



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA QUÍMICA – BIOSEPARACIONES**

**PRODUCCIÓN DE BIOMATERIALES BASADOS EN POLI(ÁCIDO GÁLICO) PARA SU
ESTUDIO EN INGENIERÍA DE TEJIDOS**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA**

**PRESENTA:
M.I. ALEJANDRA ROMERO MONTERO**

**TUTOR PRINCIPAL
DR. MIQUEL GIMENO SECO, FACULTAD DE QUÍMICA**

**COMITÉ TUTOR
DR. ROEB GARCÍA ARRAZOLA, FACULTAD DE QUÍMICA
DRA. CARMINA MONTIEL PACHECO, FACULTAD DE QUÍMICA**

CDMX, AGOSTO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA

Secretario: DRA. CARMINA MONTIEL PACHECO

1 er. Vocal: DR. ALBERTO ROSAS ABURTO

2 do. Vocal: DR. ROEB GARCÍA ARRAZOLA

3 er. Vocal: DR. MIQUEL GIMENO SECO

Lugares donde se realizó la tesis: Laboratorio 314, conjunto E de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM y grupo PSEP (Polímeros sintéticos: estudio y propiedades. Polímeros biodegradables de la Universidad Politécnica de Catalunya).

TUTOR DE TESIS:

Dr. Miquel Gimeno Seco

FIRMA

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio E-314 de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (FQ-UNAM) y en el grupo “*Synthetic Polymers: Structure and Properties. Biodegradable Polymers*” de la Universidad Politécnica de Catalunya bajo la asesoría del Dr. Miquel Gimeno Seco (FQ-UNAM), con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de becario 336576 y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN200520.

Artículos:

Romero-Montero, A., Gimeno, M., Farfán, N., & Labra-Vázquez, P. (2019). Enzymatic poly (gallic acid): A stable multiradical polyanion. *Journal of Molecular Structure*, 1197, 326-335.

Romero-Montero, A., Tecante, A., García-Arrazola, R., Montiel, C., del Valle, L. J., Puiggali, J., & Gimeno, M. (2017). Growth of epithelial cells on films of enzymatically synthesized poly (gallic acid) crosslinked to carboxymethylcellulose. *RSC advances*, 7(29), 17660-17669.

Romero-Montero, A., del Valle, L. J., Puiggali, J., Montiel, C., García-Arrazola, R., & Gimeno, M. (2020). Poly (gallic acid)-coated polycaprolactone inhibits oxidative stress in epithelial cells. *Materials Science and Engineering: C*, 111154.

Romero-Montero, A., Labra-Vázquez, P., del Valle, L. J., Puiggali, J., Montiel, C., García-Arrazola, R., & Gimeno, M. (2020). Development of an antimicrobial and antioxidant hydrogel/nano-electrospun wound dressing. *RSC advances*, 10, 30508-30518.

Colaboraciones:

Sánchez-Sánchez, R., Romero-Montero, A., Montiel, C., Melgarejo-Ramírez, Y., Sánchez-Ortega, C., Lugo-Martínez, H., ... & Gimeno, M. (2017). Cytoprotective effect of the enzyme-mediated polygallic acid on fibroblast cells under exposure of UV-irradiation. *Materials Science and Engineering: C*, 76, 417-424.

Zamudio-Cuevas, Y., Andonegui-Elguera, M. A., Aparicio-Juárez, A., Aguillón-Solís, E., Martínez-Flores, K., Ruvalcaba-Paredes, E., ... & García-Arrazola, R. (2020). The enzymatic poly (gallic acid) reduces pro-inflammatory cytokines in vitro, a potential application in inflammatory diseases. *Inflammation*, 1-12.

Estancias:

En el grupo *Synthetic Polymers: Structure and Properties. Biodegradable Polymers* (PSEP) de la Universidad Politécnica de Catalunya. Barcelona, España, 2018-2019. Asesor: Dr. Jordi Puiggali.

Congresos:

Cartel. International Material Research Congress, Cancún, México, 2017.

Agradecimientos:

A mi familia, por todo su apoyo y motivación a lo largo de tantos años, han hecho de mis sueños los suyos, los quiero mucho. Especialmente agradezco a mis padres Esther y Gilberto y a mi hermana Lupita por ser siempre los mejores, por buscar mi felicidad y por darme una familia increíble.

A Pablo por ser el mejor compañero de vida y el mejor amigo, gracias por todo el apoyo e impulso a través de estos años. Por llenar mi vida de felicidad, te amo.

A mi abuelita María de la Luz y a mis tíos Rogelio, María de los Ángeles, Consuelo, Carmen y Teresa por todo su cariño. Igualmente, gracias a mis primos *cuasi*-hermanos Vicky, Angela y Josué.

A mi asesor, el Dr. Miquel Gimeno. Gracias por todo su apoyo durante estos seis años, por sus consejos, sus enseñanzas y por impulsarme siempre a superarme. Fue un placer trabajar con usted, somos un buen equipo.

A mi comité tutor, Dra. Carmina Montiel y Dr. Roeb García. Siempre fue agradable conversar con ustedes, gracias por sus consejos, por sus aportaciones y por su amistad. Gracias Mina por toda la paciencia en el labo, eres el mejor dinosaurio que uno podría conocer.

A mis sinodales Dra. Cristina Piña y Dr. Alberto Rosas por sus comentarios, observaciones y retroalimentación en mejora de este trabajo.

A el Dr. Luis del Valle y el Dr. Jordi Puiggali por todas sus enseñanzas durante la estancia de investigación. Gracias Lucho por ser guía y amigo.

A personas increíbles que conocí a lo largo de estos años que de alguna u otra manera contribuyeron en mi formación académica, Mtra. Mariana Ramírez, Dr. Alberto Tecante, Dr. Joaquín Palacios, Dr. Francisco López, Dra. Amelia Farrés, Dra. Irma Bernal, M.C. Julieta Sandoval y Dr. Enrique Chávez. Y

especialmente a la Lic. Gloria García y sus compañeras en la administración escolar (Paty y Adri) que hicieron mi paso por el posgrado más sencillo.

A mis amigos de tantos años que siempre me animaron, que soportaron mis quejas y me consolaron con su compañía tan amena. Aunque a veces es difícil volver a reunirnos el cariño es siempre el mismo

A mis amigos del laboratorio 314, los llevó en mi corazón, especialmente a Lidia, Anahí, Isabel, Belén, Mariana, Irwin, Axel, Diego bueno, Diego malo, Chucho, Carlita, Miryam, Jon, Andrés, Pimentel, Joss, Ángel, Sam, Gabs, Don Armando, Claudia, Toño, Nidia, María y Ger. Son los mejores del mundo, talvez algún día olvide al PGAL, pero jamás a ustedes.

A mis amigos del PSEP: Angelica, Sonia, Brenda, Ina, Georgina, Hamidreza y Vitor por los eternos breaks de “coffee and merenda”. Gracias por hacer de mi estancia en el grupo una muy grata experiencia.

A mi familia, mi hogar

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	6
Medicina e Ingeniería de materiales	6
Biomateriales	6
Interacción biomaterial-tejido	8
Diseño de materiales antioxidantes	12
Polifenoles	14
Mecanismo antioxidante	16
Fuentes de polifenoles	17
Poli(ácido gálico)	18
CAPITULO 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	21
HIPOTESIS	21
OBJETIVOS	21
CAPÍTULO 3. POLI (ÁCIDO GÁLICO) ENZIMÁTICO: UN POLIANIÓN MULTIRADICAL ESTABLE	22
Perspectivas del capítulo	22
Introducción	22
Materiales y métodos	25
Materiales	25
Actividad enzimática de Lacasa de Lacasa de Trametes versicolor (LTV)	26
Síntesis enzimática de PGAL	26
Protonación del PGAL	27
Caracterización química	27
Métodos computacionales	28
Resultados y discusión	29
Síntesis y caracterización de los polímeros PGALn y PGAL	29
Espectroscopia infrarroja	30

Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido	31
La naturaleza multirradicalaria del PGAL	33
Estudios teóricos sobre los polímeros PGALn y PGAL.....	39
Los monómeros AG y AGrad.	39
Estudios estructurales y conformacionales de los polímeros PGALn y PGAL.	42
Espectros vibracionales y electrónicos computados.	47
Conclusiones	49
CAPÍTULO 4. CRECIMIENTO DE CÉLULAS EPITELIALES EN PELÍCULAS DE POLI(ÁCIDO GÁLICO) RETICULADO CON CARBOXIMETILCELULOSA.....	51
Perspectivas del capítulo:.....	51
Introducción	51
Materiales y métodos	54
Materiales	54
Entrecruzado de PGAL con CMC usando AC	54
Caracterización química	55
Densidad de entrecruzado	56
Análisis mecánicos de películas PGAL-CMC	57
Mediciones de permeabilidad al vapor de agua y ángulo de contacto	58
Degradación hidrolítica de películas.	59
Caracterizaciones térmicas	60
Pruebas antimicrobianas.....	60
Citotoxicidad y viabilidades celulares in vitro	61
Análisis estadístico	63
Resultados y discusión	63
Síntesis y caracterización de las películas producidas con PGAL-co-CMC	63
Propiedades mecánicas y grado de entrecruzado de las películas de PGAL-co-CMC.....	67
Caracterización térmica.....	70
Permeabilidad de Vapor de agua (PVA) y análisis de ángulo de contacto en películas PGAL-co-CMC	72
Degradación hidrolítica	74
Efecto de las películas de PGAL-co-CMC en el crecimiento bacteriano.....	78

Citotoxicidad de PGAL y viabilidad celular en películas PGAL-co-CMC.....	80
Conclusiones	83
CAPÍTULO 5. POLICAPROLACTONA RECUBIERTA CON POLI (ÁCIDO GÁLICO) INHIBE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS EPITELIALES.	85
Perspectivas del capítulo:.....	85
Introducción	86
Materiales y métodos	89
Materiales	89
Síntesis enzimática de PCL	89
Preparación de películas de PCL	90
Síntesis del copolímero de injerto PCL-g-PGAL.....	91
Caracterización química	91
Estudios de captación de radicales de PCL-g-PGAL.....	91
Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS).....	92
Mediciones de ángulo de contacto	93
Mediciones de perfilometría de contacto.....	93
Morfología de superficie	94
Mediciones DSC y XRD	94
Análisis de propiedades mecánicas de películas PCL y PCL-g-PGAL.....	95
Adhesión y proliferación celular	95
Ensayo de protección celular contra el estrés oxidativo.....	97
Resultados y discusión	97
Topografía y morfología de las muestras.....	102
Cristalinidad y comportamiento térmico.....	103
Propiedades mecánicas.....	105
Mojabilidad y energía de superficie	107
Adhesión y proliferación de células epiteliales.....	109
Estudio de protección celular contra el estrés oxidativo.....	113
Conclusiones	121
CAPÍTULO 6. DESARROLLO DE UN APOSITO HIDROGEL/ NANOELECTROHILADO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE	122

Perspectivas del capítulo.....	122
Introducción	122
Materiales y métodos	125
Materiales	125
Síntesis del copolímero injertado PCL-g-PGAL.....	126
Preparación de nanofibras PCLe-g-PGAL por electrohilado.....	127
Preparación de nanocompositos cargados de hidrogel.....	127
Caracterización química	128
Métodos computacionales.....	128
Análisis morfológico de las muestras.....	129
Mediciones de ángulo de contacto	129
Prueba antimicrobiana.....	129
Cinética de liberación de clindamicina.....	130
Actividad hemolítica.....	131
Viabilidad celular	132
Resultados y discusión	133
Electrohilado de PCLc, PCLe y PCL-g-PGAL.....	136
Caracterización de fibras electrohiladas	137
Capacidad antioxidante.....	140
Caracterización del composito hibrido	141
Actividad antimicrobiana	144
Cinética de liberación de clindamicina.....	147
Actividad hemolítica y viabilidad celular	150
Conclusiones	150
CAPÍTULO 7. AUTO ENSAMBLAJE SUPRAMOLECULAR DE POLI-L-FENILALANINA DE ORIGEN QUIMIO-ENZIMÁTICO	152
Perspectivas del capítulo:.....	152
Introducción	152
Materiales y métodos	155
Materiales	155
Desalinización del éster etílico de L-fenilalanina	155

Actividad enzimática de Subtilisin Carlsberg.....	155
Síntesis enzimática del éster etílico de poli-L-fenilalanina	156
Autoensamblaje de ePLP.....	157
Caracterización química	157
Morfología de los nanotubos	158
Mediciones de conductividad	159
Carga de TC en nanotubos e-PLP y experimentos de liberación.....	160
Resultados y discusión	161
Morfología de los nanotubos de ePLP	164
Estudios de infrarrojo sobre los nanotubos de ePLP y ePLP	168
Medición de conductividad en los nanotubos de ePLP	171
Carga de TC en nanotubos de ePLP enzimática	172
Liberación de TC de nanotubos ePLP	174
Conclusiones	176
Referencias	178
APÉNDICE A	196
APÉNDICE B.....	198
APÉNDICE C.....	202
APÉNDICE D	203
APÉNDICE E.....	204

Índice de figuras:

<i>Figura 1. Descripción general de la respuesta inmune a un biomaterial según Vishwakarma[7].....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 2. Propiedades fisicoquímicas fundamentales de los polifenoles.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 3. Representación esquemática de la síntesis de PGAL.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 4. Esquema de síntesis de los polímeros PGAL y PGALn a partir de AG</i>	<i>30</i>
<i>Figura 5. Espectro de infrarrojo (FT-IF(ATR)) para PGAL (a) y PGALn (b)</i>	<i>31</i>
<i>Figura 6. Análisis EDX para PGAL (superior) y PGALn (inferior). La microscopía SEM aparece insertada, para PGAL se observa un orden aparente con formas irregulares, en contraste con PGALn donde hay un evidente cambio de morfología y una disposición irregular del grano.</i>	<i>32</i>
<i>Figura 7. Espectro de ESR para PGAL (a) 0.125mM, (b) 0.25mM, (c) 0.5mM, (d) 0.75mM, (e) 1mM en agua a 298 K. Todas las mediciones son a 9.78 GHz con potencial de microondas de 5mW.</i>	<i>34</i>
<i>Figura 8. Espectro UV-vis para PGAL en agua (rojo), PGALn en metanol (azul), PGALn+DPPH en metanol (negro).</i>	<i>37</i>
<i>Figura 9. Espectro UV para PGAL (10ppm) en presencia de DPPH'. Intervalo: 30 s.</i>	<i>38</i>
<i>Figura 10. Espectro UV para PGALn (10 ppm) en presencia de DPPH'. Intervalo: 30 s. .</i>	<i>39</i>
<i>Figura 11. Geometrías de equilibrio en fase gaseosa obtenidas para los monómeros de ácido gálico (izquierda) y radical galato (derecha) en el nivel de teoría M06-2X / 6-311 ++ G (d, p).....</i>	<i>40</i>

<i>Figura 12. (a) Distribución de densidad de espín y (b) diagrama PDOS para el radical galato en el nivel de teoría M06-2X / 6-311 ++ G (d, p). Aquí, "fenilo" se refiere a C1-C6, "hidroxilo" a O3-O5 y "carboxilo" a C7 y O7.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 13. Geometrías optimizadas para oligómeros (n = 9) de PGAL (arriba) y PGALn (abajo) en el nivel de teoría M06-2X / 6-311 ++ G (d, p) en el vacío.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 14. HB intramolecular dentro de modelos reducidos de (a) PGALn y (b) PGAL como se evidencia a través de un análisis topológico QTAIM en el nivel de teoría M06-2X / 6-311 ++ G **. Los puntos críticos de enlace relevantes (BCP) aparecen como esferas de color verde pálido a través de caminos de enlace.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 15. Energía de los enlaces de hidrógeno intramoleculares (HB) dentro de PGALn y PGAL a partir de escaneos de energía a través del ángulo diédrico C2-C3-O3-H3 para modelos reducidos de ambos polímeros en el nivel de teoría M06-2X / 6-311 ++ G (d, p). Los puntos críticos relevantes de estas superficies de energía potencial aparecen con letras en cursiva.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 16. Espectros vibracionales computados (M06-2X/6-311 ++ G **, superior) y experimentales (FT-IR/ATR, inferior) para PGALn (a) y PGAL (b). Se indican los valores para el estiramiento asimétrico C = O.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 17. Representación esquemática de la reacción de reticulación entre PGAL y CMC con AC como agente entrecruzante con una posible estructura molecular en el producto.</i>	<i>64</i>
<i>Figura 18. Espectros FT-IR comparativos para PGAL (a); CMC (b); AC (c); y PGAL-co-CMC (d).</i>	<i>65</i>

Figura 19. Espectros EPR de estado sólido para PGAL (A); y para las películas de PGAL-co-CMC (B). La disminución de la concentración de PGAL disminuye las intensidades del campo paramagnético. La medición de control sin muestra se observa como una línea continua plana. 66

*Figura 20. Mediciones de ángulo de contacto en entradas de muestra de película PGAL-co-CMC en la Tabla 5. * $p < 0.05$ determinado por ANOVA y prueba de Tukey. 73*

Figura 21. Efecto del pH en la degradación hidrolítica a 37 °C de las películas PGAL-co-CMC. a) pH 3, b) pH 7, y c) pH 10. Los símbolos (■), (●) y (▲) corresponden a muestras con relaciones de % en volumen PGAL/Gli de 15:2 (muestra 7), 15:3 (muestra 8) y 15:4 (muestra 9), respectivamente..... 75

Figura 22. Micrografías SEM de película PGAL-co-CMC (muestra 9 en la Tabla 5). Muestra inicial (a), después de 3 días (b, c), 7 días (d, e) y 14 días (f) de exposición al tampón universal pH 7 a 37 °C. 77

*Figura 23. Inhibición del crecimiento bacteriano. a) Halos de inhibición producidos por las películas PGAL-co-CMC. Las muestras 1-9 corresponden la Tabla 5, y GM es el disco de control de gentamicina. b) y c) Inhibición del crecimiento por PGAL después de 24 y 48 h de cultivo bacteriano (respectivamente). Símbolos *E. coli* (■), *P. aeruginosa* (●), *E. faecalis* (▲) y *S. aureus* (▼). 79*

Figura 24. Curvas de citotoxicidad de PGAL (a). Viabilidad celular en películas de PGAL-co-CMC (10 mg/mL), las células se evaluaron a las 96 h de cultivo (b). 81

Figura 25. Imágenes de la proliferación celular en películas de PGAL-co-CMC. Células Vero (células de tipo epitelial) en la película o control CMC (a) muestra 3 (b), muestra 6 (c)

<i>muestra 9 (d). Células de tipo epitelial en películas (muestra 9): células MDCK (e) y células SIAT (f). Células tipo fibroblastos en las películas (muestra 9): células Cos-7 (g) y células Cos-1 (h). Las células se tiñeron con azul de tripano y se observaron por microscopía óptica (barra de escala = 20 μm).</i>	83
<i>Figura 26. Representación esquemática de la ruta sintética a PCL-g-PGAL</i>	98
<i>Figura 27. Espectro representativo de ¹³C-RMN (arriba) y CP/MAS ¹³C-RMN de PCL (en CDCl₃) y PCL-g-PGAL (fondo) para comparación, tomado a 400 MHz con frecuencia de rotación de 10 kHz.</i>	99
<i>Figura 28. Espectros XPS de alta resolución (C 1s) para PCL (a), PCL-OH (b), PGAL (c) y PCL-g-PGAL (d) y espectros de Na 1s para PCL-OH (recuadro b), PGAL (recuadro c) y PCL-g-PGAL (recuadro d). También se muestran los picos de la deconvolución (la línea negra corresponde al perfil experimental y las líneas de color a los picos deconvolucionados).</i>	101
<i>Figura 29. SEM micrographs showing the surface morphology of PCL (a), PCL_{R1} (b), PCL_{R2} (c), PCL-g-PGAL (d), PCL-g-PGAL_{R1} (e) and PCL-g-PGAL_{R2} (f).</i>	102
<i>Figura 30. Imágenes topográficas en 3D de PCL (a), PCL_{R1} (b), PCL_{R2} (c), PCL-g-PGAL (d), PCL-g-PGAL_{R1} (e) and PCL-g-PGAL_{R2} (f).</i>	103
<i>Figura 31. Series de calentamiento y enfriamiento DSC de PCL (a) y PCL-g-PGAL (b).</i>	105
<i>Figura 32. Perfiles de difracción de rayos X de ángulo amplio (WAXD) de PCL, PCL-g-PGAL y granulado comercial de PCL (M_w = 45,000 g/mol) utilizado como referencia. .</i>	106

*Figura 33. Adhesión celular (a) y proliferación celular (b) para células MDCK (azul) y Vero (red) a las muestras indicadas. La viabilidad relativa se refiere al control TCPS (placa de cultivo de tejidos). * p <0.05 vs control (TCPS). 111*

Figura 34. Imágenes de la proliferación de células Vero en películas de PCL (a), PCL_{R1} (b), PCL_{R2} (c), PCL-g-PGAL (d), PCL-g-PGAL_{R1} (e) y PCL-g-PGAL_{R2} (f). Las células se tiñeron con reactivos fluorescentes bisbenzimidida H y faloidina y se observaron por microscopía confocal (barra de escala = 50 μm). 114

Figura 35. Reducción del radical DPPH en presencia de PCL-g-PGAL (▲), PCL-g-PGAL_{R1} (●), PCL-g-PGAL_{R2} (■). Los valores se expresan como el porcentaje promedio de inhibición de DPPH en 3 experimentos. 115

Figura 36. Curvas de citotoxicidad de AAPH para células Vero y MDCK. 116

*Figura 37. Efecto antioxidante en líneas celulares MDCK y Vero cultivadas en la superficie de las películas durante 24 horas y utilizando el LD₅₀ de AAPH. TCPS (placa de cultivo) como control. * p <0.05 vs control tratado con AAPH. 117*

Figura 38. Imágenes de células Vero después de la prueba de estrés oxidativo en películas de PCL (a), PCL_{R1} (b), PCL_{R2} (c), PCL-g-PGAL (d), PCL-g-PGAL_{R1} (e) y PCL-g-PGAL_{R2} (f). Las células se tiñeron con reactivos fluorescentes bisbenzimidida y faloidina y se observaron por microscopía confocal (barra de escala = 50 μm). 118

Figura 39. Espectro representativo de CP/MAS ¹³C-NMR de PCL-g-PGAL, tomado a 400 MHz con frecuencia de rotación de 10 kHz. 133

Figura 40. Posibles vías de reacción para la PCL-g-PGAL que emplea unidades de AG y ácido 6-hidroxihexanoico como compuestos modelo. 135

<i>Figura 41. Perfil de energía a lo largo de dos posibles rutas de reacción para el PCLe-g-PGAL en el nivel de teoría M06-2X/6-311++G(d,p) que emplea unidades de AG y ácido 6-hidroxihexanoico como compuestos modelo.</i>	<i>136</i>
<i>Figura 42. Imágenes SEM de fibras electrohiladas de PCLc (a), PCLe (b) y PCLe-g-PGAL (c) preparadas en condiciones optimizadas.</i>	<i>139</i>
<i>Figura 43. Distribución de frecuencia del diámetro de la fibra y funciones Gaussianas para las fibras de PCLc (a), PCLe (b) y PCLe-g-PGAL (c).</i>	<i>140</i>
<i>Figura 44. Espectros de ESR de estado sólido para PCLe (azul), PGAL (púrpura) y PCLe-g-PGAL (verde) a 298 K. Todas las mediciones son a 9.78 GHz con una potencia de microondas de 5 mW.</i>	<i>141</i>
<i>Figura 45. Imágenes SEM de PCLc/CMC (a), PCLe/CMC (b) y PCLe-g-PGAL/CMC (c) superficie (izquierda), mapeo EDX cualitativo para elemento de cloro en azul cian (centro), corte transversal (derecha). de los compositos.</i>	<i>142</i>
<i>Figura 46. Ángulos de contacto para andamios PCLc, PCLe y PCLe-g-PGAL y muestras PCLc/CMC, PCLe/CMC y PCLe-g-PGAL/CMC.</i>	<i>143</i>
<i>Figura 47. Actividad bactericida de PCLc/CMC (a), PCLe/CMC (b) y PCLe-g-PGAL/CMC (c) compositos cargados con clindamicina contra S. aureus por ensayo STT.</i>	<i>146</i>
<i>Figura 48. Perfiles de liberación Cli de compositos e hidrogeles en PBS, pH = 7.4. Los valores corresponden a la media, mientras que las barras de error indican las desviaciones estándar (los ensayos se realizaron por triplicado).</i>	<i>148</i>
<i>Figura 49. Espectros de absorción UV-vis de ePLP en diferentes concentraciones ($\epsilon = 2.08 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).</i>	<i>162</i>

<i>Figura 50. Espectros de DC al calentar de 25 (azul) a 90 °C (rojo) para ePLP solubilizado en agua (a) y urea solubilizado (b).</i>	162
<i>Figura 51. Micrografía óptica del autoensamblaje obtenido a 4 °C para ePLP en una concentración de 0.15 mgmL⁻¹ en HFIP/H₂O 9: 1 (a, b); 0.375 mgmL⁻¹ en HFIP:H₂O 6:94 (c, d); y PLP 0.075 mgmL⁻¹ en 1:9 (e) y 2:8 de HFIP:H₂O (f).</i>	165
<i>Figura 52. Micrografías ópticas de ePLP autoensamblada a 0.5 mgmL⁻¹ a 4 °C en HFIP/H₂O 2:3 (a), 1:4 (b), 1:9 (c), 6:94 (d), 2:98 (e), 1:99 (f).</i>	166
<i>Figura 53. Imágenes de micrografía para los nanotubos ePLP obtenidos a 4 °C y 0.5 mgmL⁻¹ en 1:99 HFIP/H₂O; SEM (a-c) y AFM (d-g).</i>	167
<i>Figura 54. (a) Espectro FTIR para ePLP autoensamblada (arriba) y ePLP liofilizada (abajo) con etiquetado de señales principales. (b) Deconvolución de Fourier en la región amida I para espectros FTIR, no ensamblados (espectro superior); y autoensamblado (abajo)...</i>	169
<i>Figura 55. Micrografía óptica que muestra nanotubos PLP orientados horizontal y verticalmente seleccionados para mediciones (puntos) (a); y espectros polarizados SRIR de tubos de ePLP con orientaciones horizontal y vertical, adquiridos con polarizaciones de 0 y 90° (solo para la orientación horizontal) (b).</i>	171
<i>Figura 56. Micrografías confocales de nanotubos ePLP (a) y nanotubos ePLP cargados con TC (b-e).</i>	174
<i>Figura 57. Espectros Raman para nanotubos PLP (rojo); y nanotubos PLP cargados con TC (azul).</i>	175

<i>Figura 58. Perfiles de liberación de TC de ePLP/TC 1:1 (azul), 1:0.5 (rojo) y 1:0.33 (negro) en PBS-EtOH. Los valores corresponden al promedio, mientras que las barras de error indican las desviaciones estándar (los ensayos se realizaron por triplicado).....</i>	<i>176</i>
<i>Figura 59. Espectros de ESR de PGALn (a) 0.125 nM, (b) 0.25 mM, (c) 0.5 mM, (d) 0.75mM, (e) 1 mM en agua a 298 K.</i>	<i>196</i>
<i>Figura 60. (a) Espectros electrónicos de fase gaseosa calculados (ampliación gaussiana de 0.3 eV) y (b) Transiciones electrónicas involucradas para AG y su radical AGrad en el nivel de teoría M06-2X / 6-311 ++ G (d, p).</i>	<i>197</i>
<i>Figura 61. Parámetros de enlace de hidrógeno intramolecular calculados dentro de PGALn (izquierda) y PGAL (derecha).</i>	<i>197</i>
<i>Figura 62. Espectro ¹H-RMN de PGAL [D₂O, 400 MHz].</i>	<i>198</i>
<i>Figura 63. Espectro FT-IR(ATR) para PGAL.....</i>	<i>198</i>
<i>Figura 64. Propiedades térmicas de las películas PGAL-co-CMC. a) TGA, b) derivados de la degradación térmica, y c) Tg del segundo calentamiento. Línea negra (PGAL), línea roja (muestra 9), línea azul (muestra 5) y línea verde (muestra 1).</i>	<i>199</i>
<i>Figura 65. Ángulo de contacto vs concentración de PGAL a diferentes relaciones de Gli (vol %), concentración 2 % (■), 3 % (▲) y 4 % (●) (a); y ángulo de contacto vs concentración de Glicerol a diferentes proporciones de PGAL 5 % (●), 10 % (▲) y 15 % (■) (b).....</i>	<i>200</i>
<i>Figura 66. Efecto del entrecruzado en la proporción de hinchamiento de las matrices. Hinchamiento en H₂O desionizada a temperatura ambiente.</i>	<i>201</i>
<i>Figura 67. Medida de elongación para cada muestra en la Tabla 5.....</i>	<i>201</i>
<i>Figura 68. Espectro FT-IR para PCL (a), PGAL (b) y PCL-g-PGAL (c).....</i>	<i>202</i>

<i>Figura 69. Espectro UV para PCL (negro), PGAL (azul) y PCL-g-PGAL (rojo).....</i>	<i>202</i>
<i>Figura 70. Espectro FT-IR para PCL (a), PGAL (b) y PCL-g-PGAL (c).....</i>	<i>203</i>
<i>Figura 71. Viabilidad celular de la línea VERO en electrohilados de PCLc, PCLe y PCLe-g-PGAL, a las 96 h de cultivo.</i>	<i>203</i>
<i>Figura 72. ¹H-RMN para ePLP en DMSO.....</i>	<i>204</i>
<i>Figura 73. SDS-PAGE de solución fresca de ePLP del reactor (1), muestra concentrada por ultrafiltración (2-5).</i>	<i>204</i>
<i>Figura 74. Curva de calibración para ePLP en agua mediante espectroscopia UV-vis... </i>	<i>205</i>
<i>Figura 75. Gráfico de Nyquist para nanotubos ePLP (símbolos negros y rojos) y ePLP “bulk” (símbolos verdes y morados). El recuadro representa un detalle de la región de alta frecuencia.</i>	<i>205</i>

Índice de tablas:

<i>Tabla 1. Relación de masa para las muestras PGAL y PGALn</i>	33
<i>Tabla 2. Factor g de Landé, ancho de línea y número de spin (Ns) de muestras de PGAL.</i>	35
<i>Tabla 3. Distancias interatómicas relevantes (en Å) para el ácido gálico (AG) y el radical galato (AGrad), calculado en el nivel de teoría M06-2X/6-311 ++ G (d, p) en el vacío.</i> ..	40
<i>Tabla 4. Energías de excitación vertical (eV) experimentales y calculadas (M06-2X/6-311 ++ G **, vacío) al máximo de absorción para PGALn y PGAL.</i>	48
<i>Tabla 5. Resultados de los análisis mecánicos de las películas PGAL-co-CMC en diferentes concentraciones de PGAL y glicerol.</i>	68
<i>Tabla 6. Resultados de PVA para muestras de película PGAL-CMC según la metodología reportada por ASTM y Gennadios[110]</i>	72
<i>Tabla 7. Composición porcentual atómica (C 1s, O 1s, Na 1s) obtenida por XPS para PCL, PCL-OH, PGAL y PCL-g-GAL.</i>	102
<i>Tabla 8. Propiedades mecánicas de las películas. Los valores son la media ± SD (n = 6).</i>	107
<i>Tabla 9. Descripción general de los ángulos de contacto medidos en los diferentes materiales y la energía de la superficie relacionada con el modelo Zisman. Los valores son la media ± SD (n = 10).</i>	109
<i>Tabla 10. Parámetros de electrohilado para las muestras.</i>	137
<i>Tabla 11. Constante de difusión y T_{1/2} de clindamicina liberada de compositos de PCL/CMC e hidrogeles de CMC en PBS.</i>	149

Tabla 12. Organización de la muestra de ePLP, resistencia (R), conductividad (σ) de protones y espesor de muestra (ST)..... 172

Tabla 13. Relación de hinchamiento en el equilibrio y fracción de volumen del polímero en el hinchamiento de equilibrio para las muestras 1 a 10 de la Tabla 5. 200

Listado de símbolos y abreviaturas

SI	Sistema Inmune
M1	Macrófago M1
TNF-a	Factor de necrosis tumoral
IL	Interleucina
M2	Macrófago M2
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
LPO	Productos de oxidación lipídica
TBHQ	Terbutil hidroquinona
BHT	Butilhidroxitolueno
BHA	β -hidroxiácido
HAT	Transferencia de un átomo de hidrógeno
SET	Transferencia de un electrón singular
BDE	Energía de disociación de enlace
IP	Potencial de ionización
PGAL	Poli(ácido gálico)
PLP	Poli- <i>L</i> -fenilalanina
AG	Ácido gálico
CMC	Carboximetilcelulosa de sodio
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
LTV	Lacasa de <i>Trametes Versicolor</i>
DPPH	2,2-difenil-1-picrylhydrazyl
Gli	Glicerol
PEG	Polietilenglicol
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño
FT-IR	Espectro infrarrojo por transformada de Fourier
ESR	Resonancia electrónica de espín
DFT	Teoría del funcional de densidad
DRX	Difracción de Rayos X
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

SACX	Dispersión de rayos X de ángulo pequeño
SANS	Dispersión de neutrones en ángulo pequeño
PGALn	Poli(ácido gálico) neutro
PGAL	Poli(ácido gálico) radical
UV-vis	Ultravioleta-visible
MM	Mecánica molecular
EDX	Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva
MO	Orbitales moleculares
HB	Enlace de hidrogeno
BCP	Puntos críticos de enlace
PES	Superficie de energía de potencial
AC	Ácido cítrico
RID	Detector de infrarrojo
PVA	Permeabilidad al vapor de agua
HR	Humedad relativa
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
TGA	Análisis Termogravimétrico
LB	Agar Luria Bertani
SRIR	Radiación sincrotrón-IR
PP	Polipéptidos
GM	Gentamicina
TC	Tetraciclina
LD50	Dosis letal media
IC50	Índice de inhibición medio
Cs	Concentración de saturación
TCPS	Poliestireno para cultivos de tejido
CALB	Lipasa B de <i>Candida Antartica</i>
CL	Caprolactona
PDI	Índice de polidispersidad
WAXD	Dispersión de rayos X de ángulo amplio
SAXS	dispersión de rayos X de ángulo pequeño
PS	Poliestireno
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(láctico-co-glicólido)
SPTT	Prueba de transferencia de placa en serie
UFC	Unidades formadoras de colonia
Cli	Clindamicina
DC	Dicroísmo Circular

En este trabajo se estudiaron derivados del poli(ácido gálico) (PGAL) que es un polímero sintetizado enzimáticamente, el cual fue desarrollado en el grupo de investigación y que por su origen y método de síntesis no dañino para el medio ambiente, posee cualidades que pueden resultar benéficas para la salud humana. Es un polímero con una masa molecular de 6000 Da, una estructura secundaria helicoidal y carácter polianiónico multiradicalario, características que le permiten ser un semiconductor eléctrico ($\leq 10^{-4} \text{ Sm}^{-1}$). El PGAL tiene además capacidad antioxidante ($\text{IC}_{50} = 23.48 \mu\text{g/mL}$), actividad antimicrobiana sobre Gram+ ($\text{MIC} = 400 \text{ mg/mL}$), alta solubilidad en agua (500 mg/mL) y ofrece protección celular en cultivos sometidos a estrés oxidativo generado por luz UV y especies reactivas de oxígeno (ROS).

En esta tesis se realizó un estudio detallado teórico y experimental para asignar plenamente la estructura del polímero, lo que nos permitió entender la conectividad de otros materiales que son derivados de este y que fueron desarrollados en este trabajo. Como matrices soporte se utilizaron carboximetilcelulosa (CMC), poli- ϵ -caprolactona y poli-L-fenilalanina que son polímeros de origen natural o de síntesis enzimática y que son reconocidos por ser biocompatibles.

En general para el estudio del PGAL y sus derivados se emplearon distintas técnicas que incluyeron RMN, FT-IR, XPS, EDX, UV, DFT, ESR, SEC, XRD y SR-IR para la

caracterización química. Microscopia confocal, SEM, AFM, perfilometría y ángulo de contacto para la caracterización morfológica y de superficie, DSC y TGA para la caracterización térmica además de pruebas mecánicas y de conductividad eléctrica. La caracterización biológica incluyó pruebas antimicrobianas, de actividad hemolítica y de viabilidad, proliferación y adhesión celular.

Los resultados obtenidos indican que tanto el PGAL como sus derivados tienen potencial para ser utilizados en la ingeniería de tejidos con diversas aplicaciones, con el fin común de abatir los daños causados por el estrés oxidativo y las infecciones bacterianas; siendo ambas las complicaciones más comunes en el desarrollo y aplicación de biomateriales.

In this work, derivatives of poly (gallic acid) (PGAL), which is an enzymatically synthesized polymer, which was developed in the research group and due to its origin and method of synthesis is friendly to the environment and has qualities that can be beneficial for human health. It is a polymer with a molecular mass of 6000 Da, a helical secondary structure and multiradical polyanionic character, characteristics that allow it to be an electrical semiconductor ($\leq 10^{-4} \text{ Sm}^{-1}$) and have antioxidant capacity ($\text{IC}_{50} = 23.48 \mu\text{g/mL}$), antimicrobial activity on Gram + ($\text{MIC} = 400 \text{ mg/mL}$), a high solubility in water (500 mg/mL) and offers cellular protection in cultures subjected to oxidative stress generated by UV light and ROS.

In this thesis, a detailed theoretical and experimental study was carried out to fully assign the structure of the polymer, which allowed us to understand the connectivity of other materials that are derived from it and that were developed in this work. Carboxymethyl cellulose (CMC), poly- ϵ -caprolactone (PCL) and poly-L-phenylalanine (PLP) were used as support matrices, because they are polymers of natural or enzymatic synthesis origin and are recognized as being biocompatible.

In general, to study PGAL and its derivatives, different techniques were used, including NMR, FT-IR, XPS, EDX, UV, DFT, ESR, SEC, XRD and SR-IR for chemical characterization. Confocal microscopy, SEM, AFM, profilometry and contact angle for morphological and surface characterization, DSC and TGA for thermal characterization as

well as mechanical and electrical conductivity tests. Biological characterization included antimicrobial and hemolytic activity, viability, proliferation, and adhesion cells tests.

The results obtained indicate that both PGAL and its derivatives have the potential to be used in tissue engineering with various applications, with the common purpose of reducing the damage caused by oxidative stress and bacterial infections; both being the most common complications in the development and application of biomaterials.

Los tejidos son estructuras constituidas por un conjunto de células iguales que están organizadas y distribuidas a fin de realizar una función fisiológica específica, y requieren ciertas propiedades mecánicas y de estructura para lograrlo. Como consecuencia del ritmo de vida es común que los tejidos se dañen (huesos, piel, cartílagos y músculos) y que esto tenga severas repercusiones en la salud humana y en algunos casos no se pueda conservar la vida.

La ingeniería de tejidos es una rama de la biomedicina que busca encontrar materiales nuevos que ayuden a reparar o reemplazar tejidos dañados en el cuerpo humano mediante la combinación de células, ingeniería de materiales, bioquímica y fisicoquímica; abarca temas por demás diversos, lo que la convierte en un campo inminentemente multidisciplinario y de gran impacto.

El objetivo de la ingeniería de tejidos es encontrar biomateriales que no provoquen reacciones adversas en el organismo; que ayuden a regenerar o sustituir un tejido paulatinamente, transfiriendo así las cargas de forma progresiva; que generen productos de degradación inocuos y fácilmente eliminables por el cuerpo.

En este trabajo se reportan los resultados de estudiar el poli(ácido gálico) (PGAL) y sus derivados con miras a ser aplicados en el campo de los biomateriales y la regeneración de tejidos. Se incluye la caracterización completa del polímero y sus procesos de injerto y entrecruzado con poli- ϵ -caprolactona (PCL) y carboximetilcelulosa de sodio (CMC) respectivamente; así como diversos métodos de manufactura de materiales como elaboración de películas por fusión o evaporación de solvente, electrohilado y autoensamblado molecular.

Medicina e Ingeniería de materiales

La medicina es la ciencia que se dedica al estudio de la vida y la salud humana, gracias a sus invaluables aportes se ha logrado beneficiar a miles de personas, pues mediante el control de enfermedades se ha reducido la tasa de mortalidad. La medicina es una ciencia multidisciplinaria que se enriquece con los conocimientos generados en otras ramas de la ciencia y de la ingeniería, con lo que se ha logrado no solo mejorar el tratamiento de enfermedades, sino también aspectos como el diagnóstico y la prevención.

El resultado de la aplicación de las técnicas y principios de la ingeniería en la medicina es la ingeniería biomédica. Esta rama de la ingeniería es un campo de estudio inmenso donde converge información desde distintas fuentes, principalmente la ingeniería de materiales, la fisicoquímica, la bioquímica y la biología celular. Uno de los principales objetivos de la ingeniería biomédica es lograr sustituir o reparar funciones biológicas a través del uso de biomateriales.

Biomateriales

El término biomaterial hace referencia a cualquier material, natural o artificial que comprende todo o parte de una estructura o dispositivo biomédico, que realiza, aumenta o reemplaza una función natural [1]. El factor más importante que diferencia a un biomaterial respecto a cualquier otro es su capacidad de ser biocompatible, es decir, el biomaterial debe ser capaz de realizar una función deseada con respecto a una terapia médica, sin provocar ningún efecto local o sistémico indeseable en el receptor o beneficiario de esta ésta y a su

vez generar una respuesta celular o tisular benéfica apropiada para una condición médica específica [2].

La biocompatibilidad depende del material, el huésped y el sitio de implante; entre los factores intrínsecos que la afectan están la forma geométrica, el tamaño, la superficie química, la rugosidad, el diseño, la morfología y porosidad, la composición química, la inocuidad y el tiempo de degradación [3]. Del mismo modo, para que pueda ser considerado efectivo, el material debe estar libre de agentes microbianos, pirógenos o productos químicos tóxicos [4, 5].

La identificación y el uso de materiales adecuados para la recuperación o sustitución de partes del organismo dañadas representan un reto en la ciencia de materiales. La principal restricción en la aplicación de un biomaterial para uso médico radica en la incesante interacción que se producirá entre el material y el huésped. Dicha interacción no debe irrumpir la función del material, ni causar daño al organismo, mientras que la presencia del material debe contribuir a la recuperación del paciente [5].

Con base en la relación que se crea entre el biomaterial y el huésped se establece la siguiente clasificación de los biomateriales [6]:

- a) **Nocivo:** El biomaterial conduce a inflamación crónica de los tejidos que lo rodean, produciendo necrosis e incluso puede conllevar al desarrollo de tumores.
- b) **Biotolerante:** El material no induce una reacción adversa en el organismo, sin embargo, no llega a establecer comunicación con los tejidos que lo rodean. El material

es encapsulado por la reacción del sistema inmune y es rodeado por tejido conjuntivo rico en colágeno causando fibrosis.

- c) Bioinerte: El material establece contacto con los tejidos, se puede apreciar una interface definida. La estructura del tejido circundante es igual a la del tejido normal.
- d) Bioactivo: Se produce una interacción entre el material y los tejidos, produciéndose transformaciones en el material que conducen a la formación de una interface gradual entre el material y el medio, logrando que el material cumpla una función específica.

Teniendo en cuenta que el éxito de un biomaterial depende de la respuesta que induzca en el receptor es crítico comprender y, en la medida de lo posible, controlar las reacciones que el material induce en el organismo.

Interacción biomaterial-tejido

El sistema inmune humano actúa de manera innata y adaptativa y tiene un papel significativo en la reacción contra cualquier cuerpo extraño que pueda considerar “peligroso”. En este proceso inmune se encuentran involucrados numerosos anticuerpos y factores celulares que son esenciales para lograr una respuesta inmune efectiva. Los biomateriales son reconocidos por el sistema inmune como materiales extraños, por lo que después de la implantación del material, la respuesta inmune del organismo hospedero condiciona su éxito en la integración y la función biológica [7].

El periodo de recuperación después de la implantación del material varía dependiendo de la extensión de la reacción corporal al cuerpo extraño (serie de eventos inflamatorios, que

pueden conducir a fibrosis) y el subsecuente mecanismo homeostático que inicia el proceso celular.

En las primeras etapas de la inserción del material, los vasos sanguíneos dañados causan el derrame de sangre alrededor del material causando la primera interacción sangre-material. Los componentes del plasma (proteínas, lípidos, azúcares y iones) son adsorbidos en la superficie del material en un lapso de minutos [8, 9] y factores como la topografía, rugosidad, composición química y energía de superficie afectan el tipo y cantidad de moléculas que son adsorbidas (efecto Vroman) [10].

La composición de la interface formada influye en el reclutamiento y fijación de células (células de tejidos, inflamatorias, vasculares y conjuntivas) en el transcurso de varias horas [11-13]. A la vez, las plaquetas del exudado sanguíneo forman por agregación coágulos ricos en fibrina, los cuales sirven como depósito para las citoquinas y factores de crecimiento que proporcionan las señales para la reparación de la herida, además de servir como matriz provisional para la fijación y transporte de células [14, 15].

La respuesta del sistema inmune innato se activa principalmente por macrófagos y células dendríticas [16, 17]. Este proceso desencadena la liberación de varias citocinas proinflamatorias, que inducen la quimiotaxis dirigida de otras células inflamatorias innatas y conduce a la activación de la inmunidad adaptativa [18, 19].

Durante la fase inflamatoria crónica (primeras 48 horas), la principal fuente de citocinas son los linfocitos T. Las células inmunes innatas y adaptativas asociadas con este proceso inflamatorio son características de la respuesta corporal a cualquier cuerpo extraño, en este

caso un biomaterial [20, 21]. Sin embargo, los macrófagos parecen dominar la progresión de la inflamación crónica hacia la regeneración. El subtipo M1 secreta numerosas enzimas, incluidas las colagenasas y diferentes citocinas, como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 y IL-10, que estimulan la respuesta inflamatoria. Mientras que el fenotipo M2 activado, libera citocinas antiinflamatorias para resolver la inflamación [22, 23].

Si por alguna razón el sistema inmunitario del huésped no mejora los niveles de macrófagos M2 para pasar a la etapa de curación se desencadena en la formación de fibrosis impidiendo la regeneración del tejido. Por lo tanto, el diseño de biomateriales debe considerar la respuesta inmune, particularmente la respuesta inflamatoria [7]. En la figura 1 se ilustra de manera general el proceso inflamatorio desencadenado por el sistema inmune ante la presencia de un biomaterial, donde es notable la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son liberadas para regular el proceso de curación.

En la figura 1 podemos observar que los leucocitos son atraídos a la superficie del material mediante la interface generada por las proteínas adsorbidas; los leucocitos se encargan de atacar cualquier material extraño o patógeno a través de un estallido oxidativo dominado por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS en la figura), siendo las más identificadas el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el superóxido (O_2^-) [24].

Esas especies oxidantes promueven la quimiotaxis de un mayor número de leucocitos y células inmunes circundantes que inducen la diferenciación de macrófagos pro-inflamatorios que a su vez generan citosinas inflamatorias como la IL-6, TNF-a, IL-1. Este proceso trae como consecuencia la producción excesiva de radicales libres se desequilibra el estado redox

tisular en el sitio de implante, dando como resultado una fase inflamatoria prolongada y una respuesta de curación exacerbada que conduce a la formación de fibrosis.

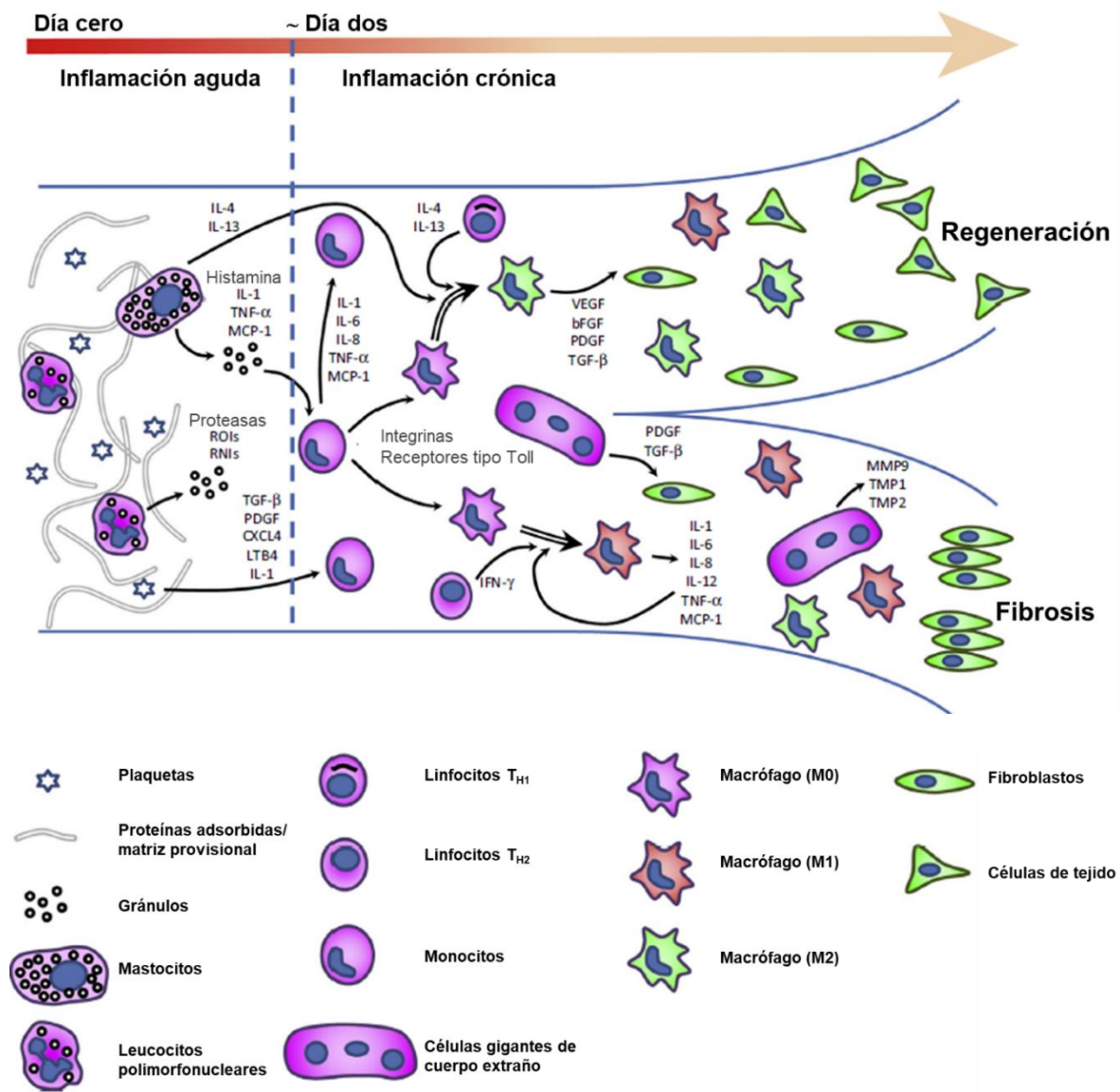


Figura 1. Descripción general de la respuesta inmune a un biomaterial según Vishwakarma[7]

Es por ello que recientemente, se ha identificado al estrés oxidativo como un factor esencial en la respuesta del tejido frente a los biomateriales y que a menudo limita su

biocompatibilidad y funcionamiento a largo plazo [25]. El estrés oxidativo es una patología que se presenta cuando la producción de oxidantes, que incluyen principalmente ROS y RNS y consecuentes productos de oxidación lipídica (LPO) sobrepasa la capacidad antioxidante de las células y tejidos. Este padecimiento está implicado en un importante número de patologías, como las cardiovasculares, neurodegenerativas, el cáncer y el envejecimiento.

Por lo tanto, existe una clara necesidad de nuevos materiales que no invoquen la generación de estrés oxidativo, sino que lo eviten o lo remedien. Por ello, el diseño de biomateriales que puedan inhibir y/o modular especies oxidantes es una estrategia prometedora para mejorar los resultados *in vivo*[26, 27]. Es relevante para este trabajo conocer la respuesta inmune del organismo hacia los biomateriales, para poder diseñar morfologías y funcionalidades que permitan controlar esta respuesta mediante el uso de antioxidantes.

Diseño de materiales antioxidantes.

El control de la respuesta inmune oxidativa ha generado una necesidad de terapias antioxidantes o reductoras de estrés oxidativo debido a la problemática que esta patología representa. La administración sistémica de fármacos antioxidantes-antinflamatorios ha sido la práctica más común. Sin embargo, existe un obstáculo entre el desarrollo de antioxidantes y su uso en tratamientos clínicos viables debido a la entrega inadecuada en el sitio de acción requerido.

En los años 70's el famoso químico Linus Pauling abogó por el consumo de grandes dosis de vitaminas, principalmente vitamina C, con el fin de prevenir el estrés oxidativo y con ello un sinfín de enfermedades. Desde entonces, se generó un gran interés en la comunidad

académica que ha hecho enormes esfuerzos en el diseño y ensayo clínico de moléculas antioxidantes. No obstante, y a pesar de la popularidad de los suplementos vitamínicos, los resultados de muchos años de ensayos clínicos sobre la administración de antioxidantes orales han sido inconsistentes [28-30].

Ahora se presume que para que una terapia antioxidante sea efectiva, el antioxidante administrado debe:

1. Inhibir las especies oxidativas correctas.
2. Ser liberado directamente en el sitio objetivo.
3. Alcanzar niveles efectivos en el sitio previsto.
4. Permanecer funcional mientras exista estrés oxidativo patológicamente relevante.

Los problemas actuales en el suministro sistémico y el fracaso a gran escala de los ensayos clínicos requieren un método más localizado y prolongado de suministro de antioxidantes, que potencialmente se puede lograr a través de biomateriales poliméricos. La liberación *in situ* y prolongada son ventajas que ofrecen los biomateriales sobre la ingesta oral.

Las principales estrategias en el campo de los materiales antioxidantes han incluido principalmente tres vertientes: (a) la encapsulación simple de moléculas antioxidantes, (b) el injerto de moléculas antioxidantes sobre otros polímeros, (c) la incorporación de moléculas antioxidantes en el esqueleto de polímeros, logrando con ello polímeros esencialmente antioxidantes [25]. En este sentido una variedad de moléculas sintéticas ha sido desarrolladas, como THBQ (terc-butilhidroquinona), BHT (butilhidroxitolueno), BHA (hidroxibutilanisol), entre otras, que, si bien han logrado aplicaciones industriales destacables como la

estabilización de polímeros, su aplicación en sistemas biológicos ha sido criticada y se limita bajo estrictas regulaciones debido a los posibles daños a la salud que pueden originar [31].

Los compuestos antioxidantes de origen natural y sus derivados se han postulado como los candidatos idóneos para aplicaciones terapéuticas, puesto que logran combatir los efectos adversos provocados por los radicales libres sin generar efectos secundarios, mientras que los materiales poliméricos debido a su química flexible potencialmente permiten la protección de compuestos inhibidores del estrés oxidativo, mientras los liberan localmente.

Entre los compuestos antioxidantes mayormente utilizados se encuentran las vitaminas, los polifenoles, las chalconas y proteínas con estructura polimérica altamente conjugada [32].

Polifenoles

Numerosos estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado que los polifenoles están involucrados en la reducción del estrés oxidativo desarrollado debido a la presencia de radicales libres. El mecanismo detrás de la acción de estos antioxidantes durante la fase inflamatoria muestra que son capaces de detener la inflamación debido a su capacidad para estabilizar radicales libres donándoles un átomo de hidrógeno o un electrón e incluso oxidándose rápidamente por sí mismos [33].

La naturaleza de los polifenoles ha adquirido una atención considerable debido a su estructura química que les confiere una naturaleza anfifílica debido a diversas características, tal como se ilustra en la Figura 2. La estructura molecular de esta familia de compuestos está formada por una región hidrofóbica debida a su anillo aromático y otra fuertemente hidrofílica debida

a su sustituyente hidroxilo (-OH), un grupo capaz de actuar como donador de enlaces de hidrógeno o como aceptor de los mismos [34]. Las interacciones de van der Waals y la formación de enlaces de hidrógeno son aparentemente dicotómicas, pero a menudo son efectos complementarios con los que los polifenoles interactúan con diversas biomoléculas, entre las que se suelen considerar a las proteínas como objetivo biológico más relevante [35].

Adicionalmente, la presencia de al menos dos grupos hidroxilo adyacentes en un anillo de fenilo les permite quelar especies metálicas, principalmente de calcio, magnesio, manganeso, hierro y cobre. Además, en comparación con el máximo de absorción secundario ($\pi \rightarrow \pi^*$) del benceno en agua a 254 nm, el fenol se desplaza al rojo a 270 nm. La presencia de un grupo hidroxilo adicional en posición *para* modifica aún más los máximos de absorción dentro del UV-vis (280-320 nm). Por lo tanto, los compuestos fenólicos brindan protección contra la radiación UV [36].

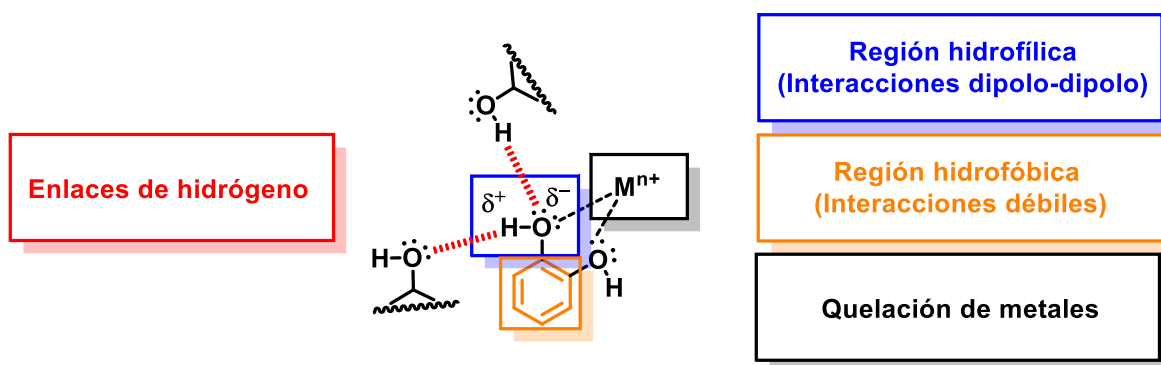


Figura 2. Propiedades fisicoquímicas fundamentales de los polifenoles.

Mecanismo antioxidante

Los compuestos polifenólicos pueden actuar como antioxidantes al quelar iones metálicos como hierro (II)/cobre (I) y hierro (III)/cobre (II) que participan en la conversión de O_2^{-*} y H_2O_2 en el altamente agresivo HO^\cdot a través de reacciones de tipo Haber-Weiss/Fenton. Asimismo, pueden bloquear la acción de algunas enzimas responsables de la generación de O_2^{-*} , como la xantina oxidasa y la proteína quinasa C. Sin embargo, se ha encontrado que la estabilización directa de ROS o radicales libres es el mecanismo de acción principal por el que los polifenoles expresan su función como protectores [37].

La acción antioxidante se lleva a cabo por dos mecanismos propuestos, el primero se basa en la capacidad del grupo funcional fenol de donar un átomo de hidrógeno a un radical libre (HAT), convirtiéndose así mismo en un radical libre estable, como se ilustra a continuación:



La eficiencia de este mecanismo depende de la rapidez con que el átomo de hidrógeno pueda ser donado, así como de la estabilidad del radical fenoxi formado, lo cual es altamente dependiente de la estructura del compuesto original (ArOH). Los factores más determinantes son la presencia, el número y la posición relativa de los grupos hidroxilo adicionales que se verán implicados en la formación de enlaces hidrógeno intramoleculares, así como la posibilidad conformacional de permitir la deslocalización electrónica a lo largo de la mayor parte de la molécula. Todos estos factores afectan la energía de disociación (BDE) del enlace fenólico (O-H). La debilidad del enlace O-H hace más factible la donación del átomo de hidrógeno [38].

El segundo mecanismo es la transferencia singular de electrones (SET) del ArOH al radical libre R[•] con la formación de un radical catión estable ArOH^{•+}.



El potencial de ionización (IP) del ArOH es otro factor fisicoquímico importante para determinar la eficiencia de los polifenoles como antioxidantes. Mientras más bajo, mejor será la transferencia de electrones.

Fuentes de polifenoles

La mayoría de los compuestos fenólicos son extraídos de plantas, siendo los más abundantes los flavonoides. Estos compuestos están presentes en gran cantidad de alimentos y bebidas y sus efectos benéficos en la salud humana han sido ampliamente reconocidos. Sin embargo, el afán de contar con estructuras complejas o poliméricas que conserven o incrementen las cualidades de los polifenoles naturales ha llevado al desarrollo de métodos de síntesis complejos, debido a la dificultad de controlar el grado de polimerización y las características regio y estereoquímicas de los enlaces entre polifenoles [39].

La síntesis orgánica de polifenoles se basa en reacciones de autocondensación de flavonoides en medio ácido, en las que se obtiene invariablemente una mezcla de oligómeros. Con el fin de mejorar la síntesis se ha implementado el uso de activadores del tipo ácido de Lewis, entre ellos TiCl₄, TMSOTf, AgBF₄ y Sc-(OTf)₃.

En contraste a la síntesis orgánica, la síntesis enzimática de polifenoles ha sido estudiada arduamente en los últimos 25 años, ya que es un proceso no dañino para el medio ambiente

y da lugar a materiales poliméricos, evitando el contenido de sustancias altamente tóxicas, como catalizadores químicos u otros aditivos de síntesis, los cuales requieren generalmente procesos costosos para su eliminación y en la mayoría de los casos son perjudiciales para la salud y el medio ambiente.

La obtención de cadenas poliméricas de polifenoles mediante síntesis enzimática permite obtener productos que sería imposible obtener a través de síntesis convencional debido a las propiedades catalíticas quimio, regio y enantioselectiva de las enzimas [40, 41]. Por tal motivo, se ha propuesto la síntesis enzimática de polifenoles usando oxidorreductasas, principalmente peroxidasa de rábano (HRP), cloro peroxidasa (CPO) y lacasas [42]. Las peroxidasas inducen la polimerización oxidativa de derivados fenólicos, lo que permite obtener compuestos con estructuras novedosas, siendo este proceso una alternativa a la convencional obtención de polímeros fenólicos y una vía para evitar el uso de reactivos tóxicos [43].

Poli(ácido gálico)

Actualmente hay un creciente interés en el desarrollo de polímeros derivados de polifenoles naturales debido a que el incremento en el peso molecular trae como consecuencia una serie de ventajas respecto a los monómeros, con lo que se ha logrado aumentar el número de aplicaciones prácticas de estos polímeros. Algunas de las características que se mejoran con la polimerización se enlistan a continuación [44]:

- Reducción en los tiempos de oxidación (aclaramiento).
- Incremento en la estabilidad térmica.

- Reducción de la fotosensibilidad.
- Mejora en las propiedades mecánicas al incrementar la viscoelasticidad.
- Incrementa la resistencia a la luz UV.
- Menor volatilidad.
- Mayor estabilidad química.
- Potencia las propiedades biológicas (capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, entre otras).

El poli(ácido gálico) (PGAL) es un polifenol proveniente de síntesis enzimática, es un homopolímero formado por unidades repetitivas de ácido gálico (AG). El AG es un polifenol natural que se encuentra en las agallas y corteza del roble y presenta actividad biológica como antioxidante, anticancerígeno y antiinflamatorio.

El PGAL se sintetizó por primera vez en 2013 por López y colaboradores[42] mediante el uso de lacasa de *Trametes versicolor* (LTV) en medio acuoso con pH=5, temperatura ambiente y oxigenación controlada (Figura 3). Bajo las condiciones óptimas, el polímero resultante tiene un peso molecular de aproximadamente 6000 Da y presenta una alta y atípica solubilidad en agua (500 mg/mL) lo que potencializa su campo de aplicación.

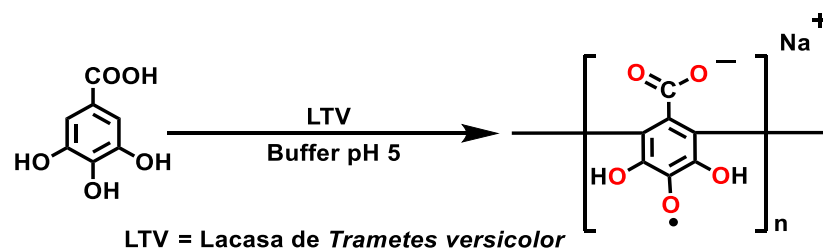


Figura 3. Representación esquemática de la síntesis de PGAL

Según lo reportado por nuestro grupo de trabajo, la propagación de cadena se da mediante enlaces fenilo-fenilo (C-C), el polímero muestra buena conductividad eléctrica en estado sólido ($>10^{-4} \text{ Sm}^{-1}$) [42, 45] ubicándose dentro de los semiconductores. Posee la capacidad de proteger a células epiteliales frente a luz UV, acción antimicrobiana sobre Gram (+) (MIC=400 mg/mL) y capacidad antioxidante ($\text{IC}_{50}=23.48 \mu\text{g/mL}$) [46]. En estudios recientes se demostró que el PGAL es capaz de reducir los niveles de producción de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α y IL-1 β en monocitos humanos expuestos a estrés oxidativo [47]. El PGAL cuenta además con el beneficio provenir de un proceso económico y no agresivo con el medio ambiente, que aunado a todas sus actividades biológicas lo perfilan como un polímero idóneo para ser probado en ingeniería de tejidos.

En este trabajo se abordarán diferentes estrategias para la obtención de biomateriales basados en PGAL, los polifenoles son capaces de reaccionar apropiadamente con una variedad de grupos funcionales como se mencionará en los siguientes capítulos, por lo que se evaluarán diferentes tipos de moléculas soporte (polisacárido, poliéster o polipéptido) así como diferentes morfologías (películas, fibras, nanotubos); con la finalidad de encontrar una conformación adecuada que permita aprovechar la capacidad antioxidante del PGAL y con ello generar un biomaterial que pueda modular la respuesta inflamatoria provocada por el sistema inmunológico. Cada material será caracterizado encaminado a una potencial aplicación biomédica.

HIPOTESIS

La inserción covalente de poli(ácido gálico) sobre diferentes matrices producirá materiales biocompatibles cuyas propiedades fisicoquímicas y capacidad antioxidante les permitirá un uso potencial en Ingeniería de tejidos.

OBJETIVOS

- Caracterizar plenamente el PGAL mediante estudios teóricos y experimentales para establecer su estructura molecular con precisión, en el afán de entender su mecanismo de acción antioxidante y su manera de interactuar químicamente con otros polímeros.
- Obtener por síntesis enzimática los polímeros PCL y PLP y caracterizarlos para utilizarlos como soportes de PGAL.
- Obtener y caracterizar el entrecruzado PGAL-*co*-CMC y el copolímero PCL-*g*-PGAL por síntesis solvotermal para evaluar el efecto de la inserción de CMC y PCL sobre las propiedades mecánicas, la capacidad antioxidante y la biocompatibilidad del PGAL.
- Producir materiales con morfologías de interés en el campo de los biomateriales a partir de los derivados de PGAL (CMC-*co*-PGAL y PCL-*g*-PGAL) mediante técnicas como evaporación de disolvente, impresión de superficie y electrohilado para evaluar su potencial en aplicaciones biológicas.

CAPÍTULO 3. POLI (ÁCIDO GÁLICO) ENZIMÁTICO: UN POLIANIÓN MULTIRADICAL ESTABLE.

Perspectivas del capítulo

En este capítulo reexaminamos la estructura molecular del PGAL enzimático, el cual se identificó de naturaleza polianiónica multiradicalaria, en contraste con una asignación previa en la que se asumió erróneamente como una molécula diamagnética y neutra. Aquí, se presenta una profunda investigación de su estructura fundamental mediante el uso de métodos experimentales y teóricos, con mediciones de ESR y cálculos químicos cuánticos. Se descubrió que su naturaleza multiradical es notablemente estable gracias a una red extendida de enlaces de hidrógeno que se produce dentro de su estructura, con un régimen de energías de interacción de 3-11 kcal/mol, de acuerdo con los cálculos de DFT en el nivel de teoría M06-2X/6-311++G**. Este polímero multiradical presenta varias características atractivas, que incluyen estabilidad térmica y fotoquímica, solubilidad en agua y, lo más notable, el hecho de que se obtiene en una escala de varios gramos a partir del naturalmente abundante ácido gálico (AG) en condiciones suaves y verdes.

Introducción

El estudio de la estructura química y las propiedades de los polímeros radicales es un campo de estudio científico estimulante y de rápido crecimiento, en el que se han descrito invaluables aplicaciones de este tipo de compuestos, como imanes moleculares, componentes orgánicos en dispositivos electrónicos y magnéticos, así como elementos redox activos para tecnología de baterías [48, 49]. Muchos trabajos acerca de este tipo de materiales moleculares han estado enfocado en polímeros con base en TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-il-

oxil) que se modifica con diferentes cadenas de polímeros como el metacrilato, metil vinil éter, norbornano o siloxano [50, 51].

Recientemente, estudios acerca de la energía de disociación de enlaces fenólicos demostraron la estabilidad de los polímeros fenoxilicos radicales, particularmente si poseen sustituyentes *para* posicionados. De modo que, en comparación con los materiales anódicos (ejemplo, los galvinoxilos) los polímeros fenoxilicos radicales tienen un potencial redox menor debido a su masa molar significativamente más baja y por tanto una capacidad teórica más alta [52, 53].

La ciencia de polímeros cada vez proporciona más y más materiales con una variedad muy amplia de aplicaciones [54-56] y la optimización del uso de estos materiales y sus propiedades requiere una caracterización estructural y dinámica adecuada. La elucidación de sus estructuras moleculares requiere el uso de técnicas robustas, siendo las más destacadas en las últimas décadas, la Difracción de Rayos X (DRX), microscopia electrónica y espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [57]. No obstante, el análisis detallado y el modelado dinámico estructural de los polímeros es esencial para optimizar los procedimientos de síntesis controlando la obtención de estructuras moleculares específicas y la poca o nula generación de subproductos, así como para proporcionar explicaciones sobre las propiedades de los productos [58].

Desafortunadamente, las estructuras moleculares de bajo orden conducen a la formación de sólidos amorfos, para los cuales la caracterización molecular suele ser un desafío [59]. Muchas de las técnicas más informadas para dilucidar estructuras moleculares se basan en la

disposición de largo alcance de la molécula, como en DRX. Además, para sistemas con orden de rango corto o medio, se utilizan dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SACX) y dispersión de neutrones de ángulo pequeño (SANS), siendo los resultados cada vez más difíciles de interpretar a medida que aumenta la complejidad de la molécula [60, 61].

La RMN es particularmente útil ya que pocos materiales presentan comportamiento paramagnético, sin embargo, esta técnica se puede ser inconveniente en sistemas complejos debido a la abundancia de interacciones de espín [60, 62]. Entre los informes recientes de nuevas síntesis de polímeros, el PGAL muestra características interesantes como alta solubilidad en agua, propiedades de inhibición de radicales libres, semiconductividad eléctrica y alta termoestabilidad y fotoestabilidad con potenciales aplicaciones en óptica no lineal y biomedicina [42, 45]. El PGAL es un polifenol no tóxico que proviene de la polimerización enzimática del naturalmente abundante ácido gálico (AG) utilizando como catalizador la enzima lacasa de *Trametes Versicolor* en condiciones de proceso no agresivo con el medio ambiente. Este polímero tiene un peso molecular promedio de 6000 Da y es altamente soluble en medio fisiológico permitiendo un efecto citoprotector sobre células tipo fibroblastos que han sido expuestas a radiación UV [46, 63]. El trabajo inicial de Lopez y colaboradores en 2013 [42] muestra una estructura molecular con una propagación del tipo fenil-fenil con moléculas hidroxilo y carboxilo totalmente protonadas. La estructura del PGAL no tiene un orden definido complicando su caracterización por métodos analíticos. La explicación a varias de sus propiedades como la alta solubilidad en agua, la intensa señal en resonancia electrónica de espín (ESR) [63] y su capacidad como semiconductor eléctrico [45]

están lejanos de tener una explicación obvia y requieren de un mayor entendimiento de la estructura química fina de este polímero.

Por lo tanto, este capítulo es una re-examinación y reasignación de la estructura molecular del PGAL y tiene como objetivo esclarecer las razones detrás de algunas propiedades sobresalientes de este polímero. En consecuencia, se presenta una profunda investigación de la estructura química del PGAL mediante acercamientos teóricos y experimentales para demostrar que posee una estructura polianionica y multiradicalaria. El PGAL proviene de una síntesis enzimática, ambientalmente amigable, libre de metales y multi-gram; a diferencia de la mayoría de polímeros radicales que provienen de síntesis química que utiliza catalizadores organometalicos (sales de litio, zinc, rodio, entre otros) [64-66], reactivos halogenados [67] y requiere altas temperatura y solventes tóxicos como medios de reacción (i.e. THF, tolueno) [68, 69].

Materiales y métodos

Materiales

Lacasa de *Trametes versicolor* (LTV, proteína liofilizada almacenada a -20 °C) suministrada por Fluka (USA). El ácido gálico (AG), 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (USA). El alcohol etílico (grado técnico, >99%) fue suministrada por Química Barsa SA de CV (México).

Actividad enzimática de Lacasa de Lacasa de Trametes versicolor (LTV)

La actividad enzimática fue determinada por el método de ABTS donde 50 μ L de solución acuosa de enzima (10 mg/mL) fueron agregados a 2.9 mL de solución de ABTS (9.1 mM) en buffer de fosfatos (pH=5, 100 mM). Las soluciones fueron medidas en un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis (USA) a $\lambda=405$ nm (25 °C). La actividad enzimática unitaria (U) está definida como la cantidad proteína requerida para oxidar 1.0 μ mol de ABTS por minuto a 25 °C y pH=5 ($\lambda=405$ ABTS=36.8 M⁻¹cm⁻¹). La LTV usada en este trabajo tiene una actividad enzimática específica de 2.35 U/g.

Síntesis enzimática de PGAL

El PGAL fue producido siguiendo el procedimiento reportado anteriormente[42] con algunas modificaciones. En un experimento típico, en un matraz ámbar de tres bocas y fondo redondo de 500 mL equipado con un agitador magnético se disuelven 8.5 g de AG en 250 mL de buffer de acetatos (0.25 M, pH=5) con la adición de 20 mL de NaOH (2M). La concentración de oxígeno se mantiene utilizando una bomba de aire Elite 800 (Hagen Inc, Canadá) y se monitorea mediante un sensor Apliens ez-Do (Applikon, USA). Después la enzima LTV es agregada (26.5 U) y la reacción transcurre a 25 °C por 24 horas. El contenido de la reacción es precipitado gota a gota en 2 L de etanol frío (5 °C) manteniendo la agitación. Los sólidos fueron filtrados al vacío (0.45 μ m) y secados en una estufa Stabletemp Cole Palmer (USA) conectada al sistema de vacío Vacuubrand PC3 RZ 2.5 a 10×10^{-4} mbar y 50 °C por dos horas para obtener PGAL en polvo en un rendimiento del 96%.

Protonación del PGAL

100 mg de PGAL fueron disueltos en agua (50 mL) y puestos en un baño de hielo, después HCl (37%, 50mL) fue agregado lentamente y la solución se mantuvo en agitación por 10 minutos a temperatura ambiente. El producto se extrajo con acetato de etilo y la fase orgánica fue separada del solvente mediante evaporación a presión reducida. El agua residual fue co-evaporada con metanol (50 mL) a 60 °C para obtener PGALn en forma de polvo café en un rendimiento del 76%. Alternativamente el residuo de agua se evaporó utilizando la estufa Stabletemp Cole Parmer (USA) conectada al sistema de vacío Vacuumbrand PC3 RZ 2.5 a 10×10^{-4} mbar y 50°C por 2 horas.

Caracterización química

Los espectros de RMN ^1H fueron colectados en espectrómetro Varian MR-400 en D_2O . Los espectros de FT-IR del PGALn y PGAL fueron adquiridos en el equipo PerkinElmer ATR-FTIR Spectrum 400. Las medidas de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) fueron hechas en el cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1210 (USA) equipado con un detector RID en una columna Ultrahydrogel-500 (7.8 x 300 mm, Waters, USA) eluida con agua desionizada que contenía LiCl (0.1 M) como fase móvil a 0.8 mL/min y 30 °C. Se utilizaron estándares de peso molecular de polietilenglicol (PEG) para la calibración de PGALn. Las muestras de PGAL fueron disueltas en la fase móvil (1mg/mL) y filtradas (0.4 μm) antes de inyectarse en el cromatógrafo. Los estudios de resonancia electrónica de espín (ESR) fueron realizados en un equipo Bruker ESR Elexsys E500 equipado con un tubo de cuarzo a temperatura ambiente en un intervalo de 80-4080 G y una frecuencia de microondas de 9.8×10^9 Hz. Los experimentos en solución fueron llevados a cabo a 298 K en etanol y agua para

PGALn y PGAL respectivamente. Para las determinaciones espectrofotométricas, una concentración de DPPH (0.125 mM) fue mezclada con soluciones equimolares de PGALn y PGAL, los espectros y los cambios en la absorción fueron monitoreados en un intervalo de 30s usando un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermoscientific, USA).

Métodos computacionales

Los cálculos de química cuántica fueron realizados dentro del marco de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) a través del programa *Gaussian 09* [70], usando el funcional M06-2X combinado con el conjunto base 6-311++G(d,p) para tomar en cuenta las interacciones no-covalentes, para lo cual el funcional *meta*-GGA M06-2X supera a muchos otros funcionales [71]. Se utilizó un conjunto base amplio que incluyó funciones difusas, ya que esto generalmente mejora la confiabilidad de la descripción de sistemas aniónicos y de capa abierta [72]. Se realizaron cálculos de Hartree-Fock sin restricción (UHF) para los sistemas de capa abierta. Las geometrías fueron optimizadas sin ninguna restricción en la fase gaseosa, y sus frecuencias vibracionales fueron inspeccionadas analíticamente para confirmar que se encontró un verdadero mínimo local de energía. Por razones de consistencia, se estudiaron las energías de excitación vertical TD-DFT en fase gas al mismo nivel de teoría. Las geometrías moleculares iniciales para los polímeros se construyeron y se optimizaron libremente empleando Mecánica Molecular clásica (MM) a través de los módulos *Polymer build* y *Forcite* incluidos en MS8. Las conformaciones resultantes se usaron como punto de partida para una optimización adicional de DFT en el nivel M06-2X/6-311++G(d,p) como se mencionó anteriormente. Se eligió un número de 9 unidades de repetición en la estructura polimérica como una buena relación entre el costo computacional

y la precisión. Se encontró una variación por debajo de 0.01 eV para la transición electrónica de más baja energía (S_0-S_1) después de agregar la última unidad de repetición para PGAL_n usando cálculos de energía a un solo punto (SPE), ratificando la confiabilidad de este acercamiento.

Resultados y discusión

Síntesis y caracterización de los polímeros PGAL_n y PGAL

La investigación de la estructura química del PGAL inició con la hipótesis de que el polímero podría ser una especie multirradicalaria, basados en las observaciones previas de la aparición de una señal de ESR para este polímero [63] además de los reportes previos para el monómero precursor AG, el cual produce un radical estable en condiciones similares [73]. El radical más estable de AG tiene el electrón desapareado en el oxígeno central (i.e. *para*-posicionado al grupo carboxilo) permitiendo su estabilización mediante enlaces de hidrogeno con los grupos hidroxilos vecinales [38]. Por lo tanto, en la reacción básica tanto el PGAL perhidrogenado (PGAL_n) como la forma radicalizada (PGAL) pueden estar presentes como productos, considerando al PGAL en su forma de carboxilato de sodio, como especie dominante [74] de acuerdo a las condiciones de reacción (pH=5) [42]. La figura 4 muestra la síntesis del polímero original soluble en agua (PGAL) a través de la reacción de polimerización de AG catalizada por la enzima lacasa (LTV) [42]. Una primera evidencia de la naturaleza polianiónica del PGAL se obtiene mediante el tratamiento de una solución acuosa del polímero con HCl concentrado, lo que induce la precipitación del polímero en el

medio de reacción. La estructura molecular resultante corresponde a la especie totalmente protonada y neutral, PGALn, que es soluble en disolventes orgánicos.

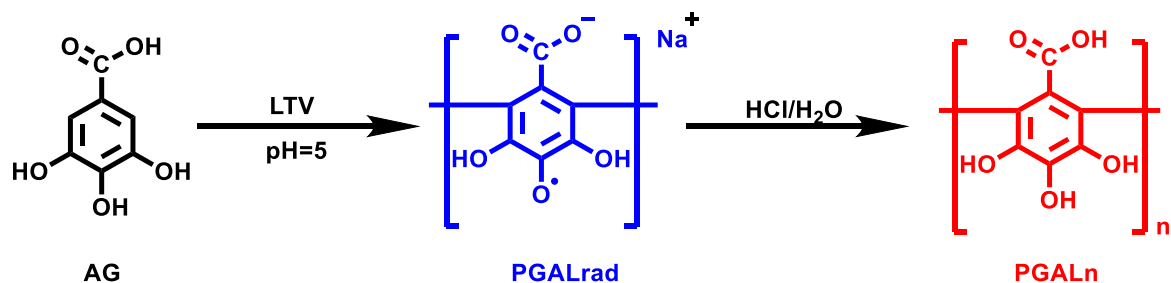


Figura 4. Esquema de síntesis de los polímeros PGAL y PGALn a partir de AG

Espectroscopia infrarroja

El espectro FT-IR(ATR) para ambos polímeros se presenta en la figura 5 y por claridad se asignan solo las señales características. El espectro para el PGAL muestra una señal ancha entre $\tilde{\nu}=3000$ y $\tilde{\nu}=3400$ cm^{-1} asignada a los estiramientos O-H. La ausencia de la vibración típica del estiramiento del carbonilo C=O del ácido carboxílico que usualmente aparece como una banda intensa en el intervalo $\tilde{\nu}=1760$ - 1690 cm^{-1} y la presencia de dos bandas que resuenan en $\tilde{\nu}=1580$ y $\tilde{\nu}=1388$ cm^{-1} asignadas al estiramiento COO⁻ [75], confirman que el PGAL es exclusivamente una especie polianiónica, por lo que la vibración fundamental del enlace C=C en el anillo aromático aparece superpuesta con las bandas de estiramiento del $\tilde{\nu}_{as}(\text{COO}^-)$.

El espectro vibracional para el PGALn confirma que el proceso de protonación fue exitoso, pues aparece la banda característica del estiramiento $\tilde{\nu}(\text{C=O})$ remarcablemente corrida hacia

el azul a $\tilde{\nu}=1721\text{cm}^{-1}$. También aparecen otros modos normales de vibración, incluidos el estiramiento del anillo aromático $\tilde{\nu}(\text{C}=\text{C})$ a $\tilde{\nu}=1615\text{ cm}^{-1}$, el estiramiento de los grupos fenólicos $\tilde{\nu}(\text{C}_{\text{arom}}-\text{OH})$ a $\tilde{\nu}=1040\text{ cm}^{-1}$ y la torción fuera del plano $\delta(\text{OH})$ del grupo hidroxilo alrededor de $\tilde{\nu}=1450\text{ cm}^{-1}$.

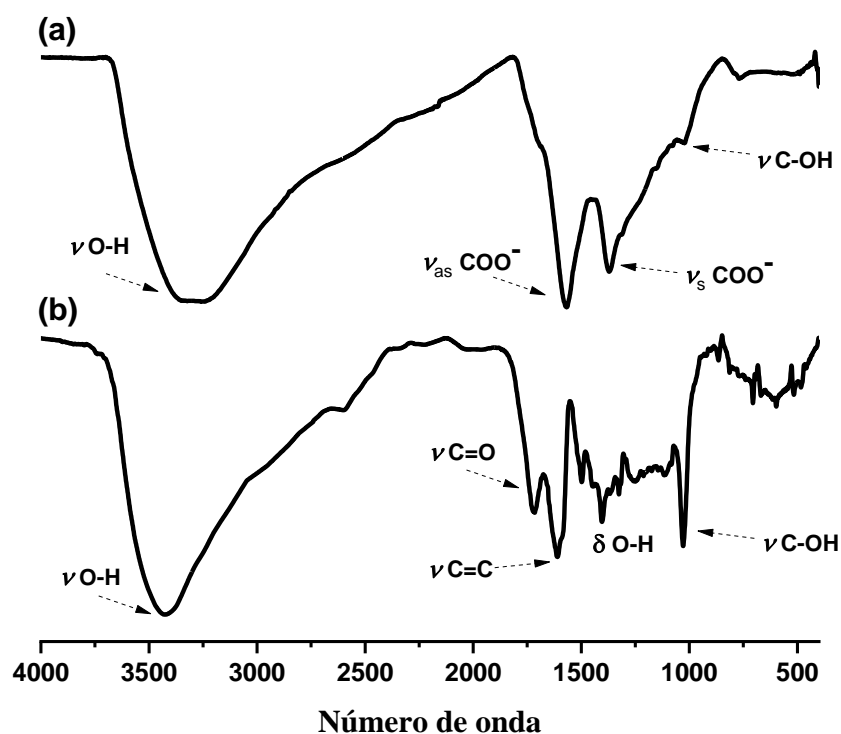


Figura 5. Espectro de infrarrojo (FT-IF(ATR)) para PGAL (a) y PGALn (b)

Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido

Mientras el análisis de las bandas características en espectroscopia de infrarrojo confirma la protonación del PGAL, un cambio en la cantidad de sodio en el polímero debería ocurrir a medida en que este se convierte de la forma de carboxilato de sodio a la forma PGALn protonada neutra. Medir la concentración residual de este metal en la muestra es un desafío,

sin embargo, el microanálisis de rayos X de energía dispersiva (EDX) para ambos polímeros ratifica la hipótesis (Figura 6).

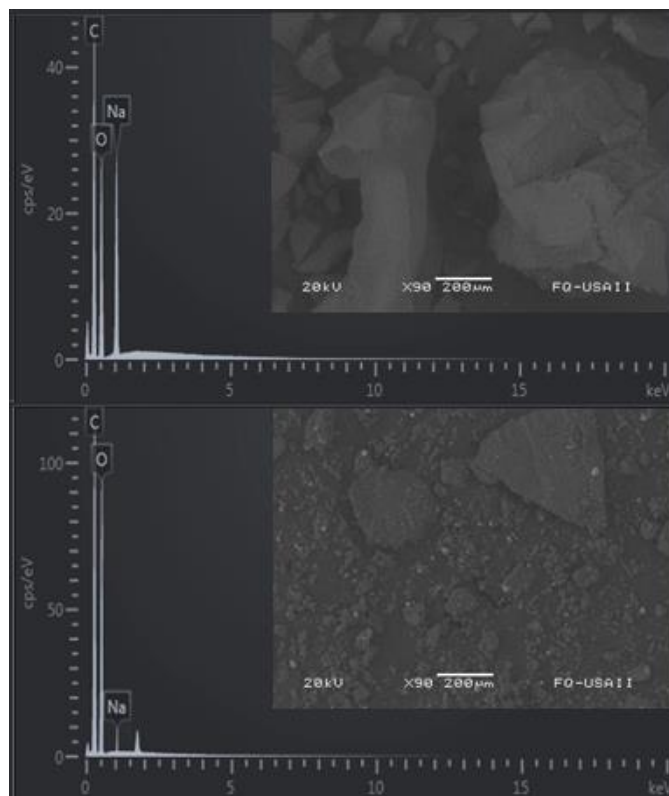


Figura 6. Análisis EDX para PGAL (superior) y PGALn (inferior). La microscopía SEM aparece insertada, para PGAL se observa un orden aparente con formas irregulares, en contraste con PGALn donde hay un evidente cambio de morfología y una disposición irregular del grano.

Como se anticipó, el espectro de EDX de los polímeros muestra que la cantidad de sodio es notablemente más alta para el PGAL que para su derivado perhidrogenado. Esto confirma que el polímero PGAL existe exclusivamente en forma de unidades repetitivas de galato de sodio, debido a las condiciones de reacción. También es evidente que la síntesis de PGALn protonado es exitosa en la medida en que se observa la liberación completa del sodio (Tabla 1).

Tabla 1. Relación de masa para las muestras PGAL y PGALn

Muestra	Elemento	Masa (%)
PGAL	C	45.10±1.32
	O	43.09±2.62
	Na	11.59±1.72
PGALn	C	56.16±3.21
	O	42.75±4.26
	Na	1.9±0.16

La naturaleza multirradicalaria del PGAL

A este punto, la explicación de las observaciones anteriores en resonancia electrónica de espín (ESR) de soluciones de PGAL que se correlaciona con sus propiedades antioxidantes necesita aclaración [63]. Como la señal de ESR surge exclusivamente de electrones no apareados dentro de radicales libres o metales de transición, una explicación plausible para la aparición de esta señal en muestras de PGAL es que el monómero no solo está en forma de galato sino también en forma de radical. La figura 7 muestra el espectro de ESR del PGAL a temperatura ambiente, se observa que el PGAL no presenta estructura hiperfina a diferencia del AG radical [73]. Además del cambio abrupto de la masa molecular del AG al polímero PGAL, esta ausencia de acoplamiento hiperfino es una herramienta invaluable para confirmar no solo el carácter multirradicalario del polímero sino también su conectividad básica, teniendo en cuenta que otras conectividades darían lugar al acoplamiento hiperfino con los hipotéticos hidrógenos magnéticamente activos del anillo de fenilo.

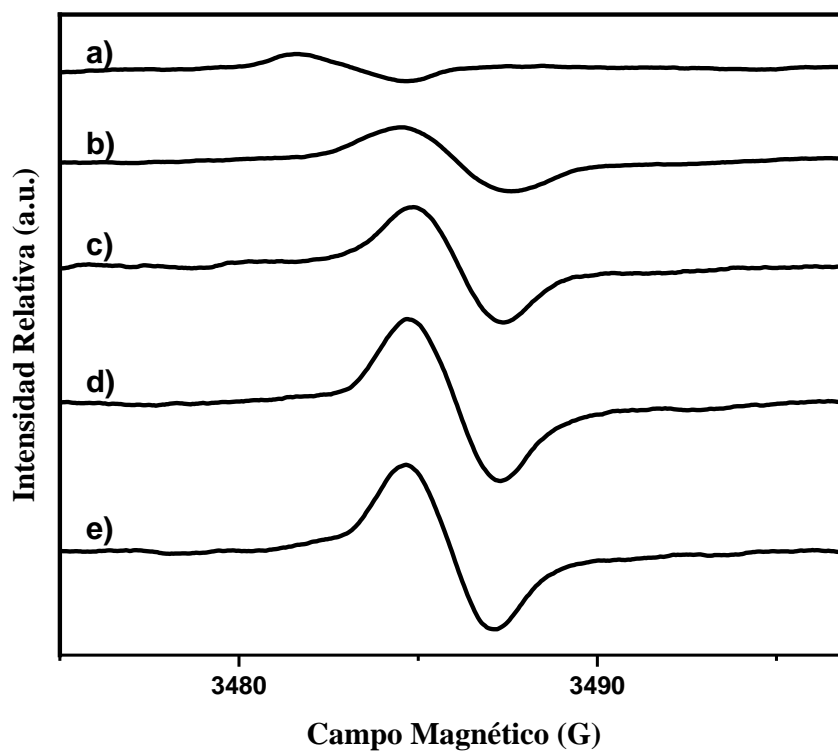


Figura 7. Espectro de ESR para PGAL (a) 0.125mM, (b) 0.25mM, (c) 0.5mM, (d) 0.75mM, (e) 1mM en agua a 298 K. Todas las mediciones son a 9.78 GHz con potencial de microondas de 5mW.

Los valores del factor g de Landé alrededor de 2.00 junto con otros parámetros relevantes obtenidos mediante ESR se muestran en la Tabla 2 y confirman el estado paramagnético del PGAL a temperatura ambiente. Un electrón desapareado en esta molécula se mueve en un orbital altamente deslocalizado, por lo tanto, su contribución al momento magnético es insignificante. Este electrón está esencialmente libre, solo su giro contribuye al momento magnético. Por ello, el factor g de Landé para el PGAL es muy cercano al valor para un electrón libre.

Tabla 2. Factor g de Landé, ancho de línea y número de espín (N_s) de muestras de PGAL.

Concentración (mM) de unidades de repetición (x)	Factor g de Landé	Ancho de banda, ΔH (G)	Número de espín, N_s .
0.125	2.00710	2.66	0.20
0.250	2.00539	2.63	0.24
0.500	2.00522	2.59	0.31
0.750	2.00530	2.54	0.39
1.000	2.00533	2.49	0.46

La alta concentración de espín en la muestra de PGAL (1mM) es quizá la razón del estrechamiento en la señal de ESR. Los datos de ESR muestran que el ancho de la señal disminuye al aumentar la concentración. El número de espín (N_s) que participan en la resonancia se calculó a partir de la siguiente ecuación (1):

$$N_s = 0.285I(\Delta H)^2 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde I es la altura de pico a pico (unidades arbitrarias) y ΔH es el ancho de la señal (G).

Como se mencionó antes, cuando la concentración (x) de PGAL incrementa, la señal de resonancia se vuelve más estrecha y el número de espín incrementa. Es además evidente que la relación entre la concentración y el número de espín es lineal. Cabe destacar que la relación de Rubbins y Bleanny permite calcular el número de espín, los valores del factor g de Landé y el ancho de señal para todas las muestras en este trabajo [76]. Curiosamente, el PGAL es altamente estable a temperatura ambiente y en solución. En este tipo de compuestos, la densidad de espín tiene incluso más deslocalización, evitando la descomposición de los radicales. El magnetismo de los multiradicales no depende de la disposición espacial de las

moléculas, sino de la capacidad de realizar la interacción magnética de muchos grupos radicales a través del espacio o enlaces covalentes [77].

El creciente interés en los años recientes por la generación de polímeros radicales es debido a su potencial uso en baterías, catálisis, materiales electroquímicamente activos, materiales orgánicos magnéticos, agentes biológicos de imagen, entre otros [52, 78, 79]. Hasta ahora hay exitosos acercamientos, incluidos el galvinoxilo, el poli (2,2,6,6 tetrametilpiperidinilo-4-il metacrilato) (PTMA) y el 2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-oxilo (TEMPO), aunque su estabilidad limitada en ambientes iluminados o temperatura ambiente sigue siendo una limitación práctica y, en el caso de PTMA, su toxicidad es una característica restrictiva [80-82]. Por lo tanto, es importante tener en cuenta que las características del polímero multiradical PGAL permanecen sin cambios durante el almacenamiento a temperatura ambiente sin protección contra la luz. Vale la pena señalar que las muestras de PGAL exhiben señales idénticas después de dos años, por lo que el PGAL es notablemente estable, lo que sin duda abre un campo muy amplio de aplicaciones incluso como estándar en el análisis de ESR. Una vez protonado, el polímero resultante (PGALn) muestra un espectro de ESR plano incluso para la concentración más alta de polímero, lo que confirma una conversión limpia de la especie multiradicalaria a la especie completamente protonada, (Apéndice A-59). La absorción UV-Vis en solución también confirma estas observaciones entre las especies PGAL y PGALn (Figura 8). Los desplazamientos máximos de absorción son de alrededor de 100 nm cuando se pasa de PGAL a PGALn y curiosamente, se puede volver al estado multiradicalario desde la especie PGAL protonada cuando se trata con una cantidad equimolar del radical DPPH, concomitantemente, los máximos de absorción del

PGALn+DPPH son prácticamente idénticos a PGAL con una diferencia mínima (20 nm) que se atribuye al cambio de disolvente. Además, hay un cambio drástico en la solubilidad una vez que tiene lugar la protonación completa de PGAL a PGALn, pues mientras que el PGALn es soluble en medios orgánicos, el PGAL es soluble en agua,

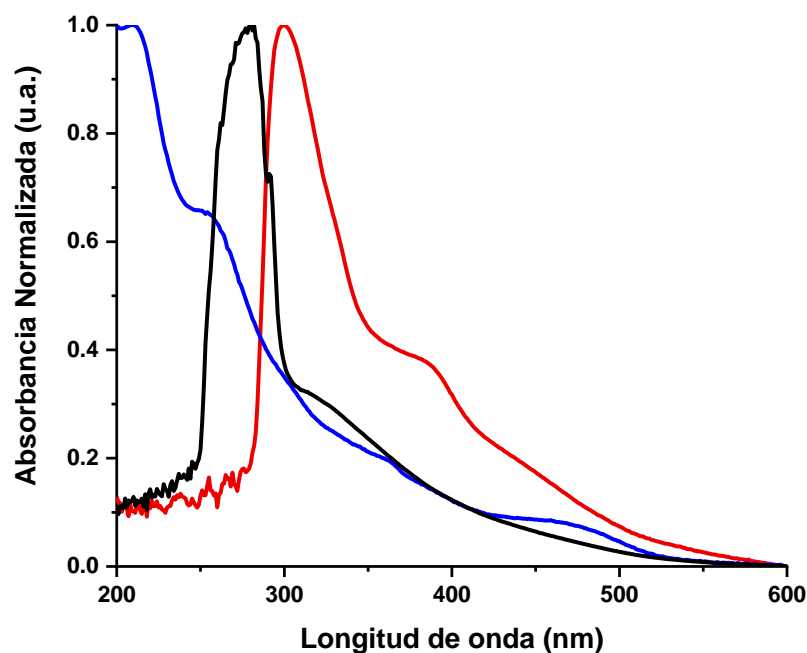


Figura 8. Espectro UV-vis para PGAL en agua (rojo), PGALn en metanol (azul), PGALn+DPPH en metanol (negro).

Una de las propiedades más destacadas de los polifenoles es su capacidad para estabilizar a los radicales libres por lo que una gran cantidad de literatura se centra en el estudio y la determinación de la capacidad antioxidante de estas moléculas. La capacidad antioxidante del polímero multirradical y de la especie completamente protonada se analizó mediante el método del radical DPPH. Para PGAL (Figura 9) hay una disminución de la banda de

absorción a $\lambda = 515$ nm que corresponde al coeficiente de extinción del electrón no apareado del radical DPPH acompañado de un aumento de la banda a $\lambda = 426$ nm con un claro punto isobéstico a $\lambda = 486$ nm. La banda de absorción a $\lambda = 426$ nm se debe a la reducción de un solo electrón DPPH[•] para formar la especie aniónica reducida (DPPH⁻) [83, 84]. Por lo tanto, PGAL actúa como antioxidante a través del mecanismo de transferencia de un solo electrón (SET) [77].

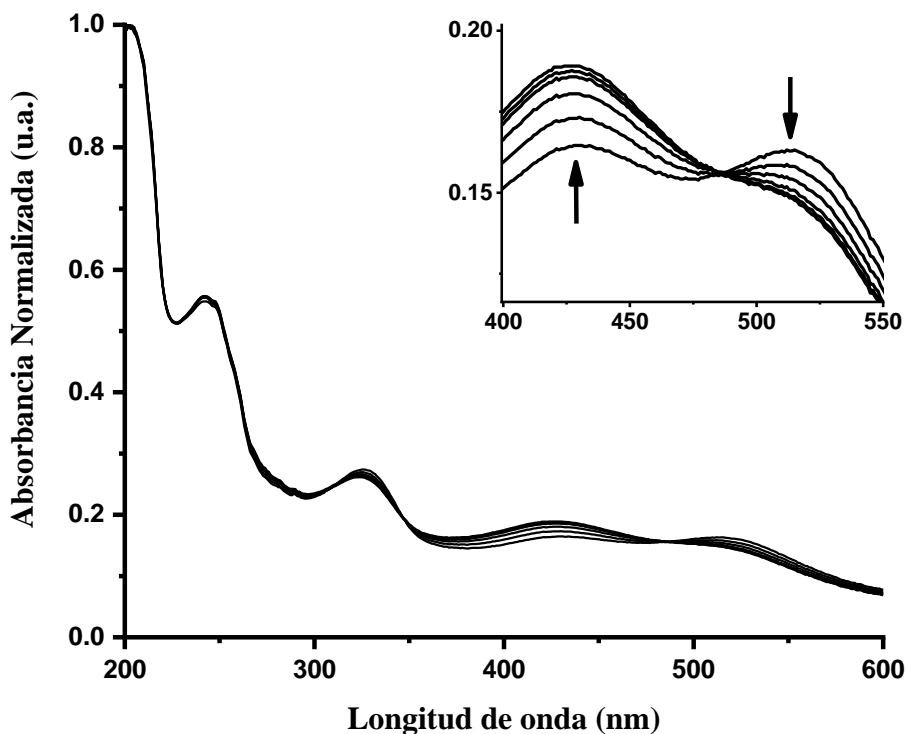


Figura 9. Espectro UV para PGAL (10ppm) en presencia de DPPH[•]. Intervalo: 30 s.

Para el polímero protonado se espera que la banda de absorción a $\lambda = 515$ nm disminuya de la misma manera que para el PGAL pero en este caso la banda a $\lambda = 526$ nm (línea roja) está

ausente (Figura 10). Esto sugiere que la forma reducida DPPH-H proviene de la transferencia de un átomo de hidrógeno del PGALn al radical (HAT). Por lo tanto, aunque ambas especies del polímero muestran capacidad antioxidante, es evidente que actúan a través de diferentes mecanismos.

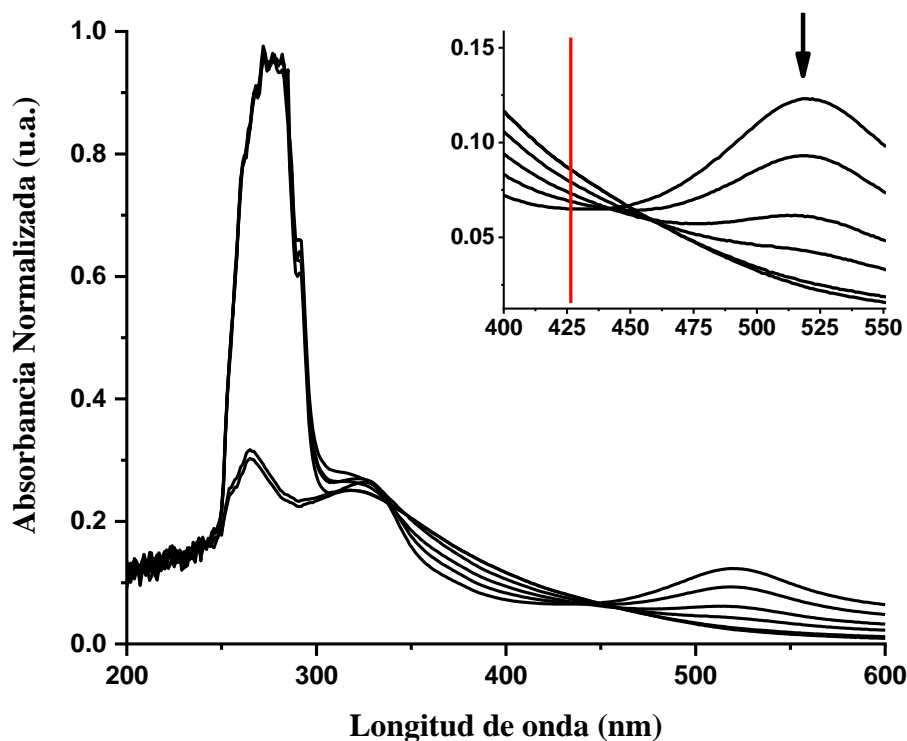


Figura 10. Espectro UV para PGALn (10 ppm) en presencia de DPPH*. Intervalo: 30 s.

Estudios teóricos sobre los polímeros PGALn y PGAL.

Los monómeros AG y AGrad.

Después de la discusión anterior sobre las especies esperadas para este polifenol, se consideró tanto AG como el radical galato de sodio (GALrad). De esta manera, las propiedades

calculadas para el modelo GALrad se correlacionan mejor con las de las especies poliméricas experimentales y teóricas. La Figura 11 muestra las geometrías optimizadas obtenidas para las moléculas AG y AGrad donde la predicción es estrictamente plana con una clara pérdida de aromaticidad a medida que el AG se oxida a AGrad.

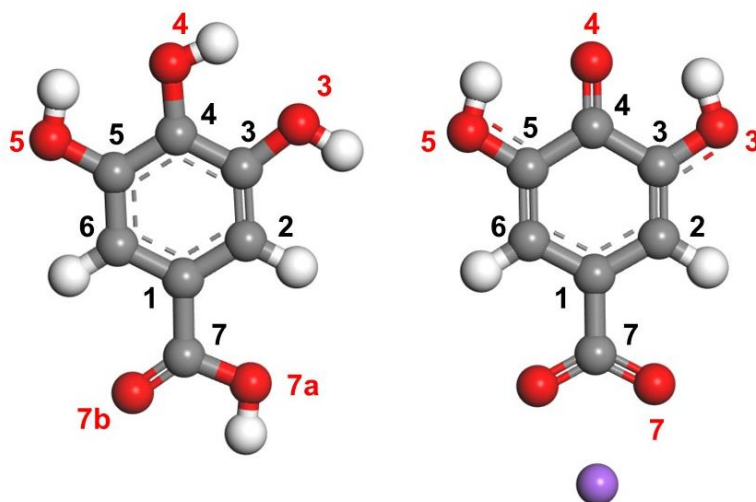


Figura 11. Geometrías de equilibrio en fase gaseosa obtenidas para los monómeros de ácido gálico (izquierda) y radical galato (derecha) en el nivel de teoría M06-2X / 6-311 ++ G (d, p).

La Tabla 3 resume las distancias interatómicas correspondientes, representando enlaces C2-C3, C5-C6 y C4-O4 notablemente más cortos en AGrad en comparación con AG, que según estos resultados es aromático. Dichos datos son indicativos de dobles enlaces alternados que involucran a estos átomos, con el consiguiente carácter semiquinoide para AGrad.

Tabla 3. Distancias interatómicas relevantes (en Å) para el ácido gálico (AG) y el radical galato (AGrad), calculado en el nivel de teoría M06-2X / 6-311 ++ G (d, p) en el vacío.

	AG	AGrad
C1-C2	1.396	1.404
C2-C3	1.384	1.373

C3-C4	1.392	1.453
C4-C5	1.394	1.453
C5-C6	1.387	1.373
C1-C6	1.392	1.404
C3-O3	1.368	1.336
C4-O4	1.359	1.248
C5-O5	1.353	1.336
C1-C7	1.484	1.513
C1-Na	-	2.481

Los espectros electrónicos calculados para estos monómeros muestran un desplazamiento batocrómico significativo de 74 nm cuando se pasa de AG a AGrad (Apéndice A-60). La discusión posterior muestra que este desplazamiento batocrómico está en buen acuerdo con nuestras mediciones experimentales de UV-Vis para PGAL neutral y multirradical. Vale la pena señalar que el método computacional reproduce con precisión el máximo de absorción de AG, que es de alrededor de $\lambda = 260$ nm [85], ratificando así la confiabilidad de nuestro enfoque computacional. Para AG, el primer estado excitado está poblado principalmente por transiciones HOMO/LUMO y HOMO-1/LUMO. Por otro lado, el máximo de absorción desplazado hacia el rojo de AGrad se debe principalmente a una transición SOMO-3/SOMO, permitida ya que la multiplicidad del estado fundamental (doblete) de esta especie no se altera como consecuencia de esta transición electrónica. Mediante un análisis de orbitales naturales de enlace (NBO), que provee una descripción localizada de los Orbitales Moleculares (MO) involucrados, pudimos caracterizar estos procesos como excitaciones locales π - π^* dentro de los anillos de fenilo de ambas especies. La Figura 12 muestra la distribución de densidad de espín sobre AGrad, que muestra una contribución no significativa del grupo carboxilo (C7, O7) a la densidad de espín y una contribución predominante de los oxígenos O3, O4 y O5 y

de los carbonos anulares, todo lo cual está de acuerdo con la estructura semiquinoide del estado fundamental del AGrad como se discutió anteriormente. La Figura 12 muestra la Densidad de Estados Parcial (PDOS) para esta especie, lo que indica una contribución dominante de estos átomos al orbital α -spin SOMO, confirmando la distribución de densidad de espín propuesta en el estado fundamental.

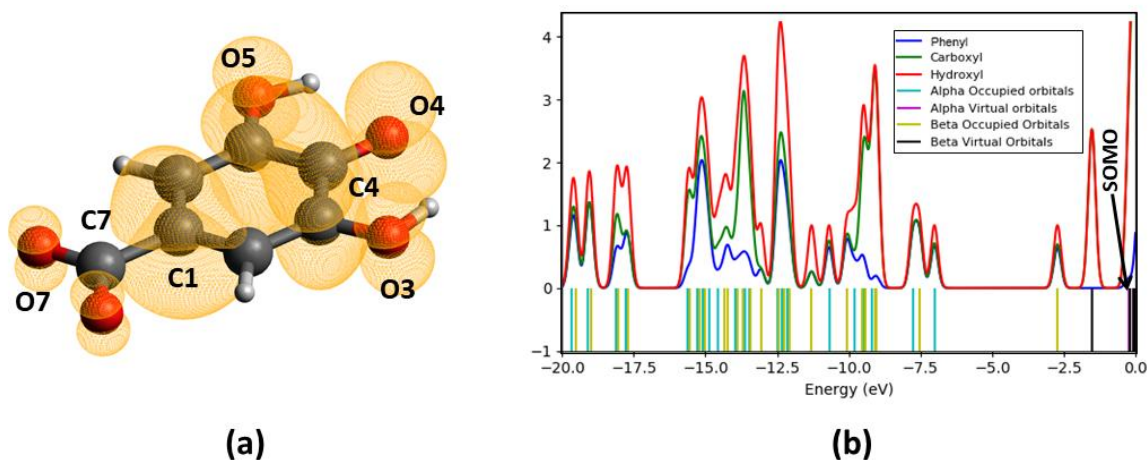


Figura 12. (a) Distribución de densidad de espín y (b) diagrama PDOS para el radical galato en el nivel de teoría M06-2X / 6-311 ++ G (d, p). Aquí, "fenilo" se refiere a C1-C6, "hidroxilo" a O3-O5 y "carboxilo" a C7 y O7.

Estudios estructurales y conformacionales de los polímeros PGAL_n y PGAL.

El modelado computacional de los polímeros PGAL_n y PGAL produjo conformaciones estables a través de una combinación de Mecánica Molecular y cálculos DFT para oligómeros con nueve unidades repetitivas. Sus geometrías (longitudes de enlace, ángulos) se optimizaron sin imponer ninguna restricción, seguido de una inspección de sus frecuencias vibratorias para confirmar esos modelos como verdaderos estados estacionarios. Las

geometrías de equilibrio resultantes se encuentran en la Figura 13, donde el método predice una disposición helicoidal interesante para ambos polímeros.

A diferencia del monómero AGrad, tanto en PGAL_n como en PGAL varias unidades repetidas muestran los grupos laterales -OH (O3, O5) junto al oxígeno central (O4) orientado hacia el carboxilato/carboxilo de la siguiente unidad. Esto sugiere que dicha disposición espacial se debe a enlaces de hidrógeno intramoleculares (HB), que ocurren entre un donador de HB fuerte (OH) y aceptores de HB fuertes (CO₂H/CO₂⁻), con una corta distancia D...A (2.6 - 2.8 Å) y un ángulo O-H...A amplio (aprox. 160 °) (Apéndice A-61).

Para confirmar y obtener más información sobre la naturaleza de los enlaces los HBs mencionados anteriormente en los polímeros, realizamos un análisis topológico de las densidades electrónicas de modelos reducidos de los polímeros (es decir, el sistema submolecular mínimo que contiene los HB) en el marco de la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM). Esto constituye un método robusto y confiable para abordar las interacciones supramoleculares en fases gaseosas o condensadas [86, 87].

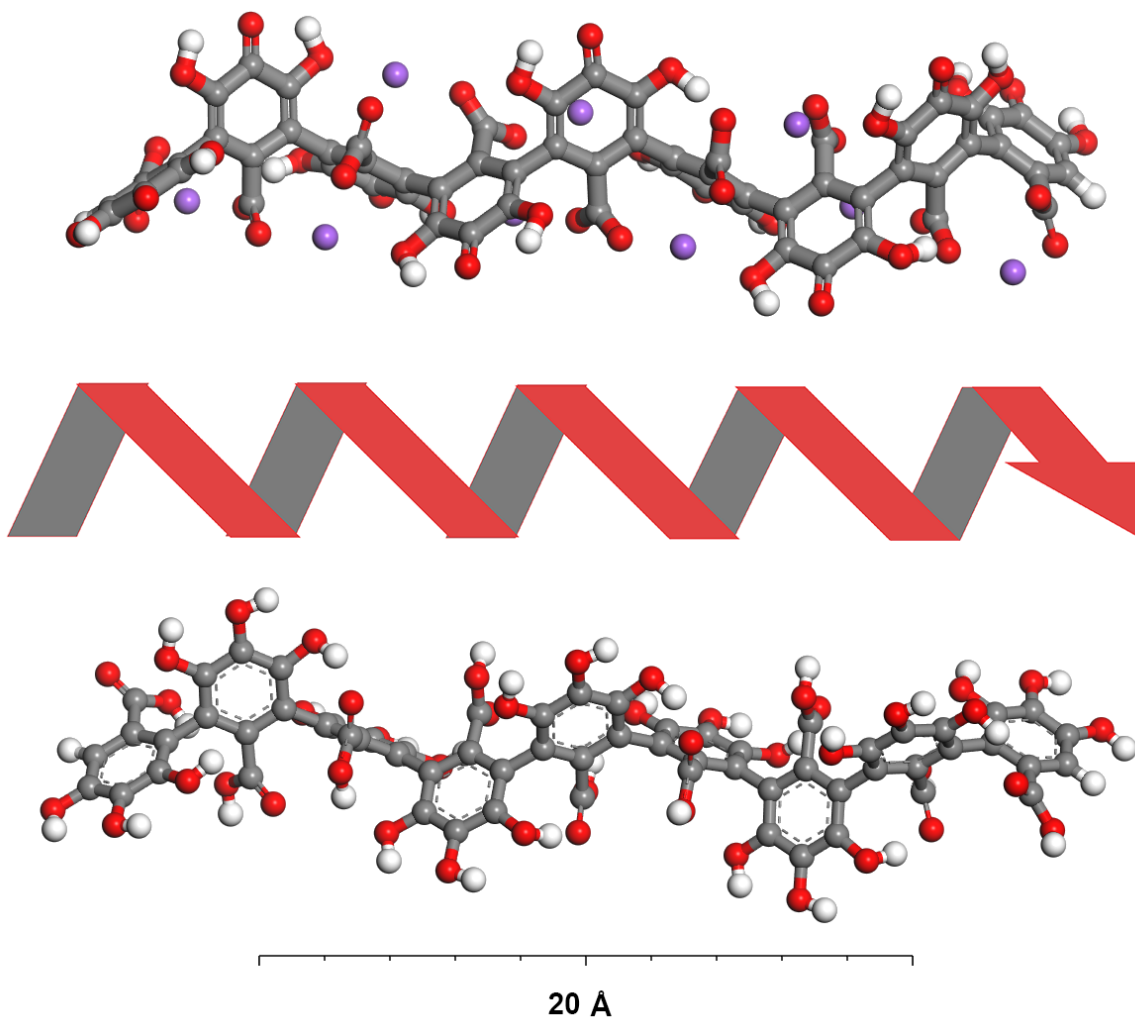


Figura 13. Geometrías optimizadas para oligómeros ($n = 9$) de PGAL (arriba) y PGAL n (abajo) en el nivel de teoría M06-2X/6-311++G(d,p) en el vacío.

Los resultados en la Figura 14 muestran dos puntos críticos de enlace (BCP) relevantes, el primero dentro de la ruta de enlace entre el hidroxilo de una unidad repetida y el carboxilato/carboxilo de su vecino (BCP-1A para PGAL n y BCP-1B para PGAL) y el segundo (BCP-2) entre un hidroxilo y el oxígeno radicalario central (O3) en PGAL. El hallazgo de estos BCP confirma la presencia del HB propuesto en la estructura molecular de estos polímeros. Estos HB-1A/HB-1B se producen entre monómeros y explican

razonablemente la disposición helicoidal de ambas moléculas y HB-2 para el enlace de hidrógeno dentro de una unidad repetitiva en PGAL, que debería desempeñar un papel importante en la estabilización de esta especie multirradical.

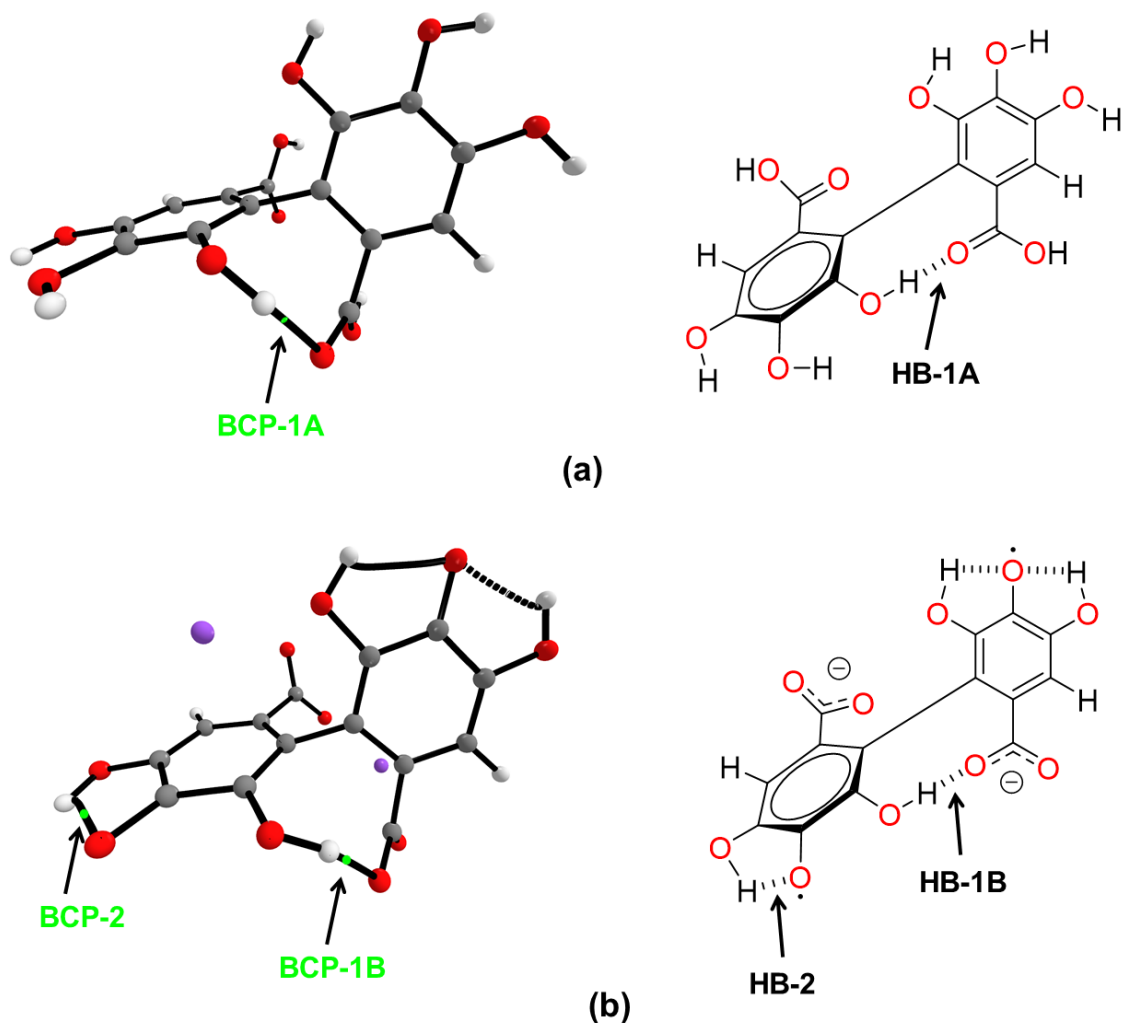


Figura 14. HB intramolecular dentro de modelos reducidos de (a) PGAL_n y (b) PGAL como se evidencia a través de un análisis topológico QTAIM en el nivel de teoría M06-2X/6-311++G**. Los puntos críticos de enlace relevantes (BCP) aparecen como esferas de color verde pálido a través de caminos de enlace.

Sin embargo, es particularmente intrigante que nuestros cálculos electrónicos predicen una preferencia en PGAL para estabilizar HB-1B en lugar de estabilizar aún más el radical a través de una segunda interacción HB-2. Esto nos llevó a calcular la energía de estas interacciones escaneando la superficie de energía potencial (PES) de estos polímeros al aumentar las variaciones de 15° del ángulo de torsión C2-C3-O3-H3 (Figura 15). Allí, hay un mínimo global (Punto A) cuando la torsión alcanza $40-45^\circ$, lo que confiere la geometría más favorable (lineal) para los enlaces de hidrógeno HB-1A/HB-1B. Al comparar con la energía de la geometría inicial sin HBs a $\theta = 0^\circ$, una notable estabilización de 11 kcal/mol para PGAL y 5 kcal/mol para PGALn se atribuye a la energía de HB-1B y HB-1A interacciones, correspondientemente. La marcada diferencia entre ambos valores es una consecuencia de que el carboxilato al ser aniónico en PGAL es un aceptor de HBs más fuerte en comparación con el grupo COOH neutro en PGALn. Los máximos globales (puntos B y B') en estas curvas de PSA son alrededor de 110° para PGAL y 180° para PGALn, lo que se explica por la repulsión electrostática entre O3 y O7 para PGAL y la repulsión estérica entre H-3 y H-4 en PGALn. Finalmente, la PES para PGAL alcanza un segundo mínimo (Punto C) debido a la presencia de HB-2, con una contribución neta de 3 kcal/mol. Estos resultados apuntan hacia una profunda estabilización de estas geometrías moleculares debido a las interacciones HB-1A/HB-1B que deberían ser aún más pronunciadas debido a los efectos cooperativos ocurriendo en toda la geometría helicoidal.

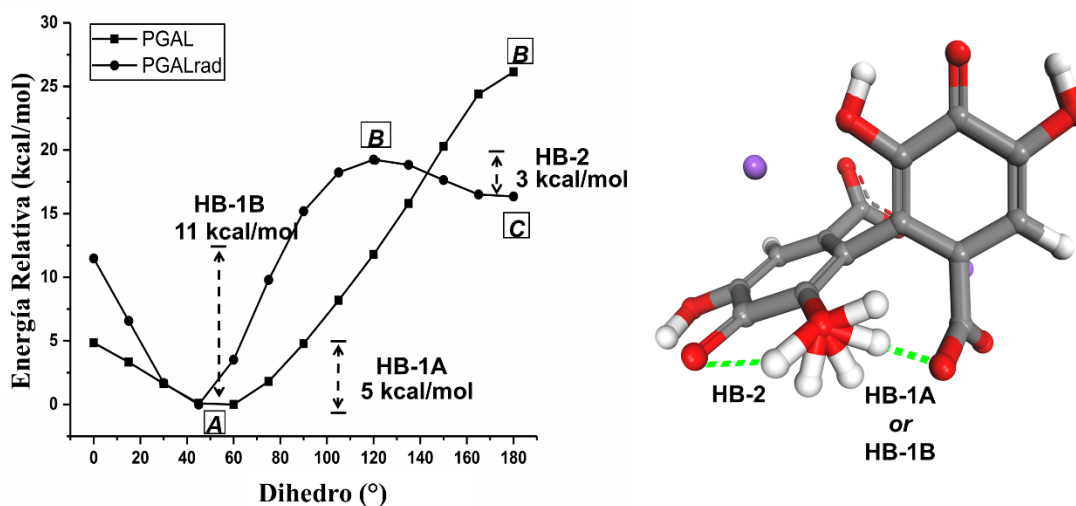


Figura 15. Energía de los enlaces de hidrógeno intramoleculares (HB) dentro de PGALn y PGAL a partir de escaneos de energía a través del ángulo diédrico C2-C3-O3-H3 para modelos reducidos de ambos polímeros en el nivel de teoría M06-2X / 6-311 ++ G (d, p). Los puntos críticos relevantes de estas superficies de energía potencial aparecen con letras en cursiva.

Espetros vibracionales y electrónicos computados.

Una comparación entre los espectros electrónicos experimentales y computacionales de PGALn y PGAL mostró que tanto el desplazamiento rojo experimental de ca. 70 nm cuando se pasa de PGALn a PGAL (ver arriba) y las energías de excitación vertical para ambas especies concuerdan con nuestros cálculos en el nivel de teoría M06-2X/6-311 ++ G (d, p) (Tabla 4). Los efectos de los disolventes se descartaron en nuestro cálculo para ganar consistencia con los datos experimentales, que se midieron en diferentes disolventes debido a la solubilidad ampliamente divergente de estos materiales. Aunque de pequeña magnitud, la mayor desviación obtenida para PGAL puede indicar una fuerte influencia del disolvente en estas transiciones o un carácter multiconfigurativo significativo para esta especie.

Tabla 4. Energías de excitación vertical (eV) experimentales y calculadas (M06-2X/6-311++ G **, vacío) al máximo de absorción para PGALn y PGAL.

	M06-2X/6-311++G(d,p) ^a	Experimental
PGALn	5.0	4.93 (en metanol)
PGAL	3.85	3.34 (en agua)

El buen acuerdo entre los resultados teóricos y experimentales confirmó las estructuras moleculares propuestas y nos permitió caracterizar estas transiciones electrónicas como transiciones locales π - π^* dentro de los anillos de fenilo de las unidades de repetición en ambos polímeros, muy similar a la de los monómeros AG y AGrad. Aparte de los hombros observados experimentalmente a ca. $\lambda = 350$ nm y $\lambda = 400$ nm para PGALn y PGAL debido a una alta degeneración de la estructura del estado fundamental a medida que crecen los polímeros, los espectros electrónicos de estos polímeros no tienen cambios en comparación con los monómeros AG y AGrad, que es el resultado de la marcada falta de planaridad en estas moléculas, ya que los amplios ángulos de torsión de aproximadamente 105° predichos entre monómeros vecinos impiden la comunicación electrónica entre los sistemas π de dos anillos de fenilo adyacentes. En consecuencia, el espectro electrónico de PGALn y PGAL se aproxima a la repetición periódica de la absorción electrónica de sus monómeros.

Una confirmación adicional de la estructura molecular de los polímeros PGALn y PGAL es el buen acuerdo entre las frecuencias vibratorias calculadas y experimentales para estos polímeros. Sorprendentemente, los espectros teóricos reproducen con una precisión sobresaliente el desplazamiento al rojo de 150 cm^{-1} para el estiramiento asimétrico C = O al pasar de PGALn a PGAL (Figura 16), de acuerdo con estructuras moleculares neutras y

aniónicas. Además, los espectros calculados concuerdan con el extendido aleteo del –OH (1250-1500 cm^{-1}) claramente presente en el PGALn perhidrogenado como consecuencia de la protonación del radical carboxilato y fenoxilo O.

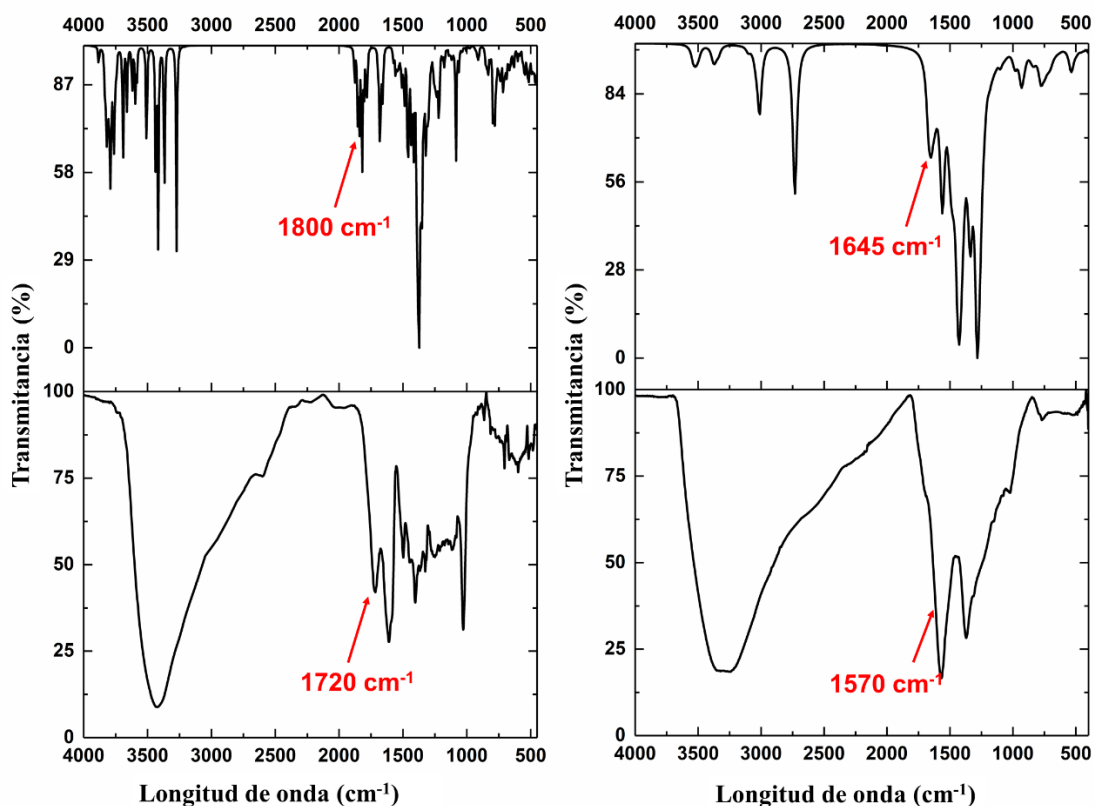


Figura 16. Espectros vibracionales computados (M06-2X/6-311 ++ G **, superior) y experimentales (FT-IR/ATR, inferior) para PGALn (a) y PGAL (b). Se indican los valores para el estiramiento asimétrico C = O.

Conclusiones

Siguiendo un enfoque teórico-experimental, se ha establecido con éxito la estructura molecular del PGAL mediado por enzimas. Esta contribución demuestra que el polímero tiene una naturaleza multirradicalaria y polianiónica. Como multirradical, PGAL tiene varias

características atractivas, como alta solubilidad en agua, síntesis verde escalable, estabilidad térmica, estabilidad fotoquímica y es estable en condiciones ambientales. De acuerdo con la Mecánica Molecular y los cálculos de DFT, su carácter multirradical se estabiliza en gran medida gracias a una red extendida de enlaces de hidrógeno con energías de interacción en el régimen de 3 a 11 kcal/mol, lo que resulta en una intrincada topología molecular helicoidal. Los estudios de ESR confirman la estabilidad de este polímero, que cambia de una especie completamente protonada por reacción con el radical libre DPPH y, en consecuencia, la inhibición de radicales libres sigue un mecanismo de transferencia de un solo electrón (SET) para la especie multirradicalaria. Se está trabajando en nuestro laboratorio para realizar más estudios espectrocinéticos para los mecanismos antioxidantes del polímero y para explorar aplicaciones novedosas para este material como multirradical.

CAPÍTULO 4. CRECIMIENTO DE CÉLULAS EPITELIALES EN PELÍCULAS DE POLI(ÁCIDO GÁLICO) RETICULADO CON CARBOXIMETILCELULOSA.

Perspectivas del capítulo:

El PGAL obtenido mediante la polimerización enzimática del AG, se retículo con éxito a la carboximetilcelulosa (CMC) utilizando ácido cítrico como agente de entrecruzante. Se prepararon películas con el copolímero resultante y se evaluó su biocompatibilidad *in vitro*. Las películas producidas fueron caracterizadas mediante pruebas mecánicas, permeabilidad al vapor de agua, ángulo de contacto y actividad antioxidante mediante resonancia electrónica de espín; los resultados fueron apropiados para la proponer al material como conveniente para la regeneración de la piel. Las películas también se descompusieron en condiciones fisiológicas utilizando soluciones amortiguadoras universales a pH 3, 7 y 10. Los experimentos *in vitro* con células del tipo fibroblastos y epiteliales mostraron buena adhesión y proliferación en las láminas de PGAL-co-CMC. En consecuencia, estos biomateriales pueden considerarse películas novedosas biocompatibles y biodegradables con alta capacidad de respuesta para aplicaciones biomédicas o de ingeniería de tejidos.

Introducción

Los biomateriales compuestos de polímeros de fuentes naturales encontraron aplicaciones en la ingeniería de tejidos debido a su buena biocompatibilidad, respuestas superiores, pocos efectos secundarios y reducción o incluso supresión de tratamientos secundarios o cirugías [5, 88-91]. Además, también se estudian en neurología, imagen médica, medicina biónica, biomecánica o biotecnología [92]. En general, la mejora de las propiedades de estos

biomateriales para cumplir con los requisitos de una aplicación biomédica específica incluye propiedades mecánicas adecuadas, estabilidad en ambientes acuosos, propiedades de barrera al vapor y biocompatibilidad celular, todo esto concomitantemente con la reproducibilidad sintética en ausencia de procesos tóxicos y reactivos [92, 93]. En este sentido, el uso de ácidos carboxílicos no tóxicos como agentes de reticulación entre dos o más cadenas principales de polímeros, como el ácido cítrico (AC), demostró ser exitoso para proporcionar materiales para ingeniería de tejidos con biocompatibilidad superior en comparación con los derivados de otros reticulantes citotóxicos, tales como glutaraldehído o formaldehído [94]. Entre las matrices de polímeros estudiadas, los enfoques que utilizan a la celulosa naturalmente abundante y sus derivados son alentadores debido a sus bajos costos y disponibilidad, además de una buena biocompatibilidad. Específicamente, las carboximetilcelulosas (CMC) solubles en agua tienen múltiples usos biomédicos, como en cirugías de corazón, pecho y córnea, además de aplicaciones ortopédicas y farmacéuticas, entre otras [95, 96].

Por otro lado, los polifenoles extraídos de las plantas han atraído un gran interés en el campo biomédico, especialmente debido a su actividad de inhibición de radicales (RSA) y su capacidad antimicrobiana. Los radicales libres interaccionan dentro de las células y conducen al daño de proteínas, membranas y genes y, además, el estrés oxidativo generado por las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS) está involucrado no solo en los procesos de curación de heridas sino también en otros síndromes metabólicos y procesos inflamatorios [33, 37, 97]. Por lo tanto, la preparación de matrices con actividad antioxidante para proteger las células y los tejidos del daño oxidativo se ha logrado mediante la incorporación de moléculas captadoras de radicales oxidantes, por ejemplo, formas solubles en agua de

vitamina B6 (piridoxina, piridoxal y piridoxamina), y pequeños polifenoles como los ácidos cumárico y cafeico [98, 99]. No obstante, las características en la mayoría de los extractos de polifenoles naturales, especialmente su baja estabilidad molecular frente a la temperatura o la radiación UV, así como su alta hidrofobicidad o sus extracciones limitadas en grandes cantidades restringen su biodisponibilidad y procesabilidad; por lo tanto, sus modificaciones juegan un papel importante para producir derivados sintéticos con características adecuadas y factibilidad de ampliación [100]. Las modificaciones mediadas por enzimas ofrecen condiciones de proceso ambientalmente favorables y suaves que dan como resultado productos no tóxicos [41, 101]. La glicosilación o esterificación de antioxidantes vegetales demostró ser exitosa para estos propósitos [102, 103]. Además, la polimerización oxidativa de fenoles usando oxidoreductasas se ha estudiado para lograr nuevas estructuras y funcionalidades macromoleculares [43, 104]. Recientemente hemos informado la polimerización del naturalmente abundante ácido gálico (AG) mediada por la lacasa de *Trametes versicolor* en condiciones de proceso moderadas para lograr un nuevo poli(ácido gálico) semiconductor eléctricamente (PGAL) [42]. Este polímero presenta una estructura molecular controlada con enlaces fenil-fenil y un peso molecular promedio en número de aprox. 7,000 Da, que pueden variar según las condiciones sintéticas, y lo que es más importante, este PGAL sintetizado enzimáticamente presenta una alta solubilidad en agua, lo que permite una procesabilidad inocua. Sin embargo, la rigidez de PGAL no permitió la formación de película por sí mismo. En el presente capítulo, el PGAL se retícula con CMC usando AC como agente de reticulación mediante una metodología no tóxica [105, 106]. Este nuevo material (PGAL-co-CMC) muestra características fisicoquímicas adecuadas para la

ingeniería de tejidos. El poder antioxidante de las películas PGAL-co-CMC se demostró mediante resonancia electrónica de espín (ESR) en estado sólido, la actividad antimicrobiana tanto para PGAL como para las películas se evaluó mediante el estudio de la inhibición de cepas bacterianas patógenas comunes en hospitales. Para evaluar su potencial como biomaterial para la regeneración del tejido de la piel, se estudió la viabilidad células epiteliales en las películas de PGAL-co-CMC producidas.

Materiales y métodos

Materiales

LTV (proteína liofilizada almacenada a -20 °C) se compró a Fluka (USA). Ácido Gálico (AG), ABTS, glicerol (Gli), DPX montante para histología y 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (USA). CMC (sal de sodio) fue suministrada por Química Hércules SA de CV (México). Ácido cítrico (AC), cloruro de calcio, fosfato de sodio monobásico e hidróxido de sodio fueron adquiridos de JT Baker México. El alcohol etílico (grado técnico > 99%) fue suministrado por Química Barsa SA de CV (México). PGAL mediado por enzimas se produjo como se informó anteriormente (capítulo 3) [42] con un rendimiento del 96% ($M_n = 5800$ Da, PDI = 1.1).

Entrecruzado de PGAL con CMC usando AC

En un experimento típico; se disolvió CMC (1 g) en 50 mL de agua a 80 °C bajo agitación en un matraz de fondo redondo de 100 mL. Luego, se realizaron experimentos con diferentes cantidades de PGAL; 5, 10 y 15% en peso con respecto a CMC. Luego, se añadieron 6.5×10^{-3} mol (1.25 g) de AC y 30 mg de fosfato de sodio monobásico a la solución agitada y se

dejó reaccionar durante 2 h a 80 °C. Se añadió glicerol en diferentes proporciones de 2, 3 y 4 % en volumen (base húmeda) y se agitó a 80 °C durante 15 minutos más. Los contenidos de reacción se vertieron en placas de Petri de polietileno (25 mL por muestra) y se secaron a temperatura ambiente hasta la evaporación completa del disolvente. Las películas se retiraron de las placas de Petri y se neutralizaron para eliminar el exceso de AC antes de los estudios de viabilidad celular.

Caracterización química

Los espectros de $^1\text{H-NMR}$ se registraron en un espectrómetro Varian MR-400 en D_2O . Los espectros FT-IR de las películas PGAL y PGAL-*co*-CMC se adquirieron en un instrumento Perkin-Elmer ATR-FTIR Spectrum 400. Las mediciones de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se realizaron en un aparato de cromatografía líquida Agilent serie 1210 (USA) equipado con un detector RID y una columna Ultrahydrogel-500 ($7,8 \times 300$ mm, Waters, USA), las muestras fueron eluidas con agua desionizada que contiene LiCl (0,1 M) como fase móvil a 0.8 mL/min y 30 °C. Se usó polietilenglicol (PEG) de peso molecular estrecho como estándar para la calibración de PGAL. Los estándares de pululano se utilizaron para CMC. Las muestras se disolvieron en la fase móvil (1 mg/mL) y se filtraron ($0,45 \mu\text{m}$) antes de la inyección en el cromatógrafo. La ESR en estado sólido para PGAL y las películas de PGAL-*co*-CMC se realizaron en un equipo Bruker EPR Elexsys E500 con PGAL (100 mg) o secciones de películas PGAL-*co*-CMC colocadas en un tubo de cuarzo a temperatura ambiente en el rango de campo magnético 80-4080 G y frecuencia de microondas de $9,8 \times 10^9$ Hz.

Densidad de entrecruzado

Se permitió que las muestras se hincharan en agua desionizada a temperatura ambiente y se controló el cambio de peso hasta el volumen de equilibrio de hinchamiento (V_s) después de 48 h se midió la densidad por desplazamiento de tolueno puro en un picnómetro (Brand, Alemania) usando la Ecuación 2 [107].

$$V_s = \frac{W_{mt} - W_t}{\rho_t} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde W_{mt} es el peso de la matriz hinchada más el peso del picnómetro lleno de tolueno de densidad ρ_t y W_t es el peso del picnómetro una vez que la muestra desplazó el tolueno.

Luego, la relación de hinchamiento de equilibrio (Q_m) se determinó mediante la Ecuación 3.

$$Q_m = \frac{V_s}{V_p} = \frac{V_s \rho_p}{W_p} = \frac{1}{v_{2m}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde V_p es el volumen de la matriz polimérica no hinchada, W_p y ρ_p son el peso y la densidad anhidra del polímero, y v_{2m} es la fracción de volumen del polímero en la hinchazón de equilibrio.

La ecuación de hinchamiento de Flory-Huggins para un polímero iónico se adaptó para el hinchamiento de equilibrio isotrópico de un hidrogel de un polímero reticulado iónico o amorfo, ajustando así el polímero reticulado en solución con la Ecuación 4.

$$\frac{v_e}{V_o} = \frac{V_1 \Delta c_j - [\ln(1 - v_{2m}) + v_{2m} + X_1 v_{2m}^2]}{V_1 v_{2o} [(v_{2m}/v_{2o})^{1/3} - (v_{2m}/2v_{2o})]} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde v_e/V_o representa la concentración de cadenas activas reticuladas designadas como grado de reticulación. Δc_j es la diferencia de concentración de iones móviles dentro y fuera de la matriz hinchada, V_1 es el volumen molar del solvente, X_1 es el parámetro de interacción polímero-solvente Flory-Huggins (sin dimensiones) y v_{2o} es la fracción de volumen de polímero en formación de red, es decir, en reticulación en solución. El grado de reticulación se calculó con $X_1 = 0.495$, $V_1 = 18$ mL/mol, valores experimentales de v_{2m} , estimados en 0.1 para y v_{2o} los valores aproximados de Δc_j alrededor de 0.7×10^{-5} mol/mL.

Análisis mecánicos de películas PGAL-CMC

Todos los análisis mecánicos se realizaron y procesaron según lo especificado en la American Society for Testing Materials Methods (ASTM) [108]. Las películas se pre-acondicionaron colocándolas en una cámara con humedad controlada de acuerdo con el método ASTM D618 ($50 \pm 5\%$ HR y $23 \pm 2^\circ$ C) durante 24 h. Luego, el grosor de las películas se midió con un micrómetro Cole-Parmer 08204-80 en cinco puntos diferentes y aleatorios (4 en el perímetro y uno en el centro). Las películas se sometieron a pruebas de tracción y punción utilizando un SINTECH 1/S (MTS, USA) con una celda de carga de 100 N. La prueba de tracción se realizó a temperatura ambiente siguiendo el estándar ASTM D882-97. En un experimento típico; las películas se cortaron en muestras de 1 cm de ancho por 8 cm de largo y se sujetaron en las tenazas a una longitud de 5 cm. Las muestras se evaluaron a una velocidad de estiramiento de 150 mm/min para registrar la resistencia del material hasta la ruptura. Todos los análisis se realizaron por quintuplicado para cada formulación. La fuerza de fractura a la punción se determinó de acuerdo con el método descrito por Gontard et al. en 2003 [109],

que especifica un ajuste para las matrices con base de polisacárido y uso de glicerol como plastificante. En un experimento típico; las películas preacondicionadas se cortaron en círculos de 10 cm de diámetro, se unieron a un anillo de metal y se sometieron a la fuerza de un pinchazo en un área de 1.3 cm de diámetro a una velocidad de descenso de 50 mm/min. Las muestras se analizaron por quintuplicado para cada formulación. Los resultados reflejan el promedio de 5 réplicas ($n = 5$ para cada experimento). Los experimentos de control se llevaron a cabo de forma idéntica sin la adición de PGAL.

Mediciones de permeabilidad al vapor de agua y ángulo de contacto

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó gravimétricamente siguiendo el estándar ASTM E96-00, sobre el coeficiente de transmisión del vapor de agua al monitorear el aumento de peso en el tiempo en relación con la humedad que pasa a través de la película. Las películas se cortaron y se colocaron en celdas preacondicionadas que se llenaron con cloruro de calcio anhidro (previamente secado a 200 °C para asegurar 0% de HR) dejando un espacio de aire de 0.5 cm en su superficie. Las películas se unieron a un anillo acrílico usando cuatro tornillos colocados simétricamente y una capa de silicona para mantener la estanqueidad. Después de colocar la película, se registró el peso inicial y se colocó en una cámara con humedad controlada (50 % HR y 22 °C). La diferencia de humedad entre el interior de la celda y la cámara proporcionó la fuerza impulsora para que el vapor pasara a través de la película hacia el desecante. Las celdas se retiraron cada 24 h para registrar el aumento de peso en una balanza analítica (Ohaus Modelo GA200, Alemania) con una precisión de 0.0001 g durante tres meses. Los análisis se realizaron por quintuplicado para cada formulación y los datos se analizaron de acuerdo con el estándar ASTM y utilizando

una corrección para materiales hidrófilos (i.e., polisacáridos) [110]. Los ángulos de contacto se midieron a temperatura ambiente con gotas sésiles usando un microscopio de ángulo de contacto OCA-15 plus (Dataphysics, USA) y el software SCA20. Se midieron y promediaron los valores de los ángulos de contacto de los lados derecho e izquierdo de las gotas de agua destilada. Las mediciones se realizaron 5 s después de que la gota (1 μ L) se depositara en la superficie de la muestra. Todos los datos fueron un promedio de diez mediciones en diferentes ubicaciones de superficie.

Degradación hidrolítica de películas.

Se emplearon piezas de películas de polímero (1 \times 1 cm²) para los diferentes estudios de degradación. Los ensayos de degradación hidrolítica *in vitro* se realizaron en tampones universales a pH 3, 7 y 10 a 37 °C y 70 °C [111]. Las muestras se mantuvieron bajo agitación orbital en botellas llenas con 5 mL del medio de degradación y azida sódica (0.03% en peso) para evitar el crecimiento microbiano para los tiempos de exposición seleccionados. Las muestras se enjuagaron a fondo con agua destilada, se secaron a peso constante al vacío y se almacenaron sobre P₄O₁₀ antes del análisis. Los estudios de degradación se realizaron por triplicado y los datos proporcionados correspondieron a los valores promedio. La retención de peso (W_r) de las muestras se determinó por la proporción porcentual de peso después de la degradación (W_d) respecto al peso inicial antes de la degradación (W_0) de acuerdo con la ecuación (5):

$$W_r = \frac{W_d}{W_0} \times 100 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Caracterizaciones térmicas

Los datos calorimétricos se registraron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un instrumento Q100 serie TA equipado con un sistema de enfriamiento refrigerado (RCS) que funciona entre -90 y 550 °C. Los experimentos se realizaron bajo un flujo de nitrógeno seco con una muestra de ~ 5 mg. El instrumento se calibró para temperatura y calor de fusión usando un estándar de indio. Las operaciones de calentamiento y enfriamiento se llevaron a cabo a una velocidad de 20 °C/min y 10 °C/min, respectivamente. La degradación térmica se estudió a una velocidad de calentamiento de 20 °C/min en un analizador termogravimétrico Q50 (TGA) serie TA con temperaturas de prueba de 0 a 600 °C.

Pruebas antimicrobianas

Se seleccionaron cepas de bacterias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. faecalis* (CECT, Valencia, España) para evaluar el efecto antimicrobiano de las películas PGAL y PGAL-co-CMC. Las cepas se cultivaron previamente aeróbicamente a fase exponencial en caldo de cultivo (5 g/L de extracto de carne de res, 5 g/L de NaCl, 10 g/L de peptona y pH 7.2). Los experimentos de crecimiento se realizaron en microtubos Eppendorf estériles. Se añadió 1 mL de diferentes concentraciones de PGAL preparadas en medio de cultivo en cada microtubo. Luego, se sembraron 0.1 mL de caldo de cultivo que contenía 10³ UFC en los microtubos. Los cultivos se incubaron a 37 °C y se agitaron a 80 rpm. Se tomaron alícuotas de 50 µL a intervalos de tiempo predeterminados para la medición de absorbancia a 650 nm en un lector de microplacas (Biochrom Ltd., Reino Unido). La turbidez estaba directamente relacionada con el crecimiento bacteriano. Todos los ensayos se realizaron en seis réplicas y

se promediaron los valores. En cuanto al método cualitativo, el medio de cultivo se preparó con agar LB y se esterilizó a 121 °C durante 30 minutos en una autoclave. Las placas se llenaron con 15 mL de medio y se mantuvieron en reposo para solidificar el medio a temperatura ambiente. La placa de difusión de agar se sembró con 10^4 UFC/mL de cada bacteria por separado y usando un hisopo de nylon, luego las muestras de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ de películas PGAL-co-CMC se colocaron en la superficie del agar. Se usó un disco comercial de gentamicina (GM) como control positivo. Se tomaron imágenes de halos de inhibición después de la incubación de las placas durante 24 h a 37 °C.

Citotoxicidad y viabilidades celulares in vitro

Las células Vero, PC-3, PNT2, MDCK, SIAT, Cos-7 y Cos-1 (ATCC, USA) se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina/estreptomicina al 1 % y L-glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO_2 y 95 % de aire. El medio de cultivo se cambió cada dos días y, para el subcultivo, las monocapas celulares se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se separaron por incubación con tripsina EDTA (0.25%) a 37 °C durante 2 a 5 min. La concentración celular se determinó contando el número de células con una cámara Neubauer y empleando azul de tripano al 4% como colorante vital. Se utilizaron células separadas con viabilidad $\geq 95\%$ para los ensayos de cultivo celular. Para determinar la concentración citotóxica (LD_{50}) de PGAL, la viabilidad y la muerte celular (mortalidad) se utilizaron diferentes concentraciones de PGAL preparadas por dilución en medio de cultivo. La citotoxicidad de PGAL se determinó a partir de alícuotas de 200 μL que contenían 10^4 células que se sembraron en cada pocillo de la placa de cultivo de 96 pocillos y se

cultivaron durante 24 h para permitir la unión celular a la placa. Posteriormente, se aspiró el medio y se prepararon nuevas muestras agregando medio de cultivo fresco. La viabilidad celular se evaluó después de otras 24 h de incubación y se determinó mediante el ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio; 5 mg/ml) y luego, se calculó la viabilidad relativa para cada muestra como el porcentaje de cociente entre la viabilidad de la muestra y el control (medio sin PGAL). La citotoxicidad se evaluó utilizando cinco repeticiones, y los resultados se promediaron y se representaron gráficamente. Para los ensayos de proliferación en las películas PGAL-co-CMC, el procedimiento fue el siguiente, se esterilizaron muestras de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ de las películas por exposición a luz UV durante 15 minutos. Estas muestras se adhirieron luego usando una pequeña gota de silicona (Silbione® MED ADH 4300 TRV, Bluestar Silicones France SAS, Lyon, Francia) en los pocillos de un plato de cultivo de 24 pocillos. Luego, se añadió 1 mL de medio de cultivo y las muestras se mantuvieron durante 24 h en condiciones de cultivo para asegurar una adecuada rehidratación de las películas. El medio se aspiró y las muestras se lavaron dos veces con PBS estéril. Las células se sembraron depositando en la superficie de las muestras (10 mg/ml) una alícuota de 100 μL que contenía 2×10^4 células. Los cultivos se mantuvieron durante 96 h para permitir el crecimiento celular, y los medios se renovaron cada dos días. Finalmente, la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Cada muestra se evaluó utilizando cinco réplicas y los resultados se promediaron y se representaron gráficamente. Para obtener imágenes representativas de los ensayos de proliferación, las muestras se fijaron durante la noche con formaldehído al 2.5% en PBS a 4 °C, y luego se lavaron cinco veces con PBS. Las muestras se tiñeron con azul de tripán al 4% y el exceso de colorante se eliminó mediante

lavados acuosos. Las muestras se colocaron en un portaobjetos y se montaron con una gota de DPX, luego se cubrieron con un cubreobjetos y se secaron durante la noche antes de los análisis en el microscopio óptico.

Análisis estadístico

Los valores se promediaron y se muestran en tablas y gráficos, junto con sus respectivas desviaciones estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA para comparar las medias de todos los grupos, y luego se aplicó la prueba de Tukey para determinar una diferencia estadísticamente significativa entre dos grupos. El nivel de confianza de la prueba se estableció en 95% ($p < 0.05$) (software OriginPro, Microcal Corp., USA).

Resultados y discusión

Síntesis y caracterización de las películas producidas con PGAL-co-CMC

Una posible estructura molecular de la molécula objetivo se representa en la Figura 17 como el producto del esquema de reacción. Cabe destacar que ambos polímeros tienen más de un grupo funcional hidroxilo para la esterificación y CMC presenta metilación y carboxilación aleatorias en sus unidades repetidas. Por lo tanto, las estructuras moleculares del producto pueden ser varias. La elongación del PGAL vía enlace fenil-fenil se confirmó por la ausencia de señales en los espectros de $^1\text{H-NMR}$. Además, fue confirmado por las amplias bandas FT-IR entre 3000 y 3400 cm^{-1} asignadas al estiramiento O-H y la ausencia de la característica banda de vibración C-O-C, como se informó previamente [42] (Ver Apéndice B 62 y 63 para los espectros $^1\text{H-NMR}$ y FTIR para PGAL, respectivamente).

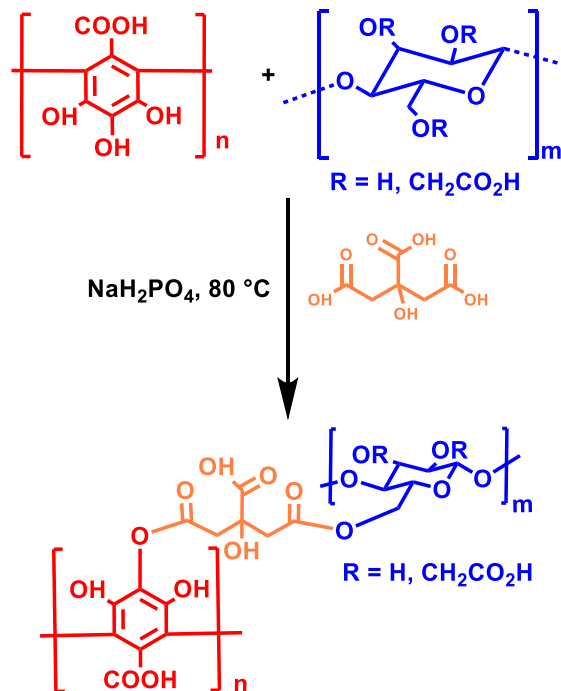


Figura 17. Representación esquemática de la reacción de reticulación entre PGAL y CMC con AC como agente entrecruzante con una posible estructura molecular en el producto.

Los análisis SEC para PGAL contra los estándares de PEG mostraron una masa molecular para este lote de alrededor de 6,000 g/mol y la concentración de saturación (Cs) en agua para PGAL se determinó como 500 mg/mL, lo que vale la pena señalar desde el punto de vista de la inocuidad de procesamiento [111].

El espectro FT-IR para PGAL-co-CMC (muestra 3 en la Tabla 5), que se muestra en la Figura 18, se compara con los de PGAL, AC y CMC, donde se observan las bandas esperadas para los polímeros nativos. Las bandas asignadas a grupos carbonilo en AC también están presentes, 1700-1725 cm^{-1} , lo que confirma la reticulación.

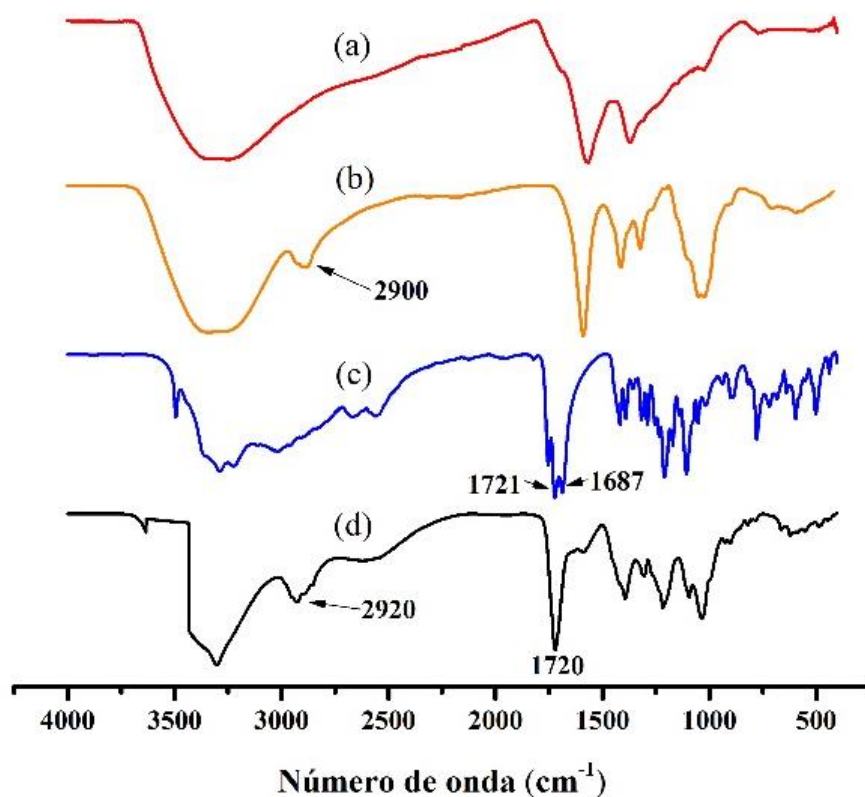


Figura 18. Espectros FT-IR comparativos para PGAL (a); CMC (b); AC (c); y PGAL-co-CMC (d).

El ESR en estado sólido de las películas se implementó para detectar la señal del electrón no apareado en la "estructura hiperfina" debida a la interacción del momento magnético de cualquier electrón no apareado y el núcleo vecino con un número de espín diferente a cero (Figura 3). Este método permitió la detección del electrón desapareado presente en la molécula de PGAL. Los resultados obtenidos se compararon con ESR de estado sólido para PGAL medido en las mismas condiciones. Los análisis muestran una señal intensa para PGAL, que decae para las películas de PGAL-co-CMC. Esta característica puede atribuirse

razonablemente a la disminución de electrones libres debido a la reticulación, como se muestra en la Figura 19-A y 19-B, respectivamente.

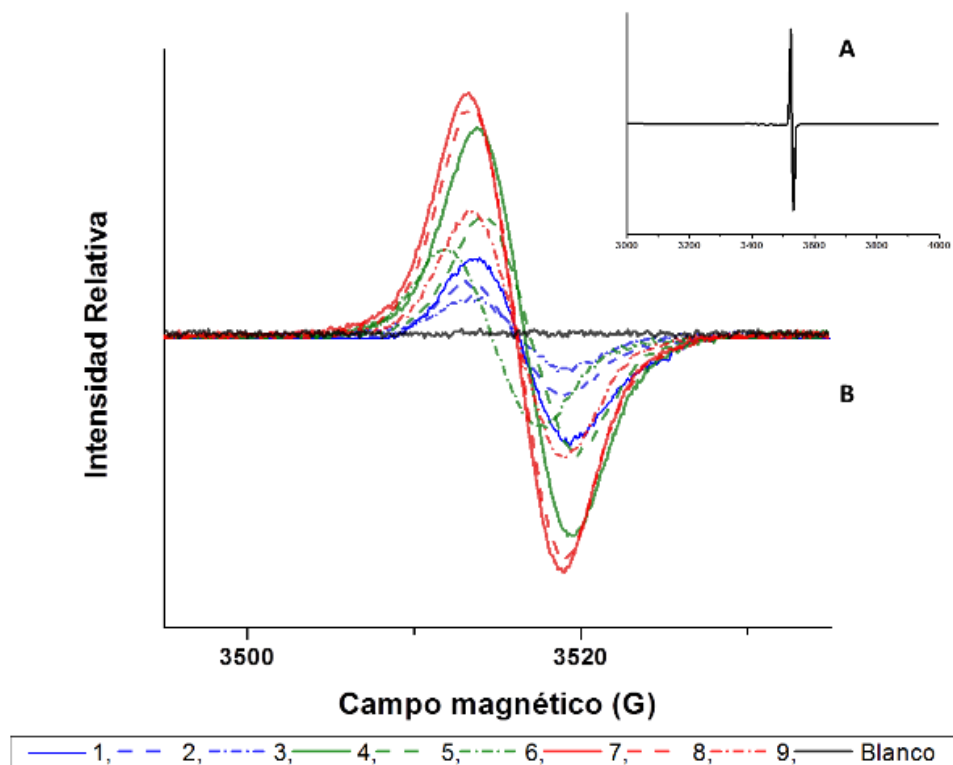


Figura 19. Espectros EPR de estado sólido para PGAL (A); y para las películas de PGAL-co-CMC (B). La disminución de la concentración de PGAL disminuye las intensidades del campo paramagnético. La medición de control sin muestra se observa como una línea continua plana.

La comparación entre los espectros ESR de las películas hace evidente que las intensidades de señal están relacionadas con la concentración de PGAL. La disminución en la concentración de PGAL resultó en la disminución de las intensidades del campo paramagnético, las bandas más intensas en la Figura 3B corresponden a las muestras 7-9, intermedias a 4-6 y las bandas de menor intensidad a 1-3 en la Tabla 5. Además, la intensidad

disminuye a medida que aumenta el contenido de glicerol que podría atribuirse a la interacción del plastificante con los grupos funcionales en las unidades de repetición fenólica.

Propiedades mecánicas y grado de entrecruzado de las películas de PGAL-co-CMC

Los datos de la resistencia máxima a la tracción y punción en la ruptura, así como el Módulo de Young para cada una de las formulaciones utilizadas en la prueba se muestran en la Tabla 5. Los datos indicaron claramente que las concentraciones de PGAL y glicerol tuvieron una influencia significativa en las propiedades del producto final. Estos resultados podrían sugerir que, además de la reticulación, la semicristalinidad de la CMC permite generar interacciones de enlace tipo ión-dipolo y enlaces de hidrógeno entre sus cadenas. Sin embargo, teniendo en cuenta que este polifenol ha expuesto grupos hidroxilo y carboxilo en cada unidad de repetición fenólica, las interacciones dipolo-dipolo podrían verse favorecidas, mejorando así la resistencia a la tracción. La densidad de reticulación del copolímero se ha estudiado en agua desionizada como un método indirecto para estimar el grado de reticulación según lo informado por Xing et al.,[107]. Los resultados mostrados en la Tabla 5 corroboran el efecto de PGAL en la reticulación que puede atribuirse a los grupos hidroxilo y carboxilo superficiales en la cadena principal del polifenol. Por el contrario, los experimentos de control sin adición de PGAL, muestras 10-12 en la Tabla 5, mostraron una unión pobre entre las cadenas de CMC. Esto también se evidenció cuando se compararon los datos de la relación de hinchazón de equilibrio (Q_m) y el porcentaje de hinchamiento entre las muestras (consulte el Apéndice B, Tabla 13 para Q_m y el porcentaje de hinchamiento para las muestras 1-12 en la Tabla 5 y una representación gráfica B-66 del porcentaje de hinchamiento para

cada muestra en la Tabla 5). Además, la resistencia a la rotura también se ve afectada por la cantidad de plastificante.

Tabla 5. Resultados de los análisis mecánicos de las películas PGAL-co-CMC en diferentes concentraciones de PGAL y glicerol.

Muestra	PGAL (%)	Gli (%)	σ (MPa) ^a	Módulo de Young (MPa)	σ_v (ensayo punción, MPa)	Espesor (m) x 10 ⁵	Grado de entrecruzado (mol/mL) ^b x10 ³
1	5	2	3.92±0.33	23.06±3.56	42.34±2.24	1.2±0.1	9.3
2	5	3	7.78±0.74	14.40±0.75	44.12±2.26	1.3±0.3	9.3
3	5	4	14.23±0.35	11.32±0.83	47.44±1.46	1.2±0.2	9.8
4	10	2	7.86±0.54	21.67±1.25	43.40±2.89	1.1±0.2	10.8
5	10	3	7.51±0.58	10.50±0.40	47.68±0.82	1.3±0.2	10.1
6	10	4	28.40±0.36	9.46±0.76	65.85±3.70	1.2±0.3	11.1
7	15	2	12.80±0.69	19.22±1.46	45.44±1.40	1.4±0.1	19.1
8	15	3	12.22±0.31	9.82±0.60	63.24±1.63	1.3±0.3	19.2
9	15	4	31.02±2.89	5.85±0.28	75.83±0.25	1.4±0.2	17.8
10	0	2	8.99±0.79	6.44±0.61	39.54±2.35	1.2±0.1	1.3
11	0	3	14.73±1.11	4.88±0.41	41.15±1.34	1.2±0.2	1.1
12	0	4	17.65±0.99	3.91±0.26	43.80±2.49	1.3±0.1	1.5

^a σ_v Tensión verdadera, está relacionado con la tensión de Hencky en la prueba de tracción y punción.

^bEl grado de entrecruzado fue calculado a partir de la ecuación de Flory-Huggins para interacciones polímero-disolvente.

La evidencia experimental sugiere que los tres compuestos (i.e., PGAL, CMC, Gli) son higroscópicos debido a la cantidad de grupos hidroxilo disponibles para generar enlaces de hidrógeno por lo que podrían ser ventajosos en los estudios de regeneración dérmica, donde la hidratación de la piel es un factor crucial. La fuerza de fractura (tensión real) está

influenciada en conjunto por el porcentaje de PGAL y la cantidad de glicerol, aunque la proporción más alta de este último es del 4% en peso para mejorar la flexibilidad. Por lo tanto, el aumento en la cantidad de plastificante podría disminuir la resistencia del material al limitar las interacciones intermoleculares relativamente débiles entre las cadenas [109]. Sin embargo, esto no se observa en PGAL-*co*-CMC, lo que podría atribuirse a la reticulación. Con respecto al módulo de Young, todas las formulaciones se pueden clasificar como materiales blandos de acuerdo con las normas ASTM. Los datos en la Tabla 5 indican que la presencia de PGAL y el plastificante tienden a aumentar el módulo elástico. Para polímeros no reticulados, cuanto mayor es el volumen libre, mayor es la libertad de movimiento y, por lo tanto, aumenta la flexibilidad. El efecto del plastificante suele ser dramático porque la adición de moléculas pequeñas implica un aumento notable en el volumen libre que ayuda a aumentar la flexibilidad y, por lo tanto, a aumentar la elongación antes de la rotura. Sin embargo, la unión covalente entre las cadenas de polímeros por AC provocó el comportamiento observado. Los experimentos de control sin PGAL permitieron observar el efecto separado del polifenol y el plastificante. Por lo tanto, se puede concluir que el aumento en la concentración de glicerol resulta en una mayor tolerancia al estiramiento, es decir, más capacidad para soportar la tensión. Este efecto plastificante puede interpretarse como una flexibilidad mejorada (la deformación medida para cada muestra en la Tabla 1 se presenta el Apéndice B-67 para ejemplificar ambos efectos). Por otro lado, el aumento en la concentración de PGAL resultó en una mayor resistencia a la tracción, independientemente de la concentración de glicerol, esto significa películas con mayor resistencia a la fractura. Cabe destacar que el módulo de Young generalmente es menos sensible a los cambios en la

concentración del polifenol y del plastificantes, pero indica el carácter elástico intrínseco de las películas por debajo de su límite elástico.

La tensión verdadera a la punción para todas las formulaciones muestra una influencia notable de las concentraciones iniciales de PGAL y glicerol. Sin embargo, la punción y la resistencia a la tracción no son comparables y deben considerarse para cada aplicación específica de las películas. Para la ingeniería de tejidos, específicamente para la regeneración de la piel, las características elásticas de nuestras películas son superiores a las de la piel humana, cuyo módulo de Young varía entre 4.2×10^5 Pa a 8.5×10^5 Pa para la piel humana joven y vieja, respectivamente [112]. Por lo tanto, aunque la resistencia de la piel humana y nuestros análisis mecánicos no son comparables, se puede concluir que el material presenta buenas cualidades para su aplicación en la ingeniería de tejidos.

Caracterización térmica

Los análisis TGA (Apéndice B-64 demostraron la estabilidad térmica de los polímeros reticulados, ya que solo se observó una degradación apreciable cuando la temperatura era superior a 200 °C. Todas las muestras mostraron una pérdida de peso inicial que puede asociarse con el agua adsorbida (observe el pico a 100 °C en la curva DTGA). Esta pérdida siempre fue cercana al 10% e indica una mayor afinidad de los polímeros PGAL-co-CMC al agua que la del PGAL (en este caso se determinó una pérdida de solo el 5%) que podría atribuirse a la relación de grupos hidroxilo en unidades de repetición. La descomposición de PGAL se caracterizó por un mecanismo complejo que siguió al menos dos pasos de degradación con picos de DTGA a 230 y 320 °C y produjo un rendimiento de carbón muy

alto (49 %) debido al alto contenido aromático de PGAL. Los polímeros reticulados mostraron también un proceso de degradación intermedio asociado con CMC que produjo un pico de DTGA distintivo a 265 °C. El rendimiento de carbón disminuyó, por ejemplo, al 12% para la muestra 9 de PGAL-*co*-CMC y al 16 % para la muestra 1, valores que claramente contrastan con el obtenido para PGAL solo. La disminución en el rendimiento de carbón se observó lógicamente cuando las muestras incorporaron mayores cantidades del componente volátil (glicerol) y tenían un contenido más bajo de PGAL.

Las corridas de calentamiento DSC mostraron que las muestras eran amorfas, mostrando solo una transición vítrea transparente a temperaturas cercanas a 0 °C cuando el contenido de PGAL era bajo (por ejemplo, 5% en peso) (consulte el Apéndice B-64 para trazas TGA y DSC). Esta temperatura aumentó ligeramente con el contenido de PGAL y también fue influenciada por la incorporación del componente plastificante (glicerol). El valor más alto se alcanzó lógicamente para la muestra que tenía un contenido máximo de PGAL (i.e., 15% en peso) y mínimo de Glicerol (i.e., 2 % en volumen), siendo la T_g observada significativamente más baja que la observada para el homopolímero de PGAL (i.e., 42 °C con respecto a 88 °C). El aumento del contenido de glicerol a 4 % en volumen disminuyó la temperatura de transición vítrea a 25 °C. De esta manera, las muestras flexibles de PGAL-*co*-CMC podrían prepararse fácilmente si se incorporara una cantidad apropiada de glicerol. A pesar de tener una estructura reticulada, las muestras de PGAL-*co*-CMC fueron más flexibles que PGAL debido a su menor contenido aromático y la incorporación de una pequeña proporción de moléculas plastificantes.

Permeabilidad de Vapor de agua (PVA) y análisis de ángulo de contacto en películas PGAL-co-CMC

Se seleccionaron dos muestras de PGAL-co-CMC (1 y 2 en la Tabla 5), para los análisis PVA basados en los cálculos estándar ASTM E-96 y el método de corrección propuesto por Gennadios en 1994 [110], como se muestra en la Tabla 6. El aumento de Glicerol aumenta el PVA en las películas debido a las fuerzas intramoleculares reducidas, lo que a su vez aumenta el espacio libre y, por lo tanto, permite la difusión de las moléculas de agua a través de la estructura macromolecular [109].

Tabla 6. Resultados de PVA para muestras de película PGAL-CMC según la metodología reportada por ASTM y Gennadios[110]

Muestras de Table 5	PVA x 10¹³ (g·Pa⁻¹·s⁻¹·m⁻¹)	
1	ASTM	1.79±0.05
	Gennadios test	3.69±0.10
2	ASTM	3.31±0.13
	Gennadios test	6.84±0.27

Sin embargo, los resultados obtenidos difieren de los informados para los polisacáridos lineales y están en el orden de magnitud del polietileno y las ceras de baja densidad a la misma temperatura y humedad. Este resultado sugiere que la reticulación con PGAL restringe la difusión de moléculas de agua a través de la película. Cabe destacar que las películas no se hincharon y no mostraron aumento de peso mientras se colocaron en la cámara con humedad controlada (50 % HR).

La figura 20 muestra el comportamiento del ángulo de contacto de las películas PGAL-co-CMC. El aumento de PGAL tiende a aumentar el ángulo de contacto, lo que podría atribuirse al grado de entrecruzado previamente discutido. Las muestras con la menor cantidad de PGAL (es decir, 5 %) mostraron ángulos de contacto similares a la película de CMC (16.5°). Sin embargo, el ángulo de contacto disminuye por el aumento de plastificante, y esto fue más notable cuando la concentración de PGAL fue alta (es decir, 10 y 15 %).

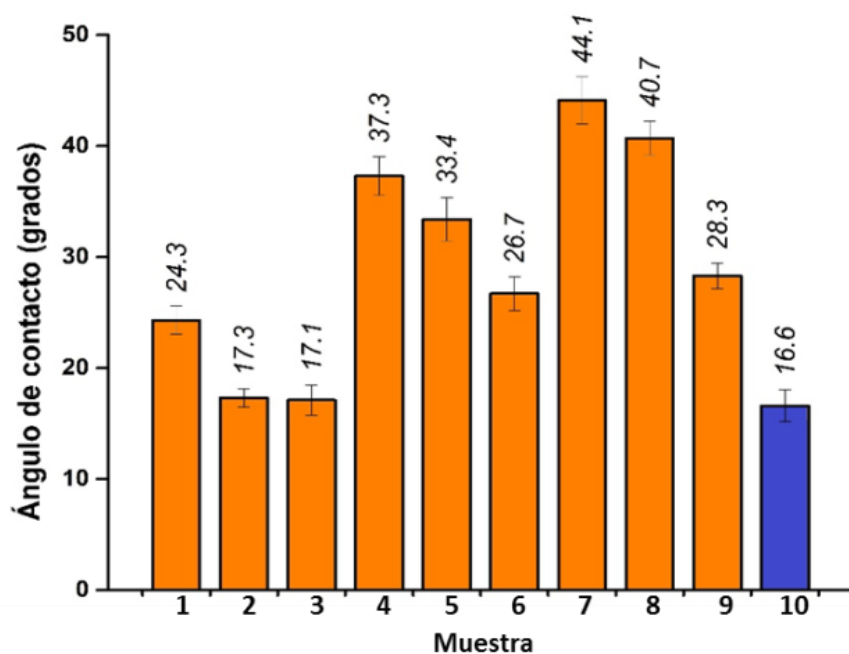


Figura 20. Mediciones de ángulo de contacto en entradas de muestra de película PGAL-co-CMC en la Tabla 5. * $p < 0.05$ determinado por ANOVA y prueba de Tukey.

Este comportamiento señala que el plastificante desempeña un papel importante en las características hidrofílicas de las películas (consulte el Apéndice B-65 para conocer las relaciones de ángulo de contacto con glicerol y PGAL).

Degradación hidrolítica

La degradación hidrolítica *in vitro* de las películas de PGAL-co-CMC se realizó a la temperatura fisiológica (37 °C) y pH de 3, 7 y 10 proporcionado por el tampón universal que consiste en soluciones de citrato-fosfato-borato/HCl [113, 114]. La degradación se estudió en las muestras 7, 8 y 9 de la Tabla 5 debido a que tienen el mayor contenido de PGAL y permiten evaluar su efecto en comparación con el de CMC, como se informó previamente [115], y los resultados se muestran en la Figura 21. En todos los casos, las muestras mostraron una pérdida de peso muy rápida al comienzo de la exposición (es decir, 42-72 % después de solo tres días) y una pérdida de peso moderada posterior entre 7 y 15 días cuando se alcanzó una meseta. Los resultados permiten identificar el primer proceso que implicó la disolución del exceso de AC y el plastificante Gli agregado, así como la degradación y la rápida disolución de moléculas con un bajo grado de reticulación. Las diferencias observadas entre muestras con diferente contenido de Gli después de tres días de exposición pueden justificarse considerando la disolución del plastificante y el aumento de la hidrofibicidad de la matriz que facilita la difusión de moléculas de agua y productos de degradación a través de las películas. Tenga en cuenta que la pérdida de peso a los tres días de exposición aumentó claramente con el contenido de Gli (por ejemplo, 42, 52 y 62 % para las muestras 7, 8 y 9, respectivamente, para pH 3). Después de los tres días de exposición indicados, el comportamiento de degradación aún dependía de la concentración inicial de Gli, lo que sugiere que algunas moléculas plastificantes permanecieron en las películas debido a las fuertes interacciones de enlace de hidrógeno entre las cadenas principales de CMC y PGAL.

Por lo tanto, la pérdida de peso aumentó para el medio pH = 3 del 42 al 60%, del 52 al 79% y del 62 al 95% para 2, 3 y 4% en volumen de alimentación de Gli, respectivamente.

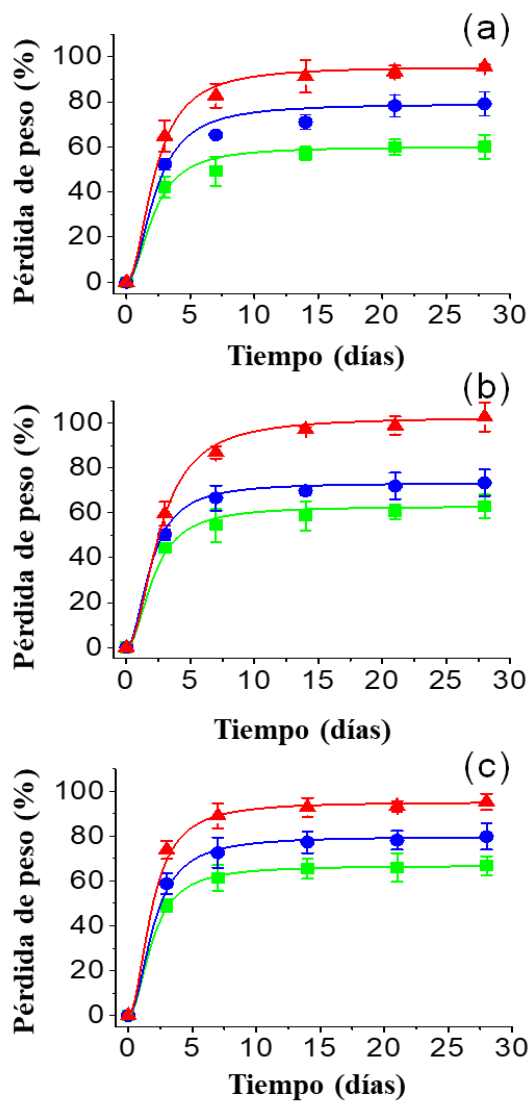


Figura 21. Efecto del pH en la degradación hidrolítica a 37 °C de las películas PGAL-co-CMC. a) pH 3, b) pH 7, y c) pH 10. Los símbolos (■), (●) y (▲) corresponden a muestras con relaciones de % en volumen PGAL/Gli de 15:2 (muestra 7), 15:3 (muestra 8) y 15:4 (muestra 9), respectivamente.

Vale la pena señalar que el pH del medio tuvo una ligera influencia en el comportamiento de degradación a pesar de la presencia de grupos iónicos como COO^- en PGAL y CMC. Lógicamente, la ionización debería influir en la solubilidad molecular y la conformación molecular. De hecho, es bien sabido que la conformación de CMC depende del pH del medio y que forma agregados densos en solución a pH bajos; es decir, por debajo de su pK_a [115], mientras que las conformaciones de cadena extendida se ven favorecidas en presencia de iones carboxilato. Los datos que se muestran en la Figura 21 también muestran que la diferencia principal entre las muestras degradadas a diferentes pH corresponde a la disolución inicial, que es más alta a pH 10.

Específicamente, las pérdidas de peso aumentaron hasta 48, 59 y 72 % para las muestras 7, 8 y 9, que fueron muestras cargadas con 2, 3 y 4 % en volumen de glicerol, respectivamente. Por el contrario, las pérdidas de peso alcanzadas después de 15 días fueron comparables cuando se varió el pH. Por ejemplo, 60, 63 y 67 % se determinaron para la muestra 7 a pH 3, 7 y 10. Cabe destacar que la pérdida de peso de estas muestras en el período entre 3 y 15 días fue bastante constante (es decir, 18, 20 y 19 % para los pH 3, 7 y 10, respectivamente). En resumen, la hidrólisis de los grupos éster no se modificó significativamente con el cambio de pH que influye efectivamente en la reducción de la reticulación y hacer fragmentos solubles. Por otro lado, la Figura 22 muestra diferentes imágenes tomadas durante el proceso de disolución y degradación hidrolítica de las películas.

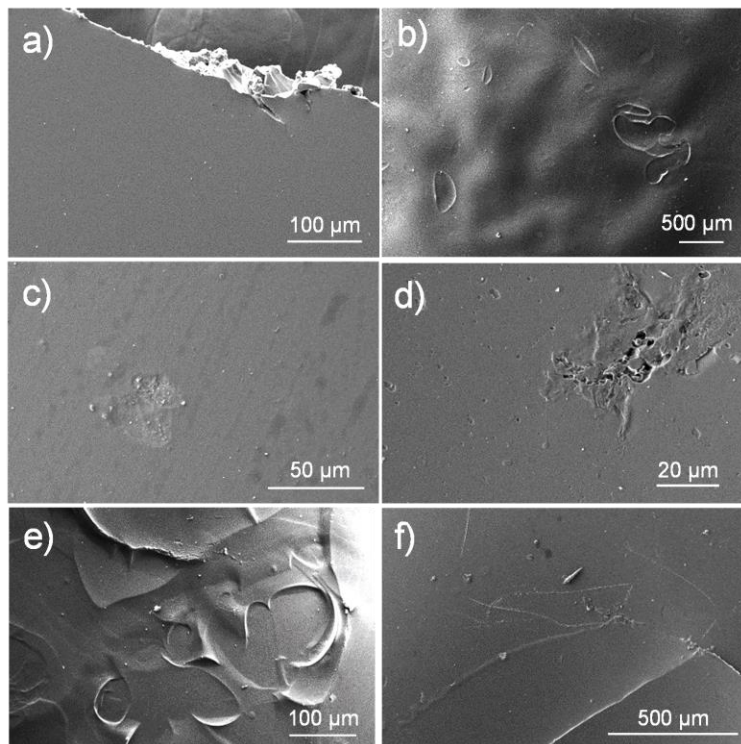


Figura 22. Micrografías SEM de película PGAL-co-CMC (muestra 9 en la Tabla 5). Muestra inicial (a), después de 3 días (b, c), 7 días (d, e) y 14 días (f) de exposición al tampón universal pH 7 a 37 °C.

Las películas preparadas por evaporación de disolvente tenían una superficie lisa y homogénea como se representa en la Figura 22-a. Al comienzo de la exposición al medio hidrolítico (es decir, tres días), la matriz polimérica se hinchó ligeramente como lo revelaron las ampollas formadas en su superficie y eso se puede observar claramente en las imágenes de bajo aumento (Figura 22-b). Además, se observan pequeñas erosiones en la superficie a gran aumento (Figura 22-c), las cuales se volvieron progresivamente profundas y dieron lugar a agujeros y grietas, mientras que a bajo aumento, se puede detectar una estructura de terraza derivada de la eclosión de las ampollas/burbujas indicadas anteriormente. Finalmente, el

material restante muestra nuevamente una superficie lisa con algunas reminiscencias de la estructura de la terraza (Figura 22-f).

Efecto de las películas de PGAL-co-CMC en el crecimiento bacteriano

La Figura 23-a muestra la formación de halos de inhibición del crecimiento bacteriano para muestras con diferente composición y diferentes cepas bacterianas. Esta observación cualitativa demuestra la actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas (i.e., *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) y bacterias Gram negativas (i.e., *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). El ensayo cualitativo mostró escasas diferencias entre las muestras de película PGAL-co-CMC con diferente contenido de PGAL y más lógicamente entre muestras con diferente contenido de Gli.

Las mediciones cuantitativas indican que el efecto antibacteriano es limitado ya que no se eliminó toda la población bacteriana, incluso a la concentración más alta analizada de PGAL (1 mg/mL). Los resultados también mostraron dos características relacionadas con la acción antibacteriana de PGAL; primero, la actividad es solo bacteriostática porque reduce la población en un 35 y 20% a las 24 h de cultivo (Figura 23-b) y alrededor del 30 y 15% a las 48 h (Figura 23-c) para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente. En segundo lugar, la actividad antibacteriana tiene una mayor efectividad contra las cepas Gram-positivas probadas. La disminución de la actividad antibacteriana a medida que avanza el tiempo de cultivo es consistente con la disminución del ingrediente bioactivo. Finalmente, la difusión en la placa de agar podría considerar una concentración menor de 1 mg/ml, y esto

explicaría la similitud de los tamaños de los halos de inhibición para todas las muestras como se muestra en la Figura 23.

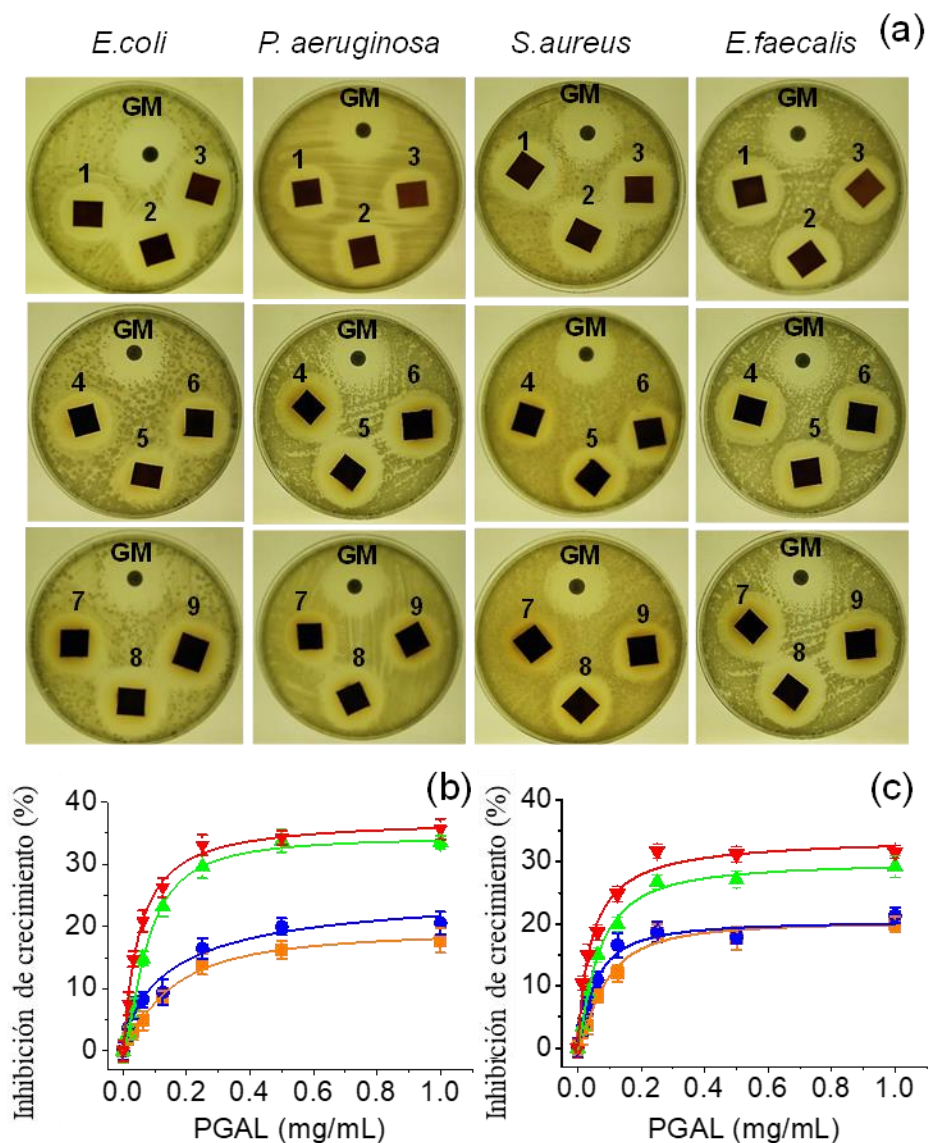


Figura 23. Inhibición del crecimiento bacteriano. a) Halos de inhibición producidos por las películas PGAL-co-CMC. Las muestras 1-9 corresponden la Tabla 5, y GM es el disco de control de gentamicina. b) y c) Inhibición del crecimiento por PGAL después de 24 y 48 h de cultivo bacteriano (respectivamente). Símbolos *E. coli* (■), *P. aeruginosa* (●), *E. faecalis* (▲) y *S. aureus* (▼).

Citotoxicidad de PGAL y viabilidad celular en películas PGAL-co-CMC

La Figura 24-a muestra las curvas experimentales de citotoxicidad para PGAL, que tiene una forma sigmoidea típica. Las curvas permiten determinar en la parte de la pendiente lineal, la dosis citotóxica (LD_{50}) que corresponde a la región de dependencia lineal entre el porcentaje de viabilidad celular y la concentración de PGAL. Esta dosis varió en el intervalo de 0.2-0.6 mg/mL para las diferentes líneas celulares analizadas, excepto para las células de tipo epitelial MDCK que requirieron una dosis notablemente más alta (es decir, 1.1 mg/mL). Curiosamente, estas células se caracterizan por su configuración de monocapa y, en consecuencia, por su capacidad para formar una barrera celular protectora que justifica la dosis relativa más alta necesaria para producir un efecto citotóxico. De hecho, se encontró una dosis habitual cuando se pierde esta barrera celular como es, por ejemplo, el caso de las células SIAT derivadas de MDCK que tenían un valor LD_{50} de 0.4 mg/mL. También es interesante comparar los valores obtenidos de las líneas epiteliales derivadas del epitelio prostático. Por lo tanto, la línea PNT2 derivada de un tejido normal muestra una LD_{50} más alta (0.3 mg/mL) que la línea de tumor de próstata PC-3 (0.2 mg/mL). Finalmente, la línea Vero, que es la que forma la barrera celular más reducida, muestra la LD_{50} más baja (0.2 mg/mL). Por otro lado, se determinó una LD_{50} ligeramente más alta (es decir, 0.6 mg/mL) para células de tipo fibroblastos como Cos-1.

La figura 24-b muestra la viabilidad de las células sembradas en diferentes películas de PGAL-co-CMC (10 mg/mL). La prueba se realizó considerando los contenidos de PGAL de 5, 10 y 15 % en peso con la carga máxima del plastificante, muestras 3, 6 y 9 en la Tabla 5, respectivamente, para evaluar el efecto de los contenidos de PGAL.

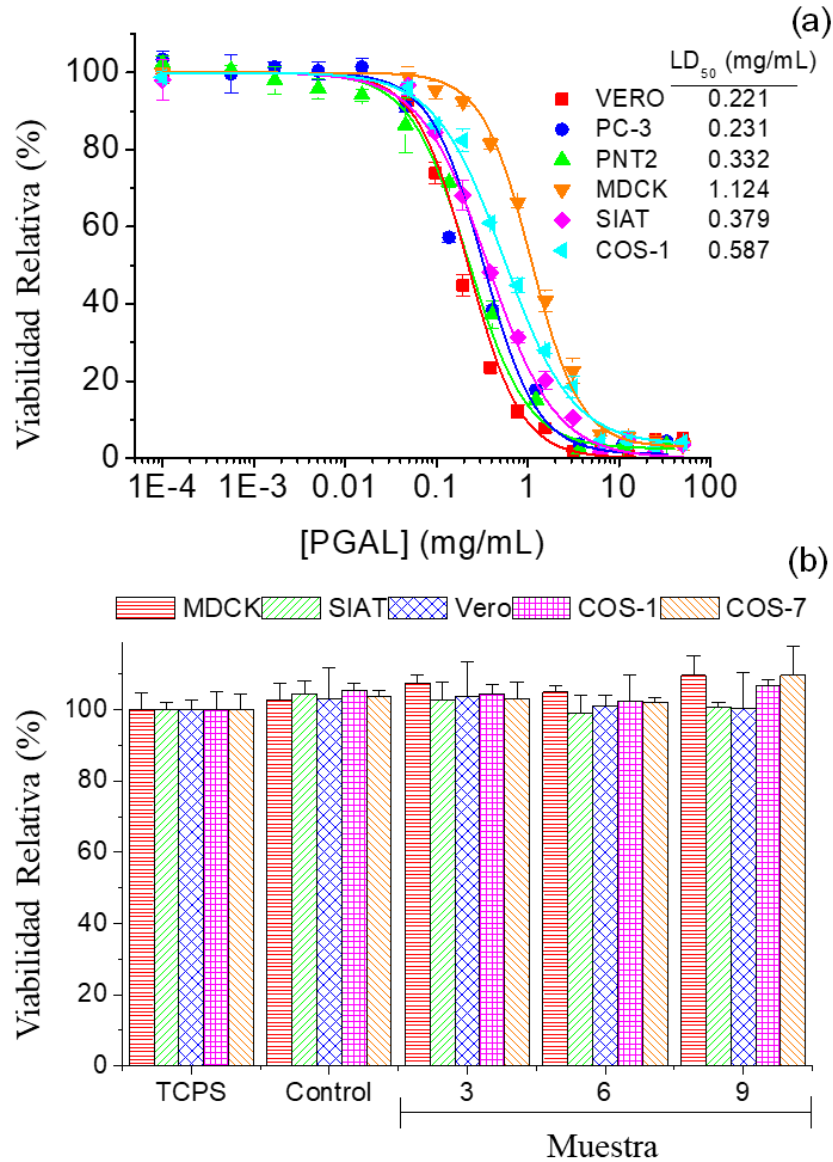


Figura 24. Curvas de citotoxicidad de PGAL (a). Viabilidad celular en películas de PGAL-co-CMC (10 mg/mL), las células se evaluaron a las 96 h de cultivo (b).

En todos los casos, las películas no muestran efectos citotóxicos sobre las células sembradas en su superficie y conducen a una viabilidad completamente comparable con la determinada para la superficie de la placa de cultivo (TCPS) y también para la matriz CMC utilizada como control. Por lo tanto, es notable que se haya detectado una alta viabilidad después de 96 h de

cultivo para todas las líneas celulares analizadas (i.e., células MDCK, SIAT y Vero de tipo epitelial y células Cos-1 y Cos-7 de tipo fibroblastos).

La falta de toxicidad de las muestras estudiadas implica también que la pérdida de peso detectada durante la exposición de las muestras estudiadas en los medios de degradación hidrolítica a pH 7 y 37 °C corresponde principalmente a materiales solubles diferentes a PGAL. Tenga en cuenta que la pérdida de peso es de alrededor del 50 % durante el período de tiempo indicado y la LD₅₀ se produce a una concentración de 0.2-0.6 mg/mL. Se consideraron dos puntos para establecer este cultivo como un punto de control; primero, la cinética de la degradación hidrolítica a pH 7 y 37 °C, correspondiente a condiciones en las que puede ocurrir aproximadamente el 50 % de la pérdida de peso del material y, en segundo lugar, que el LD₅₀ de PGAL ocurre a una concentración de 0.2-0.6 mg/mL. Por lo tanto, en teoría, para una muestra de aproximadamente 50 mg cultivados en 1 mL de medio, la liberación máxima de PGAL correspondería a una concentración de 1.25, 2.5 y 3.75 mg/mL para muestras con 5, 10 y 15% en peso de PGAL, respectivamente. Estos valores claramente excedieron la concentración correspondiente a LD₅₀, lo que demuestra que la mayor parte de PGAL se retuvo en la película reticulada y las películas son seguras como sustratos para la adhesión y el crecimiento celular. La figura 25 muestra la morfología de las células cultivadas en la superficie de las películas. Como ejemplo, la disposición en monocapa de células Vero de tipo epitelial se muestra en la superficie de CMC (control, Figura 25a) y en las superficies de las películas de PGAL-co-CMC estudiadas (Figuras 25b-d). Otras líneas celulares epiteliales como MDCK y SIAT también se caracterizaron por la formación de monocapas

en las superficies de las películas PGAL-co-CMC. Finalmente, la distribución de células más aisladas en esta superficie se muestra para células de fibroblastos como Cos-1 y Cos-7.

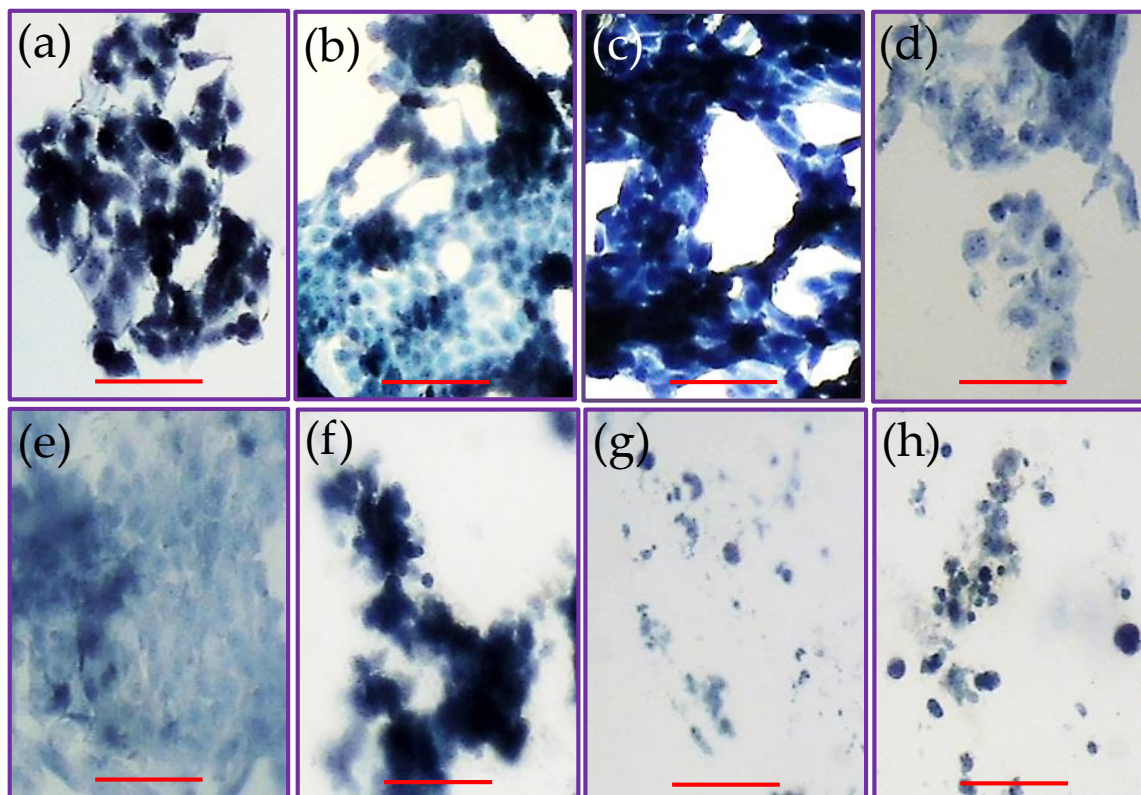


Figura 25. Imágenes de la proliferación celular en películas de PGAL-co-CMC. Células Vero (células de tipo epitelial) en la película o control CMC (a) muestra 3 (b), muestra 6 (c) muestra 9 (d). Células de tipo epitelial en películas (muestra 9): células MDCK (e) y células SIAT (f). Células tipo fibroblastos en las películas (muestra 9): células Cos-7 (g) y células Cos-1 (h). Las células se tiñeron con azul de tripano y se observaron por microscopía óptica (barra de escala = 20 μ m).

Conclusiones

El uso de ácido cítrico como agente de reticulación permitió obtener un nuevo copolímero de PGAL y CMC. La evidencia experimental demuestra que las películas de PGAL-co-CMC son posibles biomateriales candidatos para estudios de regeneración de tejido de la piel. Las

células epiteliales y fibroblastos se cultivaron con éxito en películas de este material. Las películas no son tóxicas y presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas, características deseadas en los campos dermatológicos y quirúrgicos.

Perspectivas del capítulo:

Uno de los problemas que se presentaron con el compuesto PGAL-co-CMC discutido en el capítulo anterior es la baja adhesión celular. Para mejorar esto se investigó la modificación de superficie mediante el uso de un material de soporte del PGAL que permitiera este estudio y fuera igualmente biocompatible. De esta forma, PGAL se injertó con éxito en PCL, producida enzimáticamente, mediante foto-inducción con luz UV. Las películas de PCL se prepararon con varios niveles de rugosidad y posteriormente se injertaron con PGAL (PCL-g-PGAL). Los resultados de la caracterización completa de los materiales producidos mediante pruebas mecánicas, morfología y topografía de la superficie, análisis térmicos y cristalográficos, así como la humectabilidad y la actividad de protección celular contra el estrés oxidativo fueron adecuados para la regeneración de los tejidos. La biocompatibilidad *in vitro* se evaluó con células de tipo epitelial que mostraron una excelente adhesión y proliferación en las películas PCL-g-PGAL, lo más importante, PCL-g-PGAL mostró una buena capacidad para proteger los cultivos celulares en su superficie contra especies reactivas de oxígeno. En consecuencia, estos biomateriales pueden considerarse películas novedosas biocompatibles y antioxidantes con alta capacidad de respuesta para aplicaciones biomédicas o de ingeniería de tejidos.

Introducción

El estrés oxidativo es un factor esencial de la respuesta tisular a los biomateriales implantados, que a menudo limita su biocompatibilidad y rendimiento [116]. Esta es una condición fisiopatológica que desequilibra el exceso de producción de oxidantes en relación con el mecanismo antioxidante del organismo [117]. En general, el implante de un biomaterial o andamio desencadena un cierto grado de respuesta inflamatoria y una respuesta inmune posterior. Por lo tanto, la reducción de este estrés oxidativo es fundamental para la ingeniería de tejidos porque si esta respuesta se exagera, debido a la inflamación crónica, podría comprometer la funcionalidad del biomaterial [7, 118].

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen al comienzo de la inflamación [32, 119]. Específicamente, las proteínas y los factores de coagulación absorbidos en la interfaz conducen a la atracción de leucocitos que generan superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) contra materiales externos [120, 121]. Ahí, las cantidades excesivas de estos radicales libres promueven el desequilibrio del estado redox del tejido en el sitio del implante, seguido de la cascada de respuestas inflamatorias e inmunes, que pueden provocar la formación de cicatrices, pérdida de funcionalidades del material o incluso el rechazo [6, 122].

El uso de fármacos naturales y sintéticos son generalmente las herramientas terapéuticas usadas contra la inflamación causada por los implantes. Las aplicaciones actuales utilizan chalconas, vitaminas, compuestos fenólicos o peptídicos, entre otros [123]. Sin embargo, combatir el estrés oxidativo con estos medicamentos puede ser un desafío debido a la falta de biodisponibilidad, los altos costos y la aparición de efectos secundarios [124]. Además,

los tratamientos requieren ingerir grandes cantidades para obtener las respuestas deseadas. Alternativamente, el uso de compuestos naturales captadores de radicales libres, principalmente polifenoles, se encuentra entre los enfoques pro-salud notorios y es un tema de investigación en los últimos años debido a su biocompatibilidad y actividades biológicas atractivas con bajos efectos secundarios [125]. Estos fitoquímicos pueden exhibir capacidad antioxidante [126] además de actividades antialérgicas [127], antibacterianas [128], antiinflamatorias [129, 130], antitumorales, hipoglucemiantes y antivirales [131, 132]. En cuanto a la inflamación, son capaces de estabilizar los radicales libres al donar un átomo de hidrógeno o un electrón e incluso auto-oxidarse rápidamente [33]. Sin embargo, muchos de estos compuestos bioactivos no están disponibles fácilmente o se degradan fácilmente a derivados no funcionales.

Para ampliar las aplicaciones biomédicas de estos compuestos, los biomateriales poliméricos antioxidantes funcionalizados con polifenoles se describen ampliamente en la literatura [133, 134]. Se ha logrado una variedad de biomateriales con las propiedades deseadas basados en polifenoles con diferente longitud de cadena utilizando rutas de síntesis modulares y sencillas. Estos enfoques describen a los polifenoles como componentes básicos, ya que son fáciles de interactuar con una amplia gama de polímeros, incluidos los polímeros sintéticos y polipéptidos, así como los polisacáridos naturales, proteínas y ácidos nucleicos, que forman complejos de polímero-fenol, así como cápsulas, partículas e hidrogeles [135]. Estos compuestos que contienen grupos catecol y/o galloilo permiten diversas interacciones covalentes y no covalentes en el ensamblaje de materiales con base de polifenoles [136]. Las mezclas de polifenoles con PCL o sus injertos, incluidos los derivados de taninos y la

catequina, resultaron exitosas en la cicatrización de heridas y en estudios de ingeniería de tejidos [134, 137, 138]. Por tanto, el anclaje de polifenoles en polímeros biocompatibles es alentador; a pesar del uso de agentes citotóxicos como catalizadores de formaldehído o SnOct₂ para producir esos materiales.

En esta parte del trabajo, diseñamos un material para la ingeniería de tejidos derivado del PGAL que es un polifenol estable y natural con capacidad antioxidante *per se* para evitar la generación de radicales libres cuando se implanta y para disminuir también la necesidad de medicamentos antiinflamatorios adicionales. Entre los informes recientes en nuevas síntesis de polímeros, para aplicaciones biomédicas, el poli(ácido gálico) enzimático (PGAL) (ca 7,000 Da), que es un polianión multirradical estable con una estructura secundaria helicoidal [139], muestra características interesantes. Por ejemplo, alta solubilidad en medios fisiológicos con citotoxicidad nula, capacidad de eliminación de radicales libres, semiconductividad eléctrica y alta termoestabilidad y fotoestabilidad [45, 63]. Este polímero se produce en condiciones de proceso moderadas durante la polimerización del naturalmente abundante ácido gálico mediada por lacasa de *Trametes versicolor* [42, 140]. Anteriormente estudiamos materiales basados en PGAL para la proliferación de células epiteliales y este polímero individualmente mostró citoprotección de fibroblastos humanos bajo exposición a la radiación UV [46]. El presente estudio demuestra que el injerto de PGAL sobre policaprolactona enzimática activada en la superficie (PCL) inhibe las ROS generadas en cultivos de células epiteliales MDCK y Vero.

Materiales y métodos

Materiales

Lacasa de *Trametes versicolor* (LTV, actividad enzimática específica 2,35 U/g, proteína liofilizada almacenada a -20 °C) se adquirió de Fluka (USA). La lipasa B inmovilizada de *Candida antarctica* (CALB) (Lewatit VPOC1600, Lanxess, USA), soportada en perlas esféricas macroporosas de poli(metacrilato divinilbenceno) (1 mm), actividad enzimática específica 5.000 U/g almacenada a 5 °C se adquirió de C -Lecta (Alemania). El ácido gálico (AG), la ϵ -caprolactona (CL), el ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y el carbonato de 1,2-propileno fueron suministrados por Sigma-Aldrich (USA). El alcohol etílico (grado técnico, > 99%) fue suministrado por Química Barsa S.A. (CV, México). Se adquirió etilenglicol de Merck (Madrid, España) y Formamida de Panreac (España). La solución salina tamponada con fosfato (PBS) se preparó disolviendo productos químicos de grado reactivo, NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄ · 3H₂O, MgCl₂ · H₂O, CaCl₂ y Na₂SO₄, en agua desionizada, tamponada a pH = 7,25. El cilindro de 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R-134a/Norflurane Dupont, SUVA, USA) (60 Kg) fue suministrado por Refracciones Star (México) con un 98% de pureza. PGAL mediado por enzimas se produjo como se informó anteriormente (capítulo 3)[42] con un rendimiento del 96% (Mn = 7000 Da, PDI = 1.1).

Síntesis enzimática de PCL

CALB catalizó la producción de PCL mediante la polimerización de CL mediante apertura de anillo, siguiendo el método informado por García-Arrazola et al. (2007) [141]. En un experimento típico, CL (1,26 mol), previamente destilada sobre CaH₂, se cargó en un reactor

de 400 mL 316st equipado con un agitador magnético, una camisa de calentamiento de cerámica externa y dos termopares, uno que mide la temperatura de la camisa y el otro dentro del reactor. Luego, se agregaron las perlas CALB (6000 U/mg), que previamente se liofilizaron hasta una actividad mínima de agua, y el reactor se presurizó con medio líquido 1,1,1,2-tetrafluoroetano usando una bomba de jeringa ISCO. La presión final fue de 40 bares y el reactor se mantuvo a una temperatura constante de 65 °C. La despresurización a presión atmosférica al final de la polimerización (48 h) se realizó fácilmente después de enfriar el reactor en un congelador convencional (-5 °C) durante un período no mayor de 30 min. La enzima se separó por filtración después de disolver los reactivos y productos en cloroformo, y los polímeros se purificaron por precipitación en metanol frío (1/10 v/v) para obtener PCL con $M_n = 38,519$ Da (PDI = 2.1), $T_m = 55.6$ ° C, pico DTGA = 475 ° C y porcentaje de cristalinidad = 54.1%.

Preparación de películas de PCL

Se obtuvieron dos materiales con diferente rugosidad superficial (denominados R1 y R2) utilizando plantillas de vidrio cuya superficie se imprimió previamente mediante la técnica de grabado ácido. Este tratamiento se realizó con un gel de ácido fosfórico concentrado (37%). Las películas de PCL se prepararon fundiendo el polímero entre los moldes, para tener una topografía especular. Luego, se produjo una capa homogénea de grupos hidroxilo colgantes sobre la superficie de PCL por inmersión de las películas de PCL en una solución alcalina (pH = 12) durante 24 h.

Síntesis del copolímero de injerto PCL-g-PGAL

PGAL se injertó en la superficie de películas de PCL formando grupos éster a través de los grupos hidroxilo generados en las superficies hidrolizadas. Con este fin, se introdujeron 0.6 g de PCL en una solución de PGAL (0.28 mM) a pH = 3 (pH ajustado con ácido cítrico) y se expusieron a irradiación UV ($I = 1.35 \text{ mW cm}^{-2}$) durante 0,4,8,12 y 24 h. Después del injerto, las películas se lavaron con agua y etanol para eliminar cualquier PGAL residual y otros compuestos no reaccionados. El mejor rendimiento de injerto fue alcanzado en las muestras con 24 h de irradiación UV.

Caracterización química

Los espectros FT-IR se adquirieron en un instrumento ATR-FTIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer (USA). Las mediciones de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se realizaron en un cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1210 (USA) equipado con un detector RID. Se usaron estándares de polietilenglicol (PEG) de peso molecular estrecho en agua desionizada (Millipore, MilliQ) y estándares de poliestireno (PS) en THF (Merck de grado HPLC) para la calibración de PGAL y PCL, respectivamente. Las muestras se disolvieron en la fase móvil (1 mg/mL) y se filtraron (0.45 μm) antes de la inyección en el cromatógrafo.

Estudios de captación de radicales de PCL-g-PGAL

El estudio de la inhibición del radical DPPH por muestras de PCL-g-PGAL se llevó a cabo en un espectrofotómetro UV-vis Genesys 10S (Thermo Scientific) a 517 nm. Las soluciones madre de PCL-g-PGAL (25-500 ppm) se diluyeron en cloroformo y luego se añadieron alícuotas de 100 μl de cada dilución en tubos de ensayo que contenían 2.9 mL de solución

DPPH (6.34×10^{-5} M). Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente antes de los análisis UV. El porcentaje relativo de actividad captadora de radicales DPPH (RSA) se estimó de acuerdo con la Ec. (6):

$$RSA = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde A_s y A_0 son las absorbancias del análisis con y sin antioxidante, respectivamente. La determinación de RSA se realizó por triplicado. Los datos experimentales se ajustaron utilizando el software OriginPro 8.0. El valor IC_{50} se determinó como la concentración de PCL-g-PGAL que inhibe al 50% el RSA de DPPH.

Espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS)

Los análisis se realizaron en un sistema SPECS equipado con una fuente de rayos X de doble ánodo de alta intensidad XR50 de Mg/Al (1253 eV/1487 eV) que funciona a 150 W, colocado perpendicular al eje del analizador y utilizando un detector de XP Phoibos 150 MCD -9. El tamaño del punto de rayos X fue de 650 μ m. La energía de paso se ajustó a 25 y 0.1 eV para el estudio y los escaneos estrechos, respectivamente. La compensación de carga se logró con una combinación de cañones de inundación de iones de argón y electrones. La energía y la corriente de emisión de los electrones fueron de 4 eV y 0.35 mA, respectivamente. Para la pistola de argón, la energía y la corriente de emisión fueron 0 eV y 0.1 mA, respectivamente. Los espectros se registraron con una energía de paso de 25 eV en pasos de 0.1 eV a una presión inferior a 6×10^{-9} mbar. Estas condiciones estándar de compensación de carga dieron como resultado una carga estática negativa pero perfectamente uniforme. El pico C 1s se utilizó como referencia interna con una energía de unión de 284.8 eV. Los espectros XPS de

alta resolución fueron adquiridos por el ajuste de la curva Gaussian-Lorentzian después de la sustracción del fondo en forma de s . La composición de la superficie se determinó utilizando los factores de sensibilidad del fabricante.

Mediciones de ángulo de contacto

Las mediciones del ángulo de contacto estático con el método de gota sésil se registraron y analizaron a temperatura ambiente en un equipo OCA-15EC de DataPhysics Instruments GmbH (Filderstadt, Alemania) con el software SCA20 (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemania). Los solventes considerados para este estudio fueron agua desionizada, carbonato de 1,2-propileno, PBS, medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol y formamida. Los valores de los ángulos de contacto de los lados derecho e izquierdo de la gota de disolvente se midieron y promediaron. Las mediciones se realizaron 5 s después de que la gota (1 μL) se depositara en la superficie de la muestra. Todos los datos fueron un promedio de diez mediciones en diferentes ubicaciones de superficie.

Mediciones de perfilometría de contacto

La rugosidad de la superficie (Rq) de las películas PCL y PCL-*g*-PGAL se determinó usando un perfilómetro (Veeco, Plainview, NY, USA). La obtención de imágenes de las muestras se realizó utilizando las siguientes configuraciones optimizadas: radio de la punta = 2.5 μm ; fuerza de la aguja = 1.5 mg; longitud de escaneo = 1 μm ; velocidad = 1.5 nm/s.

Morfología de superficie

Los estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM) se llevaron a cabo utilizando un microscopio enfocado Ion Beam Zeiss Neon40 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Alemania) que funciona a 5 kV. Se depositaron muestras de películas de PCL y PCL-*g*-PGAL en trozos de aluminio y se recubrieron con una capa delgada de carbono.

Mediciones DSC y XRD

Los datos calorimétricos se obtuvieron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) con un instrumento TA serie Q100 equipada con un sistema de refrigeración por refrigeración (RCS) que funciona desde -90 °C a 220 °C. Los experimentos se realizaron bajo un flujo de nitrógeno seco con un peso de muestra de aproximadamente 5 mg y la calibración se realizó con indio. Las ejecuciones de calentamiento y enfriamiento se realizaron a una velocidad de 20 ° C/min.

Los experimentos WAXD se llevaron a cabo en la beamline NCD (BL11) de la instalación de sincrotrón Alba (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España). El haz se monocromatizó a una longitud de onda de 0.100 nm. Las muestras de películas se envolvieron entre cinta de Kapton. Los perfiles WAXD y SAXS se adquirieron simultáneamente con dos detectores lineales sensibles a la posición: el detector SAXS se calibró con diferentes órdenes de difracción del behenato de plata (AgBh), mientras que el detector WAXD se calibró con difracciones de un estándar de una muestra de alúmina (Al₂O₃). Automáticamente, los perfiles de difracción se normalizaron a la intensidad del haz y se corrigieron considerando el fondo de muestra vacío (kapton). Los picos WAXD fueron deconvolucionados con el

programa PeakFit v4 de Jandel Scientific Software usando la función matemática llamada área Gaussian-Lorentzian. Los perfiles fueron ajustados utilizando el software OriginPro 8.0.

Análisis de propiedades mecánicas de películas PCL y PCL-g-PGAL

Las propiedades mecánicas se determinaron con una máquina de prueba Zwick Z2.5/TN1S (Zwick / Roell; Ulm, Alemania) en pruebas de tensión-deformación llevadas a cabo a una velocidad de deformación de 10 mm/min. La capacidad de la celda de carga fue de 100 kN y los parámetros mecánicos se evaluaron mediante el software de prueba Xpert de Zwick. Las medidas se delimitaron a la parte lineal de la determinación en muestras rectangulares (30×5×0.5 mm). Los parámetros mecánicos se promediaron a partir de un mínimo de seis mediciones para cada muestra.

Adhesión y proliferación celular

Vero (riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) y células epiteliales similares a MDCK (riñón canino Madin-Darby) (ATCC, USA.) se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina/estreptomicina al 1 %, y 2 mM de L-glutamina a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ y 95 % de aire. El medio de cultivo se cambió cada dos días y, para el subcultivo, las monocapas de células se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se separaron por incubación con tripsina EDTA (0.25%) a 37 °C durante 2–5 min. La concentración celular se determinó contando el número de células con una cámara Neubauer y empleando azul de tripano al 4% como colorante vital. Se utilizaron células separadas con viabilidad $\geq 95\%$ para los ensayos de cultivo celular.

Para la adhesión y la proliferación, los ensayos de películas PCL y PCL-g-PGAL se lavaron con PBS y etanol (70%) y se esterilizaron con UV durante 15 minutos. Las muestras se adhirieron a los pocillos (placa de cultivo de 24 pocillos) utilizando una pequeña gota de silicona (Silbione® MED ADH 4300 TRV, Bluestar Silicones France SAS, Lyon, Francia). Las células se sembraron en la superficie de la película por contacto directo. La adhesión celular se determinó después de 24 h porque es un evento temprano de colonización celular en las películas, mientras que la proliferación celular se determinó a los 7 días como punto final para demostrar el crecimiento y reproducción celular. La unión celular se evaluó considerando la relación entre el número de células adheridas y la viabilidad celular (es decir, el número de células adheridas en el control, denominado TCPS) para cada placa de pocillos cultivados. El recuento final de células se obtuvo mediante el ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; 5 mgml⁻¹). Cada muestra se evaluó en cuatro repeticiones y los resultados se promediaron y se representaron gráficamente. Para obtener imágenes de la morfología de las células procedentes de los ensayos de adhesión y proliferación, las muestras se fijaron durante la noche con formaldehído al 2.5% en PBS a 4 °C, y luego se lavaron cinco veces con PBS. Las muestras se tiñeron para microscopía de fluorescencia, específicamente, la actina se marcó con tinte de faloidina Alexa Fluor Atto-488 fluorescente verde, y el núcleo se marcó con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Luego, las muestras se observaron en un microscopio de escaneo láser confocal (LSM 900 Zeiss) y se microfotografiaron con una cámara controlada por el software ZEN 2.6 (edición azul) (Carl-Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemania).

Ensayo de protección celular contra el estrés oxidativo

Se utilizaron células MDCK y Vero separadas con una viabilidad $\geq 95\%$. La concentración citotóxica (LD_{50}) de AAPH, la viabilidad celular y la muerte celular (mortalidad) se determinaron con diferentes concentraciones de AAPH preparadas por dilución en el medio de cultivo. La citotoxicidad de AAPH se determinó a partir de alícuotas de 1 mL que contenían 5×10^4 células que se sembraron en una placa de cultivo de 24 pocillos durante 24 h para permitir la unión a la placa. Luego, se aspiró el medio y se añadieron medios de cultivo frescos complementados con varias concentraciones de AAPH. La viabilidad celular se determinó después de 24 h de incubación mediante el ensayo MTT y luego, se calculó la viabilidad relativa (%) para cada muestra como la relación entre la viabilidad de la muestra y el control (es decir, el medio sin AAPH). La citotoxicidad se evaluó utilizando cuatro repeticiones y los resultados se promediaron y se representaron gráficamente. La determinación de la viabilidad de las células MDCK y Vero se siguió de acuerdo con el mismo procedimiento. Por lo tanto, las células se incubaron durante 24 h en las muestras. Luego, los medios de cultivo se reemplazaron con medio fresco que tenía la concentración correspondiente para a la LD_{50} de AAPH determinada para cada línea celular. Finalmente, la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT. Los resultados se expresaron en relación con los obtenidos con muestras cultivadas en el medio sin AAPH como control.

Resultados y discusión

La PCL es ampliamente utilizada para aplicaciones biomédicas debido a su alta biocompatibilidad, propiedades mecánicas y baja toxicidad [142]. La producción enzimática

de este polímero en un disolvente orgánico tipo fluido comprimido, como se indicó en informes anteriores, proporciona un material no tóxico con propiedades adecuadas para anclar PGAL [141, 143]. Para ello, la superficie de las películas del PCL enzimática se hidrolizó parcialmente mediante un tratamiento con álcali para tener grupos hidroxilo/carboxilo disponibles y suficientes para el injerto [144] inducido por irradiación UV en condiciones ácidas, el esquema de la ruta de síntesis se ilustra en la Figura 26. El espectro de $^1\text{H-NMR}$ no resuelto de PGAL, como se describió anteriormente [139], impide la determinación de la relación molar entre PGAL y PCL injertada a pesar de que los espectros para copolímeros muestran señales asignadas a PCL.

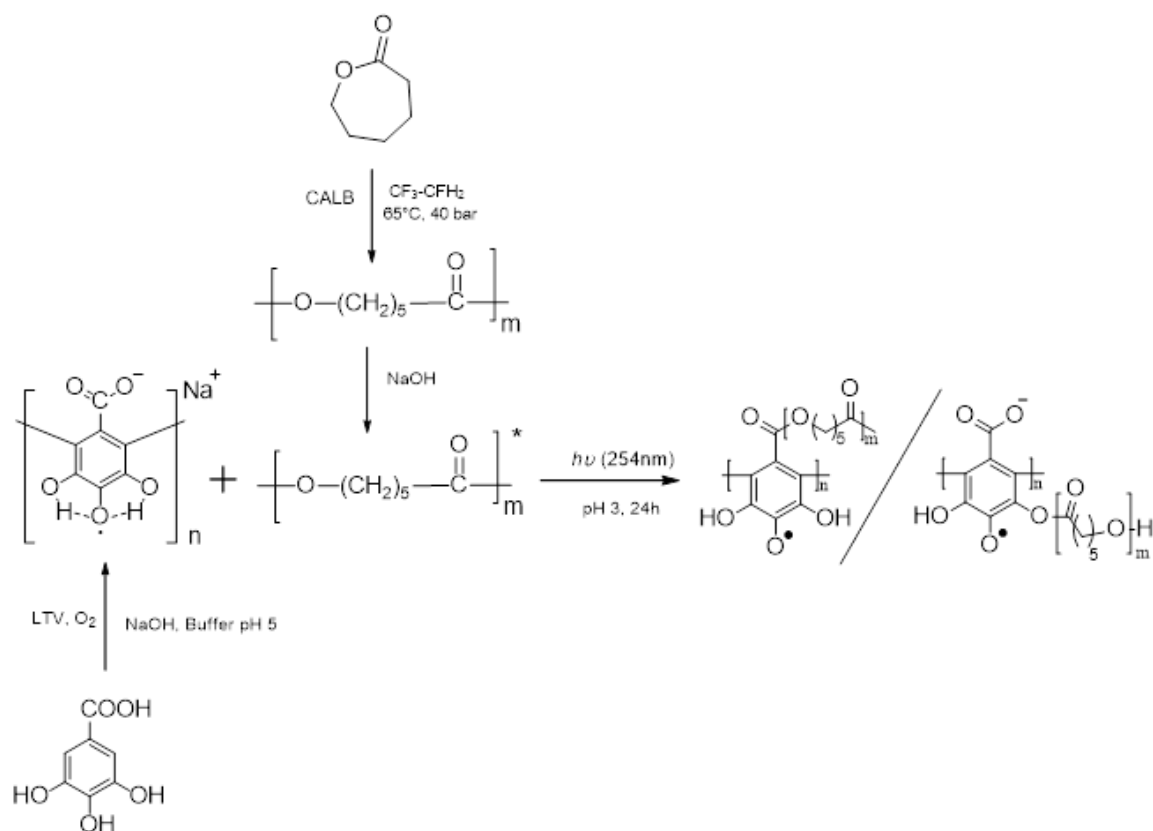


Figura 26. Representación esquemática de la ruta sintética a PCL-g-PGAL

El espectro CP/MAS ^{13}C -NMR para PCL-g-PGAL (Figura 27) muestra las señales típicas asociadas a PCL [145] con otra señal a δ (ppm) = 165.49 ppm (etiqueta b en el espectro) que puede ser asignada al carbono carbonílico de PGAL. Además, hay señales relacionadas con los carbonos aromáticos de PGAL (etiqueta c en el espectro) a δ (ppm) = 134.3 (C-C), 127.45 (C-COO) y 126.41 (CO), lo que confirma la estructura molecular de PGAL informada con anterioridad [139].

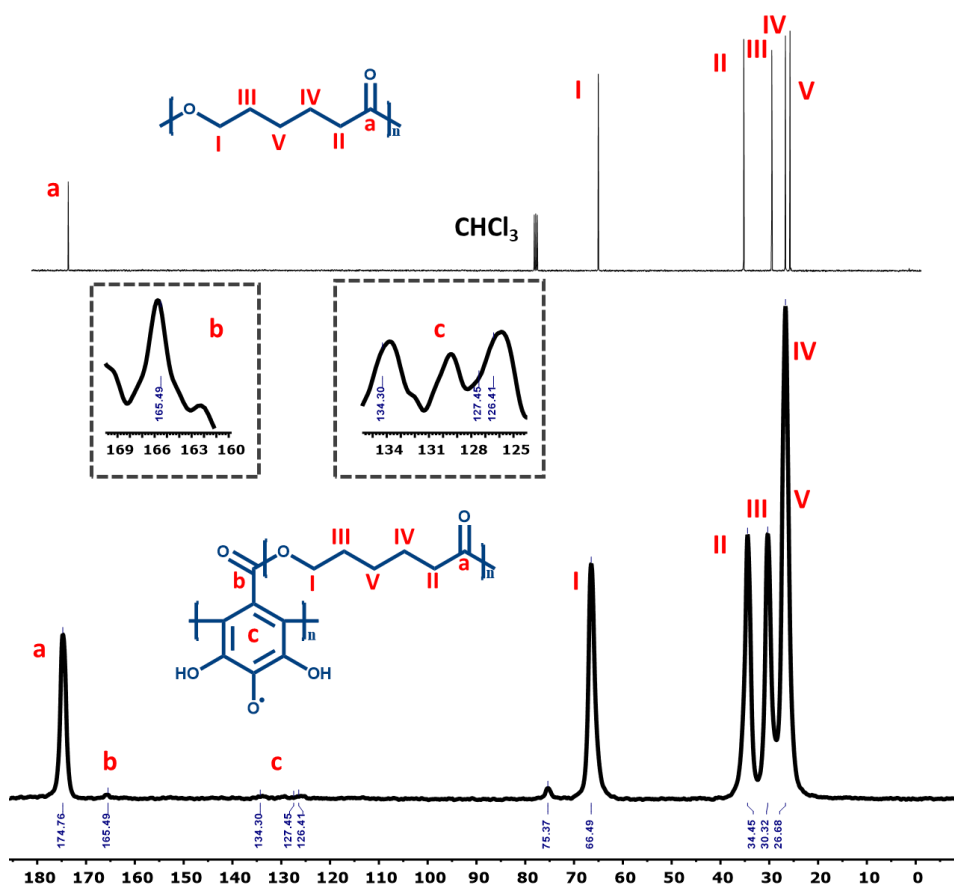


Figura 27. Espectro representativo de ^{13}C -RMN (arriba) y CP/MAS ^{13}C -RMN de PCL (en CDCl_3) y PCL-g-PGAL (fondo) para comparación, tomado a 400 MHz con frecuencia de rotación de 10 kHz.

Los espectros de FTIR también corroboran el injerto (Apéndice C-68), con la ausencia de las bandas correspondientes al estiramiento de COO⁻ en $\nu = 1580$ y 1388 cm^{-1} de PGAL. En cambio, hay una banda en $\nu = 1722 \text{ cm}^{-1}$ (estiramiento C=O) indicativa del éster formado y dos bandas adicionales en $\nu = 1635$ y 1592 cm^{-1} asignadas a los enlaces aromáticos C=C. Como se esperaba, los espectros UV (Apéndice C-69) no muestran absorción para PCL, pero, por el contrario, se detectaron bandas de absorción asociadas a transiciones $\pi-\pi^*$ en los espectros PGAL y PCL-*g*-PGAL.

Los espectros XPS de las superficies de película PCL, PCL-OH, PGAL y PCL-*g*-PGAL se muestran en la Figura 28, y la composición atómica correspondiente se compara en la Tabla 7. Los espectros básicos de C1s de PCL corresponden a cuatro curvas con energías de enlace de 284.78, 286.17, 287 y 288.76 eV que se asignan fácilmente a los carbonos C-H, C-O, C=O y O-C=O [146] (Figura 28a). Se obtuvieron curvas similares para PCL-OH (Figura 28b) debido al bajo grado de hidroxilación. Se puede prever algo de Na residual del tratamiento básico.

La señal PGAL C1s consta de cuatro componentes a 284.67, 286.15, 287.84 y 288.86 eV que corresponden a carbonos C=C, C-OH, C=O y O-C=O, respectivamente (Figura 28c). Finalmente, el espectro PCL-*g*-PGAL muestra cuatro picos con energías de 284.74, 286.21, 287.61 y 288.73 eV que pueden asignarse a los carbonos C=C y CH, C-OH, C=O y O-C=O, respectivamente (Figura 28d). El aumento de intensidad para el pico a 288 eV demuestra el aumento de grupos éster por el injerto. Además, la aparición de la señal de Na 1s en el espectro PCL-*g*-PGAL confirma el injerto de PGAL (recuadro, Figura 28d). La

concentración de la superficie se puede expresar mediante la relación $[Na]/[C]$ (determinada a partir de la relación del área espectral de alta resolución de Na 1s y C1s corregida por factores sensibles de las superficies PCL-g-PGAL). La relación $[Na]/[C]$ para las películas PCL y PCL-g-PGAL va de 7.5×10^{-4} a 6.55×10^{-3} debido al contenido de polifenoles.

La determinación del rendimiento del injerto sigue la ecuación $GY = (W_a - W_b)/A$, [144] donde W_b y W_a son los pesos de las muestras de película seca antes y después de la reacción, respectivamente, y A es el área de la película. El rendimiento del injerto fue $0.16 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$.

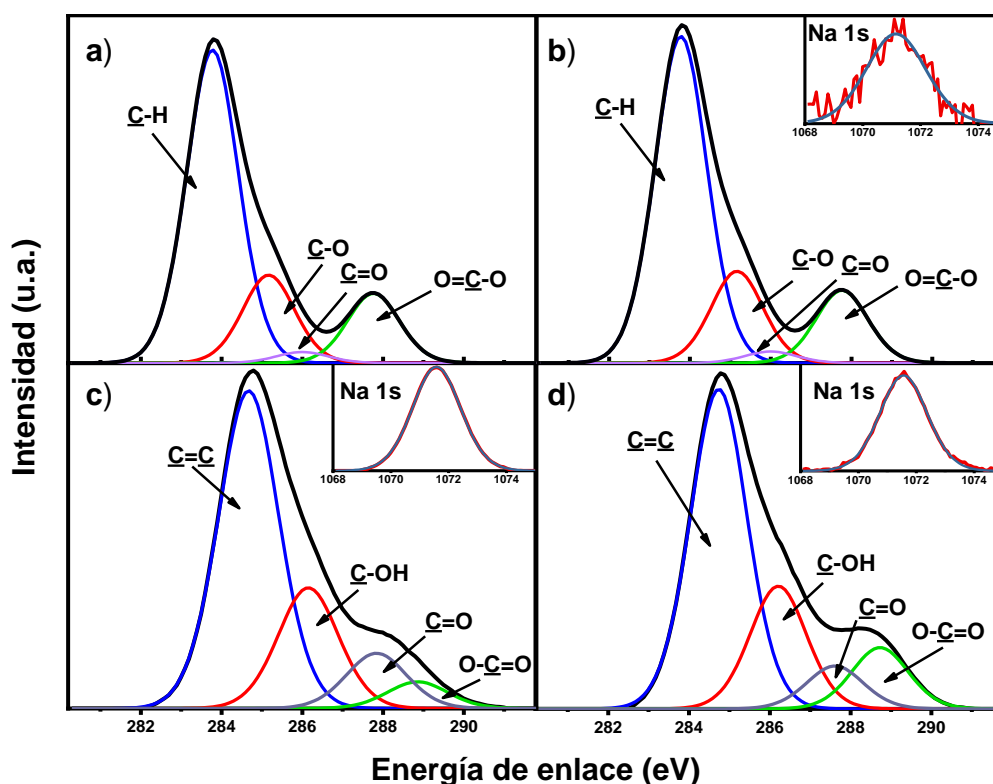


Figura 28. Espectros XPS de alta resolución (C 1s) para PCL (a), PCL-OH (b), PGAL (c) y PCL-g-PGAL (d) y espectros de Na 1s para PCL-OH (recuadro b), PGAL (recuadro c) y PCL-g-PGAL (recuadro d). También se muestran los picos de la deconvolución (la línea negra corresponde al perfil experimental y las líneas de color a los picos deconvolucionados).

Tabla 7. Composición porcentual atómica (C 1s, O 1s, Na 1s) obtenida por XPS para PCL, PCL-OH, PGAL y PCL-g-GAL.

	C 1s	O 1s	Na 1s
PCL	78.50	20.67	-
PCL-OH	77.00	20.51	0.06
PGAL	71.05	26.00	0.45
PCL-g-PGAL	69.93	26.78	0.46

Topografía y morfología de las muestras.

Las micrografías SEM y las imágenes topográficas de muestras tomadas antes y después del injerto se muestran en la Figura 29 y 30, respectivamente. La superficie de las muestras de PCL es lisa o con dos niveles diferentes de rugosidad (R1 y R2) dependiendo del molde de vidrio donde se prepararon las películas por fundición.

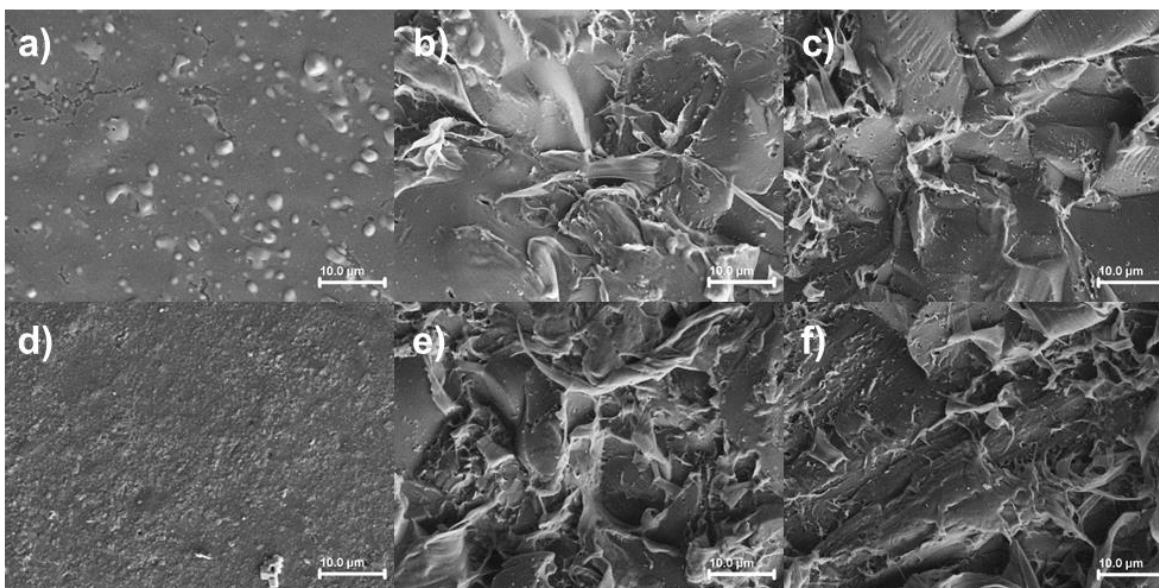


Figura 29. SEM micrographs showing the surface morphology of PCL (a), PCL_{R1} (b), PCL_{R2} (c), PCL-g-PGAL (d), PCL-g-PGAL_{R1} (e) and PCL-g-PGAL_{R2} (f).

La perfilometría de contacto con el índice R_q demuestra claramente que el injerto de PGAL en las películas de PCL tiene un efecto sobre el nivel de rugosidad, por ejemplo, el R_q promedio que se muestra en la Tabla 8 es 2.9 ± 0.24 y 4.1 ± 0.19 μm para PCL y PCL-g-PGAL respectivamente ($P < 0.05$). Sin embargo, las muestras R2 (PCL_{R2} o PCL-g-PGAL_{R2}) tienen un nivel de rugosidad que duplica el de las muestras R1 (PCL_{R1} o PCL-g-PGAL_{R1}). Estos cambios en la rugosidad de las superficies tendrán efectos sobre las propiedades mecánicas y de humectabilidad de estos nuevos materiales, como se demostrará más adelante.

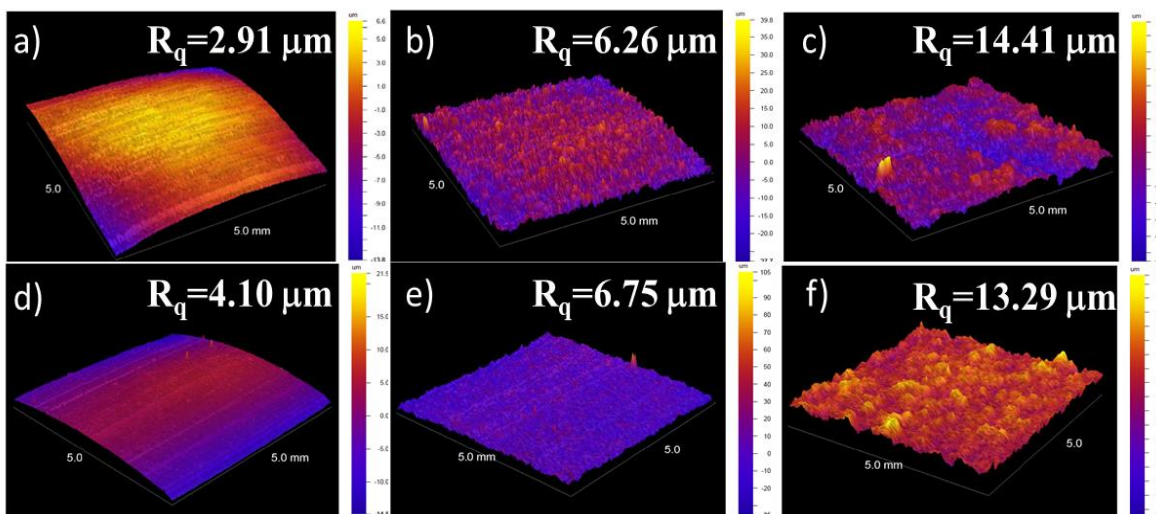


Figura 30. Imágenes topográficas en 3D de PCL (a), PCL_{R1} (b), PCL_{R2} (c), PCL-g-PGAL (d), PCL-g-PGAL_{R1} (e) and PCL-g-PGAL_{R2} (f).

Cristalinidad y comportamiento térmico.

La Figura 31 muestra series de calentamiento y enfriamiento DSC de muestras representativas (es decir, películas PCL y PCL-g-PGAL). La primera exploración de calentamiento de la muestra de película de PCL mostró un pico endotérmico claro a 60.3 $^{\circ}\text{C}$

que está asociado a su fusión. La muestra injertada con PGAL tenía un pico de fusión similar (i.e., 62.2 °C) pero una entalpía claramente más alta (i.e., 121.2 J/g con respecto a 102.1 J/g), después de la corrección por la composición experimental. Por lo tanto, parece que el injerto de PGAL facilitó la cristalización de PCL, probablemente debido a un efecto de nucleación.

Se observó un pico exotérmico indicativo de la cristalización durante la ejecución de enfriamiento de PCL ($T_c = 31.1$ °C, $\Delta H_c = 71.5$ J/g). Sin embargo, para la muestra injertada, este pico se hizo más amplio (es decir, la temperatura de inicio ligeramente invertida) y tuvo una mayor entalpía (81.6 J/g) de acuerdo nuevamente con el efecto de nucleación indicado.

La comparación de los segundos escaneos de calentamiento indica una ligera disminución de la temperatura de fusión para la muestra injertada (i.e., de 55.2 a 54.1 °C). Sin embargo, el cambio no parece significativo. Lógicamente, y de acuerdo con el ciclo de enfriamiento, la entalpía de fusión aumentó claramente para la muestra injertada. Los grados de cristalinidad se pueden estimar a partir de datos calorimétricos teniendo en cuenta el valor de 139.3 J/g que se determinó para una muestra cristalina 100 % [147].

Para verificar el aumento de la cristalinidad de la muestra injertada, también se registraron patrones WAXD. La Figura 32 muestra los perfiles WAXD para dos muestras representativas: PCL y PCL-g-PGAL. La deconvolución de los perfiles WAXD mostró dos halos amorfos a 0.443 y 0.373 nm y tres picos de Bragg a 0.417 nm, 0.406 nm y 0.376 nm que corresponden a las reflexiones (110), (111) y (200) de PCL [148]. La cristalinidad

después del injerto de PGAL en la película PCL mostró un aumento del 52.6 % al 69.8 %, un resultado que está totalmente de acuerdo con las observaciones de DSC.

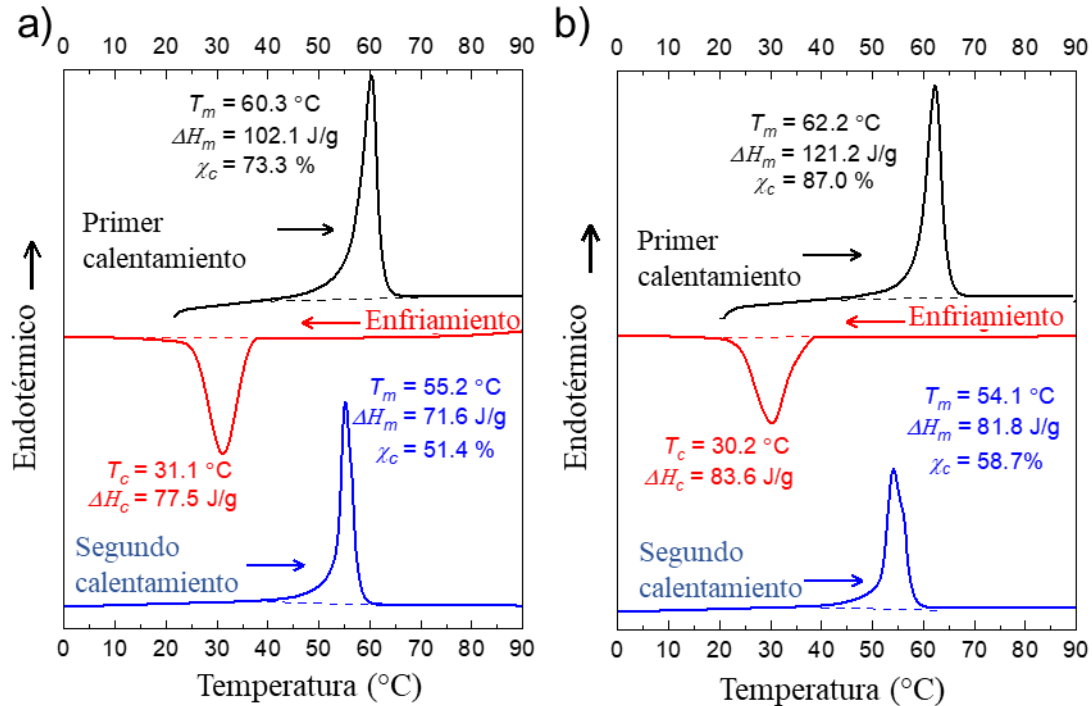


Figura 31. Series de calentamiento y enfriamiento DSC de PCL (a) y PCL-g-PGAL (b).

Propiedades mecánicas

La resistencia máxima a la tracción a la rotura y el módulo de Young de las diferentes películas se resumen en la Tabla 8. Se puede concluir que la variación en las propiedades mecánicas no es resultado del injerto, ya que no existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre PCL y películas de PCL-g-PGAL, a pesar de la evidencia de que el injerto de polifenoles tiene influencia sobre la rugosidad de los materiales. No obstante, la rugosidad de la superficie de los materiales en los niveles micro y nanoestructurados debe considerarse con respecto a las propiedades mecánicas [149]. La influencia de esta característica en la

resistencia de los materiales a la tensión es evidente en nuestros resultados. Por lo tanto, PCL y PCL-g-PGAL mostraron una resistencia similar a la tracción, 22.5 y 20.8 MPa, respectivamente.

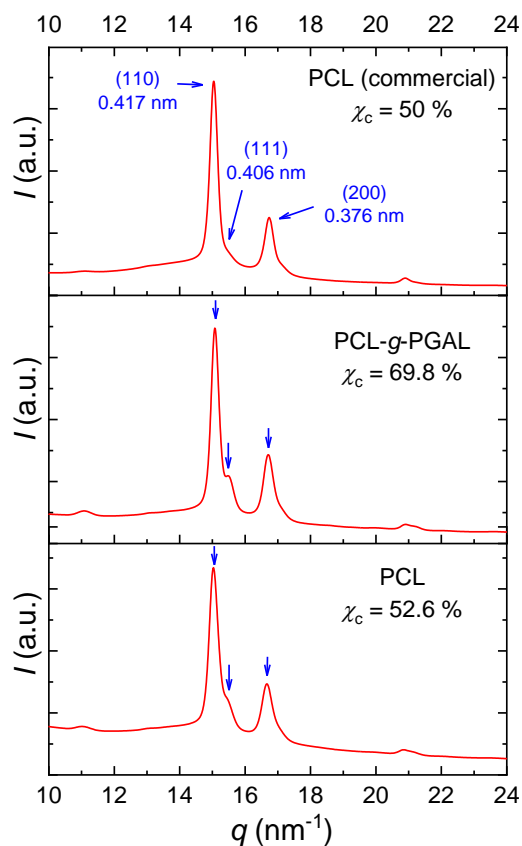


Figura 32. Perfiles de difracción de rayos X de ángulo amplio (WAXD) de PCL, PCL-g-PGAL y granulado comercial de PCL ($M_w = 45,000$ g/mol) utilizado como referencia.

Sin embargo, las películas de PCL y PCL-g-PGAL modificadas en su rugosidad fueron significativamente menos resistentes a la resistencia a la tracción, y disminuyeron estos valores al intervalo de 13-18 MPa. Además, este efecto fue similar para los dos grados de rugosidad de la película (R1 y R2). El módulo de Young mostró el mismo comportamiento y específicamente PCL y PCL-g-PGAL tuvieron valores similares de 2.7 y 3.1 MPa,

respectivamente. Sin embargo, el módulo aumentó después del injerto de acuerdo con el aumento de cristalinidad indicado anteriormente.

Además, las películas rugosas (R1 y R2) tenían módulos significativamente más pequeños con valores en el rango de 1.2-1.7 MPa (Tabla 8). Esta pérdida de resistencia a la tracción reduce a su vez la rigidez de las películas; y disminuye el riesgo de fractura, siendo un efecto positivo ya que las fuerzas mecánicas de corte pueden inducir necrosis de los tejidos circundantes. En resumen, los nuevos materiales son suaves y flexibles, características deseadas en los biomateriales [150].

Tabla 8. Propiedades mecánicas de las películas. Los valores son la media \pm SD ($n = 6$).

Material	Rugosidad (μm)	σ_v (MPa)	Módulo de Young (MPa)	Espesor (mm)	Rendimiento de injerto (mg/cm^2)
PCL	2.9 \pm 0.24	22.5 \pm 1.2	2.7 \pm 0.2	0.71 \pm 0.02	-
PCL _{R1}	6.3 \pm 0.15	13.8 \pm 2.3*	1.2 \pm 0.1*	0.62 \pm 0.03	-
PCL _{R2}	14.4 \pm 0.35	13.0 \pm 1.1*	1.2 \pm 0.1*	0.64 \pm 0.01	-
PCL-g-PGAL	4.1 \pm 0.19**	20.8 \pm 0.8	3.1 \pm 0.2	0.65 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02
PCL-g-PGAL _{R1}	6.8 \pm 0.13**	17.7 \pm 2.0*	1.7 \pm 0.1*	0.53 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02
PCL-g-PGAL _{R2}	13.3 \pm 0.22**	12.8 \pm 1.5*	1.3 \pm 0.2*	0.51 \pm 0.03	0.15 \pm 0.01

** En el nivel de confianzas 0.05, las medias poblacionales con PGAL son significativamente diferentes.

* En el nivel de confianza 0.05, las medias poblacionales de rugosidad son significativamente diferentes.

En el nivel de confianza 0.05, las medias poblacionales de PGAL no son significativamente diferentes.

En el nivel de confianza 0.05, la interacción entre PGAL y rugosidad no es significativa

Mojabilidad y energía de superficie

Los ángulos de contacto (θ) determinados usando gotas de agua (Tabla 9) indican que las películas de PCL son materiales hidrófobos (i.e., $\theta = 90.5^\circ$) antes de la modificación de la superficie con PGAL. Después del injerto, hay un aumento significativo en la

humectabilidad, que podría atribuirse a la higroscopia del PGAL. Específicamente, el ángulo de contacto disminuyó a 60.6° . Sin embargo, la modificación de la rugosidad de la superficie produjo diferentes efectos en las películas. Por ejemplo, PCL_{R1} y PCL_{R2} aumentaron su hidrofobicidad con el aumento de la rugosidad (i.e., los valores de θ fueron de 95.6° y 105.8° , respectivamente). Se observaron comportamientos similares usando distintos medios acuosos como PBS, DMEM y etilenglicol. Se detectó una mayor humectabilidad cuando se analizaron disolventes de baja polaridad tales como formamida, DMSO y carbonato de propileno.

En el caso de las películas $PCL-g-PGAL_{R1}$ y $PCL-g-PGAL_{R2}$, el aumento de la rugosidad produjo una mayor hidrofilia superficial, siendo valores de 45.6° y 40.6° , respectivamente. Se obtuvieron comportamientos similares también con los líquidos indicados anteriormente de menor polaridad, lo que dio valores de ángulo de contacto en el rango de 40° - 20° (Tabla 9). Los ángulos de contacto determinados en PBS y DMEM (es decir, líquidos que son similares a fluidos biológicos) son notables, siendo valores similares a los encontrados con agua ($\Delta\theta \leq 4.6^\circ$ y $\Delta\theta \leq 5.7^\circ$, respectivamente). La notable disminución del ángulo de contacto en la muestra injertada sugiere una reducción de la hidrofobicidad causada por la interacción entre el PGAL y las proteínas (contenidas en el DMEM). Este efecto de absorción es un evento deseado.

En general, el efecto de la rugosidad sobre la humectabilidad de los materiales puede ser explorado por la ecuación de Wenzel (7), donde la rugosidad de una superficie (r) disminuye el ángulo de contacto si $\theta < 90^\circ$, mientras que aumenta el ángulo de contacto a $\theta > 90^\circ$.

$$\cos \theta_{\text{apparent}} = r \cdot \cos \theta_{\text{true}} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Por lo tanto, los ángulos de contacto están influenciados no solo por la estructura química en la superficie sino también por la morfología de los materiales. No obstante, la humectabilidad de la superficie aumenta con el injerto de PGAL, lo que evidencia el impacto del polifenol mediado por enzimas en la energía de la superficie. Se espera que estos resultados, que concuerdan con los datos del ángulo de contacto, sean ventajosos para aplicaciones biomédicas hacia la adhesión celular mejorada y su proliferación, como ya se ha informado [151, 152].

Tabla 9. Descripción general de los ángulos de contacto medidos en los diferentes materiales y la energía de la superficie relacionada con el modelo Zisman. Los valores son la media \pm SD ($n = 10$).

Disolvente	PCL	PCL _{R1}	PCL _{R2}	PCL-g-PGAL	PCL-g-PGAL _{R1}	PCL-g-PGAL _{R2}
Agua	90.5 \pm 2.8	95.6 \pm 2.5	105.8 \pm 4.9	60.6 \pm 1.1	45.6 \pm 2.2	40.6 \pm 1.2
PBS^a	88.3 \pm 2.8	100.2 \pm 1.7	107.5 \pm 3.8	62.3 \pm 2.3	49.8 \pm 2.6	39.5 \pm 2.0
DMEM^b	85.0 \pm 2.8	99.8 \pm 3.7	106.7 \pm 4.0	54.9 \pm 1.6	45.0 \pm 2.8	35.7 \pm 1.5
Etilenoglicol	59.7 \pm 0.7	61.4 \pm 1.8	75.5 \pm 1.6	56.7 \pm 2.2	38.2 \pm 1.5	33.5 \pm 1.6
Formamida	64.7 \pm 1.0	64.7 \pm 2.2	54.6 \pm 2.2	51.7 \pm 1.1	39.5 \pm 1.4	33.0 \pm 1.0
DMSO	40.4 \pm 0.9	33.8 \pm 1.4	30.9 \pm 1.2	33.9 \pm 1.3	20.1 \pm 0.2	20.3 \pm 1.3
Carbonato de propileno	39.7 \pm 2.3	33.0 \pm 2.4	25.7 \pm 1.3	39.9 \pm 2.2	34.5 \pm 0.7	27.3 \pm 0.8
Energía superficial^c (mN/m)						
	31.4 \pm 0.2	35.1 \pm 0.1	34.8 \pm 0.3	20.5 \pm 0.3	25.7 \pm 0.3	24.4 \pm 0.5

^a Buffer de fosfatos (PBS)

^b Medio Dulbecco Eagle Modificado

^cModelo Zisman[153]

Adhesión y proliferación de células epiteliales

La adhesión de las células MDCK y Vero en las diferentes películas se muestra en la Figura 33a, donde los porcentajes de viabilidad relativa están relacionados con el control TCPS

(placa de cultivo). En todos los casos, la cantidad de células adheridas es mayor para los materiales modificados con PGAL. Estos resultados, respaldados por la caracterización del material, corroboran la hipótesis de que la funcionalización de PCL con PGAL es un enfoque prometedor para modificar las interfaces entre el biomaterial y las células. Por lo tanto, un mayor número de células se unió a la superficie del material. La Figura 33b muestra la viabilidad celular evaluada a través de la proliferación de células MDCK y Vero después de 7 días de cultivo. La adhesión celular tiene mecanismos tempranos de acondicionamiento de superficies. Las células epiteliales, a diferencia de los fibroblastos, requieren una mayor superficie de contacto para su adhesión (basolateral). Las células sembradas en la superficie provienen de un proceso de desprendimiento (como tripsinización y centrifugación) y por lo tanto tienen un grado de estrés en su membrana, por lo que una superficie acondicionada con PGAL podría mejorar la adherencia. Durante el cultivo se requieren cambios en el medio de cultivo cada 48 h porque, por un lado, los nutrientes se agotan y, por otro lado, como producto del metabolismo celular, el medio se oxida. Entonces, tener PGAL en la placa de cultivo debería favorecer que el medio sea menos oxidativo y, en consecuencia, se observan mejoras en la proliferación.

Los resultados obtenidos con las diferentes rugosidades y matrices injertadas fueron significativamente mejores para las muestras de PCL-*g*-PGAL_R que las determinadas para las superficies no rugosas y no funcionalizadas, así como para el control. Vale la pena señalar que la proliferación celular aumenta con la rugosidad solo para las películas con PGAL injertado en la superficie, independientemente del tipo de célula epitelial analizada.

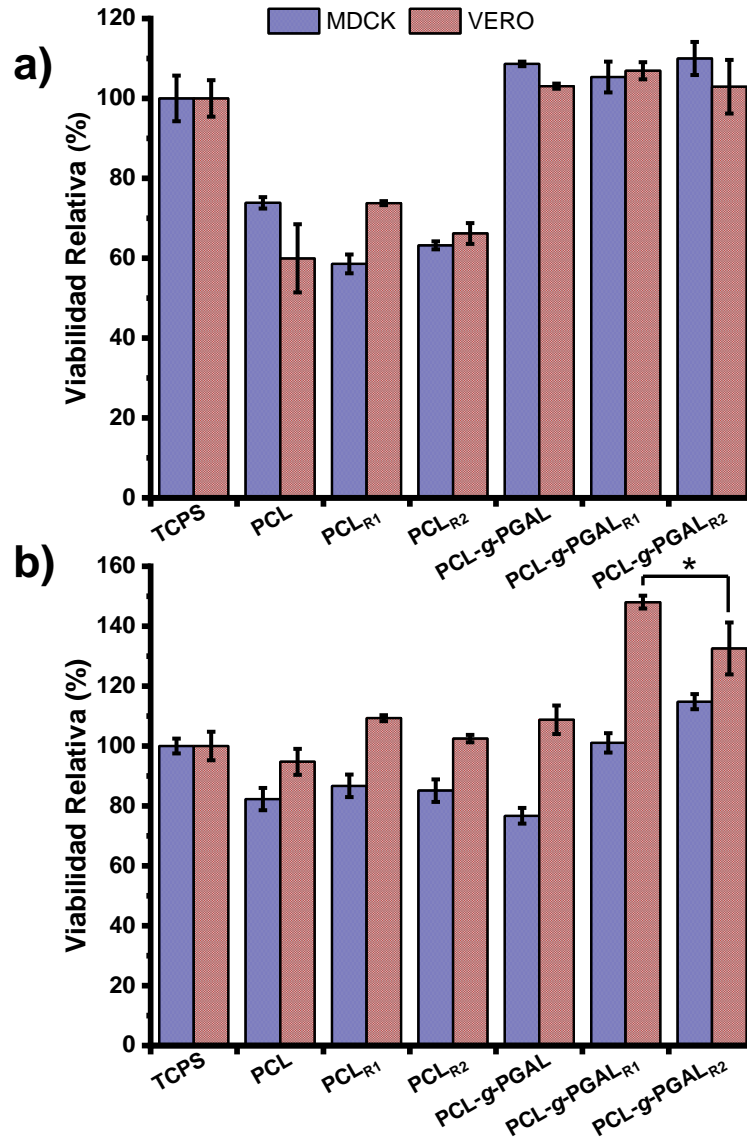


Figura 33. Adhesión celular (a) y proliferación celular (b) para células MDCK (azul) y Vero (red) a las muestras indicadas. La viabilidad relativa se refiere al control TCPS (placa de cultivo de tejidos). * $p < 0.05$ vs control (TCPS).

Los ensayos de proliferación indicaron que la respuesta de las células al material antioxidante después de 7 días se mejoró en la molécula objetivo en comparación con la determinada para el material sin el polifenol enzimático. Por lo tanto, el comportamiento como material

bioactivo se mejora claramente para muestras rugosas de PCL-*g*-PGAL_R, una conclusión que refleja la importancia de la estructura química y la topografía de la superficie.

Estudios previos sobre polímeros funcionalizados con polifenoles para combatir el estrés oxidativo describieron que el aumento de los grupos hidroxilo disponibles aumenta la citotoxicidad debido a los efectos pro-oxidativos [154]. De acuerdo con eso, se necesita precaución cuando se usan fitoquímicos con contenido de grupos hidroxilo. El precursor AG tiene tres grupos hidroxilo en el anillo de benceno, sin embargo, como se demostró anteriormente, el PGAL es un polianión multirradical a pH fisiológico en sus condiciones de síntesis enzimática [139].

Es importante destacar que el mecanismo antioxidante SET difiere del descrito para los polifenoles unidos a polímeros en informes anteriores y debe tenerse en cuenta que las actividades biológicas de los compuestos fenólicos están correlacionadas con sus estructuras químicas. Es de destacar que el PGAL tiene una LD₅₀ (i.e., para VERO = 0.221 mg/ml y MDCK = 1.124 mg/ml) [63] que es mayor que la de AG para el mismo tipo de células (i.e., 5.88 µg/ml) [155].

No obstante, el rendimiento del injerto de PGAL es de 0.16 mg/cm² en promedio, por lo que para el volumen de 1 mL para 1 cm² de material en el experimento realizado es una cantidad insuficiente para alcanzar la dosis letal promedio; es por eso que tanto la adhesión celular como la proliferación no se ven afectadas en los cultivos estudiados. Por otro lado, la proliferación celular aumenta con la rugosidad solo para los materiales que tienen PGAL en su superficie, lo que se ha atribuido a las características de humectabilidad de los materiales.

La energía superficial está fuertemente correlacionada con la absorción de proteínas que forman la interfaz con las células, por lo tanto, los materiales ideales son aquellos que tienen características hidrofílicas ya que permiten una absorción ordenada de proteínas, y por tanto promueven la mejor adhesión y proliferación celular.

Se ha informado que los sustratos no humectantes dan como resultado la desnaturalización de las proteínas, exponiendo los residuos hidrófobos internos de las proteínas y evitando la interacción específica entre la proteína adsorbida y las células [156]. Esto explica el método recurrente de funcionalización de superficies con polifenoles para convertir materiales hidrófobos poco biocompatibles en materiales ampliamente biocompatibles [157-159].

En conclusión, nuestros resultados se correlacionan bien con los resultados anteriores sobre el efecto protector contra el estrés oxidativo en células en polímeros derivados de AG [160, 161]. La morfología de las células cultivadas en la superficie de las películas se muestra en la Figura 34. Como ejemplo, la disposición monocapa de células Vero de tipo epitelial se muestra en la superficie de PCL (Figura 34a-c) y en las superficies de la PCL-g-PGAL (Figura 34d-f).

Estudio de protección celular contra el estrés oxidativo.

Para determinar la capacidad antioxidante de los derivados de PGAL, se empleó el método de inhibición de DPPH debido a su alta estabilidad y simplicidad. El RSA medido por espectroscopia UV, que se muestra en la Figura 35, demuestra la inhibición proporcional del radical DPPH con el aumento de la concentración de PCL-g-PGAL. Por lo tanto, PCL-g-PGAL retuvo la capacidad antioxidante de PGAL (i.e., $IC_{50} = 23.48 \mu\text{g/mL}$) con una IC_{50}

medida alrededor de 115 $\mu\text{g/mL}$ para cada nivel de rugosidad sin diferencias significativas entre las muestras de PCL-g-PGAL; además, este resultado sugiere una cantidad similar de PGAL injertada sobre PCL para cada rugosidad, ya que la capacidad antioxidante del polímero injertado se relaciona únicamente con el polifenol.

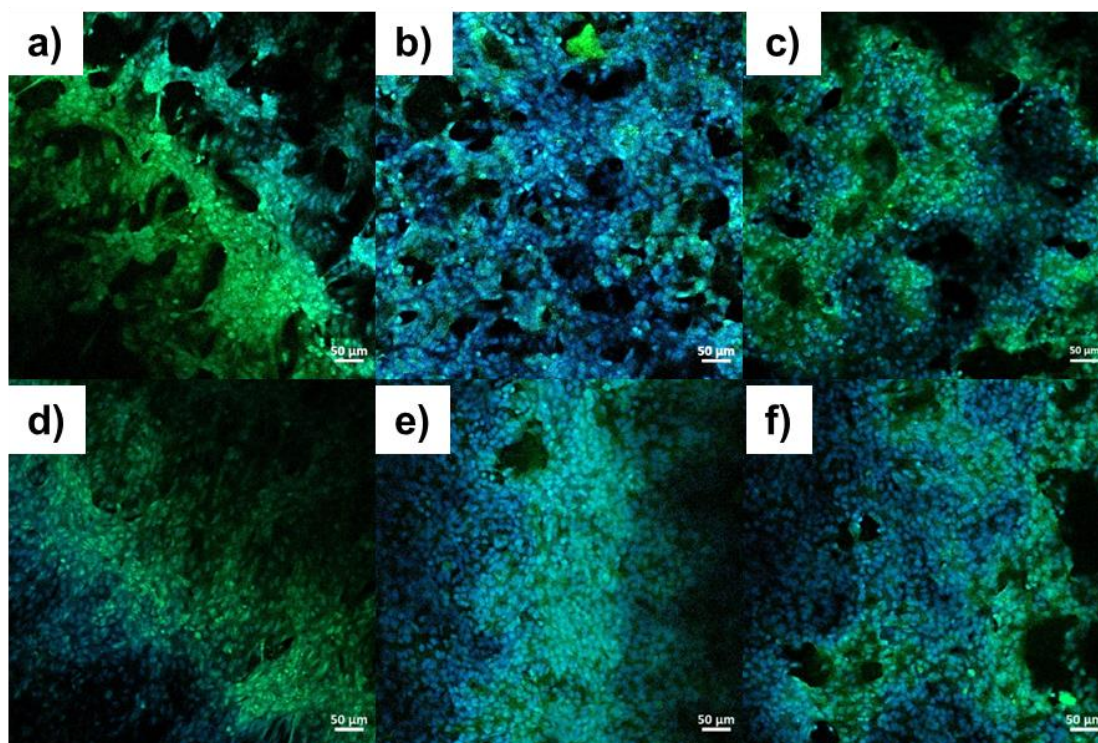


Figura 34. Imágenes de la proliferación de células Vero en películas de PCL (a), PCL_{R1} (b), PCL_{R2} (c), PCL-g-PGAL (d), PCL-g-PGAL_{R1} (e) y PCL-g-PGAL_{R2} (f). Las células se tiñeron con reactivos fluorescentes bisbenzimidazole H y faloidina y se observaron por microscopía confocal (barra de escala = 50 μm).

Cabe señalar que estos resultados se correlacionan bien con informes anteriores sobre la eliminación de radicales de polifenoles, donde la introducción de estas especies mejora la capacidad antioxidante como lo demuestra el ensayo de DPPH [154]. Animados por estos resultados, decidimos investigar la misma acción de nuestro injerto en células vivas expuestas al estrés oxidativo inducido por AAPH. Esta molécula se descompone lentamente a 37 °C y

pH = 7.4 y libera una corriente constante de radicales peróxido solubles en agua en condiciones fisiológicas similares a las del organismo [162].

Este enfoque mejora el uso del daño celular inducido por peróxido de hidrógeno, ya que los radicales peróxido atacan los ácidos grasos insaturados en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) para iniciar la oxidación de lípidos y formar hidroperóxido. La oxidación de LDL iniciada por radicales peróxido está estrechamente relacionada con la oxidación de LDL en condiciones fisiológicas humanas en comparación con otros modelos *in vitro*. Las LDL oxidadas son más aterogénicas que las LDL nativas y sirven como factores quimiotácticos en el reclutamiento de los monocitos circulantes, que son precursores de macrófagos involucrados en el proceso inflamatorio [98, 163-166]. Este estudio demuestra el efecto antioxidante de los materiales derivados de PGAL hacia su uso potencial como agente antiinflamatorio al limitar la oxidación de LDL y, por lo tanto, el reclutamiento de monocitos.

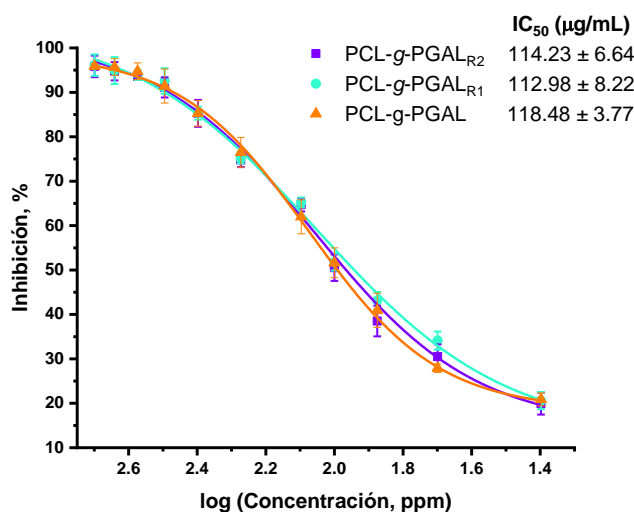


Figura 35. Reducción del radical DPPH en presencia de PCL-g-PGAL (▲), PCL-g-PGALR1 (●), PCL-g-PGALR2 (■). Los valores se expresan como el porcentaje promedio de inhibición de DPPH en 3 experimentos.

La Figura 36 muestra las curvas experimentales de citotoxicidad para AAPH. Estos datos permitieron determinar las dosis letales medias (LD_{50}) para las células estudiadas. Las células MDCK fueron las más susceptibles con $LD_{50} = 13.8$ mM claramente inferior a la determinada para las células Vero ($LD_{50} = 30.6$ mM).

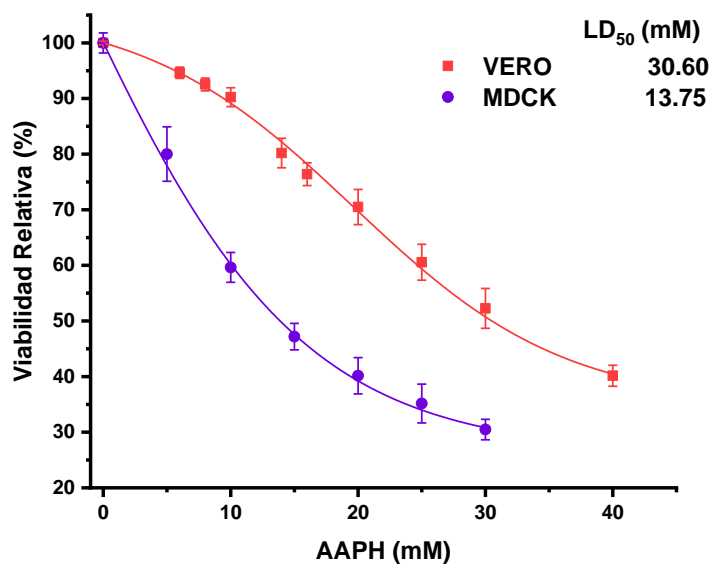


Figura 36. Curvas de citotoxicidad de AAPH para células Vero y MDCK.

La Figura 37 muestra la viabilidad de las células Vero y MDCK a las 24 h de cultivo y bajo las dosis LD_{50} de AAPH. Según el análisis estadístico, la presencia de PGAL y el cambio en la rugosidad de la superficie, así como la interacción entre ambos factores mejoraron significativamente ($p < 0.05$) la respuesta celular al estrés oxidativo. Claramente, la actividad de las proteínas absorbidas fue alterada por las características de los materiales. Probablemente, ocurren cambios conformacionales durante la absorción [167] por lo que la reducción del estrés oxidativo causado por los radicales libres de AAPH difiere significativamente entre las muestras.

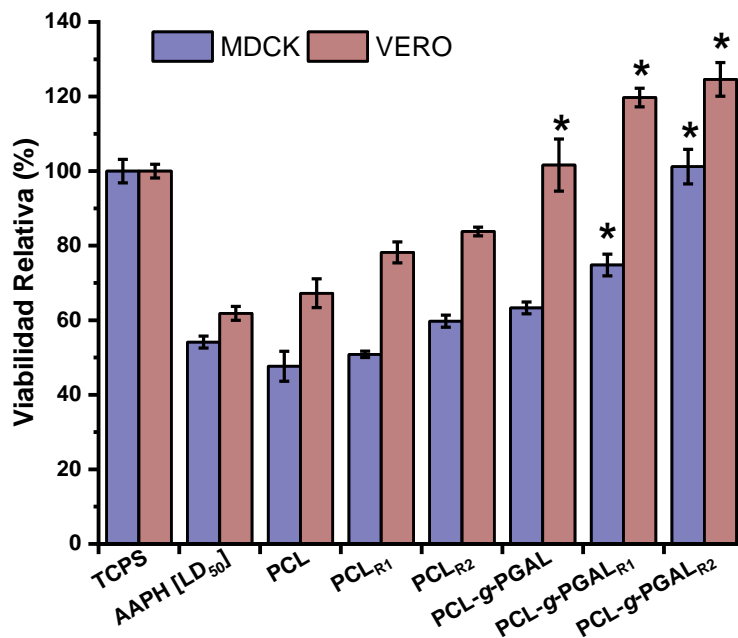


Figura 37. Efecto antioxidante en líneas celulares MDCK y Vero cultivadas en la superficie de las películas durante 24 horas y utilizando el LD₅₀ de AAPH. TCPS (placa de cultivo) como control. * $p < 0.05$ vs control tratado con AAPH.

Como ejemplo, la morfología de las células epiteliales Vero cultivadas en la superficie de la película después del ataque ROS se muestra en la Figura 38. El daño hacia la formación de la disposición de monocapa celular es evidente en las películas de PCL (Figura 38a-c), mientras que el orden de la monocapa se mantiene a pesar del ataque oxidativo para los materiales injertados con polifenol (Figura 38d-f). Las células de la superficie de PCL, PCL_{R1} y PCL_{R2} parecen más grandes que las células de las superficies injertadas. Este hecho es característico de las células epiteliales, como MDCK y Vero, entre otras. Se ha demostrado que estas células disminuyen de tamaño en función de la densidad celular. Esta observación estaría de acuerdo con nuestros resultados y está sustentada en los trabajos de Puliafito et al. (2012) [168] y Tlili et al. (2018) [169].

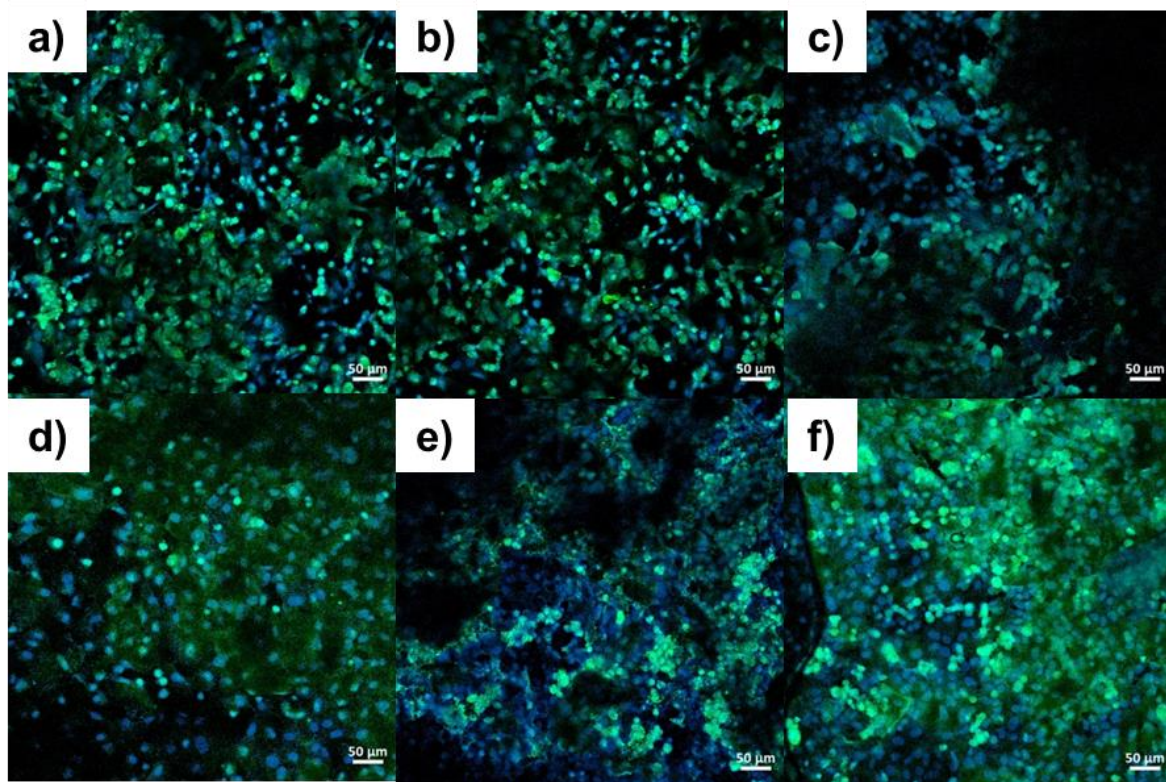


Figura 38. Imágenes de células Vero después de la prueba de estrés oxidativo en películas de PCL (a), PCL_{R1} (b), PCL_{R2} (c), PCL-g-PGAL (d), PCL-g-PGAL_{R1} (e) y PCL-g-PGAL_{R2} (f). Las células se tiñeron con reactivos fluorescentes bisbenzimidida y faloidina y se observaron por microscopía confocal (barra de escala = 50 µm).

Trabajos publicados anteriormente sobre el efecto protector de AG contra la oxidación de LDL iniciada por AAPH describen que la concentración necesaria para reducir la formación de LDL oxidada es de 200 µM [170]. Sin embargo, no se observa mejoría en cultivos *in vitro* de linfocitos expuestos a AAPH con presencia de este polifenol. Cabe señalar que también se estudió el potencial antioxidante de PGAL, obteniendo así una concentración necesaria de 200 µg/mL para prevenir el daño celular en fibroblastos dérmicos expuestos a estrés oxidativo [46].

En este sentido, tenemos una concentración del polifenol en la muestra de PCL-g-PGAL de $0.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, lo que equivale a $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ en el cultivo celular, esta dosis de polifenol induce un efecto positivo sobre recuperación de cultivo celular. Esto concuerda con informes anteriores sobre polímeros polifenólicos y derivados; por ejemplo, se ha encontrado que los polímeros catequina [171, 172], la rutina [173] y el galato de epigallocatequina [174], entre otros, son más efectivos en comparación con sus monómeros, y adicionalmente, su actividad contra la oxidación de LDL aumenta proporcionalmente con el número de unidades repetidas. Además, los monómeros indujeron citotoxicidad mortal por sí mismos a la misma concentración [175]. Esta evidencia experimental se relacionó con las diferencias estructurales, a medida que la longitud de cadena del polímero aumenta adopta una estructura secundaria helicoidal, lo que también se demostró para PGAL [139], lo que sugiere que los grupos fenilo se vuelven cada vez más disponibles y sin mayores obstáculos estéricos para lograr enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas [176].

A pesar de que el mecanismo *in vitro* de actividad polifenólica contra el estrés oxidativo generado por la oxidación de LDL no ha sido completamente dilucidado, algunos autores indican hipotéticamente que los polímeros polifenólicos y sus derivados inhiben los radicales peroxilo liberados por la oxidación de LDL, estabilizando la apolipoproteína B (el componente más grande en LDL), a través de interacciones electrostáticas y de enlace de hidrógeno y también por su capacidad para autooxidarse [177].

En conclusión, el mecanismo de los biomateriales derivados de PGAL puede ser a través de la inhibición y estabilización de los productos de oxidación de LDL debido a la estructura

secundaria helicoidal. El injerto a PCL, que es un polímero susceptible de autooxidación [178], puede conducir a un efecto sinérgico que se suma a la mejora de las propiedades superficiales generadas por la modificación de la rugosidad [179].

Las características atractivas de PGAL incluyen aire, termoestabilidades y fotoestabilidades, solubilidad en agua y su obtención en una escala de varios gramos a partir de AG naturalmente abundante en condiciones suaves y verdes, y nuestra evidencia experimental indica que PCL-*g*-PGAL permite casi el 100% de viabilidad celular en un cultivo con una dosis suficiente de AAPH para matar aprox. 50% de la población celular. Además, PCL-*g*-PGAL posee grupos carboxilo en cada unidad de repetición del PGAL helicoidal, que puede reticularse con iones calcio en solución acuosa, lo cual es particularmente interesante ya que un alto nivel de calcio a menudo se relaciona con la muerte celular causada por estrés oxidativo [180]. Es de destacar que los radicales PGAL, que se muestran en la Figura 26, pueden cambiar de forma reversible a formas protonadas pero manteniendo la actividad antioxidante en ambas formas moleculares [139]. Un estudio anterior demostró que la captación de radicales PGAL se somete a un mecanismo de transferencia de un solo electrón (SET) que difiere de la ruta antioxidante común de los polifenoles [139], que comúnmente se transforman en formas inactivas después de la extinción de radicales. Estos rasgos sugieren una actividad antioxidante prolongada para PCL-*g*-PGAL en el sitio del implante, aunque se necesita más investigación para evaluar su aplicación biomédica en tejidos epiteliales.

Conclusiones

La incorporación de PGAL en películas de PCL activadas en la superficie aumenta la cristalinidad en las películas finales por efecto de nucleación, este comportamiento en sinergia con la rugosidad de la superficie, mejora las propiedades mecánicas como suavidad y flexibilidad adecuadas en el material PCL-g-PGAL para la aplicación en ingeniería de tejidos. Las características fisicoquímicas y biológicas apropiadas del material permiten la adsorción óptima de proteínas y, en consecuencia, la viabilidad de las células Vero y MDCK. Este trabajo también demuestra que la rugosidad de la superficie en la PCL es un factor clave para la viabilidad celular en la PCL-g-PGAL. Las evidencias experimentales indican que debido a la presencia de PCL-g-PGAL hay una inhibición de ROS en células MDCK y Vero cuando están bajo el LD₅₀ de AAPH. Estos resultados demuestran que estos materiales son una alternativa para el bloqueo de estrés oxidativo causado por la presencia de agentes externos y con ello se evita el desarrollo de problemas médicos frecuentes en la medicina regenerativa. Esto último puede atribuirse claramente a las propiedades de eliminación de radicales libres del PGAL. Por lo tanto, estas evidencias indican que el polímero PCL-g-PGAL es un andamio bioactivo potencial para estudios de ingeniería de tejidos.

Perspectivas del capítulo

Los promisorios resultados empleando el compuesto PCL-*g*-PGAL en forma de película impulsó la investigación con éste en otro tipo de morfologías que permitan ampliar la aplicabilidad de este material. Para ello se investigó un nanocomposito multifuncional de hidrogel embebido en fibras nano-electrohiladas con capacidad antimicrobiana y antioxidante. El material está compuesto de nanofibras de PCL-*g*-PGAL. La red del hidrogel está formada por CMC cargada clindamicina, un antibiótico de amplio espectro. Este biomaterial inhibe una cepa de *Staphylococcus aureus*, que es la principal causa de infecciones nosocomiales. Este trabajo también presenta un extenso estudio teórico-experimental sobre la estructura molecular y las caracterizaciones morfológicas para este nanocomposito.

Introducción

Los apósitos han llamado la atención recientemente en el campo de la curación de heridas porque proporcionan un entorno fisiológico compatible con el desarrollo celular. Otras características deseadas son la ausencia de citotoxicidad, la capacidad de mantener un ambiente húmedo y la permeabilidad de oxígeno. Un apósito bioactivo también previene las infecciones bacterianas, que se encuentran entre las complicaciones más comunes y graves en el tratamiento de la cicatrización de heridas [181, 182]. En un procedimiento médico

típico, la limpieza inicial de la herida es seguida por un tratamiento con antibióticos [183, 184], desafortunadamente, estas acciones pueden ser ineficientes para algunos pacientes, y el rápido desarrollo de las infecciones conduce a complicaciones en el proceso de curación, asociadas con dolor, eritema, edema y discapacidades a largo plazo [185, 186]. Además, la administración de antioxidantes es altamente beneficiosa ya que la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno ROS en el sitio de curación retrasa la recuperación debido al daño severo a los tejidos circundantes causado por la inflamación y otras patologías asociadas al estrés oxidativo [187-190].

Actualmente, las películas de polímeros [191-193], los hidrogeles [194-196] y las nanofibras [197-199] se han utilizado eficazmente como vendajes para heridas. Entre todas las opciones, el electrohilado de polímeros y los hidrogeles son atractivos debido a su capacidad para imitar las condiciones biológicas de muchos tejidos [200]. Los hidrogeles se usan ampliamente en la medicina regenerativa como portadores de fármacos y células, y como matrices de ingeniería de tejidos porque poseen propiedades fisicoquímicas y biológicas similares al microambiente de los tejidos debido a su estructura molecular porosa e hidratada [201, 202]. Sin embargo, las características de los hidrogeles pueden mejorar cuando se cargan en polímeros electrohilados para proporcionar soporte mecánico en una estructura 3D porosa que mejora la adhesión celular, con una alta relación superficie-área-volumen que permite una alta permeación de gases y una buena adaptabilidad [203, 204]. En este sentido, el electrohilado es un proceso versátil para la producción de nanofibras, que son ventajosas en el campo biomédico debido a sus propiedades físicas tales como alta flexibilidad, suavidad, falta de bordes afilados, no son abrasivas, alta capacidad de carga de fármacos, y son

fácilmente fabricados en diferentes geometrías logrando diseños beneficiosos [205]. El electrohilado se ha estudiado para muchas estructuras de polímeros, incluidos poliestireno (PS), derivados y mezclas de polisacáridos, ácido poliláctico (PLA), polilactico-co-glicólido (PLGA) y poli- ϵ -caprolactona (PCL). Este último se emplea comúnmente para obtener una morfología continua en una distribución uniforme y controlada de micro o nanofibras biocompatibles.

En este capítulo investigamos un apósito nano-composito activo compuesto de un hidrogel antimicrobiano cargado en fibras nano-electrohiladas con capacidad antioxidante. Este andamio tiene nanofibras de PCL enzimática injertada con poli(ácido gálico) (PGAL), un polímero recientemente desarrollado que presenta una naturaleza multirradical y polianiónica en una estructura secundaria helicoidal [139]. Además de la capacidad de inhibición de radicales, el PGAL también posee alta solubilidad en medios fisiológicos, citotoxicidad nula, semiconductividad eléctrica, alta termoestabilidad y fotoestabilidad [45, 63]. Además, este polímero se produce en condiciones de proceso suaves durante la polimerización de un fitoquímico naturalmente abundante en medio acuoso mediada por lacasa [42, 140]. La red de hidrogel está formada por carboximetilcelulosa de sodio (CMC) cargada con clindamicina [63], que es un antibiótico de amplio espectro para el tratamiento de infecciones de huesos, piel, tejidos blandos y heridas y puede usarse para tratar pacientes alérgicos a la penicilina [206, 207]. Este biomaterial inhibe una cepa de *Staphylococcus aureus*, que es la principal causa de infecciones nosocomiales, y que habita las membranas mucosas y la piel de los humanos, lo que le permite penetrar en el torrente sanguíneo del paciente a través de las heridas. Los hidrogeles son redes poliméricas reticuladas tridimensionales altamente

hidratadas que pueden absorber exudados de heridas o mantener la humedad, y pueden hincharse varias veces su volumen seco sin ser solubles en condiciones fisiológicas [208]. Este trabajo considera el uso de un hidrogel de CMC como un complemento del composito debido a su alta permeabilidad al oxígeno y su capacidad para mantener la integridad estructural de los fármacos. La presencia del hidrogel es fundamental para lograr una liberación controlada del fármaco, además de la capacidad absorbente, logrando un ambiente biomimético. En este sentido, la CMC es ampliamente compatible con las membranas mucosas y con la piel y mantiene un ambiente húmedo óptimo en la región de la herida para la formación y reepitelización de la matriz extracelular [209].

Se discute un extenso estudio teórico experimental sobre la estructura molecular, la caracterización morfológica y la actividad biológica para el nuevo nanobiocomposito.

Materiales y métodos

Materiales

Lacasa de *Trametes versicolor* (LTV, actividad enzimática específica 2,35 U/g, proteína liofilizada almacenada a -20 °C) se adquirió en Fluka (USA). La lipasa B inmovilizada de *Candida antarctica* (CALB) (Lewatit VPOC1600, Lanxess, USA), soportada en perlas esféricas macroporosas de poli(metacrilato divinilbenceno) (1 mm), actividad enzimática específica 5.000 U/g almacenada a 5 ° C) se adquirió de C -Lecta (Alemania). Ácido gálico (AG), ϵ -caprolactona (CL), ácido 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), clorhidrato de clindamicina, PCL comercial (PCLc) ($M_n = 45,000$ g / mol) y CMC ($M_n \approx 700,000$ g / mol) se compraron

de Sigma-Aldrich (México). El alcohol etílico (grado técnico, > 99%) fue suministrado por Química Barsa (México). La solución salina tamponada con fosfatos (PBS) se preparó disolviendo productos químicos de grado reactivo, NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄·3H₂O, MgCl₂ · H₂O, CaCl₂ y Na₂SO₄, en agua desionizada, tamponada a pH = 7.25. El cilindro de 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R-134a/Norflurane Dupont, SUVA, USA) (60 Kg) fue suministrado por Refracciones Star (México) con un 98% de pureza. PGAL mediado por enzimas se produjo como se informó anteriormente (capítulo 3) [42] con un rendimiento del 96% (Mn = 5800 Da, PDI = 1.1). La PCL enzimática (PCL_e) se produjo como se informó previamente (capítulo 5) [141] con Mn = 38,519 Da (PDI = 2.1), $T_m = 55.6$ °C, pico DGTA = 475 °C y porcentaje de cristalinidad = 54.1%.

Síntesis del copolímero injertado PCL-g-PGAL

El PGAL se injertó en la superficie de hebras de PCL_e a través de una esterificación ácida haciendo reaccionar PGAL con los grupos hidroxilo disponibles en la superficie de PCL hidrolizada [10]. Con este fin, se introdujeron 0.6 g de PCL_e en una solución acuosa de PGAL (0,28 mM) a pH = 3 (ajustado con ácido cítrico), seguido de exposición a irradiación UV ($I = 1,35$ mWcm⁻²) durante 24 h. Después del injerto, las hebras se lavaron con agua y etanol para eliminar cualquier PGAL residual y otros compuestos no reaccionados. La determinación del rendimiento del injerto siguió la ecuación 8.

$$GY = [(W_a - W_b)/W_b] \times 100 \% \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde W_b y W_a son los pesos de las muestras secas antes y después de la reacción, respectivamente. El porcentaje de inserción de PGAL fue del 46%.

Preparación de nanofibras PCL-g-PGAL por electrohilado

Se recogieron fibras electrohiladas en un objetivo colocado a diferentes distancias (10-25 cm) de la punta de la aguja (diámetro interior 0.84 mm). El voltaje aplicado varió entre 10 y 30 kV utilizando un suministro de alto voltaje (Gamma High Voltage Research, ES 30-5W). Las soluciones de polímeros se administraron mediante una sola bomba de jeringa de infusión KDS100 (KD Scientific, USA) para controlar el caudal (de 1 a 5 mLh⁻¹). Todos los experimentos de electrohilado se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las fibras electrohiladas PCL-g-PGAL se prepararon usando parámetros optimizados (distancia del colector de 20 cm, 25 V y una velocidad de flujo igual a 2.5 mLh⁻¹) y condiciones del solvente (proporción de 60 % p/v en la mezcla de cloroformo/acetona 2:1).

Preparación de nanocompositos cargados de hidrogel.

Se prepararon soluciones acuosas (10 mL) de ácido cítrico (4.1, 10.5, 16.2 mg); luego se añadió clorhidrato de clindamicina (6 mg) en polvo a cada solución y se sónico durante 10 minutos. Después, se añadieron 200 mg de CMC con agitación mecánica continua para alcanzar una mezcla homogénea de hidrogel viscoso. Para asegurar la homogeneidad y la viscosidad de la solución, la mezcla se mantuvo a 37 °C bajo agitación (200 rpm) durante 18 h. Se cortaron muestras electrohiladas de 1 cm² y se sumergieron en agua durante 48 h antes de agregar el hidrogel en su superficie, luego se retiraron del agua y se esterilizaron con luz ultravioleta por 15 min; en cada muestra se depositó 0.5 mL del precursor de hidrogel. Posteriormente, se llevó a cabo la reticulación a 50 °C durante 6 h y posteriormente se secó a temperatura ambiente al alto vacío hasta la completa evaporación del solvente. Finalmente, los compositos fueron curados bajo radiación UV por 30 min.

Caracterización química

Los espectros de CP/MAS ^{13}C -NMR se registraron en un espectrómetro Varian MR-400. Los espectros FT-IR se adquirieron en un instrumento ATR-FTIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer (USA). Los análisis de resonancia electrónica de espín (ESR) se realizaron en un equipo Bruker ESR Eleksys E500 en un tubo de cuarzo a temperatura ambiente en el intervalo 80-4080 G y frecuencia de microondas de 9.8×10^9 Hz a 298 K.

Métodos computacionales

Los cálculos de DFT sin restricción de espín (UHF) se realizaron en el marco de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) utilizando el funcional M06-2X combinado con el conjunto base 6-311++G(d,p), para tener en cuenta las interacciones no covalentes, para lo cual los funcionales meta-GGA generalmente superan a muchos otros funcionales híbridos [71, 210]. Los efectos de la solvatación del agua se incorporaron a través del modelo de polarización continua (PCM). Utilizamos el gran conjunto base con funciones difusas, ya que su inclusión generalmente mejora la confiabilidad de la descripción química cuántica para sistemas aniónicos y de capa abierta [72, 211]. Las geometrías moleculares se optimizaron sin ninguna restricción, y se inspeccionaron sus frecuencias vibracionales para confirmarlas como mínimos locales verdaderos por la ausencia de frecuencias imaginarias. Se realizaron búsquedas de los estados de transición y se optimizaron completamente al mismo nivel de teoría utilizando el método de seguimiento de vectores propios (EF) implementado en el algoritmo Berny. Las geometrías optimizadas resultantes se confirmaron como estados de transición por la presencia de una frecuencia vibratoria imaginaria única en $\nu = -425.1 \text{ cm}^{-1}$ y $\nu = -1312.2 \text{ cm}^{-1}$ para **S1-TS** y **S2-TS**, respectivamente.

Análisis morfológico de las muestras

La morfología de las muestras electrohiladas se determinó en un microscopio Zeon Neon40 de Ion Beam enfocado (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania) que funciona a 5 kV. Las muestras de electrohilado se depositaron en trozos de aluminio y se recubrieron con una capa delgada de carbono. El diámetro de las fibras electrohiladas se midió con el software SmartTiff de Carl Zeiss SMT Ltd. El microanálisis SEM de rayos X dispersivos de energía (EDX) se registró en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5900-LV (Japón).

Mediciones de ángulo de contacto

Las mediciones del ángulo de contacto estático con el método de gota sésil se registraron y analizaron a temperatura ambiente en un equipo OCA-15EC de DataPhysics Instruments GmbH (Alemania) con el software SCA20 (DataPhysics Instruments GmbH, Alemania). Los valores de los ángulos de contacto de los lados derecho e izquierdo de la gota de disolvente se midieron y promediaron. Las mediciones se realizaron 5 s después del depósito de la gota (1 μ L) en la superficie de la muestra. Todos los datos fueron un promedio de diez mediciones en diferentes ubicaciones de superficie.

Prueba antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los compuestos se probó contra *Staphylococcus aureus* (ATCC, USA). La prueba de transferencia de placa en serie (SPTT) se utilizó para medir la actividad antimicrobiana y la duración de la liberación del antibiótico. Se inocularon placas de agar Müller-Hinton usando un hisopo estéril con una suspensión de bacterias con una opacidad equivalente a 0.5 MacFarland Standard (1×10^8 UFC/mL). Los compositos con y

sin antibiótico se colocaron en el centro de una placa de agar ($n = 3$) y se incubaron durante 18 h a 37 °C. La inhibición, determinada como el diámetro de la zona de inhibición menos el diámetro del material en mm, se midió utilizando un Vernier. Los compositos se transfirieron diariamente a una placa fresca sembrada asegurándose de que la misma superficie del material estuviera en contacto con el agar, hasta que una zona de inhibición estuviera ausente. Los compositos que dejaron de producir una zona de inhibición se cortaron longitudinalmente y se colocaron en placas de agar sembradas con la superficie en contacto con el agar y se incubaron durante la noche a 37 °C para garantizar que no se liberara más antibiótico. Los compuestos sin clindamicina cargada no mostraron ningún efecto antibacteriano.

Cinética de liberación de clindamicina

Para evaluar la cinética de liberación del fármaco, se colocaron en tubos Falcon los compositos de fibras electrohiladas/hidrogel cargados con y sin Cli (1 cm^2) e hidrogeles de CMC (equivalente a 1 ml en húmedo). Se consideró como medio de liberación una solución salina tamponada con fosfato (PBS) de $\text{pH} = 7.4$. Los ensayos, que se realizaron por triplicado, y se llevaron a cabo sumergiendo los materiales en 20 mL del medio de liberación utilizando un agitador rotatorio. El medio (0.5 mL) se retiró a intervalos de tiempo predeterminados y se reemplazó por un volumen igual de medio fresco. El medio eliminado se utilizó para cuantificar la liberación de Cli midiendo su absorbancia en un espectrofotómetro UV-vis Genesys 10S (Thermo Scientific) a una $\lambda = 210 \text{ nm}$. La curva de calibración para Cli ($y = 3.997x - 0.0314$, $R^2 = 0.9996$) se obtuvo trazando la absorbancia medida a 210 nm frente a la concentración de Cli. Todos los ensayos se realizaron por

triplicado y se promediaron los resultados. La cantidad original del fármaco atrapado en cada compuesto e hidrogel se obtuvo sumergiendo la muestra en agua (20 ml) a 37°C durante 5 días y se midió como se mencionó anteriormente. Se aplicó el modelo de ley de potencia (Ec. 9) desarrollado por Ritger y Peppas [212] para analizar el primer 60% de liberación fraccionada del fármaco.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde M_t es la masa de fármaco liberada en el tiempo t , M_∞ es la masa total de fármaco liberada en el equilibrio, k es la constante cinética del sistema y n es una potencia característica de la liberación de fármaco. Cuando n es igual a 0.5, se considera que el fármaco se difunde con un comportamiento Fickiano. Para $n = 1$, el comportamiento se denomina difusión del Caso II. Finalmente, el comportamiento de transporte anómalo ocurre en valores n intermedios entre Fickiano y el Caso II

Actividad hemolítica

Las placas de agar sangre se prepararon añadiendo 10 % v/v de sangre humana en medio base de agar sangre estéril en placas de Petri estériles. Después de la solidificación, se hicieron pozos en la placa de agar usando un trozo de vidrio estéril (6 mm de diámetro) para colocar el control positivo de agua (100 μ L). Los compuestos con y sin antibiótico se colocaron en el centro de la placa de agar ($n = 3$) y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Después del período de incubación, la hemólisis se observó mediante una zona clara de inhibición (diámetro de zona menos diámetro del composito en mm) que se midió usando un Vernier.

Viabilidad celular

La línea celular Vero (mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*, riñón) (ATCC, USA) se cultivó en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10 %, penicilina/estreptomicina al 1 % y L-glutamina 2 mM en 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ y 95 % de aire. El medio de cultivo se cambió cada dos días y, para el subcultivo, las monocapas celulares se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se separaron por incubación con tripsina EDTA (0.25 %) a 37 °C durante 2–5 min.

La concentración celular se determinó contando el número de células con una cámara Neubauer utilizando azul de tripano al 4 % como colorante vital. Se utilizaron células separadas con viabilidad ≥ 95 % para los ensayos de cultivo celular. Para los ensayos de citotoxicidad, las muestras se lavaron con PBS y etanol (70 %) y se esterilizaron con UV durante 15 minutos. Las muestras se adhirieron a los pocillos (placa de cultivo de 24 pocillos) utilizando una pequeña gota de silicona (Silbione® MED ADH 4300 TRV, Bluestar Silicones France SAS, Lyon, Francia). La viabilidad celular se determinó a las 96 h como punto final para el crecimiento celular. La unión celular se evaluó considerando la relación entre el número de células adheridas y la viabilidad celular (es decir, el número de células adheridas en el control, denominado TCPS) para cada placa de pocillos cultivados. El recuento final de células se obtuvo mediante el ensayo MTT (5 mg/mL). Cada muestra se evaluó en cuatro réplicas.

Resultados y discusión

El injerto de PGAL en PCLe mediante la reacción de esterificación de Fischer en condiciones ácidas utilizando foto-inducción UV se corrobora mediante CP/MAS ^{13}C -NMR (Figura 39) y espectroscopias FT-IR (Apéndice D-70). La investigación teórica sobre la conectividad entre PGAL y la superficie PCLe confirma la obtención de la molécula objetivo.

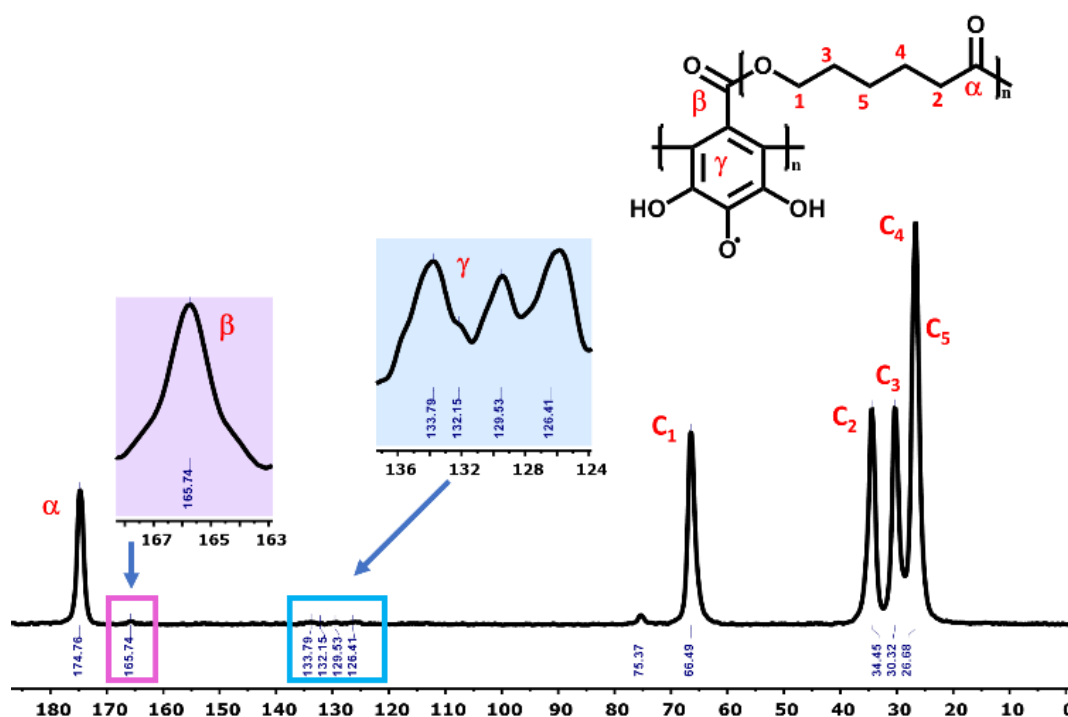


Figura 39. Espectro representativo de CP/MAS ^{13}C -NMR de PCL-g-PGAL, tomado a 400 MHz con frecuencia de rotación de 10 kHz.

Estos polímeros presentan grupos funcionales COOH y OH, por lo tanto, se consideraron dos vías de reacción diferentes, como se muestra en la Figura 40, empleando unidades de AG y ácido 6-hidroxihexanoico como compuestos modelo. Un ataque nucleofílico del fenol del PGAL a un grupo carboxilo sobre la superficie activa de la PCLe producirá **S1** a través del

estado de transición **S1-TS**; alternativamente, el grupo hidroxilo de la PCLe podría atacar al grupo carboxilo del PGAL para producir la conectividad **S2** a través del estado de transición **S2-TS**.

La Figura 41 muestra los resultados del escaneo de las rutas de reacción de energía hacia **S1** y **S2**, que muestran valores de ΔG_R de 9.28 y -4.06 kcal/mol para **S1** y **S2**, respectivamente. La diferencia energética de *ca.* 13 kcal/mol entre **S1** y **S2** se podría explicar razonablemente mediante la mejor estabilización del radical en **S2**, ya que el átomo de oxígeno radicalario no tiene dos grupos orto-fenol, los que recientemente encontramos que participan en la formación de enlaces de hidrógeno dentro del esqueleto de PGAL con energías de interacción estabilizadoras en el régimen de 3-11 kcal/mol [139].

Cabe señalar que, aunque la energía de **S1-TS** se reduce con respecto a **S2-TS** debido al enlace de hidrógeno intramolecular, la reacción hacia **S1** es endergónica y, en consecuencia, se desplaza a los reactivos mientras que la formación de **S2** es exergónica; así, para este proceso, **S1** y **S2** son favorecidos cinética y termodinámicamente, respectivamente. No obstante, se espera que esta reacción produzca **S2** selectivamente a temperatura ambiente ya que la baja energía de activación para la reacción inversa desde **S1** a los reactivos se supera fácilmente a esta temperatura.

Además, la energía de activación prevista para **S2** debería reducirse debido a las condiciones ácidas de la reacción (pH = 3) [213, 214], favoreciendo aún más su formación selectiva sobre **S1**. En resumen, nuestros cálculos de DFT mostraron que, en las condiciones empleadas, la conectividad para el injerto de PGAL en la superficie PCLe es en gran medida la de los

hidroxilos de la superficie PCLe activada unida al carboxilo de las unidades PGAL, descrita como **S2** en este modelo.

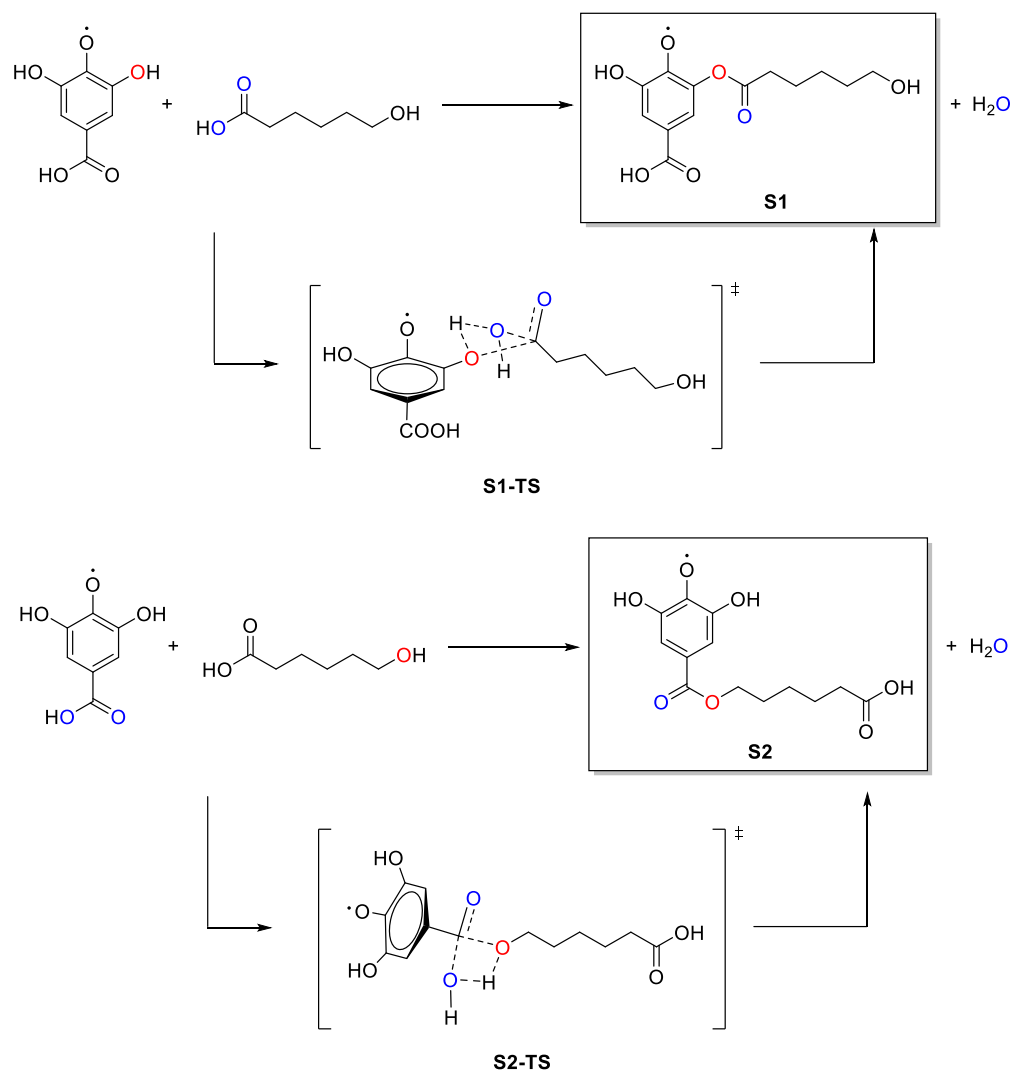


Figura 40. Posibles vías de reacción para la PCLe-g-PGAL que emplea unidades de AG y ácido 6-hidroxihexanoico como compuestos modelo.

Electrohilado de PCLc, PCLe y PCL-g-PGAL

La estabilización de la fuente giratoria en el electrohilado de PCLe y PCLe-g-PGAL se logra aumentando la concentración de polímero en la solución. Las mejores condiciones para el electrohilado de estos materiales se recogen en la Tabla 10. Todas las muestras se disolvieron en una mezcla de cloroformo/acetona (2:1 v/v), y en la concentración más alta (60 % p/v) para PCLe-g-PGAL para lograr una viscosidad adecuada en un flujo relativamente bajo (i.e., (2.5 mL/h) comparado con el requerido para PCLe (4 mL/h), y también alto voltaje. Estos parámetros requeridos pueden atribuirse a la baja masa molar en PCLe y PGAL.

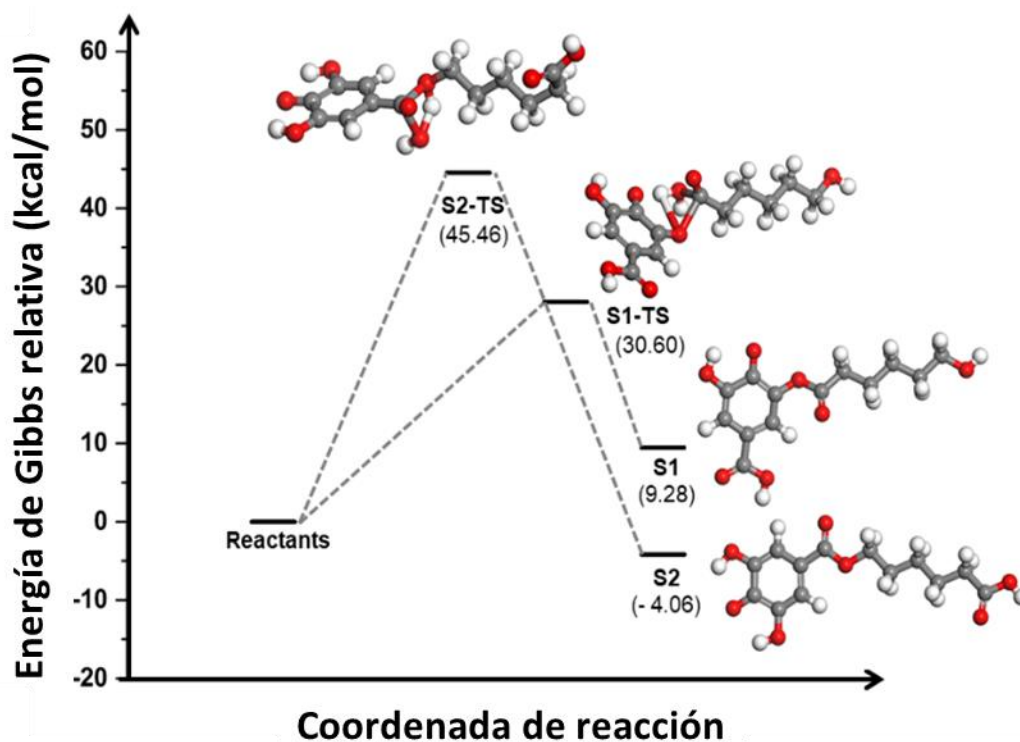


Figura 41. Perfil de energía a lo largo de dos posibles rutas de reacción para el PCLe-g-PGAL en el nivel de teoría M06-2X/6-311++G(d,p) que emplea unidades de AG y ácido 6-hidroxihexanoico como compuestos modelo.

Tabla 10. Parámetros de electrohilado para las muestras.

Muestra	Concentración (% w/v)	Velocidad de flujo (mL/h)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)
PCLc	25	5	15	15
PCLe	30	4	15	15
PCLe-g-PGAL	60	2.5	25	20

Caracterización de fibras electrohiladas

Las micrografías SEM en la Figura 42 muestran la morfología de los andamios electrohilados, revelando fibras homogéneas, continuas y rectas con superficies lisas para todas las muestras. El electrohilado produce nanofibras con un diámetro promedio cercano a 200 nm, que es un tamaño adecuado para exhibir un alto nivel de porosidad, permeación de gas y una alta relación superficie-volumen. Estas propiedades promueven la respiración celular, la regeneración de la piel, la retención de humedad, la eliminación de exudados y la hemostasia [215].

La Figura 43 describe histogramas representativos y curvas Gaussianas de las distribuciones de diámetro para las diferentes fibras electrohiladas para proporcionar una cuantificación de la variabilidad en las muestras. Los diámetros de las fibras PCLe y sus derivados PCLe-g-PGAL son similares, es decir, 218.45 ± 2.75 y 232.30 ± 8.0 nm, respectivamente, a pesar de haberse obtenido utilizando diferentes parámetros. Además, la distribución del homopolímero mediado por enzimas es la más estrecha, mientras que PCLe-g-PGAL tiene poblaciones de fibras anchas (i.e., > 400 nm) y estrechas (es decir, <100 nm) que representan menos del 10 % de la muestra.

Las micrografías SEM y el histograma de la muestra de electrohilado de PCLc mostraron claramente que la población tiene un tamaño de diámetro menor en promedio (i.e., 183.83 ± 8.12 nm) que los otros productos y que la distribución tiende a diámetros relativamente pequeños, ya que solo el 10 % de la muestra un diámetro mayor a 250 nm. Estos resultados pueden atribuirse a las diferentes distribuciones de masa molar para PCLc y PCLe.

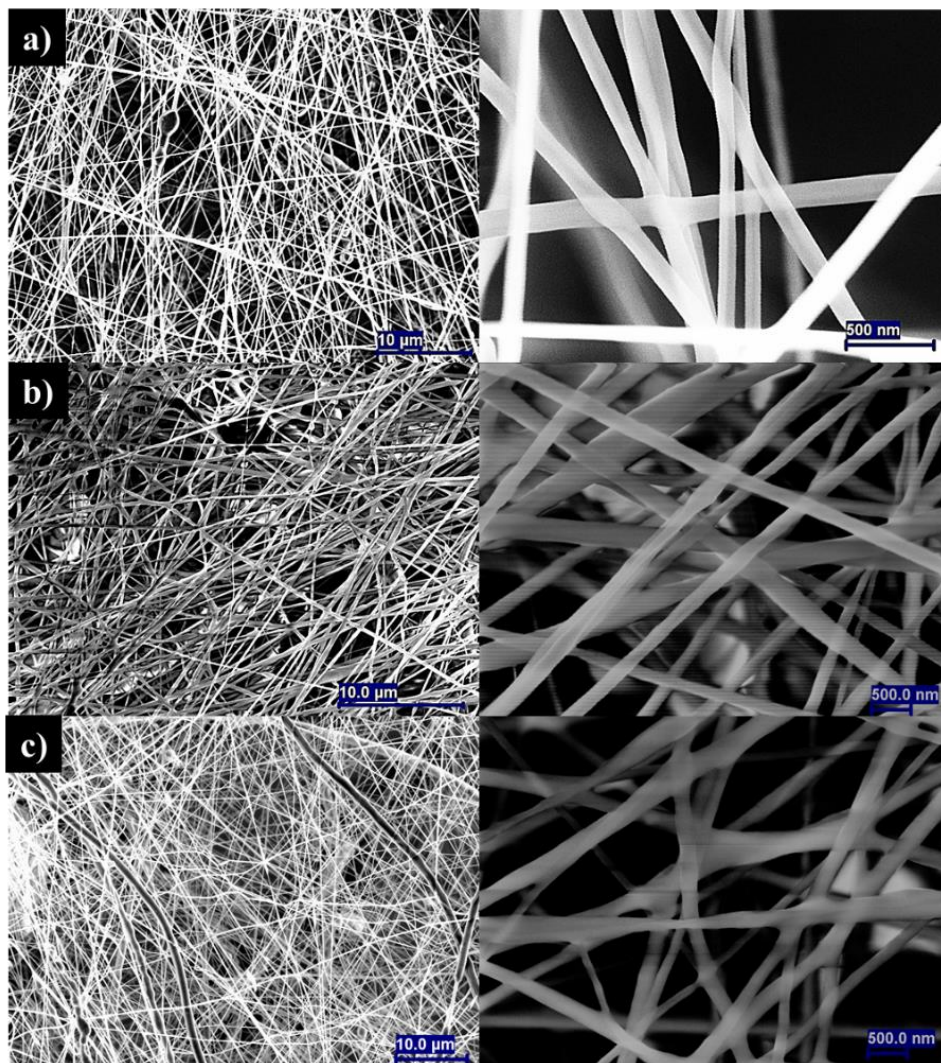


Figura 42. Imágenes SEM de fibras electrohiladas de PCLc (a), PCLe (b) y PCLe-g-PGAL (c) preparadas en condiciones optimizadas.

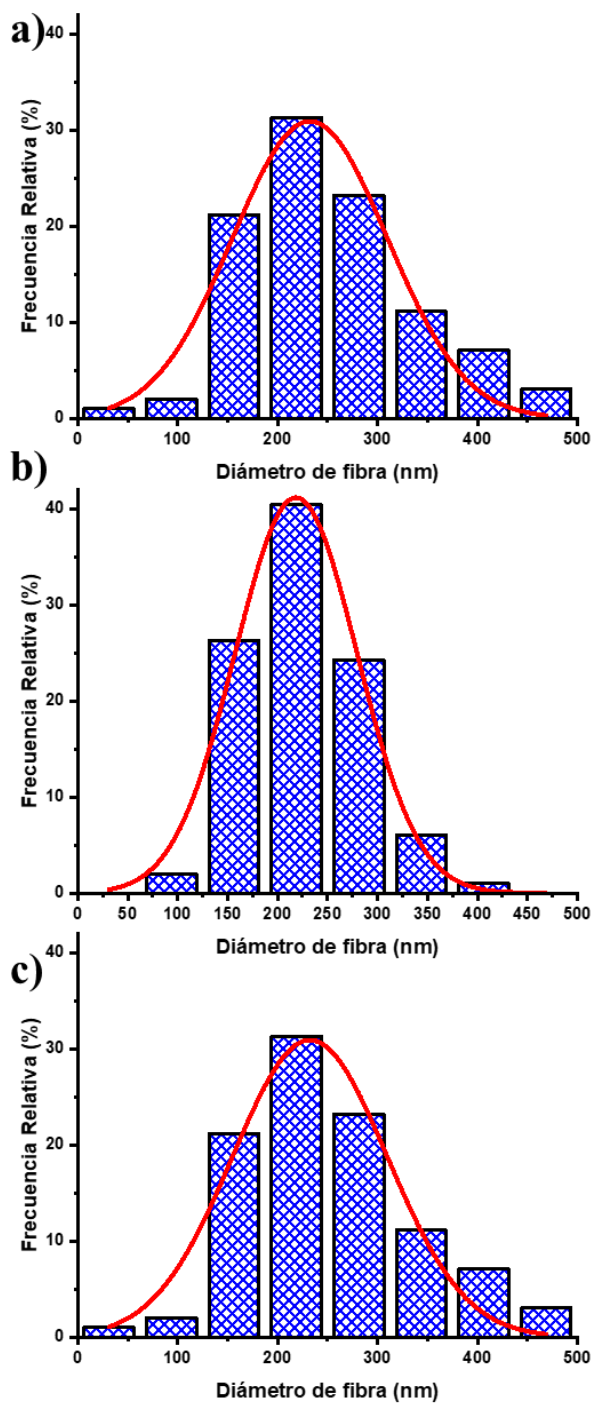


Figura 43. Distribución de frecuencia del diámetro de la fibra y funciones Gaussianas para las fibras de PCLc (a), PCLe (b) y PCLe-g-PGAL (c).

Capacidad antioxidante

El análisis de ESR en estado sólido para fibras PCLe-g-PGAL confirma la presencia del electrón no apareado en el esqueleto de PGAL, la señal de ESR característica para PGAL muestra estructura hiperfina que depende del momento magnético del electrón no apareado y los núcleos vecinos con un número de espín distinto de cero de acuerdo con el trabajo anterior [139]. Los resultados de ESR para PCLe-g-PGAL se comparan con los de PGAL medidos en las mismas condiciones. Los análisis muestran una señal intensa y estrecha para este último (i.e., $\Delta H = 2.59$ G), que se amplía para PCLe-g-PGAL (i.e., $\Delta H = 13.25$ G) debido a la disminución de la concentración del polifenol en la muestra, que concuerda con la relación Rubbins y Bleanny (Figura 44) [76].

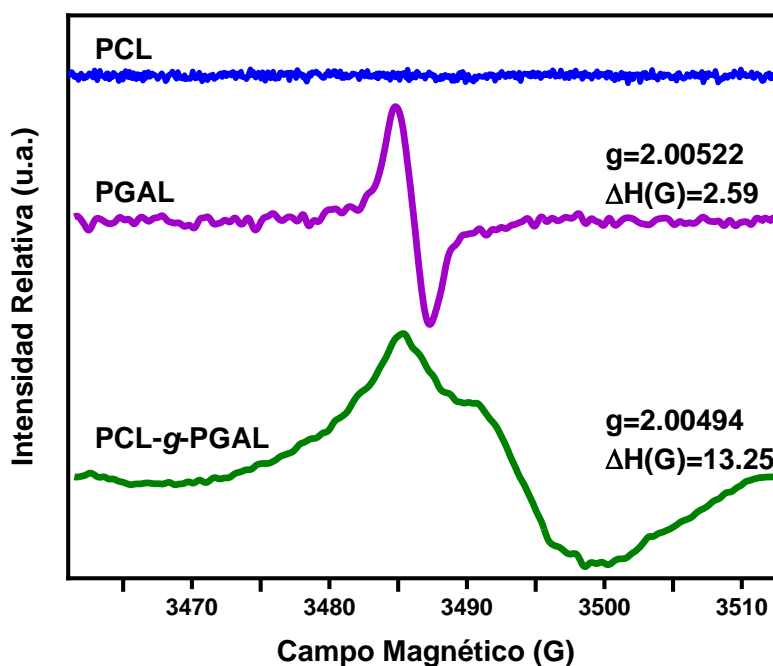


Figura 44. Espectros de ESR de estado sólido para PCLe (azul), PGAL (púrpura) y PCLe-g-PGAL (verde) a 298 K. Todas las mediciones son a 9.78 GHz con una potencia de microondas de 5 mW.

El factor g de Landé para PGAL está cerca de 2.00, que es muy cercano al de un electrón libre y este valor se conserva para el polímero de injerto. Esto lleva a confirmar que el carácter multirradical de PGAL de acuerdo con informes anteriores se conserva [46, 63, 139] después del injerto en PCLe activada en la superficie.

Caracterización del compuesto híbrido

La morfología de la superficie del compuesto híbrido por SEM se muestra en la Figura 45 (izquierda), donde se observa que el hidrogel permeó de manera diferente para cada muestra. Esta observación podría atribuirse a las porosidades; la muestra PCLc tiene un recubrimiento de hidrogel en la superficie, mientras que PCLe y PCLe-g-PGAL muestran mejor flujo dentro del andamio (Fig. 43 a la derecha). Esto sugiere que la red de hidrogel se forma a mayor profundidad en PCLe y PCL-g-PGAL, mientras que para PCLc hay una deposición de grumos de hidrogel en la superficie de las fibras, sin suficiente permeación para formar una red.

El mapeo EDX nos permite observar la distribución de la clindamicina en estos compuestos, en la Figura 45 (centro) se marca el cloro con azul cian, mostrando una dispersión homogénea del fármaco en el material. Esta información es relevante porque la liberación del fármaco será controlada debido a que no se acumula en una sola región del compuesto.

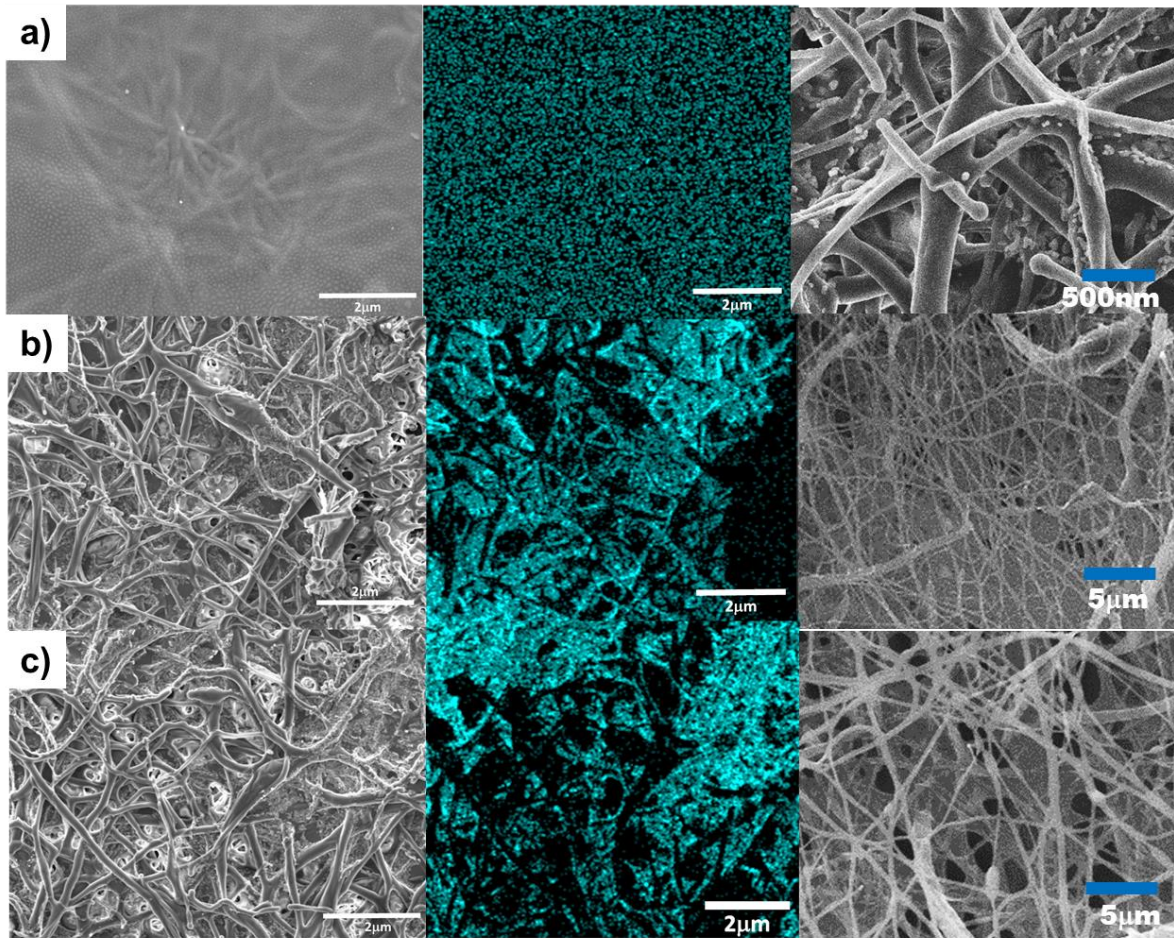


Figura 45. Imágenes SEM de PCLc/CMC (a), PCLe/CMC (b) y PCLe-g-PGAL/CMC (c) superficie (izquierda), mapeo EDX cualitativo para elemento de cloro en azul cian (centro), corte transversal (derecha). de los compositos.

Las mediciones de ángulo de contacto indican que los materiales electrohilados de PCLc, PCLe y PCL-g-PGAL son hidrófobos (es decir, $\theta > 115^\circ$) con un valor ligeramente más bajo para PCL-g-PGAL debido a los grupos hidroxilo higroscópicos en PGAL capaces de formar enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo (Figura 46). Esta humectabilidad en los apósitos es una característica importante que influye en la adhesión celular inicial y, en consecuencia, en la migración celular [216]. Una vez que el hidrogel se incrusta dentro del

electrohilado, hay una reducción en el ángulo de contacto ($\theta \leq 82^\circ$), comportamiento que se espera para las matrices de material higroscópico. La humectabilidad de los composites aumenta en gran medida para los obtenidos de PCLc debido a que las fibras están cubiertas superficialmente con el hidrogel, lo que concuerda con los análisis SEM. Sin embargo, el tamaño del diámetro de las fibras también afecta a los materiales, ya que PCLe presenta una mayor hidrofobicidad que PCLc, lo que podría explicarse por el diámetro medio de las nanofibras ligeramente más alto. Específicamente, el aumento del tamaño del diámetro de la fibra conduce a superficies cada vez más hidrófobas según la ecuación de Wenzel [152].

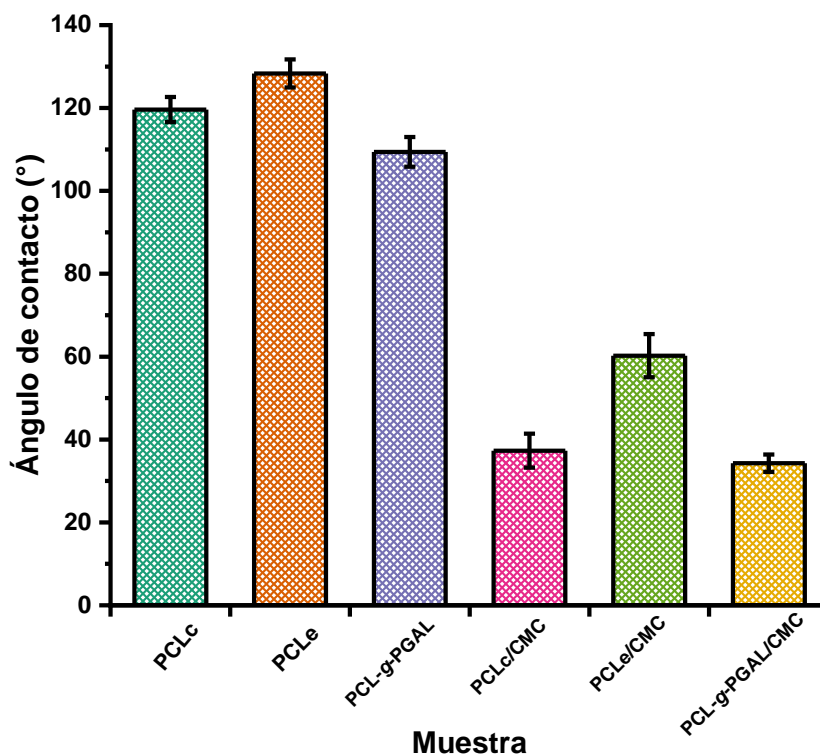


Figura 46. Ángulos de contacto para andamios PCLc, PCLe y PCLe-g-PGAL y muestras PCLc/CMC, PCLe/CMC y PCLe-g-PGAL/CMC.

Por lo tanto, los ángulos de contacto están influenciados no solo por la estructura química en la superficie sino también por la morfología de la fibra. No obstante, la humectabilidad de la superficie aumenta por el injerto de PGAL, lo que evidencia el impacto de este polifenol en la energía de la superficie. En resumen, estos resultados muestran que las propiedades físicas (por ejemplo, las características de la superficie hidrofóbica/hidrofílica) de este apósito se pueden ajustar cambiando la composición química y la morfología de la fibra, y los compositos híbridos muestran características ventajosas para posibles aplicaciones biomédicas.

Actividad antimicrobiana

El ensayo SPTT permite la determinación de la actividad antimicrobiana del material compuesto por las tasas de liberación de clindamicina. Este ensayo determina la duración de la actividad en condiciones estáticas como medio para evaluar el potencial de los materiales para ensayos clínicos, este ensayo es superior respecto a la prueba en placa de zona de inhibición de un día debido a que es un procedimiento en serie [217]. Este estudio se realizó hasta que no se detectó una zona de inhibición alrededor de los materiales, no se observó generación de resistencia al antibiótico durante el ensayo y no hubo inhibición alrededor de los materiales sin antibiótico. Los compositos de hidrogel/electrohilado tienen tres grados diferentes del agente de reticulación ácido cítrico (2, 5 y 7.5 % p/p), que varía su capacidad para liberar clindamicina, como se muestra en la Figura 47.

Varios factores están involucrados en la liberación de medicamentos de las matrices, estos incluyen el peso molecular del medicamento y su solubilidad en la matriz. Notablemente, la

difusividad del fármaco disminuye con los altos pesos moleculares, y el tiempo de liberación aumenta con la distribución de la masa molar de la matriz polimérica [218]. La determinación de la solubilidad de clindamicina y cualquier otro fármaco en una matriz reticulada es un desafío experimental, por lo tanto, esto generalmente se infiere indirectamente [218]. En este sentido, la clindamicina es altamente soluble en la matriz no reticulada en agua, por lo que se pueden inferir las cantidades del fármaco en cada material (es decir, 0.6 mg) considerando que el precursor de hidrogel muestra una distribución homogénea del fármaco, que se corrobora por análisis SEM.

La actividad bactericida inicial puede deberse a la disolución de las partículas directamente accesibles desde la superficie de los apósitos. La actividad antibacteriana es persistente con el tiempo lo que demuestra la capacidad del hidrogel portador para difundirse a través de la matriz, como se esperaba. Sin embargo, hay una liberación rápida de los apósitos basados en PCLc (es decir, 9, 13 y 19 días como máximo), que se correlaciona con la poca penetración del hidrogel en la matriz, produciendo así la aglomeración del fármaco en la superficie.

Este comportamiento se ha atribuido a una menor porosidad del andamio, ya que el tamaño de las fibras tiende a tamaños más pequeños que los de PCLe y PCLe-g-PGAL. Por otro lado, las matrices PCIE y PCIE-g-PGAL muestran un mayor tiempo de retención del fármaco para el polímero funcionalizado que para el PCLe individual. Esto sugiere la presencia de grupos carbonilo disponibles del PGAL para la reticulación con CMC, de acuerdo con trabajos previos [63].

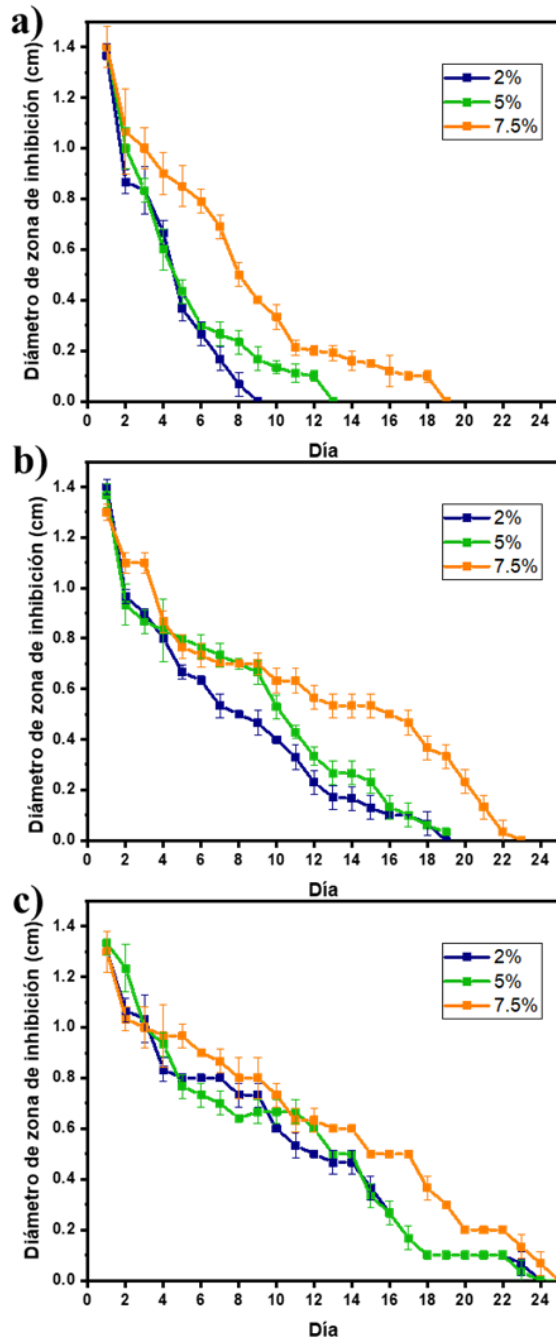


Figura 47. Actividad bactericida de PCLc/CMC (a), PCLe/CMC (b) y PCLe-g-PGAL/CMC (c) compositos cargados con clindamicina contra *S. aureus* por ensayo STT.

En consecuencia, el hidrogel está reticulado hasta cierto punto a PGAL y las partículas de fármaco probablemente están encerradas dentro de la red reticulada. Por lo tanto, además de las propiedades antioxidantes, PGAL también mejora el tiempo de liberación del medicamento. Sobre el efecto del reticulador, no hay diferencias entre el uso de 2 o 5%, mientras que la incorporación de 7.5% prolonga los tiempos de liberación debido al mayor grado de reticulación [202, 219].

Cinética de liberación de clindamicina

Los resultados obtenidos de la liberación de clindamicina de los compuestos de PCL/CMC y los hidrogeles de CMC en un medio de PBS se muestran en la Figura 48, y los parámetros cinéticos correspondientes están reunidos en la Tabla 11. El mecanismo de liberación de los compuestos de hidrogel/electrohilado es bastante complejo y está influenciado por varios parámetros como degradación del polímero, hidrofobicidad/hidrofilia, hinchamiento del hidrogel y difusión de solutos. Se aplicó un enfoque siguiendo el modelo de ley de la potencia (Ec. 9) desarrollado por Ritger y Peppas [212] para analizar el primer 60 % de liberación fraccionada del fármaco.

La potencia “n” en la ecuación (9) se determinó a partir de la pendiente en la gráfica de la fracción de liberación (F) frente al logaritmo del tiempo. Los valores “n” se utilizan junto con la ecuación (9) para calcular la constante cinética de liberación (k), que también se informa en la Tabla 11. Estos valores indican que la liberación de Cli de los nanocompuestos sigue una difusión del tipo Fickiana para todas las concentraciones de agente reticulante. Los hidrogeles de CMC sin soporte de fibras tienen el índice de liberación más bajo (es decir, n

= 0.23), y la constante de liberación más grande (es decir, $k = 0.6$) y el tiempo de liberación más rápido ($T_{1/2} = 6$ h).

Según Gaharwar et al. [220], la liberación de fármacos a través de los poros llenos de agua del hidrogel debería tener un índice de liberación “n” menor que 0.5. En nuestros resultados, un valor de $n = 0.23$ para los hidrogeles de CMC sugiere una liberación rápida porque los poros en la estructura del hidrogel se llenan rápidamente de agua, lo que provoca el hinchamiento de la matriz.

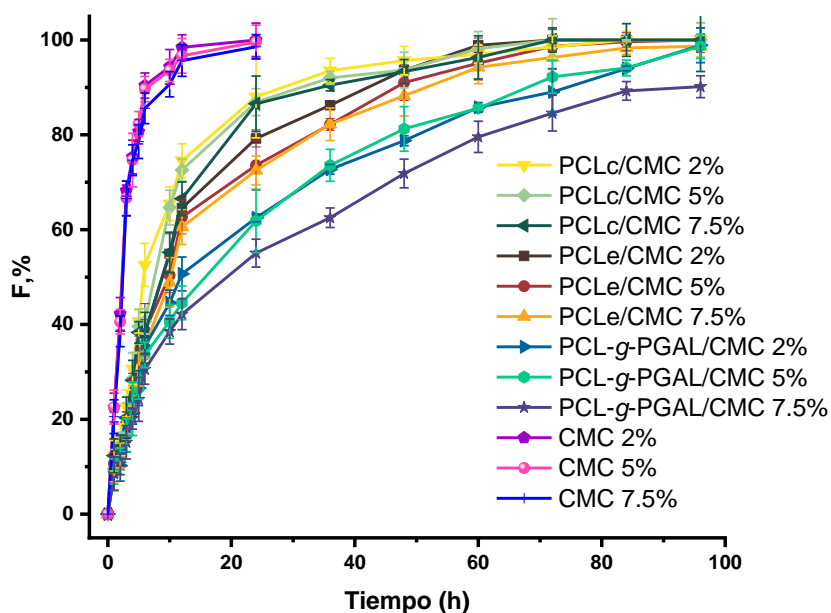


Figura 48. Perfiles de liberación *Cli* de composites e hidrogeles en PBS, $pH = 7.4$. Los valores corresponden a la media, mientras que las barras de error indican las desviaciones estándar (los ensayos se realizaron por triplicado).

Esto concuerda con informes previos de administración de fármacos a partir de un hidrogel [221]. Por otro lado, los resultados del ajuste al modelo de ley de potencia de Peppas indican que los composites tienen un índice “n” de difusión similar, lo que significa que se mantiene

el mecanismo de liberación de Fick. En cambio, los valores de la constante k se reducen significativamente en comparación con los hidrogeles de CMC puros, y disminuyen con el aumento del agente de reticulación (AC). La dependencia de la constante k con la longitud de la ruta de difusión y la difusividad del fármaco podría indicar que la presencia de nanofibras de PCL aumenta significativamente la longitud de la ruta difusión y la tortuosidad para la liberación del fármaco.

Tabla 11. Constante de difusión y $T_{1/2}$ de clindamicina liberada de compositos de PCL/CMC e hidrogeles de CMC en PBS.

Muestra	Ácido cítrico (%)	n	k	r^2	$T_{1/2}$
PCLc/CMC	2	0.483±0.020	0.292	0.9946	12.87
PCLc/CMC	5	0.489±0.020	0.292	0.9861	14.08
PCLc/CMC	7.5	0.496±0.016	0.249	0.9867	17.75
PCLe/CMC	2	0.486±0.015	0.262	0.9981	19.21
PCLe/CMC	5	0.482±0.013	0.246	0.9972	23.13
PCLe/CMC	7.5	0.463±0.013	0.228	0.9927	24.01
PCL-g-PGAL/CMC	2	0.455±0.013	0.198	0.9851	26.035
PCL-g-PGAL/CMC	5	0.431±0.007	0.157	0.9888	50.83
PCL-g-PGAL/CMC	7.5	0.440±0.007	0.144	0.9848	45.85
CMC	2	0.226±0.019	0.618	0.9764	6.6
CMC	5	0.231±0.020	0.619	0.9875	6.31
CMC	7.5	0.234±0.022	0.564	0.9802	6.17

Además, las matrices de fibras de PCL hidrofóbica electrohilada sirven como una barrera de difusión adicional para disminuir los coeficientes de difusión efectivos, reduciendo así la hinchazón del hidrogel y las tasas de penetración de agua como lo demostraron previamente Han et al. [222]. Cabe destacar que el PGAL también reduce la constante k , lo que podría atribuirse a la drástica reducción del comportamiento de hinchamiento de la CMC cuando se reticula con este polifenol, de acuerdo con el estudio anterior [63], con lo que el hinchamiento

se reduce hasta en un 90%. Cabe destacar que la influencia de PGAL también se evidencia por el tiempo medio de liberación ($T_{1/2}$), que aumenta significativamente.

Actividad hemolítica y viabilidad celular

Los compositos se probaron contra glóbulos rojos humanos sanos por el método de difusión de pozos de agar [223] y no mostraron hemólisis. Se observó la formación clara de un halo de inhibición (aprox. 5 mm) alrededor del pozo lleno de agua, que se utilizó como control positivo. Por el contrario, ninguno de los compuestos indujo la formación de una zona de hemólisis. Estos datos de eritrocitos humanos confirman que los materiales no son citotóxicos y, por lo tanto, son adecuados para la aplicación en el tratamiento de heridas porque no están implicados en propiedades líticas o de inestabilidad de la membrana celular. Por otro lado, la viabilidad de las células sembradas en las fibras electrohiladas PCLc, PCLe y PCLe-g-PGAL (ver Apéndice D-71 para la viabilidad de células VERO en PCLc, PCLe y PCLe-g-PGAL electrohilado, células a las 96 h de cultivo). Ninguno de los materiales muestra efectos citotóxicos en las células sembradas en sus superficies, y muestra una viabilidad completamente comparable con la de la superficie de la placa de cultivo (TCPS). En resumen, estos materiales no afectan el desarrollo celular normal, lo que demuestra que el material basado en PCLe-g-PGAL es seguro para su uso en aplicaciones biomédicas.

Conclusiones

La clindamicina cargada en un hidrogel de CMC reticulado a PCL-g-PGAL electrohilado muestra características mejoradas para un apósito para heridas con respecto a sus características antioxidantes, antibacterianas y morfológicas. Los estudios analíticos y

teóricos sostienen la consecución del injerto de PGAL en PCLe, donde se favorece cinéticamente la esterificación de un grupo carbonilo del PGAL a un hidroxilo de la superficie de poliéster activada. Las nanofibras formadas muestran diámetros promedio ligeramente superiores a 200 nm para este polímero en una distribución estrecha. Además del efecto antioxidante, el PGAL también aumenta la hidrofilia del biomaterial y los resultados evidencian que la reticulación de este polifenol a CMC mejora las tasas de difusión del fármaco. Finalmente, el PCL-*g*-PGAL no es citotóxico ya que no muestra actividad hemolítica y no afecta la viabilidad de las células epiteliales. El progreso adicional requerirá una evaluación continua *in vivo* e identificar formas de usar esta nanofibra en la administración de fármacos para la curación de heridas.

CAPÍTULO 7. AUTO ENSAMBLAJE SUPRAMOLECULAR DE POLI-L-FENILALANINA DE ORIGEN QUIMIO-ENZIMÁTICO

Perspectivas del capítulo:

Con motivo de ampliar la aplicación biomédica de PGAL en matrices bioactivas, se investigó el comportamiento de autoensamblaje de PLP quimio-enzimática (ca. 20,000 Da) y sus nanomorfologías. Curiosamente, los análisis FTIR y DC para este polipéptido supramolecular demuestran un cambio de una estructura secundaria no ordenada cuando se solubiliza en agua a una α -hélice con la adición de codisolvente HFIP. Los resultados también indican una estabilización de la estructura dependiente de la temperatura, debido a que el proceso de autoensamblaje se rige principalmente por enlaces de hidrógeno. El análisis de microscopía óptica, SEM y AFM son evidencia de que la PLP mediada por enzimas con ca. 20 KDa se autoensambla en una morfología definida bajo condiciones controladas para lograr nanotubos con un diámetro promedio de $0.21 \pm 0.04 \mu\text{m}$, y al menos $100 \mu\text{m}$ de longitud. La espectroscopia de radiación infrarroja microbeam del sincrotrón (SRIR) demuestra orientaciones paralelas de los restos amida en la estructura de α -hélice. Finalmente, se realizaron varios ensayos de administración de fármacos con nanotubos cargados de tetraciclina, lo que indica una posible aplicación biomédica de esta PLP enzimática como liberador de PGAL en ingeniería de tejidos.

Introducción

La inspiración para diseñar nuevas estructuras y arquitecturas moleculares funcionales, dinámicas y reversibles basadas en aminoácidos tiene como objetivo imitar los procesos

naturales como el autoensamblaje de péptidos y proteínas. Estos fenómenos ubicuos en los sistemas naturales se producen bajo ciertas condiciones termodinámicas y cinéticas en respuesta a interacciones específicas y locales, que provocan la formación de estructuras ordenadas, con una reducción concomitante de la entropía en el sistema a medida que evoluciona a uno o pocos conformeros [224]. En este sentido, la construcción de bloques peptídicos ha ganado interés en la generación de materiales avanzados en nanobiotecnología y biomedicina debido a su origen biológico inherente, programabilidad estructural, biocompatibilidad y biodegradabilidad, sin causar alteraciones en el sistema inmune y el uso de precursores de aminoácidos fácilmente disponibles [225-227]. La investigación en el autoensamblaje de polipéptidos (PP) es útil para comprender el comportamiento de los sistemas de proteínas, en la medida en que algunas estructuras de PP y proteínas están involucradas en más de 30 enfermedades humanas [228], incluyendo Parkinson [229], diabetes tipo II [230] y Alzheimer [231]. Curiosamente, los ensamblajes de PP anormales incluyen nanoestructuras de tipo nano-fibrillas, llamadas amiloides, como el PP amiloide de Alzheimer constituido por unidades de difenilalanina (FF), que se encuentra entre los motivos de reconocimiento más simples y comunes para el autoensamblaje molecular [232-234]. Varios estudios sobre polifenilalaninas (PPhe) demuestran la capacidad de autoensamblarse en geometrías discretas y extraordinarias; sin embargo, los ensambles de nanotubos solo se encuentran en informes con oligopéptidos PPhe de un máximo de cuatro unidades repetidas que tienen F-moc de cierre de extremo, lo que afecta la solubilidad y por lo tanto, el control de la nanoestructura autoensamblada [235-237].

Por lo tanto, la investigación en estos agregados naturales se ha desarrollado para el diseño de nanotubos de péptidos artificiales, comúnmente bioinspirados específicamente por los fenómenos de agregación de proteínas patológicas de amiloidosis [236, 237], además, estas estrategias aplicadas con éxito al autoensamblaje molecular de péptidos también han aportado nuevos conocimientos sobre estructuras en biología y química supramolecular [235, 238]. Estas consideraciones también se aplican para estudiar el autoensamblaje de PP sintéticos para aplicaciones potenciales en administración de fármacos o ingeniería de tejidos [239-242]. Este trabajo se centra en la poli-*L*-fenilalanina enzimática (PLP) de peso molecular relativamente alto (ca. 20,000 Da), que representa 140 unidades, su proceso de autoensamblaje y propiedades fisicoquímicas. La ePLP se produce en condiciones de proceso suaves mediante la polimerización de un solo paso mediada por la proteasa subtilisina del éster etílico de *L*-fenilalanina en un disolvente líquido puro de 1,1,1,2-tetrafluoroetano, como se informó anteriormente [243]. En general, las rutas químio-enzimáticas hacia PP ofrecen varias ventajas sobre los enfoques químicos u otros enfoques biológicos [244], tales como condiciones amigables con el medio ambiente con la ausencia de toxicidad y reacciones secundarias, lo que podría mejorar las características del producto [245]. Una característica interesante de nuestra ePLP además del alto peso molecular, es la ausencia de aductos fluorados de terminación como en aquellas PLP informadas obtenidas por síntesis de péptidos en estado sólido (SSPS), lo que resulta en una alta solubilidad en agua en una estructura secundaria no ordenada [234, 246]. Esto da lugar a una capacidad de procesamiento inocuo para los estudios de autoensamblaje. Además, estos nanotubos

enzimáticos de PLP (ePLP) también se estudiaron como portadores de fármacos utilizando cargas de tetraciclina y se analizan los resultados.

Materiales y métodos

Materiales

Sigma-Aldrich suministró clorhidrato de éster etílico de *L*-fenilalanina [L-PheOEt • HCl], SC (Subtilisin Carlsberg, Subtilisin A serine S8 endoproteinasa EC.3.4.21.62; 27 kDa de *Bacillus licheniformis*), clorhidrato de tetraciclina (TC) (C₂₂H₂₄N₂O₈•HCl) y 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, HFIP [(CF₃)₂CHOH]. CEI de México SA de CV (México) suministró un cilindro de 1.1 kg de 1,2,1,2-tetrafluoroetano Dupont Suva-R134a.

Desalinización del éster etílico de L-fenilalanina

La desalinización se realizó mediante la preparación de una solución de 11 mL de hidróxido de potasio (39 mmol), que se añadió a una solución de 22 mL de L-PheOEt • HCl (26 mmol). Después de agitar durante 1 h, la mezcla se extrajo cuatro veces con acetato de etilo (20 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre cloruro de calcio y el disolvente se eliminó por evaporación rotativa a presión reducida para dar un líquido amarillo con un rendimiento del 60 %.

Actividad enzimática de Subtilisin Carlsberg

Para la actividad enzimática, el SC se incubó en 1,1,1,2- tetrafluoroetano líquido durante 3, 6, 24 y 48 h, luego se disolvió (0.064 mg mL⁻¹) en una solución (tampón de acetato de sodio 10 mM con acetato de calcio 5 mM, pH 7.5). El ensayo proteolítico se realizó de la siguiente manera: una unidad (U) de actividad de proteasa era equivalente a 1 mmol de L-tirosina (JT

BakerMexico) liberada por la cantidad de enzima por minuto. Los datos son el resultado de tres réplicas y se comparan con un control sin CF. La U para la subtilisina Carlsberg que se usó en este trabajo fue $8.39 \pm 0.5 \text{ mmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

Síntesis enzimática del éster etílico de poli-L-fenilalanina

La PLP enzimática se produjo siguiendo el procedimiento previamente informado con algunas modificaciones [243]. En un experimento típico, se colocaron SC (110 U), L-PheOEt (6 mmol) y un agitador magnético en un recipiente cilíndrico st-316 (40 mL) equipado con dos válvulas de alta presión Swagelock (USA), camisa de calentamiento de cerámica externa conectado a un dispositivo de control de temperatura, y dos termopares, uno que mide la temperatura en la camisa de calentamiento y el otro dentro del recipiente del reactor. Luego, el 1,1,1,2-tetrafluoroetano se introdujo en el recipiente mediante una bomba de jeringa ISCO 160XD (USA). La presión y temperatura operativas fueron de 25 bar y 313.15 K, respectivamente, y el contenido se mantuvo bajo agitación durante 24 h. Luego, el reactor se despresurizó a presión atmosférica antes de abrirse, retirando la camisa de calentamiento y colocándose en una cámara a 5 °C. El contenido del reactor se recogió en agua desionizada y se centrifugó a $7000 \times g$ durante 20 minutos, y el sobrenadante se recuperó y se concentró por ultrafiltración usando un filtro centrífugo Amicon ultra 0.5 para 5000 Da para eliminar productos y reactivos de bajo peso molecular. La muestra final se almacenó en un ultracongelador (REVCO, USA) a -80 °C hasta su uso.

Autoensamblaje de ePLP

Una solución madre (7.6 mg/mL) de Poli-*L*-FeOEt en agua mili-Q se mezcló con HFIP como codisolvente para reducir la concentración de péptido. La concentración final de péptido varió entre 7.5 y 0.15 mg/mL, y se probaron doce concentraciones diferentes para determinar el límite necesario para el obtener el autoensamblaje. De cada solución se tomaron 20 μ L, se depositaron sobre un cubreobjetos de microscopio y se dejaron secar en una habitación fría a 4 °C para una evaporación lenta del disolvente.

Caracterización química

Los espectros FT-IR se adquirieron en un instrumento Perkin-Elmer ATR-FTIR Spectrum 400. Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Varian MR-400 en DMSO. Las mediciones de microespectroscopía infrarroja basada en sincrotrón (modo de transmisión) se realizaron en el haz infrarrojo MIRAS del sincrotrón ALBA (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España) usando el microscopio Hyperion 3000 acoplado al espectrómetro Vertex 70 (Bruker, Alemania) a 4 cm^{-1} de resolución con 256 escaneos agregados conjuntamente. En este caso, los nanotubos se crecieron directamente sobre ventanas transparentes infrarrojas de CaF_2 (13 mm de diámetro y 0.5 de espesor). Todos los espectros se obtuvieron utilizando un único tamaño de apertura de enmascaramiento de 8 $\mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$. Además de la polarización de luz casi lineal, intrínseca de la radiación sincrotrón, la luz sincrotrón también se polarizó a 0 o 90° por un polarizador de rejilla de alambre holográfico ZnSe (Acal BFi Germany GmbH). Los espectros Raman se adquirieron utilizando un espectrómetro de microscopio Raman dispersivo Renishaw (modelo InVia Qontor, GmbH, Alemania) y el software Renishaw WiRe. El espectrómetro está equipado con un microscopio

óptico Leica DM2700 M, un detector de dispositivo acoplado a carga (CCD) enfriado termoeléctricamente (-70 °C, 1024 × 256 píxeles) y una luz dispersada del espectrógrafo con 2400 líneas mm⁻¹ de rejilla. Los experimentos se realizaron a una longitud de onda de excitación de 532 nm y con una potencia de láser nominal entre 1 y 100 mW de potencia de salida. El tiempo de exposición fue de 10 s, la potencia del láser se ajustó al 1 % de su potencia de salida nominal y cada espectro se recogió con tres acumulaciones. Los espectros Raman se recolectaron en un rango espectral de 600 a 1600 cm⁻¹ con los mismos parámetros de medición. Los espectros de dicroísmo circular (DC) en la región UV lejana se registraron con un espectrómetro qCD Chirascan-plus (Applied Photophysics, APL; Reino Unido) equipado con una celda de temperatura controlada, utilizando una longitud de trayectoria de 10 mm. El gel de electroforesis de poliacrilamida se preparó al 15% de resolución y un 4% de apilamiento. La muestra se diluyó a 15 mg/mL de ePLP. La muestra se diluyó 1:4 con tampón de muestra (tampón reductor SDS) y se calentó a 95 ° C durante 10 min. Las bandas de referencia de las soluciones BSA y Lyz se cargaron usando el mismo procedimiento. Todas las muestras fueron expuestas a un campo eléctrico de 120 V durante 2 h. Después de ese tiempo, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie-metanol-ácido acético (0.1 % - 40 % - 10 %) y, posteriormente, se lavó con una solución de 40 % de metanol y 10 % de ácido acético.

Morfología de los nanotubos

Las imágenes de microscopía óptica se obtuvieron usando un microscopio de polarización de luz Zeiss Axioskop 40 Pol (Carl Zeiss, Gotinga, Alemania) donde se observaron muestras de nanotubos que se cultivaron en un cubreobjetos de vidrio. La microscopía electrónica de

barrido (SEM) se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido Zeon Neon40 de Ion Beam enfocado que funciona a 5 KV. Las muestras de nanotubos se cultivaron en un cubreobjetos de vidrio y se depositaron en soportes de aluminio y se recubrieron con una capa delgada de carbono. Las imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) se adquirieron en un PicoSPM de imágenes moleculares y un controlador NanoScope IV, en condiciones ambientales. La derivación AFM se hizo funcionar a una desviación constante con una frecuencia de exploración de filas de 1 Hz. Se realizaron mediciones en varias partes de las muestras, que produjeron imágenes reproducibles similares a las mostradas en este trabajo. Los tamaños de las ventanas de escaneo oscilaron entre $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ y $80 \times 80 \mu\text{m}^2$.

Mediciones de conductividad

Para un primer examen, las mediciones de conductividad de protones se realizaron con una membrana de autoensamblaje seca. La conductividad se determinó mediante mediciones de impedancia usando el analizador de respuesta de frecuencia (FRA) AutoLab PGSTAT302N a una amplitud de CA de 10 mV. El intervalo de frecuencia empleado para las mediciones varió de 10kHz a 10mHz. Las muestras de autoensamblaje se cultivaron en dos discos de acero inoxidable (electrodos de bloqueo compuestos por acero tipo AISI 304). Se depositaron 200 μL de una solución con una concentración de péptido de 0.76 $\text{mg}/\mu\text{L}$ en agua/HIFP (94:6) y se dejaron secar a 4 ° C. Luego, las muestras se atraparon dentro de los discos, separadas por un soporte de teflón, correspondiente a la configuración de celda casera de conductividad a través del plano. La celda utilizada se describió completamente anteriormente [247]. Finalmente, para el ensayo, los valores de espesor de las muestras de autoensamblaje en seco se midieron con un dispositivo de bolsillo Neurtek Mega-Check FE. Los datos de alta

frecuencia de la gráfica de Nyquist corresponden a la combinación de resistencia a granel (R_b) y capacitancia del sistema polimérico de electrodo de membrana y la adaptación de los resultados experimentales con un circuito eléctrico equivalente. La conductividad de protones de las muestras se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\sigma = \frac{L}{R_b A} \quad (\text{Ecuación 10})$$

Donde σ es la conductividad de protón ($S\text{ cm}^{-1}$), L el grosor (cm) de la membrana polimérica, A es el área de contacto entre los electrodos y la membrana polimérica (es decir, el área de superficie del electrodo, 1.766 cm^2) y R_b la resistencia total de la membrana (Ω) calculada a partir de la gráfica de Nyquist.

Carga de TC en nanotubos e-PLP y experimentos de liberación

Se mezcló una solución madre ultrafiltrada (7.6 mg/mL) de ePLP en agua milli-Q con HFIP como codisolvente para reducir la concentración de péptido a 4.2 mg/mL. Esta solución se mezcló con una solución acuosa de 25 mg/mL de TC a proporciones de masa final de 1:1, 1:0.5 y 1:0.33 PLP/TC. Luego, se depositaron 20 mL de cada solución en un cubreobjetos de microscopio y se dejaron secar en una habitación fría para hacer crecer el autoensamblaje. Cada experimento se realizó por triplicado y la carga del fármaco se analizó en un microscopio confocal. Los nanotubos cargados y sin cargar con TC (controles) se crecieron en un cubreobjetos de microscopio y se colocaron dentro de tubos Falcon. La solución salina tamponada con fosfato (PBS) de pH 7.4 con 20% v/v de etanol se consideró como el medio de liberación. Los ensayos, se realizaron por triplicado y se llevaron a cabo sumergiendo

nanotubos de muestra en 20 mL del medio de liberación y usando un agitador rotativo. El medio se retiró a intervalos de tiempo predeterminados y se reemplazó por medio fresco. El medio retirado se usó para cuantificar la TC liberada midiendo su absorbancia en un espectrofotómetro Shimadzu 3600 UV-vis-NIT. Finalmente, los nanotubos se disolvieron en agua y la Poli-*L*-FeOEt residual se cuantificó por UV-vis. Las curvas de calibración para TC ($y = 0.0039x + 0.037$ $R^2 = 0.9997$) y Poli-*L*-FeOEt ($y = 1.0337x + 0.0276$, $R^2 = 0.9994$) se obtuvieron trazando la absorbancia contra la concentración de muestras por triplicado.

Resultados y discusión

La ePLP obtenida después del proceso de ultrafiltración (5000 Da) presenta un peso molecular relativamente alto, ca. 20,000 Da, según lo corroborado por $^1\text{H-NMR}$ (Apéndice E-71) y electroforesis SDS-PAGE (Apéndice E-74). Los espectros UV-vis registrados a varias concentraciones de ePLP muestran las bandas características de los máximos de absorción a 251, 257 y 263 nm (Figura 49), que se asignan al sistema π de los grupos aromáticos de las unidades de repetición, (consulte la curva de calibración en el Apéndice E-75).

Para la formación de fibrillas proteicas, como en el caso de las proteínas amiloides implicadas en el desarrollo de enfermedades degenerativas, los enlaces de hidrógeno asistidos por agua son clave en la disposición del autoensamblaje. Por lo tanto, los sitios de enlace de hidrógeno altos son fuerzas impulsoras importantes hacia la organización, formación, estabilización de la estructura secundaria y en el plegamiento del péptido. A este respecto, los espectros de DC de una solución de polipéptido muy diluida en agua (0.5 mg/mL) y en urea (1 M)

proporcionan información sobre la estructura y el rol del enlace de hidrógeno en la organización de ePLP en el proceso de ensamblaje inicial, como se muestra en la Figura 50.

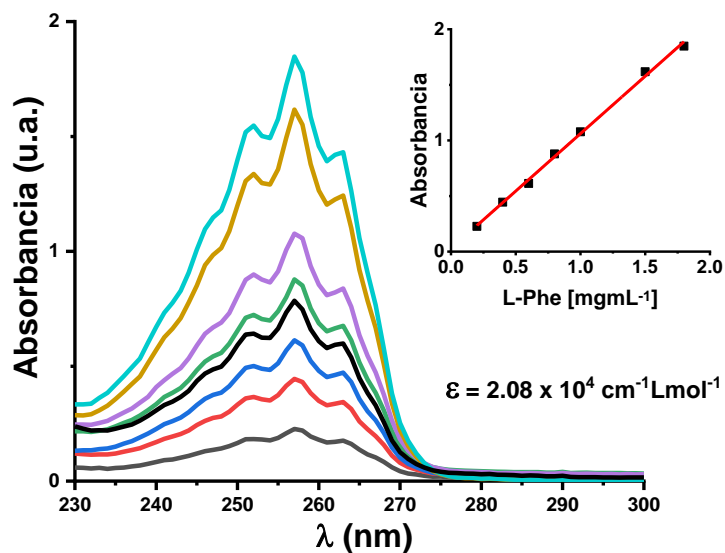


Figura 49. Espectros de absorción UV-vis de ePLP en diferentes concentraciones ($\epsilon = 2.08 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

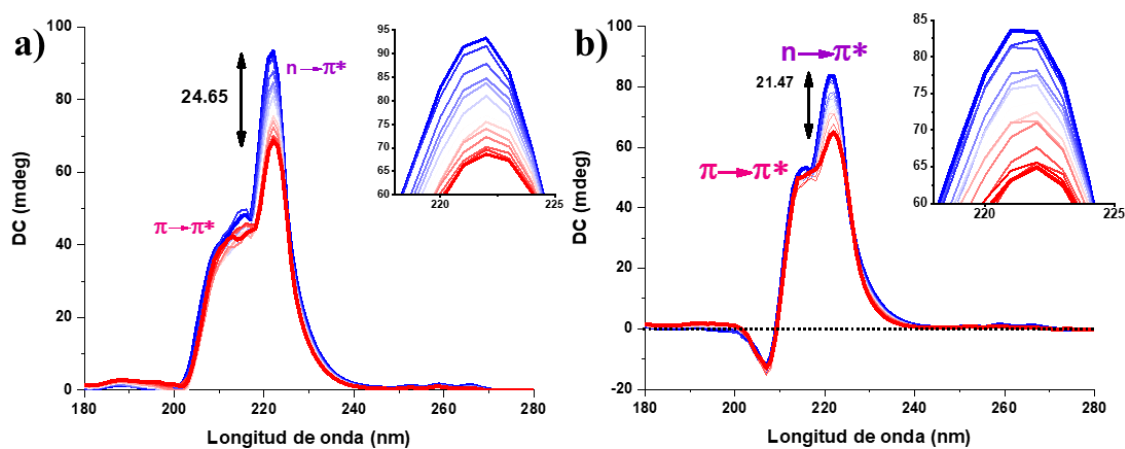


Figura 50. Espectros de DC al calentar de 25 (azul) a 90 °C (rojo) para ePLP solubilizado en agua (a) y urea solubilizado (b).

Las bandas en los espectros de la Figura 50 sugieren una mezcla de estructuras aleatorias de hoja- β y α -hélice en porcentajes de 31.29, 52.93 y 15.78 %, respectivamente, calculados por dichoweb [248, 249]. Los espectros de DC registrados a diferentes temperaturas en el agua muestran una señal de DC amplia y positiva, que disminuye con el aumento de la temperatura. El comportamiento de la señal de DC puede entenderse intuitivamente por la absorción UV correspondiente [250].

La transición electrónica de carbonilo más baja es del tipo $n \rightarrow \pi^*$, que implica la rotación de la densidad de electrones del par libre del oxígeno no unido al orbital π^* del enlace C=O. Se espera que el centro quiral del carbono induzca una señal de DC de transición para los grupos de amina y las cadenas laterales vecinas de acuerdo con la regla del octeto de Moffitt [251], donde el DC de la transición $n \rightarrow \pi^*$ depende de las posiciones de otras partes de la molécula relativas al carbonilo. Entonces, la señal a ~ 220 nm puede asignarse a este $n \rightarrow \pi^*$ del grupo carbonilo y a ~ 210 nm a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del cromóforo aromático.

La disminución constante a 222 nm durante el ciclo de calentamiento está relacionada con la pérdida de integridad estructural de este grupo, que a su vez, esto puede atribuirse a la desestabilización de los enlaces de hidrógeno entre la amina y el átomo de oxígeno de carbonilo [252]. Por lo tanto, estas evidencias confirman que la temperatura influye en la estabilización de los enlaces de hidrógeno.

Por otro lado, cuando el DC se realiza en urea (Figura 50), que restringe la interpenetración de agua, y generalmente tiene una actividad que se reconoce por el despliegue y la desnaturalización de los péptidos [253], la intensidad y el gradiente de intensidad de la banda

a 222 nm son menores y más estrechos que en agua a igual concentración de ePLP. Sin lugar a dudas, este comportamiento está vinculado al proceso de despliegue causado por la urea en la ePLP, que también es corroborado por un acoplamiento de excitón debido a la interacción entre el grupo carbonilo y el residuo aromático.

En conclusión, los resultados sugieren que la estabilización de la estructura depende de la temperatura en un proceso gobernado por enlaces de hidrógeno.

Morfología de los nanotubos de ePLP

El autoensamblaje de la ePLP se estudió variando la concentración del polímero (entre 0.15 y 0.5 mg/mL), la temperatura y la proporción del disolvente. Este barrido de condiciones termodinámicas demuestra que el homopéptido es capaz de autoensamblarse en varias geometrías, como se muestra en micrografías ópticas representativas en la Figura 51.

Curiosamente, la concentración de 0.5 mg mL^{-1} permite que un proceso de autoensamblaje logre nanotubos con una morfología homogénea con 1% en volumen de HFIP. Las micrografías ópticas evidencian que la longitud y la presencia de los nanotubos aumentan con el aumento de la proporción de agua en la mezcla, como se muestra en la Figura 52.

Los análisis SEM y AFM corroboran que ePLP se autoensambla mejor en morfología de tubos definidos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ en 0.5 mg mL^{-1} con una proporción de 1:99 de HFIP/H₂O. El diámetro promedio de estos tubos determinado por AFM es $0.21 \pm 0.04 \text{ } \mu\text{m}$, mientras que la longitud se establece en varios cientos de micras (Figura 53). Es notable que bajo estas condiciones el proceso de autoensamblaje se controla permitiendo estructuras bien definidas con un tamaño

promedio homogéneo, mientras que hay un control deficiente de las morfologías en otras condiciones experimentales.

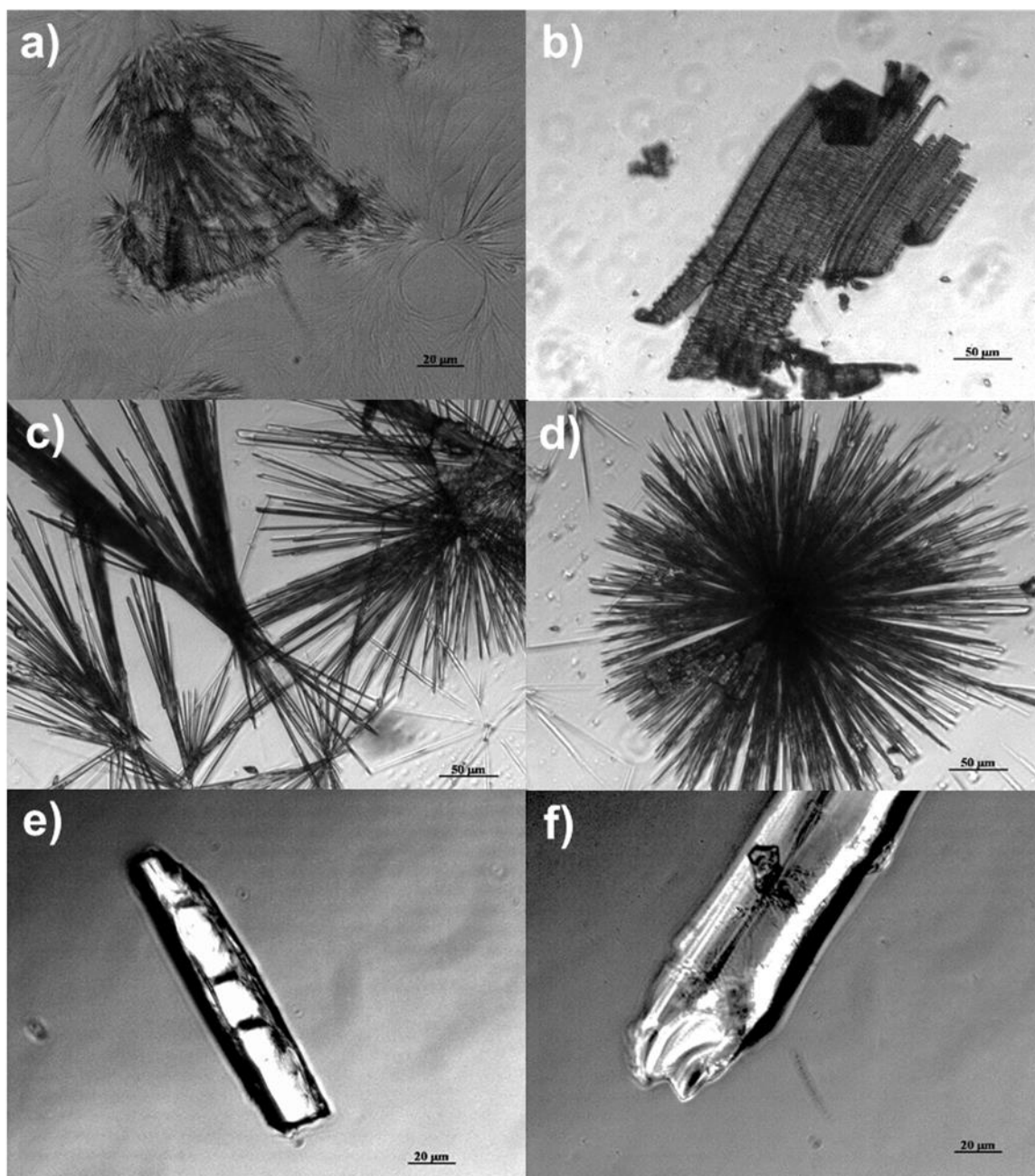


Figura 51. Micrografía óptica del autoensamblaje obtenido a 4 °C para ePLP en una concentración de 0.15 mgmL^{-1} en HFIP/H₂O 9: 1 (a, b); 0.375 mgmL^{-1} en HFIP:H₂O 6:94 (c, d); y PLP 0.075 mgmL^{-1} en 1:9 (e) y 2:8 de HFIP:H₂O (f).

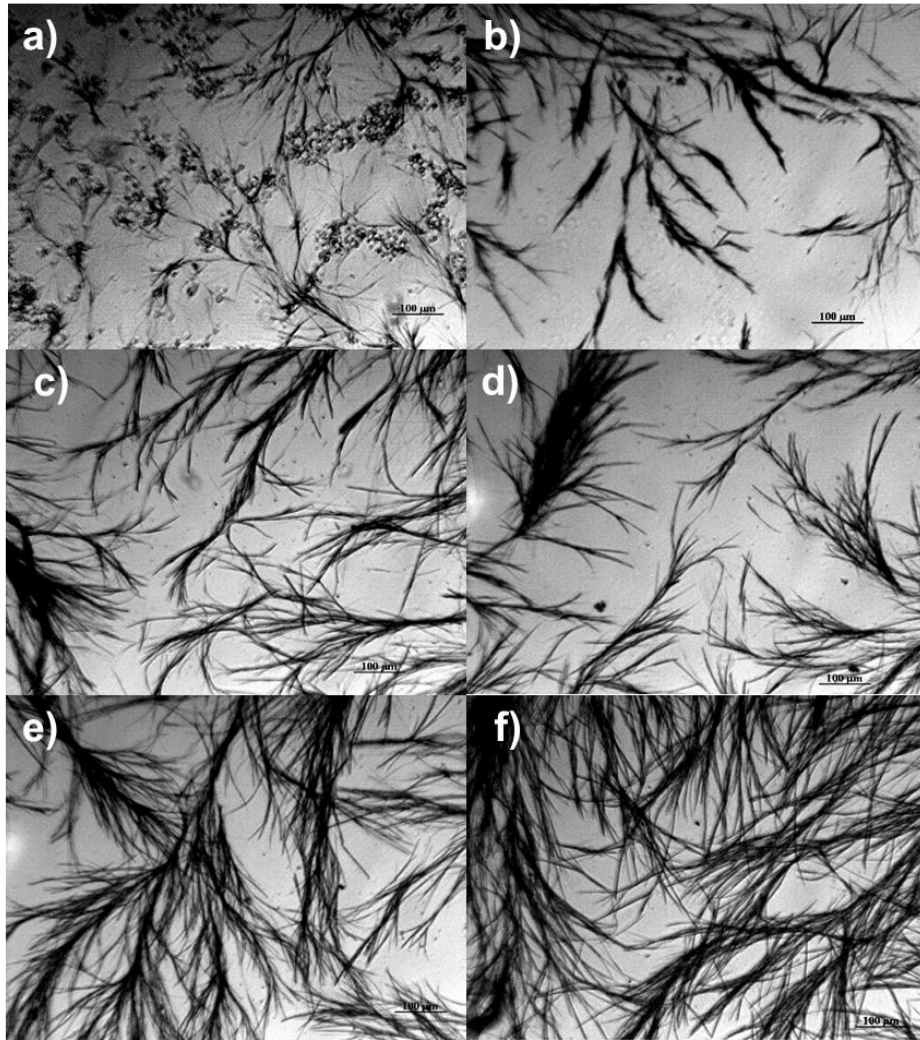


Figura 52. Micrografías ópticas de ePLP autoensamblada a 0.5 mgmL^{-1} a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ en HFIP/ H_2O 2:3 (a), 1:4 (b), 1:9 (c), 6:94 (d), 2:98 (e), 1:99 (f).

Vale la pena señalar que los nanotubos de dímeros y oligómeros de fenilalanina informados anteriormente generalmente se han obtenido en concentraciones más altas que las empleadas en el presente trabajo [254-256]. Además, los tubos obtenidos con esta ePLP mediada por enzimas tienen diámetros más pequeños que los informados para oligofenilalaninas [233, 257]. También es muy notable que los nanotubos de ePPL se obtengan en una proporción de 1:99 de HFIP: H_2O , que es una concentración mucho más baja para el codisolvente en

comparación con otros estudios informados [258, 259]. Para la ePLP, por lo tanto, el control de la formación de nanotubos está relacionado con el aumento de agua en la mezcla y la disminución de la concentración de polipéptidos.

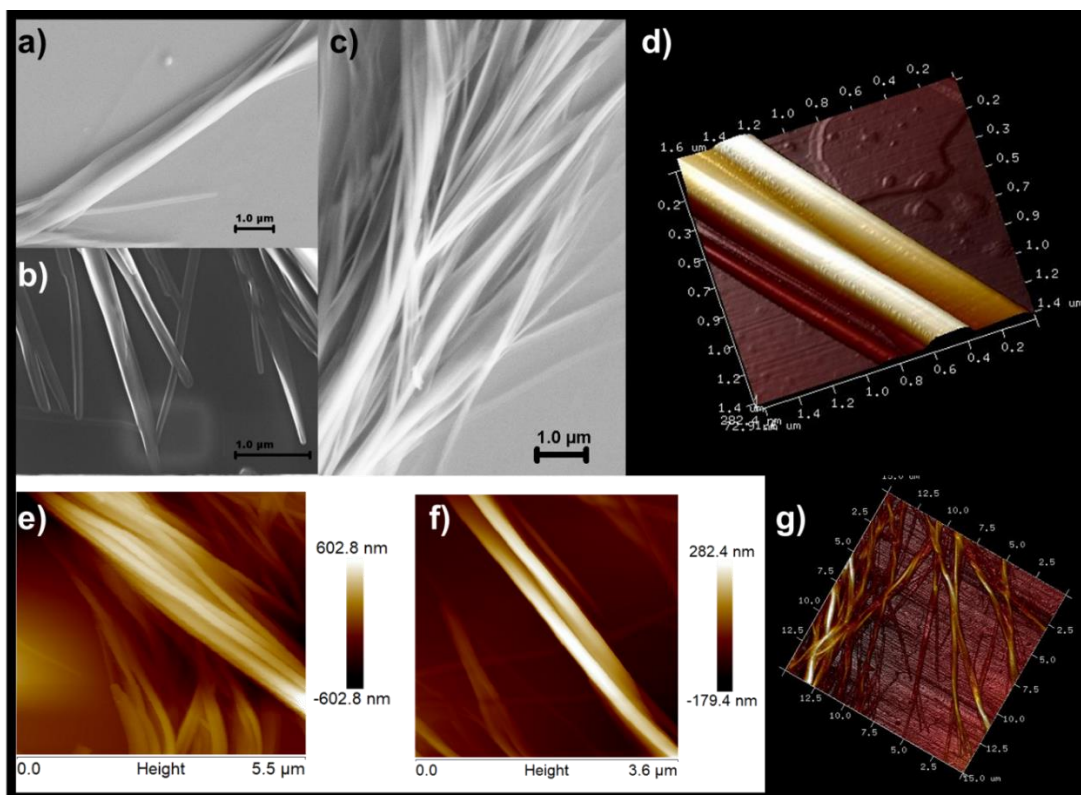


Figura 53. Imágenes de micrografía para los nanotubos ePLP obtenidos a 4 °C y 0.5 mgmL⁻¹ en 1:99 HFIP/H₂O; SEM (a-c) y AFM (d-g).

Es notorio que el proceso de autoensamblado en un entorno acuoso es de gran relevancia para fines biológicos, por lo que es relevante reducir la cantidad de codisolvente utilizada para la generación de nanotubos. Las interacciones no covalentes en el agua son específicas y permiten modos de interacción únicos, por lo que los polímeros supramoleculares acuosos ofrecen la posibilidad de crear sistemas biocompatibles con gran potencial en aplicaciones médicas [260].

Estudios de infrarrojo sobre los nanotubos de ePLP y ePLP

La Figura 54-a muestra los espectros de FTIR para una muestra de nanotubos con una concentración de péptido de 0.5 mgmL^{-1} (rojo) y para el PLP no ensamblado (azul). La vibración de estiramiento NH da lugar a la banda a 3530 cm^{-1} asignada a la amida A, cuya frecuencia depende de la fuerza del enlace de hidrógeno y se correlaciona con el doblete de resonancia de Fermi del segundo componente (amida B) a 3115 cm^{-1} .

La vibración de la amida I apenas se ve afectada por la naturaleza de la cadena lateral, ya que se relaciona con la estructura secundaria del esqueleto molecular, por lo tanto, se usa más comúnmente para el análisis de la estructura secundaria. Cabe destacar que la banda de amida I ($1600\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$) cambia cuando la ePLP se autoensambla, porque esta señal es sensible a los efectos de los enlaces de hidrógeno existentes.

La deconvolución de Fourier en la Figura 54-b permite la medición precisa de esta señal de amida I. Estos resultados sugieren que la ePLP cambia de una mezcla de hoja- β (1641 cm^{-1}), estructuras aleatorias (1610 cm^{-1}) y α -hélice (1581 cm^{-1} para la amida II) (Fig. 52-b arriba) a adoptar principalmente la estructura de α -hélice después del autoensamblaje (Fig. 52-b inferior). Esta evidencia es consistente con los resultados del DC.

El SR-IR especular que usa radiación sincrotrón demuestra que la formación de nanotubos probablemente se desencadena por la orientación de largo alcance de los enlaces peptídicos hacia la misma dirección, creando una región hidrofílica dentro del nanotubo con los anillos aromáticos hidrofóbicos orientados hacia afuera, esto concuerda con el pozo de

autoensamblajes documentados de difenilalanina y tetrafenilalanina con extremo de F-Moc [233, 261-263].

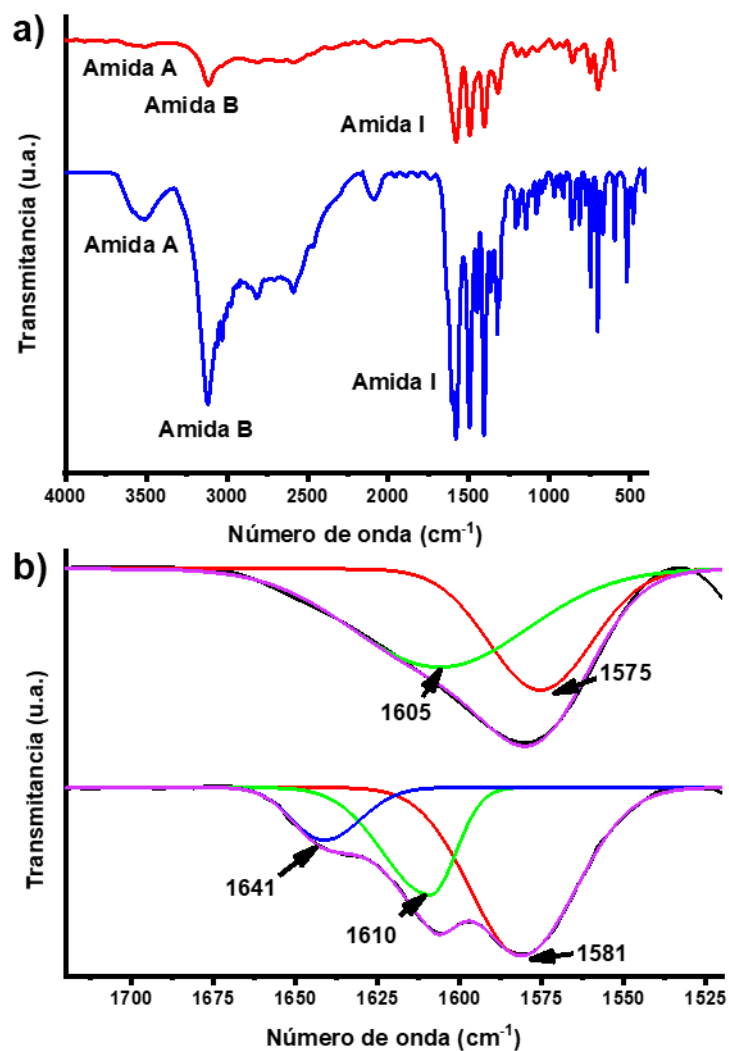


Figura 54. (a) Espectro FTIR para ePLP autoensamblada (arriba) y ePLP liofilizada (abajo) con etiquetado de señales principales. (b) Deconvolución de Fourier en la región amida I para espectros FTIR, no ensamblados (espectro superior); y autoensamblado (abajo)

Estos conjuntos supramoleculares se construyen mediante enlaces de hidrógeno entre los aminoácidos vecinos, que constituyen fuertes interacciones supramoleculares que estabilizan profundamente las estructuras secundarias en péptidos y proteínas. La formación de tales materiales está comenzando a allanar el camino para aplicaciones emergentes, como el desarrollo de membranas biomiméticas con canales internos para el transporte de moléculas pequeñas (por ejemplo, insulina) y de nuevos sistemas controlados de administración de fármacos [264, 265].

En los espectros SRIR para los nanotubos, se muestran en la Figura 55-b, las muestras se cultivaron directamente sobre las ventanas transparentes infrarrojas CaF_2 . La región seleccionada para este estudio corresponde a un grupo de nanotubos orientados horizontalmente, como se muestra en la micrografía óptica en la Figura 55-a. Las áreas con tubos orientados horizontal y verticalmente son claramente diferentes, con una intensidad débil para la banda en 1642 cm^{-1} (disposición horizontal para un espectro polarizado de 0°), lo que sugiere que el enlace $\text{C}=\text{O}$ de los grupos amida están orientados paralelos al eje helicoidal.

El espectro adquirido con polarización de 90° muestra la desaparición de la banda indicada, lo que sugiere la orientación paralela de largo alcance para el grupo amida. Esta característica notable en los espectros SR-IR para estos materiales es fuertemente indicativa de la formación de cavidades internas hidrófilas dentro de estos nanotubos *vía* enlace de hidrógeno altamente direccional de los aminoácidos vecinos.

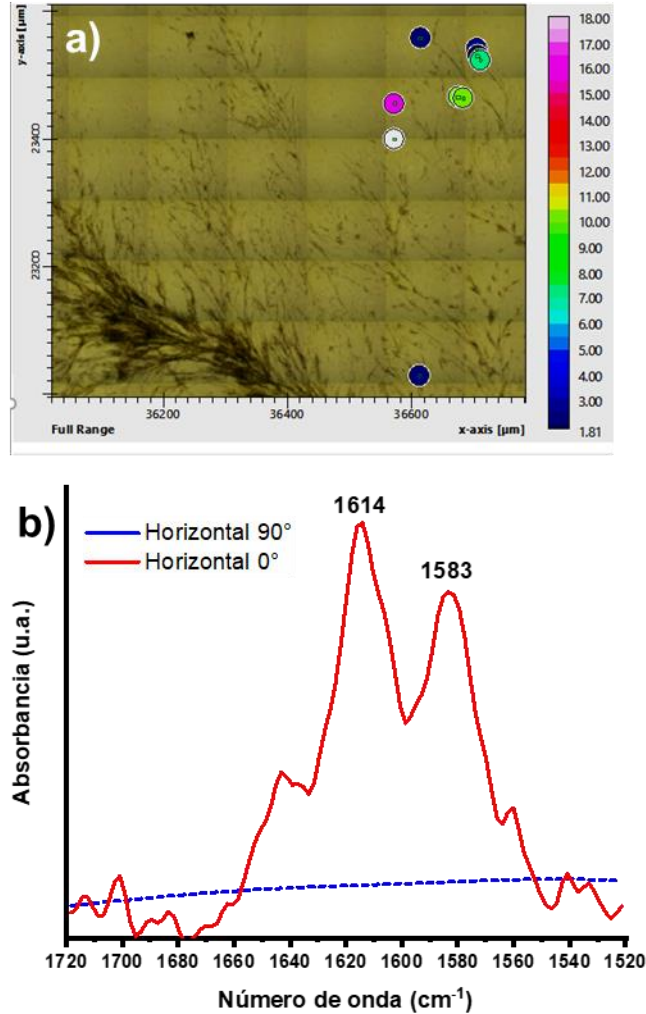


Figura 55. Micrografía óptica que muestra nanotubos PLP orientados horizontal y verticalmente seleccionados para mediciones (puntos) (a); y espectros polarizados SRIR de tubos de ePLP con orientaciones horizontal y vertical, adquiridos con polarizaciones de 0 y 90° (solo para la orientación horizontal) (b).

Medición de conductividad en los nanotubos de ePLP

Para una primera aproximación, las mediciones de conductividad de protones se realizaron con muestras de nanotubos secos cultivados en la superficie del electrodo de acero. El valor de conductividad corresponde al promedio de dos muestras y las resistencias se midieron a temperatura ambiente, la presión de compresión se fijó a la distancia mínima permitida por

los tornillos utilizados para sellar la celda (descritos en los métodos). Al observar el gráfico de Nyquist (Apéndice E-75), es notable que la resistencia para la muestra de nanotubos ePLP sea menor que la del PLP en desorden. Una observación importante es que la disposición de la celda utilizada en este trabajo tiene una buena configuración para los análisis EIS, como lo demuestra la ausencia de puntos dispersos. De hecho, el circuito equivalente ajustado muestra una buena correlación y una diferencia estadística inferior al 10 %. La conductividad del protón calculada y el grosor de las muestras se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Organización de la muestra de ePLP, resistencia (R), conductividad (σ) de protones y espesor de muestra (ST)

Muestra	R_b^* (Ω)	σ^* ($S\ cm^{-1}$)	ST** (μm)
ePLP (desorden)	5.8×10^3	6.2×10^{-7}	25 ± 3
ePLP (nanotubos)	1.8×10^2	3.2×10^{-6}	4 ± 2

* Medido en estado seco a temperatura ambiente, ajustando los datos de impedancia obtenidos al circuito equivalente que se muestra en la Figura Apéndice E-76. ** El espesor de la muestra (ST) se midió con un dispositivo de bolsillo Neurtek Mega-Check FE.

Esta ePLP bioinspirada puede permitir una mejor interfaz entre los mundos semiconductores y biológicos, debido a la capacidad simple e intrínseca de autoensamblarse en nanotubos ordenados y emerge como un candidato prometedor para aplicaciones tecnológicas. Amplios estudios han revelado que las características semiconductoras son propiedades inherentes de algunas nanoestructuras basadas en péptidos, que exhiben características notables que pueden permitir el desarrollo de entidades bioinspiradas en materiales funcionales [266].

Carga de TC en nanotubos de ePLP enzimática

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de los nanotubos anfifílicos de ePLP alientan a explorar las capacidades de ePLP en la carga y liberación de medicamentos de

interés farmacéutico. Para este propósito, la tetraciclina es un excelente candidato de prueba debido a sus características antibióticas fluorescentes de amplio espectro. La formación de nanotubos también procede de una relación 1:99 (HFIP: H₂O; 0.5 mgmL⁻¹; 4 °C) variando la relación PLP:TC en 1:1, 1:0.5 y 1:0.33. La presencia de TC en el medio no tiene ningún efecto sobre el autoensamblaje de ePLP en nanotubos en estas condiciones óptimas comprobadas, y la presencia del fármaco se verifica fácilmente mediante microscopía confocal (Figura 56).

La micrografía de la muestra control en la Figura 56a muestra la auto fluorescencia inicial del péptido, sin embargo, aumenta cualitativamente con la carga de TC (Figura 56 b-e). La fluorescencia TC proviene del interior de los nanotubos, a pesar de que no se puede descartar la adsorción TC en la superficie, debido a interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno.

Esto último es corroborado por la espectroscopía Raman (Figura 57), que indica que las interacciones de enlace de hidrógeno existen entre los grupos funcionales de PLP y TC, alterando así el entorno químico local. Esto no es sorprendente, porque ambas moléculas son ricas en motivos que son fuertes donantes de H (i.e., en la TC los grupos -OH y NH₂) y aceptores de H (i.e., en la TC los grupos carbonilo anular y exocíclico), lo que permite estas interacciones de enlace de hidrogeno. En consecuencia, las señales de la amida I y II (1605, 1581 cm⁻¹) se desplazan al menos 5 cm⁻¹ en comparación con la de los nanotubos no cargados (Figura 57-rojo).

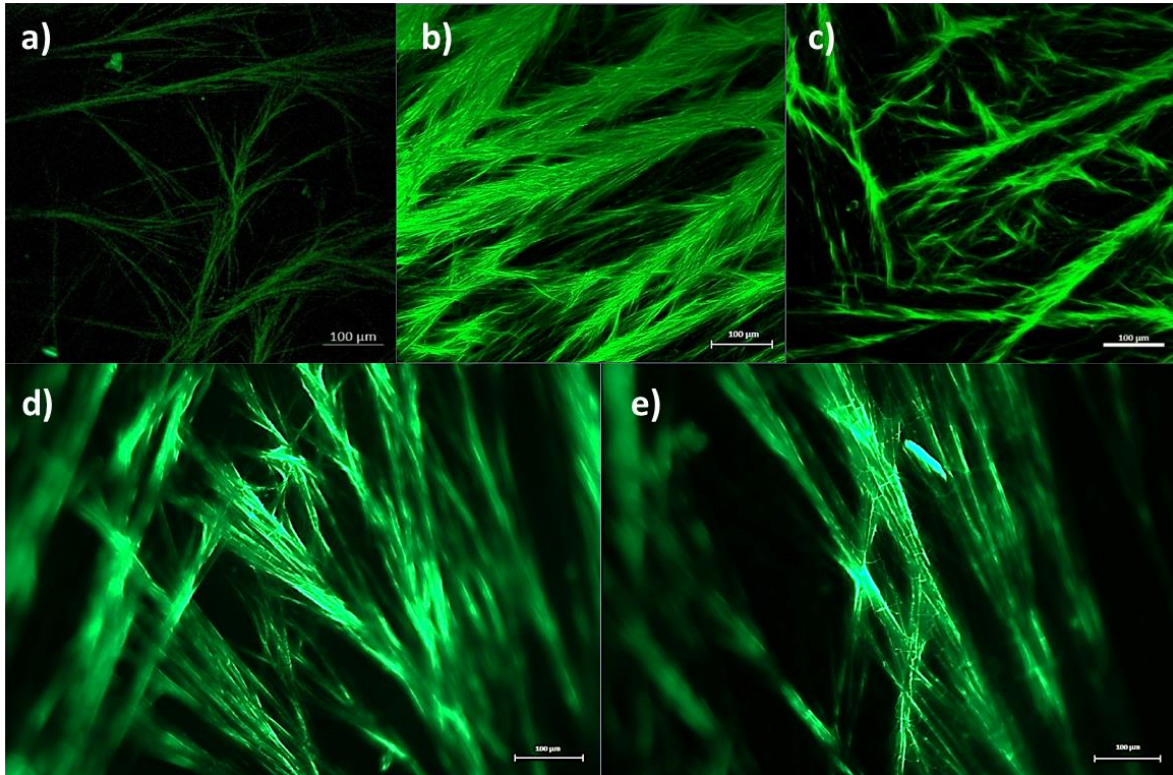


Figura 56. Micrografías confocales de nanotubos ePLP (a) y nanotubos ePLP cargados con TC (b-e).

Liberación de TC de nanotubos ePLP

Los resultados de los ensayos de liberación cuantitativa en un medio fisiológico que contiene etanol con relaciones PLP/TC de 1:1, 1:0.5 y 1:0.33 se muestran en la Figura 58. Cabe señalar que se espera una variedad de microambientes para cualquier ubicación dada dentro del organismo (es decir, pH e índice de hidrofobicidad/hidrofilia) y, en consecuencia, el etanol se usa con frecuencia para reflejar mejor la mirada de condiciones fisiológicas potenciales dentro del cuerpo, específicamente, el uso de este disolvente es bien conocido por modificar la hidrofobicidad del medio de liberación cuando se administran fármacos hidrofóbicos, en un intento de imitar la hidrofobicidad de los entornos ricos en lípidos y liposomas [267].

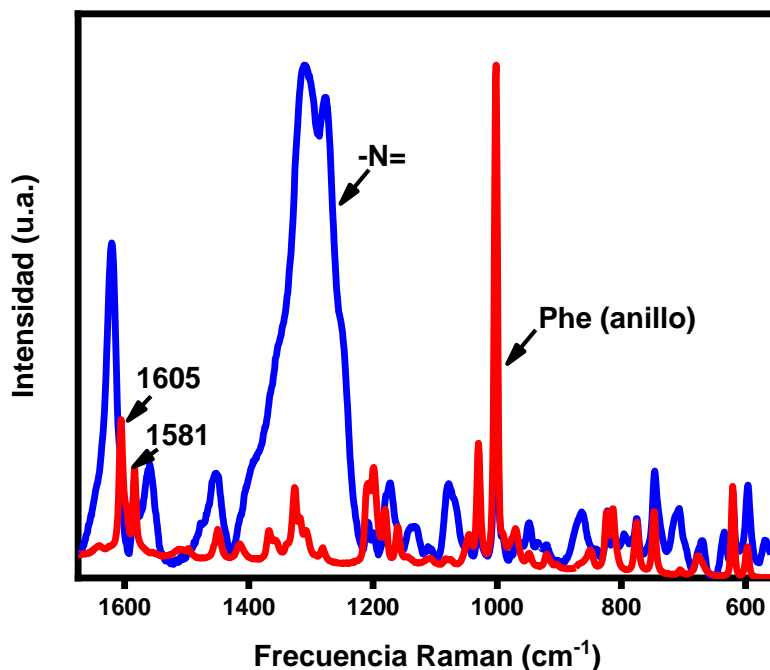


Figura 57. Espectros Raman para nanotubos PLP (rojo); y nanotubos PLP cargados con TC (azul).

En el presente experimento, es evidente que la liberación de TC depende de la concentración de ePLP en solución, con la liberación más rápida para la muestra de relación PLP: TC 1:1 con aprox. 100 % en 24 h (Figura 58).

Por otro lado, las otras dos concentraciones presentan tasas de liberación más lentas, lo que podría atribuirse a una fuerte adsorción de la TC a los nanotubos del polipéptido, lo que reduce la difusión al medio. Después de las primeras 6 h, la liberación del fármaco para las proporciones de ePLP: TC 1:0.5 y 1:0.33 se vuelve aún más lenta que la de la proporción ePLP:TC 1:1. La aparición de agregados supramoleculares debido a fuertes interacciones electrostáticas TC-PLP y enlaces de hidrógeno, podría evitar la liberación completa del medicamento, de acuerdo con sistemas análogos reportados previamente [268, 269].

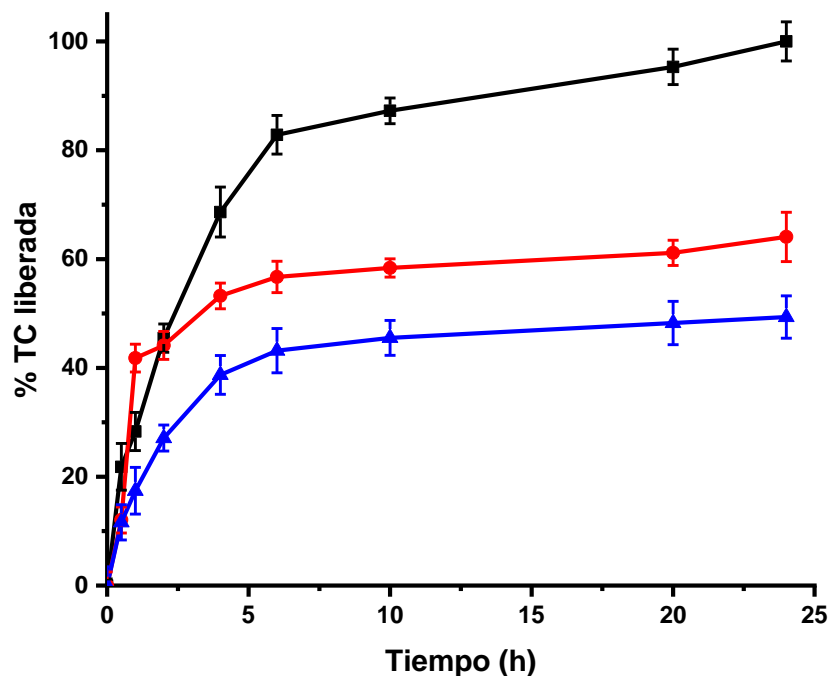


Figura 58. Perfiles de liberación de TC de ePLP/TC 1:1 (azul), 1:0.5 (rojo) y 1:0.33 (negro) en PBS-EtOH. Los valores corresponden al promedio, mientras que las barras de error indican las desviaciones estándar (los ensayos se realizaron por triplicado).

Conclusiones

Se demuestra el autoensamblaje en nanotubos en condiciones controladas de la ePLP quimioenzimática. Un avance notable en este trabajo es el cambio de una macromolécula soluble en agua y mal ordenada a una estructura de nanotubos de α -hélice bien definida con solo 1 % en volumen de codisolvente orgánico. Fuertes evidencias analíticas respaldan las características fisicoquímicas y morfológicas de este ePLP. Estos resultados difieren de otros informes que usan PLP por SSPS, en donde la solubilidad y los bajos pesos moleculares

desafían el control del autoensamblaje. Estas características permiten aplicaciones biomédicas previstas. En este sentido, la carga de TC para estudios de liberación ha sido exitosa. Las características distintivas de la PLP mediada por enzimas en comparación con otros enfoques químicos fomentan una mayor investigación de esta molécula y otros péptidos mediados por enzimas sintetizados en un disolvente orgánico puro. Futuras investigaciones están en progreso para definir si los nanotubos de ePLP podrían ser capaces de cargar y liberar controladamente PGAL.

Referencias

- [1] P.A. Madurantakam, C.P. Cost, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, Science of nanofibrous scaffold fabrication: strategies for next generation tissue-engineering scaffolds, (2009).
- [2] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, *Biomaterials* 29(20) (2008) 2941-2953.
- [3] E. Fournier, C. Passirani, C.N. Montero-Menei, J.P. Benoit, Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility, *Biomaterials* 24(19) (2003) 3311-3331.
- [4] J.C. Middleton, A.J. Tipton, Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials* 21(23) (2000) 2335-2346.
- [5] Y. Ramot, M. Haim-Zada, A.J. Domb, A. Nyska, Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers, *Advanced drug delivery reviews* 107 (2016) 153-162.
- [6] I.M. Adjei, G. Plumton, B. Sharma, *Oxidative Stress and Biomaterials: The Inflammatory Link*, *Oxidative Stress and Biomaterials*, Elsevier 2016, pp. 89-115.
- [7] A. Vishwakarma, N.S. Bhise, M.B. Evangelista, J. Rouwkema, M.R. Dokmeci, A.M. Ghaemmaghami, N.E. Vrana, A. Khademhosseini, Engineering immunomodulatory biomaterials to tune the inflammatory response, *Trends in biotechnology* 34(6) (2016) 470-482.
- [8] C.J. Wilson, R.E. Clegg, D.I. Leavesley, M.J. Pearcy, Mediation of biomaterial–cell interactions by adsorbed proteins: a review, *Tissue engineering* 11(1-2) (2005) 1-18.
- [9] L. Tang, J.W. Eaton, Fibrin (ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials, *The Journal of experimental medicine* 178(6) (1993) 2147-2156.
- [10] L.-C. Xu, C.A. Siedlecki, Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces, *Biomaterials* 28(22) (2007) 3273-3283.
- [11] J. Vitte, A. Benoliel, A. Pierres, P. Bongrand, Is there a predictable relationship between surface physical-chemical properties and cell behaviour at the interface, *Eur Cell Mater* 7 (2004) 52-63.
- [12] L. Zhang, Z. Cao, T. Bai, L. Carr, J.-R. Ella-Menye, C. Irvin, B.D. Ratner, S. Jiang, Zwitterionic hydrogels implanted in mice resist the foreign-body reaction, *Nature biotechnology* 31(6) (2013) 553-556.
- [13] Y.K. Kim, R. Que, S.W. Wang, W.F. Liu, Modification of biomaterials with a self-protein inhibits the macrophage response, *Advanced healthcare materials* 3(7) (2014) 989-994.
- [14] S. Saghadzadeh, C. Rinoldi, M. Schot, S.S. Kashaf, F. Sharifi, E. Jalilian, K. Nuutila, G. Giatsidis, P. Mostafalu, H. Derakhshandeh, Drug delivery systems and materials for wound healing applications, *Advanced drug delivery reviews* 127 (2018) 138-166.
- [15] C. Esche, C. Stellato, L.A. Beck, Chemokines: key players in innate and adaptive immunity, *Journal of Investigative Dermatology* 125(4) (2005) 615-628.
- [16] P. Kruger, M. Saffarzadeh, A.N. Weber, N. Rieber, M. Radsak, H. von Bernuth, C. Benarafa, D. Roos, J. Skokowa, D. Hartl, Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury, *PLoS pathogens* 11(3) (2015).

- [17] S. de Oliveira, E.E. Rosowski, A. Huttenlocher, Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse, *Nature Reviews Immunology* 16(6) (2016) 378.
- [18] W.G. Brodbeck, M. MacEwan, E. Colton, H. Meyerson, J.M. Anderson, Lymphocytes and the foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 74(2) (2005) 222-229.
- [19] H.H. Simms, R. D'Amico, K.I. Bland, Integrin stimulation regulates polymorphonuclear leukocytes inflammatory cytokine expression, *Annals of surgery* 225(6) (1997) 757.
- [20] R. Klopffleisch, F. Jung, The pathology of the foreign body reaction against biomaterials, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 105(3) (2017) 927-940.
- [21] S. Todros, C. Venturato, A.N. Natali, G. Pace, V. Di Noto, Effect of steam on structure and mechanical properties of biomedical block copolymers, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 52(20) (2014) 1337-1346.
- [22] F.O. Martinez, S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, *F1000prime reports* 6 (2014).
- [23] P.J. Murray, Macrophage polarization, *Annual review of physiology* 79 (2017) 541-566.
- [24] H. Yang, C. Liu, D. Yang, H. Zhang, Z. Xi, Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition, *Journal of applied Toxicology* 29(1) (2009) 69-78.
- [25] R. van Lith, G.A. Ameer, *Antioxidant Polymers as Biomaterial*, Oxidative stress and biomaterials, Elsevier 2016, pp. 251-296.
- [26] S. Selvam, K. Kundu, K.L. Templeman, N. Murthy, A.J. García, Minimally invasive, longitudinal monitoring of biomaterial-associated inflammation by fluorescence imaging, *Biomaterials* 32(31) (2011) 7785-7792.
- [27] D. Surendran, R. Sarath Kumar, C. Geetha, P. Mohanan, Long term effect of biodegradable polymer on oxidative stress and genotoxicity, *Proc. BIO, 2012*, pp. 37-46.
- [28] Y. Ye, J. Li, Z. Yuan, Effect of antioxidant vitamin supplementation on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials, *PloS one* 8(2) (2013).
- [29] S.-K. Myung, W. Ju, B. Cho, S.-W. Oh, S.M. Park, B.-K. Koo, B.-J. Park, Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials, *Bmj* 346 (2013) f10.
- [30] G. Bjelakovic, D. Nikolova, C. Gluud, Antioxidant supplements to prevent mortality, *Jama* 310(11) (2013) 1178-1179.
- [31] H. Haenen, E. Bleijlevens, H. Elzerman, J. Temmink, J. Koeman, P. Van Bladeren, Cytotoxicity of 2-tert-butyl hydroquinone glutathione conjugates after apical and basolateral exposure of rat renal proximal tubular cell monolayers, *Toxicology in vitro* 10(2) (1996) 141-148.
- [32] P. Arulselvan, M.T. Fard, W.S. Tan, S. Gothai, S. Fakurazi, M.E. Norhaizan, S.S. Kumar, Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016 (2016) 15.
- [33] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouységu, Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis, *Angewandte Chemie International Edition* 50(3) (2011) 586-621.

- [34] D.G. Barrett, T.S. Sileika, P.B. Messersmith, Molecular diversity in phenolic and polyphenolic precursors of tannin-inspired nanocoatings, *Chemical Communications* 50(55) (2014) 7265-7268.
- [35] J. Shen, G. Gao, X. Liu, J. Fu, Natural Polyphenols Enhance Stability of Crosslinked UHMWPE for Joint Implants, *Clinical Orthopaedics and Related Research®* 473(3) (2015) 760-766.
- [36] R.R. Watson, V.R. Preedy, S. Zibadi, *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease*, Academic press 2018.
- [37] P.-G. Pietta, Flavonoids as antioxidants, *Journal of natural products* 63(7) (2000) 1035-1042.
- [38] M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism, *The Journal of Physical Chemistry A* 108(22) (2004) 4916-4922.
- [39] X. Wang, F. Liu, J. Yun, Z. Feng, J. Jiang, Y. Yang, P. Zhang, Iron-Catalyzed Synthesis of the Hexahydrocyclopenta [c] furan Core and Concise Total Synthesis of Polyflavanostilbene B, *Angewandte Chemie International Edition* 57(32) (2018) 10127-10131.
- [40] J. Marin-Navarro, N. Roupain, D. Talens-Perales, J. Polaina, Identification and structural analysis of amino acid substitutions that increase the stability and activity of *Aspergillus niger* glucose oxidase, *PloS one* 10(12) (2015).
- [41] T. Oguchi, S.-i. Tawaki, H. Uyama, S. Kobayashi, Enzymatic synthesis of soluble polyphenol, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 73(6) (2000) 1389-1396.
- [42] J. López, J.M. Hernández-Alcántara, P. Roquero, C. Montiel, K. Shirai, M. Gimeno, E. Bárzana, *Trametes versicolor* laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 97 (2013) 100-105.
- [43] H. Uyama, H. Kurioka, I. Kaneko, S. Kobayashi, Synthesis of a new family of phenol resin by enzymatic oxidative polymerization, *Chemistry letters* 23(3) (1994) 423-426.
- [44] L. Panzella, A. Napolitano, Natural phenol polymers: Recent advances in food and health applications, *Antioxidants* 6(2) (2017) 30.
- [45] J. Díaz-Sánchez, A. Rosas-Aburto, E. Vivaldo-Lima, J.M. Hernández-Alcántara, I. Gracia-Mora, H. Vázquez-Torres, L.C. Ordóñez, P. Roquero, M. Gimeno, Development and characterization of a flexible electrochromic device based on polyaniline and enzymatically synthesized poly (gallic acid), *Synthetic Metals* 223 (2017) 43-48.
- [46] R. Sánchez-Sánchez, A. Romero-Montero, C. Montiel, Y. Melgarejo-Ramírez, C. Sánchez-Ortega, H. Lugo-Martínez, B. Cabello-Arista, R. García-Arazola, C. Velasquillo, M. Gimeno, Cytoprotective effect of the enzyme-mediated polygallic acid on fibroblast cells under exposure of UV-irradiation, *Materials Science and Engineering: C* 76 (2017) 417-424.
- [47] Y. Zamudio-Cuevas, M.A. Andonegui-Elguera, A. Aparicio-Juárez, E. Aguillón-Solís, K. Martínez-Flores, E. Ruvalcaba-Paredes, C. Velasquillo-Martínez, C. Ibarra, V. Martínez-López, M. Gutiérrez, The enzymatic poly (gallic acid) reduces pro-inflammatory cytokines in vitro, a potential application in inflammatory diseases, *Inflammation* (2020) 1-12.
- [48] A. Rajca, Organic diradicals and polyradicals: from spin coupling to magnetism?, *Chemical reviews* 94(4) (1994) 871-893.

- [49] P. Wang, S. Lin, Z. Lin, M.D. Peeks, T. Van Voorhis, T.M. Swager, A Semiconducting Conjugated Radical Polymer: Ambipolar Redox Activity and Faraday Effect, *Journal of the American Chemical Society* 140(34) (2018) 10881-10889.
- [50] T.V. Can, R.T. Weber, J.J. Walsh, T.M. Swager, R.G. Griffin, Frequency-Swept Integrated Solid Effect, *Angewandte Chemie International Edition* 56(24) (2017) 6744-6748.
- [51] J.E. Nutting, M. Rafiee, S.S. Stahl, Tetramethylpiperidine N-Oxyl (TEMPO), Phthalimide N-Oxyl (PINO), and Related N-Oxyl Species: Electrochemical Properties and Their Use in Electrocatalytic Reactions, *Chemical Reviews* 118(9) (2018) 4834-4885.
- [52] T. Jähnert, B. Häupler, T. Janoschka, M.D. Hager, U.S. Schubert, Polymers based on stable phenoxyl radicals for the use in organic radical batteries, *Macromolecular rapid communications* 35(9) (2014) 882-887.
- [53] T. Suga, H. Ohshiro, S. Sugita, K. Oyaizu, H. Nishide, Emerging N-Type Redox-Active Radical Polymer for a Totally Organic Polymer-Based Rechargeable Battery, *Advanced Materials* 21(16) (2009) 1627-1630.
- [54] J. Yu, L. Sun, C. Ma, Y. Qiao, H. Yao, Thermal degradation of PVC: A review, *Waste management* 48 (2016) 300-314.
- [55] J.W. Collette, J.S. Miller, Materials, research—current issues and future directions, *Advanced Materials* 1(5) (1989) 140-141.
- [56] T. Nezakati, A. Seifalian, A. Tan, A.M. Seifalian, Conductive polymers: opportunities and challenges in biomedical applications, *Chemical reviews* 118(14) (2018) 6766-6843.
- [57] P. Zugenmaier, Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers, *Progress in polymer science* 26(9) (2001) 1341-1417.
- [58] R. Mülhaupt, Hermann Staudinger and the origin of macromolecular chemistry, *Angewandte Chemie International Edition* 43(9) (2004) 1054-1063.
- [59] G. Jeschke, Determination of the nanostructure of polymer materials by electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Macromolecular rapid communications* 23(4) (2002) 227-246.
- [60] G. Tria, H.D. Mertens, M. Kachala, D.I. Svergun, Advanced ensemble modelling of flexible macromolecules using X-ray solution scattering, *IUCrJ* 2(2) (2015) 207-217.
- [61] J. Higgins, Neutron Scattering from Polymers: Five Decades of Developing Possibilities, *Annual review of chemical and biomolecular engineering* 7 (2016) 1-28.
- [62] R.M. Gathungu, R. Kautz, B.S. Kristal, S.S. Bird, P. Vouros, The integration of LC-MS and NMR for the analysis of low molecular weight trace analytes in complex matrices, *Mass spectrometry reviews* (2018).
- [63] A. Romero-Montero, A. Tecante, R. García-Arrazola, C. Montiel, L.J. del Valle, J. Puiggali, M. Gimeno, Growth of epithelial cells on films of enzymatically synthesized poly (gallic acid) crosslinked to carboxymethylcellulose, *RSC Advances* 7(29) (2017) 17660-17669.
- [64] T. Sukegawa, H. Omata, I. Masuko, K. Oyaizu, H. Nishide, Anionic polymerization of 4-methacryloyloxy-TEMPO using an MMA-capped initiator, *ACS Macro Letters* 3(3) (2014) 240-243.
- [65] K. Oyaizu, T. Suga, K. Yoshimura, H. Nishide, Synthesis and characterization of radical-bearing polyethers as an electrode-active material for organic secondary batteries, *Macromolecules* 41(18) (2008) 6646-6652.

- [66] M. Suguro, A. Mori, S. Iwasa, K. Nakahara, K. Nakano, Syntheses and electrochemical properties of TEMPO radical substituted silicones: active material for organic radical batteries, *Macromolecular Chemistry and Physics* 210(17) (2009) 1402-1407.
- [67] S. Komaba, T. Tanaka, T. Ozeki, T. Taki, H. Watanabe, H. Tachikawa, Fast redox of composite electrode of nitroxide radical polymer and carbon with polyacrylate binder, *Journal of Power Sources* 195(18) (2010) 6212-6217.
- [68] Z. Jia, Q. Fu, J. Huang, Synthesis of poly (ethylene oxide) with pending 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-oxyl groups and its further initiation of the grafting polymerization of styrene, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 44(12) (2006) 3836-3842.
- [69] M. Suguro, S. Iwasa, Y. Kusachi, Y. Morioka, K. Nakahara, Cationic Polymerization of Poly (vinyl ether) Bearing a TEMPO Radical: A New Cathode-Active Material for Organic Radical Batteries, *Macromolecular Rapid Communications* 28(18-19) (2007) 1929-1933.
- [70] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision B.01, 2009. Wallingford CT.
- [71] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, *Theoretical Chemistry Accounts* 120(1-3) (2008) 215-241.
- [72] N. Treitel, R. Shenhar, I. Aprahamian, T. Sheradsky, M. Rabinovitz, Calculations of PAH anions: When are diffuse functions necessary?, *Physical Chemistry Chemical Physics* 6(6) (2004) 1113-1121.
- [73] A.C. Eslami, W. Pasanphan, B.A. Wagner, G.R. Buettner, Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: An electron paramagnetic resonance study, *Chemistry Central Journal* 4(1) (2010) 15.
- [74] H.-F. Ji, H.-Y. Zhang, L. Shen, Proton dissociation is important to understanding structure–activity relationships of gallic acid antioxidants, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16(15) (2006) 4095-4098.
- [75] M. Sillion, D. Hritcu, G. Lisa, M.I. Popa, New hybrid materials based on layered double hydroxides and antioxidant compounds. Preparation, characterization and release kinetic studies, *Journal of Porous Materials* 19(3) (2012) 267-276.
- [76] B. Bleaney, R. Rubins, Explanation of someForbidden"Transitions in Paramagnetic Resonance, *Proceedings of the Physical Society* 77(1) (1961) 103.
- [77] T. Jähnert, M.D. Hager, U.S. Schubert, Application of phenolic radicals for antioxidants, as active materials in batteries, magnetic materials and ligands for metal-complexes, *Journal of Materials Chemistry A* 2(37) (2014) 15234-15251.

- [78] Q. Cao, L.M. Dornan, L. Rogan, N.L. Hughes, M.J. Muldoon, Aerobic oxidation catalysis with stable radicals, *Chemical Communications* 50(35) (2014) 4524-4543.
- [79] T. Janoschka, M.D. Hager, U.S. Schubert, Powering up the future: radical polymers for battery applications, *Advanced Materials* 24(48) (2012) 6397-6409.
- [80] K. Zhang, M.J. Monteiro, Z. Jia, Stable organic radical polymers: synthesis and applications, *Polymer Chemistry* 7(36) (2016) 5589-5614.
- [81] A. Rajca, J. Wongsriratanakul, S. Rajca, Magnetic ordering in an organic polymer, *Science* 294(5546) (2001) 1503-1505.
- [82] E. Morisbak, V. Ansteinson, J.T. Samuelsen, Cell toxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA): the role of oxidative stress, *European journal of oral sciences* 123(4) (2015) 282-287.
- [83] J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio, Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *Journal of the American Chemical Society* 123(6) (2001) 1173-1183.
- [84] I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Imai, M. Kamibayashi, Y. Yoshihashi, K.-i. Matsumoto, K. Fukuhara, K. Terada, S. Itoh, T. Ozawa, Solubilisation of a 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in water by β -cyclodextrin to evaluate the radical-scavenging activity of antioxidants in aqueous media, *Chemical Communications* 51(39) (2015) 8311-8314.
- [85] S. Mishra, A. Gupta, P. Malhotra, P. Singh, R. Pathak, A. Singh, S. Kukreti, H. Gautam, S. Javed, R. Kumar, Protection against ionizing radiation induced oxidative damage to structural and functional proteins by semiquinone glucoside derivative isolated from radioresistant bacterium *Bacillus* sp. INM-1, *Current Biotechnology* 3(1) (2014) 117-126.
- [86] R. Bader, P. MacDougall, C. Lau, Bonded and nonbonded charge concentrations and their relation to molecular geometry and reactivity, *Journal of the American Chemical Society* 106(6) (1984) 1594-1605.
- [87] R.F. Bader, H. Essén, The characterization of atomic interactions, *The Journal of chemical physics* 80(5) (1984) 1943-1960.
- [88] R.J. Soto, J.R. Hall, M.D. Brown, J.B. Taylor, M.H. Schoenfish, In vivo chemical sensors: role of biocompatibility on performance and utility, *Analytical chemistry* 89(1) (2017) 276-299.
- [89] Y. Chujo, K. Tanaka, New polymeric materials based on element-blocks, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 88(5) (2015) 633-643.
- [90] K. Miki, A. Kimura, T. Inoue, H. Matsuoka, H. Harada, M. Hiraoka, K. Ohe, Synthesis of biocompatible polysaccharide analogues and their application to in vivo optical tumor imaging, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 88(6) (2015) 792-803.
- [91] K. Ariga, K. Minami, M. Ebara, J. Nakanishi, What are the emerging concepts and challenges in NANO? Nanoarchitectonics, hand-operating nanotechnology and mechanobiology, *Polymer Journal* 48(4) (2016) 371-389.
- [92] S. Pilla, *Handbook of bioplastics and biocomposites engineering applications*, John Wiley & Sons 2011.
- [93] A. Espadín, N. Vázquez, A. Tecante, L.T. de Dios, M. Gimeno, C. Velasquillo, K. Shirai, Fibroblast viability and inhibitory activity against *Pseudomonas aeruginosa* in lactic acid-grafted chitosan hydrogels, *Journal of Applied Polymer Science* 131(14) (2014).

- [94] V. Coma, I. Sebti, P. Pardon, F. Pichavant, A. Deschamps, Film properties from crosslinking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid, *Carbohydrate polymers* 51(3) (2003) 265-271.
- [95] M.P. Adinugraha, D.W. Marseno, Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from cavendish banana pseudo stem (*Musa cavendishii* LAMBERT), *Carbohydrate Polymers* 62(2) (2005) 164-169.
- [96] H. Kang, R. Liu, Y. Huang, Graft modification of cellulose: Methods, properties and applications, *Polymer* 70 (2015) A1-A16.
- [97] O. Nimmi, P. George, Evaluation of the antioxidant potential of a newly developed polyherbal formulation for antiobesity, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci* 4(3) (2012) 505-510.
- [98] E. Llorens, L.J. del Valle, A. Díaz, M.T. Casas, J. Puiggali, Polylactide nanofibers loaded with vitamin B 6 and polyphenols as bioactive platform for tissue engineering, *Macromolecular Research* 21(7) (2013) 775-787.
- [99] E. Llorens, L.J. del Valle, J. Puiggali, Inhibition of radical-induced oxidative DNA damage by antioxidants loaded in electrospun polylactide nanofibers, *Macromolecular Research* 22(4) (2014) 388-396.
- [100] Y. Zheng, W.-B. Song, L.-J. Xuan, Directing-group-assisted copper-catalyzed oxidative esterification of phenols with aldehydes, *Organic & biomolecular chemistry* 13(44) (2015) 10834-10843.
- [101] E.I. Solomon, U.M. Sundaram, T.E. Machonkin, Multicopper oxidases and oxygenases, *Chemical reviews* 96(7) (1996) 2563-2606.
- [102] M. Jacobsson, J. Malmberg, U. Ellervik, Aromatic O-glycosylation, *Carbohydrate research* 341(10) (2006) 1266-1281.
- [103] L. Xu, T. Qi, L. Xu, L. Lu, M. Xiao, Recent progress in the enzymatic glycosylation of phenolic compounds, *Journal of Carbohydrate Chemistry* 35(1) (2016) 1-23.
- [104] S.-i. Shoda, H. Uyama, J.-i. Kadokawa, S. Kimura, S. Kobayashi, Enzymes as green catalysts for precision macromolecular synthesis, *Chemical reviews* 116(4) (2016) 2307-2413.
- [105] D. Alonso, M. Gimeno, R. Olayo, H. Vázquez-Torres, J.D. Sepúlveda-Sánchez, K. Shirai, Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles, *Carbohydrate Polymers* 77(3) (2009) 536-543.
- [106] M.A. Hernández-Valdepeña, J. Pedraza-Chaverri, I. Gracia-Mora, R. Hernández-Castro, F. Sánchez-Bartez, J. Nieto-Sotelo, C. Montiel, K. Shirai, M. Gimeno, Suppression of the tert-butylhydroquinone toxicity by its grafting onto chitosan and further cross-linking to agavin toward a novel antioxidant and prebiotic material, *Food chemistry* 199 (2016) 485-491.
- [107] Q. Xing, K. Yates, C. Vogt, Z. Qian, M.C. Frost, F. Zhao, Increasing mechanical strength of gelatin hydrogels by divalent metal ion removal, *Scientific reports* 4 (2014) 4706.
- [108] A.S.f. Testing, Materials, Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, *Astm International* 2002.
- [109] N. Gontard, R. Thibault, B. Cuq, S. Guilbert, Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(4) (1996) 1064-1069.

- [110] A. Gennadios, C.L. Weller, C.H. Gooding, Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films, *Journal of food engineering* 21(4) (1994) 395-410.
- [111] D. Klemm, B. Heublein, H.P. Fink, A. Bohn, Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material, *Angewandte chemie international edition* 44(22) (2005) 3358-3393.
- [112] P.G. Agache, C. Monneur, J.L. Leveque, J. De Rigal, Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo, *Archives of dermatological research* 269(3) (1980) 221-232.
- [113] T. Teorell, E. Stenhagen, Ein Universalpuffer für den pH-Bereich 2.0 bis 12.0, *Biochem Z* 299 (1938) 416-419.
- [114] Y. Márquez, J.C. Martínez, P. Turon, L. Franco, J. Puiggalí, Influence of pH on morphology and structure during hydrolytic degradation of the segmented GL-b-[GL-co-TMC-co-CL]-b-GL copolymer, *Fibers* 3(3) (2015) 348-372.
- [115] I. Dogsa, M. Tomšič, J. Orehek, E. Benigar, A. Jamnik, D. Stopar, Amorphous supramolecular structure of carboxymethyl cellulose in aqueous solution at different pH values as determined by rheology, small angle X-ray and light scattering, *Carbohydrate polymers* 111 (2014) 492-504.
- [116] R. van Lith, G.A. Ameer, Chapter Ten - Antioxidant Polymers as Biomaterial, in: T. Dziubla, D.A. Butterfield (Eds.), *Oxidative Stress and Biomaterials*, Academic Press 2016, pp. 251-296.
- [117] P.-A. Mouthuy, S.J. Snelling, S.G. Dakin, L. Milković, A.Č. Gašparović, A.J. Carr, N. Žarković, Biocompatibility of implantable materials: an oxidative stress viewpoint, *Biomaterials* 109 (2016) 55-68.
- [118] G. Huang, F. Li, X. Zhao, Y. Ma, Y. Li, M. Lin, G. Jin, T.J. Lu, G.M. Genin, F. Xu, Functional and biomimetic materials for engineering of the three-dimensional cell microenvironment, *Chemical reviews* 117(20) (2017) 12764-12850.
- [119] A.W. Bridges, A.J. García, Anti-Inflammatory Polymeric Coatings for Implantable Biomaterials and Devices, *Journal of Diabetes Science and Technology* 2(6) (2008) 984-994.
- [120] J.L. Dziki, S.F. Badylak, Immunomodulatory biomaterials, *Current Opinion in Biomedical Engineering* 6 (2018) 51-57.
- [121] W. Wu, R. Cheng, J. das Neves, J. Tang, J. Xiao, Q. Ni, X. Liu, G. Pan, D. Li, W. Cui, B. Sarmiento, Advances in biomaterials for preventing tissue adhesion, *Journal of Controlled Release* 261 (2017) 318-336.
- [122] S.K. Mallapragada, B. Narasimhan, Immunomodulatory biomaterials, *International Journal of Pharmaceutics* 364(2) (2008) 265-271.
- [123] S. Hariram Nile, S. Won Park, Optimized Methods for In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Assays and Its Applications in Herbal and Synthetic Drug Analysis, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 13(1) (2013) 95-100.
- [124] Y.H. Choi, Schisandrin A prevents oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis by attenuating ROS generation in C2C12 cells, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106 (2018) 902-909.

- [125] K. Zhan, H. Ejima, N. Yoshie, Antioxidant and adsorption properties of bioinspired phenolic polymers: A comparative study of catechol and gallol, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4(7) (2016) 3857-3863.
- [126] M. Jeszka-Skowron, M. Krawczyk, A. Zgoła-Grześkowiak, Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals, *Journal of Food Composition and Analysis* 40 (2015) 70-77.
- [127] T. Magrone, E. Jirillo, Influence of polyphenols on allergic immune reactions: mechanisms of action, *Proceedings of the Nutrition Society* 71(2) (2012) 316-321.
- [128] D. Payra, M. Naito, Y. Fujii, Y. Nagao, Hydrophobized plant polyphenols: self-assembly and promising antibacterial, adhesive, and anticorrosion coatings, *Chemical Communications* 52(2) (2016) 312-315.
- [129] J.A. Nichols, S.K. Katiyar, Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms, *Archives of dermatological research* 302(2) (2010) 71-83.
- [130] Y.-J. Zhang, R.-Y. Gan, S. Li, Y. Zhou, A.-N. Li, D.-P. Xu, H.-B. Li, Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases, *Molecules* 20(12) (2015) 21138-21156.
- [131] A.-N. Li, S. Li, Y.-J. Zhang, X.-R. Xu, Y.-M. Chen, H.-B. Li, Resources and biological activities of natural polyphenols, *Nutrients* 6(12) (2014) 6020-6047.
- [132] Z.-F. Yang, L.-P. Bai, W.-b. Huang, X.-Z. Li, S.-S. Zhao, N.-S. Zhong, Z.-H. Jiang, Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure–activity relationship analysis, *Fitoterapia* 93 (2014) 47-53.
- [133] J. Guo, T. Suma, J.J. Richardson, H. Ejima, Modular Assembly of Biomaterials Using Polyphenols as Building Blocks, *ACS Biomaterials Science & Engineering* 5(11) (2019) 5578-5596.
- [134] J.-Y. Lai, L.-J. Luo, Antioxidant gallic acid-functionalized biodegradable in situ gelling copolymers for cytoprotective antiglaucoma drug delivery systems, *Biomacromolecules* 16(9) (2015) 2950-2963.
- [135] Q. Dai, H. Geng, Q. Yu, J. Hao, J. Cui, Polyphenol-based particles for theranostics, *Theranostics* 9(11) (2019) 3170.
- [136] T.S. Sileika, D.G. Barrett, R. Zhang, K.H.A. Lau, P.B. Messersmith, Colorless Multifunctional Coatings Inspired by Polyphenols Found in Tea, Chocolate, and Wine, *Angewandte Chemie* 125(41) (2013) 10966-10970.
- [137] S. Jiang, P. Song, H. Guo, X. Zhang, Y. Ren, H. Liu, X. Song, M. Kong, Blending PLLA/tannin-grafted PCL fiber membrane for skin tissue engineering, *Journal of Materials Science* 52(3) (2017) 1617-1624.
- [138] A.F. Martins, S.P. Facchi, P.C. da Câmara, S.E. Camargo, C.H. Camargo, K.C. Popat, M.J. Kipper, Novel poly (ϵ -caprolactone)/amino-functionalized tannin electrospun membranes as scaffolds for tissue engineering, *Journal of colloid and interface science* 525 (2018) 21-30.
- [139] A. Romero-Montero, M. Gimeno, N. Farfán, P. Labra-Vázquez, Enzymatic poly (gallic acid): A stable multiradical polyanion, *Journal of Molecular Structure* 1197 (2019) 326-335.

- [140] B. Badhani, N. Sharma, R. Kakkar, Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications, *Rsc Advances* 5(35) (2015) 27540-27557.
- [141] R. García-Arrazola, M. Gimeno, E. Bárzana, Use of Liquid 1,1,1,2-Tetrafluoroethane as Solvent Media for Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Lactones, *Macromolecules* 40(12) (2007) 4119-4120.
- [142] O. Suwantong, Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats, *Polymers for Advanced Technologies* 27(10) (2016) 1264-1273.
- [143] A. Espadín, L.T. De Dios, E. Ruvalcaba, J. Valadez-García, C. Velasquillo, I. Bustos-Jaimes, H. Vázquez-Torres, M. Gimeno, K. Shirai, Production and characterization of a nanocomposite of highly crystalline nanowhiskers from biologically extracted chitin in enzymatic poly (ϵ -caprolactone), *Carbohydrate polymers* 181 (2018) 684-692.
- [144] F. Xu, Z. Wang, W. Yang, Surface functionalization of polycaprolactone films via surface-initiated atom transfer radical polymerization for covalently coupling cell-adhesive biomolecules, *Biomaterials* 31(12) (2010) 3139-3147.
- [145] J. Spěváček, J. Brus, T. Divers, Y. Grohens, Solid-state NMR study of biodegradable starch/polycaprolactone blends, *European polymer journal* 43(5) (2007) 1866-1875.
- [146] H.-W. Tien, Y.-L. Huang, S.-Y. Yang, J.-Y. Wang, C.-C.M. Ma, The production of graphene nanosheets decorated with silver nanoparticles for use in transparent, conductive films, *Carbon* 49(5) (2011) 1550-1560.
- [147] M. Koenig, S. Huang, Biodegradable blends and composites of polycaprolactone and starch derivatives, *Polymer* 36(9) (1995) 1877-1882.
- [148] L.J. Del Valle, R. Camps, A. Díaz, L. Franco, A. Rodríguez-Galán, J. Puiggali, Electrospinning of polylactide and polycaprolactone mixtures for preparation of materials with tunable drug release properties, *Journal of polymer research* 18(6) (2011) 1903-1917.
- [149] C.H. Suh, Y.-C. Jung, Y.S. Kim, Effects of thickness and surface roughness on mechanical properties of aluminum sheets, *Journal of mechanical science and technology* 24(10) (2010) 2091-2098.
- [150] H. Vuyk, *Biomaterials in rhinoplasty*, (1998).
- [151] S. Maione, G. Fabregat, L.J. Del Valle, G. Ballano, C. Cativiela, C. Alemán, Electro-biocompatibility of conjugates designed by chemical similarity, *Journal of Peptide Science* 20(7) (2014) 537-546.
- [152] M. Lampin, R. Warocquier-Clérout, C. Legris, M. Degrange, M. Sigot-Luizard, Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials* 36(1) (1997) 99-108.
- [153] W.A. Zisman, Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution, *Advan. Chem. Ser.* 43 (1964) 1-51.
- [154] L.-J. Luo, D.D. Nguyen, J.-Y. Lai, Benzoic acid derivative-modified chitosan-g-poly (N-isopropylacrylamide): Methoxylation effects and pharmacological treatments of Glaucoma-related neurodegeneration, *Journal of Controlled Release* 317 (2020) 246-258.
- [155] A. Faried, D. Kurnia, L. Faried, N. Usman, T. Miyazaki, H. Kato, H. Kuwano, Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines, *International journal of oncology* 30(3) (2007) 605-613.

- [156] D.R. Lu, K. Park, Effect of surface hydrophobicity on the conformational changes of adsorbed fibrinogen, *Journal of colloid and interface science* 144(1) (1991) 271-281.
- [157] Q. Huang, L. Hao, J. Xie, T. Gong, J. Liao, Y. Lin, Tea polyphenol–functionalized graphene/chitosan as an experimental platform with improved mechanical behavior and bioactivity, *ACS applied materials & interfaces* 7(37) (2015) 20893-20901.
- [158] S.H. Ku, J. Ryu, S.K. Hong, H. Lee, C.B. Park, General functionalization route for cell adhesion on non-wetting surfaces, *Biomaterials* 31(9) (2010) 2535-2541.
- [159] J. McColl, R. Horvath, A. Aref, L. Larcombe, I. Chianella, S. Morgan, G.E. Yakubov, J.J. Ramsden, Polyphenol control of cell spreading on glycoprotein substrata, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 20(5-6) (2009) 841-851.
- [160] S.-F. Chou, L.-J. Luo, J.-Y. Lai, Gallic acid grafting effect on delivery performance and antiglaucoma efficacy of antioxidant-functionalized intracameral pilocarpine carriers, *Acta biomaterialia* 38 (2016) 116-128.
- [161] S.-F. Chou, L.-J. Luo, J.-Y. Lai, In vivo pharmacological evaluations of pilocarpine-loaded antioxidant-functionalized biodegradable thermogels in glaucomatous rabbits, *Scientific reports* 7(1) (2017) 1-15.
- [162] I. Elisia, D.D. Kitts, Anthocyanins inhibit peroxy radical-induced apoptosis in Caco-2 cells, *Molecular and cellular biochemistry* 312(1-2) (2008) 139-145.
- [163] Y.-F. Chu, R.H. Liu, Novel low-density lipoprotein (LDL) oxidation model: antioxidant capacity for the inhibition of LDL oxidation, *Journal of agricultural and food chemistry* 52(22) (2004) 6818-6823.
- [164] S. Duggan, C. Rait, A. Platt, S.P. Gieseg, Protein and thiol oxidation in cells exposed to peroxy radicals is inhibited by the macrophage synthesised pterin 7, 8-dihydroneopterin, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1591(1-3) (2002) 139-145.
- [165] S.P. Gieseg, D.S. Leake, E.M. Flavall, Z. Amit, L. Reid, Y.-T. Yang, Macrophage antioxidant protection within atherosclerotic plaques, *Front biosci* 14(1) (2009) 230-46.
- [166] S. Kiokias, C. Proestos, V. Oreopoulou, Effect of natural food antioxidants against LDL and DNA oxidative changes, *Antioxidants* 7(10) (2018) 133.
- [167] E. Mariani, G. Lisignoli, R.M. Borzì, L. Pulsatelli, Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response?, *International journal of molecular sciences* 20(3) (2019) 636.
- [168] A. Puliafito, L. Hufnagel, P. Neveu, S. Streichan, A. Sigal, D.K. Fygenon, B.I. Shraiman, Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(3) (2012) 739-744.
- [169] S. Tlili, E. Gauquelin, B. Li, O. Cardoso, B. Ladoux, H. Delanoë-Ayari, F. Graner, Collective cell migration without proliferation: density determines cell velocity and wave velocity, *Royal Society open science* 5(5) (2018) 172421.
- [170] K.S. De Bona, G. Bonfanti, P.E.R. Bitencourt, T.P. da Silva, R.M. Borges, A. Boligon, A. Pigatto, M.L. Athayde, M.B. Moretto, Protective effect of gallic acid and *Syzygium cumini* extract against oxidative stress-induced cellular injury in human lymphocytes, *Drug and chemical toxicology* 39(3) (2016) 256-263.
- [171] M. Kurisawa, J.E. Chung, Y.J. Kim, H. Uyama, S. Kobayashi, Amplification of antioxidant activity and xanthine oxidase inhibition of catechin by enzymatic polymerization, *Biomacromolecules* 4(3) (2003) 469-471.

- [172] M. Kurisawa, J.E. Chung, H. Uyama, S. Kobayashi, Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly (catechin), *Macromolecular Bioscience* 3(12) (2003) 758-764.
- [173] M. Kurisawa, J.E. Chung, H. Uyama, S. Kobayashi, Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly (rutin), *Biomacromolecules* 4(5) (2003) 1394-1399.
- [174] M. Kurisawa, J.E. Chung, H. Uyama, S. Kobayashi, Oxidative coupling of epigallocatechin gallate amplifies antioxidant activity and inhibits xanthine oxidase activity, *Chemical communications* (3) (2004) 294-295.
- [175] J.E. Chung, M. Kurisawa, Y.-J. Kim, H. Uyama, S. Kobayashi, Amplification of antioxidant activity of catechin by polycondensation with acetaldehyde, *Biomacromolecules* 5(1) (2004) 113-118.
- [176] S. Oliver, O. Vittorio, G. Cirillo, C. Boyer, Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules, *Polymer Chemistry* 7(8) (2016) 1529-1544.
- [177] H.H. Gahruie, M. Niakousari, Antioxidant, antimicrobial, cell viability and enzymatic inhibitory of antioxidant polymers as biological macromolecules, *International journal of biological macromolecules* 104 (2017) 606-617.
- [178] M.A. Sabino, Oxidation of polycaprolactone to induce compatibility with other degradable polyesters, *Polymer degradation and stability* 92(6) (2007) 986-996.
- [179] A.L. Raines, R. Olivares-Navarrete, M. Wieland, D.L. Cochran, Z. Schwartz, B.D. Boyan, Regulation of angiogenesis during osseointegration by titanium surface microstructure and energy, *Biomaterials* 31(18) (2010) 4909-4917.
- [180] S. Baek, H. Park, M. Kim, D. Lee, Preparation of PCL/(+)-catechin/gelatin film for wound healing using air-jet spinning, *Applied Surface Science* 509 (2020) 145033.
- [181] M. Contardi, J.A. Heredia-Guerrero, G. Perotto, P. Valentini, P.P. Pompa, R. Spanò, L. Goldoni, R. Bertorelli, A. Athanassiou, I.S. Bayer, Transparent ciprofloxacin-povidone antibiotic films and nanofiber mats as potential skin and wound care dressings, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 104 (2017) 133-144.
- [182] J. Tavakoli, Y. Tang, Honey/PVA hybrid wound dressings with controlled release of antibiotics: Structural, physico-mechanical and in-vitro biomedical studies, *Materials Science and Engineering: C* 77 (2017) 318-325.
- [183] K. Totoraitis, J.L. Cohen, A. Friedman, Topical Approaches to Improve Surgical Outcomes and Wound Healing: A Review of Efficacy and Safety, *Journal of drugs in dermatology: JDD* 16(3) (2017) 209-212.
- [184] H.A. Tran, K.L. Ly, K.E. Fox, P.A. Tran, T.-H. Nguyen, Immobilization of Antimicrobial Silver and Antioxidant Flavonoid as a Coating for Wound Dressing Materials, *International Journal of Nanomedicine* 14 (2019) 9929.
- [185] I. Ludolph, F.W. Fried, K. Knepe, A. Arkudas, M. Schmitz, R.E. Horch, Negative pressure wound treatment with computer-controlled irrigation/instillation decreases bacterial load in contaminated wounds and facilitates wound closure, *International wound journal* 15(6) (2018) 978-984.
- [186] M. Zhai, Y. Xu, B. Zhou, W. Jing, Keratin-chitosan/n-ZnO nanocomposite hydrogel for antimicrobial treatment of burn wound healing: Characterization and biomedical application, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 180 (2018) 253-258.
- [187] M. di Luca, M. Curcio, E. Valli, G. Cirillo, M.E. Butini, A. Farfalla, E. Pantuso, A. Leggio, F.P. Nicoletta, A. Tavanti, Combining antioxidant hydrogels with self-assembled

- microparticles for multifunctional wound dressings, *Journal of Materials Chemistry B* 7(27) (2019) 4361-4370.
- [188] G. Lagana, E.H. Anderson, Moisture dressings: the new standard in wound care, *The Journal for Nurse Practitioners* 6(5) (2010) 366-370.
- [189] P. Zahedi, I. Rezaeian, S.O. Ranaei-Siadat, S.H. Jafari, P. Supaphol, A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages, *Polymers for Advanced Technologies* 21(2) (2010) 77-95.
- [190] T. Amna, F.N. Gharsan, K. Shang, M.S. Hassan, M.-S. Khil, I. Hwang, Electrospun Twin Fibers Encumbered with Intrinsic Antioxidant Activity as Prospective Bandage, *Macromolecular Research* 27(7) (2019) 663-669.
- [191] C.-Y. Chin, J. Jalil, P.Y. Ng, S.-F. Ng, Development and formulation of *Moringa oleifera* standardised leaf extract film dressing for wound healing application, *Journal of ethnopharmacology* 212 (2018) 188-199.
- [192] S.M. Lee, I.K. Park, Y.S. Kim, H.J. Kim, H. Moon, S. Mueller, Y.-I. Jeong, Physical, morphological, and wound healing properties of a polyurethane foam-film dressing, *Biomaterials research* 20(1) (2016) 15.
- [193] M. Yoshimura, N. Ohura, J. Tanaka, S. Ichimura, Y. Kasuya, O. Hotta, Y. Kagaya, T. Sekiyama, M. Tannba, N. Suzuki, Soft silicone foam dressing is more effective than polyurethane film dressing for preventing intraoperatively acquired pressure ulcers in spinal surgery patients: the Border Operating room Spinal Surgery (BOSS) trial in Japan, *International wound journal* 15(2) (2018) 188-197.
- [194] M. Comotto, S. Saghadzadeh, S. Bagherifard, B. Aliakbarian, M. Kazemzadeh-Narbat, F. Sharifi, S.A. Mousavi Shaegh, E. Arab-Tehrany, N. Annabi, P. Perego, Breathable hydrogel dressings containing natural antioxidants for management of skin disorders, *Journal of biomaterials applications* 33(9) (2019) 1265-1276.
- [195] S. Tyeb, N. Kumar, A. Kumar, V. Verma, Flexible agar-sericin hydrogel film dressing for chronic wounds, *Carbohydrate polymers* 200 (2018) 572-582.
- [196] D.S. Yoon, Y. Lee, H.A. Ryu, Y. Jang, K.-M. Lee, Y. Choi, W.J. Choi, M. Lee, K.M. Park, K.D. Park, Cell recruiting chemokine-loaded sprayable gelatin hydrogel dressings for diabetic wound healing, *Acta biomaterialia* 38 (2016) 59-68.
- [197] I. Garcia-Orue, G. Gainza, F.B. Gutierrez, J.J. Aguirre, C. Evora, J.L. Pedraz, R.M. Hernandez, A. Delgado, M. Igartua, Novel nanofibrous dressings containing rhEGF and Aloe vera for wound healing applications, *International journal of pharmaceutics* 523(2) (2017) 556-566.
- [198] S. Gilotra, D. Chouhan, N. Bhardwaj, S.K. Nandi, B.B. Mandal, Potential of silk sericin based nanofibrous mats for wound dressing applications, *Materials Science and Engineering: C* 90 (2018) 420-432.
- [199] J. Haik, R. Kornhaber, B. Blal, M. Harats, The feasibility of a handheld electrospinning device for the application of nanofibrous wound dressings, *Advances in wound care* 6(5) (2017) 166-174.
- [200] L.A. Bosworth, L.-A. Turner, S.H. Cartmell, State of the art composites comprising electrospun fibres coupled with hydrogels: a review, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9(3) (2013) 322-335.

- [201] A. Francesko, P. Petkova, T. Tzanov, Hydrogel dressings for advanced wound management, *Current medicinal chemistry* 25(41) (2018) 5782-5797.
- [202] H. Namazi, R. Rakhshaei, H. Hamishehkar, H.S. Kafil, Antibiotic loaded carboxymethylcellulose/MCM-41 nanocomposite hydrogel films as potential wound dressing, *International journal of biological macromolecules* 85 (2016) 327-334.
- [203] R. Lalani, L. Liu, Electrospun zwitterionic poly (sulfobetaine methacrylate) for nonadherent, superabsorbent, and antimicrobial wound dressing applications, *Biomacromolecules* 13(6) (2012) 1853-1863.
- [204] X. Yang, L. Fan, L. Ma, Y. Wang, S. Lin, F. Yu, X. Pan, G. Luo, D. Zhang, H. Wang, Green electrospun Manuka honey/silk fibroin fibrous matrices as potential wound dressing, *Materials & Design* 119 (2017) 76-84.
- [205] Z. Tang, C. He, H. Tian, J. Ding, B.S. Hsiao, B. Chu, X. Chen, Polymeric nanostructured materials for biomedical applications, *Progress in Polymer Science* 60 (2016) 86-128.
- [206] R. Brindle, O.M. Williams, P. Davies, T. Harris, H. Jarman, A.D. Hay, P. Featherstone, Adjunctive clindamycin for cellulitis: a clinical trial comparing flucloxacillin with or without clindamycin for the treatment of limb cellulitis, *BMJ open* 7(3) (2017) e013260.
- [207] A. Karczewski, S.A. Feitosa, E.I. Hamer, D. Pankajakshan, R.L. Gregory, K.J. Spolnik, M.C. Bottino, Clindamycin-modified triple antibiotic nanofibers: a stain-free antimicrobial intracanal drug delivery system, *Journal of endodontics* 44(1) (2018) 155-162.
- [208] A. Hebeish, M. Hashem, M. Abd El-Hady, S. Sharaf, Development of CMC hydrogels loaded with silver nano-particles for medical applications, *Carbohydrate polymers* 92(1) (2013) 407-413.
- [209] T.W. Wong, N.A. Ramli, Carboxymethylcellulose film for bacterial wound infection control and healing, *Carbohydrate polymers* 112 (2014) 367-375.
- [210] M.E. Ochoa, P. Labra-Vázquez, N. Farfán, R. Santillan, Designed Synthesis and Crystallization of Isomorphic Molecular Gyroscopes with Cell-like Bilayer Self-Assemblies, *Crystal Growth & Design* 18(5) (2018) 2795-2803.
- [211] Y. Inada, H. Orita, Efficiency of numerical basis sets for predicting the binding energies of hydrogen bonded complexes: evidence of small basis set superposition error compared to Gaussian basis sets, *Journal of computational chemistry* 29(2) (2008) 225-232.
- [212] P.L. Ritger, N.A. Peppas, A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices, *Journal of controlled release* 5(1) (1987) 37-42.
- [213] M. Vafaezadeh, A. Fattahi, DFT investigations for “Fischer” esterification mechanism over silica-propyl-SO₃H catalyst: Is the reaction reversible?, *Computational and Theoretical Chemistry* 1071 (2015) 27-32.
- [214] T. Yu, H.-B. Chang, W.-P. Lai, X.-F. Chen, Computational study of esterification between succinic acid and ethylene glycol in the absence of foreign catalyst and solvent, *Polymer Chemistry* 2(4) (2011) 892-896.
- [215] K.A. Rieger, N.P. Birch, J.D. Schiffman, Designing electrospun nanofiber mats to promote wound healing—a review, *Journal of Materials Chemistry B* 1(36) (2013) 4531-4541.

- [216] M. Nakamura, N. Hori, H. Ando, S. Namba, T. Toyama, N. Nishimiya, K. Yamashita, Surface free energy predominates in cell adhesion to hydroxyapatite through wettability, *Materials Science and Engineering: C* 62 (2016) 283-292.
- [217] R. Bayston, L.E. Fisher, K. Weber, An antimicrobial modified silicone peritoneal catheter with activity against both Gram positive and Gram negative bacteria, *Biomaterials* 30(18) (2009) 3167-3173.
- [218] R. Bayston, R. Milner, Antimicrobial activity of silicone rubber used in hydrocephalus shunts, after impregnation with antimicrobial substances, *Journal of clinical pathology* 34(9) (1981) 1057-1062.
- [219] N.S. Capanema, A.A. Mansur, A.C. de Jesus, S.M. Carvalho, L.C. de Oliveira, H.S. Mansur, Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogels for potential wound dressing applications, *International journal of biological macromolecules* 106 (2018) 1218-1234.
- [220] A.K. Gaharwar, N.A. Peppas, A. Khademhosseini, Nanocomposite hydrogels for biomedical applications, *Biotechnology and bioengineering* 111(3) (2014) 441-453.
- [221] T.-L. Tsou, S.-T. Tang, Y.-C. Huang, J.-R. Wu, J.-J. Young, H.-J. Wang, Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) wound dressing containing ciprofloxacin and its drug release studies, *Journal of materials science: materials in medicine* 16(2) (2005) 95-100.
- [222] N. Han, J. Johnson, J.J. Lannutti, J.O. Winter, Hydrogel–electrospun fiber composite materials for hydrophilic protein release, *Journal of controlled release* 158(1) (2012) 165-170.
- [223] S. Prakash, R. Ramasubburayan, V.S. Ramkumar, E. Kannapiran, A. Palavesam, G. Immanuel, In vitro—Scientific evaluation on antimicrobial, antioxidant, cytotoxic properties and phytochemical constituents of traditional coastal medicinal plants, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83 (2016) 648-657.
- [224] J. Wang, K. Liu, R. Xing, X. Yan, Peptide self-assembly: thermodynamics and kinetics, *Chemical Society Reviews* 45(20) (2016) 5589-5604.
- [225] C. Chen, K. Liu, J. Li, X. Yan, Functional architectures based on self-assembly of bio-inspired dipeptides: structure modulation and its photoelectronic applications, *Advances in colloid and interface science* 225 (2015) 177-193.
- [226] S.J. Song, S. Lee, K.-S. Ryu, J.S. Choi, Amphiphilic peptide nanorods based on oligo-phenylalanine as a biocompatible drug carrier, *Bioconjugate chemistry* 28(9) (2017) 2266-2276.
- [227] F. Zhang, H. Yan, DNA self-assembly scaled up, *Nature Publishing Group*, 2017.
- [228] C.M. Dobson, Protein folding and misfolding, *Nature* 426(6968) (2003) 884.
- [229] M.L. Choi, S. Gandhi, Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases, *The FEBS journal* 285(19) (2018) 3631-3644.
- [230] Y. Mazor, S. Gilead, I. Benhar, E. Gazit, Identification and characterization of a novel molecular-recognition and self-assembly domain within the islet amyloid polypeptide, *Journal of molecular biology* 322(5) (2002) 1013-1024.
- [231] B.I. Lee, Y.S. Suh, Y.J. Chung, K. Yu, C.B. Park, Shedding light on Alzheimer's β -amyloidosis: photosensitized methylene blue inhibits self-assembly of β -amyloid peptides and disintegrates their aggregates, *Scientific reports* 7(1) (2017) 7523.

- [232] E. Mayans, G. Ballano, J. Casanovas, L.J. del Valle, M.M. Pérez-Madrigal, F. Estrany, A.I. Jiménez, J. Puiggalí, C. Cativiela, C. Alemán, Hierarchical self-assembly of di-, tri- and tetraphenylalanine peptides capped with two fluorenyl functionalities: from polymorphs to dendrites, *Soft matter* 12(24) (2016) 5475-5488.
- [233] E. Mayans, G. Ballano, J. Casanovas, A. Díaz, M.M. Pérez-Madrigal, F. Estrany, J. Puiggalí, C. Cativiela, C. Alemán, Self-Assembly of Tetraphenylalanine Peptides, *Chemistry—A European Journal* 21(47) (2015) 16895-16905.
- [234] D.M. Ryan, T.M. Doran, S.B. Anderson, B.L. Nilsson, Effect of C-terminal modification on the self-assembly and hydrogelation of fluorinated Fmoc-Phe derivatives, *Langmuir* 27(7) (2011) 4029-4039.
- [235] N. Amdursky, M. Molotskii, E. Gazit, G. Rosenman, Elementary building blocks of self-assembled peptide nanotubes, *Journal of the American Chemical Society* 132(44) (2010) 15632-15636.
- [236] I.W. Hamley, Peptide nanotubes, *Angewandte Chemie International Edition* 53(27) (2014) 6866-6881.
- [237] M. Mizrahi, A. Zakrassov, J. Lerner-Yardeni, N. Ashkenasy, Charge transport in vertically aligned, self-assembled peptide nanotube junctions, *Nanoscale* 4(2) (2012) 518-524.
- [238] C. Guo, Y. Luo, R. Zhou, G. Wei, Probing the self-assembly mechanism of diphenylalanine-based peptide nanovesicles and nanotubes, *ACS nano* 6(5) (2012) 3907-3918.
- [239] N. Habibi, N. Kamaly, A. Memic, H. Shafiee, Self-assembled peptide-based nanostructures: Smart nanomaterials toward targeted drug delivery, *Nano Today* 11(1) (2016) 41-60.
- [240] S. Kim, J.H. Kim, J.S. Lee, C.B. Park, Beta-sheet-forming, self-assembled peptide nanomaterials towards optical, energy, and healthcare applications, *Small* 11(30) (2015) 3623-3640.
- [241] G.B. Qi, Y.J. Gao, L. Wang, H. Wang, Self-Assembled Peptide-Based Nanomaterials for Biomedical Imaging and Therapy, *Advanced Materials* 30(22) (2018) 1703444.
- [242] L. Sun, C. Zheng, T.J. Webster, Self-assembled peptide nanomaterials for biomedical applications: promises and pitfalls, *International journal of nanomedicine* 12 (2017) 73.
- [243] I.S. Aguirre-Díaz, C. Montiel, I. Bustos-Jaimes, Y. Medina-Gonzalez, A. Tecante, M. Gimeno, Chemoenzymatic synthesis of polypeptides in neat 1, 1, 1, 2-tetrafluoroethane solvent, *RSC advances* 8(63) (2018) 35936-35945.
- [244] K. Tsuchiya, K. Numata, Facile terminal functionalization of peptides by protease-catalyzed chemoenzymatic polymerization toward synthesis of polymeric architectures consisting of peptides, *Polymer Chemistry* 11(2) (2020) 560-567.
- [245] K. Tsuchiya, K. Numata, *Macromol. Biosci.* 11/2017, *Macromolecular Bioscience* 17(11) (2017).
- [246] C.H. Görbitz, Nanotubes from hydrophobic dipeptides: pore size regulation through side chain substitution, *New Journal of Chemistry* 27(12) (2003) 1789-1793.
- [247] F.I. Müller, C.A. Ferreira, D.S. Azambuja, C. Alemán, E. Armelin, Measuring the proton conductivity of ion-exchange membranes using electrochemical impedance

- spectroscopy and through-plane cell, *The Journal of Physical Chemistry B* 118(4) (2014) 1102-1112.
- [248] C. Cai, L. Wang, J. Lin, Self-assembly of polypeptide-based copolymers into diverse aggregates, *Chemical Communications* 47(40) (2011) 11189-11203.
- [249] L. Whitmore, B.A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* 89(5) (2008) 392-400.
- [250] N. Amdursky, M.M. Stevens, Circular dichroism of amino acids: following the structural formation of phenylalanine, *ChemPhysChem* 16(13) (2015) 2768-2774.
- [251] W. Moffitt, R. Woodward, A. Moscowitz, W. Klyne, C. Djerassi, Structure and the optical rotatory dispersion of saturated ketones, *Journal of the American Chemical Society* 83(19) (1961) 4013-4018.
- [252] E.Y. Chi, S. Krishnan, T.W. Randolph, J.F. Carpenter, Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation, *Pharmaceutical research* 20(9) (2003) 1325-1336.
- [253] C. Zhang, M. Yang, K. Zhao, Insight into the effect mechanism of urea-induced protein denaturation by dielectric spectroscopy, *Physical Chemistry Chemical Physics* 19(47) (2017) 32007-32015.
- [254] C. Diaferia, N. Balasco, T. Sibillano, C. Giannini, L. Vitagliano, G. Morelli, A. Accardo, Structural Characterization of Self-Assembled Tetra-Tryptophan Based Nanostructures: Variations on a Common Theme, *ChemPhysChem* 19(13) (2018) 1635-1642.
- [255] C. Diaferia, T. Sibillano, N. Balasco, C. Giannini, V. Roviello, L. Vitagliano, G. Morelli, A. Accardo, Hierarchical analysis of self-assembled PEGylated hexaphenylalanine photoluminescent nanostructures, *Chemistry—A European Journal* 22(46) (2016) 16586-16597.
- [256] M. Reches, E. Gazit, Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes, *Science* 300(5619) (2003) 625-627.
- [257] V.L. Sedman, L. Adler-Abramovich, S. Allen, E. Gazit, S.J. Tendler, Direct observation of the release of phenylalanine from diphenylalanine nanotubes, *Journal of the American Chemical Society* 128(21) (2006) 6903-6908.
- [258] J.J. Panda, S. Yandrapu, R.S. Kadam, V.S. Chauhan, U.B. Kompella, Self-assembled phenylalanine- α , β -dehydrophenylalanine nanotubes for sustained intravitreal delivery of a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 172(3) (2013) 1151.
- [259] S. Parween, A. Misra, S. Ramakumar, V.S. Chauhan, Self-assembled dipeptide nanotubes constituted by flexible β -phenylalanine and conformationally constrained α , β -dehydrophenylalanine residues as drug delivery system, *Journal of Materials Chemistry B* 2(20) (2014) 3096-3106.
- [260] E. Krieg, M.M. Bastings, P. Besenius, B. Rybtchinski, Supramolecular polymers in aqueous media, *Chemical reviews* 116(4) (2016) 2414-2477.
- [261] C.H. Görbitz, Nanotube formation by hydrophobic dipeptides, *Chemistry—A European Journal* 7(23) (2001) 5153-5159.

- [262] I.W. Hamley, Small bioactive peptides for biomaterials design and therapeutics, *Chemical reviews* 117(24) (2017) 14015-14041.
- [263] C.G. Pappas, R. Shafi, I.R. Sasselli, H. Siccardi, T. Wang, V. Narang, R. Abzalimov, N. Wijerathne, R.V. Ulijn, Dynamic peptide libraries for the discovery of supramolecular nanomaterials, *Nature nanotechnology* 11(11) (2016) 960.
- [264] T. Fan, X. Yu, B. Shen, L. Sun, Peptide self-assembled nanostructures for drug delivery applications, *Journal of Nanomaterials* 2017 (2017).
- [265] W. Ma, A.G. Cheetham, H. Cui, Building nanostructures with drugs, *Nano today* 11(1) (2016) 13-30.
- [266] K. Tao, P. Makam, R. Aizen, E. Gazit, Self-assembling peptide semiconductors, *Science* 358(6365) (2017) eaam9756.
- [267] K. Park, D. Choi, J. Hong, Nanostructured polymer thin films fabricated with brush-based layer-by-layer self-assembly for site-selective construction and drug release, *Scientific reports* 8(1) (2018) 1-9.
- [268] T. Coviello, F. Alhaique, C. Parisi, P. Matricardi, G. Bocchinfuso, M. Grassi, A new polysaccharidic gel matrix for drug delivery: preparation and mechanical properties, *Journal of controlled release* 102(3) (2005) 643-656.
- [269] A. Puiggali-Jou, A. Cejudo, L.J. del Valle, C. Alemán, Smart Drug Delivery from Electrospun Fibers through Electroresponsive Polymeric Nanoparticles, *ACS Applied Bio Materials* 1(5) (2018) 1594-1605.

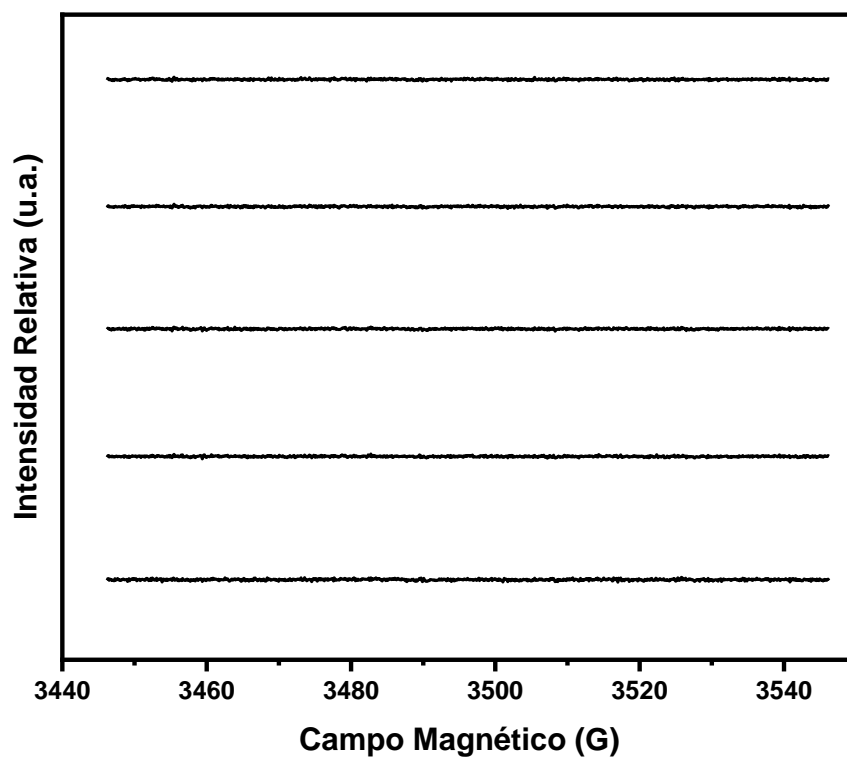


Figura 59. Espectros de ESR de PGALn (a) 0.125 nM, (b) 0.25 mM, (c) 0.5 mM, (d) 0.75mM, (e) 1 mM en agua a 298 K.

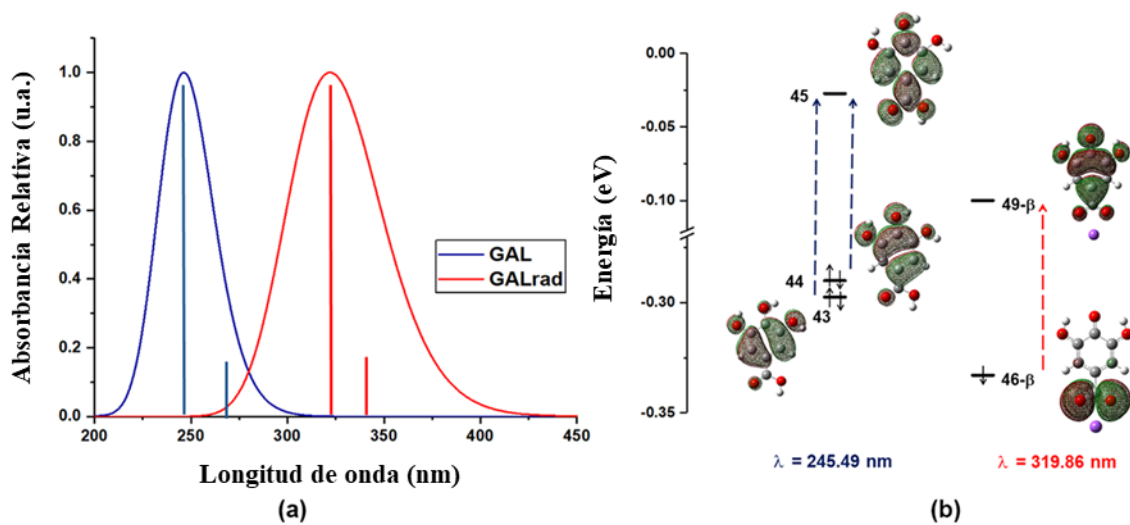


Figura 60. (a) Espectros electrónicos de fase gaseosa calculados (ampliación gaussiana de 0.3 eV) y (b) Transiciones electrónicas involucradas para AG y su radical AGrad en el nivel de teoría M06-2X / 6-311 ++ G (d, p).

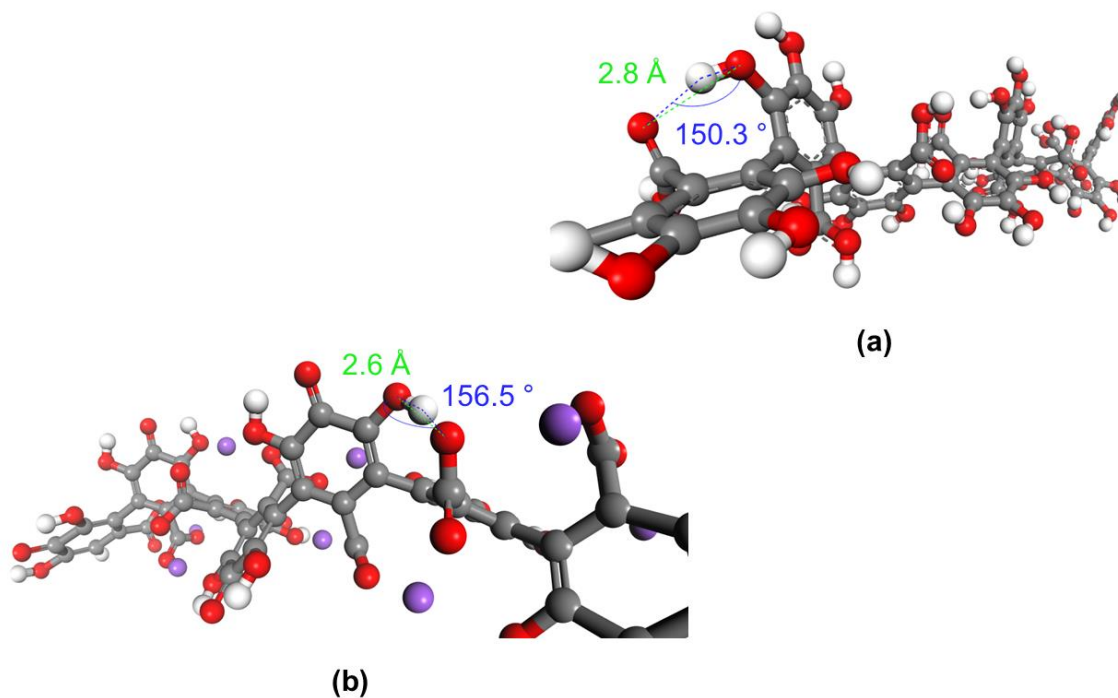


Figura 61. Parámetros de enlace de hidrógeno intramolecular calculados dentro de PGALn (izquierda) y PGAL (derecha).

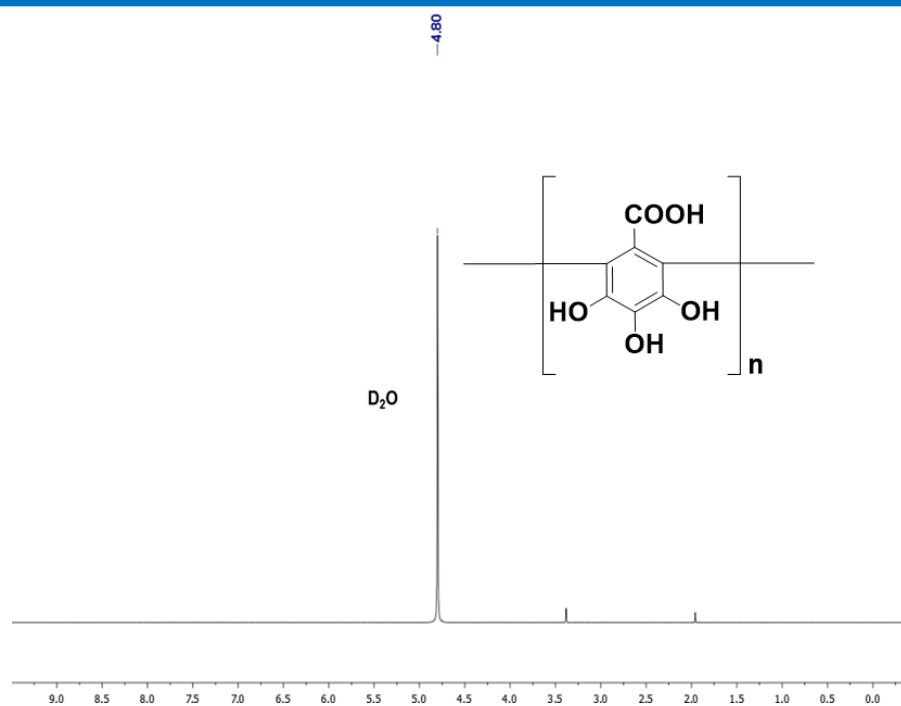


Figura 62. Espectro $^1\text{H-RMN}$ de PGAL [D_2O , 400 MHz].

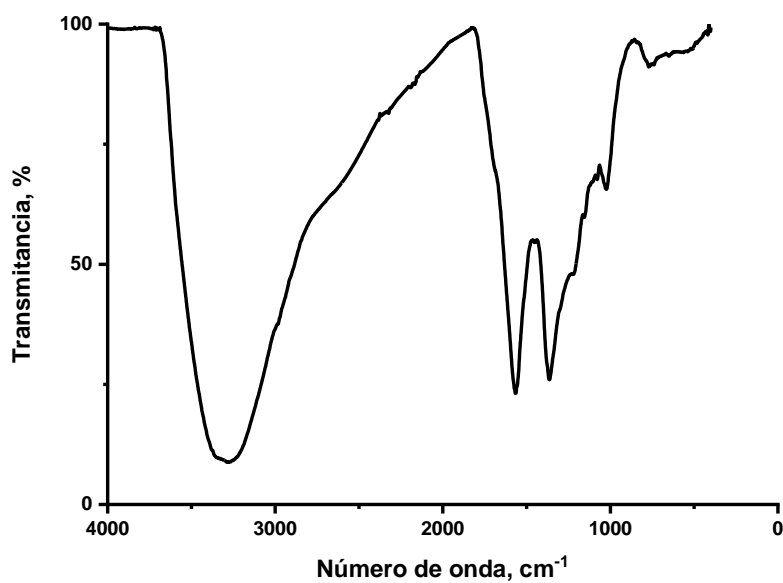


Figura 63. Espectro FT-IR(ATR) para PGAL

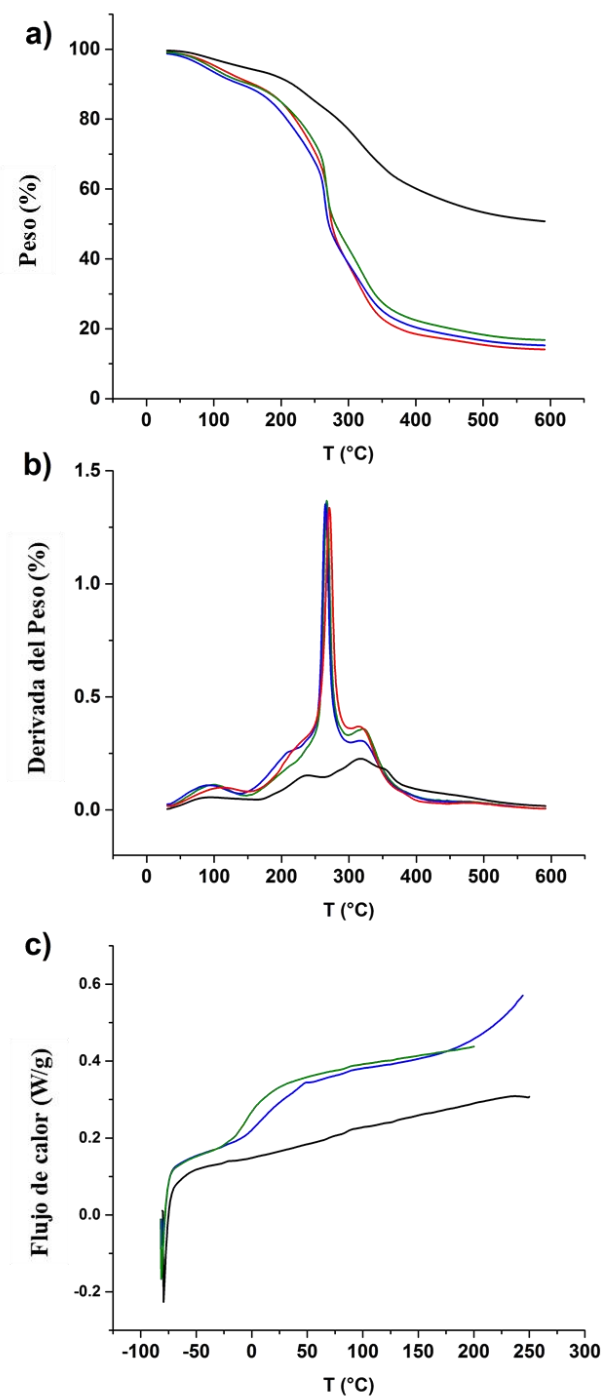


Figura 64. Propiedades térmicas de las películas PGAL-co-CMC. a) TGA, b) derivados de la degradación térmica, y c) Tg del segundo calentamiento. Línea negra (PGAL), línea roja (muestra 9), línea azul (muestra 5) y línea verde (muestra 1).

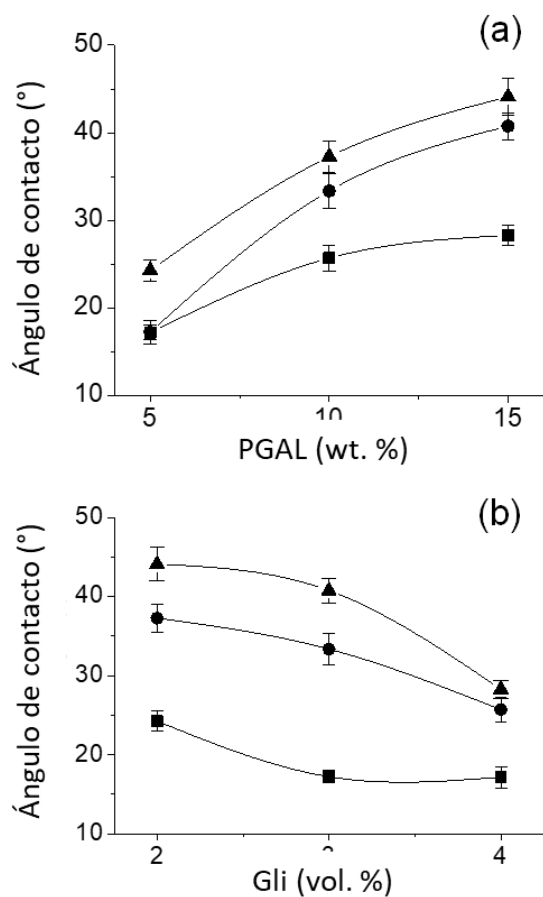


Figura 65. Ángulo de contacto vs concentración de PGAL a diferentes relaciones de Gli (vol %), concentración 2 % (■), 3 % (▲) y 4 % (●) (a); y ángulo de contacto vs concentración de Glicerol a diferentes proporciones de PGAL 5 % (●), 10 % (▲) y 15 % (■) (b).

Tabla 13. Relación de hinchamiento en el equilibrio y fracción de volumen del polímero en el hinchamiento de equilibrio para las muestras 1 a 10 de la Tabla 5.

Muestra	Relación de hinchamiento en el equilibrio, Q_m	Fracción de volumen del polímero en el hinchamiento de equilibrio, v_{2m}
1	1.69	0.59
2	1.68	0.60
3	1.87	0.54
4	1.37	0.73
5	1.30	0.77
6	2.07	0.48
7	2.55	0.39
8	1.07	0.93

9	2.50	0.40
10	6.40	0.16
11	7.02	0.14
12	6.61	0.15

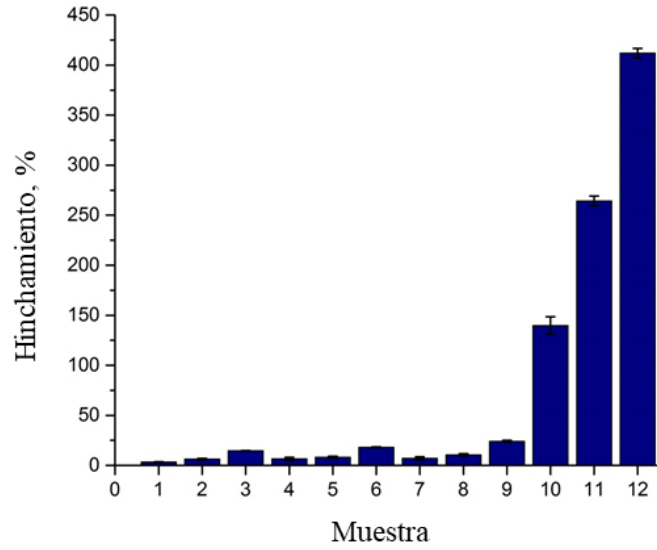


Figura 66. Efecto del entrecruzado en la proporción de hinchamiento de las matrices. Hinchamiento en H₂O desionizada a temperatura ambiente.

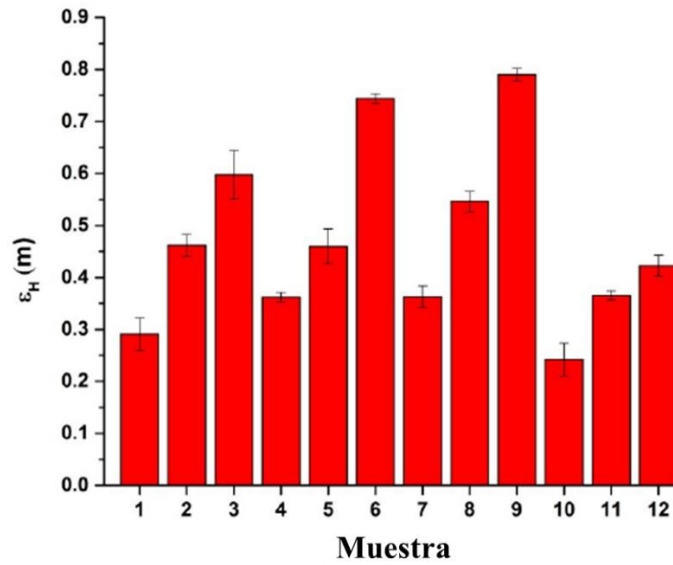


Figura 67. Medida de elongación para cada muestra en la Tabla 5.

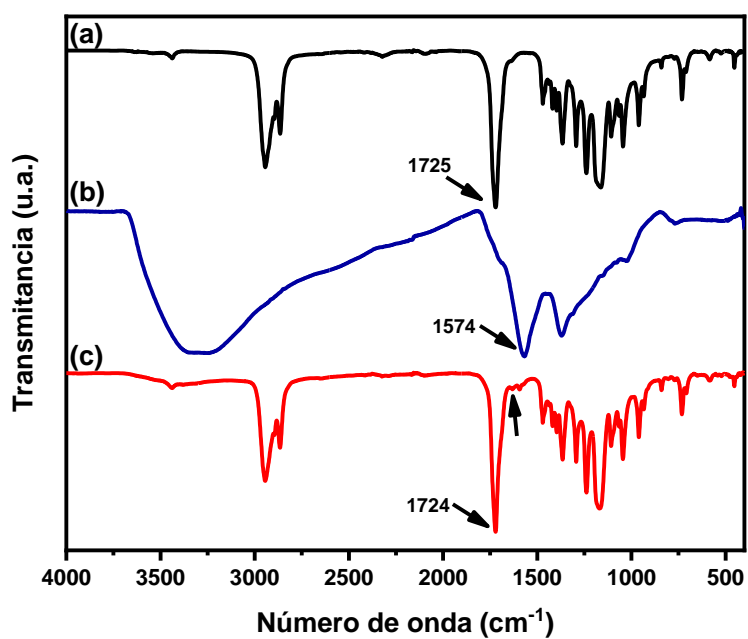


Figura 68. Espectro FT-IR para PCL (a), PGAL (b) y PCL-g-PGAL (c)

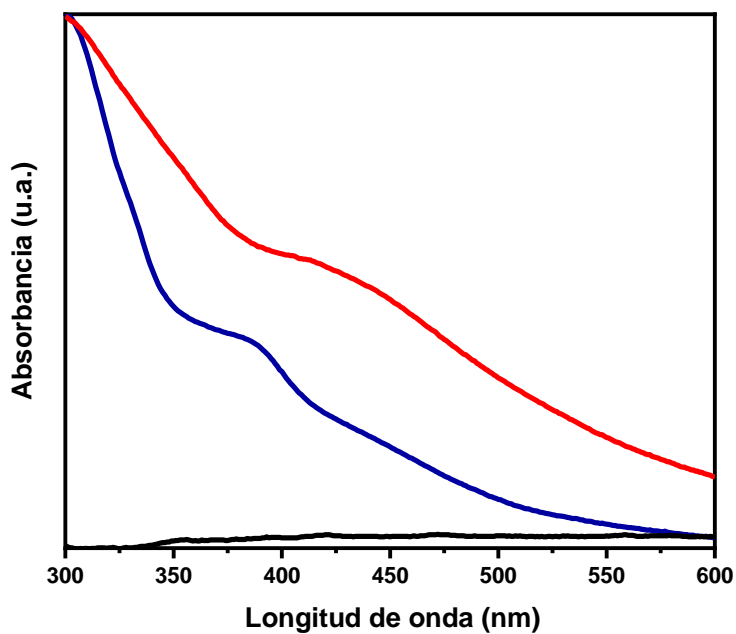


Figura 69. Espectro UV para PCL (negro), PGAL (azul) y PCL-g-PGAL (rojo)

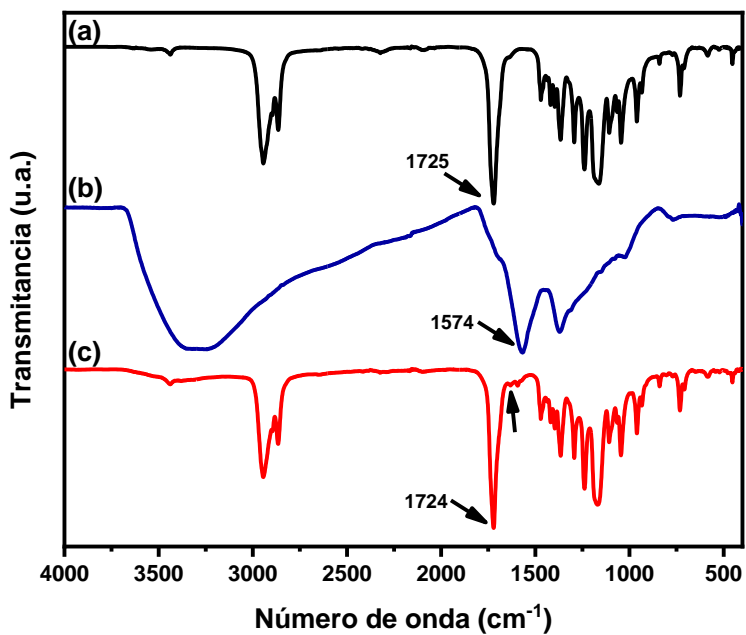


Figura 70. Espectro FT-IR para PCL (a), PGAL (b) y PCL-g-PGAL (c)

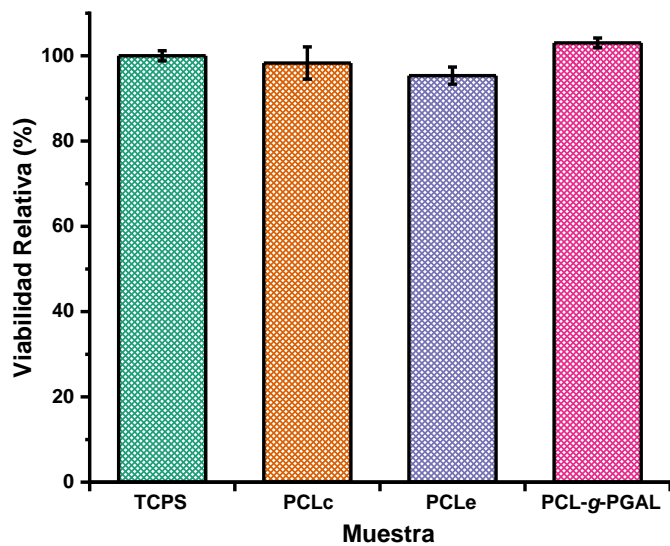


Figura 71. Viabilidad celular de la línea VERO en electrohilados de PCLc, PCLe y PCLe-g-PGAL, a las 96 h de cultivo.

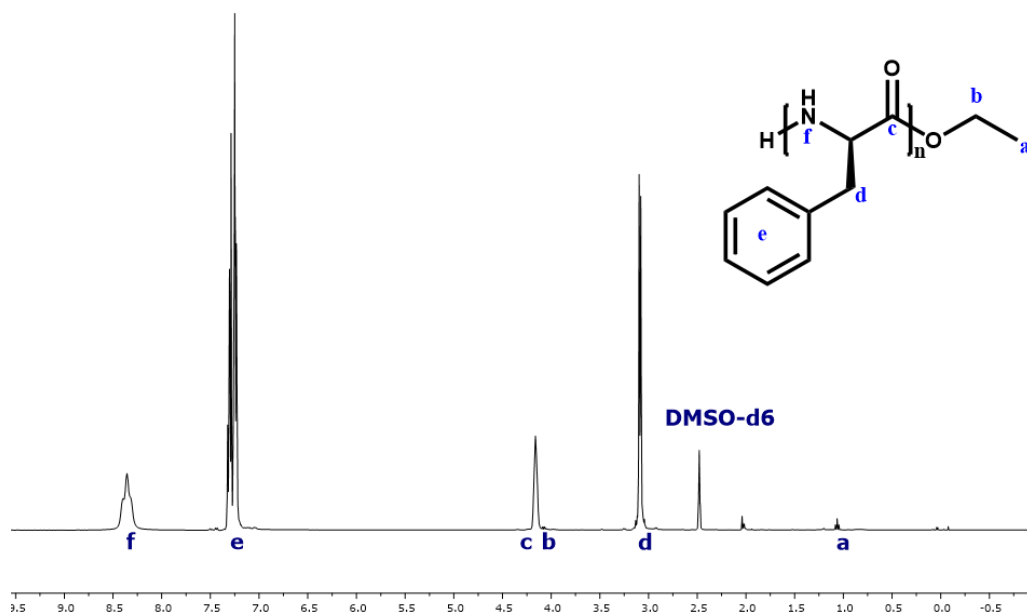


Figura 72. $^1\text{H-NMR}$ para ePLP en DMSO

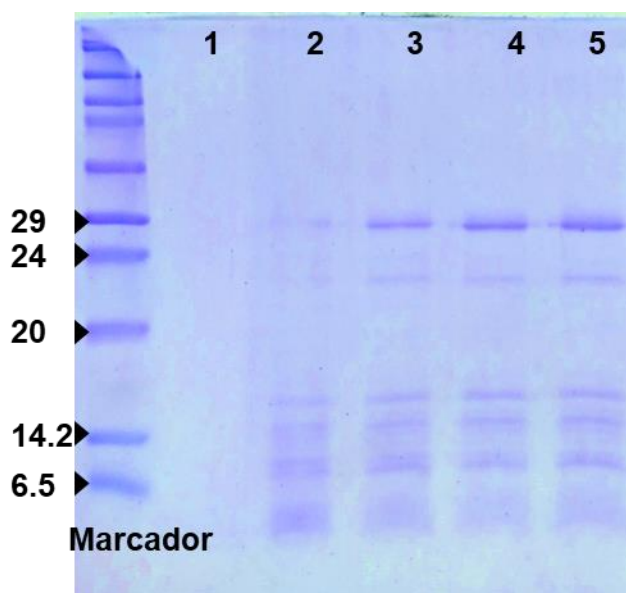


Figura 73. SDS-PAGE de solución fresca de ePLP del reactor (1), muestra concentrada por ultrafiltración (2-5).

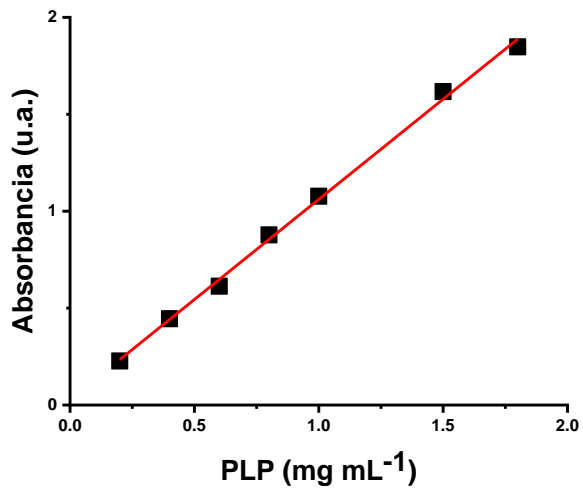


Figura 74. Curva de calibración para ePLP en agua mediante espectroscopia UV-vis.

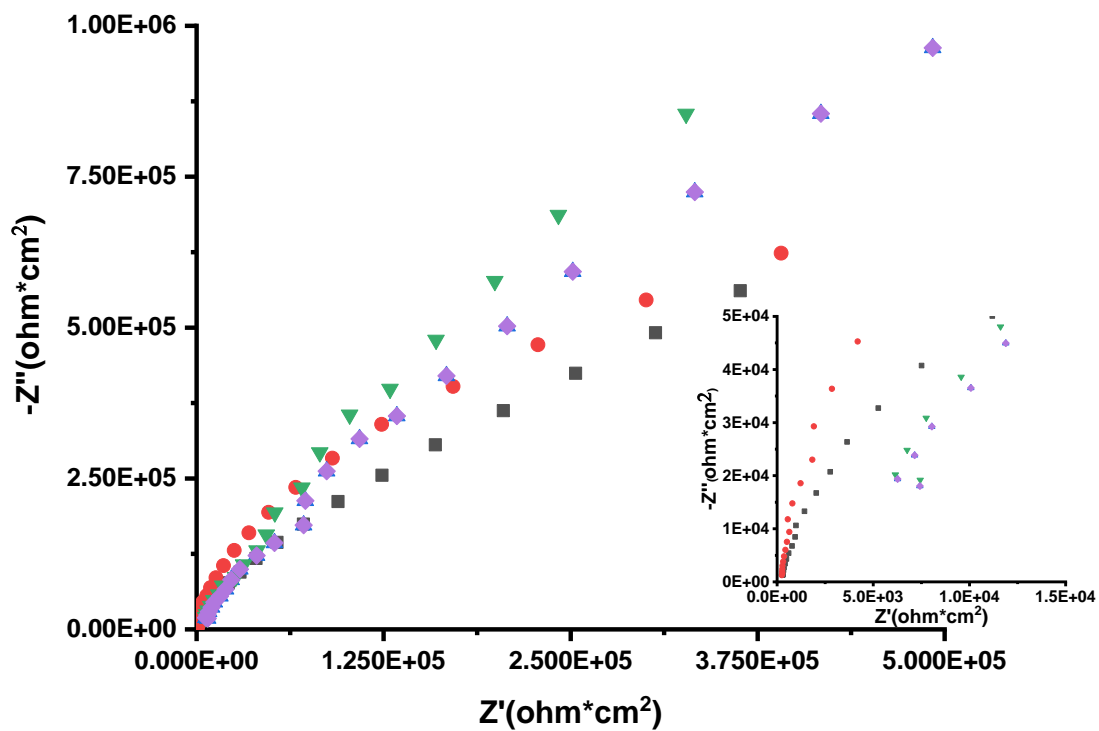
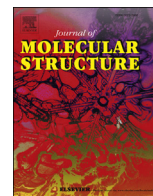


Figura 75. Gráfico de Nyquist para nanotubos ePLP (símbolos negros y rojos) y ePLP “bulk” (símbolos verdes y morados). El recuadro representa un detalle de la región de alta frecuencia.



Enzymatic poly(gallic acid): A stable multiradical polyanion

Alejandra Romero-Montero ^a, Miquel Gimeno ^{a, **}, Norberto Farfán ^b,
Pablo Labra-Vázquez ^{b, *}

^a Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, CDMX, Mexico

^b Facultad de Química, Departamento de Química Orgánica, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, CDMX, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 January 2019

Received in revised form

10 July 2019

Accepted 11 July 2019

Available online 15 July 2019

Keywords:

Poly(gallic acid)

Polyphenol

DFT

EPR

Multiradical

ABSTRACT

In this work we re-examined the molecular structure of enzymatic poly(gallic acid) (PGAL), for which we identified a multiradical and polyanionic nature, in contrast to a previous assignment where it was mistakenly assumed as a neutral and diamagnetic molecule. Here, we present a profound investigation of its ground-state structure by the use of both experimental and theoretical methods, featuring ESR measurements and quantum chemical computations. It was found that its multiradical nature is remarkably stable thanks to an extended hydrogen bonding network occurring within its structure, with interaction energies in the 3–11 kcal/mol regime, according to DFT computations at the M06-2X/6-311++G** level of theory. This multiradical polymer displays several appealing features, including air, thermal and photostabilities, water solubility and, most remarkably, the fact that it is obtained in a multi-gram scale from the naturally abundant gallic acid in mild and green conditions.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The study of the chemical structure and properties of radical polymers is a rapidly growing and stimulating field where applications such as molecular magnets, components in organic electronics and magnetic devices, and redox-active elements for battery technologies have been described [1,2]. Many publications about these molecular materials focus on TEMPO-based polymers that are employed with varying polymer backbones such as methacrylate, vinyl ether, norbornene, or siloxane [3,4]. More recently, studies about bond dissociation energies of phenols showed the stability of polymeric phenoxyl radicals, particularly if they possess substituents in para-positions so that in comparison to established anode materials such as galvinoxyles, phenoxyl radical polymers have a lower redox potential and, because of their significantly lower molar mass, a higher theoretical capacity [5,6].

Polymer science provides more and more materials with very broad applications [7–9], and the optimized use of these materials and their characteristics require adequate structural and dynamic characterization. The assessment of their molecular structures

requires complex techniques such as X-Ray diffraction (XRD), electron microscopy and NMR spectroscopy, which stand out among others over the last decades [10]. Nonetheless, the detailed analyses and modeling of the structural levels of polymers is essential for synthetic reaction procedures, and for the formation of controlled structures of chemical byproducts, as well as to provide explanations for the properties of these systems [11].

Unfortunately, low ordered molecular structures render amorphous solids, for which molecular characterization is usually challenging [12]. Many of the most reported techniques for elucidating molecular structures rely on the long-range arrangement of the molecule, as in XRD. Additionally, for systems with short or medium range order, Small-angle X-ray scattering (SAX) and Small-angle neutron scattering (SANS) are used but the results become increasingly difficult to interpret as the complexity of the system increases [13,14]. NMR is particularly useful as few materials display paramagnetic behavior, however, this technique becomes inconvenient in complex systems due to the abundance of detectable spin interactions [15–13]. Among the recent reports in new polymer syntheses, poly(gallic acid) (PGAL) shows interesting characteristics as high water solubility, radical scavenging properties, electric semiconductivity and high thermal and photostabilities with applications in nonlinear optics and biomedicine [16,17]. PGAL is a non-toxic polyphenol from the enzymatic polymerization of the naturally abundant gallic acid (GA) by the laccase

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: mgimeno@unam.mx (M. Gimeno), pab.labra@gmail.com (P. Labra-Vázquez).

of *Trametes versicolor* in mild process conditions. This polymer displays an average molecular weight of ca. 6000 Da and its high solubility in physiological media allows for a cytoprotective effect on fibroblast cells under exposure to UV-irradiation [18,19]. The initial work by López et al., in 2013 [14] shows a molecular structure with a phenyl-phenyl propagation with fully protonated carboxylic and hydroxyl moieties. The PGAL structure has a non-defined order; therefore its characterization by analytical methods is complex. The explanation of some of its properties such as the high water solubility, intense solid-state ESR signal [18], and semi-conducting properties [17] are far from obvious and require a further understanding of the fine chemical structure for this polymer.

Therefore, this work is a reexamination and reassignment of the molecular structure of PGAL and aims to shed light upon the reasons behind some of these outstanding properties. Thus, we present a profound investigation of the chemical structure of PGAL by experimental and theoretical approaches to demonstrate a poly-anionic and multiradical structure for enzymatic PGAL. Unlike most polymeric radicals coming from traditional chemical synthesis that use as catalysts, organometallic (lithium salts, zinc, rhodium, among others) [20–22] or halogenated reagents [23], require high temperatures and polluting solvents as reaction media (i.e. THF, toluene) [24,25], PGAL comes from an environmentally friendly, and metal-free and multi-gram synthesis.

2. Materials and methods

2.1. Synthetic procedures

2.1.1. Materials

Lacasse of *Trametes versicolor* (LTV, lyophilized protein stored at -20°C) was purchased to Fluka (USA). Specific enzymatic activity was determined by the ABTS method: 50 μL of an aqueous enzyme solution (10 mg/mL) was added to 2.9 mL of ABTS solution (9.1 mM) in phosphate buffer (pH = 5, 100 mM). Solutions were measured in a Thermo Scientific Genesys 10S UV–Vis (USA) spectrophotometer at $\lambda = 405\text{ nm}$ (25°C). Enzymatic activity unit (U) is defined as the amount of protein required to oxidize 1.0 μmol of ABTS per minute at 25°C and pH = 5 ($\lambda = 405\text{ nm}$, $\text{ABTS} = 36.8\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). The LTV used in this work has a specific enzymatic activity of 2.35 U/g. GA, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), glycerol (Gly) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were supplied by Sigma-Aldrich (USA). Ethyl alcohol (technical grade, > 99%) was supplied by Química Barsa SA de CV (Mexico).

2.1.2. Enzymatic synthesis of PGAL

PGAL was produced following a previously reported procedure [16] with some modifications. In a typical experiment, in a 500 mL three-necked round-bottom amber flask equipped with a magnetic stirrer, the GA (8.5 g) was dissolved in 250 mL of acetate buffer (0.25 M, pH = 5) with the addition of 20 mL of NaOH (2 M). Constant oxygen concentration was kept by an Elite 800 air pump (Hagen Inc, Canada) and monitored by an Apliens ez-DO sensor (Applikon, USA). Then, LTV was added (26.5 U) and the reaction was allowed to stir at 25°C for 24 h. Reaction contents were precipitated dropwise into 2 L of cold ethanol (5°C) under stirring. The solids were vacuum filtered (0.45 μm) and dried in Stabletemp Cole Palmer (USA) vacuum oven connected to a Vacuubrand PC3 RZ 2.5 system at $10 \times 10^{-4}\text{ mbar}$ at 50°C for 2 h to give PGAL as powder in 96% yield.

2.1.3. Protonation of PGAL

100 mg of PGAL were dissolved in H_2O (50 mL) and placed in an

ice bath, after which HCl (37%, 50 mL) was added slowly and the solution was stirred at room temperature for 10 min. The product was extracted with ethyl acetate, the organic phase was separated and the solvent was evaporated under reduced pressure. Water residues were co-evaporated with methanol (50 mL) at 60°C to yield PGAL as brown solid in 76% yield. Alternatively, water residues were successfully removed in a Stabletemp Cole Palmer (USA) vacuum oven connected to a Vacuubrand PC3 RZ 2.5 system at $10 \times 10^{-4}\text{ mbar}$ at 50°C for 2 h.

2.1.4. Chemical characterizations

^1H NMR spectra were recorded in a Varian MR-400 spectrometer in D_2O . FT-IR spectra of PGALn and PGALrad were acquired in a PerkinElmer ATR-FTIR Spectrum 400 instrument. Size exclusion chromatography (SEC) measurements were conducted in an Agilent 1210 series (USA) liquid chromatograph equipped with a RID detector and an Ultrahydrogel-500 (7.8 \times 300 mm, Waters, USA) column eluted with deionized water containing LiCl (0.1 M) mobile phase at 0.8 mL/min and 30°C . Standard narrow molecular weight polyethyleneglycol (PEG) was used for calibration of PGALn. Samples were dissolved in the mobile phase (1 mg/mL) and filtered (0.45 μm) before injection in the chromatographer. Electron Spin Resonance (ESR) analyses were conducted in a Bruker ESR Elexsys E500 equipment in a quartz tube a room temperature in the 80–4080 G interval and $9.8 \times 10^9\text{ Hz}$ microwave frequency. Solutions experiments were carried out at 298 K in ethanol and water solutions for PGALn and PGALrad, respectively. For spectrophotometric determinations, a concentration of DPPH (0.125 mM) was mixed with an equimolar solution of PGALn and PGALrad. Then, changes in the absorption spectra were monitored within a 30 s interval using a Genesys 10S UV–vis spectrophotometer (Thermoscientific, USA).

2.2. Computational methods

Quantum chemical calculations were performed within the framework of the Density Functional Theory (DFT) through the *Gaussian 09* suite of programs [26], using the M06-2X functional combined with the triple- ζ 6-311++G(d,p) basis set, to take into account non-covalent interactions, for which the *meta*-GGA M06-2X functional outperforms many other functionals [27]. We used a large basis set comprising diffuse functions, as they usually improve the reliability of the quantum chemical description for open-shell and anionic systems [28]. Spin-unrestricted Hartree-Fock (UHF) computations were performed for open-shell systems. Geometries were optimized without any constraint in the gas phase, and their vibrational frequencies were analytically inspected to confirm a true local energetic minimum was found. For consistency reasons, spin-allowed TD-DFT vertical excitation energies were studied in the gas phase at the same level of theory. The starting molecular geometries for polymers were built and allowed to optimize freely employing classical Molecular Mechanics (MM) through the *Polymer build* and *Forcite* modules bundled within *MS8*. The resulting conformations were used as input for a further DFT optimization at the M06-2X/6-311++G(d,p) level as mentioned above. A number of 9 repeating units was chosen as a good relationship between computational cost and accuracy. A variation below 0.01 eV for the lowest lying (S_0 – S_1) transition was found after adding the last additional repeating unit for PGALn using single-point energy computations, ratifying the reliability of this approach.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and characterization of PGALn and PGALrad polymers

The investigation on the chemical structure of PGAL initiates with the hypothesis that the polymer might be a multiradical species, based on our previous observations on the ESR signal of this polymer [18] and on the reports for the monomer precursor GA, which produces stable radical under mild conditions [29]. The GA most stable radical is on the central oxygen (i.e. *para*-to the carboxyl group) owing to hydrogen-bonding stabilization with the vicinal hydroxyl groups [30]. Thus, both the perhydrogenated PGAL [14] (PGALn) and a radicalized form of PGAL (PGALrad) might be present, considering PGALrad in its sodium carboxylate form, as dominating species [31] according to the enzymatic reaction conditions (pH = 5) [16]. Scheme 1 shows the synthesis of the parent water-soluble polymer (PGALrad) through the polymerization reaction of GA catalyzed by the laccase enzyme (LTV) [16]. A first evidence of the polyanionic nature of the parent polymer is obtained by the treatment of an aqueous solution of PGALrad with concentrated HCl, inducing the precipitation of the polymer from the reaction media. The molecular structure of the resulting polymer corresponds to the completely protonated species and neutral PGALn which is soluble in organic solvents.

3.2. Infrared spectroscopy

The FT-IR (ATR) spectra for both polymers in Fig. 1 show for clarity only the assigned characteristic signals. The spectrum for PGALrad displays a broad signal between $\tilde{\nu}=3000$ and $\tilde{\nu}=3400\text{ cm}^{-1}$ assigned to the O–H stretching. The absence of the typical vibration of carbonyl stretch C=O of a carboxylic acid that usually appears as an intense band in the $\tilde{\nu}=1760\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$ interval implies the two bands that resonate at $\tilde{\nu}=1580$ and $\tilde{\nu}=1388\text{ cm}^{-1}$ due to the COO[−] stretching [32], thus confirming that PGALrad is exclusively polyanionic, for which the C=C fundamental vibration of the aromatic ring appears overlapped with the $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ stretch bands.

The vibrational spectrum for PGALn confirms a successful protonation with the characteristic band of the carbonyl stretch $\nu(\text{C}=\text{O})$ remarkably blue-shifted to $\tilde{\nu}=1721\text{ cm}^{-1}$. Other normal modes include the aromatic ring stretch $\nu(\text{C}=\text{C})$ at $\tilde{\nu}=1615\text{ cm}^{-1}$, stretching of the phenolic groups $\nu(\text{C}_{\text{arom}}\text{-OH})$ at $\tilde{\nu}=1040\text{ cm}^{-1}$ and the out-of-plane bending $\delta(\text{OH})$ of the hydroxyl group around $\tilde{\nu}=1450\text{ cm}^{-1}$.

3.3. Scanning electron microscope analysis

While the analysis of the characteristic bands in infrared spectroscopy assesses the protonation of PGALrad, a change in the amount of sodium in the polymer should occur as the polymer converts from the sodium carboxylate form to the neutral protonated PGALn. Measuring the residual concentration of this metal in

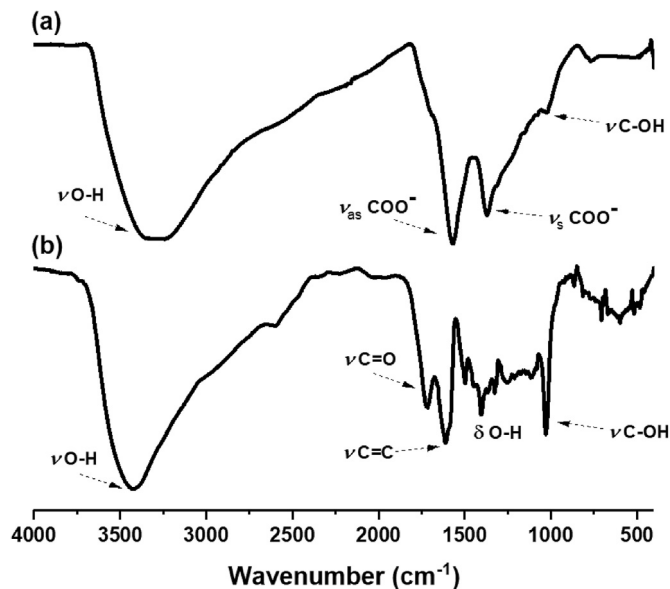


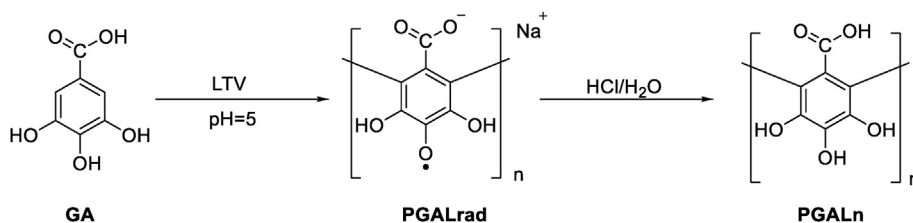
Fig. 1. FT-IR (ATR) spectra for PGALrad (a) and PGALn (b).

the sample is challenging. However, the Energy Dispersive X-ray microanalysis (EDX) for both polymers evidence this hypothesis (Fig. 2).

As anticipated, the EDX spectrum of the samples shows that the amount of sodium is notably higher in PGALrad than in the perhydrogenated derivative. This confirms that the parent polymer (PGALrad) exists exclusively in the form of sodium gallate repeating units probably due to the reaction conditions. It is also evident that the synthesis of the protonated PGALn is successful insofar as the complete release of sodium is observed (Table 1).

3.4. The multiradical nature of PGAL

At this point, the explanation for the earlier observations on the Electron Spin Resonance (ESR) from solutions of PGAL which correlates with its antioxidant properties needs clarification [18]. As the ESR signal arises exclusively from unpaired electrons within radicals or transition metals, a plausible explanation for this observation is that the monomer is not only in the gallate form but also forming the radical. Fig. 3 shows the ESR spectra of PGALrad at room temperature showing a featureless broad ESR spectra, compared to molecular GA radical, which shows ESR spectra with hyperfine structure [29]. Besides the abrupt change of molecular weight from the GA to the PGALrad polymer, this absence of hyperfine coupling is both an invaluable tool to confirm not only the multiradical character of the polymer but also its basic connectivity, keeping in mind that other connectivities would give rise to hyperfine coupling with the hypothetical magnetically active hydrogens from the phenyl ring.



Scheme 1. Enzyme-mediated synthesis of the PGALrad and PGALn polymers from GA.

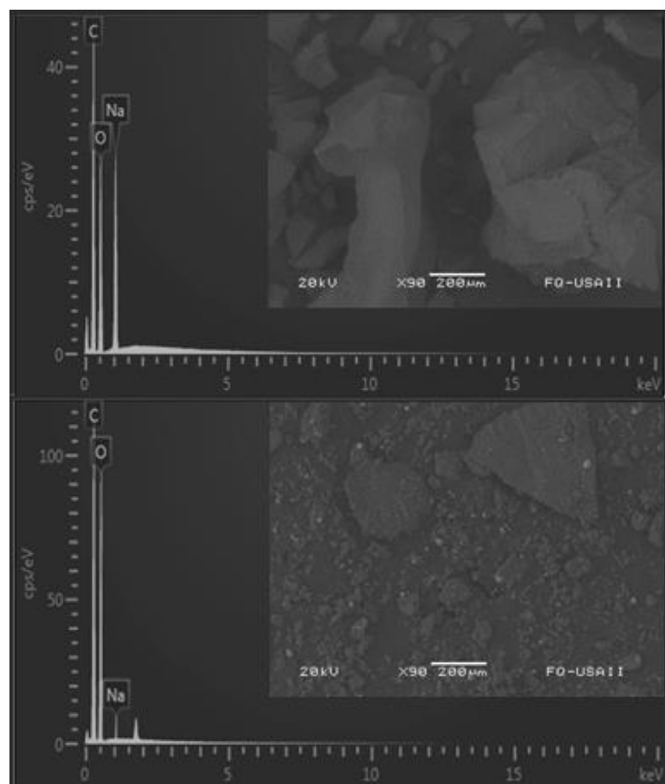


Fig. 2. EDX analyses of PGALrad (top) and PGALn (bottom). Insets are the SEM for these materials depicting some apparent order with irregular shapes and random sizes for PGALrad, in contrast to PGALn where an evident change in morphology is observed with no regular grain arrangement.

Table 1

Weight ratio of the elements for the samples of PGALrad and PGALn.

Sample	Element	Weight %
PGALrad	C	45.10 ± 1.32
	O	43.09 ± 2.62
	Na	11.59 ± 1.72
PGALn	C	56.16 ± 3.21
	O	42.75 ± 4.26
	Na	1.9 ± 0.16

The values of the Landé g -factor along with other relevant ESR parameters in Table 2 around 2.00 confirm the paramagnetic state of PGALrad at room temperature. An unpaired electron in this molecule moves on a highly delocalized orbit, therefore, its orbital contribution to the magnetic moment is negligible. This electron is essentially free, only its spin contributing to the magnetic moment. Thus, the Landé g -factor for PGALrad is very close to that for a free electron.

The higher spin concentration in PGALrad (1 mM) is perhaps the reason for the narrowing of the line width in the ESR signal. The ESR data shows that the line width decreases when increasing PGALrad concentration owing to an exchange narrowing of the ESR signal.

The number of spins (N_s) participating in the resonance follows from equation (1):

$$N_s = 0.285I(\Delta H)^2 \quad (1)$$

where I is the peak-to-peak height (arbitrary units) and ΔH is the line width (in G).

As mentioned above, when the PGALrad concentration (x)

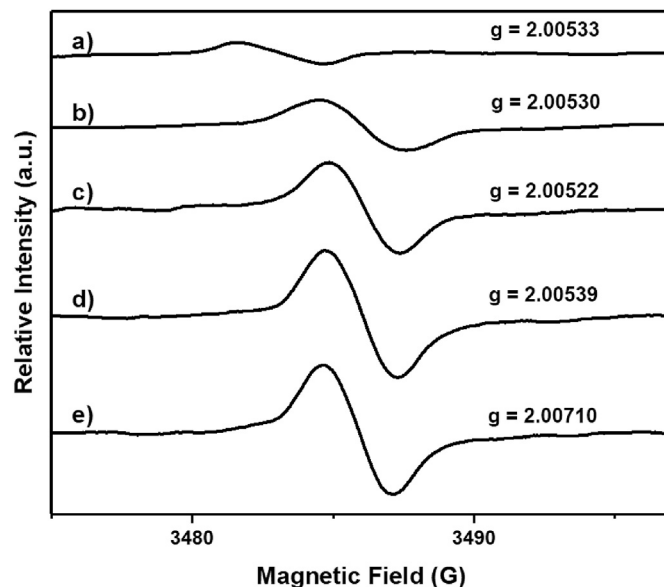


Fig. 3. ESR spectra of PGALrad (a) 0.125 mM, (b) 0.25 mM, (c) 0.5 mM, (d) 0.75 mM, (e) 1 mM in water at 298 K. All measurements are at 9.78 GHz with a Microwave power of 5 mW.

increases, the resonance signal becomes broader and also the number of spins. It is therefore evident that the relationship between the concentration and the number of spins are linear. Noteworthy, the Rubbins and Bleanny relation allows to calculate the number of spins, the values of Landé g -factor and the line width for all samples in the present work [33]. Interestingly, our multiradical is highly stable at room temperature and in solution. In these compounds, the density of spin has even more delocalization, avoiding the decomposition of the radicals. The bulk magnetism of multiradicals does not depend on the spatial arrangement of the molecules but on the ability to perform the magnetic interaction of many radical groups through space or covalent bonds [34].

The increasing interest in recent years for the generation of radical polymers relies on their use in batteries, catalysis, electrochemical active materials, organic magnetic materials, biological imaging agents, among others [5,35,36]. So far there are notable successful approaches, including Gavinoxyl, poly(2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy-4-yl meth-acrylate) (PTMA) and (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO), although the limited stability in illuminated environments or room temperature remains a practical limitation and in the case of the PTMA, its toxicity is a restricting feature [37–39]. Therefore, it is important to note that the characteristics of the PGALrad multiradical polymer remain unchanged under storage at room temperature without protection from light. Worth to note, PGALrad samples show identical ESR signals after two years. Therefore, PGALrad is remarkably stable, which undoubtedly opens a very wide field of applications even as a standard in ESR analysis. Once protonated, the resulting polymer (PGALn) displays a flat ESR spectrum even for the highest concentration of polymer, confirming a clean conversion of the multiradical to the fully protonated species (For details see the Supporting Information, Fig. S1). UV–Vis absorption also confirms these observations between the PGALrad and PGALn species in solution (Fig. 4). The absorption maximum shifts are around 100 nm when going from PGALrad to PGALn. Interestingly, we were able to return to the multiradical state from the protonated PGAL when treated with an equimolar amount of the DPPH radical. Additionally, there is a drastic change in solubility once the

Table 2
Landé *g*-factor, line width, and number of spins (*N_s*) of PGALrad samples.

Concentration (mM) of repeating unit (<i>x</i>)	Landé <i>g</i> -factor	Line Width, ΔH (G)	Number of spins, <i>N_s</i>
0.125	2.00710	2.66	0.20
0.250	2.00539	2.63	0.24
0.500	2.00522	2.59	0.31
0.750	2.00530	2.54	0.39
1.000	2.00533	2.49	0.46

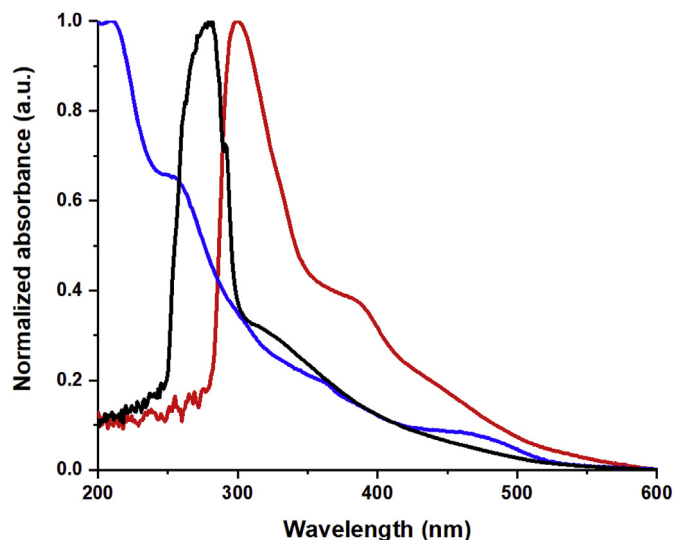


Fig. 4. UV spectra for PGALrad in water (red), PGALn in methanol (blue), PGALn + DPPH in methanol (black).

complete protonation of PGALrad to PGALn takes place. While PGALn is soluble in organic media, the parent multiradical polymer is water soluble, concomitantly, the absorption maxima of the analyte are practically identical to PGALrad. Noteworthy, the rather small difference (20 nm) is ascribed to the change of solvent.

One of the most outstanding properties of polyphenols is their ability to stabilize free radicals. A large amount of literature focuses

on the study and determination of the antioxidant capacity of these molecules. The DPPH radical method assesses this capacity for both the multiradical polymer and the fully protonated species. For PGALrad (Fig. 5) there is a decrease of the absorption band at $\lambda = 515$ nm that corresponds to the extinction coefficient of the unpaired electron of the DPPH radical accompanied by an increase of the band at $\lambda = 426$ nm with a clear isosbestic point at $\lambda = 486$ nm. The absorption band at $\lambda = 426$ nm is due to the single-electron reduced DPPH[•] (DPPH⁻) for the reduced anion form [40,41]. Thus, PGALrad acts as an antioxidant through the single-electron transfer (SET) mechanism [34].

For the protonated polymer it is expected that the absorption band at $\lambda = 515$ nm decreases in the same way as for PGALrad but in this case the band at $\lambda = 526$ nm (red line) is absent (Fig. 6). This suggests that the reduced form DPPH-H proceeds by transferring a hydrogen atom from the polymer to the radical (HAT). Therefore, although both polymers display antioxidant capacity, it is evident that they act through different mechanisms.

3.5. Theoretical studies on the PGALn and PGALrad polymers

3.5.1. The GA and GARad monomers

Following our earlier discussion on the expected species for this polyphenol, we consider both GA and the sodium gallate radical (GARad). In this manner, the computed properties for the GARad model best correlate with those from experimental and theoretical for the polymeric species. Fig. 7 shows the stable geometries obtained for the GA and GARad molecules where the prediction is strictly planar with a clear loss in aromaticity as GA one-electron oxidizes to GARad. Table 3 summarizes the corresponding

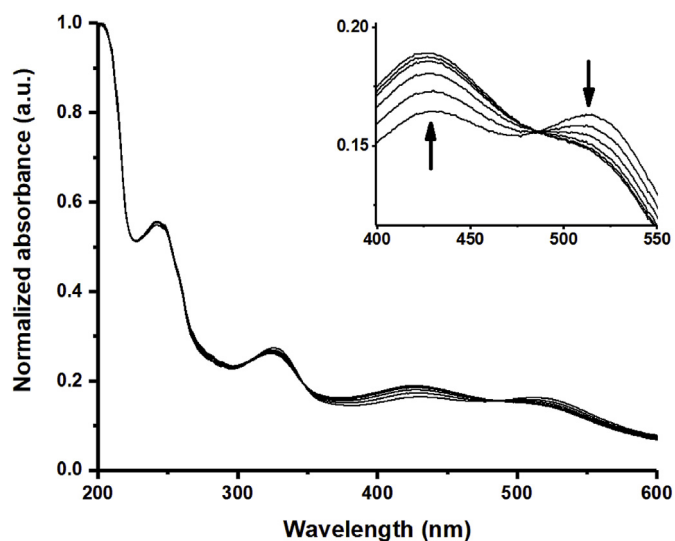


Fig. 5. UV spectra of PGALrad (10 ppm) in the presence of DPPH[•]. Interval: 30 s.

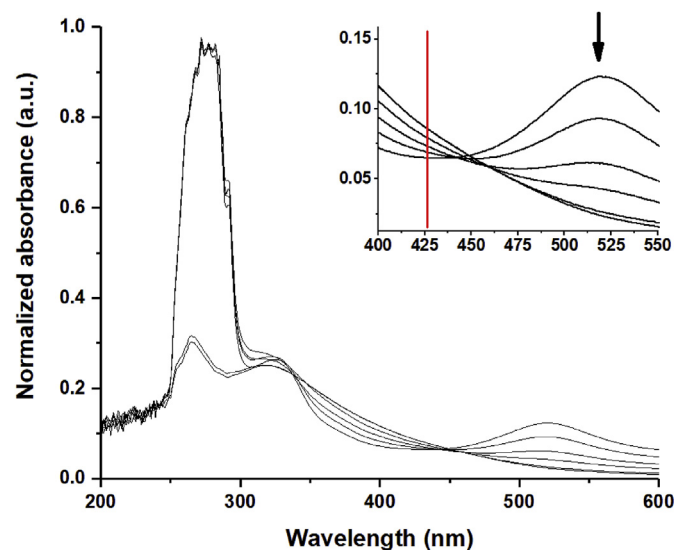


Fig. 6. Electronic spectra for PGALn (10 ppm) in the presence of DPPH[•]. Interval: 30 s.

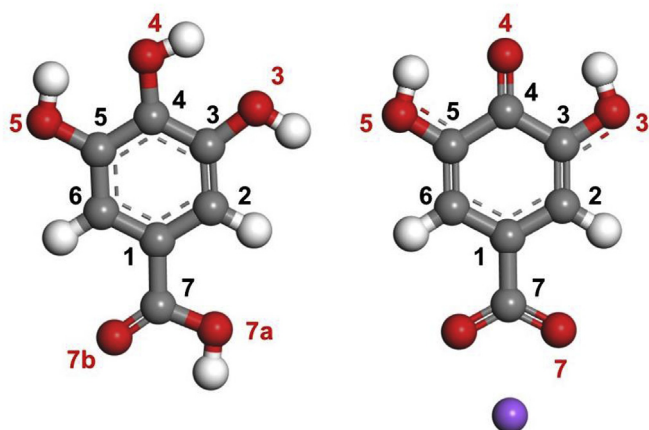


Fig. 7. Gas-phase equilibrium geometries obtained for the Gallic Acid (left) and Gallate radical (right) monomers at the M06-2X/6-311++G(d,p) level of theory.

Table 3

Relevant inter-atomic distances (In Å) for gallic acid (GA) and the gallate radical (GARad), computed at the M06-2X/6-311++G(d,p) level of theory in vacuum.

	GA	GARad
C1–C2	1.396	1.404
C2–C3	1.384	1.373
C3–C4	1.392	1.453
C4–C5	1.394	1.453
C5–C6	1.387	1.373
C1–C6	1.392	1.404
C3–O3	1.368	1.336
C4–O4	1.359	1.248
C5–O5	1.353	1.336
C1–C7	1.484	1.513
C1–Na	–	2.481

interatomic distances, depicting noticeably shorter C2–C3, C5–C6 and C4–O4 bonds in GARad when compared to GA, which according to these results is aromatic. Such data is indicative of alternating double bonds involving these atoms, with a consequent semi-quinoid character for GARad.

The computed electronic spectra for these monomers show a significant 74 nm redshift when going from GA to GARad (For details See Supplementary Information, Fig. S2). Later discussion shows that this bathochromic shift is in good agreement with our

experimental UV–Vis measurements on neutral and multiradical PGAL. Worth to note, the computational method accurately reproduces the absorption maximum of GA, which is around $\lambda = 260$ nm [42], thus ratifying the reliability of our computational approach. For GA, the first excited state is populated chiefly by HOMO/LUMO and HOMO-1/LUMO transitions. On the other hand, the red-shifted absorption maximum of GARad is due mainly to a SOMO-3/SOMO transition, which is spin-allowed as the ground-state multiplicity (doublet) of this species is not altered as a consequence of this electronic transition. TD-DFT Natural Bonding Orbital (NBO) computations rendered a localized description of the involved Molecular Orbitals (MOs), allowing us to characterize these processes as π - π^* local excitations within the phenyl rings of both species.

Fig. 8a shows the spin density distribution over GARad, that depicts a non-significant contribution of the carboxylic sub-molecular fragment (C7, O7) to the spin density and a concomitant predominant contribution O3, O4 and O5 and the annular carbons within the phenyl rings, all of which is in good agreement with the semiquinoid ground-state structure of GARad as discussed earlier. Fig. 8b shows the Partial Density of States (PDOS) for this species, which indicates a dominant contribution of these atoms to the α -spin SOMO orbital, further confirming the proposed ground-state spin density distribution.

3.5.2. Structural and conformational studies of the PGALn and PGALrad polymers

The results for the PGALn and PGALrad polymers evidence stable conformers through a combination of Molecular Mechanics and DFT quantum chemical computations for oligomers with nine repeating units. Their geometries (bond lengths, angles) were optimized without imposing any restraint, followed by inspection of their vibrational frequencies to confirm those models as true stationary points. The resulting equilibrium geometries are in Fig. 9, where the method predicts an intriguing helical arrangement for both polymers.

In contrast to the GARad monomer, in both PGALn and PGALrad several repeat units show the lateral –OH groups (O3, O5) next to the central oxygen (O4) oriented towards the carboxylate/carboxyl of the next unit. This suggests that such spatial arrangement is due to intramolecular H-bonding, occurring between both a strong H-donor (OH) and strong H-acceptors ($\text{CO}_2\text{H}/\text{CO}_2^-$), with a short D-A distance (2.6–2.8 Å) and a wide (*c.a.* 160°) D-H-A angle (For details, see Supplementary Information, Fig. S3).

In order to confirm and gain further insight into the nature of

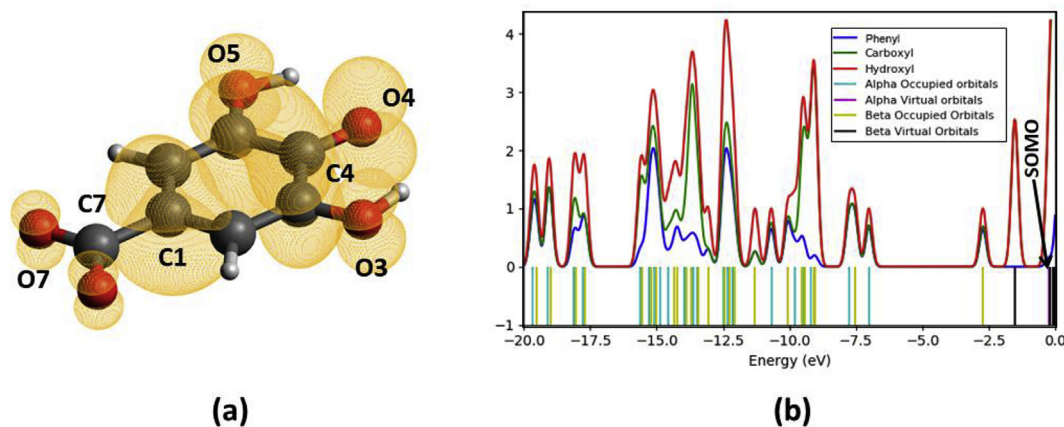


Fig. 8. (a) Spin density distribution and (b) PDOS plot for the gallate radical at the M06-2X/6-311++G(d,p) level of theory. Here, “Phenyl” refers to C1–C6, “Hydroxyl” to O3–O5 and “Carboxyl” to C7 and O7.

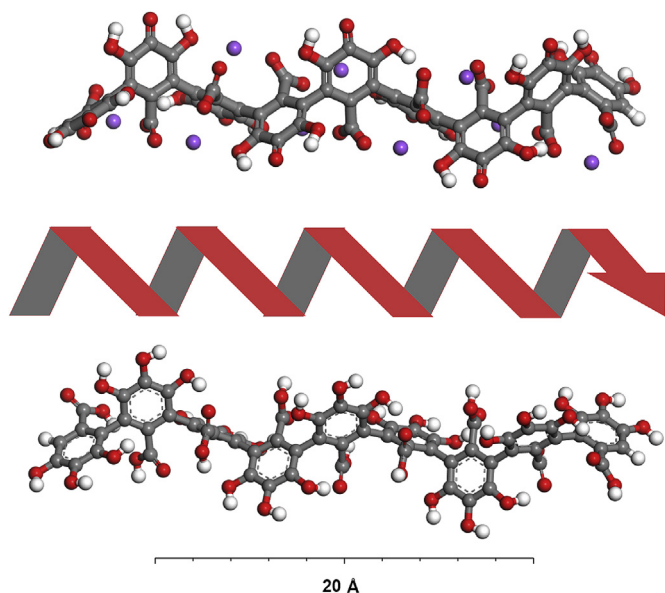


Fig. 9. Optimized geometries for oligomers ($n = 9$) of PGALrad (top) and PGALn (bottom) at the M06-2X/6-311++G(d,p) level of theory in vacuum.

the aforementioned intramolecular hydrogen bonding (HB) in the polymers, we carried out a topological analysis of the electronic densities of *reduced models* of the polymers (i.e. the minimum submolecular system containing the H-bonding entities) within the framework of the Quantum Theory of Atoms in Molecules (QTAIM).

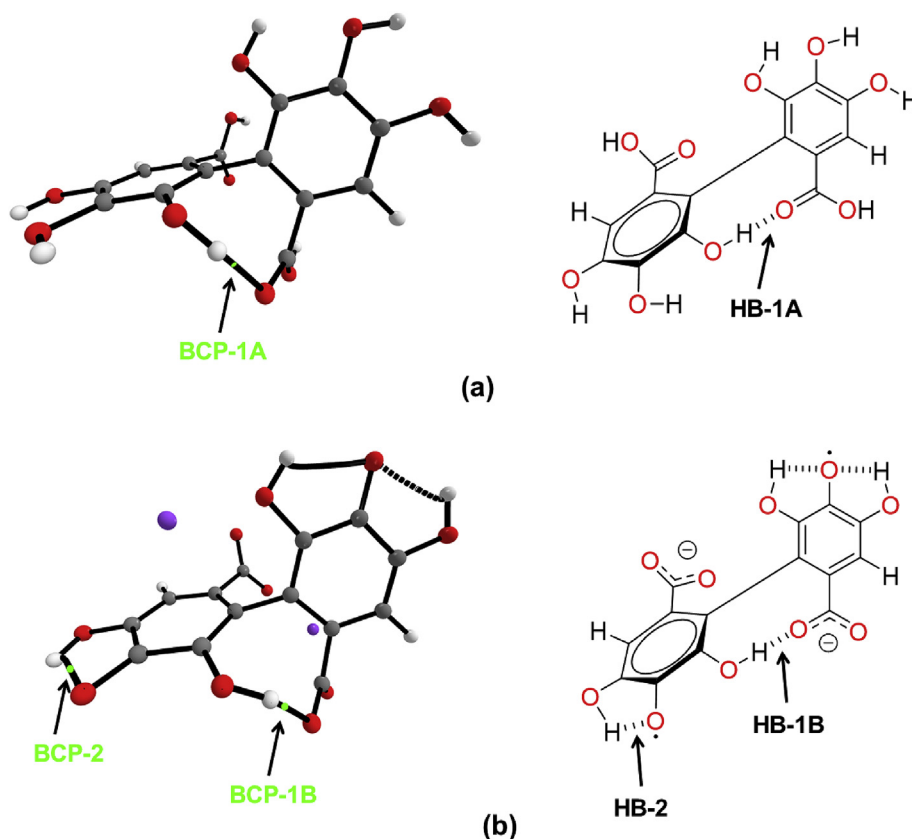


Fig. 10. Intramolecular HB within reduced models of (a) PGALn and (b) PGALrad as evidenced through a QTAIM topological analysis at the M06-2X/6-311++G** level of theory. Relevant Bond Critical Points (BCP) appears as pale-green spheres through bonding paths.

This constitutes a robust and reliable method for addressing supramolecular interactions in gas or condensed phases [43,44]. The results in Fig. 10 show two relevant Bond Critical Points (BCP), the first within the bonding path in between the hydroxyl of a repeat unit and the carboxylate/carboxyl of its neighbor (BCP-1A for PGALn and BCP-1B for PGALrad) and the second (BCP-2) in between a hydroxyl and the central radical oxygen (O3) in PGALrad. The finding of these BCPs confirms the occurrence of the proposed HB in the molecular structure of these polymers. These HB-1A/HB-1B occur among monomers and reasonably account for the helical arrangement of both molecules and HB-2 for the hydrogen bond within a repeating unit in PGALrad, which should take a major role in the stabilization of this multiradical species.

Nonetheless, it is particularly intriguing that our electronic computations predict a preference in PGALrad to stabilize HB-1B instead of further stabilizing the radical through a second HB-2 interaction. This prompted us to compute the energy of these interactions by scanning the Potential Energy Surface (PES) of these polymers by increasing 15° variations of the C2–C3–O3–H3 torsion angle (Fig. 11). Therein, there is a global minimum (Point A) as the torsion reaches $40\text{--}45^\circ$, which renders the more favorable (linear) geometry for the HB-1A/HB-1B hydrogen bonds. By comparing with the energy of the non H-bonding starting geometry at $\theta = 0^\circ$, a remarkable stabilization of 11 kcal/mol for PGALrad and 5 kcal/mol for PGALn is attributed to the energy of the HB-1B and HB-1A interactions, correspondingly. The marked difference between both values is a consequence of the stronger H-accepting character of the anionic carboxylate in PGALrad in comparison with the neutral COOH group in PGALn. Global maxima (Points B and B') in these PES curves are around 110° for PGALrad and 180° for

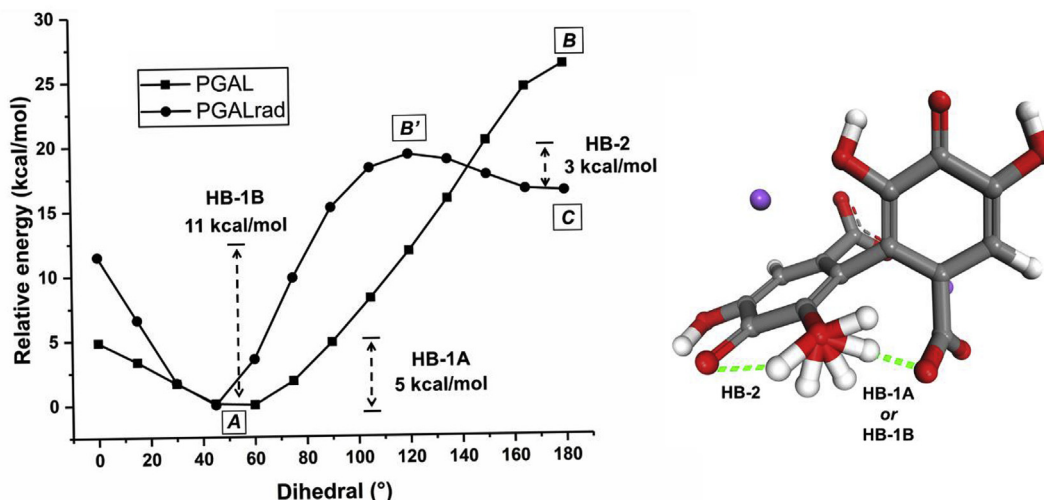


Fig. 11. Energy of the intramolecular hydrogen bonds (HB) within PGALn and PGALrad from energy scans through the C2–C3–O3–H3 dihedral angle for reduced models of both polymers at the M06-2X/6-311++G(d,p) level of theory. Relevant critical points of these potential energy surfaces appear with italic letters.

PGALn, which is accounted to electrostatic repulsion between O3 and O7 for PGALrad and to steric strain between H-3 and H-4 in PGALn. Finally, the PES for PGALrad reaches a second minimum (Point C) owing to the occurrence of HB-2, with a net contribution of 3 kcal/mol. These results point towards a profound stabilization of these molecular geometries due to the HB-1A/HB-1B interactions which should be even more pronounced due to cooperative effects throughout the helical arrangement.

3.5.3. Computed vibrational and electronic spectra

A comparison between the electronic and computed electronic spectra of both PGALn and PGALrad showed that both the experimental red-shift of ca. 70 nm when going from PGALn to PGALrad (*vide supra*) and the first vertical excitation energies for both species agree with our computations at the M06-2X/6-311++G(d,p) level of theory (Table 4). Solvent effects were ruled out in our computation to gain consistency with the experimental data, which was measured in different solvents due to the largely divergent solubility of these materials. Although of small magnitude, the larger deviation obtained for PGALrad may indicate either a strong influence of the solvent in these transitions or a significant multi-configurational character for this species.

The agreement between the theoretical and experimental results confirmed the proposed molecular structures and allowed us to characterize these electronic transitions as local π - π^* transitions within the phenyl rings of the repeat units in both polymers, very similar to that for the GA and GARad monomers. Aside from the shoulders observed experimentally at ca. $\lambda = 350$ nm and $\lambda = 400$ nm for PGALn and PGALrad owing to a highly degeneration of the ground-state structure as the polymers grow, the electronic spectra of these polymers have no changes when compared to the GA and GARad monomers, which is a result of the marked lack of

planarity in these molecules, as the wide torsion angles of ca. 105° prediction between neighboring monomers prevents electronic communication between the π -systems of two adjacent phenyl rings. Consequently, the electronic spectrum of both PGALn and PGALrad roughly approximates to the periodic repetition of the electronic absorption of their monomers.

Further confirmation of the molecular structure of the PGALn and PGALrad polymers is the good agreement between the computed and experimental vibrational frequencies for these polymers. Remarkably, the theoretical spectra reproduce with outstanding accuracy the 150 cm^{-1} redshift for the asymmetric C=O stretch when going from PGALn to PGALrad (Fig. 12), in agreement with neutral and anionic molecular structures. Moreover, the computed spectra agree with the widespread $-\text{OH}$ wagging (1250 – 1500 cm^{-1}) clearly present in the perhydrogenated PGALn as a consequence of the protonation of the carboxylate and the phenoxyl O-radical.

4. Conclusions

Following an experimental-theoretical approach we have successfully established the molecular structure of the enzyme-mediated poly(gallic acid) (PGAL). This contribution demonstrates that, in contrast to the earlier molecular structure assignment, the polymer has a multiradical and polyanionic nature. As a multiradical, PGAL has several appealing features, such as high water solubility, multi-gram green synthesis with solution processability, and thermal, air and photo stabilities. According to Molecular Mechanics and DFT quantum chemical computations, its multiradical character is largely stabilized through an extended hydrogen bonding network with interaction energies in the 3–11 kcal/mol regime, which results in an intricate helical molecular topology. The ESR studies confirm the stability of this polymer, which shifts from a fully-protonated species by reaction with the DPPH free radical, and accordingly, the radical scavenging follows a Single-Electron Transfer (SET) mechanism for the multiradical species. Work is in progress on our laboratory on further spectrokinetic studies for the antioxidant mechanisms of the polymer as well on exploring novel and exciting applications for this material as a multiradical.

Table 4

Experimental and computed (M06-2X/6-311++G**, vacuum) vertical excitation energies (eV) at the absorption maximum for PGALn and PGALrad.

	M06-2X/6-311++G(d,p) ^a	Experimental
PGALn	5.0	4.93 (in methanol)
PGALrad	3.85	3.34 (in water)

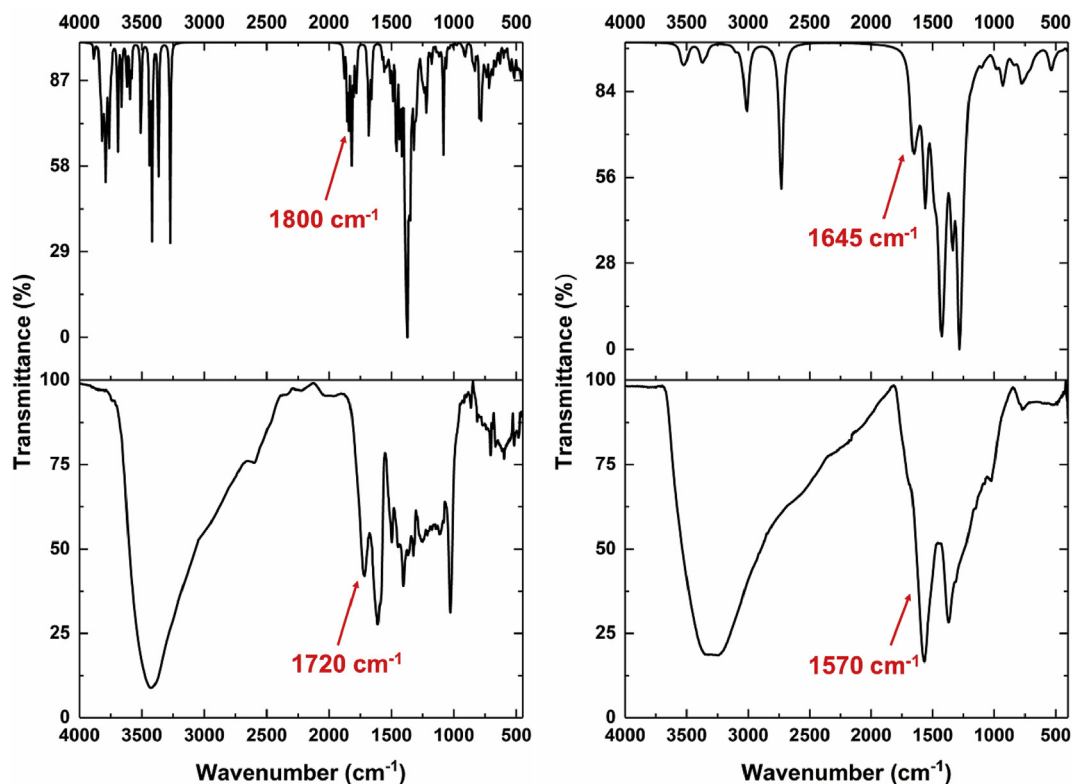


Fig. 12. Computed (M06-2X/6-311++G**, top) and experimental (FT-IR/ATR, bottom) vibrational spectra for P GALn (right) and P GALrad (left). The values for the asymmetric C=O stretch are indicated.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge computing time provided on the Miztli cluster (DGTIC-UNAM) as well as financial support from PAPIIT (IN216616 and IN201317) and CONACyT for doctoral scholarships of A.R.-M. (336576) and P.L.-V (337958). Authors thank Prof. Rosa Santillán (CINVESTAV-IPN) for critically revising the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.07.050>.

References

- [1] A. Rajca, Organic diradicals and polyradicals: from spin coupling to magnetism? *Chem. Rev.* 94 (4) (1994) 871–893.
- [2] P. Wang, S. Lin, Z. Lin, M.D. Peeks, T. Van Voorhis, T.M. Swager, A semiconducting conjugated radical polymer: ambipolar redox activity and faraday effect, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (34) (2018) 10881–10889.
- [3] T.V. Can, R.T. Weber, J.J. Walsh, T.M. Swager, R.G. Griffin, Frequency-swept integrated solid effect, *Angew. Chem. Int. Ed.* 56 (24) (2017) 6744–6748.
- [4] J.E. Nutting, M. Rafiee, S.S. Stahl, Tetramethylpiperidine N-oxyl (TEMPO), phthalimide N-oxyl (PINO), and related N-oxyl species: electrochemical properties and their use in electrocatalytic reactions, *Chem. Rev.* 118 (9) (2018) 4834–4885.
- [5] T. Jähnert, B. Häupler, T. Janoschka, M.D. Hager, U.S. Schubert, Polymers based on stable phenoxyl radicals for the use in organic radical batteries, *Macromol. Rapid Commun.* 35 (9) (2014) 882–887.
- [6] T. Suga, H. Ohshiro, S. Sugita, K. Oyaizu, H. Nishide, Emerging N-type redox-active radical polymer for a totally organic polymer-based rechargeable battery, *Adv. Mater.* 21 (16) (2009) 1627–1630.
- [7] J. Yu, L. Sun, C. Ma, Y. Qiao, H. Yao, Thermal degradation of PVC: a review, *Waste Manag.* 48 (2016) 300–314.
- [8] J.W. Collette, J.S. Miller, Materials, research—current issues and future directions, *Adv. Mater.* 1 (5) (1989) 140–141.
- [9] T. Nezakati, A. Seifalian, A. Tan, A.M. Seifalian, Conductive polymers: opportunities and challenges in biomedical applications, *Chem. Rev.* 118 (14) (2018) 6766–6843.
- [10] P. Zugenmaier, Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers, *Prog. Polym. Sci.* 26 (9) (2001) 1341–1417.
- [11] R. Mülhaupt, Hermann Staudinger and the origin of macromolecular chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (9) (2004) 1054–1063.
- [12] G. Jeschke, Determination of the nanostructure of polymer materials by electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Macromol. Rapid Commun.* 23 (4) (2002) 227–246.
- [13] G. Tria, H.D. Mertens, M. Kachala, D.I. Svergun, Advanced ensemble modelling of flexible macromolecules using X-ray solution scattering, *IUCr* 2 (2) (2015) 207–217.
- [14] J. Higgins, Neutron scattering from polymers: five decades of developing possibilities, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 7 (2016) 1–28.
- [15] R.M. Gathungu, R. Kautz, B.S. Kristal, S.S. Bird, P. Vouros, The integration of LC-MS and NMR for the analysis of low molecular weight trace analytes in complex matrices, *Mass Spectrom. Rev.* (2018).
- [16] J. López, J.M. Hernández-Alcántara, P. Roquero, C. Montiel, K. Shirai, M. Gimeno, E. Bárzana, Trametes versicolor laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 97 (2013) 100–105.
- [17] J. Díaz-Sánchez, A. Rosas-Aburto, E. Vivaldo-Lima, J.M. Hernández-Alcántara, I. Gracia-Mora, H. Vázquez-Torres, L.C. Ordóñez, P. Roquero, M. Gimeno, Development and characterization of a flexible electrochromic device based on polyaniline and enzymatically synthesized poly (gallic acid), *Synth. Met.* 223 (2017) 43–48.
- [18] A. Romero-Montero, A. Tecante, R. García-Arrazola, C. Montiel, L.J. del Valle, J. Puiggali, M. Gimeno, Growth of epithelial cells on films of enzymatically synthesized poly (gallic acid) crosslinked to carboxymethylcellulose, *RSC Adv.* 7 (29) (2017) 17660–17669.
- [19] R. Sánchez-Sánchez, A. Romero-Montero, C. Montiel, Y. Melgarejo-Ramírez, C. Sánchez-Ortega, H. Lugo-Martínez, B. Cabello-Arista, R. García-Arrazola, C. Velasquillo, M. Gimeno, Cytoprotective effect of the enzyme-mediated polygallic acid on fibroblast cells under exposure of UV-irradiation, *Mater. Sci. Eng. C* 76 (2017) 417–424.
- [20] T. Sukegawa, H. Omata, I. Masuko, K. Oyaizu, H. Nishide, Anionic polymerization of 4-methacryloyloxy-TEMPO using an MMA-capped initiator, *ACS Macro Lett.* 3 (3) (2014) 240–243.
- [21] K. Oyaizu, T. Suga, K. Yoshimura, H. Nishide, Synthesis and characterization of radical-bearing polyethers as an electrode-active material for organic secondary batteries, *Macromolecules* 41 (18) (2008) 6646–6652.

- [22] M. Suguro, A. Mori, S. Iwasa, K. Nakahara, K. Nakano, Syntheses and electrochemical properties of TEMPO radical substituted silicones: active material for organic radical batteries, *Macromol. Chem. Phys.* 210 (17) (2009) 1402–1407.
- [23] S. Komaba, T. Tanaka, T. Ozeki, T. Taki, H. Watanabe, H. Tachikawa, Fast redox of composite electrode of nitroxide radical polymer and carbon with polyacrylate binder, *J. Power Sources* 195 (18) (2010) 6212–6217.
- [24] Z. Jia, Q. Fu, J. Huang, Synthesis of poly (ethylene oxide) with pending 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-oxyl groups and its further initiation of the grafting polymerization of styrene, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 44 (12) (2006) 3836–3842.
- [25] M. Suguro, S. Iwasa, Y. Kusachi, Y. Morioka, K. Nakahara, Cationic polymerization of poly (vinyl ether) bearing a TEMPO radical: a new cathode-active material for organic radical batteries, *Macromol. Rapid Commun.* 28 (18–19) (2007) 1929–1933.
- [26] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision B.01, 2009. Wallingford CT.
- [27] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals, *Theor. Chem. Acc.* 120 (1) (2008) 215–241.
- [28] N. Treitel, R. Shenhar, I. Aprahamian, T. Sheradsky, M. Rabinovitz, Calculations of PAH anions: when are diffuse functions necessary? *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (6) (2004) 1113–1121.
- [29] A.C. Eslami, W. Pasanphan, B.A. Wagner, G.R. Buettner, Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: an electron paramagnetic resonance study, *Chem. Cent. J.* 4 (1) (2010) 15.
- [30] M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, Antioxidant properties of phenolic Compounds: H-atom versus electron transfer mechanism, *J. Phys. Chem. A* 108 (22) (2004) 4916–4922.
- [31] H.-F. Ji, H.-Y. Zhang, L. Shen, Proton dissociation is important to understanding structure–activity relationships of gallic acid antioxidants, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 16 (15) (2006) 4095–4098.
- [32] M. Sillion, D. Hritcu, G. Lisa, M.I. Popa, New hybrid materials based on layered double hydroxides and antioxidant compounds. Preparation, characterization and release kinetic studies, *J. Porous Mater.* 19 (3) (2012) 267–276.
- [33] B. Bleaney, R. Rubins, Explanation of someForbiddenTransitions in paramagnetic resonance, *Proc. Phys. Soc.* 77 (1) (1961) 103.
- [34] T. Jähnert, M.D. Hager, U.S. Schubert, Application of phenolic radicals for antioxidants, as active materials in batteries, magnetic materials and ligands for metal-complexes, *J. Mater. Chem.* 2 (37) (2014) 15234–15251.
- [35] Q. Cao, L.M. Dornan, L. Rogan, N.L. Hughes, M.J. Muldoon, Aerobic oxidation catalysis with stable radicals, *Chem. Commun.* 50 (35) (2014) 4524–4543.
- [36] T. Janoschka, M.D. Hager, U.S. Schubert, Powering up the future: radical polymers for battery applications, *Adv. Mater.* 24 (48) (2012) 6397–6409.
- [37] K. Zhang, M.J. Monteiro, Z. Jia, Stable organic radical polymers: synthesis and applications, *Polym. Chem.* 7 (36) (2016) 5589–5614.
- [38] A. Rajca, J. Wongsriratanakul, S. Rajca, Magnetic ordering in an organic polymer, *Science* 294 (5546) (2001) 1503–1505.
- [39] E. Morisbak, V. Ansteinesson, J.T. Samuelsen, Cell toxicity of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA): the role of oxidative stress, *Eur. J. Oral Sci.* 123 (4) (2015) 282–287.
- [40] J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio, Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (6) (2001) 1173–1183.
- [41] I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Imai, M. Kamibayashi, Y. Yoshihashi, K.-i. Matsumoto, K. Fukuhara, K. Terada, S. Itoh, T. Ozawa, Solubilisation of a 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in water by β -cyclodextrin to evaluate the radical-scavenging activity of antioxidants in aqueous media, *Chem. Commun.* 51 (39) (2015) 8311–8314.
- [42] S. Mishra, A.K. Gupta, P. Malhotra, P.K. Singh, R. Pathak, A. Singh, S. Kukreti, H.K. Gautam, S. Javed, K. Raj, Protection against ionizing radiation induced oxidative damage to structural and functional proteins by semiquinone glucoside derivative isolated from radioresistant bacterium *Bacillus sp. INM-1*, *Curr. Biol.* 3 (1) (2014) 117–126.
- [43] R.F.W. Bader, H. Essén, The characterization of atomic interactions, *J. Chem. Phys.* 80 (5) (1984) 1943–1960.
- [44] R.F.W. Bader, P.J. MacDougall, C.D.H. Lau, Bonded and nonbonded charge concentrations and their relation to molecular geometry and reactivity, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (6) (1984) 1594–1605.



CrossMark
click for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2017, 7, 17660

Growth of epithelial cells on films of enzymatically synthesized poly(gallic acid) crosslinked to carboxymethylcellulose†

Alejandra Romero-Montero,^a Alberto Tecante,^a Roeb García-Arazola,^a Carmina Montiel,^a Luis J. del Valle,^b Jordi Puiggalí^b and Miquel Gimeno^{*a}

Poly(gallic acid), a novel polymer obtained by enzymatic polymerization of gallic acid, was successfully cross-linked to carboxymethylcellulose using citric acid as a cross-linker. Non-woven sheets were prepared with the resulting copolymer and their *in vitro* biocompatibility was assessed. The results on the characterizations of the produced films by mechanical tests, water vapour permeability, contact angle, and antioxidant activity by electronic paramagnetic resonance were adequate for skin tissue regeneration. Films were also decomposed under physiological conditions using universal buffers at pH 3, 7 and 10. *In vitro* experiments with fibroblast-like and epithelial-like cells showed good adhesion and proliferation onto the PGAL-co-CMC sheets. These non-woven sheets can consequently be considered as novel biocompatible and biodegradable films with high-responsiveness for biomedical or tissue engineering applications.

Received 20th January 2017

Accepted 16th March 2017

DOI: 10.1039/c7ra00883j

rsc.li/rsc-advances

Introduction

The biomaterials composed of polymers from natural sources found applications in tissue engineering owing to their good biocompatibility, superior responses, few side effects and reduction or even suppression of secondary treatments or surgeries.^{1–5} Additionally, they are also studied in neurology, medical imaging, bionic medicine, biomechanics or bio-nanotechnology.⁶ Generally, the improvement of the properties of these biomaterials to meet the requirements for specific biomedical application includes adequate mechanical properties, stability in aqueous environments, vapour barrier properties and cell biocompatibility, all these concomitantly with synthetic reproducibility in the absence of toxic processes and reagents.^{6,7} In this regard, the use of non-toxic carboxylic acids as cross-linking agents between two or more polymer backbones, such as citric acid (CA), proved successful to render tissue engineering materials with superior biocompatibility compared to those derived from other cytotoxic crosslinkers, such as glutaraldehyde or formaldehyde.⁸ Among the studied polymers matrices, the approaches using the naturally abundant cellulose and its derivatives are encouraging owing to their

low costs and availability in addition to good biocompatibility. Specifically, the water-soluble carboxymethyl celluloses (CMC)s have multiple biomedical uses such as in heart, chest and cornea surgeries in addition to orthopaedic and pharmaceutical applications, among others.^{9,10}

On the other hand, plant polyphenols have attracted wide interest in the biomedical field especially due to their radical scavenging activities (RSA) and antimicrobial capacities. Free radical species promote interaction within cells leading to proteins, membrane and gene damage and additionally, the oxidative stresses generated by the so-called radical oxygen species (ROS) are involved not only in wound healing processes but also in other several metabolic syndromes and inflammatory processes.^{11–13} Thus, the preparation of matrices with antioxidant activity to protect cells and tissues from oxidative damage has been achieved by incorporation of oxidant radical scavenger molecules, *e.g.* water-soluble forms of vitamin B6 (pyridoxine, pyridoxal and pyridoxamine), and small polyphenols such as coumaric and caffeic acids.^{14,15} Nonetheless, the characteristics in most of the natural polyphenol extracts, specially their low molecular stability against temperature or UV-irradiation, as well as high hydrophobicity or their limited extractions in large quantities restricts their bioavailability and processability; thereby their modifications play an important role to produce synthetic derivatives with adequate characteristics and scale-up feasibility.¹⁶ Enzyme-mediated modifications offer environmentally favourable and mild process conditions that resulted in non-toxic products.^{17,18} Glycosylation or esterification of plant antioxidants proved to be successful for these purposes.^{19,20} Additionally, the oxidative polymerization of

^aFacultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Mexico. E-mail: mgimeno@unam.mx

^bChemical Engineering Department, Escola d'Enginyeria de Barcelona Est-EEBE, c/ Eduard Maristany 10-14, Barcelona, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7ra00883j

phenols using oxidoreductases has been studied to attain novel macromolecular structures and functionalities.^{21,22} We have recently reported the laccase from *Trametes versicolor*-mediated polymerization of the naturally abundant gallic acid (GA) in mild process conditions to attain a novel electrically semi-conducting poly(gallic acid) (PGAL).²³ This polymer displays a controlled molecular structure with phenyl–phenyl linkages and number average molecular weight of *ca.* 7000 Da, which can vary according to synthetic conditions, and importantly, this enzymatically synthesized PGAL presents high water solubility, which allows for innocuous processability. However, the rigidity of PGAL did not allow for film formation by itself. In the present work, PGAL is crosslinked to CMC using CA as the cross-linking agent by a non-toxic methodology.^{24,25} This novel material (PGAL-*co*-CMC) displays adequate physicochemical characteristics for tissue engineering. The antioxidant power of PGAL–CMC films was demonstrated by solid-state electronic paramagnetic resonance (EPR) as well as the antimicrobial activity for both PGAL and films by the study of the inhibition of common pathogen bacterial strains in hospitals. In order to assess its potential as biomaterial for skin tissue regeneration, the viability of epithelial cells were studied on the produced PGAL-*co*-CMC films.

Results and discussion

Synthesis and characterization of the produced PGAL-*co*-CMC films

A possible molecular structure of the target molecule is depicted in Fig. 1 as the product of the reaction scheme. Noteworthy, both polymers have more than one hydroxyl moieties for esterification and CMC presents random methylation and carboxylation in its repeat units. Therefore, the product molecular structures might be several. The production of PGAL (Fig. 1) was confirmed by the absence of signals in ¹H-NMR spectra.

Additionally, it was confirmed by the broad FT-IR bands between 3000 and 3400 cm⁻¹ assigned to O–H stretching and

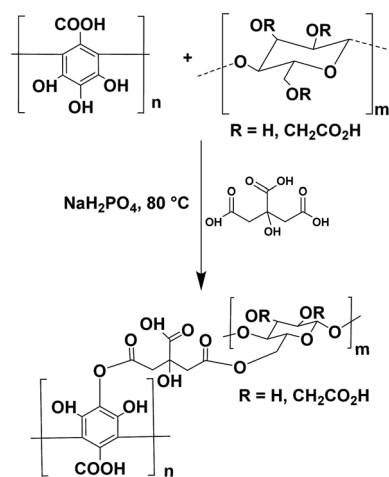


Fig. 1 Schematic representation of the cross-linking reaction between PGAL and CMC with CA as cross-linking agent to a possible molecular structure in product.

the absence of characteristic C–O–C vibration band, as reported elsewhere²³ (see ESI data file 1 and 2† for ¹H-NMR and FTIR spectra for PGAL, respectively). SEC analyses for PGAL against PEG standards displayed 6000 g mol⁻¹ and the concentration of saturation (*C_s*) in water for the synthesized molecule was determined as 500 mg mL⁻¹, which is worth to remark from the standpoint of innocuous processability.²⁶

The FT-IR spectrum for the PGAL-*co*-CMC (entry 3 in Table 1), shown in Fig. 2, is compared with those for PGAL, CA and CMC, where expected bands for native polymers are observed. The bands assigned to carbonyl moieties in AC are also present, 1700–1725 cm⁻¹, which sustains the cross-linking.

Solid-state EPR in films was implemented to detect the signal of unpaired electrons in the “hyperfine structure” owing to the interaction of the magnetic momentum of any unpaired electron and the vicinal nucleus with spin number different to zero (Fig. 3). This method allowed non-bonding electrons to be detected qualitatively through the magnetic excitation of the phenolic –OH moieties. The obtained results were compared to solid state EPR for PGAL measured under the same conditions. The analyses display an intense signal for PGAL, which decays for PGAL-*co*-CMC films. This feature can be reasonably attributed to the decrease of free –OH moieties because of the cross-linking, as shown in Fig. 3A and B, respectively.

The comparison between EPR spectra of films points out that the signal intensities are related to the PGAL feed. The decrease in PGAL feed resulted in the decrease of the paramagnetic field intensities, most intense bands in Fig. 3B correspond to entries 7–9, intermediate to 4–6 and lowest intensity bands to 1–3 in Table 1. Additionally, the intensity decreases as the Gly content increases which might be ascribed to the interaction of the plasticizer with the –OH moieties in the phenolic and CMC repeat units.

Mechanical properties and degree of cross-linking of PGAL-*co*-CMC films

The data of maximum tensile strength at break and puncture as well as Young's modulus for each of the formulations used in the tensile test are shown in Table 1. Data clearly indicated that PGAL and Gly concentrations had a significant influence on the properties of the final product. These results might suggest that besides of the cross-linking, the semi crystalline CMC allows generating ion-dipole and hydrogen bonding interactions between its chains. However, keeping in mind that this polyphenol has exposed hydroxyl and carboxyl moieties in each phenolic repeat unit, the dipole–dipole interactions might be favoured, thereby improving the tensile strength. The density of cross-linking of the polymer matrices in deionized water has been studied as an indirect method to estimate the degree of cross-linking as reported by Xing *et al.*²⁷ The results shown in Table 1 substantiate the effect of PGAL in the cross-linking which can be ascribed to the pendant hydroxyl and carboxyl moieties at the polyphenol backbone. Contrarily, control experiments without PGAL addition, entries 10–12 in Table 1, displayed poor bonding among CMC chains. This was also evidenced when comparing the data of equilibrium swelling

Table 1 Results for the mechanical analyses of PGAL-co-CMC films at different PGAL and Gly feed

Entry	PGAL (%)	Gly (%)	σ^a (MPa)	Young's modulus (MPa)	σ (puncture assay, MPa)	Thickness (m) $\times 10^5$	Cross-linking degree ^b (mol mL ⁻¹) $\times 10^3$
1	5	2	3.92 \pm 0.33	23.06 \pm 3.56	42.34 \pm 2.24	1.2 \pm 0.1	9.3
2	5	3	7.78 \pm 0.74	14.40 \pm 0.75	44.12 \pm 2.26	1.3 \pm 0.3	9.3
3	5	4	14.23 \pm 0.35	11.32 \pm 0.83	47.44 \pm 1.46	1.2 \pm 0.2	9.8
4	10	2	7.86 \pm 0.54	21.67 \pm 1.25	43.40 \pm 2.89	1.1 \pm 0.2	10.8
5	10	3	7.51 \pm 0.58	10.50 \pm 0.40	47.68 \pm 0.82	1.3 \pm 0.2	10.1
6	10	4	28.40 \pm 0.36	9.46 \pm 0.76	65.85 \pm 3.70	1.2 \pm 0.3	11.1
7	15	2	12.80 \pm 0.69	19.22 \pm 1.46	45.44 \pm 1.40	1.4 \pm 0.1	19.1
8	15	3	12.22 \pm 0.31	9.82 \pm 0.60	63.24 \pm 1.63	1.3 \pm 0.3	19.2
9	15	4	31.02 \pm 2.89	5.85 \pm 0.28	75.83 \pm 0.25	1.4 \pm 0.2	17.8
10	0	2	8.99 \pm 0.79	6.44 \pm 0.61	39.54 \pm 2.35	1.2 \pm 0.1	1.3
11	0	3	14.73 \pm 1.11	4.88 \pm 0.41	41.15 \pm 1.34	1.2 \pm 0.2	1.1
12	0	4	17.65 \pm 0.99	3.91 \pm 0.26	43.80 \pm 2.49	1.3 \pm 0.1	1.5

^a σ true stress is related to Hencky strain in tensile and puncture test. ^b Cross-linking degree was calculated from Flory–Huggins polymer–solvent interaction equation.

ratio (Q_m) and percentage of swelling among samples (see ESI data file 4† for Q_m and percentage of swelling for entries 1–12 in Table 1 and a graphical representation of the swelling percentage for each entry in Table 1).

Additionally, the strength at break is also affected by the amount of plasticizer. The experimental evidence suggests that the three hygroscopic compounds with high hydrogen-bonding moieties might be advantageous in dermal regeneration studies, where skin hydration is a crucial factor. The fracture force, true stress, is influenced together with the percentage of PGAL and by the amount of Gly, although the highest contribution of the latter is 4 wt% to enhance the flexibility. Therefore, the increase in the amount of the plasticizer could decrease the material strength by limiting the relatively weak intermolecular interactions between chains.²⁸ However, this is not observed in PGAL-co-CMC, which might be ascribed to the cross-linking.

Regarding the Young's modulus, all formulations can be classified as soft materials according to ASTM standards. The

data in Table 1 indicate that the presence of PGAL and plasticizer tend to increase the elastic modulus. Non-cross-linked polymers have a greater free volume and consequently more freedom of movement. This condition could explain the increase in flexibility. Also, the plasticizer can contribute to molecular mobility and therefore increase the flexibility and elongation at break. Control experiments without PGAL allowed the separate effect of the polyphenol and plasticizer to be observed. Therefore, it can be concluded that the increase in Gly concentration results in more tolerance to stretching, *i.e.* more capacity to withstand strain. This plasticizing effect can be interpreted as an enhanced flexibility (the measured elongation for each entry in Table 1 is shown in ESI data file 5† to exemplify both effects). On the other hand, the increase in PGAL concentration resulted in higher tensile strength, regardless of Gly concentration. This means films with higher resistance to

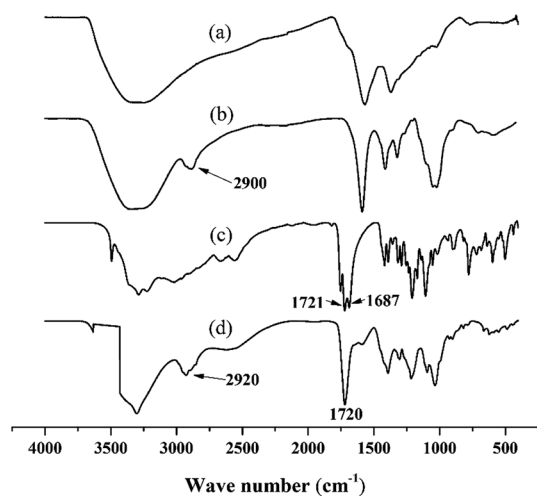


Fig. 2 Comparative FT-IR spectra for PGAL (a); CMC (b); AC (c); and PGAL-co-CMC (d).

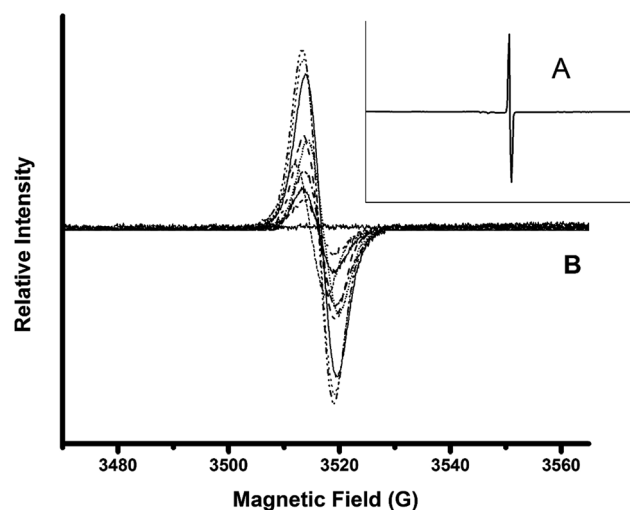


Fig. 3 Solid state EPR spectra for PGAL (A); and for the PGAL-co-CMC films (B). Decrease in PGAL feed decrease paramagnetic field intensities. Control measurement without sample displays a flat continuous line.

fracture. Noteworthy, Young's modulus is less sensitive to changes in polyphenol and plasticizer concentration but indicates the intrinsic elastic character or individual films, below their elastic limit.

The true stress to puncture for all formulations displays a remarkable influence of PGAL and Gly initial concentrations. However, puncture and tensile strength are not comparable and must be considered for each specific application of the films. For tissue engineering, specifically in skin regeneration, the elastic characteristics of our films are superior to those of the human skin, which Young's modulus varies between 4.2×10^5 Pa to 8.5×10^5 Pa for young and old human skin, respectively.²⁹ Therefore, although the forces in human skin and that in our mechanical analyses are not comparable, it can be concluded that the material presents good qualities for application in tissue engineering.

Thermal characterization

TGA analyses (ESI data file 2†) demonstrated the thermal stability of the crosslinked polymers since an appreciable degradation was only observed when the temperature was higher than 200 °C. All samples showed an initial weight loss that can be associated with the adsorbed water (*i.e.* note the peak at 100 °C in the DTGA curve). This loss was always close to 10% and indicates a higher affinity of PGAL-*co*-CMC polymers with water than PGAL (a loss of only to 5% was determined in this case) which might be ascribed to the ratio of hydroxyl groups in the repeat units. Decomposition of PGAL was characterized by a complex mechanism that followed at least two degradation steps with DTGA peaks at 230 and 320 °C and rendered a very high char yield (49%) due to the high aromatic content of PGAL. Crosslinked polymers showed also an intermediate degradation process associated with CMC that rendered an absolute and distinctive DTGA peak at 265 °C. Char yield decreased for example to 12% for PGAL-*co*-CMC entry 9 and to 16% for entry 1, values that clearly contrasted with that attained with the aromatic PGAL component alone. Decrease on the char yield was logically observed when samples incorporated higher amounts of the volatile Gly component and had a lower content of PGAL.

DSC heating runs showed that samples were amorphous, displaying only a clear glass transition at temperatures near 0 °C when the PGAL content was low (*e.g.* 5 wt%) (see ESI data file 2† for TGA and DSC traces). This temperature slightly increased with the PGAL content and was also influenced by the incorporation of the plasticizer Gly component. The highest value was logically attained for the sample having maximum PGAL (*i.e.* 15 wt%) and minimum Gly (*i.e.* 2 vol%) content, being the observed T_g significantly lower than the one observed for the PGAL homopolymer (*i.e.* 42 °C respect to 88 °C). The increase of the Gly content to 4 vol% decreased the glass transition temperature to 25 °C. In this way, flexible PGAL-CMC samples could be easily prepared if an appropriate amount of Gly was incorporated. Despite having a crosslinked structure, PGAL-*co*-CMC samples were more flexible than PGAL due to their lower aromatic content and the incorporation of a small ratio of plasticizer molecules.

WVP and contact angle analyses on PGAL-*co*-CMC films

Two PGAL-*co*-CMC samples, entry 1 and 2 in Table 1 were selected for the WVP analyses based on ASTM E-96 standard calculations and the correction method proposed by Gennadios in 1994,³⁰ as shown in Table 2. The increase of Gly increases the WVP in films owing to the lowered intramolecular forces, which in turn increases the free space and therefore allow water molecules diffusion through the macromolecular structure.²⁸

However, the results obtained differ from those reported for linear polysaccharides and are in the order of magnitude of low-density polyethylene and waxes at the same temperature and humidity. This result suggests that cross-linking with PGAL restricts the diffusion of water molecules throughout the film. Noteworthy, films swelled and showed no weight gain while placed in the humidity-controlled chamber (50% RH).

Fig. 4 shows the contact angle behaviour of PGAL-CMC films. The increase of PGAL tends to increase the contact angle, which might be ascribed to the hygroscopic characteristics of PGAL. Samples with the lower amount of PGAL (*i.e.* 5%) showed similar contact angles to the CMC film (16.5°). However, the contact angle decreases by the increase in plasticizer, and this was most noticeable when the concentration of PGAL was high (*i.e.*, 10% and 15%).

This behaviour points out that the plasticizer plays an important role in the hydrophilic characteristics of the films (see ESI data file 3† for contact angle to glycerol and PGAL relationships).

Hydrolytic degradation

The *in vitro* hydrolytic degradation of PGAL-*co*-CMC films was conducted at the physiological temperature (37 °C) and pHs of 3, 7 and 10 that were provided by the universal buffer consisting of citrate-phosphate-borate/HCl solutions.^{31,32} The degradation was studied in film samples of entries 7, 8 and 9 in Table 1 owing to the highest content of PGAL thereby to assess its effect compared to that for CMC, as reported elsewhere,³³ and the results are shown in Fig. 5. In all cases, the samples showed a very fast weight loss at the beginning of exposure (*i.e.* 42–72% after only three days) and a subsequent moderate weight loss between 7 and 15 days when a plateau was reached. Results pointed out the first process that involved the dissolution of the excess of CA and the added Gly plasticizer as well as the degradation and rapid dissolution of molecules with a low degree of cross-linking. The differences observed between samples with different Gly content after three days of exposure can be justified considering the dissolution of the plasticizer

Table 2 WVP results for PGAL-CMC film samples upon ASTM and Gennadios reported methodology²⁴

Entries from Table 1	WVP $\times 10^{13}$ (g Pa ⁻¹ s ⁻¹ m ⁻¹)	
1	ASTM	1.79 \pm 0.05
	Gennadios test ³⁰	3.69 \pm 0.10
2	ASTM	3.31 \pm 0.13
	Gennadios test	6.84 \pm 0.27

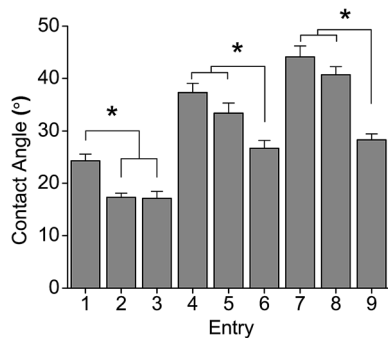


Fig. 4 Contact angle measurements on PGAL-co-CMC film sample entries in Table 1. * $p < 0.05$ determined by ANOVA of means of multiple comparisons by Tukey test.

and the increase in the matrix hydrophilicity that facilitates the diffusion of water molecules and degradation products through the films. Note that the weight loss at three days of exposure clearly increased with the Gly content (*e.g.* 42, 52 and 62% for entries 7, 8 and 9, respectively, for pH 3). After the indicated three days of exposure, the degradation behaviour was still dependent on the initial Gly feed, suggesting that some plasticizer molecules remained in the films due to the strong hydrogen bonding interactions between CMC and PGAL backbones. Thus, the weight loss increased for the pH 3 medium from 42 to 60%, 52 to 79% and 62 to 95% for 2, 3 and 4 vol% Gly feed, respectively.

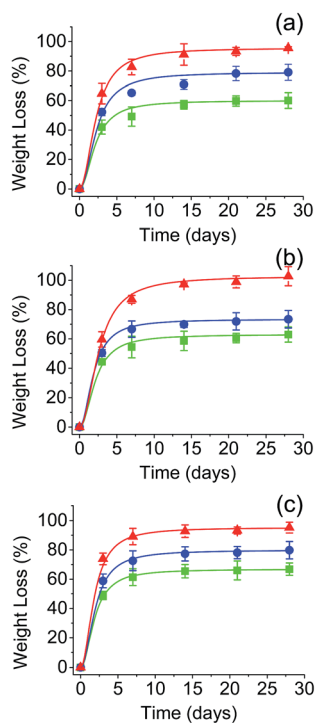


Fig. 5 Effect of pH in the hydrolytic degradation at 37 °C of the PGAL-co-CMC films. (a) pH 3, (b) pH 7, and (c) pH 10. Symbols (■), (●) and (▲) corresponds to samples with PGAL/Gly vol% ratios of 15 : 2 (entry 7), 15 : 3 (entry 8) and 15 : 4 (entry 9), respectively.

It is worth noting that the pH of the medium had a slight influence on the degradation behaviour despite the presence of ionic COO^- groups in PGAL and CMC. Logically, ionization should influence on the molecular solubility and molecular conformation. In fact, it is well known that the conformation of CMC depends on the pH of the medium forming dense aggregates in solution at low pHs; *i.e.* below its pK_a ,³³ while extended chain conformations are favoured in the presence of carboxylate ions. Data displayed in Fig. 5 also show that the main difference between samples degraded at different pHs corresponds to the initial dissolution, which is highest at pH 10.

Specifically, weight losses increased up to 48, 59 and 72% for entries 7, 8 and 9, which were samples loaded with 2, 3 and 4 vol% of Gly, respectively. Contrarily, weight losses attained after 15 days were comparable when the pH was varied. For example, 60, 63 and 67% were determined for entry 7 at pHs 3, 7 and 10. Noteworthy, the weight loss of these samples in the period between 3 and 15 days was rather constant (*i.e.* 18, 20 and 19% for pHs 3, 7 and 10, respectively). In summary, hydrolysis of ester groups was not significantly changed by pH to effectively reduce cross-linking and render soluble fragments.

On the other hand, Fig. 6 shows different images taken during the process of dissolution and hydrolytic degradation of the films.

Films prepared by solvent evaporation had a smooth and homogeneous surface as depicted in Fig. 6a. At the beginning of exposure to the hydrolytic medium (*i.e.* three days), the polymer matrix was slightly swelled as revealed by the ampoules formed on its surface and that can be clearly observed in the low magnification images (Fig. 6b).

In addition, small surface erosions are observed at high magnification (Fig. 6c). These became progressively deep and giving rise to holes and cracks, while at low magnification, a terrace structure derived from the hatching of the previously indicated ampoules/bubbles can be detected. Finally, the

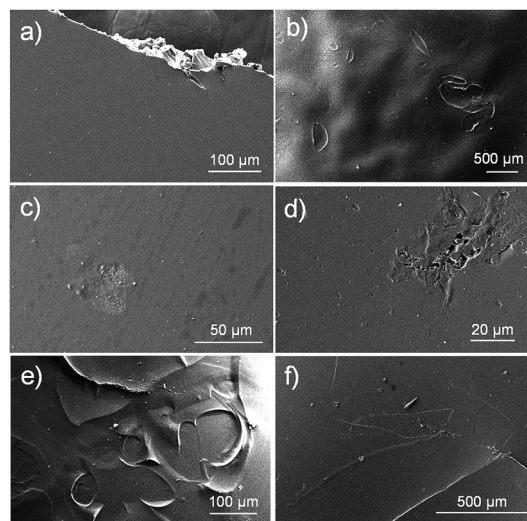


Fig. 6 SEM micrographs of PGAL-co-CMC film entry 9 in Table 1. Initial sample (a) and after 3 days (b and c), 7 days (d and e) and 14 days (f) of exposure to universal buffer pH 7 at 37 °C.

remaining material shows again a smooth surface with some reminiscences of the terrace structure (Fig. 6f).

Effect of the PGAL-co-CMC films in the bacterial growth

Fig. 7a shows the formation of bacterial growth inhibition halos for samples with different composition and different bacterial strains. This qualitative observation demonstrates the antibacterial activity against both Gram-positive (*e.g. Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative bacteria (*e.g. Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). The qualitative assay showed scarce differences among the PGAL-co-CMC film samples with different PGAL content and more logically between samples with different Gly content.

Quantitative measurements indicate that the antibacterial effect is limited because the entire bacterial population was not eliminated, even at the highest assayed concentration of PGAL (1 mg mL^{-1}). Results also showed two features concerning the antibacterial action of PGAL; first, the activity is only bacteriostatic because it reduces the population by 35 and 20% at 24 h of culture (Fig. 7b) and around 30 and 15% at 48 h (Fig. 7c) for Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively. Second, the antibacterial activity has greater effectiveness against the tested Gram-positive strains. The decrease in antibacterial activity as the culture time progresses is consistent

with the decrease of the bioactive ingredient. Finally, the diffusion on the agar plate could consider a concentration smaller than 1 mg mL^{-1} , and this would explain the similarity of the sizes of the inhibition halos for all samples as shown in Fig. 7a.

Cytotoxicity of PGAL and cell viability on PGAL-co-CMC films

Fig. 8a displays the cytotoxicity experimental curves for PGAL, which are characterized by a typical sigmoidal form. Curves allow determining in the part of the linear slope, the cytotoxic dose (LD_{50}) that corresponds to the region of linear dependence between cell viability percentage and PGAL concentration. This dose varied in the $0.2\text{--}0.6 \text{ mg mL}^{-1}$ range for the different tested cell lines except for MDCK epithelial-like cells that required a remarkable higher dose (*i.e.* 1.1 mg mL^{-1}). Interestingly, these cells are characterized by their monolayer configuration and consequently to a capability to form a protective cell barrier that justifies the relative higher dose needed to produce a cytotoxic effect. Indeed, a usual dose is found when this cell barrier is lost as it is for example the case of the SIAT cells derived from MDCK that had an LD_{50} value of 0.4 mg mL^{-1} . It is also interesting to compare the values obtained from epithelial lines derived from prostate epithelium. Thus, the PNT2 line derived from a normal tissue shows a higher LD_{50} (0.3 mg mL^{-1}) than the PC-3 prostate

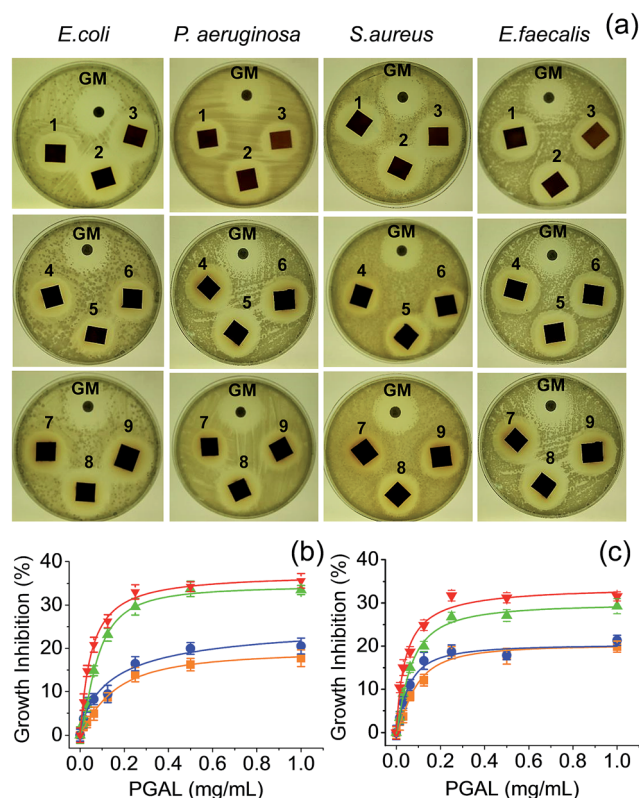


Fig. 7 Inhibition of the bacterial growth. (a) Halos of inhibition produced by the PGAL-co-CMC films. The samples named 1–9 corresponded to the entry in the Table 1, and GM is the gentamicin control disk. (b and c) Growth inhibition by PGAL after 24 and 48 h of bacterial culture (b and c, respectively). Symbols *E. coli* (■), *P. aeruginosa* (●), *E. faecalis* (▲) and *S. aureus* (▼).

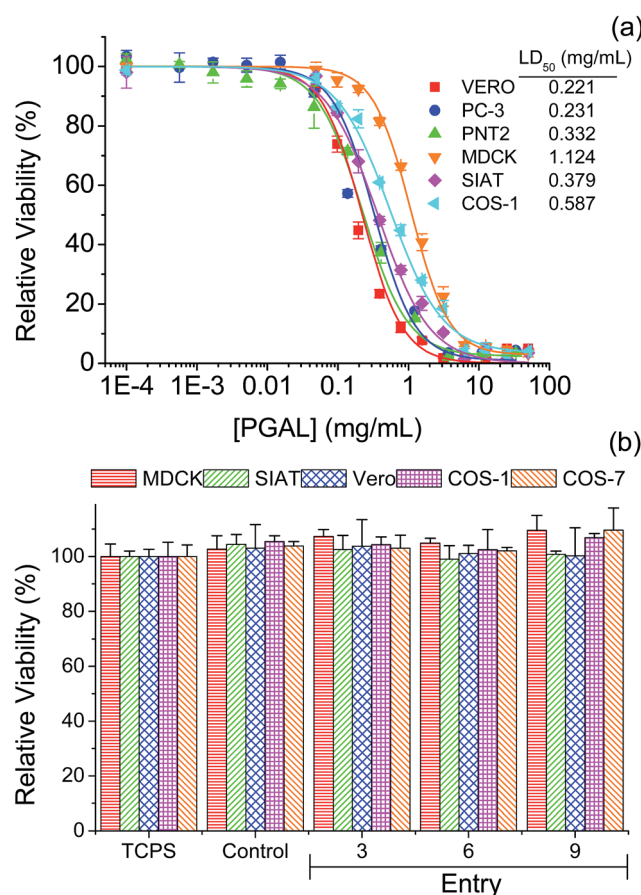


Fig. 8 Cytotoxicity curves of PGAL (a). Cell viability on films of PGAL-co-CMC (50 mg mL^{-1}), cells was evaluated at 96 h of culture (b).

tumor line (0.2 mg mL^{-1}). Finally, the Vero line, which is the one that forms the most reduced cell barrier shows the lowest LD_{50} (0.2 mg mL^{-1}). On the other hand, a slightly higher LD_{50} (*i.e.* 0.6 mg mL^{-1}) was determined for fibroblast type cells such as Cos-1.

The viability of the seeded cells on different PGAL-co-CMC (50 mg mL^{-1}) films is shown in Fig. 8b. The test was performed considering PGAL contents of 5, 10 and 15 wt% with the maximum load of the plasticizer, entries 3, 6 and 9 in Table 1, respectively, to assess the effect of the PGAL contents. In all cases, films do not show cytotoxic effects on cells seeded on their surface and led to viability entirely comparable with that determined for the surface of the culture plate (TCPS) and also to the CMC matrix used as a control. Thus, it is noteworthy that a high viability after 96 h of culture has been detected for all tested cell line (*e.g.* epithelial-like MDCK, SIAT and Vero cells and fibroblasts-like Cos-1 and Cos-7 cells).

The lack of toxicity of the studied samples implied also that the weight loss detected during exposition of the studied samples in the hydrolytic degradation media at pH 7 and 37°C mainly corresponds to soluble materials different than PGAL. Note that the weight loss is around 50% for the indicated period and the LD_{50} occurs at a concentration of $0.2\text{--}0.6 \text{ mg mL}^{-1}$. Two points were considered to establish this cultivation as a control point. First, the kinetics of hydrolytic degradation at pH 7 and 37°C , corresponding to conditions in which about 50% of the weight loss of the material can occur and second, the LD_{50} of PGAL occurs at a concentration of $0.2\text{--}0.6 \text{ mg mL}^{-1}$. Thus in theory, for a sample of approximately 50 mg cultured in 1 mL of medium, the maximum release of PGAL would correspond to a concentration of 1.25 , 2.5 and 3.75 mg mL^{-1} for samples having 5, 10 and 15 wt% of PGAL, respectively. These values clearly exceeded the concentration corresponding to LD_{50} , demonstrating that most of PGAL was retained in the cross-linked film and the safety of the films as substrates for cell

adhesion and growth. The morphology of the cultured cells on the surface of the films is shown in Fig. 9. As an example, the monolayer arrangement of epithelial-type Vero cells is shown on the surface of CMC (control, Fig. 9a) and on surfaces of the studied PGAL-co-CMC films (Fig. 9b–d). Other epithelial cell lines such as MDCK and SIAT were also characterized by the formation of monolayers on the surfaces of PGAL-co-CMC films. Finally, the distribution of more isolated cells on this surface is shown for fibroblast cells such as Cos-1 and Cos-7.

Conclusions

The use of citric acid as a cross-linking agent made possible to obtain a novel copolymer of PGAL and CMC. The experimental evidence demonstrates that the PGAL-co-CMC films are potential candidate biomaterials for skin tissue regeneration studies. Skin cells were successfully grown on films of this material. The films were non-toxic and presented antioxidant and antimicrobial properties, which are desired features in dermatological and chirurgical fields. Further work toward the application of these materials in skin tissue regeneration is in progress.

Experimental

Materials

LTV (lyophilized protein stored at -20°C) was purchased to Fluka (USA). Specific enzymatic activity was determined by the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) method; $50 \mu\text{L}$ of an aqueous enzyme solution (10 mg mL^{-1}) was added to 2.9 mL of ABTS solution (9.1 mM) in phosphate buffer (pH 5, 100 mM). Solutions were measured spectrophotometrically in a Thermo Scientific Genesys 10S UV-vis (USA) at 405 nm (25°C). Enzymatic activity unit (U) is defined as the amount of protein required to oxidize $1.0 \mu\text{mol}$ of ABTS per minute at 25°C and pH = 5 ($E_{405} \text{ ABTS} = 36.8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The LTV used in this work presented a specific enzymatic activity of 2.35 U g^{-1} . GA, ABTS, glycerol (Gly), DPX mountant for histology and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were supplied by Sigma-Aldrich (USA). CMC (sodium salt) was supplied by Química Hércules SA de CV (Mexico). CA, calcium chloride, monobasic sodium phosphate and sodium hydroxide were acquired from JT Baker Mexico. Ethyl alcohol (technical grade, $>99\%$) was supplied by Química Barsa SA de CV (Mexico).

Enzymatic synthesis of PGAL

PGAL was produced following the procedure described by López *et al.* in 2013 with some modifications.²³ In a typical experiment, GA (8.5 g) was dissolved in 250 mL of acetate buffer (0.25 M , pH = 5) with the addition of 20 mL of NaOH (2 M) in a 500 mL three-necked round-bottom amber flask equipped with a magnetic stirrer at 25°C . Constant oxygen concentration was kept by an Elite 800 air pump (Hagen Inc, Canada) and monitored by an Apliens ez-DO sensor (Applikon, USA). Then, LTV was added (26.5 U), and the reaction was stirred allowed to stir at 25°C for 24 h . Reaction contents were precipitated dropwise into 2 L of cold ethanol (5°C) under stirring, vacuum filtered

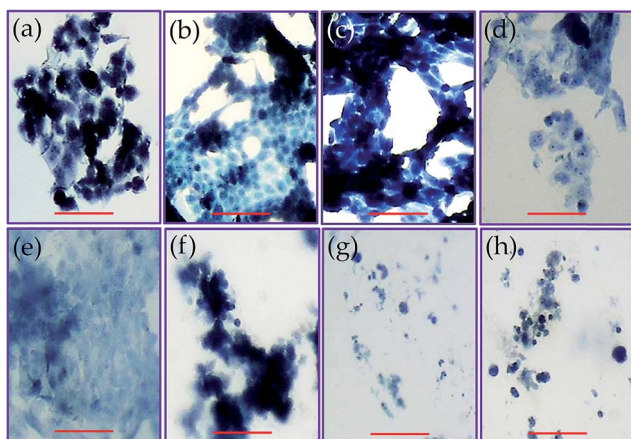


Fig. 9 Images of cell proliferation on films of PGAL-co-CMC. Vero cells (epithelial-like cells) on the CMC film or control (a), and films of entry 3 (b), entry 6 (c), and entry 9 (d). Epithelial-like cells on (entry 9) films: MDCK cells (e), and SIAT cells (f). Fibroblast-like cells on the films (entry 9) films: Cos-7 cells (g), and Cos-1 cells (h). Cells were stained with trypan-blue and observed by optical microscopy (scale bar = $20 \mu\text{m}$).

(0.45 μm) and dried in Stable temp Cole Palmer (USA) vacuum oven connected to a Vacuubrand PC3 RZ 2.5 system at 10×10^{-4} mbar at 50 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h to give PGAL as powder in 96% yield.

Cross-linking of PGAL with CMC using CA

In a typical experiment; CMC (1 g) was dissolved in 50 mL of water at 80 $^{\circ}\text{C}$ under stirring in a 100 mL round-bottom flask. Then, experiments were conducted with different amounts of PGAL; 5, 10 and 15 wt% with respect to CMC. Then, 6.5×10^{-3} mol (1.25 g) of CA and 30 mg of monobasic sodium phosphate were added to the stirred solution and allowed to react for 2 h at 80 $^{\circ}\text{C}$. Gly was added in different proportions of 2, 3 and 4 vol% (wet basis) and stirred at 80 $^{\circ}\text{C}$ for further 15 min. Reaction contents were poured into polyethylene Petri dishes (25 mL per sample) and dried at room temperature until complete evaporation of the solvent. Films were removed from the Petri dishes and neutralized to remove the excess of CA before cell viability studies.

Chemical characterizations

$^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded in a Varian MR-400 spectrometer in D_2O . FT-IR spectra of PGAL and PGAL-co-CMC films were acquired in a Perkin-Elmer ATR-FTIR Spectrum 400 instrument. Size exclusion chromatography (SEC) measurements were conducted in an Agilent 1210 series (USA) liquid chromatography appliance equipped with an RID detector and a Ultrahydrogel-500 (7.8 \times 300 mm, Waters, USA) column eluted with deionized water containing LiCl (0.1 M) mobile phase at 0.8 mL min^{-1} and 30 $^{\circ}\text{C}$. Standard narrow molecular weight polyethylene glycol (PEG) was used for calibration for PGAL. Pululan standards were used for CMC. Samples were dissolved in the mobile phase (1 mg mL^{-1}) and filtered (0.45 μm) before injection in the chromatographer. Solid state EPRs for PGAL and PGAL-CMC films were conducted in a Bruker EPR Elexsys E500 spectroscope with PGAL (100 mg) or sections of PGAL-co-CMC films placed in a quartz tube a room temperature in the 80–4080 G range of magnetic field and 9.8×10^9 Hz microwave frequency.

Cross-linking density

Samples were allowed to swell in deionized water at room temperature and the weight change was monitored until swelling equilibrium volumes (V_s) after 48 h by displacement of pure toluene and measured in a pycnometer (Brand, Germany) using eqn (1).²⁷

$$V_s = \frac{W_{\text{mt}} - W_t}{\rho_t} \quad (1)$$

where W_{mt} is the weight of the swollen matrix plus the weight of the pycnometer filled with toluene of density ρ_t and W_t is the weight of the pycnometer once the toluene was displaced by the sample.

Then, equilibrium swelling ratio (Q_m) was determined by eqn (2).

$$Q_m = \frac{V_s}{V_p} = \frac{V_s \rho_p}{W_p} = \frac{1}{v_{2m}} \quad (2)$$

where V_p is the unswollen matrix polymer volume, W_p and ρ_p are the anhydrous weight and density of the matrix polymer, and v_{2m} is the volume fraction of the matrix polymer at equilibrium swelling.

The Flory–Huggins swelling equation for ionic polymer was adapted for isotropic equilibrium swelling of an ionic or amorphous crosslinked polymer hydrogel, thus adjusting for crosslinked polymer in solution with eqn (3).

$$\frac{v_e}{V_o} = \frac{V_1 \Delta c_j - [\ln(1 - v_{2m}) + v_{2m} + X_1 v_{2m}^2]}{V_1 v_{2o} [(v_{2m}/v_{2o})^{1/3} - (v_{2m}/2v_{2o})]} \quad (3)$$

where v_e/V_o represents the concentration of crosslinked active chains designated as cross-linking degree. Δc_j is the concentration difference of mobile ions inside and outside the swollen matrix, V_1 is the molar volume of the solvent, X_1 is the Flory–Huggins polymer–solvent interaction parameter (dimensionless) and v_{2o} is the polymer volume fraction at network formation, *i.e.* at cross-linking in solution. Cross-linking degree was calculated with, $X_1 = 0.495$, $V_1 = 18 \text{ mL mol}^{-1}$, experimental values of v_{2m} , estimated 0.1 for v_{2o} and the approximated values of Δc_j around $0.7 \times 10^{-5} \text{ mol mL}^{-1}$.

Mechanical analyses of PGAL–CMC films

All mechanical analyses were conducted and processed as specified in the American Society for Testing Materials Methods (ASTM).³⁴ Films were preconditioned before analyses by placing them in a humidity-controlled chamber according to ASTM D618 method ($50 \pm 5\%$ RH and $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) for 24 h. Then, the thickness of films was measured with a Cole-Parmer 08204-80 micrometer at five different and random points (4 at the perimeter and one in the centre). Films were subjected to tensile, and puncture tests using a SINTECH 1/S (MTS, USA) with a load cell of 100 N. Tensile test was performed at room temperature following the ASTM D882-97 standard. In a typical experiment; films were cut into samples of 1 cm wide by 8 cm long and clamped in the jaws to a length of 5 cm. Samples were assessed at an extension rate of 150 mm min^{-1} to record the material's resistance to breaking. All analyses were conducted by quintuplicate for each formulation. Fracture force to puncture was determined according to the method described by Gontard *et al.* in 2003,²⁸ which specifies an adjustment for polysaccharide-base matrices with the use of Gly as the plasticizer. In a typical experiment; the preconditioned films were cut into circles of 10 cm in diameter, attached to a metal ring and subjected to the force of a puncture in an area of 1.3 cm diameter at a descent rate of 50 mm min^{-1} . Samples were analysed by quintuplicate for each formulation. Results reflect the average of 5 replicates ($n = 5$ for each experiment). Control experiments were identically carried out without the addition of PGAL.

Water vapour permeability and contact angle measurements

Water vapour permeability (WVP) was determined gravimetrically following the ASTM E96-00 standard, upon the

transmission coefficient of water vapour by monitoring the weight increase in time relative to moisture passing through the film. Films were cut and placed in pre-conditioned cells which were filled with anhydrous calcium chloride (previously dried at 200 °C to ensure 0% RH) leaving an air gap of 0.5 cm on its surface. Films were attached to an acrylic ring using four screws placed symmetrically and a layer of silicone to maintain air tightness. After placing the film, the initial weight was recorded and placed in a humidity-controlled chamber (50% RH and 22 °C). The humidity difference between the inside of the cell and the chamber provided the driving force for the vapour to pass through the film toward the desiccant. Cells were removed every 24 h to record the weight gain in an analytical balance (Ohaus Model GA200, Germany) with a precision of 0.0001 g for three months. Analyses were done by quintuplicate for each formulation and data were analysed according to the ASTM standard and using a correction for hydrophilic materials (e.g. polysaccharides).³⁰ Contact angles were measured at room temperature with sessile drops using an OCA-15 plus Contact Angle Microscope (Dataphysics, USA) and SCA20 software. Contact angle values of the right and left sides of distilled water drops were measured and averaged. Measurements were performed 5 s after the drop (1 µL) was deposited on the sample surface. All data were an average of ten measurements on different surface locations.

Hydrolytic degradation of films

Polymer film sections (1 × 1 cm²) were employed for the different degradation studies. *In vitro* hydrolytic degradation assays were carried in universal buffers at pH 3, 7 and 10 at 37 °C and 70 °C.³² Samples were kept under orbital shaking in bottles filled with 5 mL of the degradation medium and sodium azide (0.03 wt%) to prevent microbial growth for selected exposure times. Then, samples were thoroughly rinsed with distilled water, dried to constant weight under vacuum and stored over P₄O₁₀ before analysis. Degradation studies were performed in triplicate and the given data corresponded to the average values. Weight retention (W_r) of the specimens was determined by the percentage ratio of weight after degradation (W_d) to initial weight before degradation (W_0) according to eqn (4).

$$W_r = \frac{W_d}{W_0} \times 100 \quad (4)$$

Thermal characterizations

Calorimetric data were recorded by differential scanning calorimetry (DSC) using a TA Instrument Q100 series equipped with a refrigerated cooling system (RCS) operating from -90 to 550 °C. Experiments were performed under a flow of dry nitrogen with a sample of ≈ 5 mg. The instrument was calibrated for temperature and heat of fusion using an indium standard. Heating and cooling runs were carried out at a rate of 20 °C min⁻¹ and 10 °C min⁻¹, respectively. Thermal degradation was studied at a heating rate of 20 °C min⁻¹ in a Q50 Thermogravimetric Analyzer (TGA) of TA Instruments with ranged test temperatures from 0 to 600 °C.

Antimicrobial tests

E. coli, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *E. faecalis* bacteria strains (CECT, Valencia, Spain) were selected to evaluate the antimicrobial effect of PGAL and PGAL-co-CMC films. Strains were previously grown aerobically to exponential phase in broth culture (5 g L⁻¹ beef extract, 5 g L⁻¹ NaCl, 10 g L⁻¹ peptone, and pH 7.2). Growth experiments were performed in sterile Eppendorf microtubes. 1 mL of different concentrations of PGAL prepared in culture medium was added into each microtube. Then, 0.1 mL of broth culture containing 10³ CFU was seeded into the microtubes. Cultures were incubated at 37 °C and agitated at 80 rpm. Aliquots of 50 µL were taken at pre-determined time intervals for absorbance measurement at 650 nm in a microplate reader (Biochrom Ltd., UK). Turbidity was directly related to bacterial growth. All assays were conducted in six replicates and the values averaged. Regarding the qualitative method, the culture medium was prepared with LB agar and sterilized at 121 °C for 30 min in an autoclave. Plates were filled with 15 mL of medium and kept at rest to solidify the medium at room temperature. Agar diffusion plate were seeded with 10⁴ UFC mL⁻¹ of each bacterium separately and using a nylon swab, then the 1 × 1 cm² samples of PGAL-co-CMC films were placed onto agar surface. A commercial gentamicin (GM) disc was used as a positive control. Inhibition halos images were taken after incubation of the plates for 24 h at 37 °C.

In vitro cytotoxicity and cell viabilities

Vero, PC-3, PNT2, MDCK, SIAT, Cos-7 and Cos-1 cells (ATCC, USA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, and 2 mM of L-glutamine at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air. Culture medium was changed every two days and, for subculture, cell monolayers were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and detached by incubation with trypsin EDTA (0.25%) at 37 °C for 2–5 min. Cell concentration was determined by counting the number of cells with a Neubauer chamber and employing 4% trypan blue as a dye vital. Detached cells with viability ≥ 95% were used for cell culture assays. To determine the cytotoxic concentration (LD₅₀) of PGAL, the viability and cell death (mortality) were determined by different concentrations of PGAL prepared by dilution in culture medium. PGAL cytotoxicity was determined from 200 µL aliquots containing 10⁴ cells that were seeded in each well in a 96-wells culture plate and cultured for 24 h to allow cell attachment to the plate. Afterward, the medium was aspirated and new samples were prepared in half dilution by adding fresh culture medium. Cellular viability was evaluated after another 24 h of incubation and determined by the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium; 5 mg mL⁻¹) and then, the relative viability was calculated for each sample as the percentage quotient between the viability of the sample and the control (medium without PGAL). Cytotoxicity was evaluated using five replicates and the results were averaged and graphically represented. For the proliferation assays on the PGAL-co-CMC films, the procedure was as follows; samples of 1 × 1 cm² of the films

were sterilized by exposure to UV light for 15 min. Samples were then adhered using a small drop of silicone (Silbione® MED ADH 4300 TRV, Bluestar Silicones France SAS, Lyon, France) in the wells of a 24-well culture dish. Then, 1 mL of culture medium was added and the samples were maintained for 24 h under culture conditions to ensure adequate rehydration of the films. Medium was aspirated and the samples washed two times with sterile PBS. Cells were seeded by depositing an aliquot of 100 µL containing 2×10^4 cells on the surface of the samples (50 mg mL^{-1}). The cultures were maintained for 96 h to allow cell growth, and the media were renewed every two days. Finally, cell viability was determined by the MTT assay. Each sample was evaluated using five replicates and the results were averaged and graphically represented. To obtain representative images from proliferation assays, the samples were fixed overnight with formaldehyde 2.5% in PBS at 4 °C, and then washed five times with PBS. Samples were stained with 4% trypan-blue and the excess of dye was removed by aqueous washings. Samples were placed on a slide and mounted with a drop of DPX, then covered with a cover slip and dried overnight prior to analyses in the optical microscope.

Statistical analysis

Values were averaged and shown in tables and graphs, together with their respective standard deviations. Statistical analysis was performed by ANOVA test to compare the means of all groups, and then Tukey's test was applied to determine a statistically significant difference between two groups. The test confidence level was set at 95% ($p < 0.05$) (OriginPro software, Microcal Corp., USA).

Acknowledgements

We thank CONACyT for scholarship (ARM) and funding by project SEP-BASICA 165757. We also like to thank DGAPA PAPIIT for funding project 200115.

Notes and references

- 1 R. J. Soto, J. R. Hall, M. D. Brown, J. B. Taylor and M. H. Schoenfish, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 276–299.
- 2 K. Miki, A. Kimura, T. Inoue, H. Matsuoka, H. Harada, M. Hiraoka and K. Ohe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2015, **88**, 792–803.
- 3 Y. Ramota, M. Haim-Zadab, A. J. Dombb and A. Nyska, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2016, **107**, 153–162.
- 4 K. Ariga, K. Minami, M. Ebara and J. Nakanishi, *Polym. J.*, 2016, **48**, 371–389.
- 5 Y. Chujo and K. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2015, **88**, 518–521.
- 6 *Handbook of Bioplastics and Biocomposites Engineering Applications*, ed. S. Pilla, John Wiley & Sons, 2011, vol. 81.
- 7 A. Espadín, N. Vázquez, A. Tecante, L. T. Dios, M. Gimeno, C. Velasquillo and K. Shirai, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2014, **131**, 40252.
- 8 V. Coma, I. Sebti, P. Pardon, F. H. Pichavant and A. Deschamps, *Carbohydr. Polym.*, 2003, **51**, 265–271.
- 9 M. P. Adinugraha and D. W. Marseno, *Carbohydr. Polym.*, 2005, **62**, 164–169.
- 10 H. Kang, R. Liu and Y. Huang, *Polymer*, 2015, **70**, A1–A16.
- 11 P. G. Pietta, *J. Nat. Prod.*, 2000, **63**, 1035–1042.
- 12 O. S. Nimmi and P. George, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2012, **4**, 505–510.
- 13 S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus and L. Pouysegou, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 586–621.
- 14 E. Llorens, L. J. del Valle, A. Díaz, M. T. Casas and J. Puiggali, *Macromol. Res.*, 2013, **21**, 775–787.
- 15 E. Llorens, L. J. del Valle and J. Puiggali, *Macromol. Res.*, 2014, **22**, 388–396.
- 16 Y. Zheng, W. B. Song and L. J. Xuan, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 10834–10843.
- 17 T. Oguchi, S. I. Tawaki, H. Uyama and K. Kobayashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2000, **73**, 1389–1396.
- 18 E. I. Solomon, U. M. Sundaram and T. E. Machonkin, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2563–2606.
- 19 M. Jacobsson, J. Malmberg and U. Ellervik, *Carbohydr. Res.*, 2006, **341**, 1266–1281.
- 20 L. Xu, T. Qi, L. Xu, L. Lu and M. Xiao, *J. Carbohydr. Chem.*, 2016, **35**, 1–23.
- 21 H. Uyama, H. Kurioka, I. Kaneko and S. Kobayashi, *Chem. Lett.*, 1994, **3**, 423–426.
- 22 S. I. Shoda, H. Uyama, J. Kadokawa, S. Kimura and S. Kobayashi, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 2307–2413.
- 23 J. López, J. M. Hernández-Alcántara, P. Roquero, C. Montiel, K. Shirai, M. Gimeno and E. Bárzana, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2013, **97**, 100–105.
- 24 D. Alonso, M. Gimeno, R. Olayo, H. Vázquez-Torres, J. D. Sepúlveda-Sánchez and K. Shirai, *Carbohydr. Polym.*, 2009, **77**, 536–543.
- 25 M. A. Hernández-Valdepeña, J. Pedraza-Chaverri, I. Gracia-Mora, R. Hernández-Castro, F. Sánchez-Bartez, J. Nieto-Sotelo, C. Montiel, K. Shirai and M. Gimeno, *Food Chem.*, 2016, **199**, 485–491.
- 26 D. Klemm, B. Heublein, H. P. Fink and A. Bohn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 3358–3393.
- 27 Q. Xing, K. Yates, C. Vogt, Z. Qian, M. C. Frost and F. Zhao, *Sci. Rep.*, 2014, **4**(4706), 1–10.
- 28 N. Gontard, S. Guilbert and J. L. Cuq, *J. Food Sci.*, 1993, **58**, 206–211; ASTM, *Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*, American Society for Testing and Materials, 2002.
- 29 P. G. Agache, C. Monneur, J. L. Leveque and J. De Rigal, *Arch. Dermatol. Res.*, 1980, **269**, 221–232.
- 30 A. Gennadios, C. L. Weller and C. H. Gooding, *J. Food Eng.*, 1994, **21**, 395–409.
- 31 T. Theorell and E. Stenhagen, *Biochem. Z.*, 1939, **299**, 416–419.
- 32 Y. Márquez, J. C. Martínez, P. Turon, L. Franco and J. Puiggali, *Fibers*, 2015, **3**, 348–372.
- 33 I. Dogsa, M. Tomsic, J. Orehek, E. Benigar, A. Jamnik and D. Stopar, *Carbohydr. Polym.*, 2014, **111**, 492–504.
- 34 American Society for Testing and Materials, *Standard test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*, 2002.



Poly(gallic acid)-coated polycaprolactone inhibits oxidative stress in epithelial cells

Alejandra Romero-Montero^a, Luis J. del Valle^b, Jordi Puiggali^{b,c}, Carmina Montiel^a, Roeb García-Arrazola^a, Miquel Gimeno^{a,*}

^a Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 CDMX, Mexico

^b Chemical Engineering Department, Escola d'Enginyeria de Barcelona Est-EEBE, c/Eduard Maristany 10-14, Barcelona, Spain

^c Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology, Baldri Reixac 10-12, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Poly(gallic acid)
Polyphenol
Antioxidant
Radical oxygen species

ABSTRACT

Enzymatic mediated poly (gallic acid) (PGAL), a stable multiradical polyanion with helicoidal secondary structure and high antioxidant capacity, was successfully grafted to poly(ϵ -caprolactone) (PCL) using UV-photo induction. PCL films were prepared with several levels of roughness and subsequently grafted with PGAL (PCL-g-PGAL). The results on the full characterization of the produced materials by mechanical tests, surface morphology, and topography, thermal and crystallographic analyses, as well as wettability and cell protection activity against oxidative stress, were adequate for tissue regeneration. The in vitro biocompatibility was then assessed with epithelial-like cells showing excellent adhesion and proliferation onto the PCL-g-PGAL films, most importantly, PCL-g-PGAL displayed a good ability to protect cell cultures on their surface against reactive oxygen species. These biomaterials can consequently be considered as novel biocompatible and antioxidant films with high-responsiveness for biomedical or tissue engineering applications.

1. Introduction

The oxidative stress is an essential factor of the tissue response to implanted biomaterials, often limiting their biocompatibility and performance [1]. This is a pathophysiological condition that imbalances the excess of oxidant production to the antioxidant mechanism from the organism [2]. Generally, the implant of a biomaterial or scaffold triggers a certain degree of the inflammatory response and subsequent immune response. Therefore, the reduction of this oxidative stress is critical to tissue engineering because if this response is exacerbated due to chronic inflammation it might compromise the functionality of the biomaterial [3,4].

Reactive oxygen species (ROS) are produced at the start of inflammation [5,6]. Specifically, the proteins and coagulation factors absorbed at the interface lead to the attraction of leukocytes that generate superoxide (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) against external materials [7,8]. Therein, the excessive amounts of these free radicals promote the imbalance of the tissue redox state at the implant site, followed by the cascade of inflammatory and immune responses, which might result in the formation of scars, loss of material functionalities or even the rejection [9,10].

The use of natural and synthetic drugs are generally therapeutic

tools against inflammation caused by implants. The actual applications use chalcones, vitamins, phenolic or peptidic compounds, among others [11]. Nevertheless, fighting oxidative stress by these drugs might be challenging owing to the lack of bioavailability, high costs, and the occurrence of side effects [12]. Additionally, the treatments require to ingest high amounts to get desired responses. Alternatively, the use of natural radical scavenging compounds, mainly polyphenols, is among the notorious pro-health approaches and a topic of research in recent years owing to their biocompatibility and attractive biological activities with low side effects [13]. These phytochemicals can exhibit antioxidant capacity besides antiallergic, antibacterial, anti-inflammatory [14], antitumor, anti-diabetic and antiviral activities [15,16]. Regarding the inflammation, they can stabilize free radicals by donating a hydrogen atom or an electron and even by rapidly oxidizing themselves [17]. However, many of these bioactive compounds are not readily available or they easily degrade to non-functional derivatives.

To expand the biomedical applications of these compounds, antioxidant polyphenol-functionalized polymeric biomaterials are extensively described in the literature [18,19]. A variety of polyphenol-based biomaterials across different length scales are attained with desired properties using modular and straightforward synthesis routes. These approaches describe the polyphenols as building blocks as they

* Corresponding author.

E-mail address: mgimeno@unam.mx (M. Gimeno).

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111154>

Received 10 March 2020; Received in revised form 28 May 2020; Accepted 2 June 2020

Available online 05 June 2020

0928-4931/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

are easy to interact with a wide range of polymers, including synthetic polymers and polypeptides, as well as the natural polysaccharides, proteins, and nucleic acids, forming polymer-phenol-based complexes, capsules, particles and hydrogels [20]. These compounds containing catechol and/or galloyl groups allow covalent and non-covalent interactions in the assembly of polyphenol-based materials [21]. Of to note that PCL blends or grafted with polyphenols, including tannin derivatives and catechin, proved successful in wound healing and for tissue engineering studies [19,22,23]. The anchoring of polyphenols in biocompatible polymers is therefore encouraging; despite many of these approaches use cytotoxic agents such as formaldehyde or SnOct₂ catalysts to produce the materials.

In this work, we design a stable and natural polyphenol-derived material for tissue engineering with antioxidant capacity per se to avoid the generation of free radicals when it is implanted and to decrease also the requirement for additional anti-inflammatory drugs. Among the recent reports in new polymer syntheses, for biomedical applications, the enzyme-mediated poly(gallic acid) (PGAL) (ca 7000 Da), which is a stable multiradical polyanion with a helicoidal secondary structure [24], shows interesting characteristics. For example, high solubility in physiological media with null cytotoxicity, radical scavenging capacity, electric semi-conductivity, and high thermal and photostabilities [25,26]. This polymer is produced in mild process conditions throughout the laccase-mediated polymerization of the naturally abundant gallic acid [27,28]. We previously studied PGAL-based materials for the proliferation of epithelial cells and this polymer individually showed cytoprotection of human fibroblast under exposure to UV-irradiation [29]. The present study demonstrates that the grafting of PGAL onto surface-activated enzymatic polycaprolactone (PCL) inhibits the ROS generated from MDCK and Vero epithelial cells.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.2. Synthetic procedures

Laccase from *Trametes versicolor* (LTV, specific enzyme activity 2.35 U/g, lyophilized protein stored at -20°C) was purchased from Fluka (USA). Immobilized lipase B from *Candida antarctica* (CALB) (Lewatit VPOC1600, Lanxess, USA), supported on macroporous poly(methacrylic divinylbenzene) spherical beads (1 mm), specific enzyme activity 5000 U/g stored at 5°C was purchased from C-Lecta (Germany). Gallic acid (GA), ϵ -caprolactone (CL), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), glycerol (Gly), and 1,2-propylene carbonate were supplied by Sigma-Aldrich. Ethyl alcohol (technical grade, > 99%) was supplied by Química Barsa S.A. (CV, Mexico). Ethylene glycol was purchased from Merck (Madrid, Spain), and Formamide from Panreac (Spain). Phosphate buffered saline (PBS) was prepared by dissolving reagent grade chemicals, NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄·3H₂O, MgCl₂·H₂O, CaCl₂, and Na₂SO₄, in deionized water, buffered at pH = 7.25. The 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R-134a/Norflurane Dupont, SUVA, USA) cylinder (60 Kg) was supplied by Refracciones Star (Mexico) with 98% purity.

2.2.1. Enzymatic synthesis of PGAL and PCL

PGAL was produced following a previously reported procedure [27] with some modifications. A typical experiment was prepared as follows: in a 500 mL three-necked round-bottom amber flask equipped with a magnetic stirrer, 8.5 g of GA were dissolved in 250 mL of acetate buffer (0.25 M, pH = 5) with the addition of 20 mL of NaOH (2 M). Constant oxygen concentration at 6 mgL^{-1} was maintained by an Elite 800 air pump (Hagen Inc., Canada) and monitored by an Apliens ez-DO sensor (Applikon, USA). Then, LTV was added (26.5 U) and the reaction was stirred at 25°C for 24 h. Reaction contents were dropwise precipitated into 2 L of cold ethanol (5°C) under stirring. The solids were vacuum filtered ($0.45\ \mu\text{m}$) and dried in a Stabtemp vacuum oven (Cole

Palmer, USA) connected to a Vacuubrand PC3 RZ 2.5 system (10^{-4} mbar) at 50°C for 2 h. PGAL with $M_n = 6000$ Da and PDI = 1.1 was obtained as a powder on 96% yield. CALB catalyzed the production of PCL by ring-opening polymerization of CL, previously distilled over CaH₂, and following the method reported by García-Arrazola et al. (2007) [30]. In a typical experiment, CL (1.26 mol), previously distilled over CaH₂, was loaded into a 400 mL 316-st reactor equipped with a magnetic stirrer, an external ceramic heating jacket, and two thermocouples, one measuring the temperature of the jacket and the other inside the reactor. Then, the CALB beads (6000 U/mg), which were previously lyophilized to minimum water activity, were added and the reactor was pressurized with liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane medium using an ISCO syringe pump. The final pressure was 40 bar and the reactor was maintained at a constant temperature of 65°C . Depressurization to atmospheric pressure at the end of the polymerization (48 h) proceeded easily after cooling the reactor in a conventional freezer (-5°C) for a period no longer than 30 min. The enzyme was separated by filtration after dissolving the reactants and products in chloroform, and the polymers were purified by precipitation in cold methanol. The reaction was carried out at 25 bar and 65°C for 24 h and the product was removed from the reactor with chloroform. The biocatalyst was separated by filtration and then precipitated in cold methanol (1/10 v/v) to obtain PCL with $M_n = 38,519$ Da (PDI = 2.1), $T_m = 55.6^{\circ}\text{C}$, DTGA peak = 475°C and percentage of crystallinity = 54.1%.

2.2.2. Preparation of PCL films

Two materials with different surface roughness (named R1 and R2) were obtained using glass templates whose surface was previously printed by the acid etching technique. This treatment was performed with a concentrated phosphoric acid gel (37%). The PCL films were prepared by melting the polymer between the molds to have a mirror topography. Then, a homogeneous layer of pendant hydroxyl moieties on the PCL surface was produced by immersion of PCL films in an alkaline solution (pH = 12) for 24 h.

2.2.3. Synthesis of the grafted copolymer PCL-g-PGAL

PGAL was grafted to the surface of PCL films by forming ester groups through the hydroxyl groups placed on the hydrolyzed surfaces. To this end 0.6 g of PCL were introduced in a PGAL solution (0.28 mM) at pH = 3 (pH adjusted with citric acid) and exposed during several times (0, 4, 8, 12 and 24 h) to UV-irradiation ($I = 1.35\text{ mW cm}^{-2}$) [31] during 24 h. After grafting, films were washed with water and ethanol to remove any residual PGAL and other non-reacted compounds. Highest grafting was obtained from a 24 h-irradiated sample.

2.2.4. Chemical characterizations

FT-IR spectra were acquired on a Perkin-Elmer (USA) ATR-FTIR Spectrum 400 instrument. Size exclusion chromatography (SEC) measurements were conducted in an Agilent 1210 series (USA) liquid chromatograph equipped with a RID detector. Narrow molecular weight polyethyleneglycol (PEG) standards in deionized water (Millipore, MilliQ) and polystyrene (PS) standards in THF (HPLC grade Merck) were used for calibration of PGAL and PCL, respectively. Samples were dissolved in the mobile phase (1 mg/mL) and filtered ($0.45\ \mu\text{m}$) before injection in the chromatographer.

2.2.5. Radical scavenging studies of PCL-g-PGAL

Inhibition of the DPPH radical by PCL-g-PGAL samples was conducted in a Genesys 10S UV-vis spectrophotometer (Thermo Scientific) at 517 nm. Stock solutions of PCL-g-PGAL (25–500 ppm) were diluted in chloroform and then 100 μL aliquots of each dilution were added into assay tubes containing 2.9 mL of DPPH solution (6.34×10^{-5} M). Samples were incubated for 30 min at room temperature prior to UV analyses. The relative percentage of DPPH radical scavenging activity (RSA) was estimated according to Eq. (1):

$$\text{RSA} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100$$

where A_s and A_0 are the absorbances of analysis with and without antioxidant, respectively. RSA determination was carried in triplicate. Experimental data were fitted using the software OriginPro 8.0. IC₅₀ value was the concentration of PCL-g-PGAL that inhibits 50% of the RSA of DPPH.

2.2.6. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

Analyses were performed in a SPECS system equipped with a high-intensity twin-anode X-ray source XR50 of Mg/Al (1253 eV/1487 eV) operating at 150 W, placed perpendicular to the analyzer axis, and using a Phoibos 150 MCD-9 XP detector. The X-ray spot size was 650 µm. The pass energy was set to 25 and 0.1 eV for the survey and the narrow scans, respectively. Charge compensation was achieved with a combination of electron and argon ion flood guns. The energy and emission current of the electrons were 4 eV and 0.35 mA, respectively. For the argon gun, the energy and the emission current were 0 eV and 0.1 mA, respectively. The spectra were recorded with a pass energy of 25 eV in 0.1 eV steps at a pressure below 6×10^{-9} mbar. These standard conditions of charge compensation resulted in a negative but perfectly uniform static charge. The C 1s peak was used as an internal reference with a binding energy of 284.8 eV. High-resolution XPS spectra were acquired by Gaussian–Lorentzian curve fitting after s-shape background subtraction. The surface composition was determined using the manufacturer's sensitivity factors.

2.2.7. Contact angle measurements

Static contact angle measurements with the sessile drop method were recorded and analyzed at room temperature on OCA-15EC equipment from DataPhysics Instruments GmbH (Filderstadt, Germany) with SCA20 software (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany). The solvents considered for this study, were deionized water, 1,2-propylene carbonate, PBS, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol and formamide. Contact angle values of the right and left sides of the solvents drop were measurement and averaged. Measurements were performed 5 s after the drop (1 µL) was deposited on the sample surface. All data were an average of ten measurements on different surface locations.

2.2.8. Contact profilometry measurements

The surface roughness (R_a) of the PCL and PCL-g-PGAL films was determined using a stylus profilometer (Veeco, Plainview, NY, USA). Imaging of the samples was conducted using the following optimized settings: tip radius = 2.5 µm; stylus force = 1.5 mg; scan length = 1 µm; speed = 1.5 nm/s.

2.2.9. Surface morphology

Scanning electron microscopy (SEM) studies were carried out using a Focused Ion Beam Zeiss Neon40 microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) operating at 5 kV. Samples of PCL and PCL-g-PGAL films were deposited on pin stubs of aluminum, and sputter-coated with a thin layer of carbon.

2.2.10. DSC and XRD measurements

Calorimetric data were obtained by differential scanning calorimetry (DSC) with a TA Instruments Q100 series equipped with a refrigeration cooling system (RCS) operating from -90 °C to 220 °C. Experiments were conducted under a flow of dry nitrogen with a sample weight of approximately 5 mg and calibration was performed with indium. Heating and cooling runs were performed at a rate of 20 °C/min, respectively.

WAXD experiments were carried out at the NCD beamline (BL11) of the Alba synchrotron facility (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain).

The beam was monochromatized to a wavelength of 0.100 nm. Films samples were confined between Kapton films. WAXD and SAXS profiles were acquired simultaneously with two linear position-sensitive detectors: the SAXS detector was calibrated with different orders of diffraction from silver behenate (AgBh) whereas the WAXD detector was calibrated with diffractions of a standard of an alumina (Al₂O₃) sample. Automatically, the diffraction profiles were normalized to the beam intensity and corrected considering the empty sample background (Kapton). WAXD peaks were deconvoluted with the PeakFit v4 program by Jandel Scientific Software using the mathematical function named Gaussian-Lorentzian area. The fits were profiles using the software OriginPro 8.0.

2.2.11. Mechanical properties analysis of PCL and PCL-g-PGAL films

Mechanical properties were determined with a Zwick Z2.5/TN1S (Zwick/Roell; Ulm, Germany) testing machine in stress-strain tests carried out at a deformation rate of 10 mm/min. The load cell capacity was 100 kN. Mechanical parameters were evaluated using the test Xpert software of Zwick. The measurements were delimited to the linear part of the determination in rectangular samples ($30 \times 5 \times 0.5$ mm). The mechanical parameters were averaged from a minimum of six measurements for each sample.

2.2.12. Cell adhesion and proliferation

Vero (African green monkey, *Cercopithecus aethiops*, kidney) and MDCK (Madin-Darby canine kidney) epithelial-like cells (ATCC, USA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, and 2 mM of L-glutamine at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air. Culture medium was changed every two days and, for subculture cell monolayers were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and detached by incubation with trypsin EDTA (0.25%) at 37 °C for 2–5 min. Cell concentration was determined by counting the number of cells with a Neubauer chamber and employing 4% trypan blue as a dye vital. Detached cells with viability $\geq 95\%$ were used for cell culture assays.

For the adhesion and proliferation, assays PCL and PCL-g-PGAL films were washed with PBS and ethanol (70%) and UV-sterilized for 15 min. Samples were adhered to the wells (24-well culture plate) using a small drop of silicone (Silbione® MED ADH 4300 TRV, Bluestar Silicones France SAS, Lyon, France). The cells were seeded on the film surface by direct contact. Cell adhesion was determined after 24 h because it is an early event of cell colonization on the films while cell proliferation was determined at 7 days as an endpoint that demonstrated cell growth. Cell attachment was evaluated considering the relationship between the number of adhered cells and the cell viability (i.e. the number of cells adhered in the control, named TCPS) for each cultured well plate. The final count of cells was obtained by the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium; 5 mg/mL). Each sample was evaluated in four replicates and the results were averaged and graphically represented. To obtain images from the morphology of the cells coming from the adhesion and proliferation assays, the samples were fixed overnight with formaldehyde 2.5% in PBS at 4 °C and then washed five times with PBS. Samples were stained for fluorescence microscopy. Specifically, actin was labeled with green-fluorescent Alexa Fluor Atto-488 phalloidin dye, and the nucleus was labeled with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole). Then, the samples were observed in a confocal laser scanning microscope (LSM 900 Zeiss) and microphotographed with a camera controlled by ZEN 2.6 software (blue edition) (Carl-Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany).

2.2.13. Cell protection assay against oxidative stress

Detached MDCK and Vero cells were used with a viability $\geq 95\%$. Cytotoxic concentration (LD₅₀) of AAPH, cell viability, and cell death (mortality) were determined with different concentrations of AAPH prepared by dilution in the culture medium. AAPH cytotoxicity was

determined from 1 mL aliquots containing 5×10^4 cells that were seeded in a 24-wells culture plate for 24 h to allow attachment to the plate. Then, the medium was aspirated, and fresh culture media supplemented with several concentrations of AAPH were added. Cell viability was determined after 24 h of incubation by the MTT assay and then, the relative viability (at.%) was calculated for each sample as the ratio between the viability of the sample and the control (i.e., the medium without AAPH). Cytotoxicity was evaluated using four replicates and the results were averaged and graphically represented. The determination of the MDCK and Vero cell viabilities were followed according to the same procedure. Thus, cells were incubated for 24 h on the samples. Then, well media were replaced with a fresh medium having the corresponding concentration to determine the LD₅₀ of AAPH for each cell line. Finally, cell viability was evaluated by the MTT assay. Results were expressed in relation to those attained with samples cultured in the medium without AAPH as control.

3. Results and discussion

PCL is widely used for biomedical applications owing to its high biocompatibility, mechanical properties, and low toxicity [32]. The enzymatic production of this polymer in an organic compressed fluid solvent, as indicated in previous reports, provides a non-toxic material with suitable properties to anchor PGAL [30,33]. For this, the surface of films of the enzymatic PCL is partially hydrolyzed by the alkali treatment to have available and enough hydroxyl moieties/carboxyl moieties for the grafting [34] by UV-irradiation in acidic conditions and the scheme of the synthesis route is shown in Fig. 1.

The non-resolved ¹H NMR spectrum of PGAL, as described previously [24], precludes the determination of the molar ratio between PGAL and grafted PCL despite the spectra for copolymers show signals assigned to PCL. The CP/MAS ¹³C NMR spectrum for PCL-g-PGAL (Fig. 2) displays the typical signals associated with PCL [35] with another signal at δ (ppm) = 165.49 ppm (label b in the spectrum) that can be assigned to the carbonyl carbon of PGAL. Additionally, there are signals related to the aromatic carbons of PGAL (label c in the spectrum) at δ (ppm) = 134.3 (C-C), 127.45 (C-COO) and 126.41 (C-O), which confirms the PGAL molecular structure reported elsewhere [24].

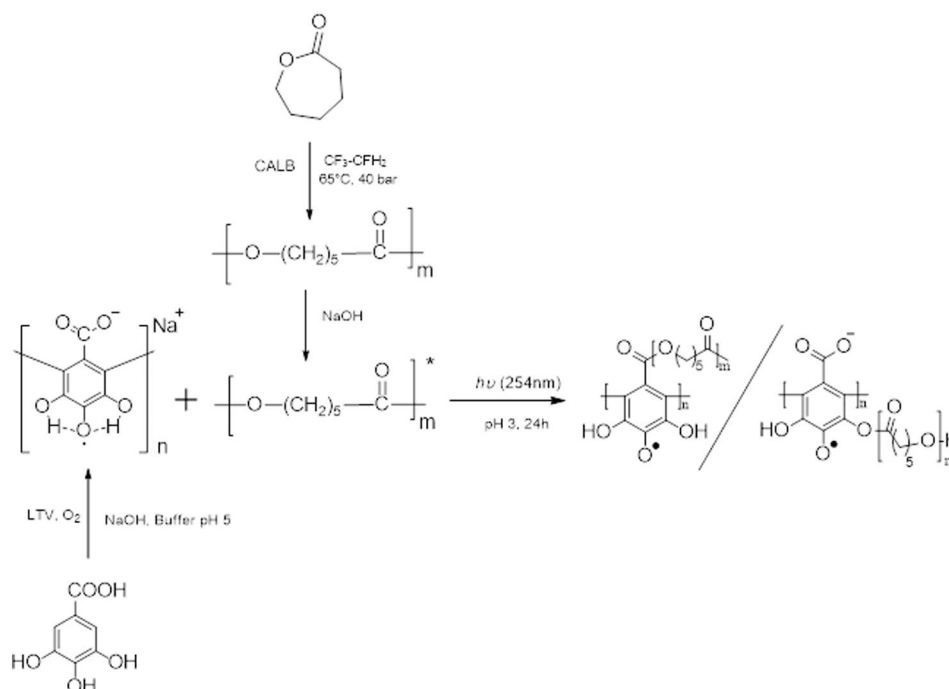


Fig. 1. Schematic representation of the synthetic route to PCL-g-PGAL.

FTIR spectra also corroborate the grafting (Fig. S1), with the absence of the bands corresponding to the stretching of COO^- at $\nu = 1580$ and 1388 cm^{-1} of PGAL. Instead, there is a band at $\nu = 1722 \text{ cm}^{-1}$ (C = O stretching) indicative of formed ester and two additional bands at $\nu = 1635$ and 1592 cm^{-1} assigned to the aromatic C = C bonds. As expected, the UV spectra (Fig. S2) show no absorption for PCL, but on the contrary absorption bands associated with $\pi\text{-}\pi^*$ transitions were detected in both PGAL and PCL-g-PGAL spectra.

The XPS spectra of PCL, PCL-OH, PGAL, and PCL-g-PGAL film surfaces are shown in Fig. 3, and the corresponding atomic composition are compared in Table 1. The basic C1s spectra of PCL corresponds to four curves with binding energies of 284.78, 286.17, 287 and 288.76 eV which are readily assigned to C-H, C-O, C=O and O-C=O carbons [36] (Fig. 3a). Similar curves were obtained for PCL-OH (Fig. 3b) due to the low degree of hydroxylation. Some residual Na from the basic treatment can be envisaged. The PGAL C1s signal consists of four components at 284.67, 286.15, 287.84, and 288.86 eV which corresponded to C=C, C-OH, C=O, and O-C=O carbons, respectively (Fig. 3c). Finally, the PCL-g-PGAL spectrum display four peaks with energies of 284.74, 286.21, 287.61, and 288.73 eV which can be assigned to C=C and C-H, C-OH, C=O, and O-C=O carbons, respectively (Fig. 3d). The increase of intensity for the peak at 288 eV demonstrates the increase of ester groups by grafting. Additionally, the Na 1s signal occurrence in PCL-g-PGAL spectrum confirms the PGAL grafting (inset, Fig. 3d). The surface concentration can be expressed by the [Na]/[C] ratio (determined from the sensitive factors-corrected Na 1s and C1s high-resolution spectral area ratio of the PCL-g-PGAL surfaces). The [Na]/[C] ratio for PCL and PCL-g-PGAL films goes from 7.5×10^{-4} to 6.55×10^{-3} owing to the polyphenol content. The determination of grafting yield follows the eq. $\text{GY} = (W_a - W_b)/A$ [34], where W_b and W_a are the weights of dry film samples before and after the reaction, respectively, and A is the film area. The grafting yield was $0.16 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$.

3.1. Topography and morphology of samples

SEM micrographs and topographic images of samples taken before and after grafting are given in Figs. 4 and 5, respectively. The surface of

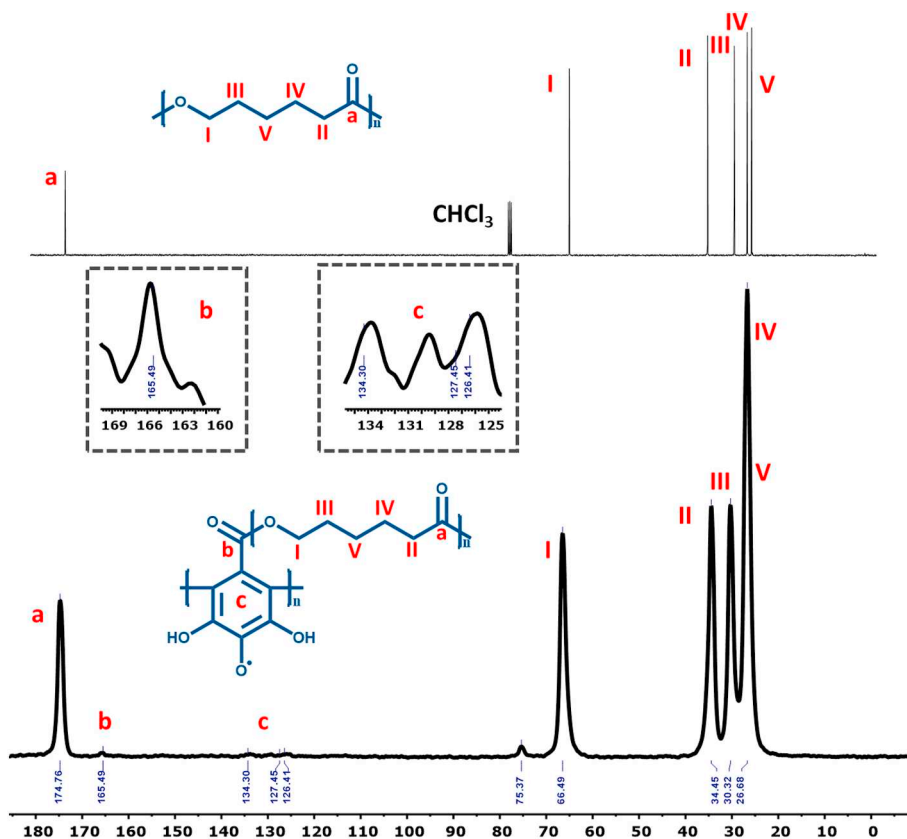


Fig. 2. Representative ^{13}C NMR (top) and CP/MAS ^{13}C NMR (bottom) spectrum of the PCL (in CDCl_3) and PCL-g-PGAL for comparison, taken at 400 MHz with a spinning frequency of 10 kHz.

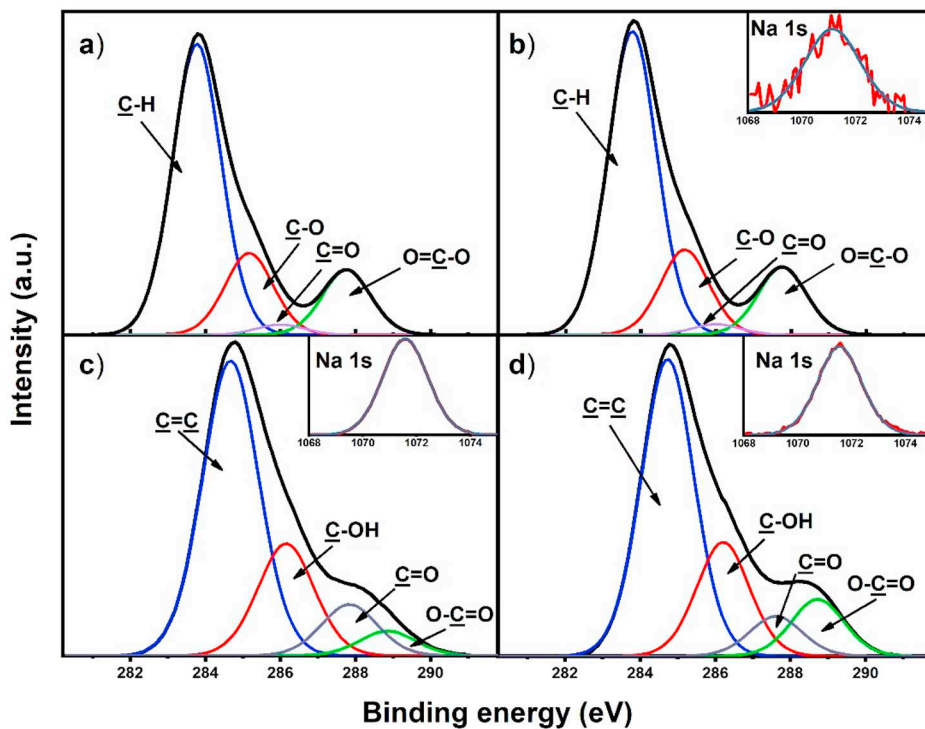


Fig. 3. High-resolution XPS spectra (C 1s) for PCL (a), PCL-OH (b), PGAL (c) and PCL-g-PGAL (d) and Na 1s spectra for PCL-OH (b-inset), PGAL (c-inset) and PCL-g-PGAL (d-inset). Peaks from deconvolution are also displayed (black line corresponds to the experimental profile and the colored lines to the deconvoluted peaks).

Table 1

Atomic percent composition (C 1s, O 1s, Na 1s) obtained by XPS for PCL, PCL-OH, PGAL, and PCL-g-PGAL.

	C 1s	O 1s	Na 1s
PCL	78.50	20.67	–
PCL-OH	77.00	20.51	0.06
PGAL	71.05	26.00	0.45
PCL-g-PGAL	69.93	26.78	0.46

PCL samples is either smooth or with two different levels of roughness (R1 and R2) depending on the glass mold where solvent casting films were prepared. The contact profilometry with the R_q index demonstrates that the PGAL grafting onto PCL films affects the roughness level, for example, the average R_q shown in Table 2 is 2.9 ± 0.24 and $4.1 \pm 0.19 \mu\text{m}$ for PCL and PCL-g-PGAL respectively ($p < 0.05$). However, R2 samples (PCL_{R2} or PCL-g-PGAL_{R2}) have a roughness level that doubles that for R1 samples (PCL_{R1} or PCL-g-PGAL_{R1}).

3.2. Crystallinity and thermal behavior

Fig. 6 shows DSC heating and cooling runs of representative samples (i.e., PCL and PCL-g-PGAL films). The first heating scan of the PCL film sample showed a clear endothermic peak at 60.3°C which is associated to its fusion. The sample grafted with PGAL had a similar melting peak (i.e. 62.2°C) but clearly higher enthalpy (i.e., 121.2 J/g with respect to 102.1 J/g), after correction by the experimental composition. Therefore, it seems that PGAL grafting facilitated the crystallization of PCL, probably because of a nucleating effect.

An exothermic peak indicative of the PCL crystallization was observed during the cooling run of PCL ($T_c = 31.1^\circ\text{C}$, $\Delta H_c = 71.5 \text{ J/g}$). However, for the grafted sample, this peak became broader (i.e., the onset temperature slightly inverted) and had a greater enthalpy (81.6 J/g) in agreement again with the indicated nucleating effect.

Comparison of second heating scans indicate a slight decrease of the melting temperature for the grafted sample (i.e., from 55.2 to 54.1°C). Nevertheless, the change seems not significant. Logically, and according to the cooling run, melting enthalpy clearly increased for the grafted sample. Degrees of crystallinity can be estimated from calorimetric data taking into account the value of 139.3 J/g that was determined for a 100% crystalline sample [37].

In order to verify the increase in crystallinity of the grafted sample, WAXD patterns were also recorded. Fig. 7 shows the WAXD profiles for two representative samples: PCL and PCL-g-PGAL. Deconvolution of the

WAXD profiles showed two amorphous halos at 0.443 and 0.373 nm and three Bragg peaks at 0.417 nm , 0.406 nm and 0.376 nm that correspond to the (110), (111) and (200) reflections of PCL [38]. The crystallinity after PGAL grafting onto the PCL film showed an increase from 52.6% to 69.8% , a results that is in full agreement with DSC observations.

3.3. Mechanical properties

The maximum tensile strength at break and Young's modulus of the different films are summarized in Table 2. It can be concluded that variation in the mechanical properties is not a result of the grafting, as there are no significant differences ($p < 0.05$) between PCL and PCL-g-PGAL films, despite the evidence that the polyphenol graft influences the roughness of the materials. Nonetheless, the surface roughness of materials at the micro and nano-structured levels must be considered regarding the mechanical properties [39]. The influence of this characteristic on the resistance of materials to stress is evident in our results. Thus, PCL and PCL-g-PGAL show a similar tensile strength resistance, 22.5 and 20.8 MPa , respectively. However, roughness modified samples are significantly less resistant to the tensile strength by decreasing these values to the $13\text{--}18 \text{ MPa}$ range. Additionally, this effect is similar for the two degrees of roughness (R1 and R2). Young modulus values show the same behavior, and specifically, PCL and PCL-g-PGAL have similar values of 2.7 and 3.1 MPa , respectively. Nevertheless, the modulus increased after grafting in agreement with the increase in the crystallinity. Rough samples (R1 and R2), however, display significantly reduced modulus with values in the $1.2\text{--}1.7 \text{ MPa}$ range (Table 2). This loss in tensile strength reduces in turn the stiffness of the films; and decreases the risk of fracture, while mechanical shearing forces can induce necrosis of surrounding tissues. Our results demonstrate that the increase in the roughness of the material, by the effect of the grafting of polyphenol and the elaboration method of material (R1 and R2), produces a decrease in the stiffness of the material; in full agreement with similar reports on biomaterials characterization [40]. In summary, the new materials are soft and flexible as preferred for biomaterials [41].

3.4. Wettability and surface energy

Contact angles (θ) determined using water drops (Table 3) indicate that PCL films are hydrophobic materials (i.e., $\theta = 90.5^\circ$) before the surface modification with PGAL. After grafting, there is a significant increase in wettability, which might be ascribed to the hygroscopic PGAL. Specifically, the contact angle decreased to 60.6° . However, the

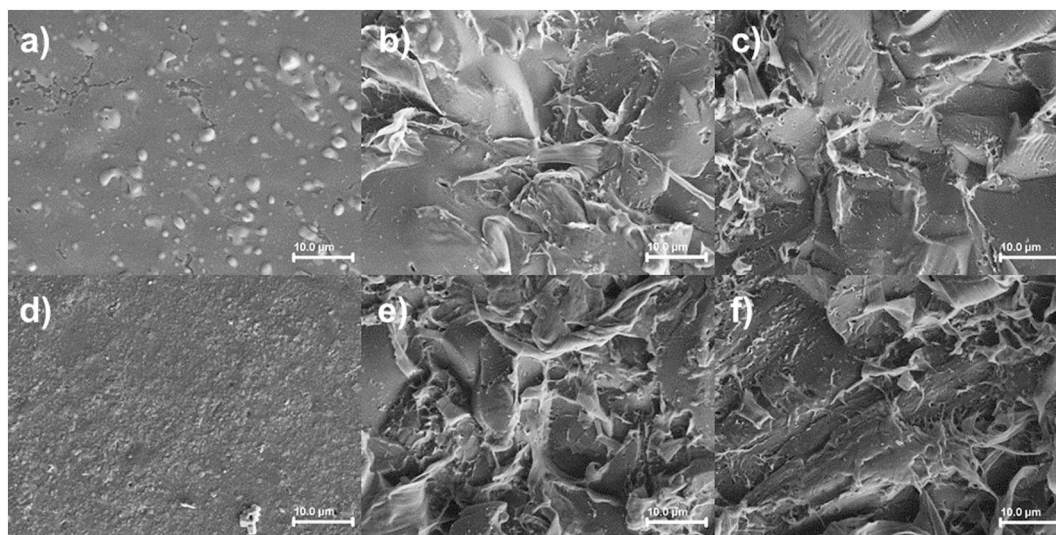


Fig. 4. SEM micrographs showing the surface morphology of PCL (a), PCL_{R1} (b), PCL_{R2} (c), PCL-g-PGAL (d), PCL-g-PGAL_{R1} (e) and PCL-g-PGAL_{R2} (f).

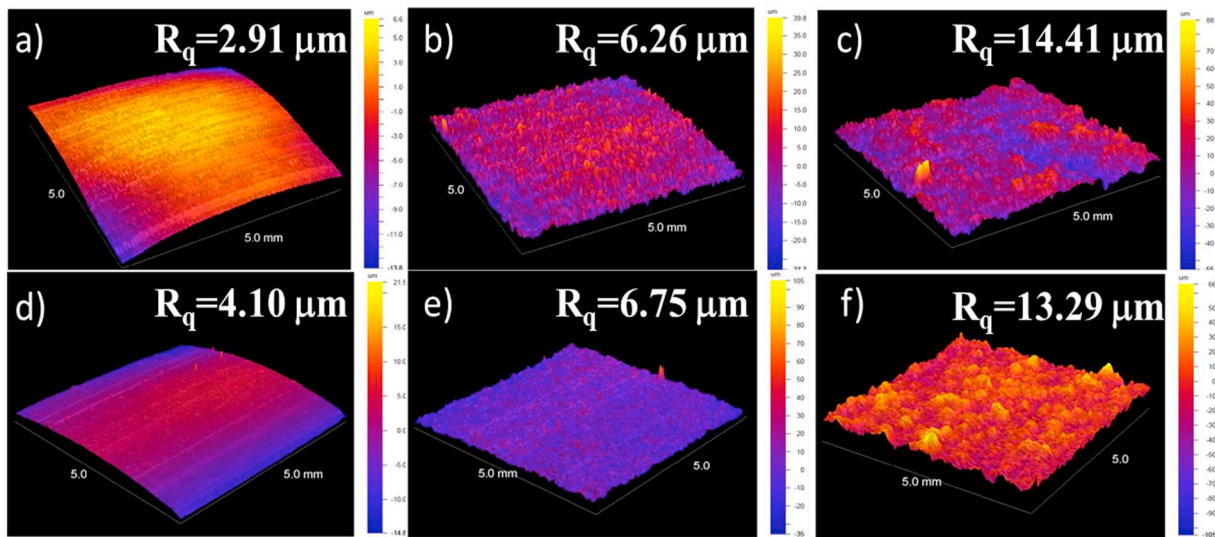


Fig. 5. 3D topographies images of PCL (a), PCL_{R1} (b), PCL_{R2} (c), PCL-g-PGAL (d), PCL-g-PGAL_{R1} (e) and PCL-g-PGAL_{R2} (f).

Table 2
Mechanical properties of films. Values are mean ± SD (n = 6).

Material	Roughness (μm)	σ_v (MPa)	Young's modulus (MPa)	Thickness (mm)	Yield Grafting (mg/cm ²)
PCL	2.9 ± 0.24	22.5 ± 1.2	2.7 ± 0.2	0.71 ± 0.02	–
PCL _{R1}	6.3 ± 0.15	13.8 ± 2.3 ^b	1.2 ± 0.1 ^b	0.62 ± 0.03	–
PCL _{R2}	14.4 ± 0.35	13.0 ± 1.1 ^b	1.2 ± 0.1 ^b	0.64 ± 0.01	–
PCL-g-PGAL	4.1 ± 0.19 ^a	20.8 ± 0.8	3.1 ± 0.2	0.65 ± 0.02	0.17 ± 0.02
PCL-g-PGAL _{R1}	6.8 ± 0.13 ^a	17.7 ± 2.0 ^b	1.7 ± 0.1 ^b	0.53 ± 0.02	0.16 ± 0.02
PCL-g-PGAL _{R2}	13.3 ± 0.22 ^a	12.8 ± 1.5 ^b	1.3 ± 0.2 ^b	0.51 ± 0.03	0.15 ± 0.01

At the 0.05 level, the population means of PGAL are not significantly different.

At the 0.05 level, the interaction between PGAL and roughness is not significant.

^a At the 0.05 level, the population means of PGAL are significantly different.

^b At the 0.05 level, the population means of roughness are significantly different.

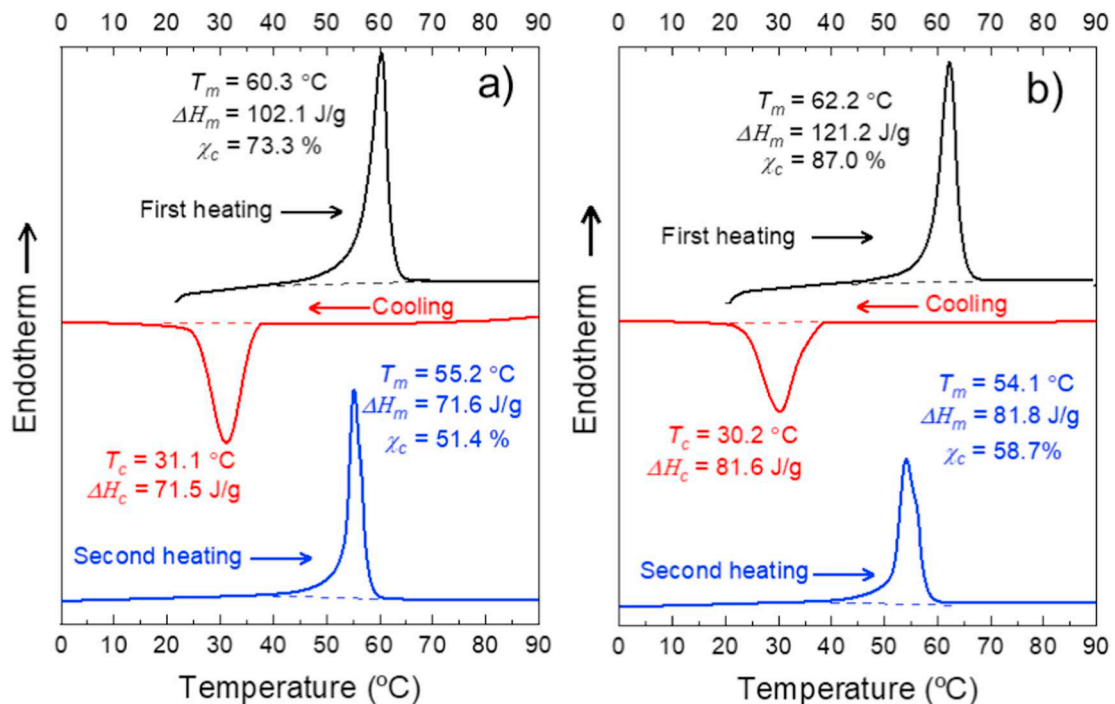


Fig. 6. DSC heating and cooling runs of PCL (a) and PCL-g-PGAL (b).

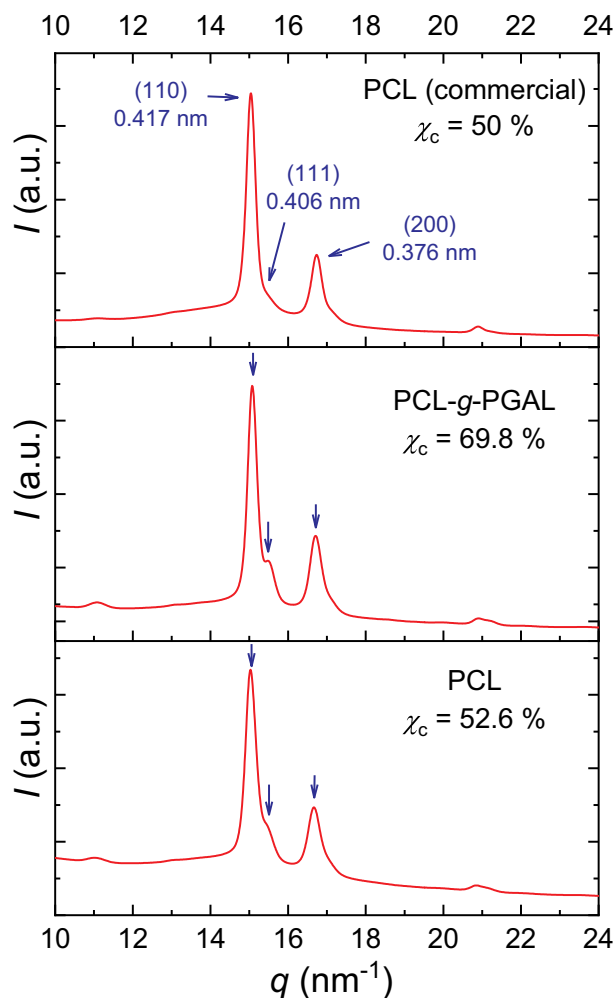


Fig. 7. Wide-angle X-ray diffraction profiles (WAXD) of PCL, PCL-g-PGAL and commercial PCL pellet ($M_w = 45,000$ g/mol) used as reference.

modification of the surface roughness produced different effects on the films. Thus, PCL_{R1} and PCL_{R2} increased their hydrophobicity with the increase in roughness (i.e., the θ values were of 95.6° and 105.8°, respectively). Similar behaviors were observed using PBS and DMEM aqueous media and also with ethylene glycol. A greater wettability was detected when low polarity solvents such as formamide, DMSO, and propylene carbonate were assayed.

In the case of PCL-g-PGAL_{R1} and PCL-g-PGAL_{R2} films the increase in roughness produced greater surface hydrophilicity, being θ values 45.6° and 40.6°, respectively. Similar behaviors were obtained also with the

liquids above indicated of lower polarity, which rendered contact angle values in the range of 40°–20° (Tabla 3).

Contact angles determined in PBS and DMEM (i.e., liquids that are similar biological fluids) are noticeable, being values similar to those found with water ($\Delta\theta \leq 4.6^\circ$ and $\Delta\theta \leq 5.7^\circ$, respectively). The remarkable decrease of the contact angle in the grafted sample, suggest a reduction of hydrophobicity caused by the interaction between PGAL and the proteins (contained in the DMEM). This absorption effect is a desired event.

In general, the effect of the roughness on the wettability of the materials can be explored by the Wenzel Eq. (1), where the roughness of a surface (r) decreases the contact angle if $\theta < 90^\circ$, whereas it increases the contact angle to $\theta > 90^\circ$.

$$\cos \theta_{\text{apparent}} = r \cdot \cos \theta_{\text{true}} \quad (1)$$

Therefore, the contact angles are influenced not only by the chemical structure on the surface but also by the morphology of the materials. Nonetheless, the surface wettability increases upon the grafting of PGAL, thus evidencing the impact of the enzyme-mediated polyphenol on the surface energy. These results, which agree with the contact angle data, is expected to be advantageous for biomedical applications towards the enhanced cell adhesion and their proliferation, as reported elsewhere [42,43].

3.5. Adhesion and proliferation of epithelial cells

The MDCK and Vero cell adhesion on the different films are shown in Fig. 8a, where relative viability percentages are related to the TCPS (culture plate) control. In all cases, the amount of adhered cells is higher for the materials modified with PGAL. These results, which are supported by the material characterization, corroborate the hypothesis that the functionalization of PCL with PGAL is a promising approach to modify the interfaces between biomaterial and cells. Therefore, an increased number of cells became attached to the surface of the material.

Fig. 8b shows cellular viability evaluated through the proliferation of MDCK and Vero cells after 7 days of culture. Cell adhesion has early mechanisms of surface conditioning. Epithelial cells, unlike fibroblasts, require a larger contact surface for their adhesion (baso-lateral). The cells seeded on the surface come from a detachment process (such as trypsinization and centrifugation) and therefore must have a degree of stress on their membrane, and because of that, a surface conditioned with PGAL could improve adhesion. During the culture, changes in the culture medium are required every 48 h because, on the one hand, the nutrients are depleted and, on the other hand, as a product of cellular metabolism, the medium oxidizes. So, having PGAL in the culture plate should favor the medium to be less oxidative and, consequently, improvements in proliferation are observed. Results obtained with the different roughness and grafted matrices were significantly better for PCL-g-PGAL_R samples than those determined for the non-rough and no-

Table 3

Overview of the measured contact angles onto the different materials and the surface energy related to Zisman model. Values are mean \pm SD ($n = 10$).

Solvent	PCL	PCL _{R1}	PCL _{R2}	PCL-g-PGAL	PCL-g-PGAL _{R1}	PCL-g-PGAL _{R2}
Water	90.5 \pm 2.8	95.6 \pm 2.5	105.8 \pm 4.9	60.6 \pm 1.1	45.6 \pm 2.2	40.6 \pm 1.2
PBS ^a	88.3 \pm 2.8	100.2 \pm 1.7	107.5 \pm 3.8	62.3 \pm 2.3	49.8 \pm 2.6	39.5 \pm 2.0
DMEM ^b	85.0 \pm 2.8	99.8 \pm 3.7	106.7 \pm 4.0	54.9 \pm 1.6	45.0 \pm 2.8	35.7 \pm 1.5
Ethylene glycol	59.7 \pm 0.7	61.4 \pm 1.8	75.5 \pm 1.6	56.7 \pm 2.2	38.2 \pm 1.5	33.5 \pm 1.6
Formamide	64.7 \pm 1.0	64.7 \pm 2.2	54.6 \pm 2.2	51.7 \pm 1.1	39.5 \pm 1.4	33.0 \pm 1.0
DMSO	40.4 \pm 0.9	33.8 \pm 1.4	30.9 \pm 1.2	33.9 \pm 1.3	20.1 \pm 0.2	20.3 \pm 1.3
Propylene carbonate	39.7 \pm 2.3	33.0 \pm 2.4	25.7 \pm 1.3	39.9 \pm 2.2	34.5 \pm 0.7	27.3 \pm 0.8
Surface energy ^c (mN/m)	31.4 \pm 0.2	35.1 \pm 0.1	34.8 \pm 0.3	20.5 \pm 0.3	25.7 \pm 0.3	24.4 \pm 0.5

^a Phosphate-buffered saline.

^b Dulbecco's modified eagle medium.

^c Zisman model [44].

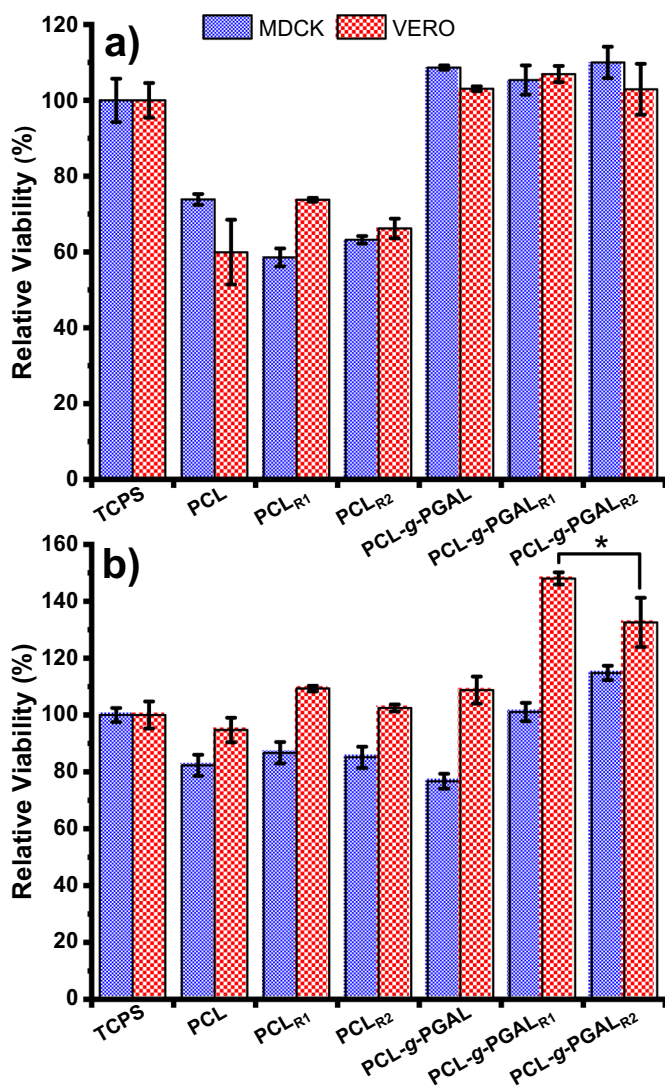


Fig. 8. Cellular adhesion (A) and cellular proliferation (B) for MDCK (green) and Vero (yellow) cells to the indicated samples. Relative viability is referred to TCPS control (tissue culture plate). * $p < 0.05$ vs control (TCPS). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

functionalized surfaces, as well as than for the control. Worth to note, that the cell proliferation increases with the roughness only for the films with PGAL grafted on the surface, regardless of the type of assayed epithelial cell.

The proliferation assays indicated that the response of cells to the antioxidant material after 7 days was enhanced on the target molecule when compared to that determined for the material without the enzyme-mediated polyphenol. Therefore, the behavior as bioactive material is improved for rough PCL-g-PGAL_R samples, a conclusion that reflects the importance of the chemical structure and the surface topography.

Previous studies on polyphenol-functionalized polymers to combat oxidative stress described that the increase in available hydroxyl groups increases the cytotoxicity owing to pro-oxidative effects [45]. According to that, a precaution is needed when using phytochemicals with the content of hydroxyl moieties. The precursor GA has up to three hydroxyl moieties in the benzene ring, however, as previously demonstrated, PGAL is a multiradical polyanion at physiological pH does its enzymatic synthesis conditions [24]. Importantly, the SET mechanism differs from that described for the polyphenols attached to polymers in

previous reports and it must be kept in mind that the biological activities of phenolic compounds are correlated to their chemical structures. Of note is that PGAL has an LD₅₀ (ie, for VERO = 0.221 mg/mL and MDCK = 1124 mg/mL) [26] which is greater than that of GA for the same type of cells (i.e. 5.88 µg/mL) [46]. Nonetheless, the PGAL yield grafting is 0.16 mg/cm² on average, therefore, the 1 mL volume in 1 cm² in the conducted experiment is an insufficient quantity to reach the average lethal dose; that is why both cell adhesion and proliferation are not affected in the studied cultures.

On the other hand, cell proliferation increases with roughness only for materials that have PGAL on their surface, which has been attributed to the wettability characteristics of the materials. The surface energy is strongly correlated with the absorption of proteins that form the interface with the cells, therefore, ideal materials are those that have hydrophilic characteristics since they allow an orderly absorption of proteins, and thereby promote best cell adhesion and proliferation. Non-wetting substrates have been reported to result in protein denaturation, exposing the inner hydrophobic residues of proteins and preventing specific interaction between the adsorbed protein and cells [47]. This explains the recurring method of functionalization of surfaces with polyphenols to convert poorly biocompatible hydrophobic materials into widely biocompatible ones [48–50]. In conclusion, our results correlate well with previous results on the protective effect against oxidative stress in cells from GA-derived polymers reported elsewhere [51,52].

The morphology of the cultured cells on the surface of the film is shown in Fig. 9. As an example, the monolayer arrangement of epithelial-type Vero cells on the surface of PCL (Fig. 9a–c) and surfaces of the studied PCL-g-PGAL (Fig. 9d–f).

3.6. Cell protection study against the oxidative stress

To determine the effects of PGAL derivatives on the free radical scavenging activities, the DPPH method was employed owing to its high stability and simplicity. The RSA measured by UV-spectroscopy, shown in Fig. 10, demonstrates the proportional inhibition of DPPH radical with the increase of PCL-g-PGAL concentration. Therefore, PCL-g-PGAL retained the antioxidant capacity of PGAL (i.e., IC₅₀ = 23.48 µg/mL) with measured IC₅₀ around 115 µg/mL for every roughness level without significant differences among PCL-g-PGAL samples; additionally, this result suggests a similar amount of PGAL grafted onto PCL for each roughness, since the antioxidant capacity of the grafted polymer relates only to the polyphenol.

It should be pointed out that these results correlate well with previous reports on the radical scavenging of polyphenols, where the introduction of these species enhances the radical scavenging as demonstrated by the DPPH assay [45]. Encouraged by these results, we decided to investigate the same action of our graft on living cells exposed to oxidative stress induced by AAPH. This molecule decomposes slowly at 37 °C and pH = 7.4 and releases a constant stream of water-soluble peroxy radicals under physiological conditions similar to those in the organism [53]. This approach improves that using hydrogen peroxide-induced cell injury, as these attack unsaturated fatty acids in low-density lipoprotein (LDL) to initiate lipid oxidation and form hydroperoxide. Peroxy radical-initiated LDL oxidation is closely related to LDL oxidation under humans' physiological conditions compared to other in vitro models. Oxidized LDLs are more atherogenic than native LDLs and it serves as chemotactic factors in the recruitment of circulating monocytes, which are macrophage precursors involved in the inflammatory process [54–58]. This study demonstrates the antioxidant effect of PGAL-derived materials towards its potential use as an anti-inflammatory agent by limiting LDL oxidation and therefore monocyte recruitment.

Fig. 11 displays the cytotoxicity experimental curves for AAPH. These allow determining the half lethal doses (LD₅₀) for the studied cells. The MDCK cells are the most susceptible to LD₅₀ = 13.8 mM,

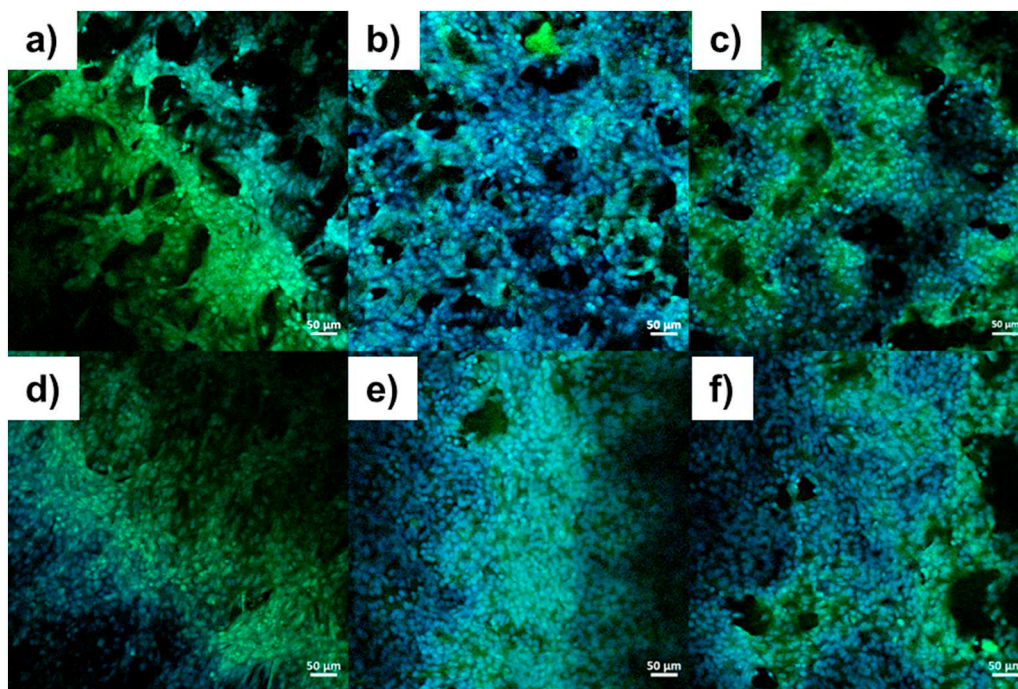


Fig. 9. Images of Vero cells proliferation on films of PCL (a), PCL_{R1} (b), PCL_{R2} (c), PCL-g-PGAL (d), PCL-g-PGAL_{R1} (e) and PCL-g-PGAL_{R2} (f). Cells were stained with fluorescent reagents bisbenzimidazole H and phalloidin and observed by confocal microscopy (scale bar = 50 μm).

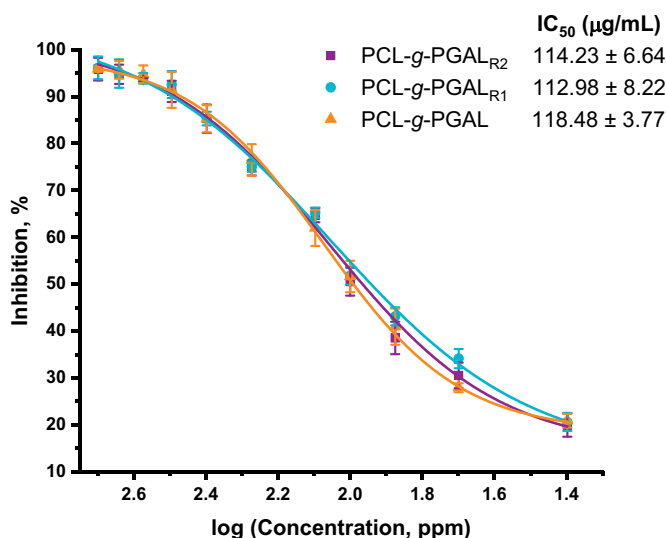


Fig. 10. Reduction of the DPPH radical in the presence of PCL-g-PGAL (▲), PCL-g-PGAL_{R1} (●), PCL-g-PGAL_{R2} (■). Values are expressed as mean percent inhibition of DPPH in 3 experiments.

which is lower than that determined for Vero cells (LD₅₀ = 30.6 mM).

Viability of Vero and MDCK cells at the 24 h of culture and under the LD₅₀ doses of AAPH is shown in Fig. 12. According to the statistical analysis, the presence of PGAL and the change in the rugosity of the surface, as well as the interaction between both factors enhanced significantly ($p < 0.05$) the cellular response to the oxidative stress. The activity of the absorbed proteins was altered by the characteristics of the materials. Probably, conformational changes during absorption [59], and the reduction of oxidative stress caused by free radicals from AAPH differed significantly among samples. As an example, the morphology of the cultured Vero epithelial cells on the film surface after the ROS attack is shown in Fig. 13. The damage to the formation of the cell monolayer arrangement is evident in the PCL films (Fig. 13a–c), while

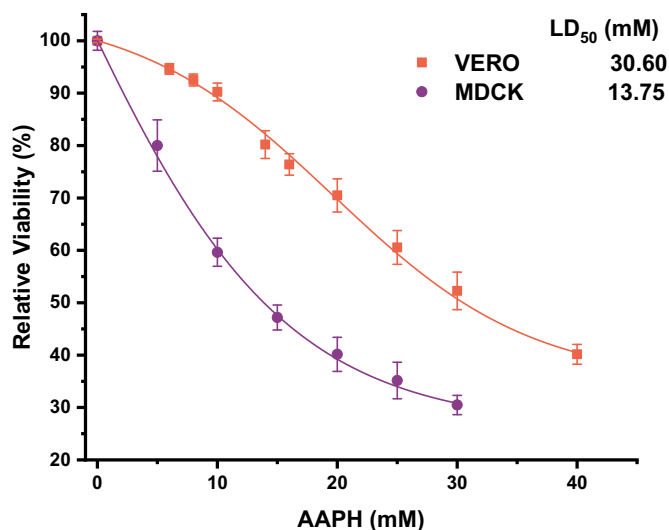


Fig. 11. Cytotoxicity curves of AAPH for Vero and MDCK cells.

the monolayer order is maintained despite the oxidative attack for polyphenol grafted materials (Fig. 13d–f). The cells on the surface of PCL, PCL_{R1}, and PCL_{R2} appear larger than the cells on the graphed surfaces. This fact is characteristic of epithelial cells, such as MDCK and Vero, among others. These cells have been shown to decrease in size as a function of cell density. This observation would agree with our results and it is supported in the works of Puliafito et al. [60] and Tili et al. [61].

Earlier reported works on the protective effect of GA against LDL oxidation initiated by AAPH describe that the concentration needed to reduce the formation of oxidized LDL is 200 μM [62]. However, no improvement is observed on in vitro cultures of lymphocytes exposed to AAPH with the presence of this polyphenol. Worth to note, the antioxidant potential of PGAL was also studied, thus obtaining a necessary concentration of 200 μg/mL to prevent cell damage in dermal fibroblast exposed to oxidative stress [29].

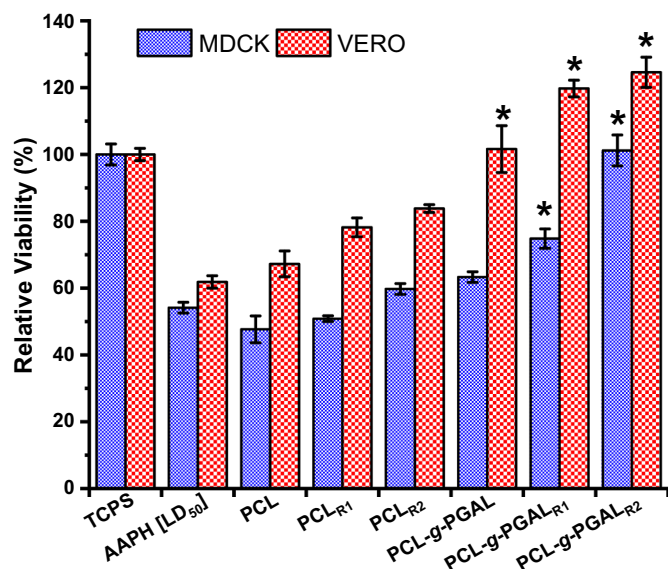


Fig. 12. Antioxidant effect in MDCK and Vero cell lines cultured on the surface of the films for 24 h and using the LD₅₀ of AAPH. TCPS (culture plate) as control. * $p < 0.05$ vs control treated with AAPH.

In this sense, we have a concentration of the polyphenol in the sample of PCL-g-PGAL of 0.16 mg/cm², which is equal to 160 µg/mL in the cell culture, although this dose of polyphenol follows a positive effect on the recovery of cell culture. This agrees with previous reports on polyphenolic polymers and derivatives; for example it has been found that catechin [63,64], rutin [65] and epigallocatechin gallate [66] polymerized biomaterial, among others, are more effective when compared to their monomers, and additionally, their activity against the oxidation of LDL increases proportionally with the number of repeating units. Moreover, the monomers induced fatal cytotoxicity by itself at the same concentration [67]. This experimental evidence was related to the structural differences, as the polymer adopts and

increasing helical secondary structure with chain length increase, which is also demonstrated for PGAL [24], thus suggesting that the phenyl groups become increasingly available and without major steric hindrances to achieve hydrogen bonding and electrostatic interactions [68].

Despite the in vitro mechanism of polyphenol activity against oxidative stress generated by LDL oxidation has not been fully elucidated, some authors hypothetically indicate that polyphenolic polymers and their derivatives quench the peroxy radicals released from the oxidation of LDL, by stabilizing apolipoprotein B (the largest component in LDL), through electrostatic and hydrogen-bonding interactions and also by their ability to auto-oxidize [69].

Conclusively, the mechanism for PGAL-derivate biomaterials may be through the inhibition and stabilization of the oxidation products of LDL owing to the helical secondary structure. The grafting to PCL, which is a polymer susceptible to auto-oxidation [70], can lead to a synergistic effect that adds to the improvement in the surface properties generated by the modification of the roughness [71].

Appealing features of PGAL include air, thermal and photostabilities, water solubility and its obtention in a multigram scale from the naturally abundant GA in mild and green conditions, and our experimental evidence indicates that PCL-g-PGAL allows almost 100% cell viability in a culture with a sufficient AAPH dose to kill ca. 50% of the cell population. Besides, PCL-g-PGAL possesses carboxyl groups in each repeat unit of the pendant helicoidal PGAL, which can cross-link with calcium ions in aqueous solution, which is particularly interesting since a high level of calcium is often related to cell death caused by oxidative stress [72]. Of note is that PGAL O radicals, shown in Fig. 1, can reversibly switch to protonated forms but maintaining antioxidant activity in both molecular forms [24]. A previous study demonstrated that PGAL radical scavenging undergoes through a single electron transfer (SET) mechanism which differs from the common antioxidant route of polyphenols [24], which commonly are transformed into inactive forms after radical quenching. These traits suggest a prolonged antioxidant activity for PCL-g-PGAL at the implant site, and further investigation is needed to assess its biomedical application in epithelial tissues.

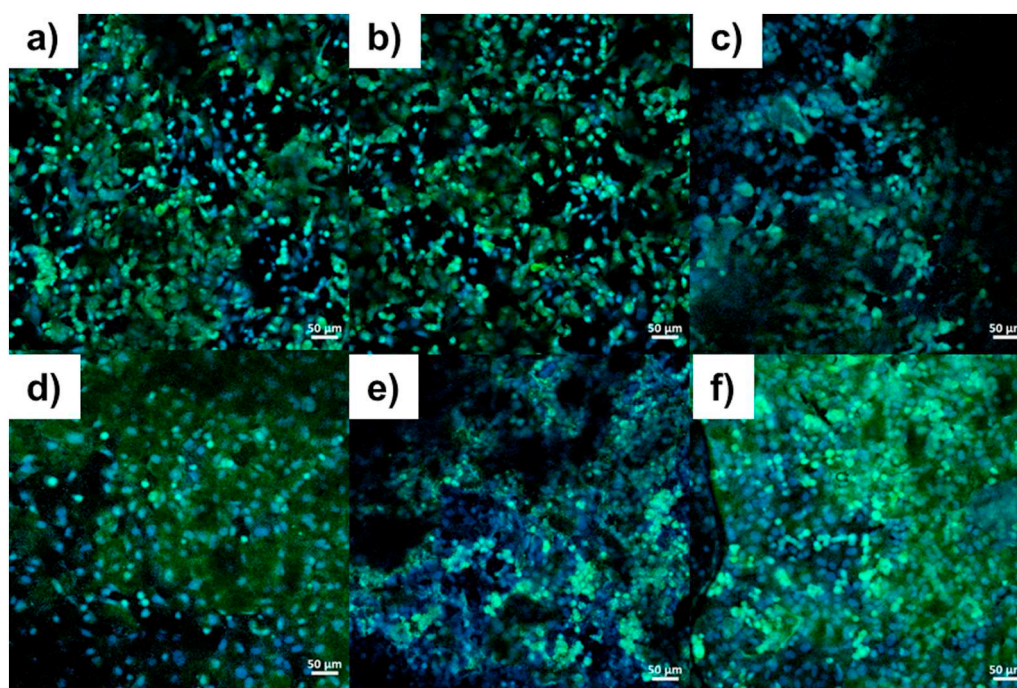


Fig. 13. Images of Vero cells after oxidative stress test on films of PCL (a), PCL-R₁ (b), PCL-R₂ (c), PCL-g-PGAL (d), PCL-g-PGAL-R₁ (e) and PCL-g-PGAL-R₂ (f). Cells were stained with fluorescent reagents bisbenzimidazole and phalloidin and observed by confocal microscopy (scale bar = 50 µm).

4. Conclusions

The incorporation of PGAL onto surface activated PCL films increases the crystallinity in the final films by nucleation effect, this behavior in synergy with surface roughness, improves the mechanical properties of adequate softness and flexibility in PCL-g-PGAL material for application in tissue engineering. The adequate physicochemical and biological characteristics allow the grafting and the optimal protein adsorption, respectively, and consequently, the viability of Vero and MDCK cells. This work also demonstrates that the surface roughness in the PCL is a key factor for cell viability in the PCL-g-PGAL. The medical issues related to the oxidative stress in cells caused by the presence of external materials in regenerative medicine have also been tackled, as the experimental shreds of evidence indicate inhibition of ROS from these cells when under their LD₅₀ of AAPH in the presence of PCL-g-PGAL_R. The latter can be attributed to the PGAL free-radical scavenging properties. Therefore, this evidence indicates that PCL-g-PGAL is a potential bioactive polymer scaffold for tissue engineering studies.

CRedit authorship contribution statement

Alejandra Romero-Montero: Investigation, Writing - original draft, Formal analysis. **Luis J. del Valle:** Conceptualization, Resources, Supervision. **Jordi Puiggalí:** Conceptualization, Resources, Supervision, Visualization, Project administration, Funding acquisition. **Carmina Montiel:** Investigation, Supervision. **Roeb García-Arazola:** Conceptualization, Supervision. **Miquel Gimeno:** Conceptualization, Resources, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

The authors acknowledge support from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA, UNAM) (MEXICO) for funding (PAPIIT IN200520) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (MEXICO) for doctoral scholarships of A.R.-M. (336576). The authors are in debt to support from Ministerio de Economía y Empresa (MINECO) (SPAIN) and Federación Española de Enfermedades Raras (FEDER) (SPAIN) (RTI2018-101827-B-I00) and the Generalitat de Catalunya (SPAIN) (2017SGR373).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111154>.

References

- R. van Lith, G.A. Ameer, Chapter ten - antioxidant polymers as biomaterial, in: T. Dziubla, D.A. Butterfield (Eds.), *Oxidative Stress and Biomaterials*, Academic Press, 2016, pp. 251–296.
- P.-A. Mouthuy, S.J. Snelling, S.G. Dakin, L. Milković, A.Č. Gašparović, A.J. Carr, N. Žarković, Biocompatibility of implantable materials: an oxidative stress viewpoint, *Biomaterials* 109 (2016) 55–68.
- A. Vishwakarma, N.S. Bhise, M.B. Evangelista, J. Rouwkema, M.R. Dokmeci, A.M. Ghaemmaghami, N.E. Vrana, A. Khademhosseini, Engineering immunomodulatory biomaterials to tune the inflammatory response, *Trends Biotechnol.* 34 (6) (2016) 470–482.
- G. Huang, F. Li, X. Zhao, Y. Ma, Y. Li, M. Lin, G. Jin, T.J. Lu, G.M. Genin, F. Xu, Functional and biomimetic materials for engineering of the three-dimensional cell microenvironment, *Chem. Rev.* 117 (20) (2017) 12764–12850.
- P. Arulselvan, M.T. Fard, W.S. Tan, S. Gothai, S. Fakurazi, M.E. Norhaizan, S.S. Kumar, Role of antioxidants and natural products in inflammation, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2016 (2016) 15.
- A.W. Bridges, A.J. García, Anti-inflammatory polymeric coatings for implantable biomaterials and devices, *J. Diabetes Sci. Technol.* 2 (6) (2008) 984–994.
- J.L. Dziki, S.F. Badylak, Immunomodulatory biomaterials, *Current Opinion in Biomedical Engineering* 6 (2018) 51–57.
- W. Wu, R. Cheng, J. das Neves, J. Tang, J. Xiao, Q. Ni, X. Liu, G. Pan, D. Li, W. Cui, B. Sarmiento, Advances in biomaterials for preventing tissue adhesion, *J. Control. Release* 261 (2017) 318–336.
- I.M. Adjei, G. Plumton, B. Sharma, *Oxidative Stress and Biomaterials: The Inflammatory Link*, Oxidative Stress and Biomaterials, Elsevier, 2016, pp. 89–115.
- S.K. Mallapragada, B. Narasimhan, Immunomodulatory biomaterials, *Int. J. Pharm.* 364 (2) (2008) 265–271.
- S. Hariram Nile, S. Won Park, Optimized methods for in vitro and in vivo anti-inflammatory assays and its applications in herbal and synthetic drug analysis, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 13 (1) (2013) 95–100.
- Y.H. Choi, Schisandrin A prevents oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis by attenuating ROS generation in C2C12 cells, *Biomed. Pharmacother.* 106 (2018) 902–909.
- K. Zhan, H. Ejima, N. Yoshie, Antioxidant and adsorption properties of bioinspired phenolic polymers: a comparative study of catechol and gallol, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4 (7) (2016) 3857–3863.
- J.A. Nichols, S.K. Katiyar, Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms, *Arch. Dermatol. Res.* 302 (2) (2010) 71–83.
- Z.-F. Yang, L.-P. Bai, W.-b. Huang, X.-Z. Li, S.-S. Zhao, N.-S. Zhong, Z.-H. Jiang, Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure–activity relationship analysis, *Fitoterapia* 93 (2014) 47–53.
- A.-N. Li, S. Li, Y.-J. Zhang, X.-R. Xu, Y.-M. Chen, H.-B. Li, Resources and biological activities of natural polyphenols, *Nutrients* 6 (12) (2014) 6020–6047.
- S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouységu, Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (3) (2011) 586–621.
- J. Guo, T. Suma, J.J. Richardson, H. Ejima, Modular assembly of biomaterials using polyphenols as building blocks, *ACS Biomaterials Science & Engineering* 5 (11) (2019) 5578–5596.
- J.-Y. Lai, L.-J. Luo, Antioxidant gallic acid-functionalized biodegradable in situ gelling copolymers for cytoprotective antiglaucoma drug delivery systems, *Biomacromolecules* 16 (9) (2015) 2950–2963.
- Q. Dai, H. Geng, Q. Yu, J. Hao, J. Cui, Polyphenol-based particles for theranostics, *Theranostics* 9 (11) (2019) 3170.
- T.S. Sileika, D.G. Barrett, R. Zhang, K.H.A. Lau, P.B. Messersmith, Colorless multifunctional coatings inspired by polyphenols found in tea, chocolate, and wine, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (41) (2013) 10766–10770.
- J. Jiang, P. Song, H. Guo, X. Zhang, Y. Ren, H. Liu, X. Song, M. Kong, Blending PLLA/tannin-grafted PCL fiber membrane for skin tissue engineering, *J. Mater. Sci.* 52 (3) (2017) 1617–1624.
- A.F. Martins, S.P. Facchi, P.C. da Câmara, S.E. Camargo, C.H. Camargo, K.C. Popat, M.J. Kipper, Novel poly (ε-caprolactone)/amino-functionalized tannin electrospun membranes as scaffolds for tissue engineering, *J. Colloid Interface Sci.* 525 (2018) 21–30.
- A. Romero-Montero, M. Gimeno, N. Farfán, P. Labra-Vázquez, Enzymatic poly (gallic acid): a stable multiradical polyanion, *J. Mol. Struct.* 1197 (2019) 326–335.
- J. Díaz-Sánchez, A. Rosas-Aburto, E. Vivaldo-Lima, J.M. Hernández-Alcántara, I. Gracia-Mora, H. Vázquez-Torres, L.C. Ordóñez, P. Roquero, M. Gimeno, Development and characterization of a flexible electrochromic device based on polyaniline and enzymatically synthesized poly (gallic acid), *Synth. Met.* 223 (2017) 43–48.
- A. Romero-Montero, A. Tecante, R. García-Arazola, C. Montiel, L.J. del Valle, J. Puiggalí, M. Gimeno, Growth of epithelial cells on films of enzymatically synthesized poly (gallic acid) crosslinked to carboxymethylcellulose, *RSC Adv.* 7 (29) (2017) 17660–17669.
- J. López, J.M. Hernández-Alcántara, P. Roquero, C. Montiel, K. Shirai, M. Gimeno, E. Bárzana, Trametes versicolor laccase oxidation of gallic acid toward a poly-conjugated semiconducting material, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 97 (2013) 100–105.
- B. Badhani, N. Sharma, R. Kakkar, Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications, *RSC Adv.* 5 (35) (2015) 27540–27557.
- R. Sánchez-Sánchez, A. Romero-Montero, C. Montiel, Y. Melgarejo-Ramírez, C. Sánchez-Ortega, H. Lugo-Martínez, B. Cabello-Arista, R. García-Arazola, C. Velasquillo, M. Gimeno, Cytoprotective effect of the enzyme-mediated polygallic acid on fibroblast cells under exposure of UV-irradiation, *Mater. Sci. Eng. C* 76 (2017) 417–424.
- R. García-Arazola, M. Gimeno, E. Bárzana, Use of liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane as solvent media for enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of lactones, *Macromolecules* 40 (12) (2007) 4119–4120.
- B. Jin, X. Zhou, Y. Liu, X. Li, Y. Mai, Y. Liao, J. Liao, Physicochemical stability and antioxidant activity of soy protein/pectin/tea polyphenol ternary nanoparticles obtained by photocatalysis, *Int. J. Biol. Macromol.* 116 (2018) 1–7.
- O. Suwantong, Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats, *Polym. Adv. Technol.* 27 (10) (2016) 1264–1273.
- A. Espadín, L.T. De Dios, E. Ruvalcaba, J. Valadez-García, C. Velasquillo, I. Bustos-Jaimes, H. Vázquez-Torres, M. Gimeno, K. Shirai, Production and characterization of a nanocomposite of highly crystalline nanowhiskers from biologically extracted

- chitin in enzymatic poly (ϵ -caprolactone), *Carbohydr. Polym.* 181 (2018) 684–692.
- [34] F. Xu, Z. Wang, W. Yang, Surface functionalization of polycaprolactone films via surface-initiated atom transfer radical polymerization for covalently coupling cell-adhesive biomolecules, *Biomaterials* 31 (12) (2010) 3139–3147.
- [35] J. Spěváček, J. Brus, T. Divers, Y. Grohens, Solid-state NMR study of biodegradable starch/polycaprolactone blends, *Eur. Polym. J.* 43 (5) (2007) 1866–1875.
- [36] H.-W. Tien, Y.-L. Huang, S.-Y. Yang, J.-Y. Wang, C.-C.M. Ma, The production of graphene nanosheets decorated with silver nanoparticles for use in transparent, conductive films, *Carbon* 49 (5) (2011) 1550–1560.
- [37] M. Koenig, S. Huang, Biodegradable blends and composites of polycaprolactone and starch derivatives, *Polymer* 36 (9) (1995) 1877–1882.
- [38] L.J. Del Valle, R. Camps, A. Díaz, L. Franco, A. Rodríguez-Galán, J. Puiggalí, Electrospinning of polylactide and polycaprolactone mixtures for preparation of materials with tunable drug release properties, *J. Polym. Res.* 18 (6) (2011) 1903–1917.
- [39] C.H. Suh, Y.-C. Jung, Y.S. Kim, Effects of thickness and surface roughness on mechanical properties of aluminum sheets, *J. Mech. Sci. Technol.* 24 (10) (2010) 2091–2098.
- [40] S.-F. Chou, J.-Y. Lai, C.-H. Cho, C.-H. Lee, Relationships between surface roughness/stiffness of chitosan coatings and fabrication of corneal keratocyte spheroids: effect of degree of deacetylation, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 142 (2016) 105–113.
- [41] H. Vuyk, *Biomaterials in Rhinoplasty*, (1998).
- [42] S. Maione, G. Fabregat, L.J. Del Valle, G. Ballano, C. Cativiela, C. Alemán, Electro-biocompatibility of conjugates designed by chemical similarity, *J. Pept. Sci.* 20 (7) (2014) 537–546.
- [43] M. Lampin, R. Warocquier-Clérout, C. Legris, M. Degrange, M. Sigot-Luizard, Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials* 36 (1) (1997) 99–108.
- [44] W.A. Zisman, Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution, *Advan. Chem. Ser.* 43 (1964) 1–51.
- [45] L.-J. Luo, D.D. Nguyen, J.-Y. Lai, Benzoic acid derivative-modified chitosan-g-poly (N-isopropylacrylamide): methoxylation effects and pharmacological treatments of glaucoma-related neurodegeneration, *J. Control. Release* 317 (2020) 246–258.
- [46] A. Faried, D. Kurnia, L. Faried, N. Usman, T. Miyazaki, H. Kato, H. Kuwano, Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines, *Int. J. Oncol.* 30 (3) (2007) 605–613.
- [47] D.R. Lu, K. Park, Effect of surface hydrophobicity on the conformational changes of adsorbed fibrinogen, *J. Colloid Interface Sci.* 144 (1) (1991) 271–281.
- [48] S.H. Ku, J. Ryu, S.K. Hong, H. Lee, C.B. Park, General functionalization route for cell adhesion on non-wetting surfaces, *Biomaterials* 31 (9) (2010) 2535–2541.
- [49] J. McColl, R. Horvath, A. Aref, L. Larcombe, I. Chianella, S. Morgan, G.E. Yakubov, J.J. Ramsden, Polyphenol control of cell spreading on glycoprotein substrata, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 20 (5–6) (2009) 841–851.
- [50] Q. Huang, L. Hao, J. Xie, T. Gong, J. Liao, Y. Lin, Tea polyphenol-functionalized graphene/chitosan as an experimental platform with improved mechanical behavior and bioactivity, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (37) (2015) 20893–20901.
- [51] S.-F. Chou, L.-J. Luo, J.-Y. Lai, Gallic acid grafting effect on delivery performance and antiglaucoma efficacy of antioxidant-functionalized intracameral pilocarpine carriers, *Acta Biomater.* 38 (2016) 116–128.
- [52] S.-F. Chou, L.-J. Luo, J.-Y. Lai, In vivo pharmacological evaluations of pilocarpine-loaded antioxidant-functionalized biodegradable thermogels in glaucomatous rabbits, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 1–15.
- [53] I. Elisia, D.D. Kitts, Anthocyanins inhibit peroxyl radical-induced apoptosis in Caco-2 cells, *Mol. Cell. Biochem.* 312 (1–2) (2008) 139–145.
- [54] Y.-F. Chu, R.H. Liu, Novel low-density lipoprotein (LDL) oxidation model: antioxidant capacity for the inhibition of LDL oxidation, *J. Agric. Food Chem.* 52 (22) (2004) 6818–6823.
- [55] S. Duggan, C. Rait, A. Platt, S.P. Gieseg, Protein and thiol oxidation in cells exposed to peroxyl radicals is inhibited by the macrophage synthesised pterin 7, 8-dihydropteridine, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1591 (1–3) (2002) 139–145.
- [56] S.P. Gieseg, D.S. Leake, E.M. Flavall, Z. Amit, L. Reid, Y.-T. Yang, Macrophage antioxidant protection within atherosclerotic plaques, *Front. Biosci.* 14 (1) (2009) 230–246.
- [57] S. Kiokias, C. Proestos, V. Oreopoulou, Effect of natural food antioxidants against LDL and DNA oxidative changes, *Antioxidants* 7 (10) (2018) 133.
- [58] E. Llorens, L.J. del Valle, A. Díaz, M.T. Casas, J. Puiggalí, Polylactide nanofibers loaded with vitamin B 6 and polyphenols as bioactive platform for tissue engineering, *Macromol. Res.* 21 (7) (2013) 775–787.
- [59] E. Mariani, G. Lisignoli, R.M. Borzi, L. Pulsatelli, Biomaterials: foreign bodies or tuners for the immune response? *Int. J. Mol. Sci.* 20 (3) (2019) 636.
- [60] A. Puliafito, L. Hufnagel, P. Neveu, S. Streichan, A. Sigal, D.K. Fyngenson, B.I. Shraiman, Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (3) (2012) 739–744.
- [61] S. Tlili, E. Gauquelin, B. Li, O. Cardoso, B. Ladoux, H. Delanoë-Ayari, F. Graner, Collective cell migration without proliferation: density determines cell velocity and wave velocity, *R. Soc. Open Sci.* 5 (5) (2018) 172421.
- [62] K.S. De Bona, G. Bonfanti, P.E.R. Bitencourt, T.P. da Silva, R.M. Borges, A. Boligon, A. Pigatto, M.L. Athayde, M.B. Moretto, Protective effect of gallic acid and *Syzygium cumini* extract against oxidative stress-induced cellular injury in human lymphocytes, *Drug Chem. Toxicol.* 39 (3) (2016) 256–263.
- [63] M. Kurisawa, J.E. Chung, Y.J. Kim, H. Uyama, S. Kobayashi, Amplification of antioxidant activity and xanthine oxidase inhibition of catechin by enzymatic polymerization, *Biomacromolecules* 4 (3) (2003) 469–471.
- [64] M. Kurisawa, J.E. Chung, H. Uyama, S. Kobayashi, Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly (catechin), *Macromol. Biosci.* 3 (12) (2003) 758–764.
- [65] M. Kurisawa, J.E. Chung, H. Uyama, S. Kobayashi, Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly (rutin), *Biomacromolecules* 4 (5) (2003) 1394–1399.
- [66] M. Kurisawa, J.E. Chung, H. Uyama, S. Kobayashi, Oxidative coupling of epigallocatechin gallate amplifies antioxidant activity and inhibits xanthine oxidase activity, *Chem. Commun.* (3) (2004) 294–295.
- [67] J.E. Chung, M. Kurisawa, Y.-J. Kim, H. Uyama, S. Kobayashi, Amplification of antioxidant activity of catechin by polycondensation with acetaldehyde, *Biomacromolecules* 5 (1) (2004) 113–118.
- [68] S. Oliver, O. Vittorio, G. Cirillo, C. Boyer, Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules, *Polym. Chem.* 7 (8) (2016) 1529–1544.
- [69] H.H. Gahrue, M. Niakousari, Antioxidant, antimicrobial, cell viability and enzymatic inhibitory of antioxidant polymers as biological macromolecules, *Int. J. Biol. Macromol.* 104 (2017) 606–617.
- [70] M.A. Sabino, Oxidation of polycaprolactone to induce compatibility with other degradable polyesters, *Polym. Degrad. Stab.* 92 (6) (2007) 986–996.
- [71] A.L. Raines, R. Olivares-Navarrete, M. Wieland, D.L. Cochran, Z. Schwartz, B.D. Boyan, Regulation of angiogenesis during osseointegration by titanium surface microstructure and energy, *Biomaterials* 31 (18) (2010) 4909–4917.
- [72] S. Baek, H. Park, M. Kim, D. Lee, Preparation of PCL/(+)-catechin/gelatin film for wound healing using air-jet spinning, *Appl. Surf. Sci.* 509 (2020) 145033.


 Cite this: *RSC Adv.*, 2020, **10**, 30508

Development of an antimicrobial and antioxidant hydrogel/nano-electrospun wound dressing†

 Alejandra Romero-Montero,^a Pablo Labra-Vázquez,^b Luis J. del Valle,^c Jordi Puiggalí,^{cd} Roeb García-Arrazola,^a Carmina Montiel^a and Miquel Gimeno^{id*^a}

A nanocomposite based on an antibiotic-loaded hydrogel into a nano-electrospun fibre with antimicrobial and antioxidant capacities is investigated. The material is composed of nanofibres of enzymatic PCL grafted with poly(gallic acid) (PGAL), a recently developed enzyme-mediated hydrophilic polymer that features a multiradical and polyanionic nature in a helicoidal secondary structure. An extensive experimental–theoretical study on the molecular structure and morphological characterizations for this nanocomposite are discussed. The hydrogel network is formed by sodium carboxymethylcellulose (CMC) loaded with the broad-spectrum antibiotic clindamycin. This nano electrospun biomaterial inhibits a strain of *Staphylococcus aureus*, which is the main cause of nosocomial infections. The SPTT assay demonstrates that PGAL side chains also improve the release rates for this bactericide owing to the crosslinking to the CMC hydrogel matrix. The absence of hemolytic activity and the viability of epithelial cells demonstrates that this nanocomposite has no cytotoxicity.

 Received 7th July 2020
 Accepted 9th August 2020

DOI: 10.1039/d0ra05935h

rsc.li/rsc-advances

Introduction

Dressings have recently drawn attention in the field of wound healing because they provide a physiological environment compatible with cell development. Other wanted characteristics are the absence of cytotoxicity, and the ability to maintain a moist environment and oxygen permeability. A bioactive dressing also prevents bacterial infections, which are among the most common and severe complications in wounds.^{1,2} In a typical medical procedure, the initial wound cleaning is followed by antibiotic treatment;^{3,4} unfortunately, these actions might be inefficient for some patients, and the rapid development of the infections leads to complications in the healing process, associated with pain, erythema, edema, and long-term disabilities.^{5,6} Furthermore, the administration of antioxidants is highly beneficial as the excessive generation of reactive oxygen species (ROS) at the healing site delays the recovery due

to severe damage to the surrounding tissues caused by inflammation and other ailing due to oxidative stress.^{7–10}

Currently, polymer films,^{11–13} hydrogels,^{14–16} and nanofibrous^{17–19} have been used effectively as wound dressings. Among all options, polymeric electrospun and hydrogels are appealing owing to their ability to mimic the biological conditions of many tissues.²⁰ Hydrogels are widely used in regenerative medicine as drug and cell carriers, as well as in tissue engineering matrices because they possess similar physicochemical and biological properties of the tissue microenvironment due to their porous and hydrated molecular structure.^{21,22} The characteristics of the hydrogels, however, may improve when loaded into electrospun polymers to provide mechanical support in a porous 3D structure for cell attachment. This approach offers a high surface-area-to-volume ratio that allows high gas permeation and good conformability.^{23,24} The electrospinning is in this regard a versatile process for the production of nonwoven nanofibres, which are advantageous in the biomedical field due to their physical properties such as high flexibility, smooth, lack of sharp edges, nonabrasive, high drug-loading capacity, and are easily fabricated into different geometries toward beneficial designs.²⁵ Therefore, electrospinning has been studied in many adequate polymers, including polystyrene (PS), polysaccharide derivatives, and their blends, polylactides (PLA), polylactide-co-glycolides (PLGA), and poly-ε-caprolactone (PCL), among others. The PCL is commonly employed to obtain a continuous morphology in a uniform and controlled distribution of biocompatible micro or nanofibres.^{25,26} We recently investigated films of an active composite

^aDepartamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 CDMX, Mexico. E-mail: mgimeno@unam.mx

^bDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 04510, Mexico

^cChemical Engineering Department, Escola d'Enginyeria de Barcelona Est-EEBE, Universitat Politècnica de Catalunya, c/Eduard Maristany 10-14, 08019 Barcelona, Spain

^dInstitute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology, Baldri Reixac 10-12, 08028 Barcelona, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0ra05935h



of enzymatically produced PCL grafted with poly(gallic acid) (PGAL).²⁷ The latter is an enzyme-mediated polymer that features a multiradical and polyanionic nature in a helicoidal secondary structure.²⁸ The radical scavenging capacity in PGAL, along with its high solubility in physiological media, null cytotoxicity, electric semi-conductivity and high thermal and photostabilities are promising characteristics for application in wound dressing.^{28–31} We produce scaffolds of nanofibres of the enzymatic PCL grafted with PGAL, as a nanocomposite dressing with antioxidant capacity composed of an antimicrobial hydrogel loaded into a nano-electrospun fibre. The hydrogel network is formed by sodium carboxymethylcellulose (CMC) loaded with clindamycin, which is a broad-spectrum antibiotic for the treatment of infections of the bones, skin, soft tissues and wounds and can be used to treat penicillin-allergic patients.³² This biomaterial inhibits a strain of *Staphylococcus aureus*, which is the main cause of nosocomial infections, affecting both mucous membranes and skin, which allows the bacteria to penetrate the patient's bloodstream through wounds. The hydrogels are three-dimensional cross-linked highly hydrated polymeric networks, and they can absorb wound exudates or maintain moisture, and able to swell several times their dry volume without being soluble under physiological conditions.³³ This work considers using a CMC hydrogel as a composite complement owing to its high oxygen permeability and its ability to maintain the structural integrity of the drugs. The presence of the hydrogel is essential to achieve a controlled drug release, in addition to the absorbent capacity-achieving a biomimetic environment. In this regard, the CMC is widely compatible with the mucous membranes and with the skin and it maintains an optimal moist environment in the wound region for extracellular matrix formation and re-epithelialization.³⁴ In this work, an extensive experimental–theoretical study on the molecular structure, morphological characterization, and biological activity for the novel nanocomposite are discussed.

Materials and methods

Materials

Laccase from *Trametes versicolor* (LTV, specific enzyme activity 2.35 U g⁻¹, lyophilized protein stored at -20 °C) was purchased from Fluka (USA). Immobilized lipase B from *Candida antarctica* (CALB; Lewatit VPOC1600, Lanxess, USA; supported on macroporous poly(methacrylic divinylbenzene) spherical beads (1 mm), specific enzyme activity 5000 U g⁻¹, stored at 5 °C) was purchased from C-Lecta (Germany). Gallic acid (GA), ε-caprolactone (CL), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), clindamycin hydrochloride, commercial PCL (PCLc) ($M_n = 45\,000\text{ g mol}^{-1}$), and CMC ($M_n \approx 700\,000\text{ g mol}^{-1}$) were purchased from Sigma-Aldrich (Mexico). Ethyl alcohol (technical grade, >99%) was supplied by Química Barsa (Mexico). Phosphate buffered saline (PBS) was prepared by dissolving reagent grade chemicals, NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄·3H₂O, MgCl₂·H₂O, CaCl₂, and Na₂SO₄, in deionized water, buffered at pH = 7.25. 1,1,1,2-Tetrafluoroethane (R-134a/norflurane Dupont, SUVA, USA) cylinder (60 kg) was supplied by Refracciones Star (Mexico) with 98% purity. Enzyme-mediated

PGAL was produced as reported elsewhere³⁰ in 96% yield ($M_n = 5800\text{ Da}$, PDI = 1.1). Enzymatic PCL (PCLe) was produced following a previous report,³⁵ with $M_n = 38\,519\text{ Da}$ (PDI = 2.1), $T_m = 55.6\text{ °C}$, DGTA peak = 475 °C and percentage of crystallinity = 54.1%.

Synthesis of the grafted copolymer PCLe-g-PGAL

PGAL was grafted to the surface of PCLe strands throughout acidic esterification by reacting PGAL with the hydroxyl groups available on the hydrolysed PCL surface.³⁶ To this end 0.6 g of PCLe were introduced in an aqueous solution of PGAL (0.28 mM) at pH = 3 (adjusted with citric acid), followed by exposure to UV-irradiation ($I = 1.35\text{ mW cm}^{-2}$) during 24 h. After the grafting, the strands were washed with water and ethanol to remove any residual PGAL and other non-reacted compounds. The PCLe-g-PGAL was obtained in 46% yield.

Determination of the grafting yield followed the eqn (1).

$$\text{GY} = [(W_a - W_b)/W_b] \times 100\% \quad (1)$$

where W_b and W_a are the weights of dry samples before and after the reaction, respectively.

Preparation of PCLe-g-PGAL nanofibers by electrospinning

Electrospun fibres were collected on a target placed at different distances (10–25 cm) from the needle tip (inside diameter 0.84 mm). Applied voltage varied between 10 and 30 kV using a high-voltage supply (Gamma High Voltage Research, ES 30-5W). Polymer solutions were delivered by a single KDS100 infusion syringe pump (KD Scientific, USA) to control the flow rate (from 1 to 5 mL h⁻¹). All electrospinning experiments were carried out at room temperature. PCL-g-PGAL electrospun fibres were prepared using optimized parameters (collector distance of 20 cm, 25 V, flow rate = 2.5 mL h⁻¹) and solvent conditions (proportion of 60 w/v% in chloroform/acetone mixture 2 : 1 v/v).

Preparation of hydrogel loaded nanocomposites

Aqueous solutions of citric acid at 0.41, 1.05, and 1.62 mg mL⁻¹ were prepared; then clindamycin hydrochloride (6 mg) powder was added to 10 mL each solution and sonicated for 10 min. Then, 200 mg of CMC was added with continuous mechanical stirring to reach a homogeneous viscous mixture hydrogel. To ensure the homogeneity and viscosity of the solution, the mixture was kept at 37 °C under stirring (200 rpm) for 18 h. Then, 1 cm² electrospun samples were cut and treated with water during 48 h before adding the hydrogel on their surface, then was retired from water and sterilized with UV light for 15 min to which 0.5 mL of the hydrogel precursor was dropped. Subsequently, the crosslinking was carried out at 50 °C for 6 h and then dried at room temperature under high vacuum until complete evaporation of the solvent. Finally, the composites were cured under UV-irradiation for 30 min.

Chemical characterizations

CP/MAS ¹³C-NMR spectra were recorded in a Varian MR-400 spectrometer. FT-IR spectra were acquired in a PerkinElmer



(USA) ATR-FTIR Spectrum 400. Size exclusion chromatography (SEC) measurements were conducted in an Agilent 1210 series (USA) liquid chromatograph equipped with a RID detector. Narrow molecular weight polyethylene glycol in deionized water (Millipore, Milli-Q) and polystyrene in THF (HPLC grade Merck) standards were used for calibration of PGAL and PCL, respectively. The chromatographer was equipped with an Ultrahydrogel-500 (7.8 × 300 mm, Waters, USA) column for PGAL and two columns PLGEL 10 cm MIXED-B (300 × 7.5 mm, Varian, USA) in series for PCL. Samples were dissolved in the mobile phase (1 mg mL⁻¹) and filtered (0.45 μm) before injection in the chromatographer. Electron Spin Resonance (ESR) analyses were conducted in a Bruker ESR Elexsys E500 in quartz tubes at room temperature in the 80–4080 G interval and 9.8 × 10⁹ Hz microwave frequency.

Computational methods

Spin-unrestricted Hartree–Fock (UHF) quantum chemical computations were performed within the framework of the Density Functional Theory (DFT) through the Gaussian-09 software package,³⁷ using the M06-2X functional combined with the triple-ζ 6-311++G(d,p) polarized basis set,²⁸ to take into account non-covalent interactions, for which meta-GGA functionals usually outperform many other hybrid functionals.^{38,39} Water solvation effects were incorporated through the Polarizable Continuum Model (PCM).⁴⁰ We used a large basis set comprising diffuse functions, as their inclusion usually improves the reliability of the quantum chemical description for open-shell and anionic systems.^{41,42} Equilibrium geometries were optimized without any constraint, and their vibrational frequencies were inspected to confirm true local minimum, which was found by the absence of imaginary frequencies. Transition states were searched and fully optimized at the same level of theory using the eigenvector following (EF) method through the Berny optimization algorithm; the resulting optimized geometries were confirmed as transition states by the presence of a single imaginary vibrational frequency at $\nu = -425.1 \text{ cm}^{-1}$ and $\nu = -1312.2 \text{ cm}^{-1}$ for **S1-TS** and **S2-TS**, respectively.

DPPH radical scavenging of PCL-g-PGAL

Inhibition of the DPPH radical by PCL-g-PGAL samples was conducted in a Genesys 10S UV-vis spectrophotometer (Thermo Scientific) at 517 nm. Stock solutions of PCL-g-PGAL (25–500 ppm) were diluted in chloroform and then 100 μL aliquots of each dilution were added into the assay tubes containing 2.9 mL of DPPH solution (6.34 × 10⁻⁵ M). Samples were incubated for 30 min at room temperature before UV analyses. The relative percentage of DPPH radical scavenging activity (RSA) was measured according to eqn (2):

$$\text{RSA} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

where A_s and A_0 are the absorbances of analysis with antioxidant and without, respectively. RSA determination was carried in triplicate. Experimental data were fitted using the software

OriginPro 8.0. IC₅₀ value was the concentration of PCL-g-PGAL that inhibits 50% of the RSA of DPPH.

Morphology analysis of samples

Morphology of electrospun samples was determined in a Focused Ion Beam Zeiss Neon 40 microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) operating at 5 kV. Samples of electrospun were deposited on pin stubs of aluminium, and sputter-coated with a thin layer of carbon. The diameter of electrospun threads was measured with SmartTiff software from Carl Zeiss SMT Ltd. Energy dispersive X-ray (EDX) SEM microanalysis was recorded in a JEOL JSM-5900-LV scanning electron microscope (Japan).

Contact angle measurements

Static contact angle measurements with the sessile drop method were recorded and analysed at room temperature on OCA-15EC equipment from DataPhysics Instruments GmbH (Germany) with SCA20 software (DataPhysics Instruments GmbH, Germany). Contact angle values of the right and left sides of the solvent drop were measurement and averaged. Measurements were performed 5 s after the deposition of the drop (1 μL) on the surface. All data were an average of ten measurements on different surface locations.

Antimicrobial studies

Serial Plate Transfer Test (SPTT) was used to study the electrospun nanocomposites behaviour against *Staphylococcus aureus* (ATCC, USA), thus monitoring antimicrobial activity and the duration of antibiotic release. Plates of Müller–Hinton agar were inoculated using a sterile swab with a suspension of bacteria with turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard (1 × 10⁸ colony-forming units per mL). Composites with and without antibiotics were placed in the centre of an agar plate ($n = 3$) and incubated at 37 °C for 18 h. Inhibition, determined as the zone diameter minus composite diameter in mm, was measured using a Vernier. Composites were transferred daily to a fresh seeded plate to ensure that the same material surface was in contact with the agar until a zone of inhibition was absent. Composites that ceased to produce a zone of inhibition were split lengthways and placed onto seeded agar plates with the surface in contact with the agar and incubated overnight at 37 °C to ensure that no further antibiotics were being released. Composites without loaded clindamycin did not show any antibacterial effect.

Drug delivery kinetic

To evaluate the drug delivery kinetics Cly-loaded and unloaded (controls) hydrogel–electrospun fiber mat composites (1 cm²) and CMC hydrogels (equivalent to 1 mL in wet) were placed in Falcon tubes. Phosphate buffered saline (PBS) solution of pH 7.4 was considered as the release medium. Assays, which were performed in triplicate, were carried out by immersing sample materials in 20 mL of the release medium using a rotating agitator. The medium (0.5 mL) was removed at predetermined



time intervals and replaced by an equal volume of fresh medium. The removed medium was used to quantify the release of Cly by measuring its absorbance in a Genesys 10S UV-vis spectrophotometer (Thermo Scientific) at $\lambda = 210$ nm. The calibration curve for Cly ($y = 3.997x - 0.0314$, $R^2 = 0.9996$) was obtained by plotting the absorbance measured at 210 nm against Cly concentration. All assays were performed in triplicate and the results averaged. The original amount of the entrapped drug in each composite and hydrogel was obtained by soaking the sample in water (20 mL) at 37 °C for 5 days and measured as mentioned above. The power-law model (eqn (3)) developed by Ritger and Peppas⁴³ was applied to analyze the first 60% of drug fractional release

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (3)$$

where M_t is the mass of drug released at time t , M_∞ is the total mass of drug released at equilibrium, k is a kinetic constant of the system and n is a characteristic power for the drug release. When n is equal to 0.5 the drug is considered to diffuse with a Fickian behavior. For $n = 1$ the behavior is named Case II diffusion. Finally, anomalous transport behavior occurs at intermediate n values between Fickian and Case II.

Hemolytic activity

Human blood agar plates were prepared by adding 10 v/v% of healthy human blood from consent donors in sterile blood agar base medium on sterile Petri plates. After solidification, wells were made on the agar plate using a sterile cork borer (6 mm diameter) for water positive control (100 μ L). Composites with and without antibiotics were placed in the centre of the agar plate ($n = 3$) and incubated at 37 °C for 24 h. After the incubation period, the hemolysis was observed by a clear zone of inhibition (zone diameter minus composite diameter in mm) which was measured using a Vernier.

Cell viability

Vero cell line (African green monkey, *Cercopithecus aethiops*, kidney) (ATCC, USA) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, and 2 mM of L-glutamine at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air. Culture medium was changed every two days and, for subculture, cell monolayers were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and detached by incubation with trypsin EDTA (0.25%) at 37 °C for 2–5 min. Cell concentration was determined by counting the number of cells with a Neubauer chamber employing 4% trypan blue as a dye vital. Detached cells with viability $\geq 95\%$ were used for cell culture assays. For cytotoxicity assays, samples were washed with PBS and ethanol (70%) and UV-sterilized for 15 min. Samples were adhered to the wells (24-well culture plate) using a small drop of silicone (Silbione® MED ADH 4300 TRV, Bluestar Silicones France SAS, Lyon, France). Cell viability was determined at the endpoint for cell growth (96 h). The final count of cells was obtained by the MTT assay. Specifically, 50 μ L of MTT solution (5 mg mL⁻¹ in PBS)

was added to each well. After 3 h of incubation, samples were washed twice with PBS and stored in clean wells. To dissolve formazan crystals, 1 mL of DMSO/methanol/water (70/20/10% v/v) was added. Finally, the absorbance at 570 nm was measured using a UV-vis spectrophotometer. The resulting viability results were normalized to control as relative percentages. Each sample was evaluated in four replicates. Cell proliferation (or growth) was determined by its relative viability; this value was obtained by normalizing the number of cells in the samples to the number of cells in the control (*i.e.*, polystyrene plate with the treated surface for tissue culture, named TCPS).

Results and discussion

The successful grafting of PGAL onto PCLe by Fischer esterification reaction in acidic conditions using UV-photo-induction is corroborated by CP/MAS ¹³C-NMR (Fig. 1) and FT-IR spectroscopies (ESI†).

Comparing this spectrum with that for PGAL reported elsewhere,²⁹ where the carboxyl carbon signal appeared at $\delta = 177$ ppm, this signal is now shifted to a higher field (165.74 ppm) due to grafting. The absence of a signal at $\delta = 177$ ppm for PCLe-g-PGAL confirms all the PGAL molecules are grafted onto PCL. The $\delta = 120$ –140 ppm region displays resonances assigned to the aromatic carbons of the phenyl ring; 4 different signals are expected due to the C₂ symmetry axis across the phenyl ring. The complexity and paramagnetic nature of the molecule do not allow further resolution, however, three different resonances at $\delta = 126.41$, 129.53, and 133.79 ppm are observed, as well as an additional signal with a lower intensity at $\delta = 132.15$ ppm, assigned to the quaternary carbon directly attached to the carboxyl group, for which long relaxation times are expected. The theoretical investigation on the connectivity between PGAL and the PCLe surface also confirms the target molecule. These polymers feature COOH and OH functional groups, therefore, two different reaction pathways are considered, as shown in Fig. 2, employing GA and 6-hydroxyhexanoic acid units as model compounds. A nucleophilic attack of phenol from PGAL to a carboxyl pending group on the surface activated PCLe yields S1 through the S1-TS transition state; alternatively, the hydroxyl group from PCLe could attack the

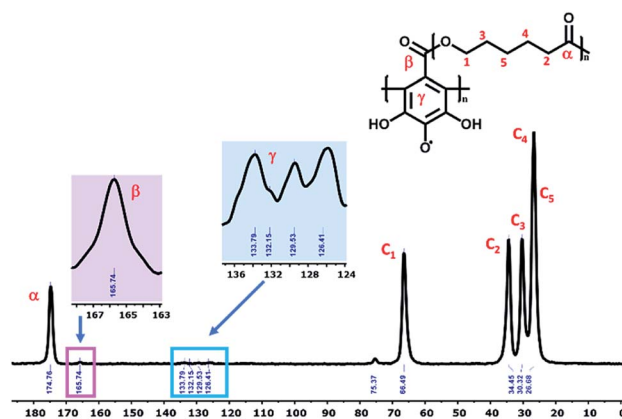


Fig. 1 Representative CP/MAS ¹³C-NMR spectrum of the PCLe-g-PGAL, taken at 400 MHz with a spinning frequency of 10 kHz.



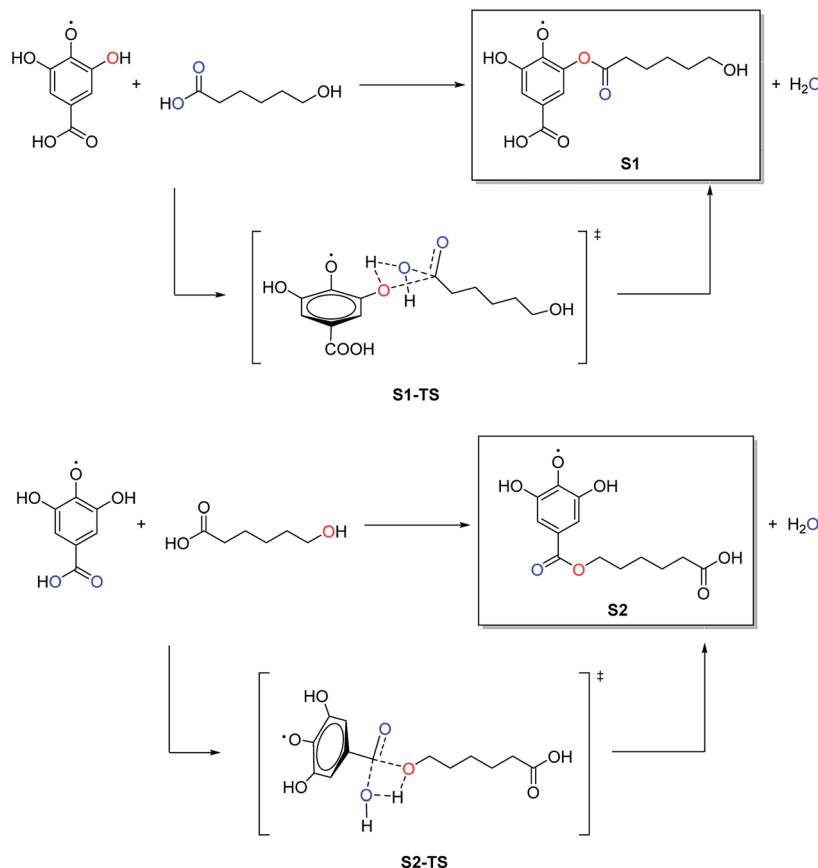


Fig. 2 Potential reaction pathways for the PCLe-*g*-PGAL employing GA and 6-hydroxyhexanoic acid units as model compounds.

carboxyl group of PGAL to yield the **S2** connectivity through the **S2-TS** transition state. Fig. 3 shows the results from scanning the energy reaction paths towards **S1** and **S2**, depicting ΔG_R values of 9.28 and -4.06 kcal mol $^{-1}$ for **S1** and **S2**, respectively.

The energetic difference of *ca.* 13 kcal mol $^{-1}$ between **S1** and **S2** might reasonably be accounted to improved stabilization of

the radical in **S2**, as the radical oxygen atom has two *ortho*-phenol groups which we recently found to participate extensively in hydrogen bonding within the PGAL backbone with stabilizing interaction energies in the 3–11 kcal mol $^{-1}$ regime.²⁸

It should be noted that although the energy of **S1-TS** is lowered with respect of **S2-TS** due to intramolecular hydrogen bonding, the reaction path towards **S1** is endergonic and consequently shifted to the reactants while the formation of **S2** is exergonic; thus for this process, **S1** and **S2** are kinetically and thermodynamically favoured, respectively.

Nonetheless, this reaction is expected to yield **S2** selectively at room temperature as the low activation energy for the backward reaction from **S1** to reactants is easily overcome at this temperature.

Moreover, the activation energy predicted for **S2** should be lowered due to the acidic conditions of the reaction (pH = 3),^{44,45} further favouring its selective formation over **S1**.

In summary, our DFT computations showed that under the conditions employed, the connectivity for the grafting of PGAL on the PCLe surface is largely that of hydroxyls from activated PCLe surface linked to the carboxyl in PGAL units, described as **S2** in this model.

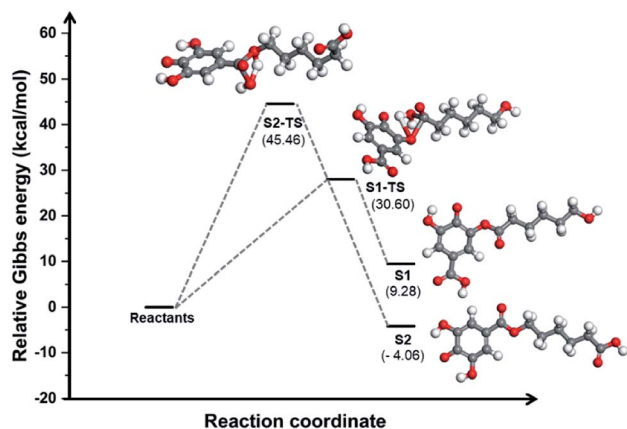


Fig. 3 Energy profile along two possible reaction paths for the PCLe-*g*-PGAL at the M06-2X/6-311++G(d,p) (PCM : water) level of theory employing GA and 6-hydroxyhexanoic acid units as model compounds.

Electrospinning of PCLc, PCLe, and PCLe-*g*-PGAL

In the present work, the electrospinning parameters are optimized to attain fibres with an average diameter of *ca.* 200 nm,



for PCLc these parameters are relatively well known but the stabilization of the spinning jet in the electrospinning of PCLc and PCLc-*g*-PGAL require increasing the polymer concentration in the solution. The best conditions for the electrospinning of these materials are gathered in Table 1.

All samples are dissolved in a chloroform/acetone mixture (2 : 1 v/v). A high concentration of 60 w/v% for PCLc-*g*-PGAL renders adequate viscosity in a relatively lower flow rate (2.5 mL h⁻¹) compared to that required for PCLc (4 mL h⁻¹), and in high voltage. These required parameters might be attributed to the relatively low molar mass in PCLc-*g*-PGAL.

Characterization of the electrospun fibers

SEM micrographs in Fig. 4 show the morphology of the electrospun scaffolds, revealing mostly homogeneous, continuous, and straight fibres with smooth surfaces for all samples. The electrospinning renders nanofibers with an average diameter near 200 nm, which is an adequate size for exhibiting a high level of porosity in the mat, with adequate gas permeation, and high surface-to-volume ratio. Of note is that these properties promote cell respiration, skin regeneration, moisture retention, removal of exudates, and homeostasis.⁴⁶

Fig. 5 describes representative histograms and Gaussian curves of diameter distributions for the different electrospun fibres to provide a quantification of the variability in samples.

The diameters for the PCLc and their derivative PCLc-*g*-PGAL fibres are similar, *i.e.* 218.45 ± 3 and 232.30 ± 8 nm, respectively, despite being obtained under different conditions. Moreover, the distribution of the enzyme-mediated polyester is the narrowest, while PCLc-*g*-PGAL has a wide distribution in the range of 100–400 nm. It is notorious that the population of fibres with a diameter >300 nm has a frequency close to 20%.

This trend toward large thread diameters is due to the high concentration of the polymer solution and the relatively low flow applied during the electrospinning. SEM micrographs and the histogram of the PCLc electrospun sample, on the other hand, show that the population has a smaller diameter size on average (*i.e.* 183.83 ± 8 nm) than the other products with only 10% of the distribution displaying diameters higher than 250 nm.

Antioxidant capacity

The solid-state ESR analysis for PCLc-*g*-PGAL fibres confirms the presence of the unpaired electron in the PGAL backbone. The characteristic ESR signal for PGAL shows a featureless hyperfine structure, as it depends on the magnetic moment of

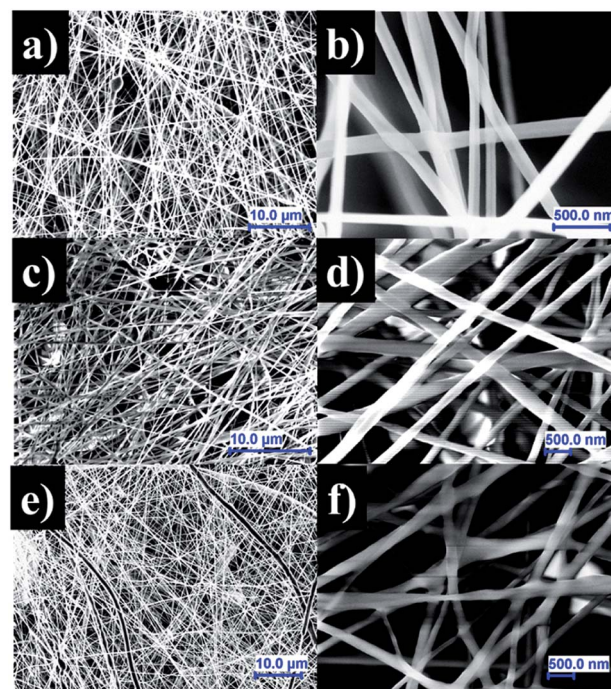


Fig. 4 SEM images of PCLc (a), PCLc (b), and PCLc-*g*-PGAL (c–f) electrospun fibres prepared under the optimized conditions.

the unpaired electron and the neighbouring nuclei with a spin number other than zero in agreement to previous work.²⁸ The ESR results for PCLc-*g*-PGAL are compared to that for PGAL measured under the same conditions. The analyses display an intense and narrow signal for the latter (*i.e.*, $\Delta H = 2.59$ G), which broadens for PCLc-*g*-PGAL (*i.e.*, $\Delta H = 13.25$ G) due to the decrease of the polyphenol concentration in the sample, which agrees to the Bleaney and Rubins relation (Fig. 6).⁴⁷ The Landé *g*-factor for PGAL is near 2.00, which is close to that for a free electron, and this value is preserved for the graft polymer. This leads to the conclusion that the multiradical character of the PGAL is preserved in the nanocomposite fibres. To make an approximation of antioxidant capacity, the IC₅₀ of the PCL-*g*-PGAL nanofibers is determined by DPPH. The RSA measured by UV-spectroscopy, shown in Fig. S3,† demonstrates the proportional inhibition of DPPH radical with the increase of PCL-*g*-PGAL concentration. The PCL-*g*-PGAL retained the antioxidant capacity of PGAL (*i.e.*, IC₅₀ = 23.48 μg mL⁻¹) with IC₅₀ *ca.* 104 μg mL⁻¹. The addition of CMC hydrogel could affect this property; notwithstanding previous works confirmed the antioxidant capacity of PGAL when crosslinked with CMC.²⁹

Table 1 Electrospinning parameters for the samples

Sample	Concentration (w/v%)	Flow rate (mL h ⁻¹)	Voltage (kV)	Distance (cm)
PCLc	25	5	15	15
PCLc	30	4	15	15
PCLc- <i>g</i> -PGAL	60	2.5	25	20



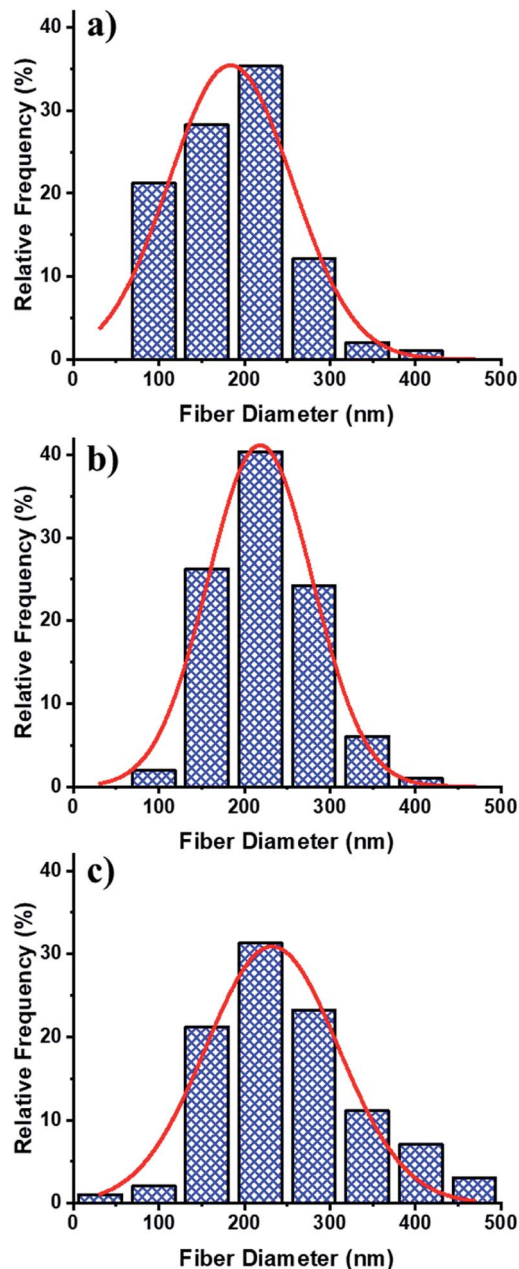


Fig. 5 Frequency distribution of the fibre diameter and Gaussian functions for PCLc (a), PCLe (b), and PCLe-g-PGAL (c) fibres.

Hybrid nanocomposite characterization

The surface morphology of the hybrid composite by SEM, shown in Fig. 7 (left), exemplifies that the hydrogel permeates differently for each sample. This observation might be ascribed to the porosities; the PCLc sample has a hydrogel coating on the surface, whereas PCLe and PCLe-g-PGAL display the best flow within the scaffold (Fig. 7-right).

This suggests that the hydrogel network is formed at greater depth in PCLe and PCLe-g-PGAL, while for PCLc, there is a deposition of hydrogel lumps on the surface of the fibres, thus causing insufficient permeation to form a network. The EDX mapping allows observing the distribution of the clindamycin

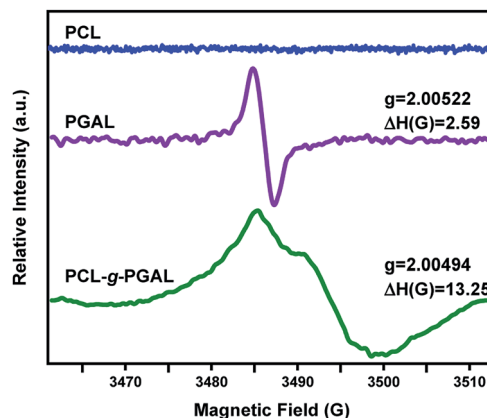


Fig. 6 Solid-state ESR spectra for PCLc (blue), PGAL (purple), and PCLe-g-PGAL (green) at 298 K. All measurements are at 9.78 GHz with a microwave power of 5 mW.

in these composites, and Fig. 7 (centre) marks the chlorine with cyan blue, with a homogeneous scattering of the drug in the material. This information is relevant because the release of the drug can be controlled, and it does not accumulate in a single region of the nanocomposite.

The water drop measurements indicate that the PCLc, PCLe, and PCLe-g-PGAL electrospun materials are hydrophobic (*i.e.*, $\theta > 115^\circ$) with a slightly lowest value for PCLe-g-PGAL owing to the hygroscopic hydroxyl groups in PGAL capable of forming hydrogen bonds and dipole-dipole interactions (Fig. 8). This wettability in the dressings is an important characteristic that influences the initial cell adhesion, and consequently, cell migration.⁴⁸ Once the hydrogel is embedded within the nanofibre, there is a reduction in the contact angle ($\Delta\theta \leq 82^\circ$), which is expected for matrices of hygroscopic materials. The wettability of the composites increases largely for those obtained

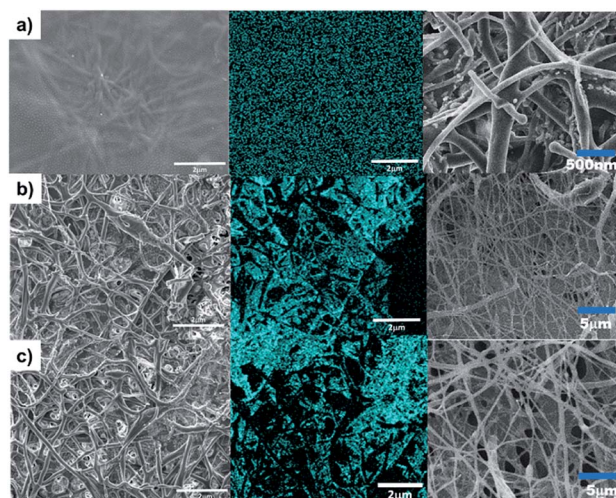


Fig. 7 SEM images of the hybrid composites. PCLc/CMC (a), PCLe/CMC (b) (scale bars = 2 μm) and PCLe-g-PGAL/CMC (c) composites surface (left) and qualitative EDX mapping for chloride element in cyan blue (center), transversal cut (right).



from PCLc at the observation of fibres superficially covered with the hydrogel, which agrees to the SEM analyses. However, the diameter size of the fibres also affects the materials, as PCLc presents higher hydrophobicity than PCLe, which might be explained by the slightly higher average nanofiber diameters. Specifically, the increase of the fibre diameter size leads to increasingly hydrophobic surfaces according to the Wenzel equation.⁴⁹

Therefore, the contact angles are influenced not only by the chemical structure on the surface but also by the fibre morphology. Nonetheless, the surface wettability increases by the grafting of PGAL, thus evidencing the impact of this polyphenol on the surface energy.

In summary, these results show that the physical properties (e.g. hydrophobic/hydrophilic surface characteristics) of this dressing can be tuned by changing the chemical composition and the fibre morphology, with the hybrid composites showing advantageous characteristics for potential biomedical applications.

Antimicrobial activity for PCLe-g-PGAL

The SPTT assay allows the determination of the antimicrobial activity of the composite by measuring the release rates of clindamycin. This assay determines the duration of activity under static conditions as a means of evaluating the potential of materials for clinical trials, and noteworthy, its ability to indicate duration because its serial procedure is superior to the one-day zone plate test.⁵⁰ This study, which is conducted until no inhibition zone is detected around the materials, shows no resistance to the antibiotic during the assay, and there is no inhibition around the non-antibiotic materials. The hydrogel/electrospun composites have three different degrees of citric acid crosslinking (2, 5, and 7.5 w/w%), which varies their ability to release clindamycin, as shown in Fig. 9.

Several factors are involved in the release of drugs from matrices, these include the drug molecular weight and its solubility in the matrix. Remarkably, the diffusivity of the drug

decreases with high molecular weights but the time of release increase with that of the molar mass distribution in the polymeric matrix.⁵¹ Of note is that the determination of the solubility of clindamycin, and any other drug, in a crosslinked matrix is experimentally challenging, therefore, this is generally inferred indirectly.⁵¹

In this regard, the clindamycin is highly soluble in the non-crosslinked matrix in water, so the amounts of the drug in each material (*i.e.* 0.6 mg) can be inferred considering that the hydrogel precursor displays a homogeneous distribution of the drug, which is corroborated by SEM analyses. The initial

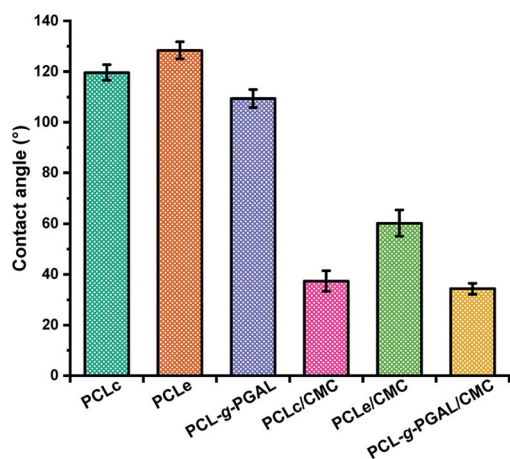


Fig. 8 Contact angles for PCLc, PCLe, and PCLe-g-PGAL scaffolds and PCLc/CMC PCLe/CMC and PCLe-g-PGAL/CMC samples.

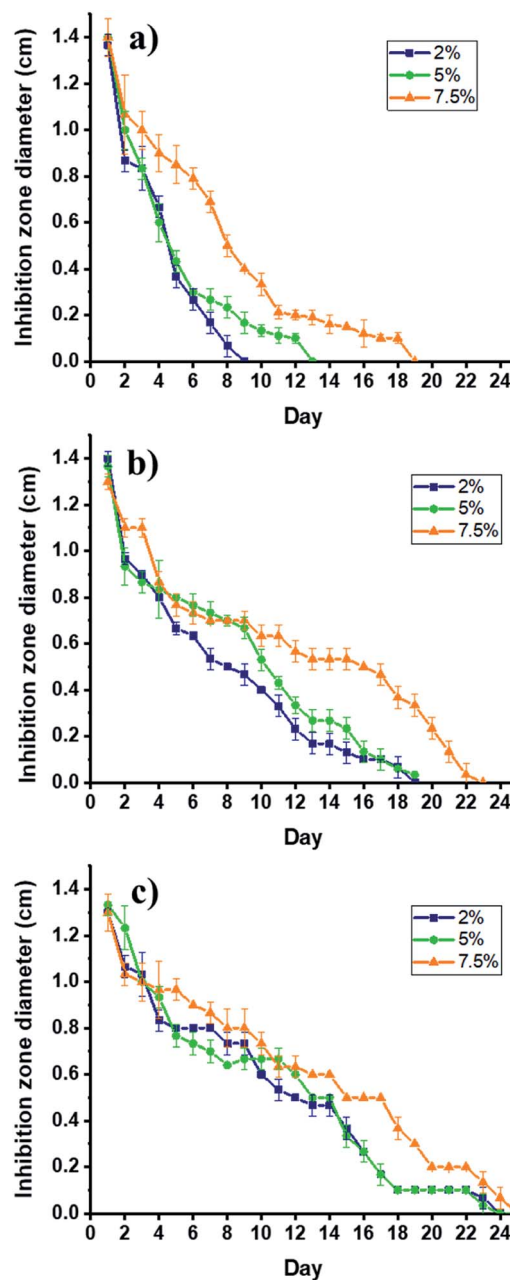


Fig. 9 Bactericidal activity PCLc/CMC (a); PCLe/CMC (b); and PCLe-g-PGAL/CMC (c) composites loaded with 2% (■), 5% (●) and 7.5% (▲) of clindamycin against *S. aureus* by SPTT assay.



bactericidal activity may be due to the dissolution of the particles directly accessible from the surface of the dressings. The high degree of persistent activity over time suggests the ability of the carrier hydrogel to diffuse through the matrix, as expected. However, there is a rapid release for PCLc-based dressings (*i.e.* 9, 13, and 19 days maximum), which correlates with the permeation of the hydrogel into the matrix, thereby producing the agglomeration of the drug on the surface. This behaviour is attributed to the low porosity of the scaffold, as the size of the fibres tends toward smaller sizes than those for PCLc and PCLc-g-PGAL. On the other hand, PCLc-g-PGAL shows longer retention time of the drug than that for PCLc.

This suggests the presence of available carbonyl groups of the PGAL for crosslinking with CMC, in agreement with previous work.²⁸ Consequently, the hydrogel is crosslinked to some extent to PGAL and the drug particles are likely imprisoned within the crosslinked network. This indicates that PGAL side chains improve the release time of the drug in addition to the antioxidant property. On the effect of the crosslinker, there are no significant differences between 2 and 5%, whereas the incorporation of 7.5% and beyond (data not shown) lengthen the release times due to crosslinking.^{21,52} Noteworthy, composites without loaded clindamycin show no antibacterial effect.

Drug delivery kinetics

Results obtained from the Cly release from the PCL/CMC composites and CMC hydrogels in PBS medium are shown in Fig. 10, and the corresponding kinetic parameters gathered in Table 2. The release mechanism of the hydrogel/electrospun composites is rather complex and influenced by several parameters as polymer degradation, hydrophobicity/philicity, hydrogel swelling, and solute diffusion. An approach, the power-law model (eqn (3)) developed by Ritger and Peppas⁴³ was applied to analyze the first 60% of drug fractional release.

The power n in eqn (3) was determined from the slope of the release fraction (F) vs. time log-log plot. The n values are used together with eqn (3) to calculate the release kinetic constant

Table 2 The diffusion constant and $T_{1/2}$ of clindamycin from drug loading PCL/CMC composites and CMC hydrogels in PBS

Sample	Citric acid (%)	n	k	r^2	$T_{1/2}$
PCLc/CMC	2	0.483 ± 0.020	0.292	0.9946	12.87
PCLc/CMC	5	0.489 ± 0.020	0.292	0.9861	14.08
PCLc/CMC	7.5	0.496 ± 0.016	0.249	0.9867	17.75
PCLe/CMC	2	0.486 ± 0.015	0.262	0.9981	19.21
PCLe/CMC	5	0.482 ± 0.013	0.246	0.9972	23.13
PCLe/CMC	7.5	0.463 ± 0.013	0.228	0.9927	24.01
PCL-g-PGAL/CMC	2	0.455 ± 0.013	0.198	0.9851	26.035
PCL-g-PGAL/CMC	5	0.431 ± 0.007	0.157	0.9888	50.83
PCL-g-PGAL/CMC	7.5	0.440 ± 0.007	0.144	0.9848	45.85
CMC	2	0.226 ± 0.019	0.618	0.9764	6.6
CMC	5	0.231 ± 0.020	0.619	0.9875	6.31
CMC	7.5	0.234 ± 0.022	0.564	0.9802	6.17

(k), which are also reported in Table 2. These values indicate that the Cly release from the nanocomposites follows a Fickian diffusion for all the crosslinking agent concentrations. The CMC hydrogels without electrospun fiber mat have the lowest release index n value (*i.e.*, 0.23), the largest release constant k (*i.e.* 0.6), and the fastest release time $T_{1/2}$ (6 h).

According to Gaharwar *et al.*,⁵³ the release of drugs through the water-filled pores of the hydrogel should have a release index n smaller than 0.5. In our results, a value of $n = 0.23$ for the CMC hydrogels suggests a rapid release because the pores in the hydrogel structure are rapidly filled with water, thereby causing swelling of the matrix.

This agrees with previous reports of drug delivery from a hydrogel.⁵⁴ On the other hand, the fitting results to Peppas power-law model indicate that the composite has a similar diffusional index n value, which means that the release Fickian mechanism is maintained. Instead, the constant k values are significantly lowered in comparison with pure CMC hydrogels, and they decrease with the increase of crosslinking agent (CA). The dependence of the constant k on diffusion path length and drug diffusivity could indicate that the presence of PCL nano-fiber significantly increased the diffusion path length and tortuosity for drug release.

Additionally, the hydrophobic PCL electrospun fiber mats serve as an additional diffusion barrier to decrease the effective diffusion coefficients, thus reducing hydrogel swelling and water penetration rates as previously demonstrated by Han *et al.*⁵⁵ Of note is that the PGAL also reduces the constant k , which might be ascribed to the drastic reduction of the swelling behavior for CMC when crosslinked to this polyphenol, in agreement to the previous study,²⁹ thereby the swelling is abated up to 90%. Noteworthy, the influence of PGAL is also evidenced by the mean release time ($T_{1/2}$), which increases significantly.

Hemolytic activity and cell viability

The nanocomposites behaviour against red blood human cells in the agar well diffusion method shows no hemolysis.⁵⁶ The clear formation of an inhibition halo (*ca.* 5 mm) around the

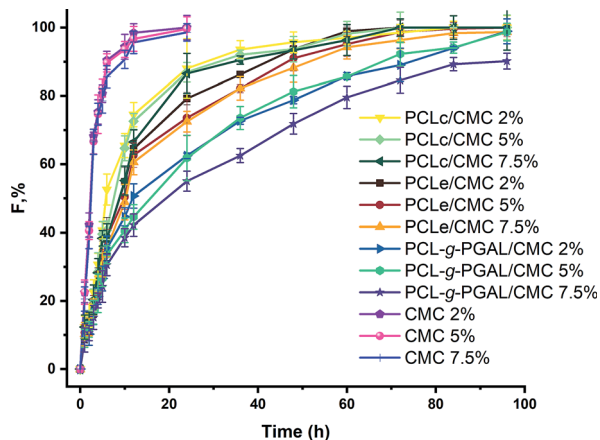


Fig. 10 Cly release profiles from composites and hydrogels in PBS, pH = 7.4. Values correspond to the average while the error bars indicate the standard deviations (*i.e.* assays were carried out for triplicate).



water-filled well was observed, which was used as a positive control. Conversely, none of the composites induced the formation of a zone of hemolysis. These data of human erythrocytes confirm that the materials are not cytotoxic, and therefore, suitable for application in wound treatment because they are not affecting the integrity of the membrane and consequently cell lysis does not occur. On the other hand, viability experiments with seeded cells on PCLc, PCLe, and PCLe-g-PGAL electrospun fibres (see ESI data† for Vero cell viability on PCLc, PCLe and PCLe-g-PGAL electrospun, cells at 96 h of culture) demonstrate no cytotoxic effects on cell surfaces, and it displays viability entirely comparable with that for the surface of the culture plate (TCPS).

In summary, these materials are not cytotoxic and do not affect cell growth, thus demonstrating that PCLe-g-PGAL-based material is safe for use in biomedical applications.

Conclusions

The clindamycin loaded in a CMC hydrogel crosslinked to electrospun PCL-g-PGAL shows improved characteristics for a wound dressing regarding its antioxidant, antibacterial, and morphological characteristics. Analytical and theoretical studies sustain the consecution of the grafting of PGAL onto PCLe, where the esterification from a PGAL carboxyl group to a hydroxyl of the activated polyester surface is kinetically favoured. The formed nanofibres show average diameters slightly above 200 nm for this polymer in a narrow distribution. Besides the antioxidant effect, PGAL also increases the hydrophilicity of the biomaterial and the results evidence the crosslinking of this polyphenol to CMC which improves drug diffusion rates. Finally, the PCL-g-PGAL shows no hemolytic activity in cells and it does not affect the viability of epithelial cells. Further progress will require continued assessment *in vivo* to identify ways to use this hybrid nanocomposite for wound healing.

Live subject statement

We declare that human consent was obtained for all blood donations following the Code of Ethics stated in the International Society of Blood Transfusion, and approved by the committee of human blood transfusions under the supervision of the Head of the Food and Biotechnology Department of the Faculty of Chemistry at the National Autonomous University of Mexico.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We thank DGAPA-UNAM for funding (PAPIIT IN200520) and CONACyT for doctoral scholarships for A. R.-M. (336576) and P. L.-V. (337958). The authors are in debt to support from MINECO and FEDER (RTI2018-101827-B-I00) and the Generalitat de Catalunya (2017SGR373).

References

- 1 J. Tavakoli and Y. Tang, *Mater. Sci. Eng., C*, 2017, **77**, 318–325.
- 2 M. Contardi, J. A. Heredia-Guerrero, G. Perotto, P. Valentini, P. P. Pompa, R. Spanò, L. Goldoni, R. Bertorelli, A. Athanassiou and I. S. Bayer, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2017, **104**, 133–144.
- 3 K. Totoraitis, J. L. Cohen and A. Friedman, *J. Drugs Dermatol.*, 2017, **16**, 209–212.
- 4 H. A. Tran, K. L. Ly, K. E. Fox, P. A. Tran and T.-H. Nguyen, *Int. J. Nanomed.*, 2019, **14**, 9929.
- 5 I. Ludolph, F. W. Fried, K. Knepp, A. Arkudas, M. Schmitz and R. E. Horsch, *Int. Wound J.*, 2018, **15**, 978–984.
- 6 M. Zhai, Y. Xu, B. Zhou and W. Jing, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2018, **180**, 253–258.
- 7 L. Mei, R. Fan, X. Li, Y. Wang, B. Han, Y. Gu, L. Zhou, Y. Zheng, A. Tong and G. Guo, *Polym. Chem.*, 2017, **8**, 1664–1671.
- 8 P. Zahedi, I. Rezaeian, S. O. Ranaei-Siadat, S. H. Jafari and P. Supaphol, *Polym. Adv. Technol.*, 2010, **21**, 77–95.
- 9 M. di Luca, M. Curcio, E. Valli, G. Cirillo, M. E. Butini, A. Farfalla, E. Pantuso, A. Leggio, F. P. Nicoletta and A. Tavanti, *J. Mater. Chem. B*, 2019, **7**, 4361–4370.
- 10 T. Amna, F. N. Gharsan, K. Shang, M. S. Hassan, M.-S. Khil and I. Hwang, *Macromol. Res.*, 2019, **27**, 663–669.
- 11 S. M. Lee, I. K. Park, Y. S. Kim, H. J. Kim, H. Moon, S. Mueller and Y.-I. Jeong, *Biomater. Res.*, 2016, **20**, 15.
- 12 M. Yoshimura, N. Ohura, J. Tanaka, S. Ichimura, Y. Kasuya, O. Hotta, Y. Kagaya, T. Sekiyama, M. Tannba and N. Suzuki, *Int. Wound J.*, 2018, **15**, 188–197.
- 13 C.-Y. Chin, J. Jalil, P. Y. Ng and S.-F. Ng, *J. Ethnopharmacol.*, 2018, **212**, 188–199.
- 14 S. Tyeb, N. Kumar, A. Kumar and V. Verma, *Carbohydr. Polym.*, 2018, **200**, 572–582.
- 15 D. S. Yoon, Y. Lee, H. A. Ryu, Y. Jang, K.-M. Lee, Y. Choi, W. J. Choi, M. Lee, K. M. Park and K. D. Park, *Acta Biomater.*, 2016, **38**, 59–68.
- 16 M. Comotto, S. Saghazadeh, S. Bagherifard, B. Aliakbarian, M. Kazemzadeh-Narbat, F. Sharifi, S. A. Mousavi Shaeigh, E. Arab-Tehrany, N. Annabi and P. Peregó, *J. Biomater. Appl.*, 2019, **33**, 1265–1276.
- 17 I. Garcia-Orue, G. Gainza, F. B. Gutierrez, J. J. Aguirre, C. Evora, J. L. Pedraz, R. M. Hernandez, A. Delgado and M. Igartua, *Int. J. Pharm.*, 2017, **523**, 556–566.
- 18 S. Gilotra, D. Chouhan, N. Bhardwaj, S. K. Nandi and B. B. Mandal, *Mater. Sci. Eng., C*, 2018, **90**, 420–432.
- 19 J. Haik, R. Kornhaber, B. Blal and M. Harats, *Adv. Wound Care*, 2017, **6**, 166–174.
- 20 L. A. Bosworth, L.-A. Turner and S. H. Cartmell, *Nanomedicine*, 2013, **9**, 322–335.
- 21 H. Namazi, R. Rakhshaei, H. Hamishehkar and H. S. Kafil, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, **85**, 327–334.
- 22 A. Francesko, P. Petkova and T. Tzanov, *Curr. Med. Chem.*, 2018, **25**, 5782–5797.
- 23 R. Lalani and L. Liu, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 1853–1863.



- 24 X. Yang, L. Fan, L. Ma, Y. Wang, S. Lin, F. Yu, X. Pan, G. Luo, D. Zhang and H. Wang, *Mater. Des.*, 2017, **119**, 76–84.
- 25 Z. Tang, C. He, H. Tian, J. Ding, B. S. Hsiao, B. Chu and X. Chen, *Prog. Polym. Sci.*, 2016, **60**, 86–128.
- 26 G. Amariei, V. Kokol, K. Boltjes, P. Letón and R. Rosal, *RSC Adv.*, 2018, **8**, 28013–28023.
- 27 A. Romero-Montero, L. J. del Valle, J. Puiggalí, C. Montiel, R. García-Arrazola and M. Gimeno, *Mater. Sci. Eng., C*, 2020, **115**, 111154.
- 28 A. Romero-Montero, M. Gimeno, N. Farfán and P. Labra-Vázquez, *J. Mol. Struct.*, 2019, **1197**, 326–335.
- 29 A. Romero-Montero, A. Tecante, R. García-Arrazola, C. Montiel, L. J. del Valle, J. Puiggalí and M. Gimeno, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 17660–17669.
- 30 J. López, J. M. Hernández-Alcántara, P. Roquero, C. Montiel, K. Shirai, M. Gimeno and E. Bárzana, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2013, **97**, 100–105.
- 31 R. Sánchez-Sánchez, A. Romero-Montero, C. Montiel, Y. Melgarejo-Ramírez, C. Sánchez-Ortega, H. Lugo-Martínez, B. Cabello-Arista, R. García-Arrazola, C. Velasquillo and M. Gimeno, *Mater. Sci. Eng., C*, 2017, **76**, 417–424.
- 32 A. Karczewski, S. A. Feitosa, E. I. Hamer, D. Pankajakshan, R. L. Gregory, K. J. Spolnik and M. C. Bottino, *J. Endod.*, 2018, **44**, 155–162.
- 33 A. Hebeish, M. Hashem, M. M. Abd El-Hady and S. Sharaf, *Carbohydr. Polym.*, 2013, **92**, 407–413.
- 34 T. W. Wong and N. A. Ramli, *Carbohydr. Polym.*, 2014, **112**, 367–375.
- 35 R. García-Arrazola, M. Gimeno and E. Bárzana, *Macromolecules*, 2007, **40**, 4119–4120.
- 36 F. Xu, Z. Wang and W. Yang, *Biomaterials*, 2010, **31**, 3139–3147.
- 37 M. J. Frisch; G. W. Trucks; H. B. Schlegel; G. E. Scuseria; M. A. Robb; J. R. Cheeseman; G. Scalmani; V. Barone; G. A. Petersson; H. Nakatsuji; X. Li; M. Caricato; A. V. Marenich; J. Bloino; B. G. Janesko; R. Gomperts; B. Mennucci; H. P. Hratchian; J. V. Ortiz; A. F. Izmaylov; J. L. Sonnenberg; D. Williams-Young; F. Ding; F. Lipparini; F. Egidi; J. Goings; B. Peng; A. Petrone; T. Henderson; D. Ranasinghe; V. G. Zakrzewski; J. Gao; N. Rega; G. Zheng; W. Liang; M. Hada; M. Ehara; K. Toyota; R. Fukuda; J. Hasegawa; M. Ishida; T. Nakajima; Y. Honda; O. Kitao; H. Nakai; T. Vreven; K. Throssell; J. A. Montgomery Jr; J. E. Peralta; F. Ogliaro; M. J. Bearpark; J. J. Heyd; E. N. Brothers; K. N. Kudin; V. N. Staroverov; T. A. Keith; R. Kobayashi; J. Normand; K. Raghavachari; A. P. Rendell; J. C. Burant; S. S. Iyengar; J. Tomasi; M. Cossi; J. M. Millam; M. Klene; C. Adamo; R. Cammi; J. W. Ochterski; R. L. Martin; K. Morokuma; O. Farkas; J. B. Foresman and D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision D.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- 38 Y. Zhao and D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.*, 2008, **120**, 215–241.
- 39 M. E. Ochoa, P. Labra-Vázquez, N. Farfán and R. Santillan, *Cryst. Growth Des.*, 2018, **18**, 2795–2803.
- 40 J. Tomasi, B. Mennucci and R. Cammi, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 2999.
- 41 N. Treitel, R. Shenhar, I. Aprahamian, T. Sheradsky and M. Rabinovitz, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, **6**, 1113–1121.
- 42 Y. Inada and H. Orita, *J. Comput. Chem.*, 2008, **29**, 225–232.
- 43 P. L. Ritger and N. A. Peppas, *J. Controlled Release*, 1987, **5**, 37–42.
- 44 T. Yu, H.-B. Chang, W.-P. Lai and X.-F. Chen, *Polym. Chem.*, 2011, **2**, 892–896.
- 45 M. Vafaezadeh and A. Fattahi, *Comput. Theor. Chem.*, 2015, **1071**, 27–32.
- 46 K. A. Rieger, N. P. Birch and J. D. Schiffman, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 4531–4541.
- 47 B. Bleaney and R. Rubins, *Proc. Phys. Soc.*, 1961, **77**, 103.
- 48 M. Nakamura, N. Hori, H. Ando, S. Namba, T. Toyama, N. Nishimiya and K. Yamashita, *Mater. Sci. Eng., C*, 2016, **62**, 283–292.
- 49 M. Lampin, R. Warocquier-Clérout, C. Legris, M. Degrange and M. Sigot-Luizard, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997, **36**, 99–108.
- 50 R. Bayston, L. E. Fisher and K. Weber, *Biomaterials*, 2009, **30**, 3167–3173.
- 51 R. Bayston and R. Milner, *J. Clin. Pathol.*, 1981, **34**, 1057–1062.
- 52 N. S. Capanema, A. A. Mansur, A. C. de Jesus, S. M. Carvalho, L. C. de Oliveira and H. S. Mansur, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, **106**, 1218–1234.
- 53 A. K. Gaharwar, N. A. Peppas and A. Khademhosseini, *Biotechnol. Bioeng.*, 2014, **111**, 441–453.
- 54 T. L. Tsou, S. T. Tang, Y. C. Huang, J. R. Wu, J. J. Young and H. J. Wang, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2005, **16**, 95–100.
- 55 N. Han, J. Johnson, J. J. Lannutti and J. O. Winter, *J. Controlled Release*, 2012, **158**, 165–170.
- 56 S. Prakash, R. Ramasubburayan, V. S. Ramkumar, E. Kannapiran, A. Palavesam and G. Immanuel, *Biomed. Pharmacother.*, 2016, **83**, 648–657.

