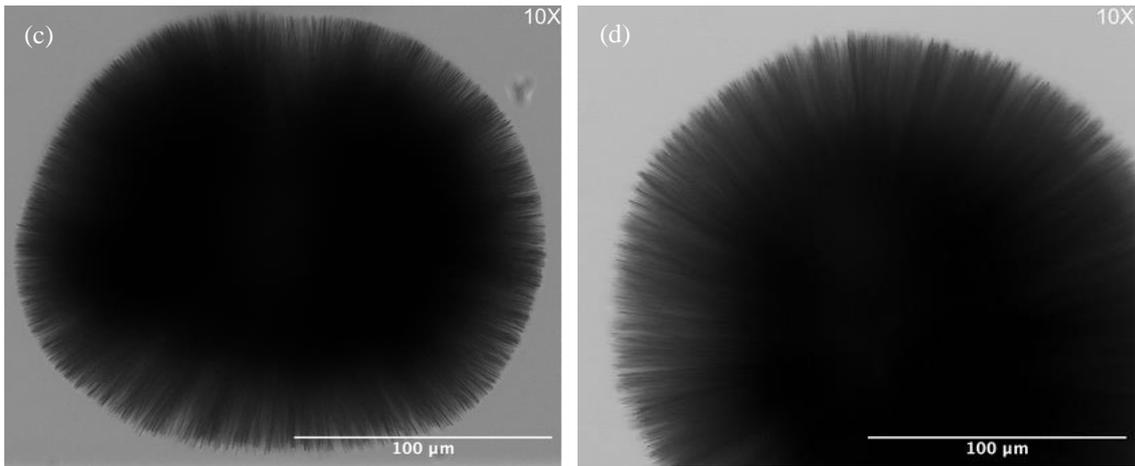


Figura S21. Imagen de la muestra 98 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c) y 24 horas (d)

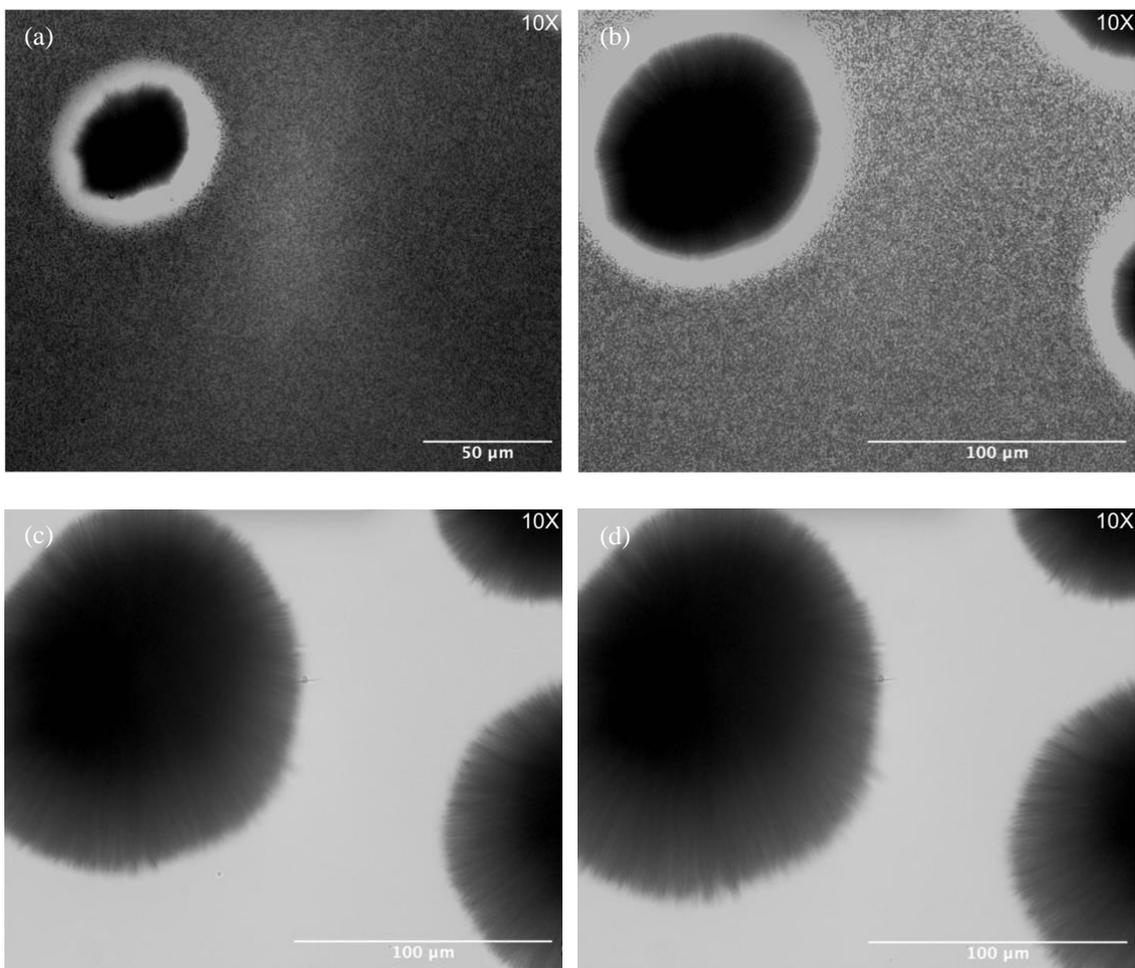


Figura S22. Imagen de la muestra 114 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c) y 24 horas (d)

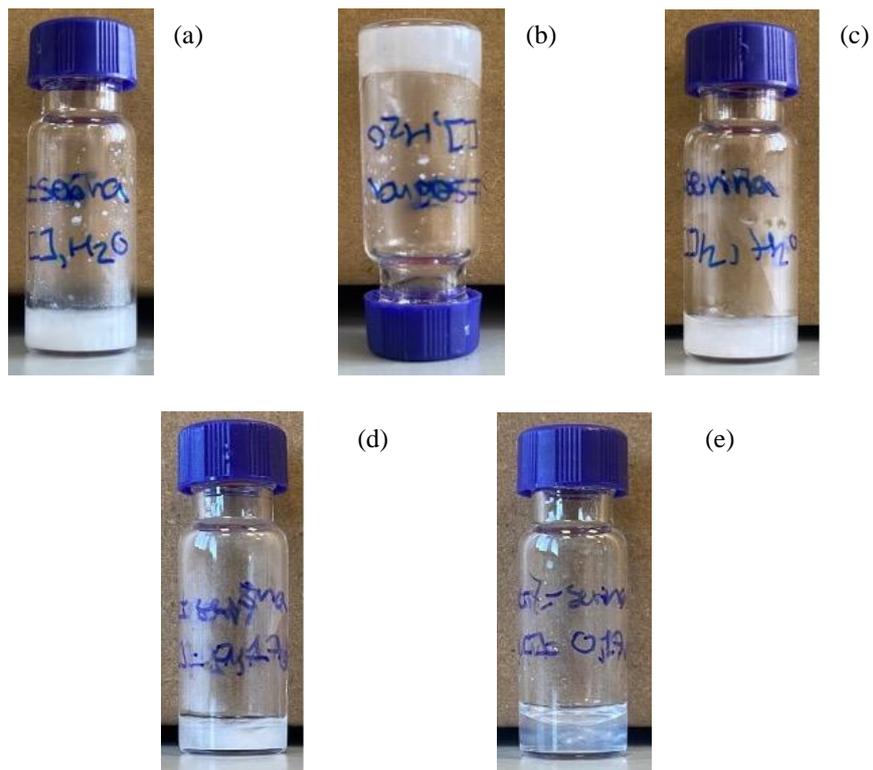


Figura S23. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 3 (a), del vial invertido de la muestra 3 (b), de la muestra 7 (c), de la muestra 11 (d) y de la muestra 13 (e) tras 120 minutos

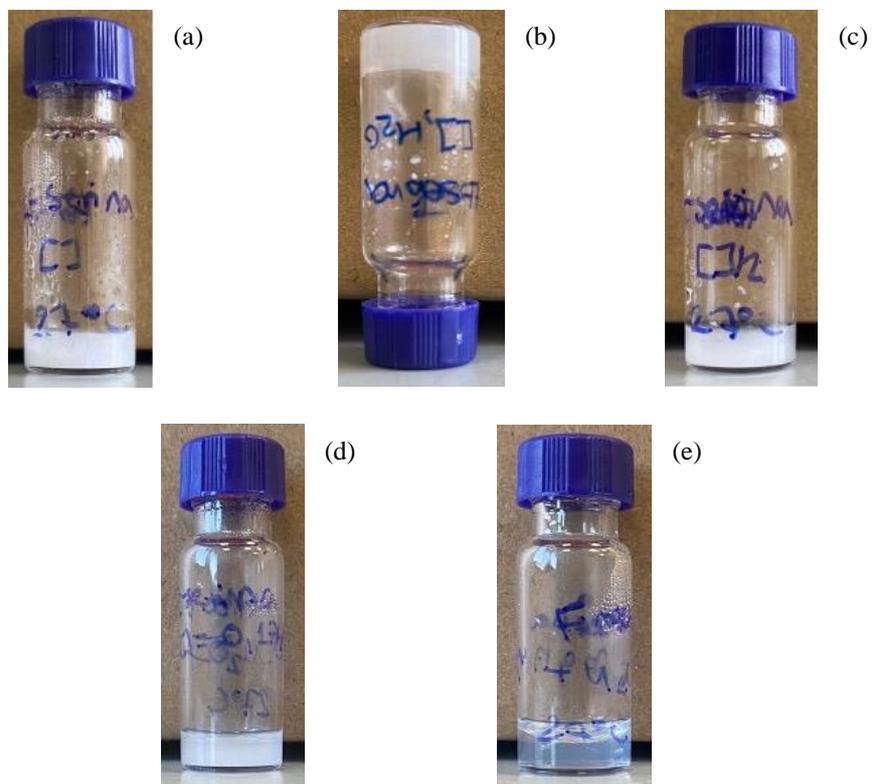


Figura S24. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 19 (a), del vial invertido de la muestra 19 (b), de la muestra 23 (c), de la muestra 27 (d) y de la muestra 31 (e) tras 120 minutos

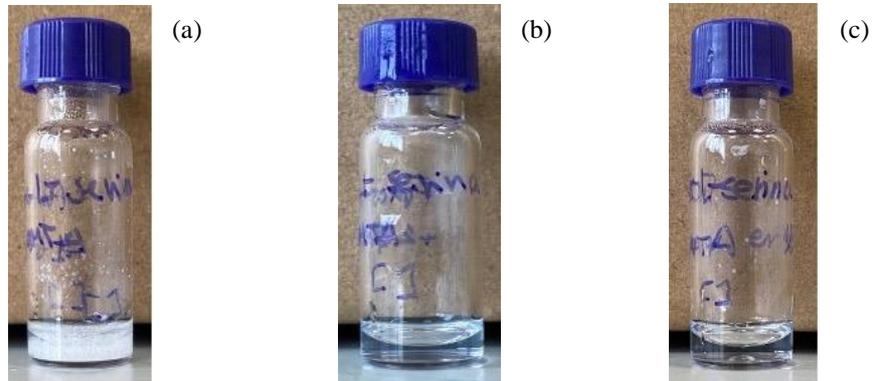
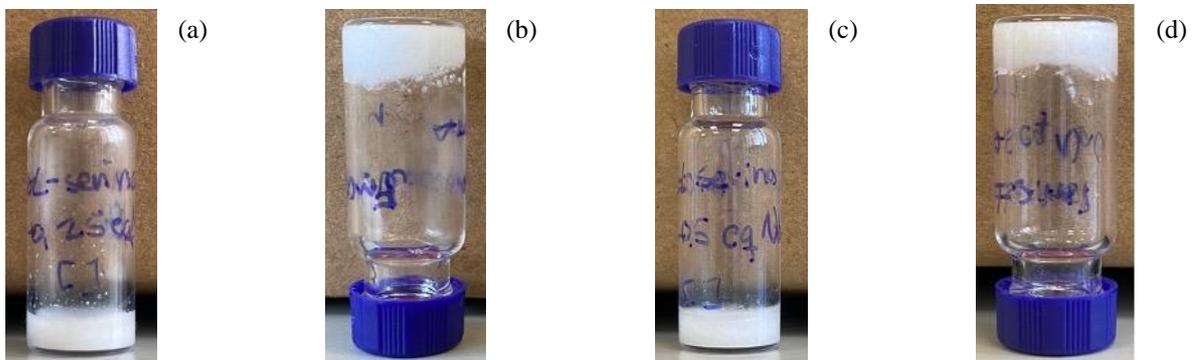


Figura S25. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 35 (a), muestra 43 (b) y muestra 51 (c) tras 120 minutos



Figura S26. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 39 (a), muestra 47 (b) y muestra 55 (c) tras 120 minutos



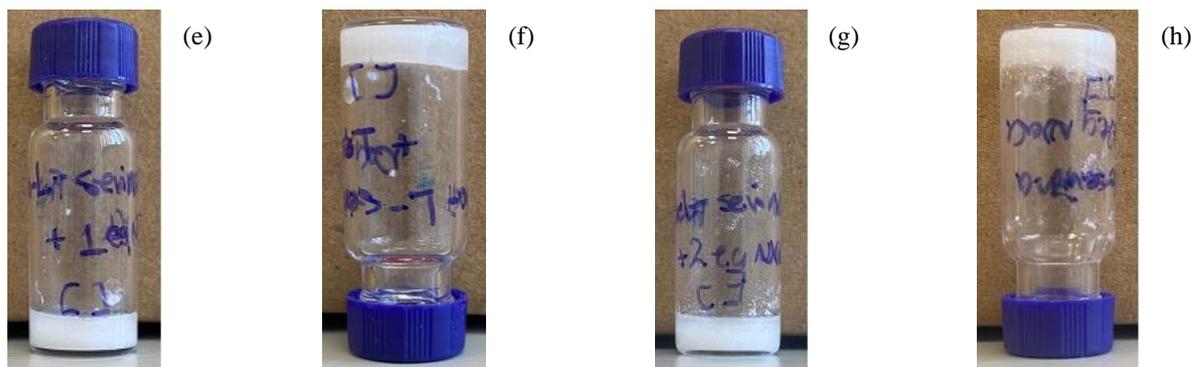


Figura S27. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 59 (a), del vial invertido para la muestra 59 (b), de la muestra 67 (c), del vial invertido para la muestra 67 (d), de la muestra 75 (e), del vial invertido para la muestra 75 (f), de la muestra 83 (g) y del vial invertido para la muestra 83 (h) tras 120 minutos

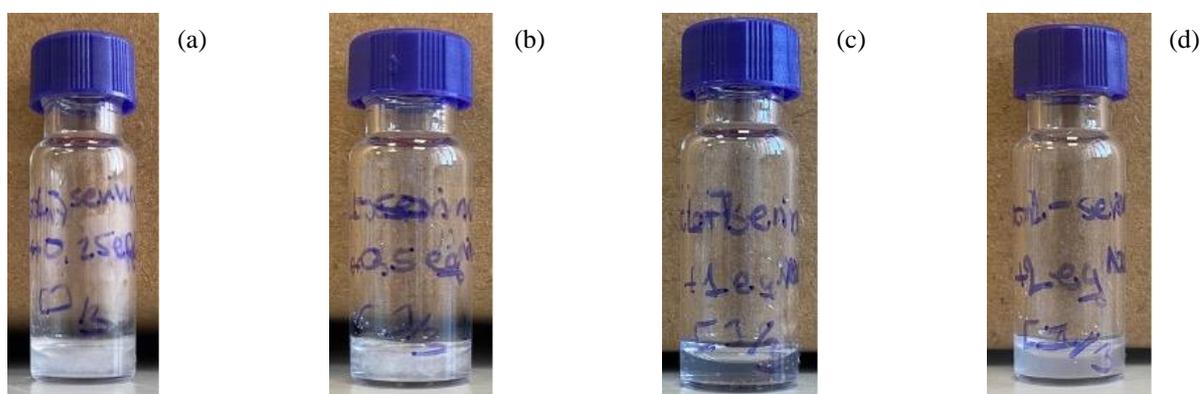
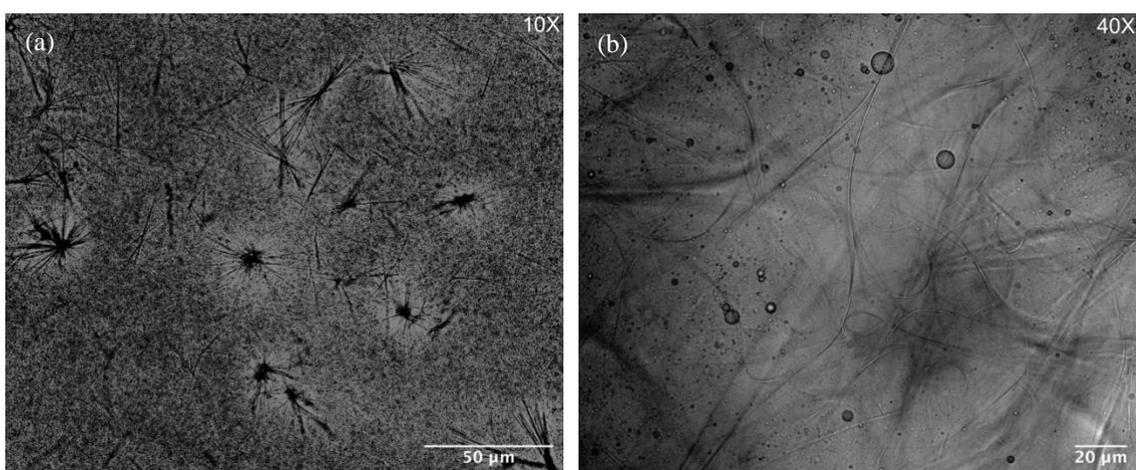


Figura S28. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 63 (a), muestra 71 (b), muestra 79 (c) y muestra 87 (d) tras 120 minutos



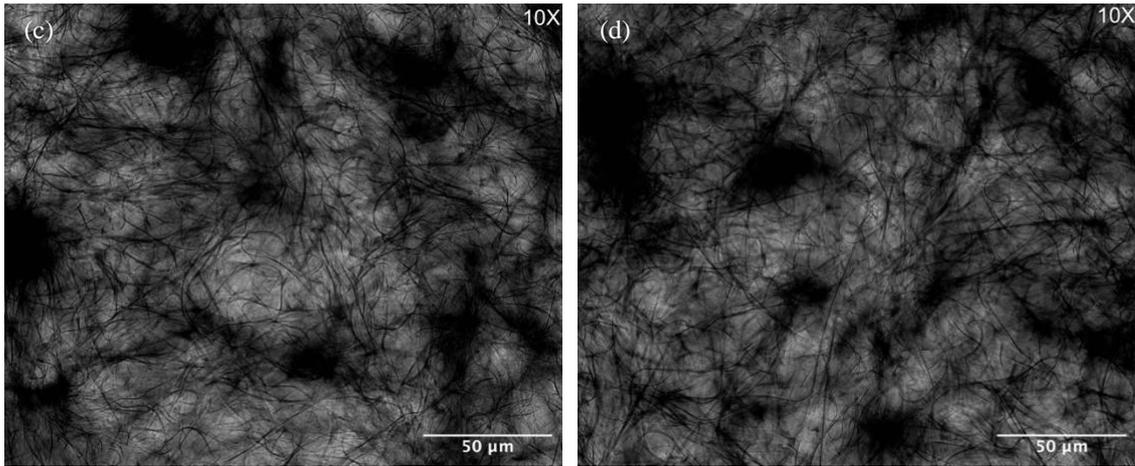


Figura S29. Imagen de la muestra 59 en el microscopio de luz transmitida tras 5 minutos (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c) y 24 horas (d)

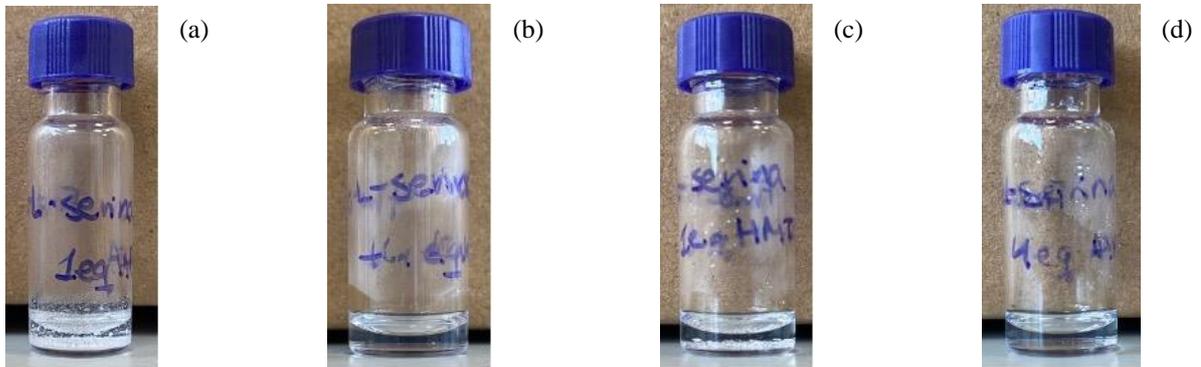


Figura S30: Imagen de la observación macroscópica de la muestra 91 (a), muestra 99 (b), muestra 107 (c) y muestra 115 (d) tras 120 minutos

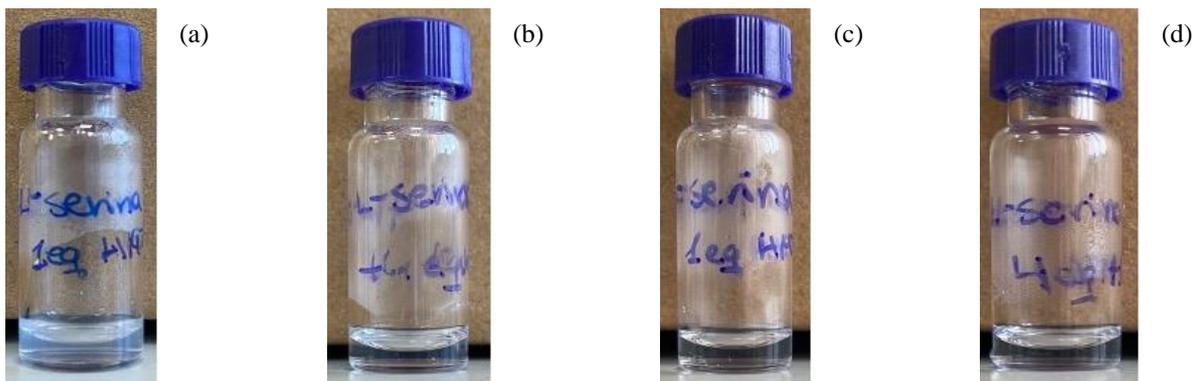


Figura S31. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 95 (a), muestra 103 (b), muestra 111 (c) y muestra 119 (d) tras 120 minutos

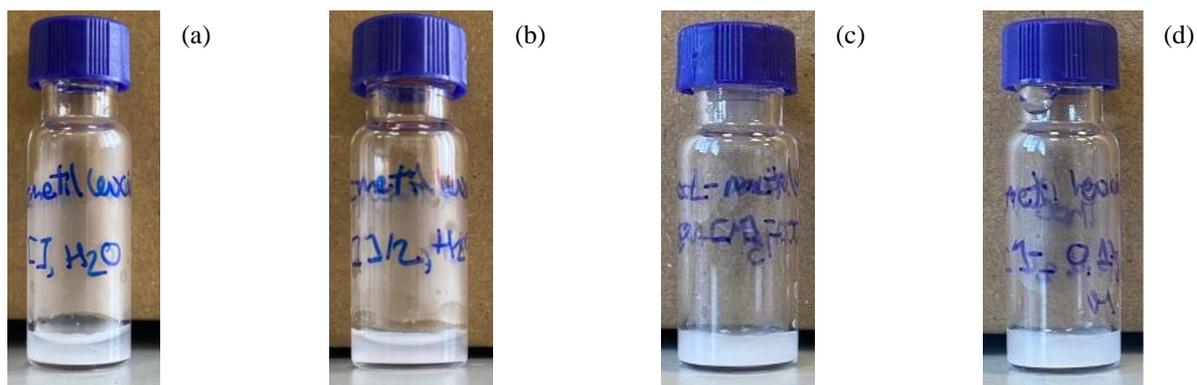


Figura S32. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 4 (a), muestra 8 (b), muestra 12 (c) y muestra 16 (d) tras 120 minutos

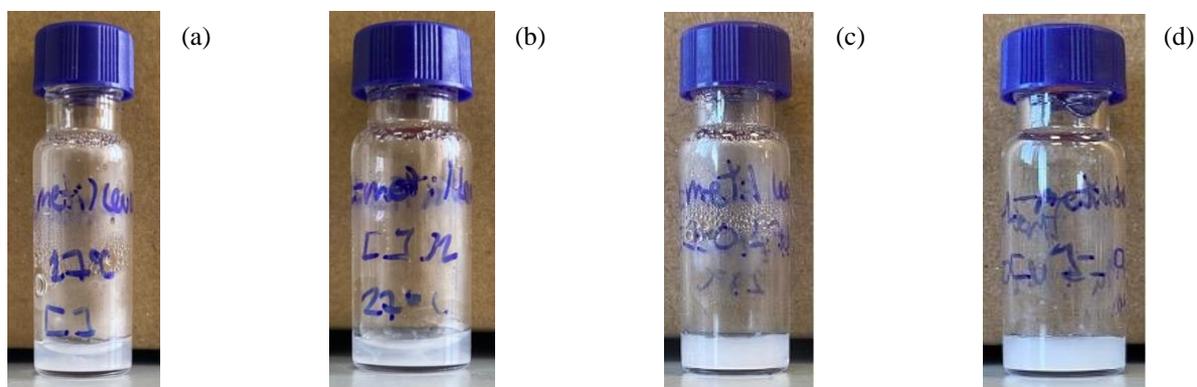
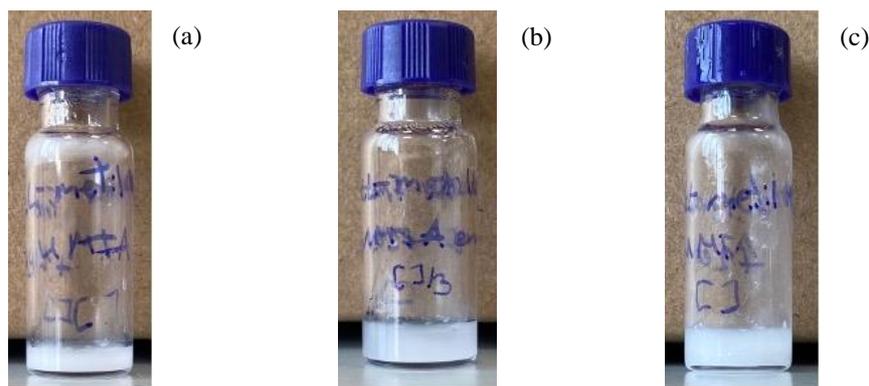


Figura S33. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 20 (a), muestra 24 (b), muestra 28 (c) y muestra 32 (d) tras 120 minutos



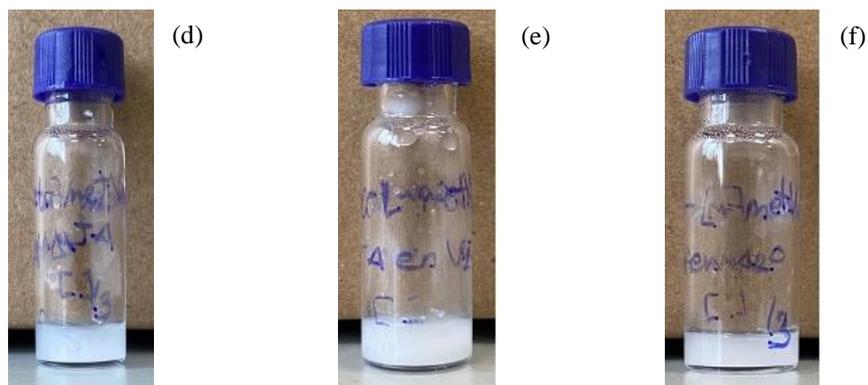


Figura S34. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 36 (a), muestra 40 (b), muestra 44 (c), muestra 48 (d), muestra 52 (e) y muestra 56 (f) tras 120 minutos

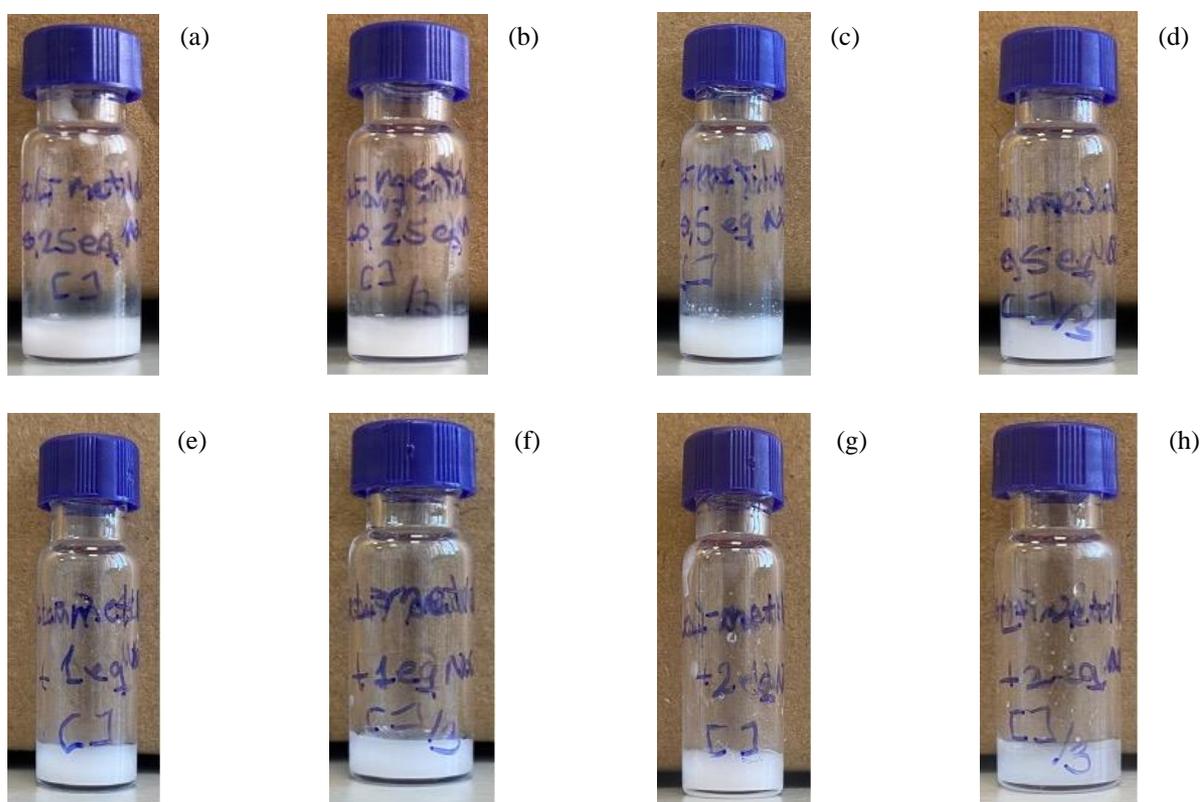


Figura S35. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 60 (a), muestra 64 (b), muestra 68 (c), muestra 72 (d), muestra 76 (e), muestra 80 (f), muestra 84 (g) y muestra 88 (h) tras 120 minutos

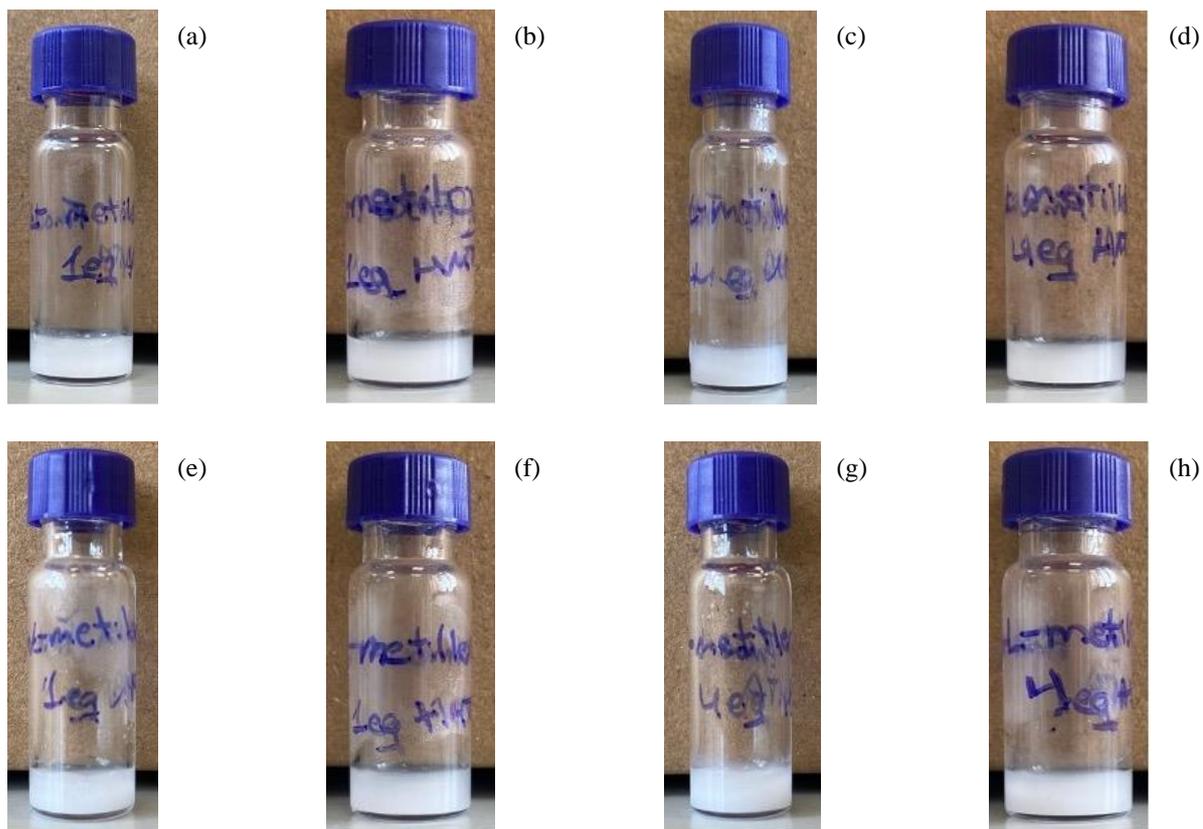
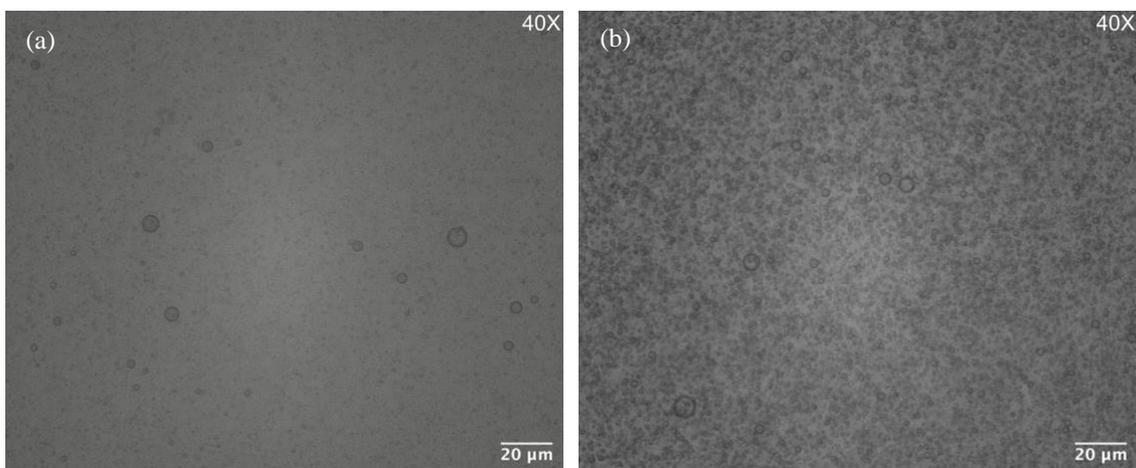


Figura S36. Imagen de la observación macroscópica de la muestra 92 (a), muestra 96 (b), muestra 100 (c), muestra 104 (d), muestra 108 (e), muestra 112 (f), muestra 116 (g) y muestra 120 (h) tras 120 minutos



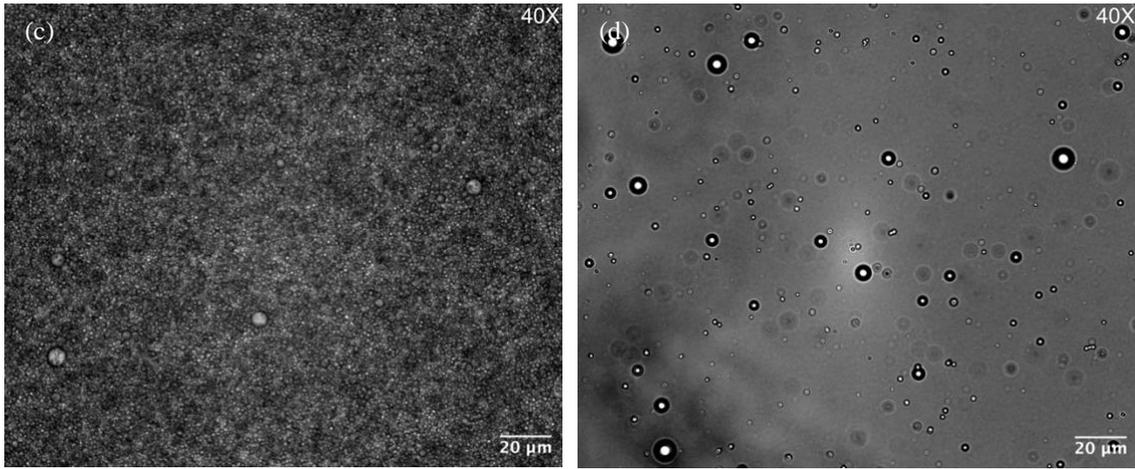


Figura S37. Imagen de la muestra 60 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

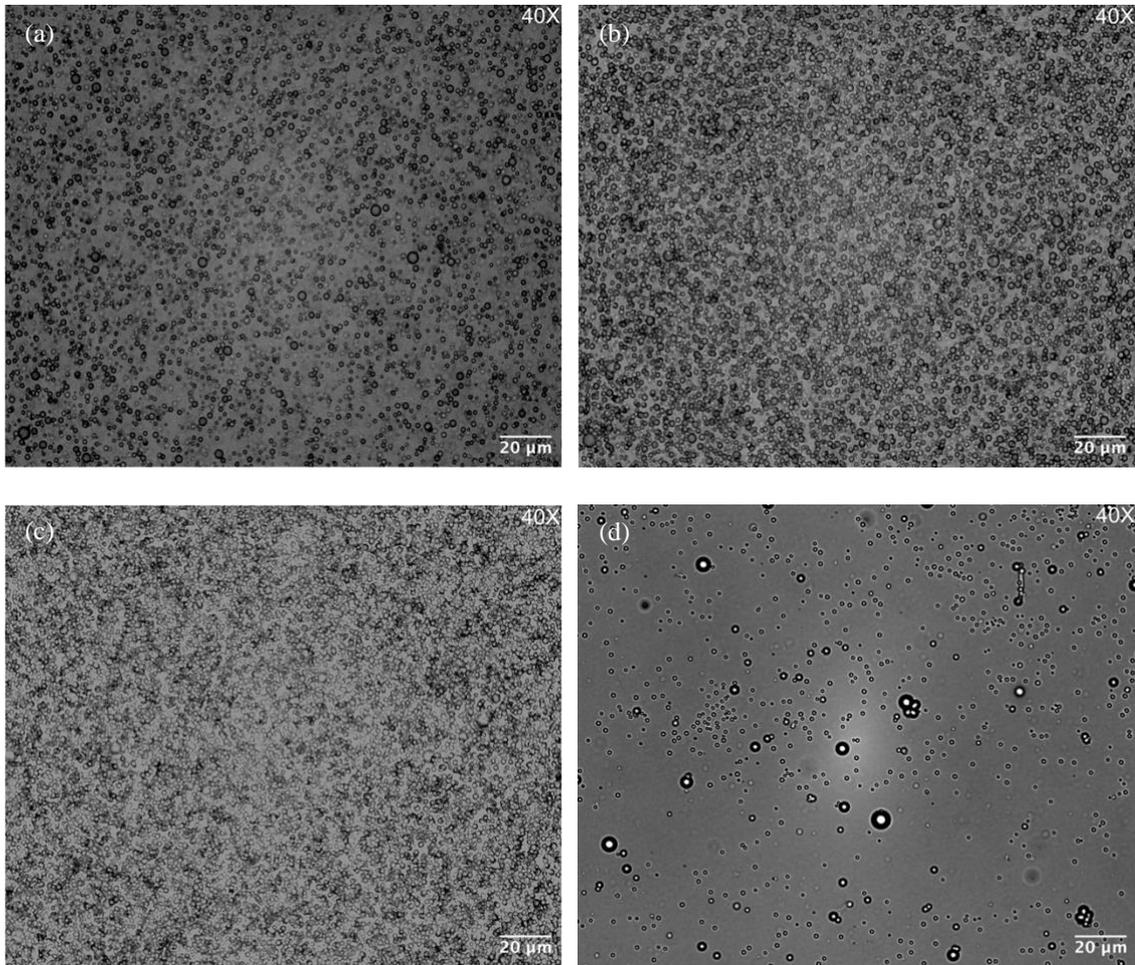


Figura S38. Imagen de la muestra 100 en el microscopio de luz transmitida tras 10 minutos (a), 30 minutos (b), 1 hora (c) y 24 horas (d)

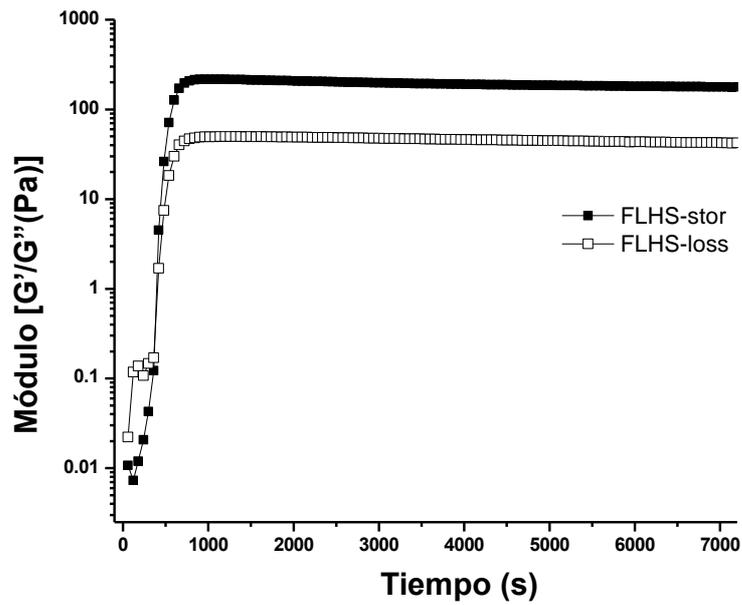


Figura S39. Experimentos reológicos de barrido temporal de FL con NaCl y HMTA con una proporción 1:2:4 (FLHS, $G' = 217,2$ Pa, $G'' = 49,52$ Pa)

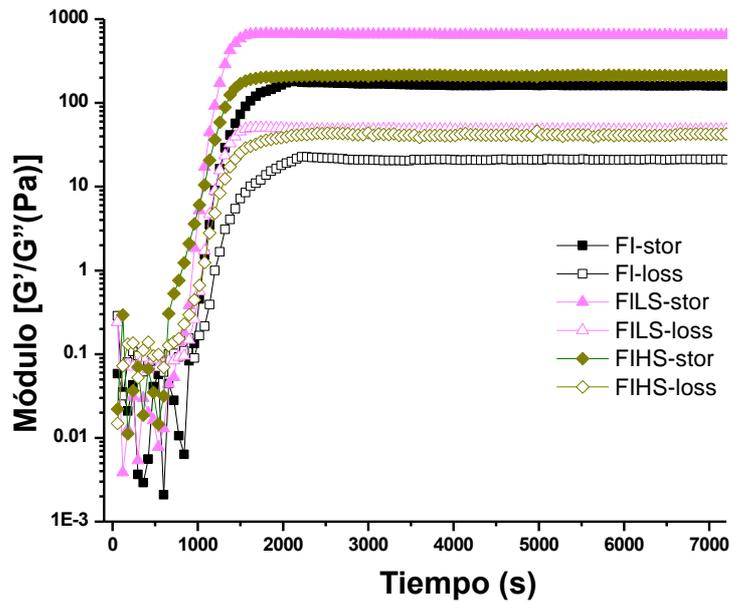


Figura S40. Experimentos reológicos de barrido temporal de FI con agua (FI, $G' = 180,6$ Pa, $G'' = 19,95$ Pa), con NaCl con una proporción 1:0,25 (FILS, $G' = 668$ Pa, $G'' = 50,33$ Pa) y con NaCl con una proporción 1:2 (FIHS, $G' = 214,9$ Pa, $G'' = 41,81$ Pa)

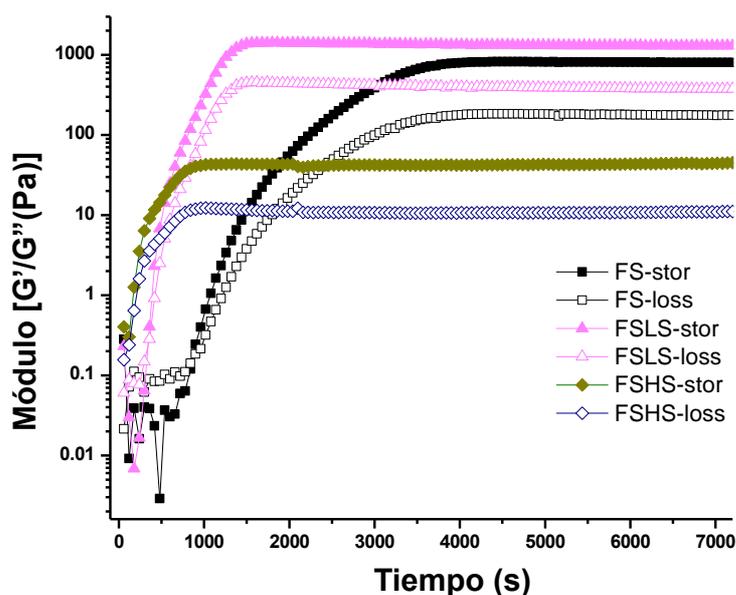


Figura S41. Experimentos reológicos de barrido temporal de FS con agua (FS, $G' = 822,5$ Pa, $G'' = 183,8$ Pa) con NaCl con una proporción 1:0,25 (FLS, $G' = 1416$ Pa, $G'' = 447,8$ Pa) y con NaCl con una proporción 1:2 (FSHS, $G' = 45,07$ Pa, $G'' = 11,08$ Pa)

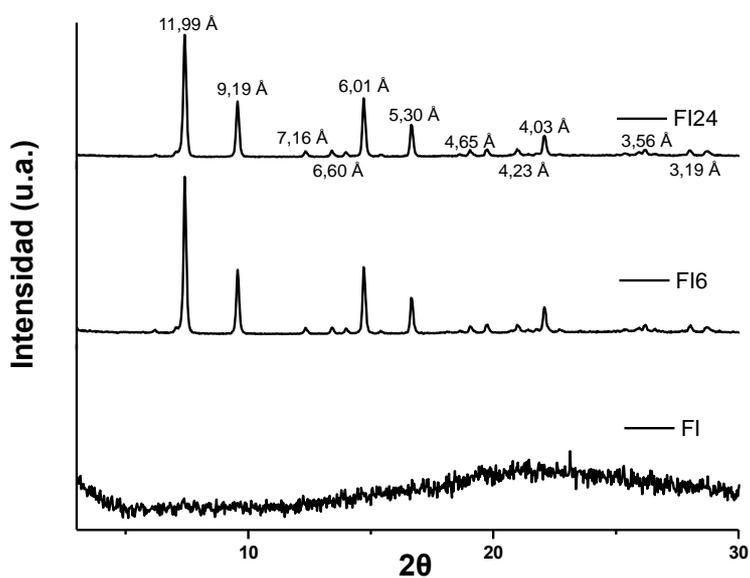


Figura S42. Espectro de difracción de rayos X en polvo de la muestra 2. De abajo hacia arriba: después de 1 minuto, después de 6 horas y después de 24 horas

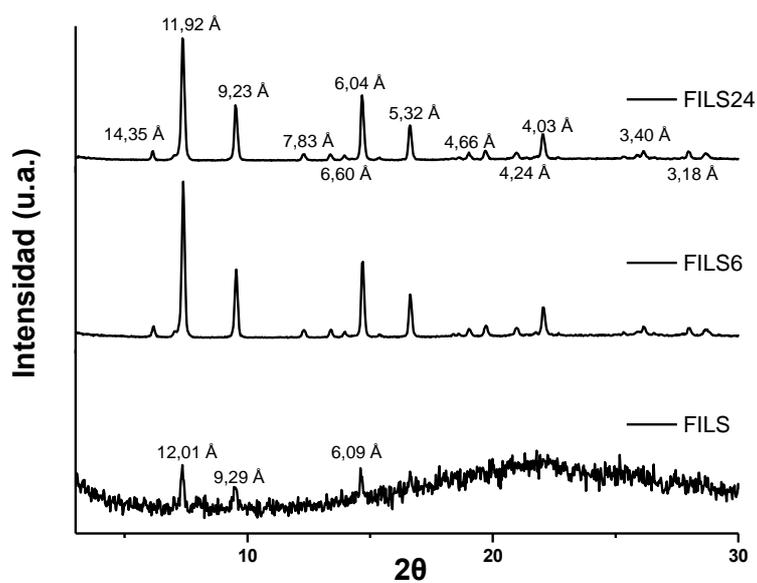


Figura S43. Espectro de difracción de rayos X en polvo de la muestra 58. De abajo hacia arriba: después de 1 minuto, después de 6 horas y después de 24 horas

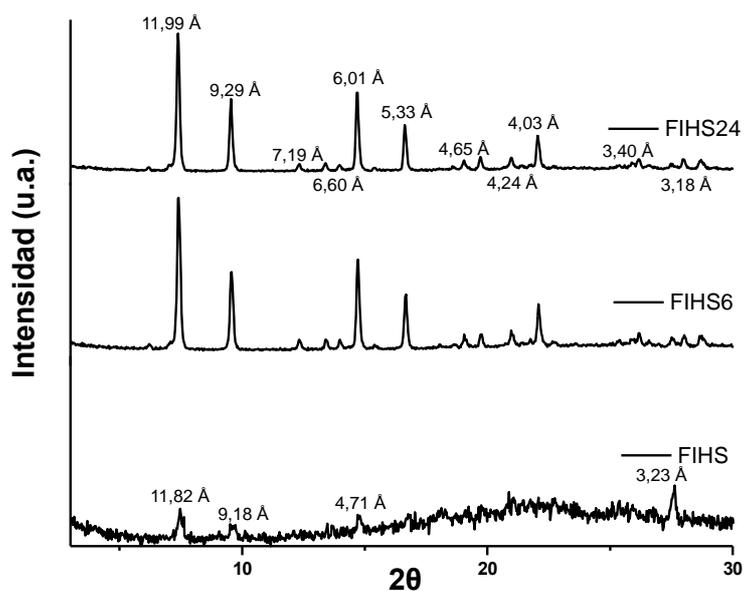


Figura S44. Espectro de difracción de rayos X en polvo de la muestra 82. De abajo hacia arriba: después de 1 minuto, después de 6 horas y después de 24 horas

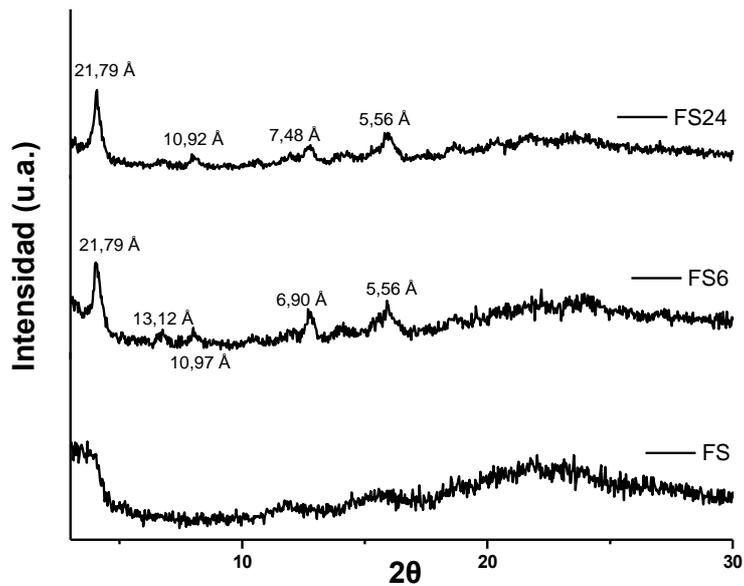


Figura S45. Espectro de difracción de rayos X en polvo de la muestra 3. De abajo hacia arriba: después de 1 minuto, después de 6 horas y después de 24 horas

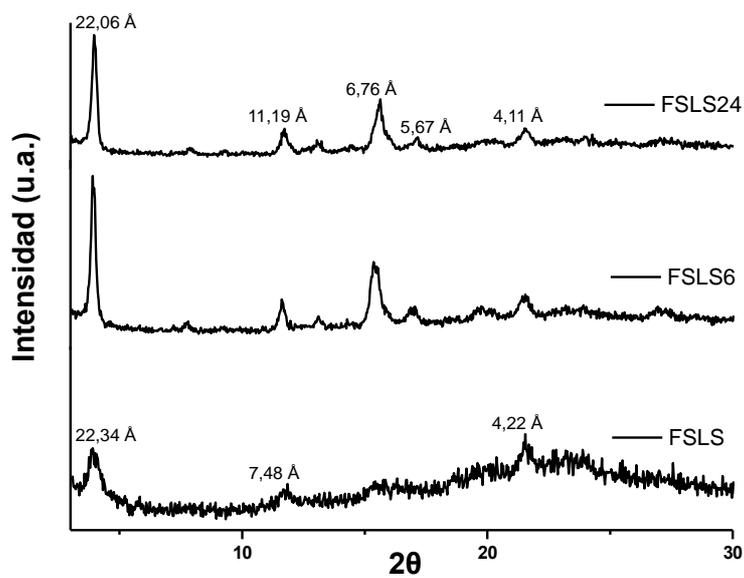


Figura S46. Espectro de difracción de rayos X en polvo de la muestra 59. De abajo hacia arriba: después de 1 minuto, después de 6 horas y después de 24 horas

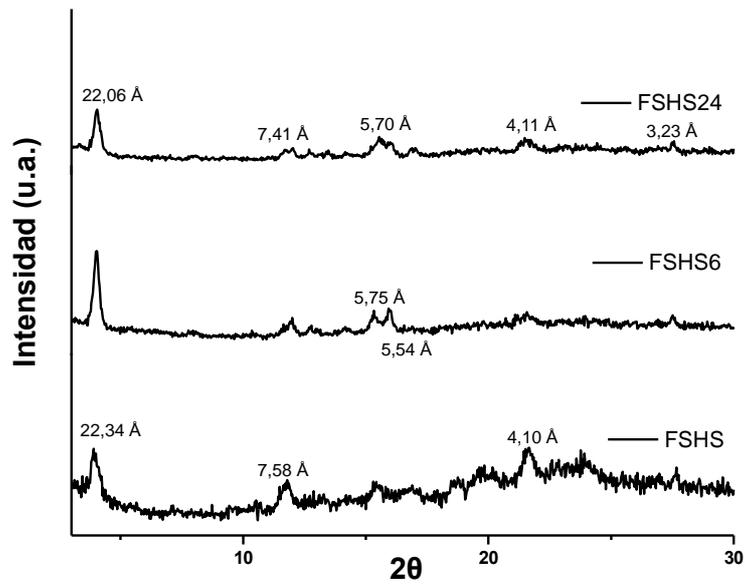


Figura S47. Espectro de difracción de rayos X en polvo de la muestra 83. De abajo hacia arriba: después de 1 minuto, después de 6 horas y después de 24 horas