



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL POLI (ÁCIDO GÁLICO) Y
DERIVADOS SINTETIZADOS ENZIMÁTICAMENTE

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. MIGUEL ANGEL HERNANDEZ VALDEPEÑA

TUTOR: DR. MIQUEL GIMENO SECO PROGRAMA DE MAESTRÍA
Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Comité tutorial:

DR. EDUARDO BARZANA GARCÍA
DRA. ROMINA MA. DE LA PAZ RODRIGUEZ SANOJA
FACULTAD DE QUÍMICA

Ciudad de México, febrero de 2021



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. AMELIA GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA

Secretario: DRA. SUSANA PORCEL GARCÍA

1 er. Vocal: DR. ALBERTO ROSAS ABURTO

2 do. Vocal: DRA. ANGÉLICA ROMAN GUERRERO

3 er. Vocal: DR. ROEB GARCÍA ARRAZOLA

Lugar donde se realizó la tesis: Laboratorio 314, conjunto E de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

Dr. Miquel Gimeno Seco

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Miquel Gimeno Seco', is written over a horizontal dashed line. The signature is stylized and somewhat abstract.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio E-314 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (FQ-UNAM) con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de becario 299544 y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN200520.

Derivado de este proyecto de doctorado, se generó el artículo “Antioxidant and antimicrobial material by grafting of L-Arginine onto enzymatic poly (gallic acid)” (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111650>) en la revista Materials Science and Engineering: C

Agradecimientos

- *A la causal de todas de todas las cosas, en cuyo aleatorio comportamiento me he dejado llevar, culminando en este momento y este lugar.*
- *A mi universidad, que me ha criado y formado, volviéndome el profesionalista que soy, y a la cual espero devolver, aunque sea un poco de lo que me dio en el transcurso de mi vida.*
- *A mis padres Miguel y María Luisa, que me han demostrado que la necedad puede ser una virtud muy redituable.*
- *A mis hermanos Luis y Manuel, cuyo apoyo ha sido invaluable en varios momentos de los últimos 5 años de mi vida.*
- *Al Dr. Miquel Gimeno, por los años que ha invertido en mi por venir y formación académica.*
- *A los Dres. Romina Rodríguez y Eduardo Barzana, por ayudarme a encaminar este proyecto de doctorado.*
- *A la Dra. Carmen Guadalupe Hernandez, por su amistad, así como sus conocimientos y capacidades que ha imbuido en mí.*
- *A los Dres. Keiko Shirai, Carmina Montiel, Gloria Diaz, Alberto Rosas y José Pedraza, por su paciencia, inteligencia y contribuciones a mi proyecto.*
- *A mis amigos César Hernandez, Enrique Min, Sergio Esquivel y Américo Mendoza, por ayudarme a extender mis alas y romper mis barreras mentales.*
- *A mis amigas Dra. Eva Bermúdez y Lic. Julieta Sandoval, por proveerme de risas, complicidad y experiencia en el trabajo.*
- *A mis compañeros del Laboratorio E-314, por hacerme entender que la verdadera paciencia es una virtud.*

Contenido

Resumen.....	8
Abstract.....	9
1. ANTECEDENTES.....	10
1.1. Resistencia bacteriana a antibióticos.....	10
1.2. Polímeros antimicrobianos y análogos sintéticos	11
1.2.1. L-Arg, AMPs y SMAMPs	13
1.3. Polifenoles y el ácido gálico.....	13
1.3.1. PGAL como posible polímero base para aplicaciones antimicrobianas.....	14
1.4. Propuesta de modificación: Síntesis asistida por microondas	15
2. HIPÓTESIS.....	17
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo General	17
3.2. Objetivos Particulares	17
4. METODOLOGÍA	18
4.1. Protocolos de síntesis.....	18
4.1.1. Polimerización de ácido gálico	18
4.1.2. Síntesis de PGAL-g-L-Gly	18
4.1.3. Síntesis de PGAL-g-L-Arg.....	19
4.2. Protocolos de determinación de estructura.....	20
4.2.1. Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC/GPC).....	20
4.2.2. Determinación de grado de funcionalización.....	20
4.2.3. RMN- ¹ H y Espectroscopia de Infrarrojo.....	21
4.2.4. Análisis térmico.....	21
4.3. Protocolos de capacidades antioxidantes	21
4.3.1. Determinación de inhibición de radical DPPH	21

4.3.2.	Determinación de FRAP	22
4.3.3.	Determinación de ORAC.....	22
4.3.4.	Determinación de retraso de radical HO•.....	23
4.4.	Protocolos de capacidades antimicrobianas	24
4.4.1.	Determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC)	24
4.4.2.	Determinación de concentración mínima bactericida (MBC).....	25
4.4.3.	Viabilidad celular por fluorescencia confocal	25
4.4.4.	Microscopía electrónica de barrido.....	26
4.4.5.	Captación de cristal violeta.....	26
4.5.	Protocolos de citocompatibilidad	27
4.5.1.	Prueba de actividad hemolítica.....	27
4.5.2.	Ensayo de viabilidad eucariota	27
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
5.1.	Caracterización del PGAL.....	29
5.2.	Reacciones de modificación y parámetros preponderantes	30
5.2.1.	Modelo de L-Gly y PGAL.....	30
5.2.2.	Modificación de PGAL con L-Arg	37
5.2.3.	Caracterización del compuesto PGAL-g-L-Arg	38
5.3.	Efecto antioxidante de las moléculas en estudio.....	44
5.4.	Efecto antimicrobiano de los diferentes compuestos	47
5.5.	Citocompatibilidad de los diferentes materiales.....	56
6.	CONCLUSIONES	58
7.	REFERENCIAS.....	59

Índice de Figuras

Figura 1. Ejemplos de mecanismo de inhibición de AMPs y SMAMPs.....	12
Figura 2. Reacción de polimerización del ácido gálico en PGAL	14
Figura 3. Esquema de reacción para la síntesis de PGAL-g-L-Arg.....	16
Figura 4. Microondas de síntesis orgánica con refrigerante acoplado.....	19
Figura 5. Reacción del TNBSA con un aminoácido, generando una anilina cromófora.....	20
Figura 6. Diagrama de reacción para la técnica de ORAC (Zulueta et al., 2009).....	23
Figura 7. Espectros de RMN- ¹ H de PGAL-g-L-Gly (A), L-Gly (B) y PGAL (C).....	29
Figura 8. Espectros de RMN- ¹ H de PGAL-g-L-Arg (A), L-Arg (B) y PGAL (C).....	40
Figura 9. Espectros FTIR de PGAL-g-L-Arg (A), L-Arg (B) y PGAL (C).....	41
Figura 10. TGA de PGAL, L-Arg y PGAL-g-L-Arg.....	42
Figura 11. Primera derivada de TGA de PGAL, L-Arg y PGAL-g-L-Arg.....	43
Figura 12. Porcentajes de inhibición del radical DPPH con los distintos materiales.	45
Figura 13. Evaluación del efectp antimicrobiano de PGAL-g-L-Arg (incorporación al 23%) a diferentes concentraciones contra S. aureus, L. monocytogenes y E. coli.....	48
Figura 14. Microscopias confocales sobreposicionadas de las distintas bacterias en presencia o ausencia de materiales.	51
Figura 15. Cuantificación de la viabilidad de bacterias expuestas a PGAL y PGAL-g-L-Arg en fluorescencia confocal.....	52
Figura 16. Efecto de PGAL y PGAL-g-L-Arg en la permeabilidad de la membrana bacteriana.....	53
Figura 17. Micrograffías SEM de las bacterias susceptibles en presencia o ausencia de PGAL y PGAL-g-L-Arg a MIC.....	54
Figura 18. Propuesta de mecanismo de inhibición de PGAL-g-L-Arg sobre Gram +	55
Figura 19. Efecto de los diferentes tratamientos en el ensayo de hemólisis: (A) Agua, (B) Buffer de fosfato, (C) PGAL y (D) PGAL-g-L-Arg	57
Figura 20. Viabilidad linfocitaria PGAL y PGAL-g-L-Arg contra control en los ensayos de MTT y rojo neutro	58

Índice de Tablas

Tabla 1. Variables evaluadas para determinar el dominio experimental.....	32
Tabla 2. Definición de niveles y variables del diseño experimental.....	33
Tabla 3. Diseño factorial fraccionado 2^{5-2}	33
Tabla 4. "Fold-over" de diseño factorial fraccionado 2^{5-2}	35
Tabla 5. Relación de efectos de variables.	36
Tabla 6. Relación de parámetros para los experimentos de incorporación de la L-Arg	37
Tabla 7. Diseño experimental 2^3 y grado de incorporación de L-Arg en los distintos experimentos	38
Tabla 8. Número promedio de peso molecular (M_n) y grado de incorporación y ensayos antioxidantes para PGAL y PGAL-g-L-Arg	39
Tabla 9. Ensayos antioxidantes para PGAL y PGAL-g-L-Arg.....	46
Tabla 10. MIC y MBC del PGA, L y PGAL-g-L-Arg a distintos grados de incorporación.	49

Resumen

El presente trabajo busca aumentar las aplicaciones potenciales de la molécula de Poli (ácido gálico), en adelante relatada como PGAL, mediante la incorporación de L-arginina como cadena lateral. Previo a esta incorporación, se realizó una inserción de L-glicina en PGAL, con el fin de obtener un modelo estándar de modificación para múltiples aminoácidos, la adición de L-Gly y L-Arg ocurre en condiciones y con materiales inocuos. El modificado PGAL-g-L-Arg, fue caracterizado por las técnicas analíticas de ácido trinitrobencen-sulfónico para determinar el grado de incorporación, las espectroscopías de Resonancia magnética nuclear de protón (RMN-1H) e Infrarrojo y análisis por termogravimétrico. Logrando un grado de incorporación del 23% de L-Arginina (L-Arg), la que ocurre mediante la formación de enlaces amida y éster entre el aminoácido y el PGAL con una relación de 3:1. La modificación se realizó con el fin de otorgar a este oligómero la capacidad de inhibir bacterias con algún mecanismo disruptivo de membrana con el fin de ser usado como compuesto sintético mimético de péptido antimicrobiano (SMAMP). Esta capacidad se evaluó en cepas de *Streptococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, las cuales fueron seleccionadas debido a su conformación de membrana y a su interés etiológico. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC de 0.85 g/L), concentración mínima bactericida (MBC de 1.7 g/L), la afectación de la viabilidad celular por par de fluorescencia SYTO 9 y yoduro de propidio, captación de cristal violeta y microscopia electrónica de barrido. El modificado, PGAL-g-L-Arg, demostró el efecto bactericida por formación de poros en las bacterias Gram (+) a la MIC, comportamiento que hace idóneo al modificado para combatir bacterias multirresistentes, no obstante, esta acción no fue detectable en la cepa de *E. coli*. Otras características estudiadas en el compuesto fueron sus capacidades antioxidantes: Capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP de 0.52 eq mM de Trolox), concentración media de retraso de radicales difenilpicrilhidrazilo (IC₅₀ DPPH 1.43 g/L), concentración media de capacidad de captación de radicales de oxígeno (IC₅₀ ORAC 615.34 μM) y captación de radicales alcóxilo (9.48 eq mM de Trolox) resultando en un poder antioxidante medio. La citocompatibilidad del compuesto con células eucariotas se realizó usando células sanguíneas humanas como modelo, sin efectos citotóxicos relacionados a hemólisis, o estrés celular a nivel mitocondrial y lisosomal, por lo que puede ser usado en aplicaciones biomédicas.

Abstract

The present work expands the potential applications of the Poly (gallic acid) molecule, hereinafter referred to as PGAL, through the incorporation of L-arginine as a side chain. Prior to this incorporation, an insertion of L-glycine in PGAL was made, in order to obtain a standard model of modification for multiple amino acids, the addition of both L-Gly and L-Arg occurs under innocuous conditions and with harmless materials. The modified polymer, PGAL-g-L-Arg, was characterized by trinitrobenzene-sulfonic acid method to assess the amino acid grafted, as well as proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) and Infrared spectroscopies, and by means of thermogravimetry. Achieving the highest degree of incorporation was 23% of L-Arg throughout the formation of amide and ester bonds between the amino acid and the PGAL with a 3:1 ratio. The modification was carried out to give this oligomer the ability to inhibit bacteria with some membrane disruptive mechanism and be used as a synthetic mimic antimicrobial peptide compound (SMAMP). This ability was studied on *Streptococcus aureus*, *Leisteria monocytogenes* and *Escherichia coli* strains. The discussion herein is supported by detected minimum inhibitory concentration (MIC of 0.85 g / L), minimum bactericidal concentration (MBC of 1.7 g / L), the affectation of cell viability by SYTO 9 /propidium iodide fluorescence pair, crystal violet uptake assays, as well as scanning electron microscopy. The PGAL-g-L-Arg demonstrated the bactericide effect mainly by pore formation mechanism for the Gram (+) bacteria at the MIC, a behavior that makes the compound ideal for combating multi-resistant bacteria; however, this action was not detectable for *E. coli*, which presented a bacteriostatic effect. Other characteristics studied for this novel compound were its antioxidant capacities: iron reduction ability of plasma (FRAP of 0.52 eq mM of Trolox), half concentration of scavenging of diphenylpicrylhydrazyl radicals (IC₅₀ DPPH 1.43 g/L), half concentration of oxygen radical absorbance capacity (IC₅₀ ORAC 615.34 μM) and alkoxy radical scavenging (9.48 eq mM of Trolox) resulting in a medium antioxidant power. The cytocompatibility of the compound with eukaryotic cells was performed using human blood cells as a model, without cytotoxic effects related to hemolysis, or cellular stress at the mitochondrial and lysosomal level, allowing it to be used in biomedical applications.

1. ANTECEDENTES

1.1. Resistencia bacteriana a antibióticos

Nuestra historia moderna con los antibióticos comienza con el verdadero impacto en nuestra sociedad debido al descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming de la Universidad de Westminster (RU) en 1928, así como su aplicación para fines terapéuticos (Gould, 2016); gracias a este compuesto y a todos los que le siguieron, la prevención y control de los efectos de los patógenos bacterianos se han desarrollado tal como la conocemos. No obstante, el uso desmedido de éstos, tanto en nuestra especie como en las especies de las que nos alimentamos, ha generado la existencia de bacterias resistentes a fármacos, las cuales repercuten a nivel social, económico y médico (WHO et al., 2014).

Todo punto en el globo que haya tenido contacto con la civilización moderna no sólo ha sido tocado por estos "súper bichos", también tiene el riesgo de sucumbir ante ellos. Tan sólo en EE. UU. se estima que cada año 2 millones de personas son infectadas por cepas de bacterias resistentes, y 23,000 han muerto por causa de éstas. Por su parte en México, existen reportes de un lapso de 40 años que permite entender el fenómeno evolutivo de resistencia; encontrando cepas con dicha capacidad de *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus spp.*, entre otros (Chantziaras et al., 2014). Los riesgos que conlleva la existencia de estos microorganismos, es una problemática vigente y urgente, por lo cual, el manejo responsable de antibióticos, el control de infecciones provocadas por las bacterias multirresistentes y la creación de compuestos, son de importancia crítica. El listado de bacterias que han evolucionado en cepas de alta resistencia a fármacos se describe según el orden de prioridad por la OMS, y en prioridad uno crítica, tenemos a *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos; *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos; y *Enterobacteriaceae*, resistentes a los carbapenémicos, productoras de enzimas resistentes a las beta-lactamas como lo son la penicilina y las cefalosporinas. Con prioridad 2, que implica elevada, a *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina; *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina; *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina. *Campylobacter spp.*,

resistente a las fluoroquinolonas. *Salmonellae*, resistentes a las fluoroquinolonas, y *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas. Por último, como prioridad media o 3, tenemos a *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina. *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina, y la *Shigella spp.*, resistente a las fluoroquinolonas. Según la OMS el índice de fallecimientos mundiales si seguimos con esta tendencia superará a los provocados por el cáncer a mediados de este siglo, por lo que es de interés el estudio de la producción de agentes bactericidas de baja resistencia. Es de especial relevancia las infecciones nosocomiales por bacterias, así como los efectos secundarios derivados de la alta carga de antibióticos perioperatorios y profilaxis en general. Por último y no menos importante, son las reacciones alérgicas cada vez en mayor frecuencia en los seres humanos debido a la exposición a fármacos.

1.2. Polímeros antimicrobianos y análogos sintéticos

Debido al auge de estas bacterias resistentes y posibles reacciones paralelas en el organismo, se han investigado alternativas a los antibióticos comunes de síntesis química o biotecnológica, esta búsqueda puede encaminarse en aras de encontrar compuestos más específicos que sean capaces de atacar a las bacterias, sin efectos secundarios indeseables, desde algún paso metabólico importante, o bien, buscar compuestos con menor especificidad. Para el último de estos casos, la incidencia sobre la membrana bacteriana es una de las mejores opciones, ya que la composición esencial de este organelo no puede ser alterada de forma rápida a través de los mecanismos de resistencia. En este sentido, los péptidos antimicrobianos (AMPs) y los imitadores sintéticos de péptidos antimicrobianos (SMAMPs) han tomado relevancia recientemente debido a su capacidad de interferir con membranas de las células procariotas (Figura 1). Entre las características de la membrana, una que destaca es su naturaleza de multianión por los grupos fosfato unidos a los diglicéridos que dan hidrofobicidad a esta cobertura. Gracias a este conocimiento, se han buscado y desarrollado polímeros y oligómeros con múltiples cargas positivas o con regiones hidrofóbicas, que son capaces de asociarse a la membrana y generar malfuncionamiento de la misma, ya sea agrupando los fosfolípidos y formando poros o canales que destruyen el equilibrio osmótico del microorganismo, o bien, alojándose en el

organelo interrumpiendo el transporte pasivo del mismo, ya que con ambos mecanismos se puede desencadenar la muerte celular (Ganewatta et al., 2015; Muñoz-Bonilla et al., 2012). Por lo anterior, los AMPs y SMAMPs son una opción a los antibióticos modernos o inclusive son perfectos coadyuvantes en el tratamiento con estos últimos.

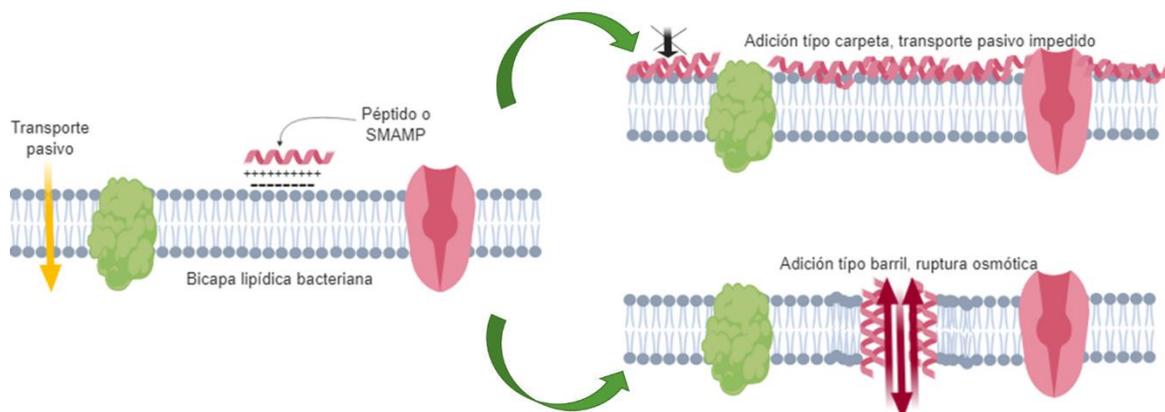


Figura 1. Ejemplos de mecanismo de inhibición de AMPs y SMAMPs.

Los AMPs, en especial aquellos propios del sistema inmune de los mamíferos, presentan propiedades beneficiosas, como su alto poder bactericida indistinto de Gram y nula toxicidad. Sin embargo, su uso a escala comercial presenta muchas desventajas. Entre ellas destacan su alto costo de producción y es claro que para el caso de AMP naturales de los organismos de los mamíferos es inviable. Por otro lado, está su degradación por proteasas extracelulares secretadas por las bacterias patógenas como mecanismo de resistencia, seguidas por los cambios conformacionales y desactivaciones por unión con otras proteínas, la baja estabilidad metabólica, y la alta toxicidad e inmunogenicidad. Por estas razones, su uso no ha sido completamente satisfactorio (Greber et al., 2016), y se han buscado alternativas en su uso, como el crear vehículos específicos para que ellos mermen los inconvenientes de estas proteínas (Martin-Serrano et al., 2019), o bien generando compuestos semejantes que no posean dichas debilidades, este es el origen de los SMAMPs (Fu et al., 2013).

1.2.1. *L-Arg, AMPs y SMAMPs*

La L-Arg es un aminoácido no esencial presente en los mamíferos, cuyas funciones en el metabolismo están íntimamente relacionadas con los equilibrios del nitrógeno y el potencial de oxido-reducción al ser un paso importante del ciclo de la urea y el precursor de formación del óxido nítrico (Jobgen et al., 2006). En los AMPs por su parte, es uno de los aminoácidos destacados, ya que su grupo δ -guanidinio es capaz de mantenerse protonado hasta en pH alcalino ($pK_a = 12.10$), esta protonación confiere al grupo de una carga parcialmente positiva, la cual es idónea para su interacción con la membrana bacteriana. Este aminoácido es hallado en la literatura demostrando su preponderancia en el mecanismo de disrupción de los AMPs (Chan et al., 2006; Morita et al., 2013), por lo que la estructura de su cadena lateral ya ha sido explorada en la producción de los SMAMPs, y se ha demostrado que esta ramificación es más eficaz y selectiva en su efecto contra microorganismos, a diferencia de ramificaciones más sencillas como la de acetilamina, análoga de la L-lisina (Gabriel et al., 2008).

1.3. **Polifenoles y el ácido gálico**

Los AMPs y SMAMPs no son los únicos compuestos que han llamado la atención como candidatos a combatir a las bacterias multirresistentes, también se ha renovado el interés por los polifenoles naturales. Estos compuestos son una extensa variedad de familias químicas, que funcionan como metabolitos secundarios en plantas que presentan varias funciones, desde precursores de distintas estructuras hasta como señalizadores metabólicos, y en múltiples casos, presentan capacidades inhibitorias y biocidas contra hongos, virus o bacterias (Daglia, 2012). En general, esta fuente natural de agentes antimicrobianos es de especial interés en medicina alópata en defensa de otras formas de medicina integrativa para tratar o suprimir los síntomas o los procesos fisiopatológicos de los patógenos en nuestro organismo. Entre estos compuestos se encuentra el ácido gálico, este derivado fenólico ha demostrado tener la capacidad de asociarse a la membrana bacteriana gracias a su hidrofobicidad, generando un cambio en el flujo de iones, alterando la carga neta de la superficie, e incluso alterando la división celular de algunas bacterias (Borges et al., 2013; Bhattacharya et al., 2018; Bouarab Chibane et al., 2019; Chen et al.,

2017). Las limitaciones que presenta este compuesto, y la gran mayoría de los polifenoles, recaen en su solubilidad, termolabilidad, y fácil descomposición en presencia de luz u oxígeno, y aunque baja, también posee una relativa citotoxicidad (Özçelik et al., 2011), por lo que su aplicación en procesos de fabricación de alimentos o en aplicaciones biomédicas no puede extenderse con facilidad.

1.3.1. PGAL como posible polímero base para aplicaciones antimicrobianas

López y colaboradores en 2013, descubrieron que el ácido gálico puede polimerizarse mediante oxidación enzimática con la lacasa de *Trametes versicolor* (LTV) bajo ciertas condiciones, generando el PGAL (Figura 2). Este oligómero, presenta una mejor solubilidad que su precursor en soluciones acuosas con pH superior a 1, además de ser termoestable, fotorresistente y citocompatible a nivel celular, así como antiinflamatorio y prevenir especies reactivas de oxígeno (Díaz-Sánchez et al., 2017; López et al., 2013; Sánchez-Sánchez et al., 2017, Zamudio-Cuevas et al., 2020).

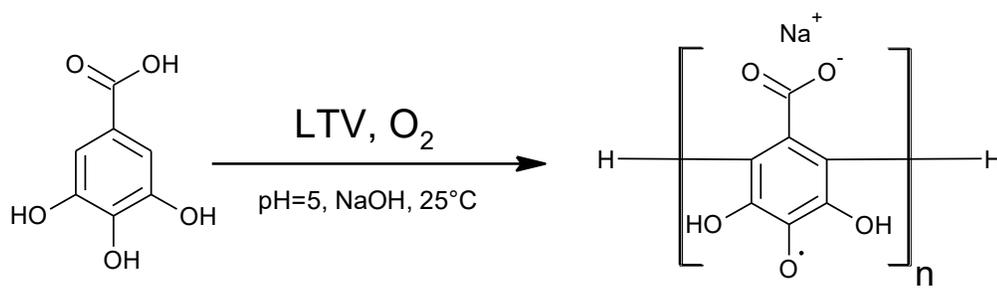


Figura 2. Reacción de polimerización del ácido gálico en PGAL

Curiosamente, la investigación inicial por López y colaboradores, así como estudios posteriores, buscaban reducir el impacto ambiental de dispositivos eléctricos, cambiando componentes fotosensibles sintéticos por estos de origen natural con propiedades optoelectrónicas compatibles, esto debido a la capacidad semiconductor intrínseca del PGAL. Sin embargo, las aplicaciones biomédicas han tomado mayor relevancia. A pesar de los avances obtenidos, los mecanismos de acción antimicrobiana de esta nueva molécula hasta el momento han sido desconocidos, lo cual es de gran importancia en su aplicación como implantes con andamiaje de policaprolactona, y en general, su potencial uso como base de un nuevo SMAMP es de interés, las razones para escogerlo como la base de

modificación para un nuevo SMAMP recaen tanto en su síntesis en condiciones inocuas, como en la naturaleza química del oligómero, que recuerda a la estructura de los lignanos, esto último, es indicativo de la biocompatibilidad y no reactividad del oligómero con las células eucariotas por lo que fue elegido el caso de estudio en este trabajo.

1.4. Propuesta de modificación: Síntesis asistida por microondas

Si bien el PGAL, por su estructura, presenta una zona predominante de hidrofobicidad, su estructura de polianión (Romero-Montero et al., 2019) no es compatible con los fundamentos de acción antimicrobiana, por lo que se espera que su efecto disruptor de membrana sea pobre o inexistente, de esta forma buscar modificaciones moleculares del PGAL para invertir el carácter aniónico del oligómero es la pieza clave para volverle un compuesto antimicrobiano. Existen muchas modificaciones para cambiar la mecánica, respuesta térmica y química de un polímero u oligómero preexistente mediante la inserción de ramificaciones con características deseadas, a este proceso se le conoce como "insertado" (Bhattacharya et al., 2009). El PGAL, al poseer grupos hidroxilo y grupos carboxilo en abundancia, lo hace idóneo para generar un insertado, y como se expuso previamente, la L-Arg es un compuesto clave en múltiples AMPs, por lo que incorporarlo en la estructura de este polifenol sintético es una posible solución al problema de carga de éste.

La búsqueda para poder generar las amidaciones o esterificaciones necesarias para unir a la L-Arg y el PGAL desembocaron en la radiación de microondas como auxiliar en estas síntesis, ya que se ha demostrado que las reacciones de amidación y esterificación ocurren en el ambiente provisto por esta metodología emergente, y que, además, es considerada inocua y dentro de las crecientes tendencias en la química sintética verde. Existen múltiples reportes sobre la capacidad de unir por enlace covalente a ácidos orgánicos tanto alifáticos como aromáticos con aminas tanto primarias como secundarias (Ferroud et al., 2008; Ojeda-Porras et al., 2015), e incluso unos cuantos reportan la esterificación con ácidos orgánicos en polisacáridos (Shogren et al., 2006); este método también ha sido usado para la modificación de polímeros con múltiples grupos carboxilo (Aris et al., 2017). El esquema de síntesis del presente trabajo está descrito en la Figura 3.

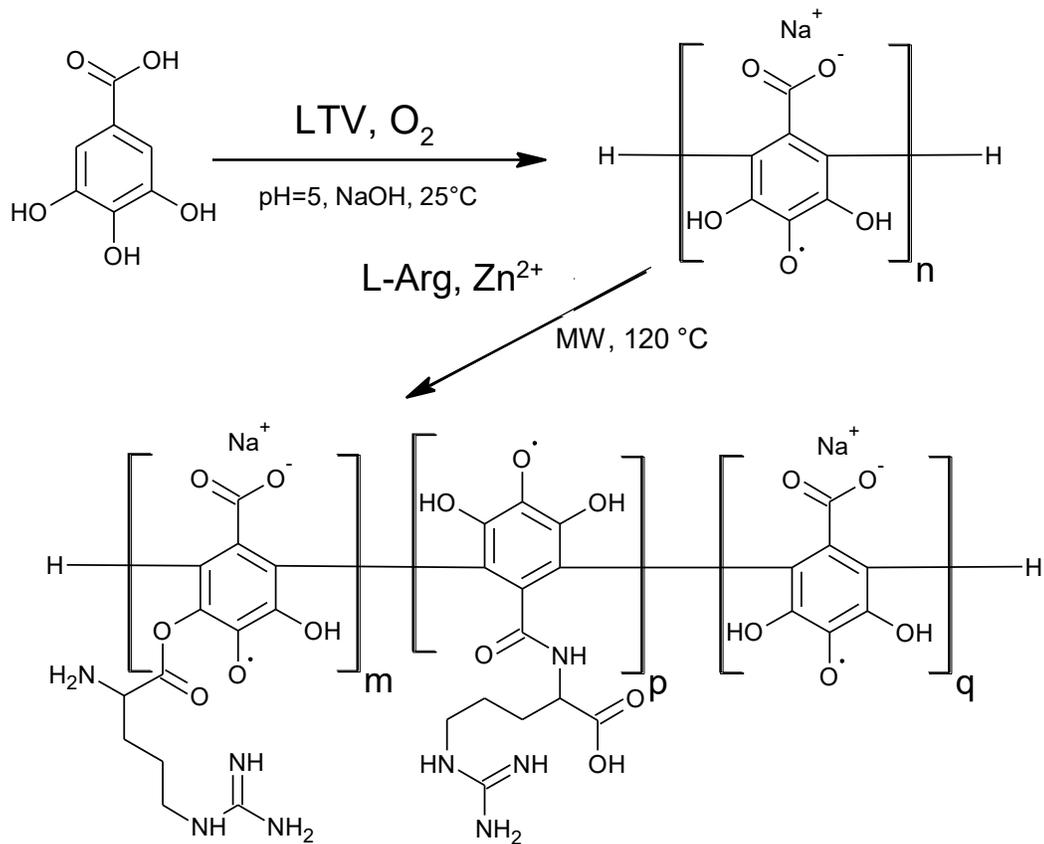


Figura 3. Esquema de reacción para la síntesis de PGAL-g-L-Arg

2. HIPÓTESIS

Mediante la incorporación de ramificaciones catiónicas de origen natural en el PGAL se obtendrá la capacidad de inhibir bacterias mediante un mecanismo de disrupción de membrana.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Sintetizar el PGAL-g-L-Arg con actividad antimicrobiana y antioxidante mediante la inserción de la L-Arg en el PGAL en condiciones inocuas.

3.2. Objetivos Particulares

- Establecer un protocolo de modificación de PGAL con un aminoácido modelo (L-Gly).
- Generar un modificado catiónico usando como base al PGAL y L-Arg.
- Determinar la estructura química del polímero por varias técnicas analíticas.
- Determinar las propiedades antioxidantes.
- Determinar su capacidad antimicrobiana y clasificar su mecanismo de acción.
- Determinar la presencia de citotoxicidad del producto en células de mamífero.

4. METODOLOGÍA

4.1. Protocolos de síntesis

4.1.1. Polimerización de ácido gálico

La síntesis de PGAL se llevó a cabo según lo previamente descrito por López y colaboradores (2013), se disolvieron 8.5 g de ácido gálico en 250 mL de solución tampón de acetato (pH 5, 250 mM) y se vertieron en un matraz de fondo redondo ámbar de tres cuellos de 500 mL. Luego, se añadieron 20 mL de NaOH (2 M) y la mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación constante a 25 °C en un baño de aceite (IKA RCT basic, EE. UU.). Una vez homogénea la solución, se añadió Lacasa de *Trametes versicolor* suficiente para alcanzar una concentración de 1 U/mL; la solución se agitó durante 24 h y se oxigenó durante toda la reacción usando una bomba de aire (Elite 800, Hagen Inc., Canadá). La mezcla de reacción se añadió gota a gota a 1.25 L de etanol frío (5 °C) y el precipitado se filtró y se secó al vacío con una bomba de aceite (1.0×10^{-4} mbar).

4.1.2. Síntesis de PGAL-g-L-Gly

Con el fin de lograr un punto cercano a la equimolaridad entre la glicina y los residuos de ácido gálico en el PGAL, 100 mg del aminoácido y 200 mg del polímero, con peso molecular promedio de 5,016 Da, fueron disueltos en 5, 10 o 15 mL de buffer de fosfato (0.1 M) a un pH determinado (3, 5 o 7). La solución fue vertida en un matraz bola de capacidad de 25 mL y se le añadió un agitador magnético. El matraz se colocó en la cámara de microondas (Discover SP CEM, E.E.U.U.), acoplado a la boca del matraz un refrigerante (Figura 4) para evitar proyecciones sobre el aparato. Los parámetros de síntesis y el modelo experimental se describen en la sección 6.2.1.



Figura 4. Microondas de síntesis orgánica con refrigerante acoplado.

La solución resultante fue precipitada por goteo en 4 veces el volumen de reacción en etanol frío. Posteriormente, el producto fue reconstituido en 5 mL agua y puesto a precipitar en 15 mL del solvente previamente usado. Después de la segunda precipitación el etanol que pudo haber quedado en el producto fue eliminado con ayuda de una estufa al vacío acoplada una extractora de solventes (30 °C).

4.1.3. Síntesis de PGAL-g-L-Arg

Se preparó una solución que contenía 200 mg de PGAL, 5 mL de buffer de fosfato a pH 7 y L-Arg suficiente para alcanzar una concentración equimolar de residuos de ácido gálico con respecto al aminoácido. El matraz con capacidad de 25 mL fue puesto en la cámara del microondas, acoplando a la boca del matraz un refrigerante (Figura 4). Los parámetros variables fueron el tiempo de reacción, la temperatura de síntesis, la concentración del catalizador sulfato de Zinc y la potencia del aparato, el modelo experimental se encuentra descrito en la sección 6.2.2. La purificación del compuesto se realizó con dos precipitaciones sucesivas del PGAL vertiendo la solución en 25 mL de etanol absoluto, seguidas de una reconstitución de los polímeros en volumen mínimo de agua y filtrados por centrifugación con ayuda de una unidad Amicon (4 mL, 5000 Da, Millipore, EE. UU.). El volumen retenido en el filtro fue liofilizado y secado con ayuda de una estufa al vacío acoplada a un extractor de solventes.

4.2. Protocolos de determinación de estructura.

4.2.1. Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC/GPC)

Las mediciones de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se realizaron en un cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1210 (EE. UU.), equipado con un detector RID y una columna Ultrahydrogel-500 (7.8x300 mm, Waters, EE. UU.), transportadas con solución acuosa de cloruro de litio (LiCl, 0.1 M) como fase móvil, un flujo de 0.8 ml/min y 30 °C de temperatura de columna (Romero-Montero et al., 2017). El volumen de inyección de la muestra disuelta en fase móvil fue de 30 µL, y con una concentración de 0.5 mg/mL.

4.2.2. Determinación de grado de funcionalización

20 mg del PGAL, o los modificados, se disolvieron en 2.5 mL de hidróxido de sodio (NaOH, 2 M) y se incubaron a 60 °C durante 24 h, liberando el aminoácido incorporado a la solución. Una vez precipitado el PGAL con 10 mL de etanol frío, el sobrenadante se separó, aforó a 25 mL y diluyó. Tomando 500 µL de los sobrenadantes, se mezclaron con 500 µL de solución acuosa de ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBSA, 0.001% p/v). La mezcla resultante se agitó e incubó a 37 °C durante 2 h. La reacción (Figura 5) se detuvo mediante la adición de 125 µL de ácido clorhídrico (HCl, 1 N). La absorbancia de la mezcla se determinó a $\lambda = 335$ nm comparando contra curva patrón del aminoácido específico (0 a 20 µg/mL) (Krasaechol et al., 2008).

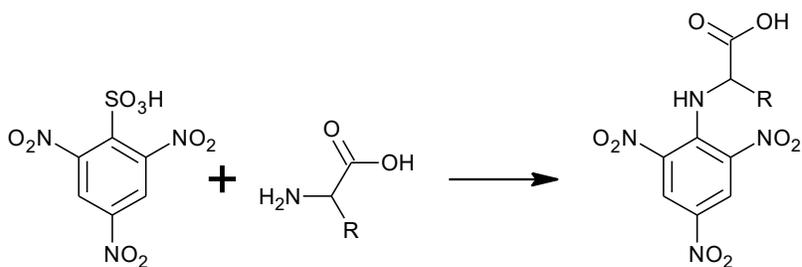


Figura 5. Reacción del TNBSA con un aminoácido, generando una anilina cromófora

4.2.3. RMN-¹H y Espectroscopia de Infrarrojo

60 mg de PGAL, L-Arg, PGAL-g-L-Gly o PGAL-g-L-Arg se disolvieron en 2 mL de agua deuterada (D₂O). Los espectros de RMN-¹H se registraron en un espectrómetro Varian MR-400 (EE. UU.) y fueron procesados con el programa MestReNova (versión 12.0.2). Los espectros FT-IR de los diversos compuestos se adquirieron colocando de 10 a 15 mg de los compuestos en un equipo Perkin-Elmer ATR-FTIR Spectrum-400, y fueron analizados con ayuda del programa Spectragryph (versión 1.2.14) en el intervalo de frecuencias de 400 a 4000 cm⁻¹ y con 30 lecturas del espectro.

4.2.4. Análisis térmico

Los termogramas de PGAL, L-Arg y PGAL-g-L-Arg se obtuvieron con un equipo de análisis termogravimétrico TGA550 (TA instruments, EE. UU.). El ciclo de combustión se realizó en presencia de nitrógeno (60 mL/min) con una rampa de temperatura de 5 °C/min desde 25 °C hasta los 900 °C.

4.3. Protocolos de capacidades antioxidantes

4.3.1. Determinación de inhibición de radical DPPH

Las diferentes muestras se sometieron a un microensayo de DPPH ejecutado de la siguiente manera: se llenó una placa de 96 pocillos con 100 µL de material disuelto (0-30 µg/L para ácido gálico y 0-150 µg/L para PGAL y PGAL-g-L-Arg) en agua-metanol (1:1), mezcla en la que los polímeros son perfectamente solubles, a estos fueron agregados 100 µL de DPPH (80 mg/L) disueltos en la misma mezcla de solventes (Jimoh et al., 2019). Los experimentos de control se llevaron a cabo de manera idéntica, pero sin adicionar material o DPPH, supliendo sus volúmenes con la mezcla de agua-metanol (Lee et al., 2015). La absorbancia se leyó a temperatura ambiente a $\lambda = 530$ nm en un lector Multiskan FC (Thermo Scientific, EE. UU.). El porcentaje de inhibición de DPPH se determinó usando la Ecuación 1.

$$\text{Inhibición de DPPH (\%)} = \frac{(DO_{M+DPPH} - DO_{MB})}{(DO_{DPPH} - DO_S)} \times 100$$

Ecuación 1

Donde: DO_{M+DPPH} es la absorbancia generada por la mezcla de material y DPPH, DO_{MB} es la absorbancia de material individual; DO_{DPPH} es la absorbancia de DPPH y DO_S es la absorbancia de solvente.

Las concentraciones de muestra requerida para inhibir el 50% de la concentración de DPPH (IC₅₀, por sus siglas en inglés) se obtuvieron interpolando las respuestas de inhibición en su parte lineal, para cada uno de los compuestos.

4.3.2. Determinación de FRAP

Para la prueba de reducción férrica del plasma (FRAP, por sus siglas en inglés, se usaron soluciones acuosas de PGAL y PGAL-*g-L*-Arg a concentración de 2 mM en buffer de fosfatos (75 mM, pH 7.4). Para la prueba FRAP, una mezcla de cloruro de hierro (III) (FeCl₃, 1.7 mM) y 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ, 0.8 mM) fueron disueltos en solución buffer de acetatos (300 mM, pH 3.6). El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pozos, en la cual 30 µL de las muestras se agregaron, junto con 300 µL de la mezcla previamente mencionada. La placa se dejó en reposo por 15 min y las absorbancias fueron medidas a λ=583 nm en un espectrofluorómetro Biotek Synergy HT (Winooski, USA) contra curva de calibración de sulfato de hierro (II) (FeSO₄, 0 a 1000 pmol/L) (Benzie et al., 1996).

4.3.3. Determinación de ORAC

Para esta prueba las muestras (2 mM), las soluciones y el Trolox (ácido 6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), fueron preparadas de forma independiente en una solución buffer de fosfatos (75 mM, pH 7.4). El ensayo se llevó a cabo en una microplaca de 96 pozos, en los cuales se agregaron 25 µL de muestra, 25 µL de AAPH (2,2'-Azobis(2-metilpropionamida), 153 mM) y 150 µL de fluoresceína (4 mM). La medición se llevó a cabo por minuto durante 90 min a 37 °C, a longitudes de onda de λ=485 nm de excitación y 515 de emisión en el espectrofluorómetro previamente mencionado (Hernández-Valdepeña et al., 2016). El fundamento de esta técnica está basado en la rápida degradación del AAPH, desencadenando en la formación de dos radicales de carbono que reaccionan con una molécula de oxígeno mediante una dismutación forzada, y generando

dos radicales de oxígeno, estos se ponen en contacto con fluoresceína en presencia o ausencia de un compuesto antioxidante, y se mide la pérdida de la fluorescencia por degradación oxidativa a través del tiempo, diferenciando el área de las curvas de caída de fluorescencia entre el blanco y el antioxidante, estas áreas se comparan con la respuesta de Trolox a diferentes concentraciones, obteniendo la equivalencia en mM de Trolox, un diagrama de este fundamento se encuentra ejemplificado en la Figura 6.

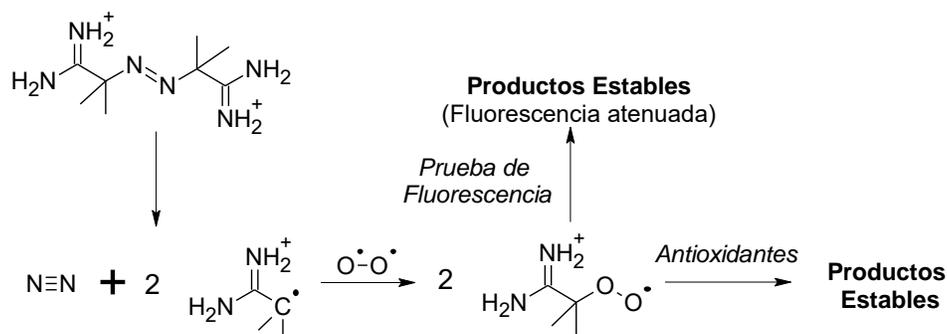


Figura 6. Diagrama de reacción para la técnica de ORAC (Zulueta et al., 2009)

4.3.4. Determinación de retraso de radical $HO\bullet$

En este ensayo, se usa la conversión de tereftalato en hidroxitereftalato, siendo este último capaz de fluorecer, a diferencia de su forma no hidroxilada. La muestra se preparó a la misma concentración que la prueba anterior. La producción del radical hidroxilo ($HO\bullet$) se realizó mediante un sistema de reacción de Fenton mezclando en un volumen de 180 μL los siguientes compuestos con suficiente masa para alcanzar la concentración deseada: ácido ascórbico (1 mM), FeCl_3 (1 mM), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 1 mM), peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 10 mM), tereftalato (3.5 mM), y solución tampón de fosfatos (50 mM, pH 7.4), a dicha mezcla se agregaron 20 μL de agua destilada o diferentes concentraciones de los polímeros. El radical, fue generado por incubación de la solución a temperatura ambiente por 30 min. El aducto fluorescente se midió en el espectrofluorómetro a $\lambda = 326$ nm de excitación y $\lambda = 432$ nm de emisión. La habilidad de los polímeros de retrasar al radical $HO\bullet$ fue comparada con la del Trolox (Gaona-Gaona et al., 2011).

4.4. Protocolos de capacidades antimicrobianas

4.4.1. Determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC)

La prueba MIC permitió comparar el efecto inhibitor del PGAL y el PGAL-g-L-Arg a distintas concentraciones. El método se realizó en microplacas de 96 pozos (Costar, EE. UU), los cuales fueron cargados con 100 μ L de medio Müeller-Hinton estéril. A la primera línea de pozos se le añadieron 100 μ L de uno de los polímeros (6.8 g/L) previamente disuelto en el mismo medio, esta primera línea de pozos fue homogeneizada mediante bombeo de micropipeta y de estos se colectaron 100 μ L de solución de cada pozo, los cuales se dispusieron en el pozo inferior inmediato a cada uno de ellos, esta operación se repitió hasta la penúltima hilera de pozos, donde una vez homogeneizados, los 100 μ L colectados fueron dispuestos fuera de la microplaca. De esta manera, se obtenían líneas de pozos con gradientes de concentración de 3.4 a 0.023 g/L de material, y una línea de estos que fungía como blanco de crecimiento al no poseer polímero alguno. Posteriormente, se agregaron 5 μ L de solución salina isotónica estéril cargada con inóculo bacteriano, la carga bacteriana inicial fue de 5×10^4 , 5×10^4 y 1×10^5 CFU/mL para *S. aureus*, *E. coli* y *L. monocytogenes*, respectivamente (Boddy, 2014), la incubación ocurrió a 37 ± 3 ° C durante 18 h. La densidad óptica de las muestras se midió en un lector Multiskan FC (Thermo Scientific, EE. UU.) a $\lambda = 620$ nm y el porcentaje de inhibición se calculó utilizando la Ecuación 2. La MIC fue determinada como la concentración mas baja en la que la inhibición era del 100%

$$\text{Inhibición (\%)} = \left(\frac{DO_0 - DO_x}{DO_0} \right) \times 100$$

Ecuación 2

Dónde: DO_0 es la densidad óptica promedio de los pocillos que contenían un inóculo de bacterias y una concentración de 0 g/L del compuesto; DO_x es la densidad óptica del pozo con inóculo y una concentración del compuesto distinta de 0 g/L.

4.4.2. Determinación de concentración mínima bactericida (MBC)

La MBC se obtuvo de los volúmenes contenidos en la microplaca de la MIC. Se colectaron alícuotas de 30 µL de al menos tres pocillos de cada concentración en placas de Petri (100x15 mm) con agar Mueller-Hinton. Luego, el inóculo se extendió sobre el total de la superficie del agar con una varilla de vidrio estéril. Las placas se incubaron a 37 ± 3 ° C durante 24 h. El MBC se determinó como la concentración donde el inóculo no contenía unidades formadoras de colonias (UFC), evento apreciable al final de la incubación de las placas.

4.4.3. Viabilidad celular por fluorescencia confocal

La prueba de viabilidad celular se llevó a cabo con una solución compuesta de SYTO9® / yoduro de propidio que fue preparada según lo descrito por el fabricante. Las bacterias se inocularon en medio Müller-Hinton en presencia o ausencia de PGAL o PGAL-g-L-Arg a concentración de 0.85 g/L para ambos compuestos, las cargas iniciales bacterianas fueron las mismas que en la prueba MIC, y el volumen de inóculo fue proporcional al de esta prueba, pero ajustado a 1.2 mL de medio, estos cultivos fueron incubados a 37 ± 3 ° C durante 18 h. Al final de la incubación, el medio se centrifugó durante 3 min a 4,000 rpm, después de decantados, los botones bacterianos se lavaron tres veces con 100 µL de Buffer de fosfatos y se resuspendieron en 50 µL del mismo buffer. A los reconstituidos, se añadieron 50 µL solución de SYTO9 / yoduro de propidio y se incubaron a 37 ± 3 ° C durante 15 min, luego, se colocaron de 0.5 a 1 µL de estas mezclas en portaobjetos y cubreobjetos y se observaron a 100x en un microscopio de fluorescencia Olympus Fv1000 (Japón). Las longitudes de onda de excitación / emisión para los colorantes son: 480/500 nm para SYTO 9 y 490/635 nm para el yoduro de propidio. El porcentaje de viabilidad celular se calculó con la Ecuación 3.

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\#Células\ viables}{\#Células\ totales} \times 100$$

Ecuación 3

Donde: #Células viables es el número de células que solo presentan fluorescencia verde; #Células totales es la suma de células que presentan fluorescencia roja o verde.

4.4.4. Microscopía electrónica de barrido

Las bacterias se inocularon en 4 mL de medio Müeller-Hinton, en presencia o ausencia de PGAL y PGAL-g-L-Arg en concentraciones, proporciones y carga bacteriana iguales a la MIC del modificado, éstas se incubaron a las condiciones previamente descritas. Las muestras se centrifugaron (centrifuga Eppendorf, EE. UU.) por 5 min a 4,000 rpm. Una vez decantadas, se les añadió aproximadamente 0.5 mL de glutaraldehído (Sigma-Aldrich, 5 % v/v) y se almacenaron a 5 °C durante 48 h. Las preparaciones se deshidrataron en una serie graduada de alcohol, fueron deshidratadas a punto crítico y se cubrieron con oro a magnificaciones de 10,000 x. Una vez preparadas, las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5900-LV (Japón).

4.4.5. Captación de cristal violeta.

El cambio en la permeabilidad de la membrana bacteriana se determinó mediante la captación de violeta cristal (Devi et al., 2010). Se prepararon cultivos de bacterias y se trataron con PGAL o PGAL-g-L-Arg a 0.85 g/L como se describió previamente. Después de 18 hr de contacto entre los materiales y las bacterias, se centrifugó 1 mL del cultivo a 4000 rpm por 5 min. Luego, las células se resuspendieron en PBS con cristal violeta (absorbancia en solución de 0.520 a 570 nm) y se incubaron durante 10 min a 37°C. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min y los sobrenadantes se filtraron con un filtro de 0.22 µm. La absorbancia de éstos se midió a 570 nm y el porcentaje de absorción se calculó con la Ecuación 4.

Ecuación 4

$$\%Captación = \left(1 - \frac{Ax}{A_0}\right) \times 100$$

Donde: Ax es la absorbancia de una muestra; A₀ es la absorbancia de la solución de violeta cristal.

4.5. Protocolos de citocompatibilidad

4.5.1. Prueba de actividad hemolítica

La actividad hemolítica se determinó a partir del método de difusión de disco en agar. Para el ensayo fue necesario el uso de donadores (sanos, con edad promedio de 27 años), a los cuales, bajo su consentimiento y siguiendo el protocolo del código de ética de la sociedad internacional de transfusiones de sangre, les fueron extraídos 10 mL de sangre, ésta se mezcló con 90 mL de medio de agar base sangre estéril. Después de la solidificación, a cada placa les fueron horadados 4 pozos usando un tubo de vidrio estéril (6 mm de diámetro). En los pozos se añadieron los controles positivo y negativo de hemólisis (agua destilada y PBS respectivamente) y los materiales a probar (PGAL y PGAL-g-L-Arg a MIC de este último). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después del período de incubación, se observó la presencia o ausencia de hemólisis, la cual se presenta como la formación de una zona clara alrededor del pozo. En caso de resultar positiva la formación de halo, éste fue medido con un Vernier (mm) (Prakash et al., 2016).

4.5.2. Ensayo de viabilidad eucariota

La determinación de viabilidad se realizó con muestras de sangre de seis donantes sanos de edad promedio de 28 años, el muestreo se realizó bajo su consentimiento, usando jeringas heparinizadas. 0.5 mL de sangre total se añadieron a 2.5 mL de medio McCoy modificado 5a con 4% en peso de Fitohemaglutinina y soluciones antibióticas al 0.4% en peso (penicilina-estreptomicina), los cultivos se incubaron durante 24 h a 37 °C para permitir la proliferación de las células blancas, dicha temperatura es usada para todas las incubaciones aquí descritas. Una vez terminada la proliferación, el medio se separó en tres tubos diferentes a los cuales se les añadió PBS estéril (control), PGAL o PGAL-g-L-Arg, los materiales alcanzaron 0.85 g/L de concentración una vez agregados a los tubos con medio. Una primera incubación se realizó por 48 h, las células se re-suspendieron en PBS y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min. Una alícuota de 75 µL de la capa leucocitaria fue transferida a un tubo limpio, el cual, se incubó con 2 mL de buffer de lisis (bicarbonato de potasio al 0.1% p/p, cloruro de amonio al 0.899% p/p y EDTA tetrasódico al 0.037% p/p)

durante 16 min, la mezcla se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min, seguida de un decantado y re-suspendido con 1 mL de cloruro de potasio (0.04%), una vez más, el tubo se sometió a incubación por 10 min, y centrifugado como se hizo previamente, una vez más el tubo fue decantado y le fueron añadidos 100 µl de rojo neutro (RN) o 50 µl de bromuro de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), para ambas técnicas se re-suspendieron los residuos, los cuales, se incubaron por dos horas y media, para la prueba de RN se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y se decantaron, añadiendo 150 µL de PBS y siendo centrifugados bajo las mismas condiciones, por último se adicionaron 100 µL de solución decolorante (alcohol etílico al 49.5% v/v, ácido acético glacial al 1% v/v y agua desionizada). Por su parte 75µl de isopropanol fueron agregados a los tubos con MTT, y tanto estos como los tubos de rojo neutro fueron incubados una última vez por 10 min, los ensayos se colocaron una microplaca de 96 pozos y se leyeron en el Multiskan FC (Thermo Scientific, EE. UU.) a $\lambda = 570\text{nm}$. La viabilidad porcentual se calculó empleando la Ecuación 5.

$$Viabilidad (\%) = \left(\frac{DO_s}{DO_c} \right) \times 100$$

Ecuación 5

Dónde: DO_s es la densidad óptica de la muestra y DO_c se refiere a la densidad óptica de control.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización del PGAL

El polímero PGAL reproducido (López et. al. 2013) y utilizado para este trabajo experimental fue un polvo negro altamente soluble en agua y con rendimiento del 95 %, que debido a su naturaleza de radical estable, no presenta señales en su espectro de RMN-¹H (Figura 7C) y con las bandas típicas en su espectro de IR (Figura 9C), mostrando un desdoblamiento en la zona de carbonilo, cuyos números de onda reflejan la dualidad de ácido carboxílico y carboxilato de sodio, todo lo anterior corresponde con lo previamente reportado (López et al., 2013; Romero-Montero et al., 2019). El peso molecular promedio fue obtenido por método de SEC-GPC, resultando en 5016 Da de tamaño al cual se le asoció un grado de polimerización de 30 unidades de ácido gálico.

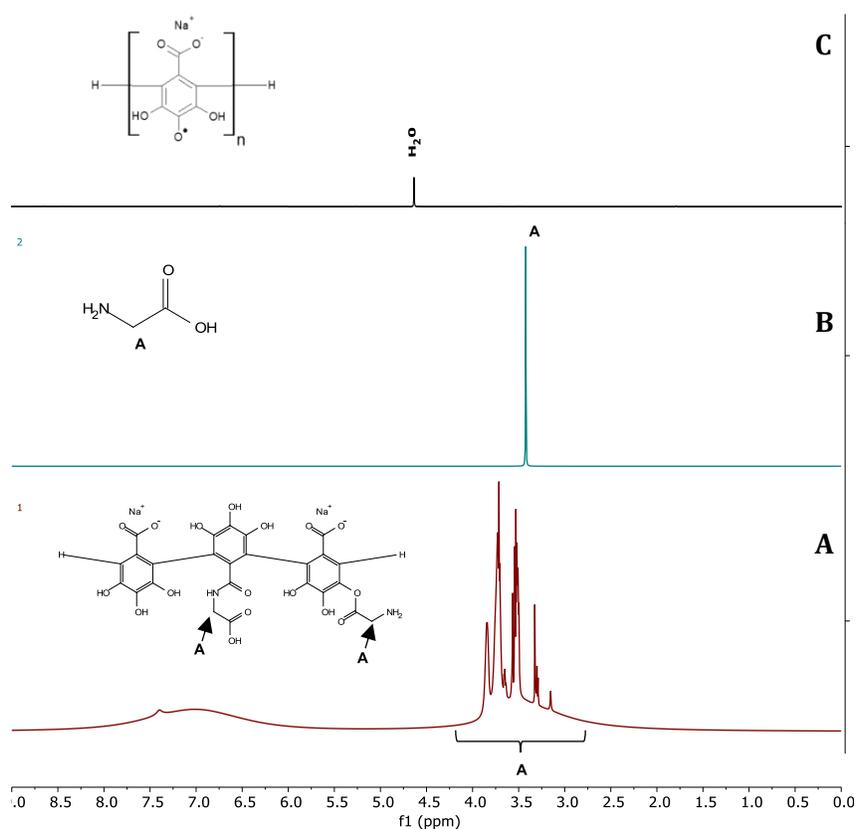


Figura 7. Espectros de RMN-¹H de PGAL-g-L-Gly (A), L-Gly (B) y PGAL (C).

5.2. Reacciones de modificación y parámetros preponderantes

La reacción de modificación de PGAL, está sustentada en una investigación en la cual se inserta taurina a oligómeros de ácido galacturónico (Aris et al., 2017). Se escogió esta reacción como modelo ya que nos permite hacer la analogía entre dichos oligómeros y el PGAL, y de la taurina con los aminoácidos usados, además describe el uso de microondas para generar la amidación en solución acuosa. Ambas condiciones son importantes, ya que contribuyen a la inocuidad del producto final. Si bien existen reportes que demuestran que tanto la esterificación como la amidación de distintos compuestos puede ser llevada a cabo en seco (Barbosa et al., 2006; Khalafi-Nezhad et al., 2003; Ojeda-Porras et al., 2015; Wang et al., 2008), algunas de ellas usan catalizadores que no podrían considerarse inocuos, o que dificultarían la separación del producto final, aun así, se llevaron a cabo algunos experimentos en seco con el PGAL y distintos aminoácidos, los cuales, no demostraron resultados prometedores. Por lo que se prefirió el método de modificación en medio acuoso.

5.2.1. Modelo de L-Gly y PGAL

Se escogió como primer reactivo de injerto a la L-Gly, al ser el aminoácido más simple, nos permitiría observar sin interferencias de la cadena lateral, el comportamiento de amidación o esterificación en la reacción, además facilitaría la observación de señales en las técnicas analíticas de RMN-¹H e IR.

La inserción de la L-Gly se comprobó a través de los espectros de RMN-¹H (Figura 7), en dichos espectros se pueden observar para el caso de la L-Gly una señal correspondiente con su metileno (**A**: $\delta=3.42$ ppm), esto se debe a que tanto los hidrógenos del grupo carboxilo como amino, se encuentran embebidos en la señal perteneciente al agua. Por su parte el polímero funcionalizado demuestra un desplegado de esta señal, que abarcó un intervalo de desplazamiento químico entre 3.98 y 1.97 ppm, lo que indica la suma de diversas señales de metileno de la glicina expuestas a distintos ambientes, es decir, que la glicina se encuentra anclada en múltiples posiciones del polímero.

Una vez comprobada la reacción de inserción entre la L-Gly y el PGAL, se comenzó con el diseño experimental. Los criterios de selección de variable y el tratamiento de los datos del diseño, los cuales fueron conducidos acorde con literatura preexistente (Carlson, 2005).

Con el fin de poder determinar el efecto de distintas variables en la reacción y alcanzar un mejor grado de incorporación del aminoácido al polímero, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

5.2.1.1. Selección de variables a analizar.

La primera variable seleccionada es la temperatura, ya que esta permite la salida de la molécula de agua cuando se genera un enlace amida o éster. Además, mientras más cercana sea a los 100 °C, permitirá la evaporación del líquido y por principio de Le Chatelier favorecería la formación de productos. Debido a su asociación directa con la temperatura, pero por desconocimiento propio de cómo afecta la interacción de estas dos variables cuando no actúan en paralelo, la potencia del microondas también fue seleccionada.

El tiempo fue señalado, ya que éste podría favorecer el regreso de los productos a reactivos, por lo que se involucró a esta variable para determinar si existe o no un límite en su uso.

El pH también es de interés, ya que los grupos funcionales existentes en el aminoácido y el polímero presentan equilibrios al cambio de concentración de protones, por lo que su interacción, no solo podría permitirnos observar la mejora de la inserción, además nos ayudaría a comprender parcialmente el mecanismo de reacción en esta amidación.

La concentración que parece un tanto descartable también fue tomada en cuenta, ya que el diseño experimental, permitiría de manera sencilla saber si este razonamiento era el correcto. Cabe mencionar que era de interés el aprovechar la excelente solubilidad del polímero en agua en esta reacción de modificación asistida por microondas.

5.2.1.2. Determinación de dominio experimental.

Las cinco variables fueron limitadas con ayuda del comportamiento observado en la reacción previamente mencionada (Aris et al., 2017). Con el fin de demostrar que estos límites experimentales eran los adecuados, tres experimentos de referencia se llevaron a cabo; B, usando todas las variables a nivel bajo; A, con todas las variables a nivel alto; y M, con todas las variables puestas a medio trayecto entre el nivel bajo y el alto. Lo anterior, más los porcentajes de incorporación determinados en los tres experimentos, son expuestos en la Tabla 1.

Tabla 1. Variables evaluadas para determinar el dominio experimental.

			Dominio		
			-1	0	+1
Experimento			B	M	A
Variable	x1	Concentración de PGAL (g/L)	40	20	10
	x2	pH	7	5	3
	x3	Temperatura (°C)	80	100	120
	x4	Tiempo (min)	5	10	15
	x5	Potencia (W)	50	75	100
%Incorporación			30.77±1.28	21.49±1.28	27.26±0.16

Como se puede observar, el dominio experimental no parecía ser adecuado para proceder al diseño factorial, ya que este último necesita de una zona de respuesta que muestre claramente una rampa de subida o bajada de incorporación del aminoácido al polímero conforme los parámetros experimentales van cambiando, pero el porcentaje de inserción no cambió considerablemente entre los experimentos B y A. Sin embargo, el experimento M demostró poseer suficiente diferencia contra B, este conjunto de comportamientos, implican que existe una curvatura en la superficie de respuesta del dominio de variables propuesto, por lo que se optó por reducir el dominio haciendo que los valores 0 pasen a ser los valores +1, de esta manera es mucho menos probable que el dominio se encuentre en una zona de inflexión de respuesta como parece ser que ocurre entre los puntos B y A, además, esto permitió el ahorro de volúmenes de reacción y purificación, así como la reducción de tiempos y energía de uso de microondas.

5.2.1.3. Realización de diseño factorial fraccionado a dos niveles.

Una vez determinado el dominio, se prosigue al diseño factorial, en este caso, debido a la cantidad de PGAL que se genera por lote, se optó por un diseño fraccionado, adicionalmente, sería más fácil el manejar una menor cantidad de muestras. Las variables y el modelo de diseño fraccionado 2^{5-2} con sus resultados de porcentaje de inserción o incorporación son expuestas en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Definición de niveles y variables del diseño experimental

Variable	Dominio	
	-1	+1
x1 Concentración de PGAL (g/L)	40	20
x2 pH	7	5
x3 Temperatura (°C)	80	100
x4 Tiempo (min)	5	10
x5 Potencia (W)	50	75

Tabla 3. Diseño factorial fraccionado 2^{5-2}

Exp	%Incorp.	x1	x2	x3	x4	x5
1	56.64±4.04	-1	-1	-1	+1	+1
2	28.93±2.05	+1	-1	-1	-1	-1
3	43.88±6.95	-1	+1	-1	-1	+1
4	23.47±0.60	+1	+1	-1	+1	-1
5	54.83±3.67	-1	-1	+1	+1	-1
6	39.56±2.93	+1	-1	+1	-1	+1
7	42.79±2.91	-1	+1	+1	-1	-1
8	26.20±1.50	+1	+1	+1	+1	+1
B	39.54	-10.00	-5.45	1.31	0.75	2.03

En la Tabla 3, no sólo se observan las condiciones de reacción de los experimentos y los porcentajes de incorporación de la L-Gly en el PGAL para cada uno de estos, también es posible observar los efectos de variable (B), estos se obtienen promediando los

porcentajes de incorporación del aminoácido después de haber sido multiplicados por su valor de dominio, por ejemplo: Para **x1** los valores a promediar serian -56.64, 28.93, -43.88, 23.47, -54.83, 39.56, -42.79 y 26.20, dando un total de -10. También debe de ser estimado el efecto de variable del total de los experimentos, en este diseño equivale a 39.54 y se obtiene promediando los porcentajes de incorporación de los 8 experimentos. Estos efectos de variable nos indican cuanta es la influencia de dicha variable en la reacción, por ejemplo, **x1** tiene un valor de -10, mientras que **x4** tiene uno de 0.75, esto implica que **x1** es mucho más importante para el sistema que **x4**, porque un cambio de nivel en **x1** siempre será más de 10 veces perjudicial o beneficioso para la reacción que un cambio de nivel en **x4**. Hasta este punto, pareciera ser que se logró el determinar las variables más importantes para la incorporación de aminoácido en PGAL. Sin embargo, el modelo experimental es fraccionado, lo que implica la formación de un estado de confusión en las variables, el estado de confusión de variable se explica como la contaminación de la influencia de dos o más efectos de variable sobre otra y es resultado directo de no poder generar el diseño experimental de 32 ensayos, al realizar solo 8, la matriz experimental impide poder eliminar dichas contaminaciones. En este caso, por definición matemática los efectos de variable descritos en la Tabla 3 se encuentran confundidos de la siguiente manera:

$$B1 = \beta_1 + \beta_{24} + \beta_{35}$$

$$B2 = \beta_2 + \beta_{14}$$

$$B3 = \beta_3 + \beta_{15}$$

$$B4 = \beta_4 + \beta_{12}$$

$$B5 = \beta_5 + \beta_{13}$$

Donde β_{ij} son los efectos de las variables o de la interacción de dos de estas.

En las anteriores expresiones matemáticas, se observa que el efecto de variable de **x4** se encuentra influenciado o contaminado por la actividad conjunta de **x1** y **x2**, o en el caso más extremo, **x1** esta influenciado tanto por los efectos conjuntos de **x2** y **x4** así como de **x3** y **x5**. La manera más sencilla de resolver este problema y quitar las interacciones de dos variables es realizar un segundo diseño factorial fraccionado que complemente al anterior, la manera de generar a esta matriz experimental complementaria es

reescribiendo la matriz inicial, pero invirtiendo el orden de las filas, y una vez hecho eso se invierten todos los signos, a este proceso se le conoce "fold over". El diseño experimental, los resultados y los factores de variable de este arreglo, se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4. "Fold-over" de diseño factorial fraccionado 2^{5-2}

Exp	%Incorp.	x1	x2	x3	x4	x5
9	33.66±0.72	-1	-1	-1	-1	-1
10	5.27±0.39	+1	-1	-1	+1	+1
11	20.52±3.62	-1	+1	-1	+1	-1
12	7.06±1.39	+1	+1	-1	-1	+1
13	36.86±0.64	-1	-1	+1	-1	+1
14	7.62±2.02	+1	-1	+1	+1	-1
15	20.28±6.05	-1	+1	+1	+1	+1
16	1.44±0.83	+1	+1	+1	-1	-1
B	16.41	-11.42	-4.44	-0.22	-2.99	0.96

En este caso, la relación de los efectos de variable por definición matemática es la siguiente:

$$B1 = \beta_1 - \beta_{24} - \beta_{35}$$

$$B2 = \beta_2 - \beta_{14}$$

$$B3 = \beta_3 - \beta_{15}$$

$$B4 = \beta_4 - \beta_{12}$$

$$B5 = \beta_5 - \beta_{13}$$

Por lo que al realizar un promedio de los efectos Bx, es posible determinar los efectos de las variables puras, así como de algunas de las interacciones de dos variables conjuntas (Tabla 5).

Tabla 5. Relación de efectos de variables.

B	Efecto de variable	Variable asociada
0	27.97	Sistema Basal
1	-10.71	Concentración de PGAL
2	-4.95	pH
3	0.54	Temperatura
4	-1.12	Tiempo
5	1.50	Potencia
12	1.87	Interacción Concentración -pH
13	0.54	Interacción Concentración -Temperatura
14	-0.50	Interacción Concentración -Tiempo
15	0.76	Interacción Concentración -Potencia
24+35	0.71	Interacción pH-Tiempo + Interacción Temperatura-Potencia

5.2.1.4. Selección de uso de variables.

En la Tabla 5 se muestra que el efecto de variable preponderante en la reacción es la concentración, este efecto, al poseer un signo negativo implica que decrece al mismo tiempo a la incorporación, por lo que no hay efecto de la concentración del polímero. Le siguen en orden el pH, el cual desfavorece la reacción al aumentar la acidez del medio, y recordando el experimento H, también lo hace el pH más alcalino, por lo que parece ser, la reacción mejora en la neutralidad. El efecto de variable de la potencia, indica que esta y la inserción son proporcionales, por su parte, el tiempo perjudica al sistema mientras más prolongada es la reacción, por último, la temperatura, aunque nimia en comparación con las otras variables, su incremento también favorece al sistema.

A primera vista, parecería que la variable de trabajo sería la concentración, ya que es la que contribuye con mayor impacto al sistema, no obstante, estando ya a 5 mL de solución, es difícil aumentar la concentración sin escalar la reacción, por lo que la única solución es mantener a la concentración a 40 g/L, como se hizo previamente. Otra variable que nos presenta esta misma encrucijada es el tiempo, ya que no sólo afecta de manera negativa a la reacción si se prolonga demás, y un tiempo inferior no nos permitiría llegar a la

temperatura de reacción deseada, por lo que es preferible aplicar el nivel alto ya establecido. Gracias a este análisis fue posible limitar el dominio experimental para el sistema de PGAL-g-aminoácido, seleccionando condiciones previas que demostraron su efectividad usando Gly, así como moviendo variables que ya han demostrado su influencia en el sistema de manera importante.

5.2.2. Modificación de PGAL con L-Arg

Gracias al modelo previamente descrito, se pudo realizar un segundo diseño con un menor número de variables, las cuales se encuentran en intervalos de interés para observar su eficiencia, intentando a su vez comprobar algunos parámetros del modelo anterior para otro aminoácido, con esto es posible fundamentar de manera más profunda los intervalos de modificación para cualquier aminoácido. Por otra parte, el uso de zinc como catalizador, no fue tomado en cuenta como un parámetro a considerar en el modelo anterior, sin embargo, debido a las clasificaciones inocuas de las sales de zinc por la FDA (*GRAS Substances (SCOGS) Database / FDA*, n.d.), y a la literatura previa que demuestra la capacidad de este ion de ayudar a las reacciones de amidación y esterificación (Xiao-Feng et al., 2012), se decidió probar al catalizador en este sistema. El nuevo dominio experimental, el diseño y los resultados de éste, se encuentran en las Tablas 6 y 7

Tabla 6. Relación de parámetros para los experimentos de incorporación de la L-Arg

	Variable	Dominio	
		+1	-1
x1	Temperatura (°C)	120	100
x2	ZnSO ₄ (mg)	20	15
x3	Potencia (w)	150	100

Tabla 7. Diseño experimental 2^3 y grado de incorporación de L-Arg en los distintos experimentos

Exp.	x1	x2	x3	% Inc. L-Arg
1	+1	+1	+1	23.19 ± 0.24
2	+1	+1	-1	20.61 ± 1.22
3	+1	-1	+1	18.72 ± 1.61
4	+1	-1	-1	12.33 ± 3.57
5	-1	+1	+1	19.21 ± 0.65
6	-1	+1	-1	15.22 ± 0.90
7	-1	-1	+1	11.55 ± 1.54
8	-1	-1	-1	09.05 ± 2.60
β	2.48	3.32	1.93	16.24

Comparando este modelo con el de L-Gly, podemos observar que las características de modificación son parcialmente transferibles entre los sistemas de L-Gly y L-Arg, ya que en ambos casos la temperatura y la potencia tienen efectos positivos sobre la incorporación y en semejante medida, por lo que nos es plausible determinar diseños experimentales sencillos para cada aminoácido y generar distintos modificados con diferentes cualidades y aplicaciones. Los parámetros del modelo anterior reflejan la misma tendencia que en éste, tanto la temperatura como la potencia mejoran la incorporación conforme se aumentan, el uso del catalizador se probó como efectivo, y no sólo eso, sino que el impacto de aumentar 5 mg de $ZnSO_4$ tiene un efecto sobre el sistema mayor a los otros dos parámetros, lo cual comprueba lo previamente descrito en la literatura (Xiao-Feng et al., 2012) y nos provee de un catalizador que puede ser utilizado en la reacción sin comprometer la inocuidad del sistema o el producto final.

5.2.3. Caracterización del compuesto PGAL-g-L-Arg

Utilizando los mejores parámetros del modelo anterior, se sintetizó un lote de producto con porcentaje de inserción de $23.26 \pm 0.38\%$. Este compuesto fue sometido a determinación de peso molecular por exclusión de tamaño (Tabla 8), dicho experimento, demostró la existencia de diferencia significativa entre el polímero nativo, y el modificado, aumentando en más de 1 kDa el peso molecular. El cambio de volumen hidrodinámico del modificado con respecto al polímero nativo es evidencia de que el polímero posee

ramificaciones de L-Arg, y al no obtener señales en tiempos superiores a 30 min, se tiene evidencia de la efectividad del proceso de purificación de aminoácido libre no reaccionado en el polímero.

Tabla 8. Número promedio de peso molecular (Mn) y grado de incorporación y ensayos antioxidantes para PGAL y PGAL-g-L-Arg

Material	Mn (Da)	PDI*	Incorporación de L-Arg (%)
PGAL	6136 ± 95 ^a	1.25 ^a	–
PGAL-g-L-Arg	7218 ± 37 ^b	1.49 ^b	23.19 ± 0.24

* Índice de polidispersidad molar.

Las diferentes letras representan diferentes grupos de significación mediante la comparación de medias de grupos mediante la prueba de Tukey Kramer.

Otro hecho que constata la existencia de ramificaciones de L-Arg en el producto terminado, es la presencia y engrosamiento de bandas en el espectro de RMN-¹H del producto final, en la Figura 8, se comparan las señales entre el PGAL-g-L-Arg (A), la L-Arg (B) y el PGAL sin modificar (C). Este último, debido a su estructura molecular no presenta ninguna señal en la técnica de detección de protones como ya se demostró en trabajos anteriores (López et al, 2013; Romero-Montero et al., 2019).

La L-Arg presenta sus desplazamientos químicos típicos, a $\delta = 2.89$ ppm (a) es observable la señal del metileno más distante de la cadena lateral del aminoácido, por otra parte, en $\delta = 1.47$ ppm (b) se registran los dos metilenos restantes de dicha cadena, por último, a $\delta = 3.12$ ppm (c) se encuentra el hidrógeno anomérico de la L-Arg. El modificado presenta señales análogas a las del agente modificante, aunque las diferencias entre ambos barridos son evidentes. Existen cambios en el desplazamiento químico de la señal (a), posicionándose a mayor campo, y para el caso más notable, la señal (c) se desdobra creando múltiples máximos a diferentes ppm, cada una representando distintos ambientes para el hidrógeno anomérico: las señales a $\delta = 3.40$ y 3.71 ppm se asignan a este protón que tiene como vecinos a una amida o un éster respectivamente, mientras que la $\delta = 3.83$ ppm podría asignarse al ambiente de este hidrógeno durante el entrecruzamiento de cadenas de PGAL a través de L-Arg. La relación entre amidación y esterificación

encontrada por este método fue de 3:1 respectivamente y la proporción de entrecruzamiento es de 11%.

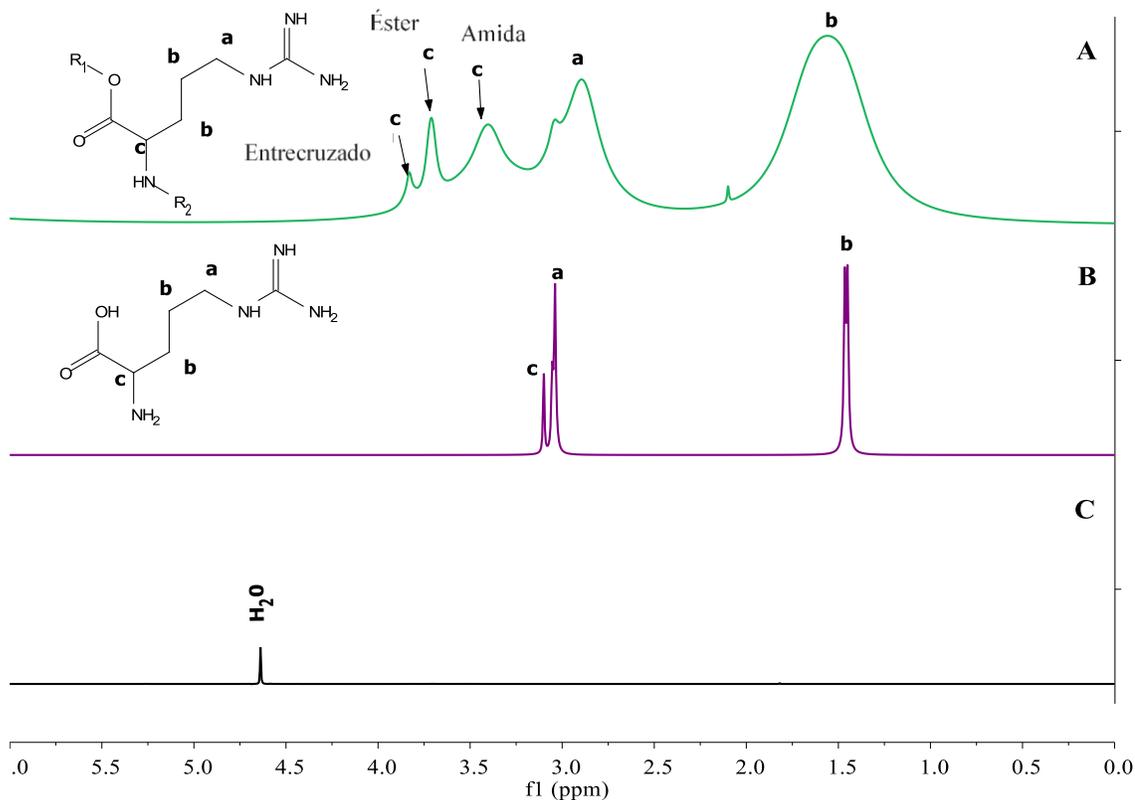


Figura 8. Espectros de RMN-1H de PGAL-g-L-Arg (A), L-Arg (B) y PGAL (C)..

Al respecto del análisis de los espectros de IR para L-Arg (Figura 9) existe una amplia señal atribuida al grupo OH con un máximo a 3051 cm^{-1} , las señales correspondientes al grupo amina son 3296 , 1675 y 879 cm^{-1} , debido a estiramiento, flexión y vibración, respectivamente. Por otro lado, CH y CH₂ presentan sus movimientos de enlace en 2944 , 2863 , 1474 , 1420 y 976 cm^{-1} . La banda de estiramiento del grupo carboxílico es observable a 1552 cm^{-1} , con una segunda banda asignada para este fenómeno a 550 cm^{-1} . Otras asignaciones son CCC estiramiento a 1137 cm^{-1} y enlace C-N a 976 y 771 cm^{-1} (Kumar et al., 2010). Las señales de PGAL aparecen como se describieron anteriormente (López et al., 2013; Romero-Montero et al., 2019). Una señal amplia a 3269 cm^{-1} revela el estiramiento del enlace O-H, también se detecta en 1373 y 1031 cm^{-1} . La señal a 1571 cm^{-1} es evidencia de estiramiento de los grupos COO- y C = C. En el caso del PGAL-g-L-Arg, la

única señal que difiere de los otros dos espectros es una débil ubicada a 3681 cm^{-1} que podría asignarse como estiramiento N-H en el grupo amida. Otras bandas de ésteres y amidas no pudieron asignarse como señales representativas entre 1800 y 1400 cm^{-1} , una zona de espectro donde también aparecen dobles enlaces amina, carboxilo y aromáticos; la superposición de estas señales hizo que la identificación de los nuevos grupos fuera compleja.

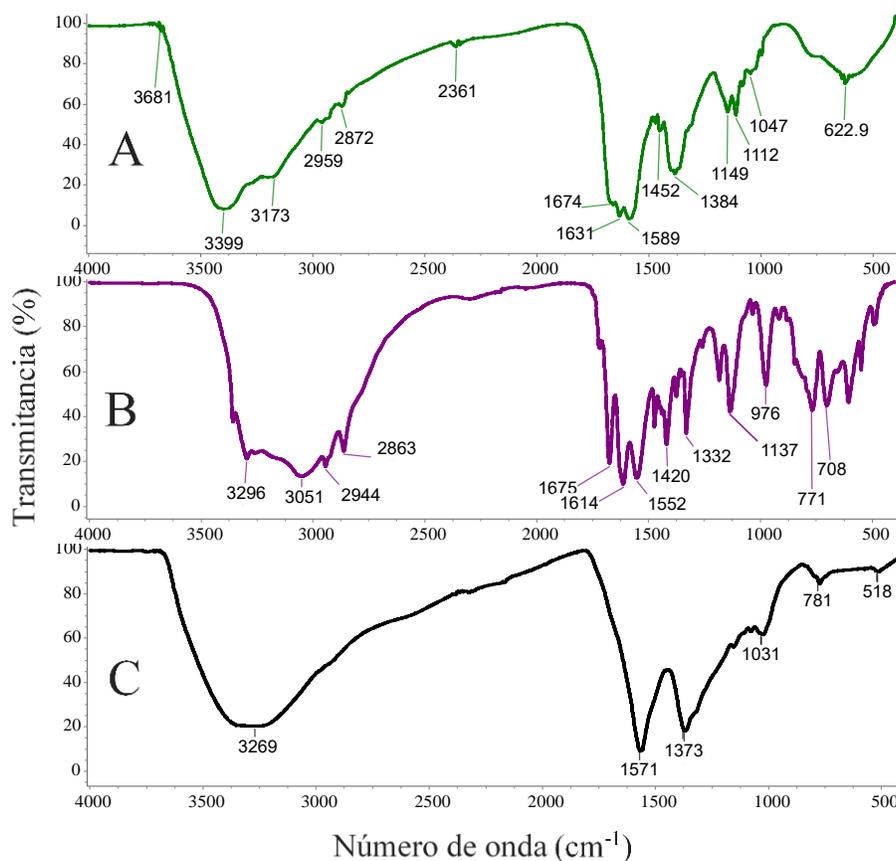


Figura 9. Espectros FTIR de PGAL-g-L-Arg (A), L-Arg (B) y PGAL (C)

Por su parte, la técnica de termogravimetría (Figura 10) comprueba la existencia de modificación, al posicionar la rampa de pérdida de masa del modificado entre las de sus precursores en el intervalo de temperaturas de 400 a 900 °C .

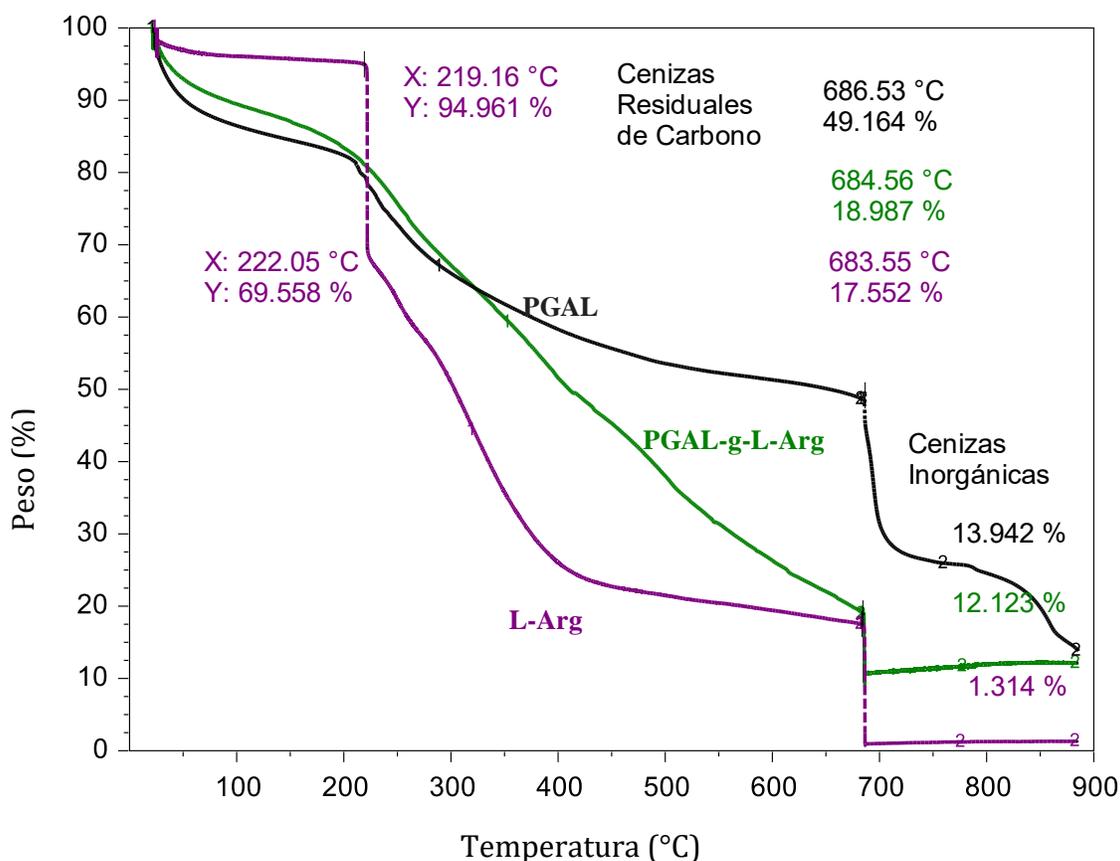


Figura 10. TGA de PGAL, L-Arg y PGAL-g-L-Arg.

Los comportamientos de pérdida de masa para la L-Arg muestra tres inflexiones prominentes en su rampa, con puntos máximos en su primer derivada (Figura 11) a 221.89, 248.23 y 316.39 °C, la primera de estas corresponde a la pérdida conjunta de una molécula de amoníaco y otra de agua, este comportamiento ha sido reportado previamente, lo que da paso a la formación de un anillo fusionado de creatina-prolina (Weiss et al., 2018). Las siguientes dos inflexiones no han sido reportadas hasta donde se sabe, no obstante, debido a las proporciones de pérdida de peso se puede suponer que la inflexión a 248. 23 °C se genera por una segunda pérdida de agua y amoníaco, y el último máximo a 316.39 °C, corresponde a una estructura o conjunto de estructuras con peso de 67 Da.

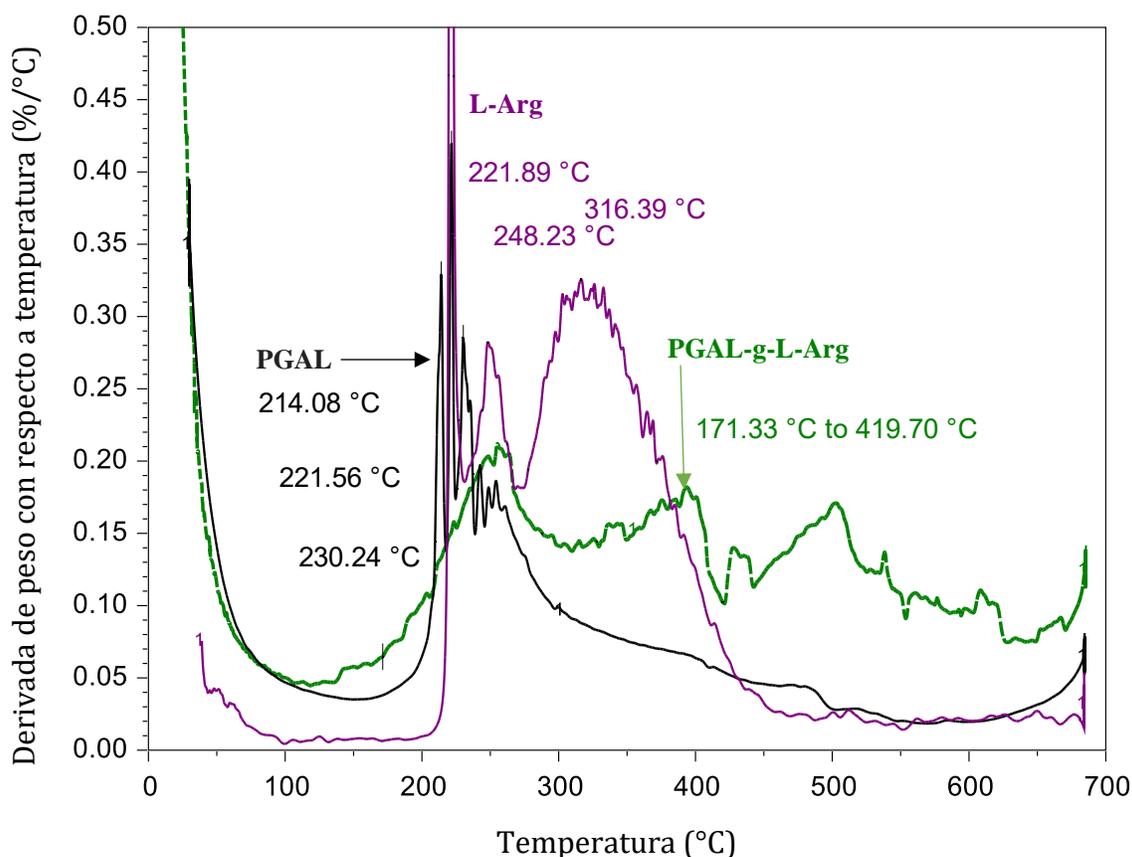


Figura 11. Primera derivada de TGA de PGAL, L-Arg y PGAL-g-L-Arg.

El PGAL presenta tres inflexiones prominentes a 214.08, 221.56 y 230.24 °C, además de otras tres mucho más discretas a 396, 478.84 y 522.43 °C. El primer conjunto de estas señales corresponde al fenómeno de descarboxilación del polímero, la pérdida de 20 % de peso en la muestra, o una estructura de 32 Da, comprueban la salida de dióxido de carbono del polímero. Las últimas señales pueden asociarse a la pérdida de los hidroxilos en el PGAL. Estas pérdidas se asemejan a las del monómero, el cual se reporta con descarboxilación en un intervalo de 213 a 311 °C, y pérdida de hidroxilos de 311 a 375 °C (Santos et al., 2012). Es de notar, que los hidroxilos del polímero presentan retardo en sus temperaturas de liberación, suceso que previamente se ha atribuido a la polimerización de este ácido orgánico (Díaz-Sánchez et al., 2019).

El modificado nos arroja una rampa de pérdida de peso con comportamiento intermedio entre el polímero nativo y el agente modificante, esto era de esperarse, y comprueba la

existencia de interacción entre ambos agentes más allá de las interacciones físicas. Debido a que no estamos hablando de una estructura sencilla o un homopolímero, es un poco más retador el poder determinar que implican cada una de las inflexiones en la primera derivada de la función del termograma.

5.3. Efecto antioxidante de las moléculas en estudio

Los antioxidantes; interfieren en la cadena de reacciones de oxidación de uno o varios compuestos diana (Sardarodiyani et al., 2016). Por lo que; el determinar las capacidades antioxidantes de una sustancia implica la evaluación de su actividad contra diversos compuestos modelo, que nos permiten observar el rol del antioxidante en un sistema complejo. En este trabajo, se revisaron métodos que nos permiten observar la capacidad de captación de radicales orgánicos, metálicos y de oxígeno. La primera de estas características es apreciable en la prueba de DPPH, donde dicho radical estable, se pone en contacto con diversas concentraciones de la L-Arg, el ácido gálico, el PGAL y el PGAL-g-L-Arg, para este ensayo también fueron sintetizados materiales con distinto grado de incorporación de L-Arg, teniendo PGAL con incorporación al 2, 5 y 23 % con el fin de observar como la ramificación afecta a la inhibición de radical orgánico. Estos comportamientos, se pueden observar en la Figura 12. La primera diferencia se haya entre el ácido gálico y su polímero, este último, debe de estar al triple de concentración que el monómero para poder inhibir al 100% el radical. Esta diferencia de capacidad, se atribuye a la pérdida de hidrógenos en el sistema para poder realizar la transferencia de electrones del ácido gálico al DPPH, este tipo de reducción ya ha sido estudiado previamente (Alavi Rafiee et al., 2018; Chen et al., 2020), por otro lado, el polímero al no poseer hidrógenos capaces de ceder sus electrones, y a la existencia de un radical libre en la estructura (Romero-Montero et al., 2019), ha demostrado reducir al DPPH mediante un sistema de transferencia de un electrón (SET por sus siglas en inglés), ambos mecanismo de transferencia electrónica son eficientes, no obstante, la menor capacidad de reducción del PGAL se puede atribuir tanto a la carga como la estabilidad y rigidez estructural (Romero-Montero et al., 2019), lo que limita la reducción.

Comparando el polímero nativo con sus modificados, podemos observar como la inhibición de DPPH requiere de mayor cantidad de material conforme se aumenta la inserción de la L-Arg al polímero. Esto puede deberse a dos factores; el primero es la posible pérdida de radicales libres en la cadena polimérica durante el proceso de síntesis asistido por microondas, lo cual es crucial para el sistema SET. Una segunda explicación, es dada por la existencia de las ramificaciones de aminoácido en el compuesto, éstas interfieren con el acercamiento del DPPH y el polímero, es decir, las ramificaciones actúan como obstáculos en reacción SET con la cadena principal de PGAL.

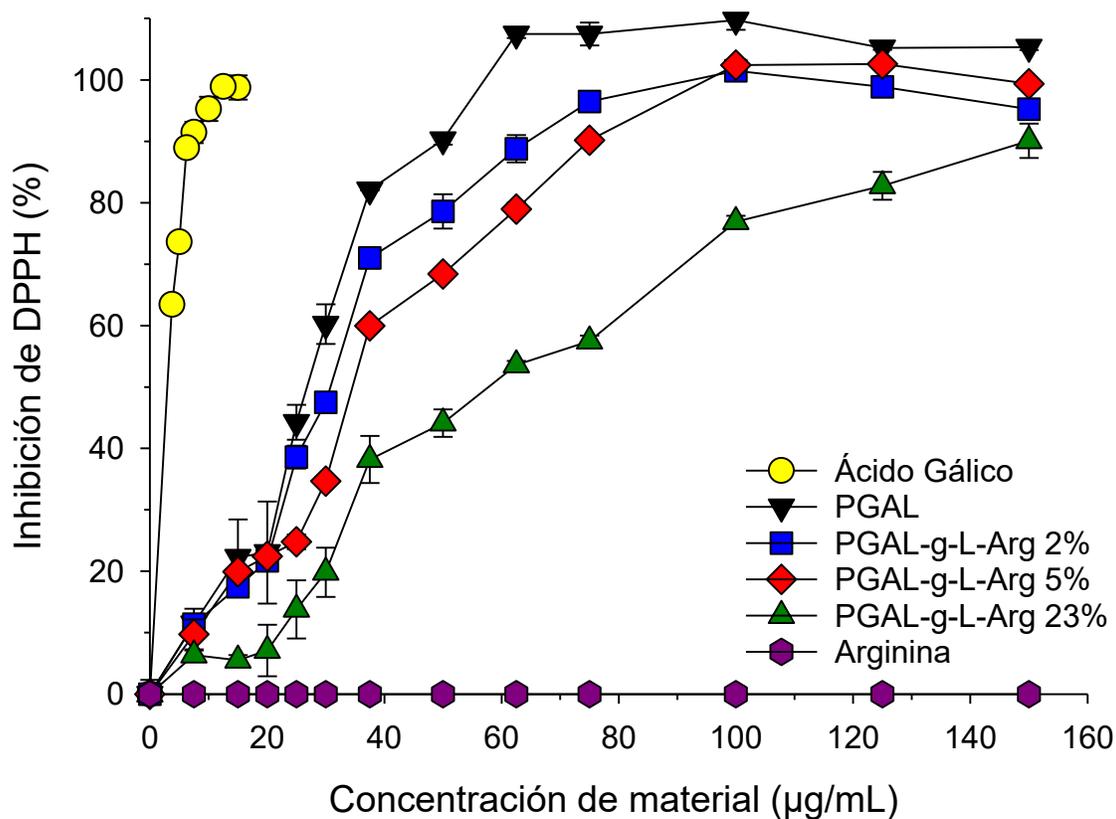


Figura 12. Porcentajes de inhibición del radical DPPH con los distintos materiales.

A partir de los datos de la Figura 12, nos es posible determinar la concentración del material a la que se inhibe la mitad de los radicales de DPPH en el sistema (IC_{50}). Este parámetro es inversamente proporcional al poder antioxidante del material. El aminoácido libre no demostró poseer ninguna capacidad de inhibición, incluso a altas

concentraciones, por lo que no se determinó IC₅₀, para el PGAL y el PGAL-g-L-Arg 23%, este valor esta reportado en la Tabla 9.

Tabla 9. Ensayos antioxidantes para PGAL y PGAL-g-L-Arg

Material	IC ₅₀ en DPPH (g/L)	FRAP (eq mM Trolox)	IC ₅₀ en ORAC (μM)	Retraso de OH• (eq μMTrolox/g)
PGAL	0.69 ^a	1.03 ± 0.06 ^a	908.27 ± 141.71 ^a	7.16 ± 0.51 ^a
PGAL-g-L-Arg	1.43 ^b	0.52 ± 0.06 ^b	615.34 ± 84.24 ^b	9.48 ± 1.06 ^b

Dentro de cada propiedad medida, los promedios con diferentes letras representan diferentes grupos de significación mediante la comparación de medias de grupos mediante la prueba de Tukey Kramer.

Como ya se ha discutido previamente, la presencia del aminoácido en PGAL-g-L-Arg en el modificado afecta en la inhibición del radical orgánico, necesitando el doble de concentración de polímero para alcanzar el mismo punto de inhibición con respecto al PGAL.

La siguiente capacidad antioxidante para analizar, es la interferencia de centros metálicos, esto a través del ensayo FRAP, la especie reactiva del modelo es un centro metálico de hierro (II), este metal es el responsable de la catálisis de la reacción de Fenton y por tanto en la generación de especies reactivas de oxígeno en alimentos y varios sistemas biológicos (Zhang et al., 2019). Típicamente, los antioxidantes influyen con estas especies metálicas de dos formas, una es secuestrando al metal por enlaces coordinados y con esto desacelerando la catálisis, o bien, captando los electrones del átomo, teniendo el mismo efecto (Cherrak et al., 2016). Como se observa en este ensayo, se compara la capacidad de inhibición del antioxidante comercial Trolox, tomado como modelo, con la de los compuestos, resultando que 2 mM de PGAL es equivalente a 1 mM de este compuesto de referencia, lo que lo clasifica como un antioxidante de buen poder inhibidor, comparándose con las capacidades de reducción de la quercitina y otros de sus derivados, así como del ácido clorogénico, la catequina y la epicatequina (Tsao et al., 2005). Por su parte, la misma cantidad de modificado solamente equivale a la mitad de Trolox. Se esperaba que esta propiedad se acrecentara con la modificación, tal vez mediante un

fenómeno de secuestro del metal, quelándolo con los grupos guanidinio de las ramificaciones de L-Arg, mas no fue así, y se atribuyen las mismas causas de interferencia de las ramificaciones y la pérdida de radical existentes en el ensayo de DPPH, clasificando al modificado como uno de capacidad baja en este ensayo.

Mientras que las inhibiciones de radicales orgánicos y de centros metálicos parecen empeorar con la inserción de la L-Arg, la inhibición y retardo de las especies de oxígeno presentan un comportamiento diferente, tanto la prueba de ORAC, que usa como modelo a radicales alcoxilo, como el retardo del radical hidroxilo demuestran una mejora significativa después de la modificación. En el caso de ORAC se disminuye su IC₅₀ en un tercio, este fenómeno se entiende a partir de la misma capacidad de la L-Arg a inhibir radicales de oxígeno, suceso que ha sido reportado previamente. Comparando a ambos compuestos con el ácido gálico, se ha de notar que ninguno se acerca a su capacidad de inhibir radicales de oxígeno, ya que este compuesto reporta un ORAC de 1.1 μM (Velderrain-Rodríguez et al., 2018). Por su parte el retraso de radical hidroxilo, aunque sufre un cambio significativo, la mejora no es tan evidente, teniendo solamente un 1 μM de Trolox de diferencia, una vez más, este fenómeno ocurre con lo previamente reportado, los radicales de oxígeno se ven captados por el hidrógeno de la amina α en el aminoácido (Wallner et al., 2001).

5.4. Efecto antimicrobiano de los diferentes compuestos

Los ensayos microbiológicos revelaron la incapacidad del PGAL y el PGAL-g-L-Arg de inhibir completamente a *E. coli*. No obstante, ambos materiales se mostraron eficaces contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Esto es común en los SMAMPs reportados con Gram negativas (Khan et al., 2016), por lo que queda trabajo por hacer en el objetivo de generar un compuesto antimicrobiano que sea inespecífico de Gram, aun así, tenemos entre manos a un polímero modificado creado con sustancias y procesos inocuos con la capacidad de inhibir a dos bacterias de interés en bioseguridad. El comportamiento de inhibición para las tres bacterias con el PGAL-g-L-Arg (23 % de incorporación) se encuentra graficado en la Figura 13. Como se mencionó previamente, el factor que posiblemente sea la diferencia entre la inhibición y la supervivencia de la bacteria es la conformación del exterior de ésta.

Dado que tanto el PGAL, como el modificado tienen pesos moleculares muy altos como para ser transportados al intersticio bacteriano, se desestima que los polímeros tengan efecto en cualquier otro organelo que no sea la membrana o la pared de la célula, así como las proteínas que se encuentren alojadas en éstas. Al obtener una respuesta inhibitoria en bacterias Gram (+), mas no en aquella de Gram (-), nos ayuda a soportar dicha teoría.

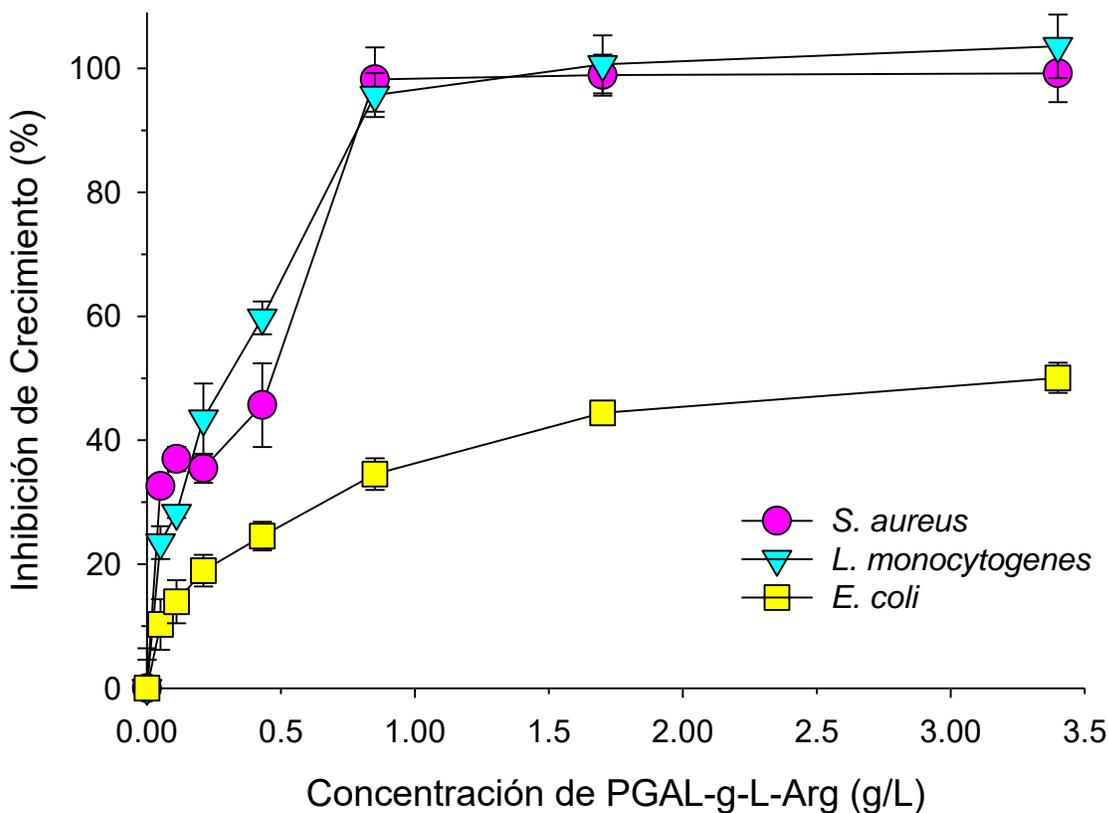


Figura 13. Evaluación del efecto antimicrobiano de PGAL-g-L-Arg (incorporación al 23%) a diferentes concentraciones contra *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli*.

En la prueba MIC (Tabla 10) es apreciable el mejoramiento en la eficacia de la inhibición de las bacterias cuando el polímero se encuentra modificado, ya que se observa una disminución de la MIC conforme se aumenta la cantidad de aminoácido insertado en el polímero. Si bien entre los modificados con 2 y 5% de inserción no es apreciable el cambio en estas concentraciones entre sí, para aquel con 23% sí que es notable la mejora,

disminuyendo 8 veces la concentración de inhibición. Es posible que la aparente falta de cambio de la MIC en PGAL-g-L-Arg 2% y 5%, se deba a que en las concentraciones más altas del ensayo se encontraban demasiado distantes una de la otra: 6.8, 3.4, 2.55, 1.7y 0.85g/L, por lo que, cabe la posibilidad que las MIC de los modificados de menor inserción se encuentren entre 6.8 y 3.4 g/L.

La MIC del ácido gálico para las tres cepas usadas ha sido reportada previamente, estableciéndose entre 1.5 y 2 g/L (Borges et al., 2013), lo que posiciona al PGAL como incapaz de inhibir a las bacterias a las concentraciones de trabajo, más el PGAL-g-L-Arg se encuentra por debajo del monómero. Una de las desventajas de este compuesto, es su alta concentración para generar la inhibición bacteriana, ya que muchos análogos de este son capaces de inhibir a concentraciones hasta 100 veces más bajas que el PGAL-g-L-Arg (Fu et al., 2013; Gabriel et al., 2008), no obstante, este modificado aún mantiene la mayoría de sus cargas negativas intactas, por lo que se prevé que un modificado con mayor número de inserciones de L-Arg, será capaz de disminuir su MIC.

La MBC, al estar tan íntimamente relacionada con la MIC, demuestra las mismas tendencias que ésta, como se observa en Tabla 10.

Tabla 10. MIC y MBC del PGA, L y PGAL-g-L-Arg a distintos grados de incorporación.

Material	L-Arg (%)	MIC (g L ⁻¹)			MBC (g L ⁻¹)		
		SA	LM	EC	SA	LM	EC
PGAL	0	-	-	-	-	-	-
	2	2.55	2.55	-	3.40	3.40	-
PGAL-g-L-Arg	5	2.55	2.55	-	3.40	3.40	-
	23	0.85	0.85	-	1.70	1.70	-

SA: *Staphylococcus aureus*; LM: *Listeria monocytogenes*; EC: *Escherichia coli*

- El material no presenta efectos inhibitorios o bactericidas.

En cuanto a la viabilidad celular, la prueba con el par cromóforo SYTO 9 / yoduro de propidio evidencian la eficacia en la desactivación de *L. monocytogenes* y *S. aureus* en presencia del PGAL-g-L-Arg a concentración de la MIC, también se comprueba su ineficacia contra *E. coli*. Se observa en la Figura 14 que en el tratamiento de PGAL a 0.85 g/L, las tres bacterias fluorescen en su mayoría en verde, esta coloración se exhibe cuando solo el SYTO 9 entra en las bacterias, ya que es capaz de permear la membrana dando la coloración al complejarse con el ADN. La ausencia de coloración roja propia del yoduro de propidio implica que no existe daño a nivel de tal organelo, por lo que se considera a las bacterias como viables, por otro lado, para PGAL-g-L-Arg a la misma concentración (0.85 g/L), las fluorescencias cambian considerablemente para las bacterias Gram (+), habiendo mayoritariamente células con fluorescencia amarilla (Figura 14). Este suceso ocurre cuando tanto el SYTO 9 como el yoduro de propidio son capaces de entrar a la célula y complejarse con su material genético, lo que implica tanto un cambio en la permeabilidad de la membrana celular, como la inviabilidad bacteriana. La Figura 15 presenta de forma gráfica el porcentaje de viabilidad celular de este ensayo.

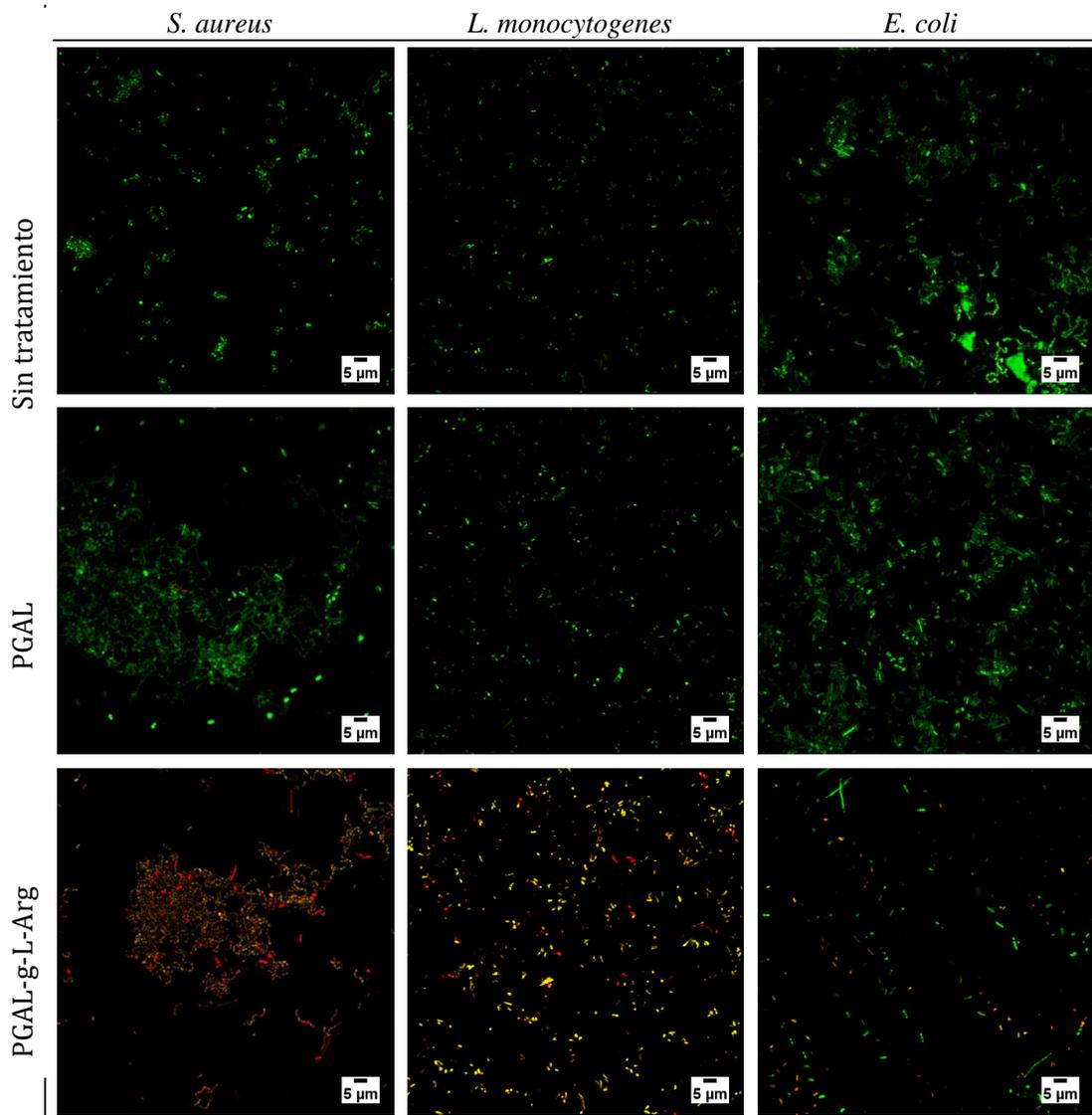


Figura 14. Microscopias confocales sobreposicionadas de las distintas bacterias en presencia o ausencia de materiales.

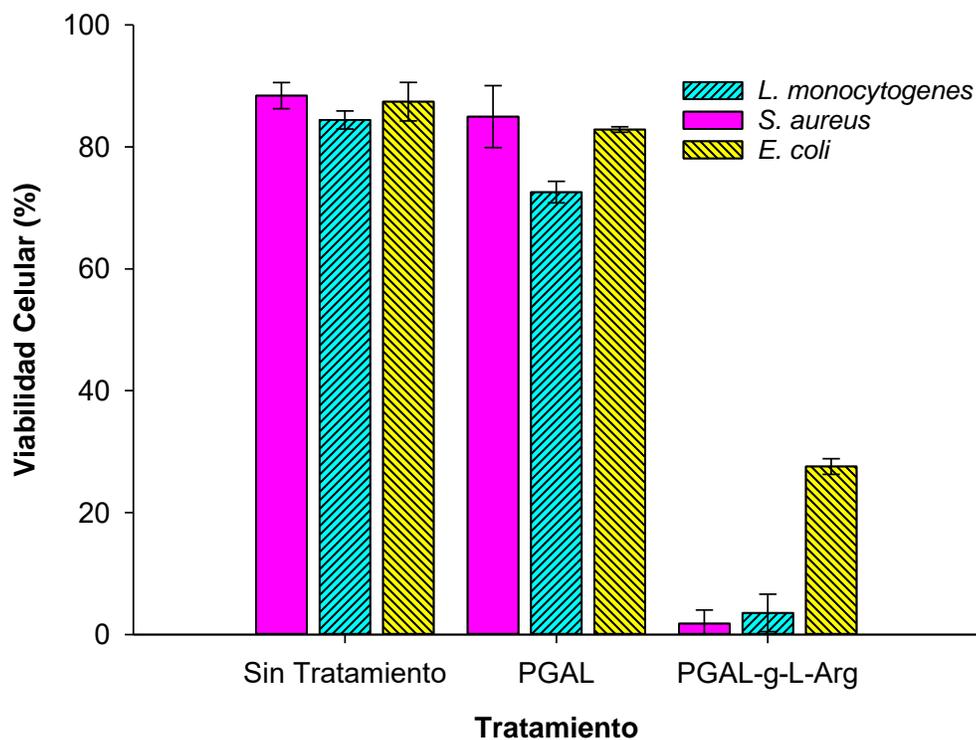


Figura 15. Cuantificación de la viabilidad de bacterias expuestas a PGAL y PGAL-g-L-Arg en fluorescencia confocal

Otra forma de observar el cambio de permeación de la membrana es sometiendo a las bacterias expuestas con el material a una solución de cristal violeta. El fundamento de este procedimiento implica que el colorante es embebido por las bacterias de forma natural, y se refleja esta absorción con una pérdida en la absorbancia en la solución de cristal violeta. Esta absorción disminuye conforme al aumento de permeación del cristal en las células, es decir, si la absorbancia de la solución después de estar en contacto con bacterias tratadas con un material disminuye, dicho material aumenta la permeabilidad de la membrana bacteriana (Devi et al., 2010). En la Figura 16 se demuestra este cambio de permeación para las tres bacterias en presencia de PGAL, esto implica que quizás el polímero genera cierto grado de disrupción de membrana que permite una mejor absorción del tinte en las células o bien que el mismo polímero es capaz de captar parcialmente el tinte. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, este efecto no es suficiente para poder generar un efecto inhibitor ni para generar inviabilidad, incluso, debido a la falta de presencia de yoduro de propidio en el tratamiento PGAL para

microscopia confocal, podemos concluir que tanto el cristal violeta como el yoduro de propidio solo pueden acomodarse en la membrana, pero no penetrarla. Por otro lado, también hay un aumento considerable de la captación de cristal violeta en bacterias tratadas con PGAL-g-L-Arg, que ronda el 95% para *S. aureus* y *L. monocytogenes*, lo que implica que la rotura de la membrana es suficiente para que relativamente grandes cantidades del tinte entren dentro de la célula.

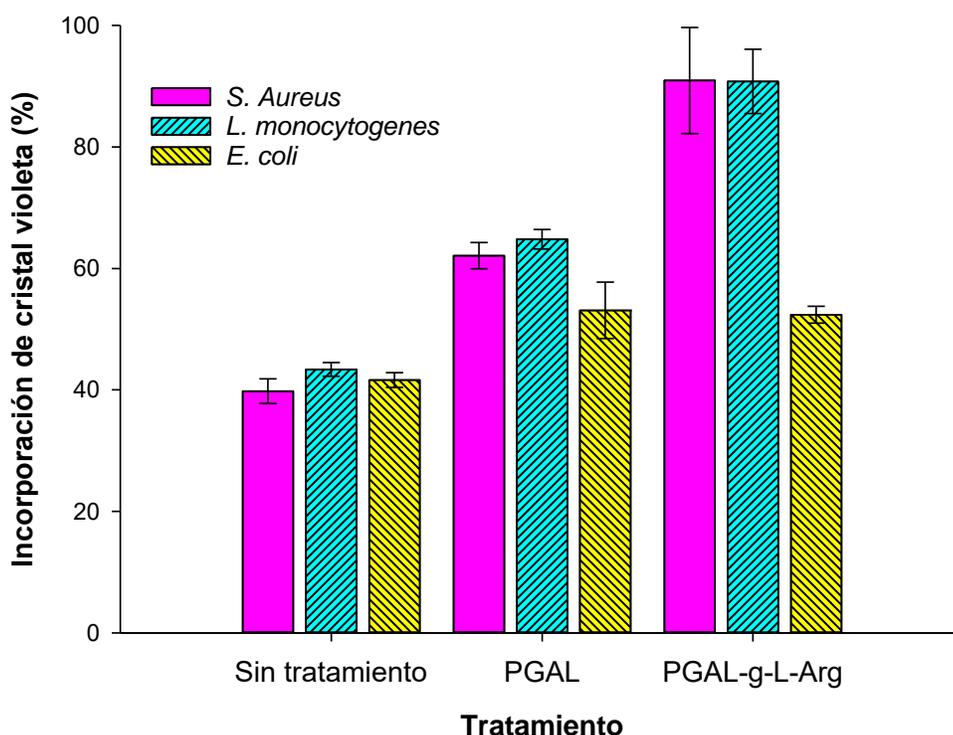


Figura 16. Efecto de PGAL y PGAL-g-L-Arg en la permeabilidad de la membrana bacteriana.

Las capturas de las SEM del tratamiento de cultivos de bacterias susceptibles con PGAL y PGAL-g-L-Arg a 0.85 g/L (Figura 17) arrojan más evidencia sobre la forma en la que el modificado afecta a estos procariontes. Es fácilmente observable el cambio en la membrana de *L. monocytogenes*, e interferencia en la fisión celular de *S. aureus*, así como la ausencia de estos cambios morfológicos en el tratamiento con PGAL. El cambio en el comportamiento de este polímero se asocia directamente con la L-Arg incorporada, ya que este aminoácido facilitara la unión entre el PGAL y la bacteria a través de cargas electrostáticas, la positiva proveniente del guanidinio de la L-Arg y la negativa encontrada

en los fosfolípidos de la membrana bacteriana, como ocurre con péptidos antimicrobianos (Chan et al, 2006; Morita et al., 2013).

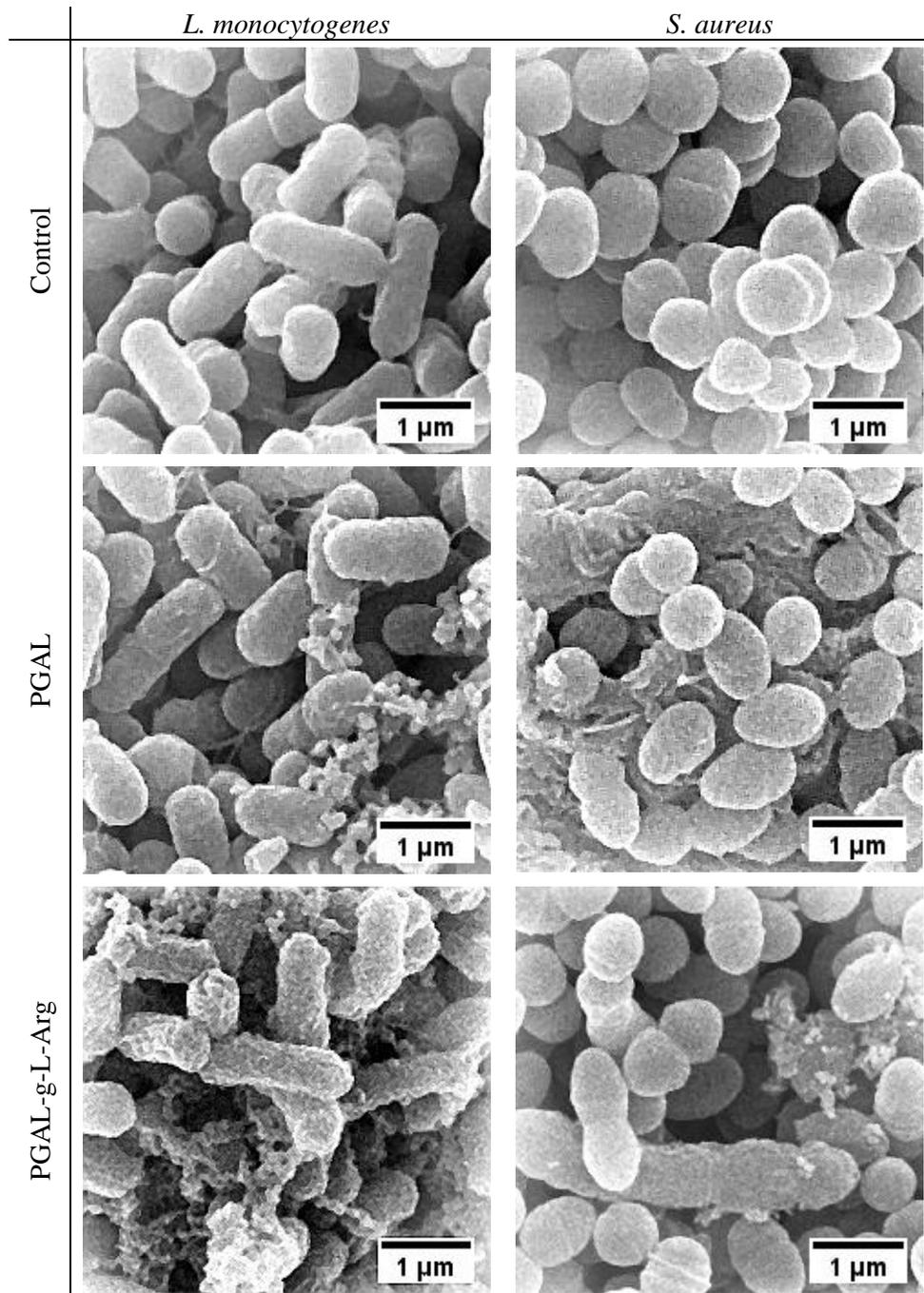


Figura 17. Micrografías SEM de las bacterias susceptibles en presencia o ausencia de PGAL y PGAL-g-L-Arg a MIC

La combinación de las MIC y MBC altas, los cambios conformacionales observados en el SEM y los cambios de permeabilidad después de 18 h presentes en las pruebas de violeta cristal y la prueba de fluorescencia nos permiten afirmar que PGAL-g-L-Arg tiene un mecanismo de disrupción por formación de carpeta, que desencadena la formación de poros o canales después de alcanzada cierta concentración. Este mecanismo requiere altas concentraciones del compuesto para saturar la membrana bacteriana y luego, al alcanzar una concentración crítica, alterar la integridad del organelo aumentando su permeación (Li et al., 2017). La selectividad del polímero para dañar únicamente las bacterias Gram (+) también contribuye a esta conclusión, ya que, por las dimensiones del compuesto y su necesidad de agregarse en la membrana a altas concentraciones, se impide realizar este proceso en las dos bicapas lipídicas en *E. coli*, de esta manera, la bacteria puede preservar parte de su población viable, superando al material en unos cuantos ciclos celulares (M. R. E. Santos et al., 2016; Ofek et al., 1994; Wimley, 2010). El mecanismo de carpeta para *L. monocytogenes* y *S. aureus* se presenta de forma esquemática en la siguiente Figura 18.

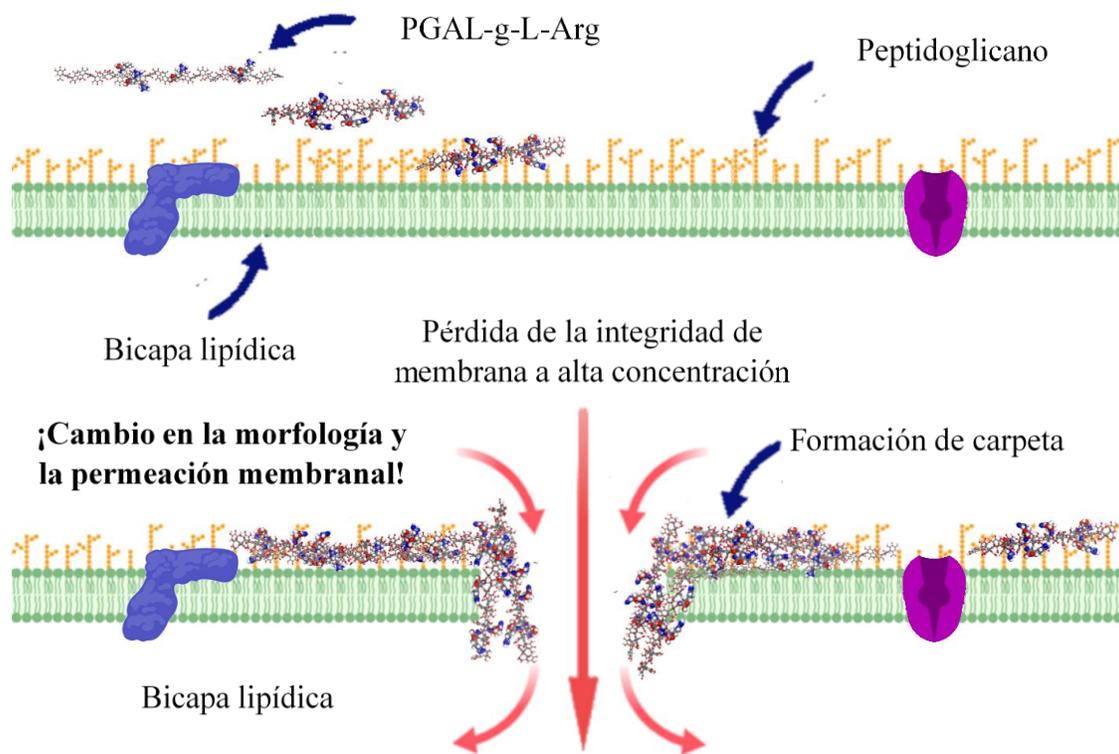


Figura 18. Propuesta de mecanismo de inhibición de PGAL-g-L-Arg sobre Gram +

5.5. Citocompatibilidad de los diferentes materiales

Debido a la concentración a la que el PGAL-g-L-Arg es relativamente alta, así como para asegurar su inocuidad, era necesario el conocer si este compuesto tenía la capacidad de alterar de alguna manera a las células eucariotas. La estructura fundamental del modificado es una de tipo lignano, es decir, pertenece o se asemeja a las fibras alimentarias, las cuales, no afectan al aparato digestivo, al contrario, facilitan la peristalsis, promoviendo una buena digestión (Maphosa et al., 2015), situación que se vio oportuna, ya que se espera la aplicación del compuesto en el área biomédica o matrices alimentarias y relacionadas. Siguiendo esta línea de pensamiento, el agente modificante es un aminoácido no esencial (Morris, 2016), es decir, el organismo mismo produce este compuesto, y si el PGAL-g-L-Arg perdiera sus ramificaciones liberaría L-Arg, el cual no tiene más que un efecto en el aporte energético del organismo.

Los eritrocitos son el modelo idóneo para determinar si existe un efecto adverso entre un compuesto y otras células eucariotas, ya que estos son incapaces de generar una respuesta de defensa al no poseer núcleo y en este caso, también se toma como ventaja a su conformación membranal que es de las más básicas existentes en el cuerpo humano (Marchesi, 2008). En el ensayo de hemólisis se explora estas cualidades para dar un sistema de detección sencillo. En caso de existir una interacción adversa, debido a la susceptibilidad de membrana del eritrocito, éste reventaría, generando hemólisis, que se observa como una zona grisácea en la superficie del agar sangre, tal como se observa en la Figura 19, donde se usó agua destilada como control positivo de hemólisis, resultando en un halo de 0.43 ± 0.23 mm, en este trabajo, sólo esta sustancia control generó respuesta hemolítica, tanto el Buffer de fosfatos (control negativo), como el PGAL y el PAGL-g-L-Arg a 0.85 g/L no crearon lisis, implicando la inocuidad de ambos polímeros frente a estas células sanguíneas.

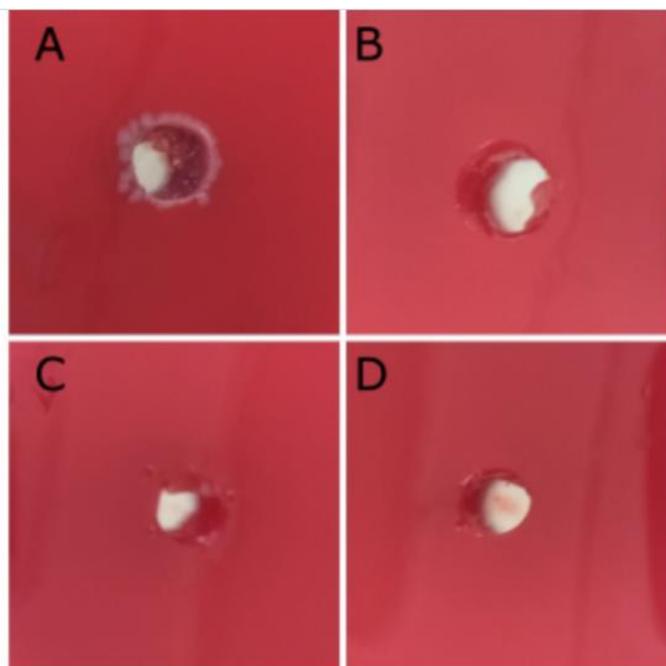


Figura 19. Efecto de los diferentes tratamientos en el ensayo de hemólisis: (A) Agua, (B) Buffer de fosfato, (C) PGAL y (D) PGAL-g-L-Arg

La segunda prueba de citocompatibilidad, se realizó con las células blancas, ya que estas a diferencia de las rojas poseen organelos que pueden ser sometidos a las pruebas de MTT y rojo neutro. Estos ensayos nos permiten observar si los compuestos tienen algún efecto en el metabolismo celular, de forma semejante al ensayo de cristal violeta, la disminución de coloración en las soluciones finales de estos ensayos refleja un cambio metabólico. La MTT da vista a la eficiencia de la actividad mitocondrial, mientras que el rojo neutro refleja la actividad lisosomal. Los resultados de estos ensayos nos describen que no existe daño a los organelos de las células linfocíticas en las muestras sanguíneas de distintos donadores, que fueron expuestas al PGAL y el PGAL-g-L-Arg, esto es visible en la Figura 20, donde no sólo no hay diferencia aparente, si no que en ensayo de prueba Turkey, tampoco hubo diferencia significativa con un α de 0.05. Con la interpretación de la prueba de hemólisis y la del ensayo presente, se puede estimar que, en caso de existir interacción entre los polímeros y las células eucariotas, éstas no presentan ningún efecto a las concentraciones en las que el PGAL-g-L-Arg genera inhibición bacteriana.

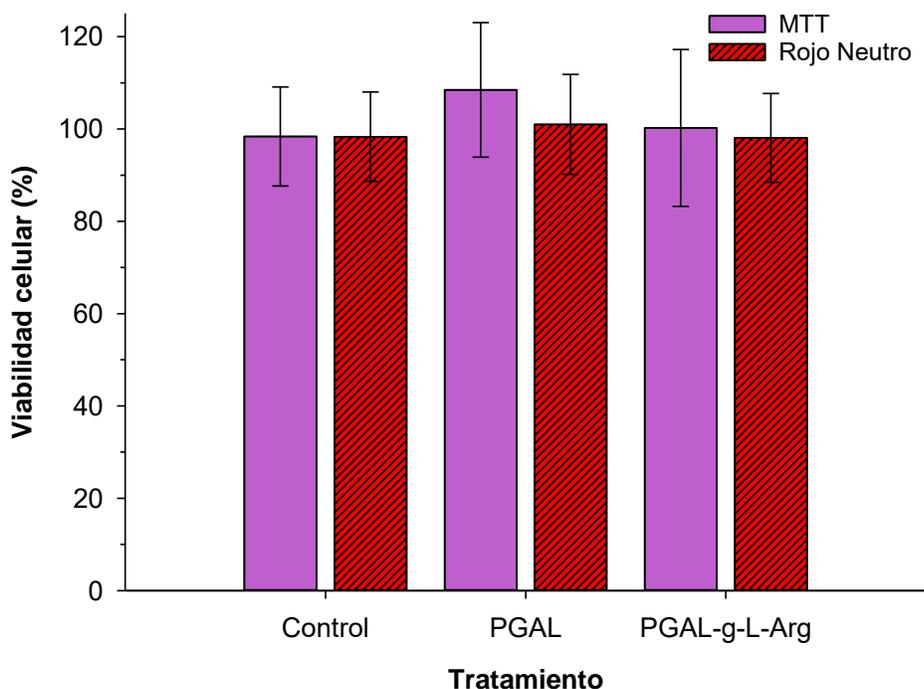


Figura 20. Viabilidad linfocitaria PGAL y PGAL-g-L-Arg contra control en los ensayos de MTT y rojo neutro

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se estableció un protocolo de metodología y se sintetizó un modificado catiónico usando como base al PGAL, y a la L-Arg como agente modificante. Se determinó su estructura a través de las pruebas de TNBSA, RMN-¹H, IR y termogravimetría, apuntando a una eficiencia de incorporación del 23%, y una relación de amidación esterificación de 3:1. Se determinó que este compuesto tiene poder antioxidante moderado, cuyo principal rol en la inhibición de la oxidación es la de captador de radicales alcoxilo, así como su capacidad de atacar de manera diferenciada a bacterias Gram (+) de aquellas Gram (-) y de células eucariotas. El mecanismo de inhibición transcurre a través de un cambio morfológico por formación de carpeta en la membrana bacteriana de estos microorganismos, dando paso a un cambio en la permeabilidad y desembocando en la muerte celular. En conjunto, se comprueba que esta simple integración de cargas positivas a través de ramificaciones, son capaces de proveer al PGAL con la capacidad de inhibir por disrupción membranal a las bacterias Gram (+).

7. REFERENCIAS

- Alavi Rafiee, S., Farhoosh, R., & Sharif, A. (2018). Antioxidant Activity of Gallic Acid as Affected by an Extra Carboxyl Group than Pyrogallol in Various Oxidative Environments. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(11), 1800319. doi: 10.1002/ejlt.201800319
- Aris, Z. F. M., Bouldin, R. M., Pelletier, M. G. H., Gaines, P., Budhlall, B., & Nagarajan, R. (2017). Microwave-assisted synthesis and characterization of hydrophilically functionalized polygalacturonic acid. *Carbohydrate Polymers*, 155, 432–439.
- Barbosa, S. L., Dabdoub, M. J., Hurtado, G. R., Klein, S. I., Baroni, A. C. M., & Cunha, C. (2006). Solvent free esterification reactions using Lewis acids in solid phase catalysis. *Applied Catalysis A: General*, 313(2), 146–150. doi: 10.1016/j.apcata.2006.07.015
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. doi: 10.1006/abio.1996.0292
- Bhattacharya, A., Rawlins, J. W., & Ray, P. (Eds.). (2009). *Polymer Grafting and Crosslinking*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Bhattacharya, D., Ghosh, D., Bhattacharya, S., Sarkar, S., Karmakar, P., Koley, H., & Gachhui, R. (2018). Antibacterial activity of polyphenolic fraction of Kombucha against *Vibrio cholerae*: targeting cell membrane. *Letters in Applied Microbiology*, 66(2), 145–152. doi: 10.1111/lam.12829
- Boddy, C. (2014). *MIC Determination by Microtitre Broth Dilution Method*. The Boddy Lab. Retrieved from http://www.boddylab.ca/file/MIC_Determination_by_Microtitre_Broth_Dilution_Method.pdf
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simoes, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256–265.
- Bouarab Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (2019). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1457–1474. doi: 10.1002/jsfa.9357
- Carlson, R. (2005). *Design and Optimization in Organic Synthesis* (R. Carlson & J. Carlson, Eds.; 1st ed.). Elsevier Science. Retrieved from <https://www.elsevier.com/books/design-and-optimization-in-organic-synthesis/carlson/978-0-444-51527-8>
- Chan, D. I., Prenner, E. J., & Vogel, H. J. (2006). Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(9), 1184–1202. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.04.006

- Chantziaras, I., Boyen, F., Callens, B., & Dewulf, J. (2014). Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3), 827–834.
- Chen, X., Liang, L., & Han, C. (2020). Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay. *LWT*, 131, 109769. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109769
- Chen, M., Zhao, Z., Meng, H., & Yu, S. (2017). The antibiotic activity and mechanisms of sugar beet (*Beta vulgaris*) molasses polyphenols against selected food-borne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 354–360. doi: 10.1016/j.lwt.2017.04.063
- Cherrak, S. A., Mokhtari-Soulimane, N., Berroukeche, F., Bensenane, B., Cherbonnel, A., Merzouk, H., & Elhabiri, M. (2016). In Vitro Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation. *PLOS ONE*, 11(10), e0165575. doi: 10.1371/journal.pone.0165575
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181.
- Díaz-Sánchez, J., Roquero, P., Hernández-Alcántara, J. M., Rosas-Aburto, A., Vázquez-Torres, H., & Gimeno, M. (2019). Complementary electrochromic devices of PANI and PEDOT using the enzymatic poly(gallic acid). *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 200(May), 109973. doi: 10.1016/j.solmat.2019.109973
- E. Greber, K., & Dawgul, M. (2016). Antimicrobial Peptides Under Clinical Trials. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(5), 620–628. doi: 10.2174/1568026616666160713143331
- Ferroud, C., Godart, M., Ung, S., Borderies, H., & Guy, A. (2008). Microwaves-assisted solvent-free synthesis of N-acetamides by amidation or aminolysis. *Tetrahedron Letters*, 49(18), 3004–3008.
- Fu, T.-H., Li, Y., Thaker, H. D., Scott, R. W., & Tew, G. N. (2013). *Expedient Synthesis of SMAMPs via Click Chemistry*. doi: 10.1021/ml400155a
- Gabriel, G. J., Madkour, A. E., Dabkowski, J. M., Nelson, C. F., Nüsslein, K., & Tew, G. N. (2008). Synthetic mimic of antimicrobial peptide with nonmembrane-disrupting antibacterial properties. *Biomacromolecules*, 9(11), 2980–2983. doi: 10.1021/bm800855t
- Ganewatta, M. S., & Tang, C. (2015). Controlling macromolecular structures towards effective antimicrobial polymers. In *Polymer* (pp. A1–A29). doi: 10.1016/j.polymer.2015.03.007
- Gaona-Gaona, L., Molina-Jijón, E., Tapia, E., Zazueta, C., Hernández-Pando, R., Calderón-Oliver, M., Zarco-Márquez, G., Pinzón, E., & Pedraza-Chaverri, J. (2011). Protective

- effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology*, 286(1–3), 20–27. doi: 10.1016/j.tox.2011.04.014
- Gould, K. (2016). Antibiotics: from prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), 572–575.
- GRAS Substances (SCOGS) Database | FDA. (n.d.). Retrieved from <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-substances-scogs-database>
- Hernández-Valdepeña, M. A., Pedraza-Chaverri, J., Gracia-Mora, I., Hernández-Castro, R., Sánchez-Bartez, F., Nieto-Sotelo, J., Montiel, C., Shirai, K., & Gimeno, M. (2016). 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, 485–491. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.042
- Jimoh, M. O., Afolayan, A. J., & Lewu, F. B. (2019). Antioxidant and phytochemical activities of *Amaranthus caudatus* L. harvested from different soils at various growth stages. *Scientific Reports*, 9(1), 12965. doi: 10.1038/s41598-019-49276-w
- Jobgen, W. S., Fried, S. K., Fu, W. J., Meininger, C. J., & Wu, G. (2006). Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. In *Journal of Nutritional Biochemistry* (Vol. 17, Issue 9, pp. 571–588). Elsevier. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.12.001
- Khalafi-Nezhad, A., Mokhtari, B., & Rad, M. N. S. (2003). Direct preparation of primary amides from carboxylic acids and urea using imidazole under microwave irradiation. *Tetrahedron Letters*, 44(39), 7325–7328. doi: [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(03\)01866-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)01866-5)
- Khan, I., Miskeen, S., Khalil, A. T., Phull, A.-R., Kim, S. J., & Oh, D.-H. (2016). Foodborne Pathogens: *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* An Unsolved Problem of the Food Industry. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15(6), 505–514.
- Krasaechol, N., Sanguandeeikul, R., Duangmal, K., & Owusu-apenten, R. K. (2008). Structure and functional properties of modified threadfin bream sarcoplasmic protein. *Food Chemistry*, 107, 1–10. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.03.075
- Kumar, S., & Rai, S. B. (2010). Spectroscopic studies of L-arginine molecule. *Indian Journal of Pure and Applied Physics*, 48(4), 251–255.
- Lee, K. J., Oh, Y. C., Cho, W. K., & Ma, J. Y. (2015). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity Determination of One Hundred Kinds of Pure Chemical Compounds Using Offline and Online Screening HPLC Assay. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. doi: 10.1155/2015/165457
- Li, J., Koh, J. J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., & Beuerman, R. W. (2017). Membrane active antimicrobial peptides: Translating mechanistic insights to design.

In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 11, Issue FEB, p. 73). Frontiers Research Foundation. doi: 10.3389/fnins.2017.00073

López, J., Hernández-Alcántara, J. M., Roquero, P., Montiel, C., Shirai, K., Gimeno, M., & Bárzana, E. (2013). Trametes versicolor laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 100–105.

Maphosa, Y., & Jideani, V. A. (2015). *Food Reviews International Dietary fiber extraction for human nutrition-A review Dietary fiber extraction for human nutrition-A review*. doi: 10.1080/87559129.2015.1057840

Marchesi, V. T. (2008). The Relevance of Research on Red Cell Membranes to the Understanding of Complex Human Disease: A Personal Perspective. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*, 3, 1–9. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154321

Martin-Serrano, Á., Gómez, R., Ortega, P., & de la Mata, F. J. (2019). Nanosystems as Vehicles for the Delivery of Antimicrobial Peptides (AMPs). *Pharmaceutics*, 11(9), 448. doi: 10.3390/pharmaceutics11090448

Morita, S., Tagai, C., Shiraishi, T., Miyaji, K., & Iwamuro, S. (2013). Peptides Differential mode of antimicrobial actions of arginine-rich and lysine-rich histones against Gram-positive *Staphylococcus aureus*. *Peptides*, 48, 75–82. doi: 10.1016/j.peptides.2013.07.025

Morris, S. M. (2016). Arginine metabolism revisited. *Journal of Nutrition*, 146(12), 2579S–2586S. doi: 10.3945/jn.115.226621

Muñoz-Bonilla, A., & Fernández-García, M. (2012). Polymeric materials with antimicrobial activity. *Progress in Polymer Science*, 37(2), 281–339.

Ofek, I., Cohen, S., Rahmani, R., Kabha, Dove Tamarkin, K., Herzig, Y., & Rubinstein, E. (1994). Antibacterial Synergism of Polymyxin B Nonapeptide and Hydrophobic Antibiotics in Experimental Gram-Negative Infections in Mice. In *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* (Vol. 38, Issue 2). Retrieved from <http://aac.asm.org/>

Ojeda-Porras, A., Hernández-Santana, A., & Gamba-Sánchez, D. (2015). Direct amidation of carboxylic acids with amines under microwave irradiation using silica gel as a solid support. *Green Chemistry*, 17(5), 3157–3163. doi: <https://doi.org/10.1039/C5GC00189G>

Özçelik, B., Kartal, M., & Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, 49(4), 396–402. doi: 10.3109/13880209.2010.519390

Prakash, S., Ramasubburayan, R., & Sri, V. (2016). In vitro — Scientific evaluation on antimicrobial, antioxidant, cytotoxic properties and phytochemical constituents of

- traditional coastal medicinal plants. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *83*, 648–657. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.019>
- 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. doi: [10.1016/j.molstruc.2019.07.050](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.07.050)
- 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. doi: [10.1039/c7ra00883j](https://doi.org/10.1039/c7ra00883j)
- Santos, M. R. E., Fonseca, A. C., Mendonça, P. v., Branco, R., Serra, A. C., Morais, P. v., & Coelho, J. F. J. (2016). Recent developments in antimicrobial polymers: A review. *Materials*, *9*(7). doi: [10.3390/MA9070599](https://doi.org/10.3390/MA9070599)
- Santos, N. A., Cordeiro, A. M. T. M., Damasceno, S. S., Aguiar, R. T., Rosenhaim, R., Carvalho Filho, J. R., Santos, I. M. G., Maia, A. S., & Souza, A. G. (2012). Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. *Fuel*, *97*, 638–643. doi: [10.1016/j.fuel.2012.01.074](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.01.074)
- Sardarodiyani, M., & Mohamadi Sani, A. (2016). Natural antioxidants: sources, extraction and application in food systems. In *Nutrition and Food Science* (Vol. 46, Issue 3, pp. 363–373). Emerald Group Publishing Ltd. doi: [10.1108/NFS-01-2016-0005](https://doi.org/10.1108/NFS-01-2016-0005)
- Shogren, R. L., & Biswas, A. (2006). Preparation of water-soluble and water-swelling starch acetates using microwave heating. *Carbohydrate Polymers*, *64*, 16–21. doi: [10.1016/j.carbpol.2005.10.018](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.10.018)
- Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., & Khanizadeh, S. (2005). Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(12), 4989–4995. doi: [10.1021/jf048289h](https://doi.org/10.1021/jf048289h)
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Torres-Moreno, H., Villegas-Ochoa, M. A., Ayala-Zavala, J. F., Robles-Zepeda, R. E., Wall-Medrano, A., & González-Aguilar, G. A. (2018). Gallic acid content and an antioxidant mechanism are responsible for the antiproliferative activity of “Ataulfo” mango peel on LS180 cells. *Molecules*, *23*(3). doi: [10.3390/molecules23030695](https://doi.org/10.3390/molecules23030695)
- Wallner, S., Hermetter, A., Mayer, B., & Wascher, T. C. (2001). The alpha-amino group of L-arginine mediates its antioxidant effect. *European Journal of Clinical Investigation*, *31*(2), 98–102. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2001.00771.x>
- Wang, X.-J., Yang, Q., Liu, F., & You, Q.-D. (2008). Microwave-Assisted Synthesis of Amide under Solvent-free Conditions. *Synthetic Communications*, *38*(7), 1028–1035.
- Weiss, I. M., Muth, C., Drumm, R., & Kirchner, H. O. K. (2018). Thermal decomposition of the amino acids glycine, cysteine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, arginine and histidine. *BMC Biophysics*, *11*(1), 2–16. doi: [10.1186/s13628-018-0042-4](https://doi.org/10.1186/s13628-018-0042-4)

- Wimley, W. C. (2010). Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. In *ACS Chemical Biology* (Vol. 5, Issue 10, pp. 905–917). NIH Public Access. doi: 10.1021/cb1001558
- World Health Organization, & others. (2014). *Antimicrobial resistance: 2014 global report on surveillance*. World Health Organization.
- Xiao-Feng, W., & Helfried, N. (2012). Zinc-Catalyzed Organic Synthesis: C-C, C-N, C-O Bond Formation Reactions. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 354(17), 3141–3160. doi: 10.1002/adsc.201200547
- Zamudio-Cuevas, Y., Andonegui-Elguera, M. A., Aparicio-Juárez, A., Aguillón-Solís, E., Martínez-Flores, K., Ruvalcaba-Paredes, E., Velasquillo-Martínez, C., Ibarra, C., Martínez-López, V., Gutiérrez, M., García-Arrazola, R., Hernández-Valencia, C. G., Romero-Montero, A., Hernández-Valdepeña, M. A., Gimeno, M., & Sánchez-Sánchez, R. (2020). The enzymatic poly(gallic acid) reduces pro-inflammatory cytokines in vitro, a potential application in inflammatory diseases. *Inflammation*, 1–12. doi: 10.1007/s10753-020-01319-5
- Zhang, Y., & Zhou, M. (2019). A critical review of the application of chelating agents to enable Fenton and Fenton-like reactions at high pH values. *Journal of Hazardous Materials*, 362, 436–450. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.09.035
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.033