



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE
PREGRADO

“Efecto de la funcionalización de poli(anhídrido maleico-*co*-estireno) con aminoácidos de distinto índice hidropático en la respuesta bioactiva de mallados poliméricos”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Sebastián Raúl Santander Baez

Directora del Seminario de Título

Dra. Laura Tamayo Villarroel

Julio, 2023

Santiago - Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE CIENCIAS
AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGÍA

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Ciencias Ambientales y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título, presentado por

Sebastián Raúl Santander Baez

“Efecto de la funcionalización de poli(anhídrido maleico-co-estireno) con aminoácidos de distinto índice hidropático en la respuesta bioactiva de mallados poliméricos”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de **Ingeniero en Biotecnología Molecular**

Dra. Laura Tamayo Villarroel
Directora Seminario de Título:

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Susan Lühr Sierra
Presidente Comisión:

Dr. Andrés Marcoleta Caldera
Evaluador:

Santiago de Chile, Julio 2023

DEDICATORIA

El presente seminario de título va dedicado a las personas que más me han apoyado a lo largo de todos los años de vida que tengo, mostrando su amor incondicional, estando presentes en los momentos buenos y malos, estas personas son: Mi madre (Cecilia Baez), Mi Tía Abuela (Verónica Bisama) y Desiderio Carriman (“Yeyo”).

Mi madre que ha sido mi pilar desde que tengo uso de razón, junto a mi Tía Abuela que lamentablemente falleció el presente año sin verme titulado. Al “Yeyo” que supo ser mi figura paterna.

Quiero dedicar todos mis logros y los que estén por venir estas personas que aprecio enormemente y que sin su apoyo no hubiera sido posible alcanzar la presente meta.

AGRADECIMIENTOS

- Al grupo “Los escapistas” que han estado conmigo a lo largo de la carrera siendo tanto amigas/os como compañeros de estudio y distracción.
- Agradecer a Eva Rekus que ha sido mi mejor amiga desde mi primer año de universidad, ha estado ahí en los momentos buenos y malos, apoyándome siempre y siendo parte de lo que fue mi paso por pregrado.
- La gente del “Discord” que siempre están ahí cuando se les necesita tanto en lo académico como en lo no académico.
- Mis compañeros de laboratorio que me ayudaron desde que llegue y me han enseñado como trabajar de manera correcta en el ámbito profesional.
- Agradecer a mi Padre (Antonio Santander) que si bien tuvimos nuestras diferencias en un momento sé que siempre me ha querido de manera incondicional y ha estado apoyándome a su manera.
- Gracias a mi gato “Spirit” que es el gato más cariñoso que pueda existir y que siempre me hace compañía.
- Un agradecimiento especial a la Dra. Laura Tamayo que sin su apoyo tanto académico, vocacional y emocional, no hubiera sido capaz de terminar este trabajo. Gracias por estar en los momentos difíciles y por ayudarme en todos los problemas que han ido surgiendo a lo largo del trabajo. También agradecerle por ayudarme a encontrar mi vocación, que espero lograr ser tan comprometido como ella y llegar a ser aunque sea la mitad de excelente docente y académico que es usted profesora.

- Gracias por último a todas/os mis compañeros que alguna vez me apoyaron y que por extensión no fueron nombrados, pero sepan que los tengo siempre presentes y que agradezco mucho su cariño y buena onda.

ÍNDICE DE CONTENIDOS	
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. Funcionalización del PSMA con aminoácidos	12
2. Síntesis de NPAg	13
3. Elaboración y caracterización de los mallados	14
4. Humectabilidad de los mallados	15
4.1. Absorción de agua	15
4.2. Ángulo de contacto	15
5. Liberaciones de los agentes activos	16

5.1. Liberación de NPAg	16
5.2. Liberación de caléndula	17
6. Biocompatibilidad de los mallados	18
6.1 Ensayo de citotoxicidad	18
6.2 Ensayo Hemolítico	19
7. Ensayo antibacteriano	20
RESULTADOS	22
1. Funcionalización del PSMA con aminoácidos	22
2. Síntesis de NPAg	23
3. Elaboración de los mallados y caracterización.	24
4. Humectabilidad de los mallados	27
4.1 Ángulo de contacto	27
4.2 Absorción de agua	28
5. Liberaciones de los agentes activos	31
5.1 Liberación de NPAg	31
5.2 Liberación de caléndula	31
6. Biocompatibilidad de los mallados	32

6.1 Ensayo de citotoxicidad	33
6.2 Ensayo hemolítico	34
7. Ensayo antibacteriano	35
DISCUSIÓN Y PROYECCIONES	37
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXO	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Índice hidropático de Phe, Gln y Tyr.....	9
Tabla 2: Diámetro promedio de las fibras poliméricas de PSMA y PSMAf.	26
Tabla 3: Diámetro promedio de las fibras poliméricas de PSMA@Phe con diferentes concentraciones de cal.....	26
Tabla 4: Diámetro promedio de las fibras poliméricas de PSMA@Phe con diferentes concentraciones de NPAg.	26
Tabla 5: Ángulo de contacto (avance y retroceso) e histéresis de los mallados de PSMA y PSMAf.....	27
Tabla 6: Grado hemolítico (%) de los mallados de PSMA y PSMAf con diferentes concentraciones de caléndula.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la reacción de funcionalización del PSMA con diferentes aminoácidos.....	12
Figura 2: Espectros ATR-IR de PSMA y PSMAf.	22
Figura 3: Espectro UV-Vis de la solución acuosa (línea azul) y de la solución orgánica (línea roja) de NPAg.	23
Figura 4: Imágenes TEM y HRTEM de NPAg. (A y B) TEM. (C) Imagen de campo oscuro obtenida de HRTEM.	24
Figura 5: Imágenes SEM de los mallados e histograma de distribución de los diámetros de las fibras	25
Figura 6: Capacidad de absorción de agua de PSMA y PSMAf en diferentes días.....	29
Figura 7: Liberaciones de iones plata (Ag^+) de los mallados de PSMA y PSMAf en diferentes días.....	31
Figura 8: Liberaciones de caléndula de los mallados de PSMA y PSMAf en diferentes días.	32
Figura 9: Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos NIH/3T3 frente mallados de PSMA y PSMAf con diferentes concentraciones de agentes activos.	33
Figura 10: Porcentaje de hemólisis de los mallados poliméricos (PSMA y PSMAf) con diferentes concentraciones de caléndula.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

Cal: Caléndula

Gln: Glutamina

NPAg: Nanopartícula(s) de plata

PBS 1X: Buffer fosfato salino 1X

Phe: Fenilalanina

PSMA: poli(anhídrido maleico-*co*-estireno)

PSMAf: PSMA funcionalizado con aminoácidos

PSMA@Gln: poli(anhídrido maleico-*co*-estireno) funcionalizado con glutamina

PSMA@Phe: poli(anhídrido maleico-*co*-estireno) funcionalizado con fenilalanina

PSMA@Tyr: poli(anhídrido maleico-*co*-estireno) funcionalizado con tirosina

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SEM: Microscopía electrónica de barrido

Solución de electrohilado: SE

Tyr: Tirosina

RESUMEN

Las heridas crónicas representan un gran problema para los sistemas de salud en el mundo, como así también para los pacientes que sufren este tipo de afecciones. En Chile el tratamiento convencional de heridas crónicas se basa en el desbridamiento del sitio de la herida y la posterior aplicación de gasas que actúan como una barrera física protectora a las alteraciones del medio externo, sin embargo, esto no impide que la herida se infecte retardando su cicatrización. En este escenario, el tratamiento ideal para heridas crónicas se basa en el uso de apósitos bioactivos elaborados a partir de polímeros capaces de liberar agentes activos que promuevan la cicatrización y/o prevengan infecciones, no obstante, pese a las significativas ventajas de este tipo de apósitos, existe una problemática asociada con el control de la velocidad con que se liberan, la cual se debe ajustar a las características de cada herida, tales como alta o baja humedad, presencia o ausencia de material exudado, tejido necrosado, tejido vivo, entre otras.

En este contexto, el presente trabajo se basó en la elaboración de mallados poliméricos bioactivos electrohilados de poli(anhídrido maleico-*co*-estireno) [PSMA] funcionalizado con aminoácidos (PSMAf) de diferentes índices hidropáticos, donde la característica bioactiva de cada mallado fue proporcionada por la incorporación de agentes activos: caléndula, cal, como agente cicatrizante y nanopartículas de plata, NPAg, como agente antibacteriano.

El objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de la funcionalización en la respuesta biológica de los mallados a través de la modulación de la liberación de agentes activos. Para ello PSMA fue modificado con los aminoácidos; L-glutamina, L-fenilalanina

y L-tirosina obteniendo derivados de los copolímeros denominados PSMA@Gln, PSMA@Phe y PSMA@Tyr, respectivamente. Luego, a partir de las soluciones poliméricas de PSMA y sus derivados se elaboraron mallados poliméricos mediante la técnica de electrohilado. Luego, los mallados fueron caracterizados morfológicamente mediante microscopía electrónica, mientras que las propiedades de humectabilidad se evaluaron a través de medidas de ángulo de contacto y capacidad de absorción de agua, resultados que fueron correlacionados con los perfiles de liberación de agentes activos. La respuesta bioactiva se evaluó mediante ensayo de citotoxicidad frente a fibroblastos NIH/3T3, ensayo hemolítico, y ensayo antibacteriano a través del conteo de colonias bacterianas.

Los resultados obtenidos, mostraron una mayor humectabilidad para PSMA@Gln, lo que concuerda con el valor del índice hidropático del aminoácido. Sin embargo, la liberación de NPAg fue mayor para PSMA y más controlada para PSMAf, mientras que las curvas de liberación de Cal no mostraron un comportamiento relacionado con la humectabilidad de los mallados debido al carácter apolar del agente activo. Por último, las diferencias en la humectabilidad de los mallados también afectaron a su bioactividad, la que se evaluó en cultivos bacterianos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* ATCC 33592 resistente a metilina y gentamicina, una línea celular de fibroblastos NIH/3T3 y glóbulos rojos.

ABSTRACT

Chronic wounds represent a major problem for health systems around the world, as well as for patients suffering from this type of conditions. In Chile, the conventional treatment of chronic wounds is based on the debridement of the wound site and the subsequent application of gauze that acts as a protective physical barrier to the alterations of the external environment, however, this does not prevent the wound from becoming infected, delaying its healing. In this scenario, the ideal treatment for chronic wounds is based on the use of bioactive dressings made from polymers capable of releasing active agents that promote healing and / or prevent infections, however, despite the significant advantages of this type of dressings, there is a problem associated with controlling the rate at which they are released, which must be adjusted to the characteristics of each wound, such as high or low humidity, presence or absence of exudate material, necrotic tissue, living tissue, among others.

In this context, the present work was based on the elaboration of bioactive polymeric meshes made of poly(maleic anhydride-*co*-styrene) [PSMA] functionalized with amino acids (PSMAf) of different hydrophobic indexes, where the bioactive characteristic of each mesh was provided by the incorporation of active agents: calendula, lime, as a healing agent and silver nanoparticles, NPAg, as an antibacterial agent.

The overall objective of this study was to evaluate the effect of functionalization on the biological response of the meshes through modulation of the release of active agents. For this purpose PSMA was modified with the amino acids; L-glutamine, L-phenylalanine and L-tyrosine obtaining copolymer derivatives named PSMA@Gln, PSMA@Phe and

PSMA@Tyr, respectively. Then, from the polymeric solutions of PSMA and its derivatives, polymeric meshes were elaborated using the electrospinning technique. Then, the lattices were morphologically characterized by electron microscopy, while wettability properties were evaluated through contact angle and water absorption capacity measurements, results that were correlated with the release profiles of active agents. The bioactive response was evaluated by cytotoxicity assay against NIH/3T3 fibroblasts, hemolytic assay, and antibacterial assay through bacterial colony count.

The results obtained showed a higher wettability for PSMA@Gln, which is in agreement with the value of the hydrophobic index of the amino acid. However, the release of NPAG was higher for PSMA and more controlled for PSMAf, while the Cal release curves did not show a behavior related to the wettability of the meshes due to the apolar character of the active agent. Finally, the differences in the wettability of the meshes also affected their bioactivity, which was evaluated in bacterial cultures of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Staphylococcus aureus* ATCC 33592 methicillin and gentamicin resistant, a fibroblast cell line NIH/3T3 and red blood cells.

INTRODUCCIÓN

Una herida crónica puede ser definida como, un tipo de herida que tras un tiempo prolongado no ha podido seguir un proceso regenerativo óptimo y oportuno para generar un modelo anatómico correcto y mantener la integridad funcional del sitio afectado (Lazarus y col., 1994). Dentro de este tipo de heridas se encuentran las úlceras de presión, úlceras de pie diabético, úlceras venosas. Se estima además que el gasto que las heridas crónicas ocasionan solo en Estados Unidos es entre \$28.000 a \$97.000 millones de dólares al año (Nussbaum y col., 2017). Para el tratamiento de estas heridas es común utilizar apósitos comerciales tradicionales, que corresponden a gasas, vendajes (sintéticos o naturales) y compresas, estos apósitos requieren ser cambiados con regularidad ya que se humedecen fácilmente, producto del drenaje de la herida y tienden a adherirse, causando dolor al momento de ser retirados (Dhivya y col., 2015).

Un apósito para heridas idealmente debe cumplir con las siguientes características (Rezvani y col., 2019): 1) Permeabilidad al oxígeno, 2) Absorber el exceso de los exudados de la herida, 3) Protección mecánica y contra microorganismos, 4) Biocompatibilidad y 5) Elasticidad. A partir de esto se han formulado alternativas basadas en el uso de polímeros biocompatibles, los cuales han surgido como alternativa para el uso de apósitos convencionales, a estos apósitos de nueva generación se les conocen como apósitos modernos. Se busca que estos apósitos modernos sean biocompatibles, presenten propiedades bioactivas y además posean agentes activos con capacidad de liberación modulada (Dhivya y col., 2015).

Diversas técnicas han sido desarrolladas para la obtención de apósitos modernos. Los de origen polimérico (sintéticos o naturales) han mostrado capacidades bioactivas y propiedades de liberación controlada, los que son comúnmente elaborados a partir de la técnica de electrohilado, la cual ha ganado mucho interés científico en el último tiempo debido a su simplicidad y bajo costo (Li y col., 2021). El electrohilado se basa en la aplicación de un campo eléctrico de alto voltaje a una solución polimérica la cual es expulsada desde un rociador con un flujo determinado, esto genera la formación de fibras de escala nano- o micro- métrica que se depositan en una superficie colectora que cierra el circuito (Subbiah y col., 2005). Las fibras electrohiladas son capaces de asemejarse a una matriz extracelular, permitiendo estimular la regeneración celular por medio de la proliferación de fibroblastos. Diversos investigadores han utilizado polímeros para generar apósitos para heridas mediante esta técnica de electrohilado. Torres y colaboradores (2011) generaron mallados ultrafinos de fibras nanométricas con propiedades antibacterianas de liberación controlada para combatir infecciones bacterianas, estos mallados fueron fabricados a partir de ácido poliláctico (Torres y col., 2011). La técnica de electrohilado permite el uso de una amplia variedad de soluciones poliméricas y permite además incorporación de agentes activos en las fibras poliméricas.

La modulación de la liberación de agentes activos, presentan un serie de ventajas, como son la liberación constante y sostenida durante periodos de tiempo prolongados, reducción de la frecuencia de cambio de apósitos para heridas crónicas, una ventaja muy importante que otorgan estos tipos de apósitos es evitar la liberación de grandes cantidades de agente activo en cortos periodos de tiempo, los cuales en altas concentraciones podrían presentar

un efecto tóxico sobre la zona afectada, tal como ha sido reportado en investigaciones previas (Boateng y col., 2007).

La propiedad más influyente en la liberación modulada de agentes activos es la humectabilidad, esta propiedad se encuentra vinculada directamente a uno de los mecanismos de liberación controlada de agentes activos que se utilizan al trabajar con polímeros no degradables y que presentan poca o nula solubilidad en agua. Previo a la liberación de agentes activos es necesario que ocurra un fenómeno de difusión de moléculas de agua al interior de la matriz polimérica. Durante la difusión, las moléculas de agua permean en la matriz polimérica y entre las cadenas poliméricas permitiendo la solubilización de los agentes activos y su posterior difusión, seguida por la liberación al medio externo (Brannon, 1997). Por lo tanto, para polímeros hidrofílicos la liberación se verá favorecida, mientras que para polímeros hidrofóbicos se verá dificultada. Además, las interacciones intermoleculares que puede presentar el agente activo con la matriz polimérica también determinarán la capacidad de liberación del agente activo.

En la presente investigación se utilizó poli(anhídrido maleico-*co*-estireno) [PSMA], este polímero corresponde a un copolímero aleatorio formado de monómeros de estireno y de anhídrido maleico. Donde la presencia de este último resulta de principal interés, al ser capaz de participar en una reacción de amidación y conjugarse con aminas primarias o secundarias (como las presentes en los aminoácidos), obteniendo así ácido maleámico (Musa, 2016).

Los copolímeros basados en anhídrido maleico estireno como el PSMA, presentan múltiples aplicaciones en campos que requieren de polímeros capaces de responder a

estímulos, administración de fármacos, aplicaciones biomédicas, entre otras, estas aplicaciones se deben a su estructura única, capacidad de modificación, equilibrio hidrofílico/hidrofóbico, actividades ópticas y catalíticas (Bag y col., 2021). Investigaciones previas han demostrado las propiedades bioactivas del PSMA, demostrando su alta capacidad de promover la regeneración celular, por medio del aumento de la tasa de crecimiento de fibroblastos al ser estos capaces de adherirse a las fibras de PSMA que cumplen un rol de matriz extracelular (Tamayo y col., 2022).

La modificación de las propiedades de humectabilidad del PSMA se ha realizado en investigaciones anteriores. Por ejemplo, en la investigación dirigida por Corine & Hsieh (2010) generaron una matriz polimérica por electrohilado de PSMA altamente hidrofílica, sintetizada por un método de reticulación que permitió la integración de hidracina por medio del grupo anhídrido maleico del PSMA, esto generó un aumento en la hidrofiliidad que fue determinada por un aumento en la capacidad de absorción de agua y de una reducción significativa en el ángulo de contacto de los mallados (Corine & Hsieh, 2010).

En base a los antecedentes anteriormente expuestos es que en el presente seminario se propuso la modificación de las propiedades de humectabilidad de mallados electrohilados de PSMA mediante la funcionalización con aminoácidos de distinto índice hidropático, a fin de evaluar su efecto en la respuesta bioactiva de los mallados poliméricos. Para lograr esto se realizó una reacción de amidación (reacción de funcionalización) del grupo anhídrido maleico presente en el PSMA, con los aminoácidos mostrados en la Tabla 1

Tabla 1: Índice hidropático de Phe, Gln y Tyr.

Aminoácido	Índice hidropático
Fenilalanina (Phe)	2,8
Tirosina (Tyr)	- 1,3
Glutamina (Gln)	- 3,5

Por otra parte, a fin de evaluar como la funcionalización modifica la humectabilidad y por tanto la liberación de agentes activos, se decidió utilizar NPAG y caléndula como agentes activos, los cuales presentan actividad bactericida y cicatrizante respectivamente.

Las NPAG han demostrado a lo largo de diferentes estudios su gran capacidad antibacteriana, tanto para bacterias Gram positivas y Gram negativas. Sin embargo, se desconoce el mecanismo completo por el cual las NPAG presentan esta propiedad antibacteriana. De igual forma, se sabe que la capacidad antibacteriana viene dada por la liberación de iones de plata desde las NPAG, estos iones de plata al interactuar con las proteínas de membrana que contienen azufre son capaces de adherirse a la pared celular y a la membrana citoplasmática de las bacterias, esto genera que la membrana se vuelva más permeable provocando la disrupción de la envoltura bacteriana (Khorrami y col., 2018). Una vez que los iones de plata logran entrar al espacio intracelular de la bacteria se genera la inhibición de la producción de ATP, formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), inactivación de proteínas por unión de los iones de plata a los grupos tiol de las proteínas e inhibición de la replicación de ADN (Marambio & Hoek, 2010; Feng y col., 2000). Diversos estudios han demostrado el daño oxidativo que generan los ROS en las células, estos ROS generan daño a nivel de las membranas citoplasmáticas (ruptura y posterior muerte celular), daño en las mitocondrias y daño a nivel de ADN (Mendis y col., 2005). Los efectos generados por ROS se han evidenciado también en bacterias y en específico

se han estudiado los ROS generados por los iones de plata provenientes de NPAg (Park y col., 2009).

Por otro lado, el extracto de caléndula (cal), está constituido por diversos compuestos orgánicos, tales como flavonoides, triterpenoides y polifenoles presentes en este tipo de extractos, los cuales podrían estar relacionados con sus propiedades bioactivas (Givol y col., 2019). Actualmente no se ha determinado totalmente el mecanismo de acción, por el cual los extractos de cal han mostrado efectos cicatrizantes en diversos tipos de heridas ya sean crónicas o no. Buzzi y colaboradores (2016) informaron reducciones significativas del tiempo de recuperación de úlceras venosas en piernas (Buzzi y col., 2016). En otra investigación, Rad y colaboradores (2019) incorporaron extractos de cal en apósitos electrolizados de poly(ϵ -craptomolactona), zeína y goma arábica, observando una mejora en la adhesión y proliferación de fibroblastos (Rad y col., 2019). A nivel molecular, se ha reportado que los extractos de cal activan factores de transcripción como NF- κ B (factor transcripcional relacionado al crecimiento, supervivencia celular, respuesta inmune e inflamatoria) y aumentan la producción de quimiocina IL-8 (promueve migración y adhesión de monocitos y neutrófilos en células endoteliales) en queratinocitos, células involucradas en procesos de regeneración celular (Nicolaus y col., 2017).

En base a la información aquí recopilada es que se propuso la siguiente hipótesis, objetivo general y objetivos específicos.

- a) **Hipótesis:** La funcionalización de poli(anhídrido maleico-*co*-estireno) [PSMA] con aminoácidos de distinto índice hidropático modulará la liberación de agentes activos influyendo así en las propiedades bioactivas de los mallados poliméricos.

b) Objetivo general: Evaluar como la funcionalización de PSMA con aminoácidos de diferente índice hidropático afectan la respuesta biológica de los mallados a través de la modulación de la liberación de agentes activos.

c) Objetivos específicos:

1. Funcionalizar PSMA con aminoácidos de distinto índice hidropático y estudiar la reacción mediante espectroscopía ATR-FTIR.
2. Sintetizar NPAg para utilizarlas como agente antibacteriano.
3. Elaborar mallados de PSMA y PSMAf en presencia y ausencia de los agentes activos y caracterizarlos morfológicamente.
4. Evaluar la humectabilidad de los mallados de PSMA y PSMAf mediante medidas de ángulo de contacto y capacidad de absorción de agua.
5. Evaluar la citotoxicidad de los mallados frente a fibroblastos NIH/3T3.
6. Evaluar la hemo compatibilidad de los mallados frente a material sanguíneo.
7. Evaluar la capacidad antibacteriana de los malladas frente bacterias de interés clínico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Funcionalización del PSMA con aminoácidos

La funcionalización de PSMA (PM = 202 g/mol) se llevó a cabo de acuerdo con el esquema de la Figura 1, para ello se utilizaron los aminoácidos tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) y glutamina (Gln), obteniendo los polímeros de PSMA funcionalizados [PSMA@Tyr], [PSMA@Phe] y [PSMA@Gln], respectivamente. La reacción se llevó a cabo solubilizando 3 g de PSMA y el correspondiente aminoácido en relación molar 1:1 en 80 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), a 80°C con agitación constante y atmosfera de nitrógeno. Luego, una vez que el aminoácido estuvo totalmente solubilizado se agregó trietilamina (TEA) como catalizador de la apertura del anhídrido maleico, en una cantidad equivalente al 0,3% de los moles totales.

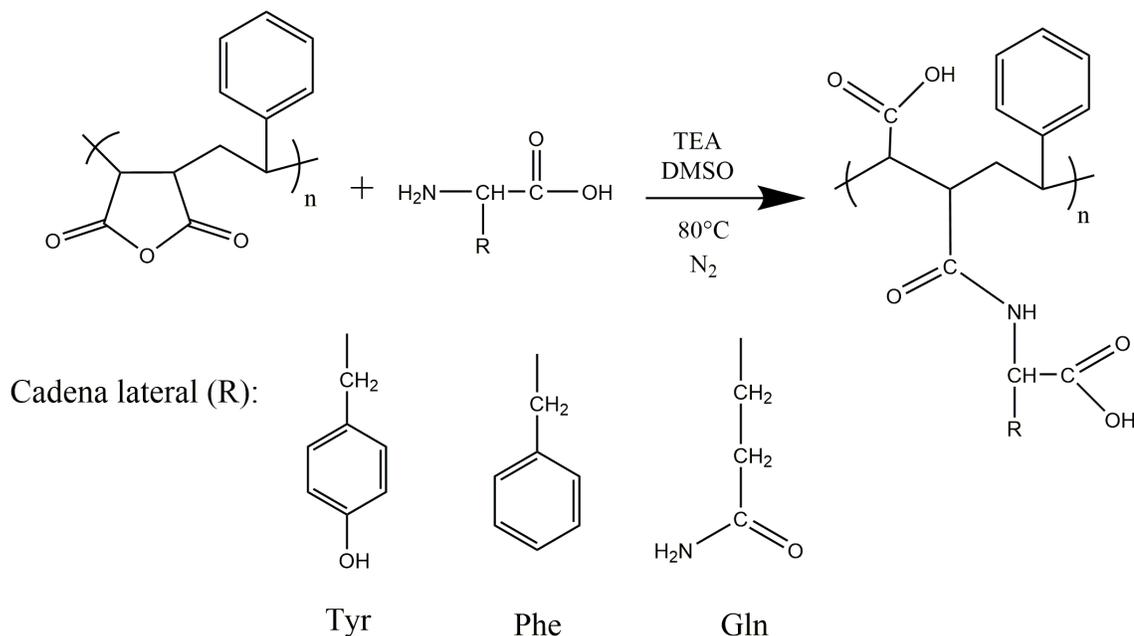


Figura 1: Esquema de la reacción de funcionalización del PSMA con diferentes aminoácidos.

El progreso de la reacción fue monitorizado mediante un espectrofotómetro ATR-FTIR (Shimadzu, IRSpirit). Por último, una vez se obtenidas las señales esperadas, la reacción se daba por terminada y se procedió a rota evaporar la solución obtenida de PSMA funcionalizado (PSMAf), para así retirar todo el solvente (DMSO) y obtener por último el polímero funcionalizado totalmente seco.

2. Síntesis de NPAg

Las NPAg se sintetizaron mediante reducción química de nitrato de plata (AgNO_3), con borohidruro de sodio (NaBH_4) en presencia de ácido oleico como agente estabilizante. Se prepararon 2 soluciones de 250 mL. La primera solución correspondió a AgNO_3 de concentración 5 mM y una segunda de NaBH_4 de concentración 20 mM que contenía 0,528 mL de ácido oleico al 75% (relación 1:1 respecto a los moles de plata). La solución de AgNO_3 fue agregada gota a gota a la solución de NaBH_4 con ácido oleico, bajo agitación constante, el cambio de coloración de translúcido a marrón oscuro confirmó la formación de las NPAg. La solución de NPAg fue adicionada a un embudo de decantación junto con un volumen igual de diclorometano (DCM), observando la separación de dos fases acuosa y orgánica, luego a la mezcla inmiscible se agregó fosfato monopotásico [KH_2PO_4] como agente de transferencia. Finalmente, la mezcla fue agitada hasta la completa decoloración de la fase acuosa y coloración marrón de la fase orgánica, la solución orgánica obtenida fue rota evaporada para así eliminar todo el DCM (Tamayo y col., 2014).

Adicionalmente, las NPAg obtenidas fueron caracterizadas por microscopia electrónica de transmisión (TEM; TEM Hitachi HT7700), microscopia electrónica de transmisión de

alta resolución (HRTEM; JEOL 2010) y espectroscopia UV-VIS (espectrofotómetro Shimadzu UV-1900) realizando un barrido de absorbancia a la solución acuosa de NPAG y a la solución orgánica de NPAG.

3. Elaboración y caracterización de los mallados

Se prepararon soluciones poliméricas de PSMA o PSMAf al 30% m/v en una mezcla de diclorometano y dimetilformamida (DCM/DMF; relación 1:2, respectivamente). Además, a partir de las soluciones previamente mencionadas se prepararon variantes de estas, las cuales contenían los agentes activos. Para las soluciones que contenían caléndula (cal), se prepararon al 5, 10, 15, 20% m/m de cal respecto a la masa de PSMA o PSMAf, mientras que las soluciones que contenían NPAG se prepararon al 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0% m/m respecto a la masa de PSMA o PSMAf.

Una vez preparadas las soluciones se realizó el proceso de electrohilado. Para esto se utilizó un equipo de electrohilado (electrospinning unit TL-01) el cual se configuró de la siguiente manera: Se utilizó una aguja con un diámetro interno de 0,64 mm, flujo constante de 0,5 mL/h, durante el proceso de electrohilado se colocó el colector a una distancia de 20 cm desde el rociador (el colector fue recubierto con papel aluminio, con el fin de poder retirar el mallado una vez estuviera completado), 45°C y 27 kV. Cada mallado se realizó dejando al equipo de electrohilado funcionar durante 2 horas.

Los mallados obtenidos fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM; FEI Quanta FEG250) operando a 15 kV, para así evidenciar la formación de fibras en ausencia de deformaciones, medir el diámetro y porosidad de las fibras de PSMA y PSMAf.

El diámetro y la porosidad promedio se determinó utilizando el software Image J versión 1.54d (NIH, Bethesda, MD, USA). Se utilizaron 3 diferentes imágenes por cada tipo de muestra según el método de umbral para determinar la porosidad (Sahi y col., 2020), por otra parte, para determinar el diámetro se realizaron 50 mediciones de la imagen SEM correspondiente a cada mallado de PSMA y PSMAf.

4. Humectabilidad de los mallados

4.1. Absorción de agua

La capacidad de absorción de agua de los mallados fue determinada a partir de la cantidad de agua que estos absorben en el tiempo. Se cortaron trozos de 3x1 cm y se sumergieron en agua desionizada por un periodo de tiempo de 1, 3, 5 y 7 días en viales separados, teniendo precaución que el mallado quedara totalmente sumergido en el agua. Una vez pasado el tiempo, los mallados se retiraron del agua y se retiró el exceso de esta (humedad no ligada) con un trozo de papel filtro. La absorción de agua se determinó utilizando la ecuación 1 (Ec. 1) (Aghdam y col., 2012).

$$\% \text{ Water uptake} = \frac{W_{wet} - W_0}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

Donde W_{wet} corresponde al peso del mallado húmedo y W_0 peso del mallado seco.

4.2. Ángulo de contacto

Las mediciones de ángulo de contacto para cada una de las muestras se realizaron en un dispositivo de ángulo de contacto (Drop Shape Analyzer DSA25S, KRUS) controlado por el software ADVANCE versión 1.5.1 (KRUS). El ángulo de contacto en la superficie de los mallados se midió usando el método de gota sésil, depositando una gota de 8 μ L a

25 °C. Se realizaron mediciones del ángulo de avance y retroceso, para así determinar la histéresis del ángulo de contacto utilizando la ecuación 2 (Ec. 2) (Extrand, 2003).

$$\Delta \theta = \theta_a - \theta_r \quad (2)$$

Donde $\Delta\theta$ corresponde a la histéresis del ángulo de contacto, θ_a al ángulo de avance y θ_r al ángulo de retroceso.

5. Liberaciones de los agentes activos

5.1. Liberación de NPAg

Se cortaron trozos de 4,5 x 4,5 cm de los mallados de PSMA y PSMAf que contenían NPAg (0, 0,5 y 2,0% m/m NPAg) como agente activo, se eligió este tamaño para reducir la variabilidad generada por la heterogeneidad de la distribución de las NPAg en los mallados, luego, estos cortes se sumergieron en una solución de 2% de ácido nítrico (HNO_3) con el objetivo de desplazar el equilibrio e impedir así la formación de óxido de plata. Cada trozo de mallado se sumergió en 15 mL de la solución de HNO_3 y se mantuvieron sumergidos por 0,5, 1, 3, 5 y 7 días. Una vez cumplido el tiempo, los mallados fueron retirados de la solución con una pinza cerámica.

La solución resultante fue filtrada 2 veces para remover posibles trazas de mallado que hayan quedado suspendidas en la solución, la primera filtración se utilizó un filtro de jeringa de 0,45 micras y en la segunda filtración se utilizó un filtro de jeringa de 0,22 micras. Por último, la concentración de plata presente en las soluciones filtradas fueron medidas a través de espectrometría de masas cuadrupolo con fuente de plasma de acoplamiento inductivo y celda de colisión (Thermo Scientific ICP-MS Q iCAP Q).

5.2. Liberación de caléndula

Para determinar la capacidad de liberación de caléndula se requirió inicialmente determinar su máximo de absorbancia en el espectro UV, el cual se encontraba en 281 nm.

A partir de esto se realizó una curva de calibración (Figura S1), que permitió determinar la concentración de caléndula presente en las soluciones de liberación. Se prepararon soluciones de 5, 25, 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{g/mL}$ de caléndula en agua desionizada, y se midió su absorbancia a 281 nm, a partir de esta información se construyó un gráfico de concentración vs absorbancia que permitió cuantificar la cantidad de caléndula liberada.

Las soluciones de liberación se prepararon sumergiendo trozos de 1,0 x 2,0 cm de los mallados de PSMA y PSMAf que contenían caléndula en 2 mL de agua desionizada, las muestras fueron sumergidas durante 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 y 7 días. Estas mediciones se realizaron por triplicado.

Una vez pasado el tiempo necesario para cada una de las muestras, se retiró cuidadosamente 1 mL de la solución de liberación y se midió su absorbancia a 281 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-1900). Luego, a partir de la absorbancia obtenida y con la curva de calibración se obtuvo la concentración de caléndula liberada en el tiempo. En el caso del PSMA, fue necesario utilizar un filtro de jeringa de 0,45 micras antes de colocar la muestra de agua en la cubeta del espectrofotómetro, esto debido a que este se desprendía con facilidad, quedando restos suspendidos en el agua.

6. Biocompatibilidad de los mallados

6.1 Ensayo de citotoxicidad

La respuesta citotóxica de los mallados fue evaluada frente a una línea celular de fibroblastos NIH/3T3 utilizando el ensayo WST-1 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Para este ensayo los fibroblastos NIH/3T3 de origen murino se cultivaron en Dulbecco Modified Eagle's Medium-F12 (DMEM-F12), con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomina (GIBCO, EE.UU.) en frascos de cultivo tisular. Una vez incubados los fibroblastos, se transfirieron 5×10^4 células a una placa de cultivo de 96 pocillos, en el fondo de cada pocillo se depositó una muestra de mallados de PSMA o PSMAf. Posteriormente se dejó incubar durante 24 horas en un incubador de células con 5% de CO₂ a 37°C. Luego del tiempo de incubación, se agregaron 10 µL del reactivo WST-1 en 100 µL del cultivo celular tratado. Por último, se evaluó la formación de formazan coloreado a partir de la lectura de la densidad óptica a 470 nm utilizando un lector de placas de ELISA. Para determinar la viabilidad celular se utilizó la siguiente ecuación (Ec 3) (Forero y col., 2017).

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{OD_{470nm}(experimental)}{OD_{470nm}(non - active)} \times 100 \quad (3)$$

Donde OD₄₇₀ experimental corresponde a la absorbancia de las muestras tratadas con los mallados de PSMA o PSMAf con y sin agentes activos. OD₄₇₀ non-active es la absorbancia de la muestra tratada solo con PSMA, escogida como control negativo debido a que se buscó comparar como la funcionalización del PSMA y la presencia de los agentes activos afectan la viabilidad celular. El control positivo elegido para este ensayo correspondió a Tritón X-100.

6.2 Ensayo Hemolítico

Se cortaron trozos de 5 mm x 10mm de mallados de PSMA y PSMAf con cal (concentraciones 0, 5 y 10%). Paralelamente, se extrajo sangre murina, la que fue lavada y centrifugada a 2000 xg por 20 minutos 3 veces PBS 1X, obteniendo una solución de eritrocitos de concentración aproximada de 6×10^8 células/mL. Luego, cada trozo de mallado fue depositado en un tubo Eppendorf y se agregaron 100 μ L de la solución de eritrocitos 1% v/v (6×10^8 células/mL) y 30 μ L de PBS 1X. Por otra parte, se preparó un tubo como control positivo tritón X-100 1 % v/v (100% de hemólisis) y otro tubo como control negativo PBS 1X (0% de hemólisis), a ambos controles se les agrego 100 μ L de la solución de eritrocitos 1% v/v. Posteriormente todas las muestras se dejaron incubar durante 1 hora a 37°C.

Seguidamente, cada tubo con la muestra y controles se centrifugaron a 3000 xg durante 5 minutos. Tras esto, se tomaron alícuotas de 80 μ L del sobrenadante y se transfirieron a pocillos de cultivo celular de 96 pocillos y se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas VERSA max, para así detectar la hemoglobina libre. Finalmente, los datos fueron analizados determinando el porcentaje de hemólisis de acuerdo con la siguiente ecuación (Ec 3) (Santana y col., 2021).

$$Hemolisis (\%) = \frac{A_{540nm} M - A_{540nm} PBS1X}{A_{540nm} TritónX100 - A_{540nm} PBS1X} \times 100 \quad (4)$$

Donde $A_{540nm} M$ corresponde al valor de absorbancia a 540nm del sobrenadante tras todo el procedimiento, $A_{540nm} PBS1X$ corresponde a la absorbancia del control negativo y $A_{540nm} Tritón X100$ corresponde a la absorbancia del control positivo.

7. Ensayo antibacteriano

Se prepararon liberaciones de plata tal como se describió en el protocolo para la medición de la liberación de NPAg. Se utilizaron soluciones filtradas de 1 y 7 días de liberación.

La capacidad bactericida de los mallados fue evaluada frente a *S. aureus* resistente a meticilina y gentamicina (ATCC 33592; [SAR]) y *S. aureus* (ATCC 25923; [SA]). Ambas bacterias fueron crecidas en medio de cultivo TSB por 16 horas a 35 °C. Posteriormente, las bacterias fueron transferidas a medio fresco y se dejaron incubar hasta fase exponencial. Luego, se centrifugaron a 6000 rpm por 2 minutos, el pellet obtenido fue re-suspendido en un buffer de lavado (buffer de lavado: 9,7 mL H₂O estéril, 100 μL medio estéril, 200 μL PBS 1X estéril), luego se volvió a centrifugar a 6000 rpm por 2 minutos, este paso fue repetido 3 veces. Por último, tras los lavados, se estandarizó ambas bacterias a 10⁶ UFC/mL mediante densidad óptica a 600 nm.

A continuación, se prepararon las muestras en un tubo Eppendorf estéril de 1,5 mL, se depositaron 20 μL de la solución estandarizada de bacteria a 10⁶ UFC/mL, 40 μL de las NPAg liberadas y 140 μL de buffer de lavado, seguidamente, una vez que se prepararon todos los tubos, se dejó interactuar la muestra y la bacteria durante 1 hora a 35 °C con agitación constante en una incubadora. Pasado el tiempo, se tomaron 10 μL de la solución incubada y se transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1,5 mL que contenía 390 μL de buffer de lavado, esto con el objetivo de diluir la muestra. Seguidamente, se tomaron 100 μL de la muestra diluida y se sembró en medio de cultivo Mueller Hinton. Los cultivos fueron dejados en incubación durante 24 horas a 35 °C. Por último, una vez pasadas las 24 horas, se realizó el conteo de colonias. Este ensayo fue realizado por triplicado de

mallado por cada día de liberación, además se realizaron placas de cultivo por duplicado de cada mallado.

RESULTADOS

1. Funcionalización del PSMA con aminoácidos

La funcionalización de PSMA con los distintos aminoácidos fue confirmada mediante la técnica de ATR-FTIR, obteniendo así los espectros IR que se aprecian en la Figura 2.

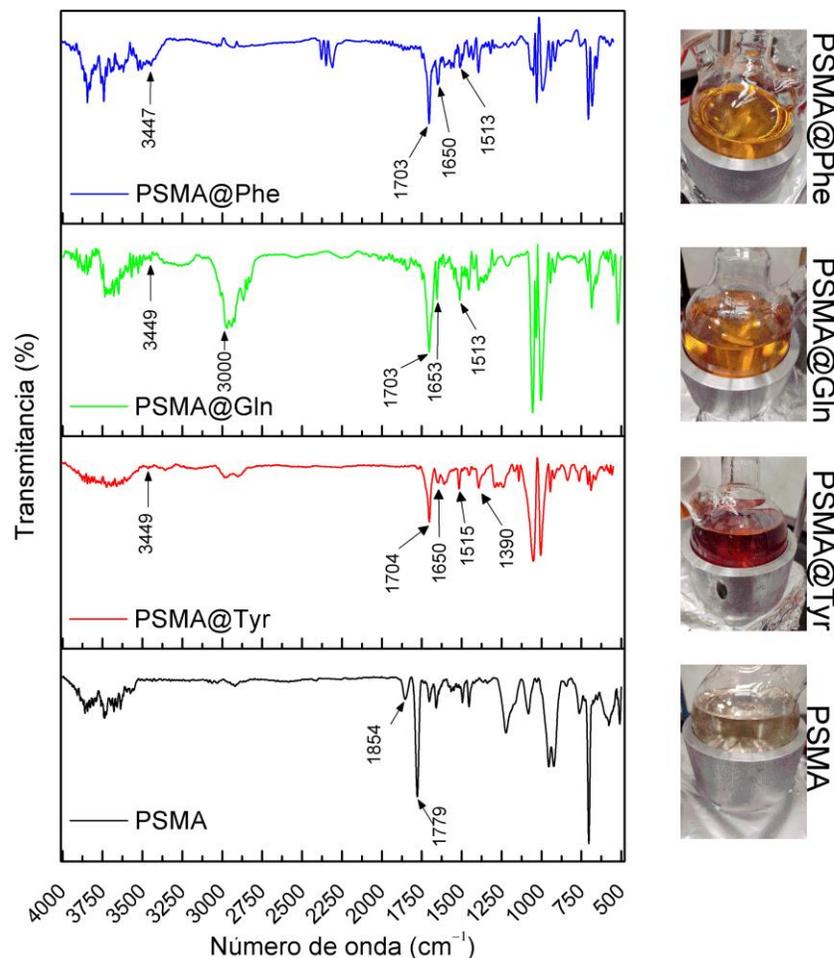


Figura 2: Espectros ATR-IR de PSMA y PSMAf.

En el espectro de PSMA se observa la presencia de señales en 1779 cm^{-1} y 1854 cm^{-1} asociadas a los grupos carbonilo del grupo anhídrido maleico, mientras que en los espectros de PSMAf estas señales desaparecen y se evidencia la aparición de nuevas señales en $\sim 1703\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ correspondientes al estiramiento del grupo carbonilo

del ácido carboxílico y al estiramiento del carbonilo del grupo amida respectivamente, que dan cuenta del proceso de funcionalización (Parker, 1971). Además, se evidencia una señal en $\sim 1515\text{ cm}^{-1}$ para los espectros de PSMAf, la cual corresponde a una mezcla de señales de vibraciones de torsión del enlace N-H y al estiramiento del enlace C-N del enlace amida formado tras la funcionalización (Pretsch y col., 2009). Por último, también se apreció una señal en los espectros de PSMAf en $\sim 3449\text{ cm}^{-1}$ y 3000 cm^{-1} (PSMA@Gln) que corresponde al estiramiento N-H (Pretsch y col., 2009).

En el caso del espectro de PSMA@Tyr se evidenció una señal en 1390 cm^{-1} que pertenece a la flexión del hidroxilo presente en el residuo de Tyr (Pretsch y col., 2009).

2. Síntesis de NPAg

La solución de NPAg se caracterizó inicialmente por espectroscopia UV-Vis. Como se evidencia en la Figura 3 se obtuvieron máximos de absorción en 418 nm, tanto para la solución acuosa como para la solución orgánica de NPAg, estos máximos de absorbancia encontrados a 418 nm se deben al fenómeno de plasmón superficial, lo cual confirma la presencia de NPAg en ambas soluciones (Slistan y col., 2005).

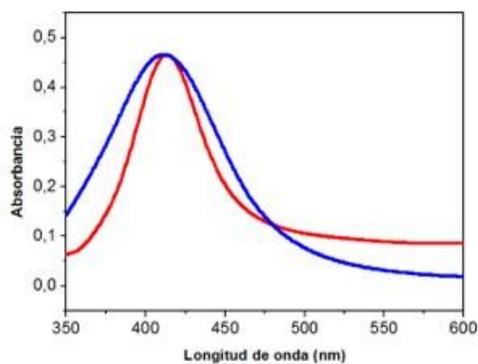


Figura 3: Espectro UV-Vis de la solución acuosa (línea azul) y de la solución orgánica (línea roja) de NPAg.

Se determino además el tamaño de las NPAg mediante TEM y HRTEM. En la Figura 4A y 4B se observa la formación de NPAg esféricas de escala nanométrica entre 7 y 19 nm, Figura 4C muestra una imagen de campo oscuro obtenida a través de HRTEM revelando las características cristalinas de una NPAg con un tamaño aproximado de 8,9 nm.

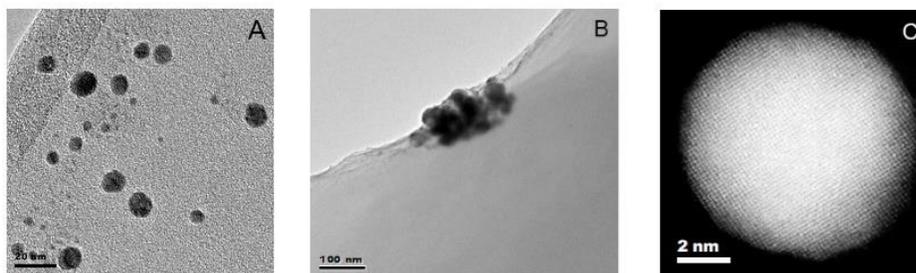


Figura 4: Imágenes TEM y HRTEM de NPAg. (A y B) TEM. (C) Imagen de campo oscuro obtenida de HRTEM.

El histograma presentado en la Figura S2, muestra la distribución de tamaños de las nanopartículas, indicando que la mayoría de las NPAg presentan un diámetro aproximado de 10 nm.

3. Elaboración de los mallados y caracterización.

A partir de las soluciones poliméricas preparadas con PSMA y PSMAf se obtuvieron fibras mediante la técnica de electrohilado, donde la recolección de fibras permitió obtener mallados poliméricos de PSMA y PSMAf con diferentes concentraciones de caléndula. La Figura 5 muestra las imágenes SEM de las fibras obtenidas tras el proceso de electrohilado junto a un histograma de la distribución de diámetro de las fibras. Los diámetros promedios obtenidos son mostrados en la Tabla 3.

De acuerdo con los histogramas, las fibras de PSMA@Tyr presentan el mayor diámetro promedio $(3,0 \pm 0,6) \times 10^2$ nm, seguidas de PSMA@Gln $(2,6 \pm 0,5) \times 10^2$ nm y PSMA@Phe $(2,0 \pm 0,6) \times 10^2$. Las fibras obtenidas de PSMA muestran un diámetro de

$(1,6 \pm 0,3) \times 10^2$ nm, el cual es menor en comparación con todas los mallados de PSMAf probablemente debido a la ausencia de aminoácidos en la cadena lateral del copolímero (Figura 5 y Tabla 3).

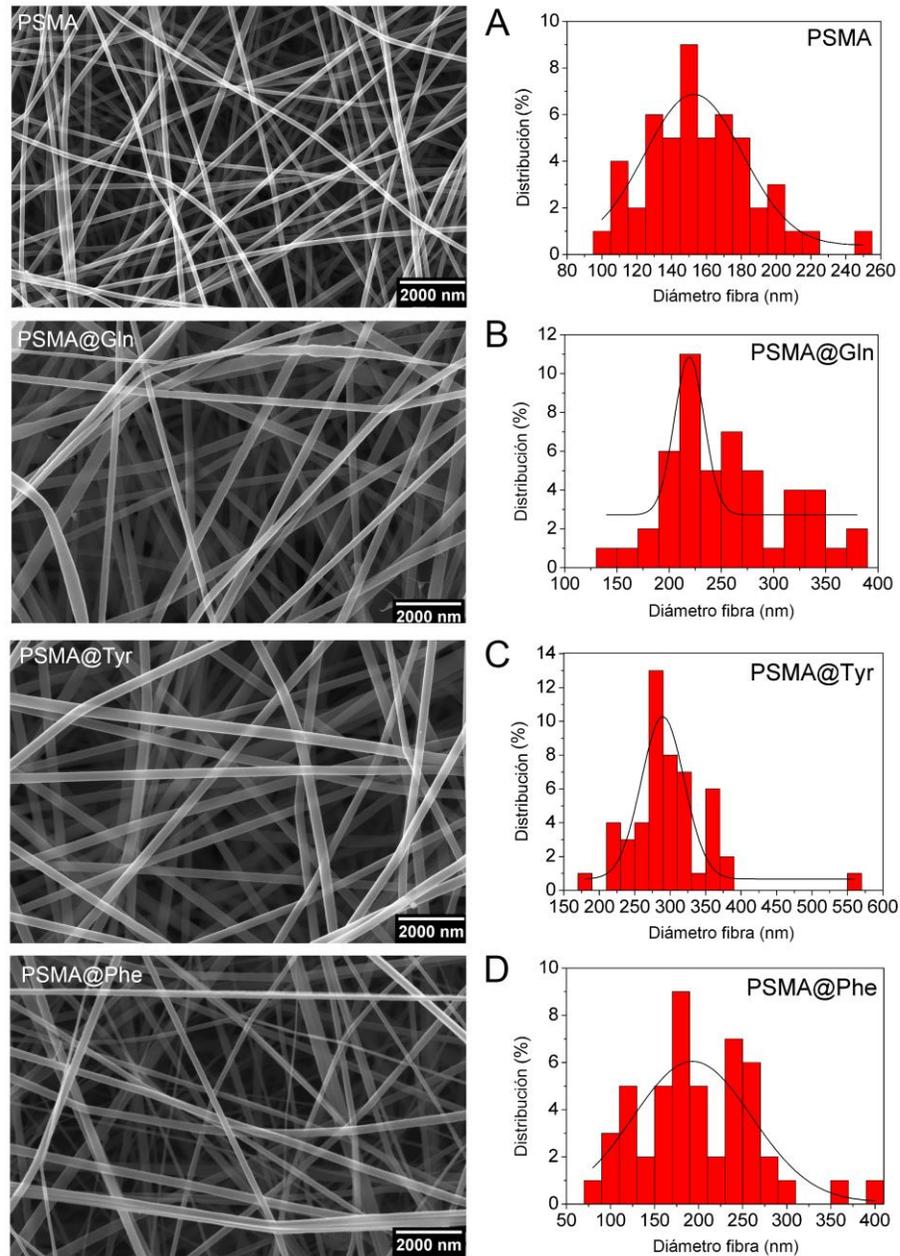


Figura 5: Imágenes SEM de los mallados e histograma de distribución de los diámetros de las fibras (A) PSMA, (B) PSMA@Gln, (C) PSMA@Tyr y (D) PSMA@Phe. Aumento 30.000x, barra de escala: 2.000 nm.

Adicionalmente, se tomaron imágenes SEM de las fibras de PSMA@Phe con diferentes concentraciones de caléndula y NPAG (Figura S10 y Figura S11).

Los valores de la Tabla 4 muestra un aumento en el diámetro de fibra de PSMA@Phe a medida que aumenta la concentración de caléndula contenida en la fibra polimérica funcionalizada.

Tabla 2: Diámetro promedio de las fibras poliméricas de PSMA y PSMAf.

	PSMA	PSMA@Phe	PSMA@Gln	PSMA@Tyr
Diámetro promedio (nm)	$1,6 \pm 0,3 \times 10^2$	$2,0 \pm 0,6 \times 10^2$	$2,6 \pm 0,5 \times 10^2$	$3,0 \pm 0,6 \times 10^2$

Tabla 3: Diámetro promedio de las fibras poliméricas de PSMA@Phe con diferentes concentraciones de cal.

	Concentración cal (%m/m)			
	5	10	15	20
Diámetro de la fibra (nm)	$2,2 \pm 0,9 \times 10^2$	$2,7 \pm 0,7 \times 10^2$	$3,1 \pm 0,5 \times 10^2$	$3,4 \pm 0,8 \times 10^2$

La tabla 5 muestra un aumento en el diámetro de las fibras de PSMA@Phe a medida que aumenta la concentración de NPAG, sin embargo, se evidencia una reducción en el diámetro de la fibra con un 2,0 % de NPAG.

Tabla 4: Diámetro promedio de las fibras poliméricas de PSMA@Phe con diferentes concentraciones de NPAG.

	Concentración NPAG (%m/m)			
	0,5	1,0	1,5	2,0
Diámetro de la fibra (nm)	$2,5 \pm 0,5 \times 10^2$	$3,0 \pm 0,4 \times 10^2$	$3,4 \pm 0,8 \times 10^2$	$2,3 \pm 0,8 \times 10^2$

4. Humectabilidad de los mallados

4.1 Ángulo de contacto

Las mediciones del ángulo de contacto (Tabla 5) permitieron en conjunto con la capacidad de absorción de agua determinar las propiedades de humectabilidad de los mallados. Al analizar las mediciones del ángulo de contacto (ver Tabla 6) se pudo determinar que los mallados de PSMA@Phe correspondían a los mallados más hidrofóbicos con un ángulo de contacto de $136,8^\circ$, lo cual se condice con el índice hidropático del aminoácido Phe (IH = 2,8) utilizado para la funcionalización del polímero, le siguen los mallados de PSMA, luego los mallados de PSMA@Tyr y por último los mallados de PSMA@Gln que resultaron ser los más hidrofílicos obteniendo un ángulo de contacto de $130,4^\circ$ y $28,7^\circ$ respectivamente, lo cual también se condice con el índice hidropático del aminoácido Tyr (IH = -1,3) y Gln (IH = -3,5).

Tabla 5: Ángulo de contacto (avance y retroceso) e histéresis de los mallados de PSMA y PSMAf.

Agente activo	Ángulo de avance (°)	Ángulo de retroceso (°)	Histéresis (°)
PSMA	132,7	116,4	16,3
PSMA@Phe	136,8	129,5	7,3
PSMA@Tyr	130,4	117,9	12,5
PSMA@Gln	28,7	25,5	-

Es necesario destacar, que en el caso de ciertos mallados como fueron los de PSMA@Gln, no fue posible medir su histéresis debido al gran carácter hidrofílico que estos presentaron, por lo cual se tomaron mediciones en 2 tiempos diferente, 0 segundos (t_1) y 6 segundos (t_2), desde que se depositó la gota de agua en la superficie polimérica, esto con el objetivo de mostrar la elevada humectabilidad que estos mallados poseen (Tabla 5).

Por otra parte, se evidencia una tendencia hacia el aumento del ángulo de contacto a medida que aumenta la concentración de caléndula (Tabla S1-S4). Además, es posible notar que la histéresis de los mallados de PSMA@Phe es menor respecto al resto de los mallados, lo cual nos indica que la distribución del agente activo en estos mallados es más homogénea, seguido por los mallados de PSMA, y luego los mallados de PSMA@Tyr, siendo estos últimos los más heterogéneos.

Los valores de ángulo de contacto de los mallados que contienen NPAg muestran una ligera disminución en relación con su respectivo mallado de PSMA y PSMAf sin agente activo (Tabla S1-S4).

4.2 Absorción de agua

La Figura 6 muestra los gráficos de capacidad de absorción de agua tanto para PSMA como PSMAf, en ella se observa una variabilidad significativa en la capacidad de absorción de PSMA, mientras que el comportamiento de absorción para PSMAf es más bien controlado, sugiriendo en principio que la funcionalización de PSMA con aminoácidos presentaría un efecto en las propiedades de humectabilidad del mallado final. Entre los mallados de PSMAf se observa una mayor capacidad de absorción para PSMA@Phe seguido de los mallados de PSMA@Gln y por último PSMA@Tyr que resultaron ser los mallados que menos agua absorbieron. En cuanto al PSMA sin funcionalizar se evidencia una alta dispersión y poca correlación de la capacidad de absorción en el tiempo.

En el caso de PSMA@Gln se observa una similitud en la capacidad de absorción de agua hasta el día 5 de inmersión respecto a PSMA@Tyr, pero transcurrido este tiempo se

observa una disminución significativa. De acuerdo con los valores de ángulo de contacto e índice hidropático, Gln presenta una mayor humectabilidad y, por lo tanto, una mayor interacción con el agua, sin embargo, es posible que la menor capacidad de absorción y su decrecimiento en el quinto día den cuenta de la solubilización de este polímero en el tiempo.

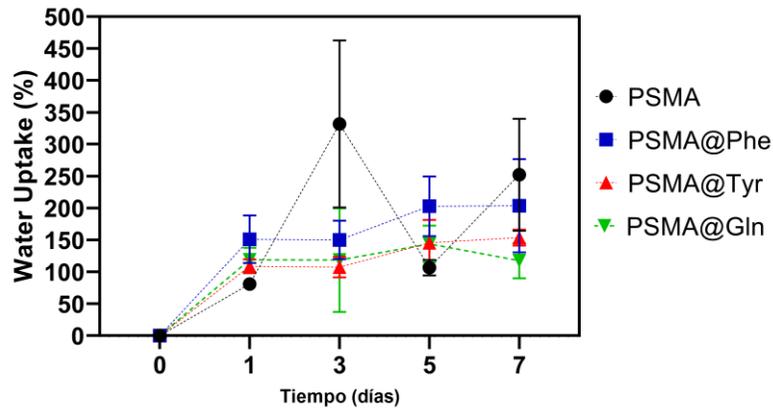


Figura 6: Capacidad de absorción de agua de PSMA y PSMAf en diferentes días.

Se observó además que los mallados de PSMA mostraron una alta capacidad de absorción de agua en el día 3, pero en días posteriores decae y luego aumenta hacia el último día del ensayo (Figura 6).

La Figura S7 muestra el comportamiento de absorción de agua PSMA y PSMAf con distintas concentraciones de caléndula, en ella es posible observar un aumento en la capacidad de absorción de agua para los mallados que contienen caléndula respecto a PSMA en ausencia de ella, sin embargo, tal efecto no es creciente en función de la concentración. Por otro lado, los mallados de PSMAf que contienen caléndula específicamente aquellos funcionalizados con Tyr y Phe muestran una disminución en la capacidad de absorción de agua.

Los mallados de PSMA@Gln mostraron una capacidad de absorción de agua que no se relaciona con la concentración de caléndula. Adicionalmente, la mayor capacidad de absorción para PSMA@Gln 5% Cal podría indicar que la presencia de caléndula otorgue mayor integridad física al mallado minimizando su solubilidad y/o ruptura al momento de ser retirado del agua.

La Figura S8 muestra los gráficos de capacidad de absorción de agua de los mallados de PSMA y PSMAf con distintas concentraciones de NPAg. En el gráfico se aprecia que PSMA presenta una disminución y alta variabilidad de la capacidad de absorción de agua desde el día 1 hasta el día 7, probablemente debido a la pérdida de masa provocado por la poca estabilidad estructural de este mallado en agua.

En los mallados de PSMAf, es posible observar que PSMA@Gln (Figura S8) muestra una capacidad de absorción de agua más reducida, probablemente asociado a la solubilidad de este polímero en agua. Por último, para los mallados de PSMA@Phe (Figura S8) se observa que la presencia de un 0,5% de NPAg mejora la capacidad de absorción de agua.

5. Liberaciones de los agentes activos

5.1 Liberación de NPAg

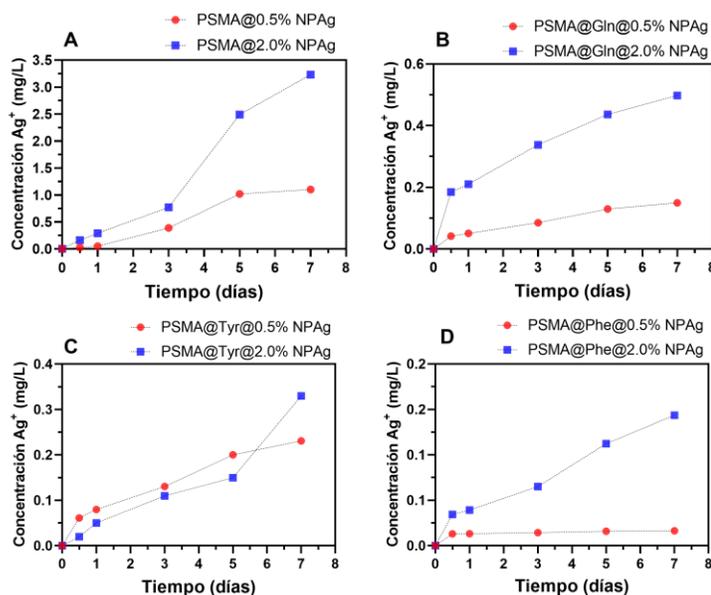


Figura 7: Liberaciones de iones plata (Ag^+) de los mallados de PSMA y PSMAf en diferentes días. (A) PSMA, (B) PSMA@Gln, (C) PSMA@Tyr y (D) PSMA@Phe.

La Figura 7 muestra los gráficos de liberación de iones de plata provenientes de las NPAg contenidas en los mallados de PSMA y PSMAf. Se evidencia que los mallados de PSMA que contenían un 2,0% de NPAg fueron los que más liberaron al séptimo día 3,3 mg/L (3,3 ppm). En contra parte, los mallados de PSMAf liberaron hasta 20 veces menos NPAg comparado con la capacidad de liberación del PSMA sin funcionalizar, el mallado que menos NPAg libero correspondió a PSMA@Phe que al séptimo día alcanzo valores de 0,14 mg/L (0,14 ppm).

5.2 Liberación de caléndula

La Figura 8 muestra los gráficos de liberación de caléndula desde PSMA y PSMAf conteniendo distintas concentraciones de caléndula.

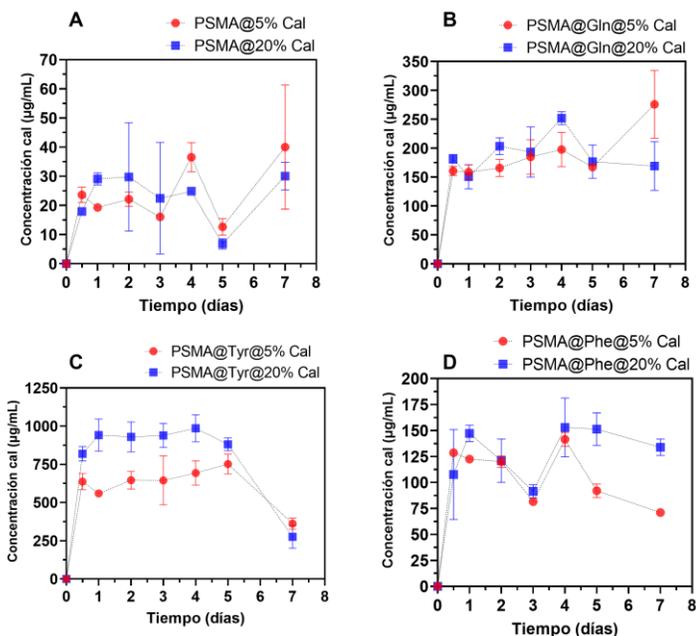


Figura 8: Liberaciones de caléndula de los mallados de PSMA y PSMAf en diferentes días.

(A) PSMA, (B) PSMA@Gln, (C) PSMA@Tyr y (D) PSMA@Phe

Se observa que los mallados de PSMA@Tyr liberan la mayor cantidad de caléndula, seguido por una disminución significativa entre el día 5 y 7. De manera contraria, los mallados de PSMA muestran una liberación menor durante los primeros 5 días, seguido por un ligero aumento hacia el séptimo día. Un comportamiento similar se observa para las liberaciones de los mallados de PSMA@Gln mostrando una tendencia al aumento de la liberación de caléndula con el tiempo, pero liberando menos que PSMA@Tyr. Por último, los mallados de PSMA@Phe presentaron la menor liberación.

6. Biocompatibilidad de los mallados

Considerando que los mallados elaborados en este trabajo puedan presentar potenciales usos como apósitos para heridas, se evaluó su respuesta frente diferentes sistemas biológicos. Los resultados se muestran a continuación.

6.1 Ensayo de citotoxicidad

Se realizó un ensayo de citotoxicidad, para evaluar el efecto citotóxico de los mallados de PSMA y PSMAf conteniendo diferentes concentraciones de caléndula y NPAg frente a una línea celular de fibroblastos NIH/3T3 de origen murino.

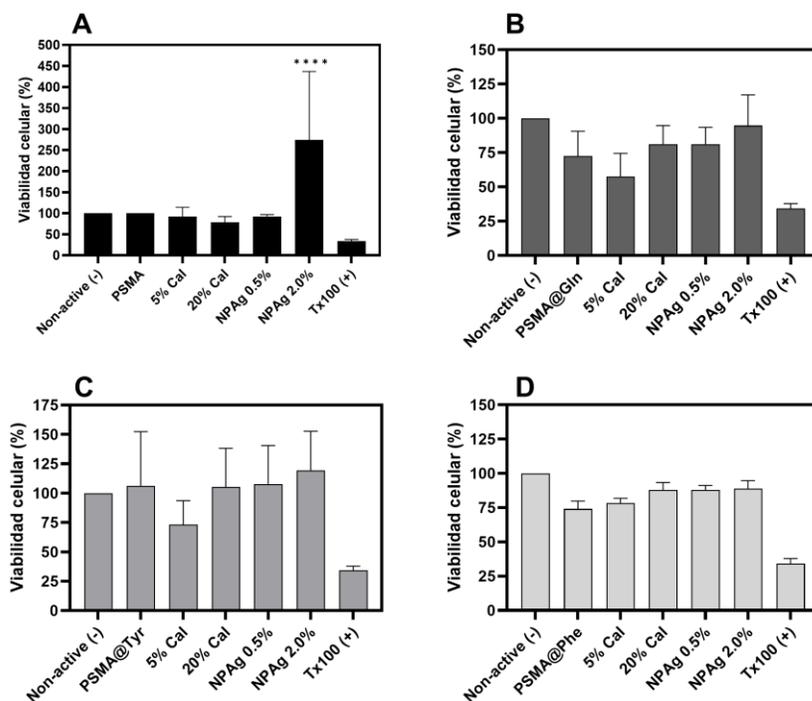


Figura 9: Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos NIH/3T3 frente mallados de PSMA y PSMAf con diferentes concentraciones de agentes activos.

(A) PSMA, (B) PSMA@Gln, (C) PSMA@Tyr y (D) PSMA@Phe.

Datos relativizados respecto a PSMA (Non-active). Los datos se analizaron utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett; **** P < 0,0001 en comparación con BL.

La Figura 9, muestra los porcentajes de viabilidad de los fibroblastos incubados a 24h para PSMA y PSMAf demostrando en algunos casos un ligero aumento en la viabilidad mientras que en otros una viabilidad cercana al 60%. En el caso de PSMA y PSMA@Tyr se observan los porcentajes de viabilidad más altos, mayores al 70%, con un ligero efecto proliferativo para los mallados conteniendo NPAg, mientras que PSMA@Phe y PSMA@Gln mostraron porcentajes ligeramente más bajos en ausencia de un efecto

proliferativo. De acuerdo con los resultados de liberación de caléndula (Figura 8) podría existir una correlación entre los mallados que presentaron mayor liberación con los que mostraron un aumento en la viabilidad celular, siendo el caso de PSMA y PSMA@Tyr.

6.2 Ensayo hemolítico

El ensayo de hemo compatibilidad buscó determinar el comportamiento de la superficie de los mallados poliméricos funcionalizados frente a material sanguíneo (eritrocitos).

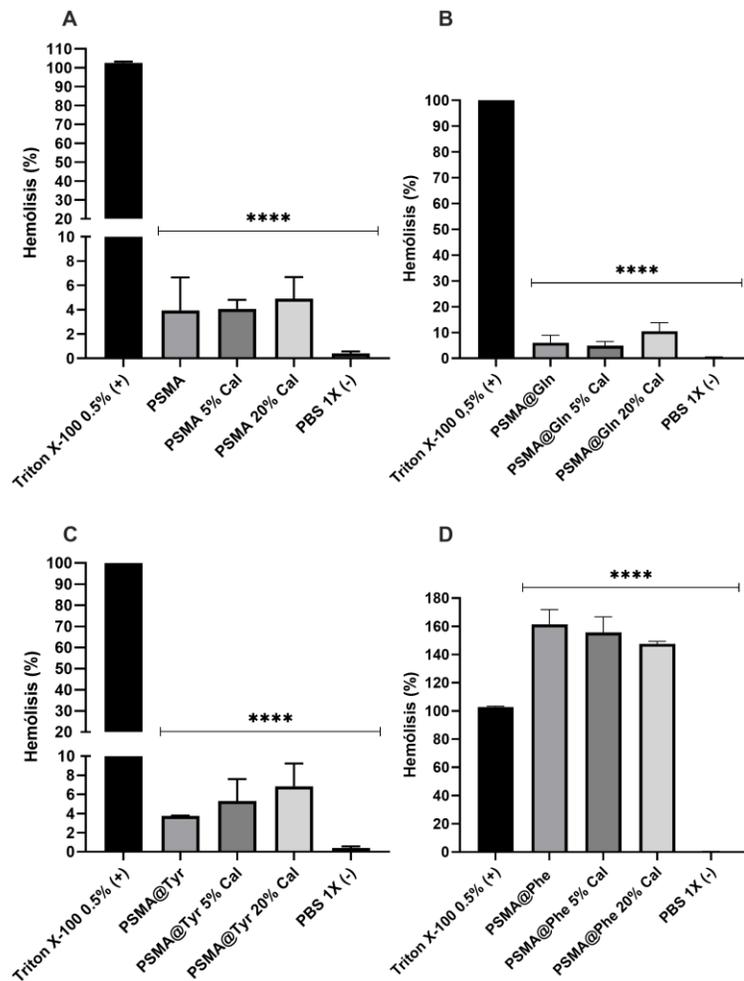


Figura 10: Porcentaje de hemólisis de los mallados poliméricos (PSMA y PSMAf) con diferentes concentraciones de caléndula.

(A) PSMA, (B) PSMA@Gln, (C) PSMA@Tyr y (D) PSMA@Phe. Los datos se analizaron utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett; **** P < 0,0001 en comparación con el grupo control positivo (Tritón X-100).

La Figura 10 muestra que los mallados de PSMAf presentan diferencias en la respuesta hemolítica respecto a PSMA, con porcentajes de hemólisis entre 4,91 y 9,90% para PSMA@Tyr y PSMA@Gln (Ver Tabla 9), y porcentajes más altos para PSMA@Phe que superan los valores del control positivo de Tritón X-100 0,5%.

Tabla 6: Grado hemolítico (%) de los mallados de PSMA y PSMAf con diferentes concentraciones de caléndula.

Mallado	Hemólisis (%)
PSMA 0% cal	3,96
PSMA 5% cal	4,08
PSMA 20% cal	4,91
PSMA@Tyr 0% cal	9,90
PSMA@Tyr 5% cal	5,31
PSMA@Tyr 20% cal	6,85
PSMA@Gln 0% cal	6,08
PSMA@Gln 5% cal	4,91
PSMA@Gln 20% cal	10,47
PSMA@Phe 0% cal	161,3
PSMA@Phe 5% cal	155,6
PSMA@Phe 20% cal	147,6
PBS 1X (-)	0,41
Tritón X-100 0,5% (+)	95,11

7. Ensayo antibacteriano

En la Figura S12 es posible apreciar un 99,9% de inhibición de la cepa bacteriana SA para los mallados de PSMA para ambos días de liberación y ambas concentraciones de NPAg, caso contrario ocurre con los mallados de PSMAf, los cuales se evidencia una ligera inhibición del crecimiento y en algunos casos hasta un efecto proliferativo. Entre las liberaciones de 1 día de los mallados de PSMAf, PSMA@Gln 0,5% NPAg presentó la inhibición más alta, siendo cercana al 56,2 % de inhibición, seguido de PSMA@Tyr que

alcanzó un 10% de inhibición, mientras que los mallados de PSMA@Phe mostraron un efecto proliferativo. En cuanto a las liberaciones de 7 días de los mallados de PSMAf, se aprecia un ligero efecto proliferativo para PSMA@Tyr y un mayor efecto proliferativo para PSMA@Phe, por otra parte, PSMA@Gln no presentó cambios significativos.

En cuanto a la cepa bacteriana SAR, la Figura S13 muestra que PSMA fue capaz nuevamente de inhibir un 99,9% en ambas concentraciones de NPAg y en ambas soluciones de liberación de 1 y 7 días. Las soluciones de liberación de 1 día para los diferentes mallados de PSMAf mostraron una inhibición cercana al 30% para el caso de PSMA@Gln con una concentración de 0,5% NPAg, mientras que para la concentración de 2,0% de NPAg no hubo un cambio significativo respecto al control. Tanto para PSMA@Phe y PSMA@Tyr se observó un ligero efecto proliferativo en ambas concentraciones de NPAg. En las soluciones de liberación de 7 días se evidencia un nulo efecto inhibitorio para los mallados de PSMAf en ambas concentraciones, se destacan PSMA@Phe y PSMA@Tyr con un efecto proliferativo cercano al 20% y PSMA@Gln con un efecto proliferativo cercano al 10%.

DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

1. Funcionalización del PSMA con aminoácidos

En el presente seminario se evaluó el efecto de modificación del PSMA, mediante la funcionalización por una reacción de amidación. Como se observó en las señales de los espectros ATR-FTIR (Figura 2) se logró funcionalizar el copolímero, a través de la formación del enlace amida entre el anhídrido maleico del PSMA y el aminoácido correspondiente, las señales indicaron la formación de grupos de ácidos carboxílicos generados por la apertura del anillo. Khazaei y colaboradores (2013) también utilizaron el grupo anhídrido maleico presente en PSMA para la formación de enlaces amida, esta investigación se centró en utilizar el PSMA para conjugar drogas con grupos amino a su estructura, los investigadores reportaron un alto grado de conjugación en la metodología que ellos utilizaron y además de una capacidad elevada de liberación de las drogas (Khazaei y col., 2013). Estas investigaciones confirman el uso de PSMA como una matriz de modificación para usos biomédicos.

2. Síntesis de NPAg

Las NPAg obtenidas demostraron una gran efectividad contra las cepas bacterianas probadas en el presente estudio lo que fue confirmado mediante el ensayo antibacteriano de los mallados sin funcionalizar y correlacionado con las curvas de liberación de Ag^+ (ver Figura S12 y S13), esto corrobora lo esperado según lo reportado por investigadores anteriores. Uttayarat y colaboradores (2012) utilizaron NPAg en mallados poliméricos de fibroína electrohilados, obteniendo una gran inhibición de crecimiento para *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Por otra parte, la caracterización por TEM de las NPAg sintetizadas permitió

determinar el diámetro de las NPAg sintetizadas (Figura 4) se determinó así que la mayoría de las NPAg mostraron un diámetro aproximado de 10 nm, lo cual resulto altamente favorecedor ya que, estudios previos han mostrado una correlación entre el diámetro de las NPAg y su efectividad bactericida, por ejemplo el estudio realizado por Morones y colaboradores (2005) indico que las NPAg de diámetro entre 1-10 nm son capaces de presentar una interacción directa con la bacteria, por lo que, preferentemente las NPAg de este rango de diámetros serían capaces de causar disrupciones en la membrana citoplasmática y la posterior muerte de la bacteria (Morones y col., 2005).

3. Elaboración de los mallados y caracterización

Durante el proceso de electrohilado fue posible obtener fibras poliméricas en escala nanométrica (Tabla 2), siendo las fibras de PSMA las que mostraron un menor diámetro, seguidas de las fibras de PSMA@Phe, luego las fibras de PSMA@Gln y por último PSMA@Tyr las que mostraron un mayor tamaño. Este aumento en el tamaño puede deberse a un impedimento estérico generado por el gran tamaño de los residuos de aminoácidos, siendo Tyr el aminoácido de mayor tamaño. En base a esta discusión PSMA@Phe debería presentar un diámetro ligeramente menor a PSMA@Tyr, sin embargo, los mallados de PSMA@Gln precedieron en tamaño. Es probable que PSMA@Phe al no poseer un grupo -OH pueda ser capaz de interactuar de mejor manera con los demás residuos de Phe mediante interacciones π - π de los anillos del aminoácido y del mismo polímero, mejorando así su empaquetamiento al momento del proceso de electrohilado y asemejándose más al diámetro obtenido para el polímero de PSMA sin funcionalizar

Es importante considerar que, en el proceso de electrohilado el uso de un solvente de tipo apolar/polar (DCM/DMF) para disolver el polímero funcionalizado, podría interactuar con los residuos de aminoácidos polares (Gln y Tyr) o aminoácidos apolares (Phe), solvente que podría determinar el tamaño de la fibra resultante del proceso de electrohilado. Este comportamiento ha sido reportado en investigaciones previas, por ejemplo, Erdem y colaboradores (2014) realizaron pruebas con diferentes combinaciones de una mezcla de solventes polares (tetrahidrofurano) y apolares (DMF), los investigadores notaron que al momento de electrohilar poliuretano el diámetro de la fibra aumentaba en función aumentaba la polaridad del solvente (mayor constante dieléctrica), los autores relacionaron el fenómeno observado al movimiento de cargas favorecido por un solvente con mayor constante dieléctrica (Erdam y col., 2014). Este mismo principio es aplicable a los resultados obtenidos, ya que al solubilizar un PSMAf con más grupos polares por la incorporación Gln y Tyr, la solución polimérica tendrá un carácter más polar favoreciendo así el movimiento de cargas y generando fibras de mayor diámetro.

En cuanto al aumento de diámetro observado por el aumento de la concentración de caléndula (Tabla 3) podría deberse al mismo fenómeno anteriormente descrito, ya que el extracto de caléndula al contener una gran cantidad de grupos aromáticos con orbitales π aumentaría la conductividad de la solución, aumentando así el diámetro de la fibra. Por otra parte, este aumento de diámetro podría deberse también a un aumento en la viscosidad atribuido a la presencia de caléndula, tal como indica Cramariuc y colaboradores (2013). Además, este aumento también podría estar relacionado a un impedimento estérico causado por el gran tamaño de las moléculas presentes en el extracto de caléndula.

Por último, fue posible evidenciar un aumento en el diámetro de las fibras de PSMA@Phe (Tabla 4 y Figura S11), este comportamiento podría deberse al carácter metálico y por tanto conductor de las NPAg, que provocarían un aumento en la conductividad de la SE, causando así un aumento en el diámetro de las fibras de PSMA@Phe (Rodríguez-Tobías y col., 2014). Sin embargo, los mallados de PSMA@Phe 2,0% NPAg no siguen este comportamiento, mostrando una reducción y mayor variabilidad en el diámetro de las fibras, probablemente debido a la formación de grandes agregados de NPAg que no se distribuyen homogéneamente a lo largo de las fibras (Figura S9) lo que alteraría la conductividad de la solución polimérica.

4. Humectabilidad de los mallados

Los resultados obtenidos con respecto a la humectabilidad de los mallados dan cuenta de que la funcionalización con Gln generó mallados más hidrofílicos, seguido de la funcionalización con Tyr y por último Phe, siendo estos los mallados más hidrofóbicos. Estos resultados se determinaron a partir de las mediciones del ángulo de contacto de cada mallado y de la capacidad de absorción de agua. En el caso de PSMA@Phe la mayor capacidad de absorción de agua de podría explicarse debido a las interacciones π - π entre los anillos de los grupos fenilo presentes en Phe y que podrían presentar una orientación hacia el interior de la fibra, lo que generaría una conformación en la cadena polimérica funcionalizada que estaría exponiendo una mayor cantidad de grupos hidrofílicos hacia las caras externas de la fibra polimérica en equilibrio con los grupos aromáticos provenientes del estireno, lo que generaría así un mallado de PSMA@Phe con mayor

capacidad de absorción de agua, y por lo tanto con una capacidad que no se relación con el índice hidropático del aminoácido.

La menor capacidad de absorción para PSMA@Tyr podría deberse a las interacciones intramoleculares entre por los grupos -OH presentes en el anillo de Tyr, estas interacciones promoverían que los grupos hidrofóbicos queden más expuestos en la superficie de las fibras, reduciendo así la capacidad de interacción con el agua y por lo tanto su absorción, esto se evidencia también a través de las medidas de ángulo de contacto cuyo valor para PSMA@Tyr es ligeramente cercano al mallado más hidrofóbico (PSMA@Phe).

Los agentes activos presentes en las fibras fueron capaces de modificar en parte la humectabilidad de los mallados de PSMA y PSMAf. La presencia de NPAg otorgó un carácter ligeramente más polar en comparación a los mallados sin NPAg, evidenciado por la reducción del ángulo de contacto de los mallados que contenían NPAg. La presencia de caléndula en los mallados no mostró un cambio significativo en cuanto a la capacidad de absorción de agua, solo se evidenció un ligero aumento en la estabilidad estructural de ciertos mallados de PSMA@Gln. Sin embargo, en el ángulo de contacto de los mallados que contenían caléndula se observó una tendencia al aumento del valor del ángulo de contacto, lo cual se debe a que este extracto está principalmente constituido de aceites, los cuales presentan un carácter hidrofóbico.

De manera general, existe una característica importante de la humectabilidad proporcionada por la presencia de agentes activos en los mallados de PSMA y PSMAf, esta característica corresponde a una dependencia con la sección de muestreo escogida, debido principalmente a la heterogeneidad de la distribución del agente activo. Esta

heterogeneidad puede ser confirmada desde los valores de histéresis (Johnson y col., 1964) que se muestran en la sección 4.1 de resultados. Es por esto, por lo que dependiendo del área escogida es posible obtener resultados ligeramente diferentes entre sí, por lo cual es importante realizar varias mediciones o aumentar el área de muestreo con el fin de reducir la heterogeneidad de los mallados.

También es importante mencionar que la funcionalización otorgó más estabilidad física y estructural en el ensayo de absorción de agua a los mallados de PSMAf, mientras que los mallados de PSMA sin funcionalizar eran susceptibles a la ruptura debido a la gran cantidad de agua que absorbían. Este comportamiento se observó en el día 3 de inmersión, indicando una elevada capacidad de absorción que decae en el tiempo debido a la susceptibilidad del mallado a la fractura seguido por la pérdida de masa.

5. Liberación de los agentes activos

5.1 Liberación de NPAg

Los resultados obtenidos respecto a la liberación de NPAg dan cuenta que los mallados fueron capaces de modular la liberación de este agente activo. En la Figura 7 se puede apreciar que los mallados funcionalizados liberan hasta 20 veces menos Ag^+ que los mallados sin funcionalizar. Siendo de los mallados funcionalizados los de PSMA@Gln los que más liberan, seguidos de PSMA@Tyr y por último PSMA@Phe que presentó la menor capacidad de liberación de Ag^+ , esto se condice directamente con los resultados obtenidos de la humectabilidad de cada mallado de PSMAf (Brannon-Peppas, 1997), además, lo obtenido se correlaciona con el índice hidropático asociado a cada aminoácido

elegido para la funcionalización del PSMA. Por lo cual, es posible determinar que la liberación de iones de plata provenientes de las NPAg fue significativamente modificada producto del cambio de humectabilidad.

Los resultados obtenidos corroboran lo esperado con respecto al fenómeno de difusión de un agente activo con carga en un medio acuoso. Así, los mallados más hidrofílicos (PSMA, PSMA@Tyr y PSMA@Gln) presentaron una mayor liberación mientras que para los mallados más hidrofóbicos la liberación fue menor (PSMA@Phe). Estudios anteriores también han llegado a esta misma conclusión. Reza y colaboradores (2003) evaluaron como polímeros de características hidrofóbicas e hidrofílicas cambiaban el patrón de liberación de ciertas drogas, confirmando que la capacidad de liberación de las drogas evaluadas era función del tipo de polímero y de la naturaleza fisicoquímica de las drogas (Reza y col., 2003). Es necesario destacar que varios factores influyen en la capacidad de liberación de los mallados, tales como son la heterogeneidad previamente descrita, la estabilidad de los mallados en agua y su posible tendencia a cambiar la conformación de la fibra polimérica reduciendo así su capacidad de interacción con el agua (Azimi y col., 2020).

5.2 Liberación de caléndula

En cuanto a los resultados obtenidos respecto a la liberación de caléndula, es necesario destacar que en general la liberación de agentes activos depende directamente de la humectabilidad de los mallados (Brannon-Peppas, 1997), sin embargo, cuando el agente activo es un compuesto de naturaleza apolar liberado en un medio acuoso, la difusión de este se ve limitada y no dependerá exclusivamente de la capacidad de las moléculas de

agua para penetrar entre las fibras y cadenas poliméricas, por lo tanto, la humectabilidad no será el factor principal. En base a esto, es de esperar que exista una alta variabilidad en los resultados, lo cual es confirmado a partir de la Figura 8. Al comparar el comportamiento de liberación con la humectabilidad de los mallados (basado en su capacidad de absorción de agua) se observa una relación inversa, donde la capacidad de liberación de caléndula es mayor para aquellos mallados que absorben menos agua y que por tanto interactúan menos con ella. De esta manera se observa que los mallados de PSMA@Tyr presentan una mayor capacidad de liberación, seguido por los mallados de PSMA@Gln, PSMA@Phe y finalmente PSMA. Por lo tanto, este comportamiento podría indicar que una mayor interacción de los mallados con el agua dificulte la liberación de caléndula debido a su carácter apolar, además es posible que la caléndula pueda ser retenida dentro de las fibras debido a las interacciones π - π entre los anillos aromáticos del polímero o cadena lateral del polímero con los anillos aromáticos de la caléndula.

6. Biocompatibilidad de los mallados

6.2 Ensayo de citotoxicidad

En general, es posible notar que no hay una variación significativa en el porcentaje de viabilidad celular de los fibroblastos NIH/3T3, a excepción de los mallados de PSMA 2,0% NPAg que generaron un aumento en la viabilidad celular, esto podría deberse a algún estímulo que esté generando la presencia de las NPAg relacionado con señales de sobrevivencia y proliferación causada por ROS provenientes de la presencia de Ag^+ que derivan de las NPAg contenidas en las fibras poliméricas (Davies, 1999).

Si bien, lo obtenido en esta sección demuestra que los mallados de PSMAf no presentan un efecto citotóxico considerable frente a fibroblastos NIH/3T3 (Figura 9), resulta necesario destacar que el análisis estadístico realizado (comparaciones múltiples de Dunnett) sobre los resultados mostrados demuestra que no hay significancia en los resultados. Lo cual estaría indicando que el parámetro comparado (PSMA blanco) no presenta una variación atribuible a la funcionalización del PSMA.

6.3 Ensayo hemolítico

En cuanto a los resultados obtenidos del ensayo hemolítico se evidenció que los mallados de PSMA@Tyr y PSMA@Gln resultaron tener un grado hemolítico inferior al 10% (Tabla 6), mientras que los mallados de PSMA@Phe mostraron un grado hemolítico superior al control positivo de Tritón X-100 0,5% (Tabla 6 y Figura 10). Este resultado podría explicarse en base a un estudio previo, en el cual los autores demostraron que Phe en altas concentraciones (como la de mallados de PSMA@Phe) tendría un efecto hemolítico similar a las moléculas de fármacos anfipáticos (Morimoto y col., 1995). Este efecto causaría que los mallados de PSMA@Phe se comporten como un detergente o tensoactivo lo que causaría la lisis de los eritrocitos producto de la interacción de estos con los grupos polares de los mallados de PSMA@Phe. Este fenómeno es posible si los grupos polares de PSMA@Phe estuvieran expuestos hacia las caras externas de la fibra polimérica funcionalizada (grupos los cuales causarían el efecto hemolítico observado), tal como se explicó anteriormente en los resultados obtenidos respecto a la capacidad de absorción de agua para los mallados de PSMA@Phe. Por lo tanto, en conjunto a los resultados obtenidos en la absorción de agua (Figura 6) y los observados en el ensayo hemolítico de

PSMA@Phe (Figura 10) se confirmaría la hipótesis planteada sobre la rotación de los grupos fenilo y posterior exposición de grupos hidrofílicos en las caras externas de las fibras poliméricas de PSMA@Phe. Esta misma explicación podría ser utilizada para los mallados de PSMA@Gln y PSMA@Tyr, en los cuales podría existir cierta interacción de los grupos polares de estas fibras con los eritrocitos, lo que causaría su lisis.

Aun así, son necesarios más experimentos para poder comprobar con certeza la rotación y exposición de grupos polares en los mallados de PSMA@Phe, ejemplo de estos experimentos serían: 1) Espectrometría de fotoelectrones inducidos por rayos X (XPS, por sus siglas en inglés), a partir de los resultados obtenidos del XPS sería posible determinar los grupos funcionales expuestos en la superficie de los mallados poliméricos (Shard, 2020). 2) Mediciones de energía superficial, a partir de la cual es posible determinar los tipos de interacciones presentes en la superficie de los mallados, lo cual daría cuenta de la disponibilidad de interacción de la superficie polimérica con el agua (Subedi, 2011).

7. Ensayo antibacteriano

Los resultados obtenidos en esta sección (Figura S12 y S13) permitieron confirmar el efecto bactericida que presentan las NPAG en los mallados de PSMA para ambas cepas bacterianas evaluadas en el presente seminario. El resultado obtenido es comparable a los resultados mostrados por Tamayo y colaboradores (2022), donde se demostró la gran efectividad antibacteriana contra *B. subtilis* y *P. aeruginosa* de NPAG en mallados de fibras coaxiales electrohiladas de PSMA/PVA. Este efecto bactericida como se ha reportado anteriormente puede deberse a la liberación de iones de plata desde las NPAG sintetizadas, que causan una disrupción en la pared celular de bacterias (Gram positivas y

Gram negativas), generando daño intracelular asociado a la generación de ROS (Park y col., 2009).

En cambio, los resultados obtenidos para los mallados de PSMAf con las diferentes concentraciones de NPAg no mostraron inhibición del crecimiento bacteriano y en algunos casos promovieron el crecimiento. Estos resultados en conjunto con las curvas de liberación de Ag^+ y valores de ángulo de contacto para los mallados de PSMA@Phe y PSMA@Tyr sugieren que la disminución de hasta 20 veces de la capacidad de liberación de Ag^+ respecto a PSMA no sería suficiente para obtener un efecto inhibitorio, esto debido a su baja capacidad de interacción con el agua, por lo tanto, una lenta difusión de los iones de plata

Por otra parte, es sabido que aminoácidos como Gln pueden presentar un efecto quelante frente a algunos iones metálicos, por ejemplo, Gln ha sido utilizada como tratamiento frente a las alteraciones bioquímicas e histopatológicas inducidas por plomo en el hígado de rata (Mahdavifard y col., 2022). Es posible que la liberación de Ag^+ desde las fibras pudo haber sido impedida por el efecto quelante asociada al grupo $-\text{NH}_2$ presentan en Gln. En el caso de Tyr y Phe el efecto quelante podría estar relacionado por interacciones catión- π entre el anillo aromático del aminoácido y los iones Ag^+ .

Se ha reportado además, que aminoácidos como Gln y Tyr han sido utilizados como suplementos para promover el crecimiento bacteriano tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas, siendo utilizado ya sea como fuente de carbono o nitrógeno (Fildes & Gladstone, 1939) (Enei y col., 1972) (Para & Baratti, 1984). Por lo tanto, es de esperar que la presencia de aminoácido libre este promoviendo el crecimiento bacteriano.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo dieron cuenta de que la funcionalización de PSMA con aminoácidos de diferentes índices hidropáticos Gln (-3,5), Phe (2,8) y Tyr (-1,3) fue capaz de modificar las propiedades de humectabilidad de los mallados electrohilados a partir del PSMAf. Esto se evidenció a partir de las mediciones de ángulo de contacto, en donde se obtuvieron los mayores valores para los mallados de PSMA@Phe, seguido de PSMA@Tyr y PSMA@Gln, esto se relacionó de la manera esperada respecto al índice hidropático de cada uno de los aminoácidos utilizados para la funcionalización. Sin embargo, la capacidad de absorción de agua difiere del comportamiento esperado a partir del ángulo de contacto, esto puede ser atribuible a cambios conformacionales de las cadenas poliméricas tras tiempos prolongados de inmersión en agua. Las diferencias observadas en la humectabilidad de cada mallado de PSMAf, afectaron su capacidad de liberación de Ag^+ , donde se observó una liberación elevada para PSMA y una liberación más controlada para todos los mallados de PSMAf. Los resultados del efecto bactericida de los mallados frente a *S. aureus* (ATCC 25923) y *S. aureus* resistente a meticilina y gentamicina (ATCC 33592) revelaron que las soluciones de liberación de PSMA que contenían 0,5% y 2,0% m/m NPAg inhibían el 99,9% del crecimiento de ambas cepas bacterianas tras 1 h de tiempo de contacto con la solución de liberación, en contraparte, los mallados de PSMA@Gln, PSMA@Tyr y PSMA@Phe presentaban un ligero efecto bactericida, o en algunos casos un efecto proliferativo, atribuible a un posible efecto quelante de los mallados y a la presencia de aminoácidos libres que podrían utilizar las cepas bacterianas como fuente de nitrógeno y/o carbono. Por otro lado, los resultados de viabilidad celular de la línea de fibroblastos

NIH/3T3 de origen murino mostraron un ligero aumento en la proliferación relacionado a la cantidad de agentes activos liberados por los mallados tanto de PSMA y PSMAf. Sin embargo, este resultado no fue significativo, por lo cual, es importante destacar que el efecto de la funcionalización en este contexto es positivo, ya que no afecta de forma positiva o negativa la línea celular evaluada. Además, los resultados del ensayo de hemo compatibilidad revelaron que los mallados de PSMA@Tyr y PSMA@Gln presentaron porcentajes de hemólisis inferiores al 10%, mientras que PSMA@Phe presentó un alto grado de hemólisis superior al 100%, lo que podría atribuirse a la conformación estructural adoptada por PSMA@Phe en la superficie de la fibra que promovería la lisis del material sanguíneo. Finalmente, la humectabilidad variable y las características estructurales, ambas generadas por la funcionalización del PSMA, mostraron un efecto en la liberación modulada de los agentes activos utilizados y en su actividad bioactiva, donde la rápida liberación de Ag^+ desde mallados de PSMA podría presentar un uso potencial en un apósito para una herida susceptibles a infecciones bacterianas oportunistas, mientras que los mallados de PSMA@Tyr podrían ser más adecuado para una herida de cicatrización lenta. Se concluye así, que la hipótesis planteada en el presente trabajo fue demostrada de la manera esperada y los objetivos planteados para el desarrollo del presente seminario se cumplieron de manera satisfactoria, es posible destacar que la funcionalización del PSMA con aminoácidos de distinto índice hidropático es capaz de modificar las propiedades bioactivas de los mallados poliméricos electrohilados.

BIBLIOGRAFÍA

- Aghdam, R. M., Najarian, S., Shakhesi, S., Khanlari, S., Shaabani, K., & Sharifi, S. 2012. Investigating the effect of PGA on physical and mechanical properties of electrospun PCL/PGA blend nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 124(1), 123-131.
- ASTM. 2017. Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials.
- Azimi, B., Maleki, H., Zavagna, L., De la Ossa, J. G., Linari, S., Lazzeri, A., & Danti, S. 2020. Bio-based electrospun fibers for wound healing. *Journal of Functional Biomaterials*, 11(3), 67.
- Bag, S., Ghosh, S., Paul, S., Khan, M. E. H., & De, P. 2021. Styrene-Maleimide/Maleic Anhydride Alternating Copolymers: Recent Advances and Future Perspectives. *Macromolecular Rapid Communications*, 42(23), 2100501.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N., & Eccleston, G. M. 2008. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(8), 2892-2923.
- Brannon-Peppas, L. 1997. Polymers in controlled drug delivery. Pp 34-45. *Medical Plastic and Biomaterials*, 4.
- Buzzi, M., De Freitas, F., & de Barros Winter, M. 2016. Therapeutic effectiveness of a *Calendula officinalis* extract in venous leg ulcer healing. *Journal of wound care*, 25(12), 732-739.
- Cécile, C., & Hsieh, Y. L. 2010. Hydrophilic polystyrene/maleic anhydride ultrafine fibrous membranes. *Journal of applied polymer science*, 115(2), 723-730.
- Cramariuc, B., Cramariuc, R., Scarlet, R., Manea, L. R., Lupu, I. G., & Cramariuc, O. 2013. Fiber diameter in electrospinning process. *Journal of Electrostatics*, 71(3), 189-198.
- Davies, K.J. 1999. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: A new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*. 48, 41–47.
- Dhivya, S., Padma, V. V., & Santhini, E. 2015. Wound dressings—a review. *BioMedicine*, 5(4), 22.
- Enei, H.; Matsui, H.; Yamashita, K.; Okumura, S.; Yamada, H. 1972. Distribution of tyrosine phenol lyase in microorganisms. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 36, 1861–1868
- Erdem, R.; Usta, İ.; Akalin, M.; Atak, O.; Yuksek, M.; Pars, A. 2015. The impact of solvent type and mixing ratios of solvents on the properties of polyurethane based electrospun nanofibers. *Applied Surface Science*, 334, 227-230.
- Extrand, C. W. 2003. Contact angles and hysteresis on surfaces with chemically heterogeneous islands. *Langmuir*, 19(9), 3793-3796.

- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of biomedical materials research*, 52(4), 662-668.
- Fildes, P.; Gladstone, G.P. 1939. Glutamine and the growth of bacteria. *Br. J. Exp. Pathol.* 20, 334–341.
- Givol, O., Kornhaber, R., Visentin, D., Cleary, M., Haik, J., & Harats, M. 2019. A systematic review of *Calendula officinalis* extract for wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 27(5), 548-561.
- Johnson Jr, R. E., & Dettre, R. H. 1964. Contact angle hysteresis. III. Study of an idealized heterogeneous surface. *The journal of physical chemistry*, 68(7), 1744-1750.
- Khazaei, A., Saednia, S., Saien, J., Kazem-Rostami, M., Sadeghpour, M., Borazjani, M. K., & Abbasi, F. 2013. Grafting amino drugs to poly (styrene-alt-maleic anhydride) as a potential method for drug release. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24, 1109-1115.
- Khorrami, S., Zarrabi, A., Khaleghi, M., Danaei, M., & Mozafari, M. R. 2018. Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. *International journal of nanomedicine*, 13, 8013.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157(1), 105-132.
- Lazarus, G. S., Cooper, D. M., Knighton, D. R., Margolis, D. J., Percoraro, R. E., Rodeheaver, G., & Robson, M. C. 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound repair and regeneration*, 2(3), 165-170.
- Li, Y., Zhu, J., Cheng, H., Li, G., Cho, H., Jiang, M., ... & Zhang, X. 2021. Developments of advanced electrospinning techniques: A critical review. *Advanced Materials Technologies*, 6(11), 2100410.
- Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of nanoparticle research*, 12, 1531-1551.
- Mahdavifard, S.; Sekhvatmand, N. 2022. Glutamine Is a Superior Protector Against Lead-Induced Hepatotoxicity in Rats via Antioxidant, Anti-inflammatory, and Chelating Properties. *Biol. Trace Elem. Res.* 200, 4726–4732
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G., & Kim, S. K. 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life sciences*, 77(17), 2166-2178.
- Morimoto, Y., Tanaka, K., Iwakiri, Y., Tokuhira, S., Fukushima, S., & Takeuchi, Y. 1995. Protective effects of some neutral amino acids against hypotonic hemolysis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(10), 1417-1422.

- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacamán, M. J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
- Musa, O. M. 2016. Handbook of maleic anhydride based materials. Springer, 10, 978-3. Pp 89-93. Springer Nature, Switzerland.
- Nicolaus, C., Junghanns, S., Hartmann, A., Murillo, R., Ganzera, M., & Merfort, I. 2017. In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 196, 94-103.
- Nussbaum, S. R., Carter, M. J., Fife, C. E., DaVanzo, J., Haught, R., Nusgart, M., & Cartwright, D. (2018). An economic evaluation of the impact, cost, and medicare policy implications of chronic nonhealing wounds. *Value in Health*, 21(1), 27-32.
- Park, H. J., Kim, J. Y., Kim, J., Lee, J. H., Hahn, J. S., Gu, M. B., & Yoon, J. 2009. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water research*, 43(4), 1027-1032.
- Para, G.M.; Baratti, J.C. 1984. Effect of culture conditions on the production of tyrosine phenol-lyase by *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1256–1258
- Parker, F. 1971. Applications of infrared spectroscopy in biochemistry, biology, and medicine. Springer Science & Business Media. Department of Biochemistry, New York. Pp 165-169. Plenum Press, New York.
- Picollo, M., Aceto, M., & Vitorino, T. 2019. UV-Vis spectroscopy. *Physical sciences reviews*, 4(4).
- Pretsch, E., Bühlmann, P., & Badertscher, M. 2020. Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data. *Structure Determination of Organic Compounds*. Pp 326, 357-361. Springer, Berlin.
- Rad, Z. P., Mokhtari, J., & Abbasi, M. 2019. *Calendula officinalis* extract/PCL/Zein/Gum arabic nanofibrous bio-composite scaffolds via suspension, two-nozzle and multilayer electrospinning for skin tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 135, 530-543.
- Reza, M. S., Quadir, M. A., & Haider, S. S. 2003. Comparative evaluation of plastic, hydrophobic and hydrophilic polymers as matrices for controlled-release drug delivery. *J Pharm Pharm Sci*, 6(2), 282-291.
- Rezvani Ghomi, E., Khalili, S., Nouri Khorasani, S., Esmaeely Neisiany, R., & Ramakrishna, S. 2019. Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(27), 47738.
- Rodríguez-Tobías, H.; Morales, G.; Ledezma, A.; Romero, J.; Grande, D. 2014. Novel antibacterial electrospun mats based on poly (d,l-lactide) nanofibers and zinc oxide nanoparticles. *J. Mater. Sci.* 49, 8373–8385

- Santana, P. A., Jara-Gutiérrez, C., Mellado, M., Forero, J. C., Guzmán, F., Barriga, A., ... & Álvarez, C. A. 2021. Effects of elderflower extract enriched with polyphenols on antioxidant defense of salmon leukocytes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 52, 13-20.
- Sahi, A.K.; Varshney, N.; Poddar, S.; Mahto, S.K. 2020. Comparative behaviour of electrospun nanofibers fabricated from acid and alkaline hydrolysed gelatin: Towards corneal tissue engineering. *J. Polym. Res.* 27, 344.
- Shard, A. G. 2020. Practical guides for x-ray photoelectron spectroscopy: Quantitative XPS. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 38(4), 041201.
- Slistan-Grijalva, A., Herrera-Urbina, R., Rivas-Silva, J. F., Ávalos-Borja, M., Castellón-Barraza, F. F., & Posada-Amarillas, A. 2005. Classical theoretical characterization of the surface plasmon absorption band for silver spherical nanoparticles suspended in water and ethylene glycol. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 27(1-2), 104-112.
- Subbiah, T., Bhat, G. S., Tock, R. W., Parameswaran, S., & Ramkumar, S. S. 2005. Electrospinning of nanofibers. *Journal of applied polymer science*, 96(2), 557-569.
- Subedi, D. P. 2011. Contact angle measurement for the surface characterization of solids. *Himalayan Physics*, 2, 1-4.
- Tamayo, L., Santana, P., Forero, J. C., Leal, M., González, N., Díaz, M., ... & Urzúa, M. 2022. Coaxial fibers of poly (styrene-co-maleic anhydride)@poly (vinyl alcohol) for wound dressing applications: Dual and sustained delivery of bioactive agents promoting fibroblast proliferation with reduced cell adherence. *International Journal of Pharmaceutics*, 611, 121292.
- Tamayo, L. A., Zapata, P. A., Vejar, N. D., Azócar, M. I., Gulppi, M. A., Zhou, X., ... & Páez, M. A. 2014. Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes*. *Materials Science and Engineering: C*, 40, 24-31.
- Torres-Giner, S., Martínez-Abad, A., Gimeno-Alcañiz, J. V., Ocio, M. J., & Lagaron, J. M. 2012. Controlled delivery of gentamicin antibiotic from bioactive electrospun polylactide-based ultrathin fibers. *Advanced Engineering Materials*, 14(4), B112-B122.
- Uttayarat, P., Jetawattana, S., Suwanmala, P., Eamsiri, J., Tangthong, T., & Pongpat, S. 2012. Antimicrobial electrospun silk fibroin mats with silver nanoparticles for wound dressing application. *Fibers and Polymers*, 13(8), 999-1006.

ANEXO

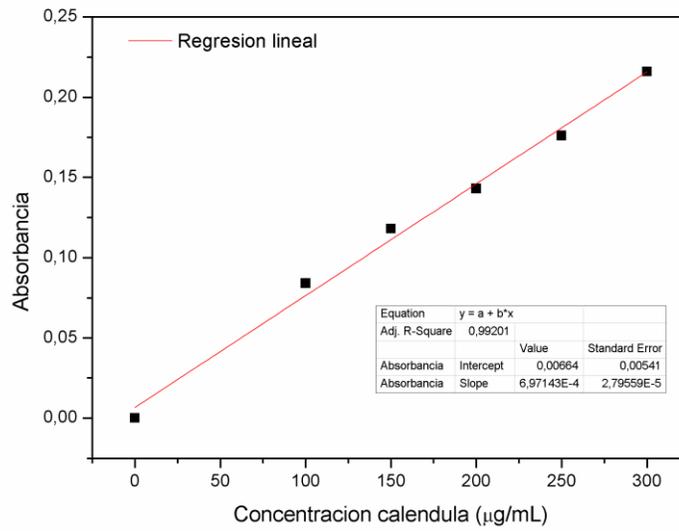


Figura S1: Curva de calibración de cal

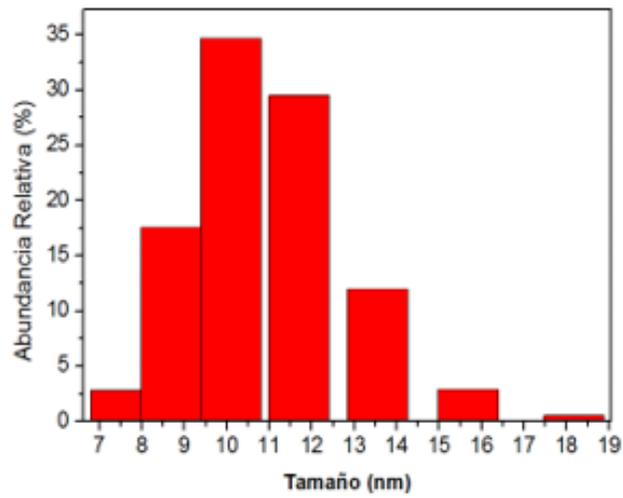


Figura S2: Histograma de la distribución de tamaños de las NPAg.

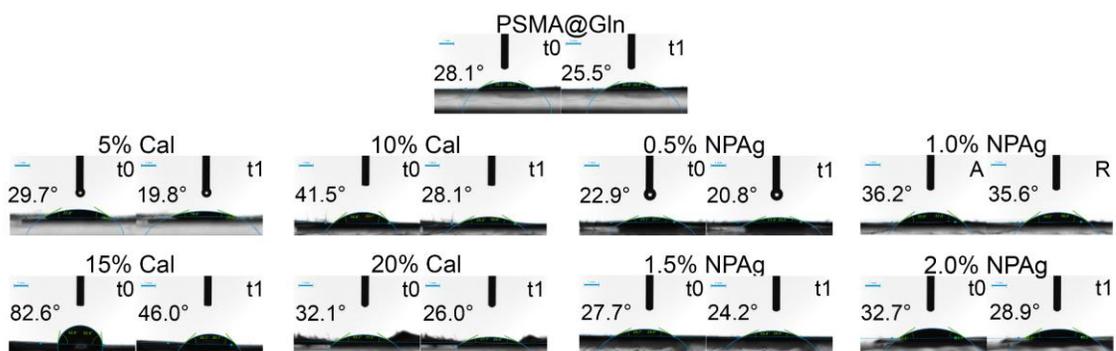


Figura S3: Angulo de contacto mallados de PSMA@Gln con diferentes concentraciones de agente activo.

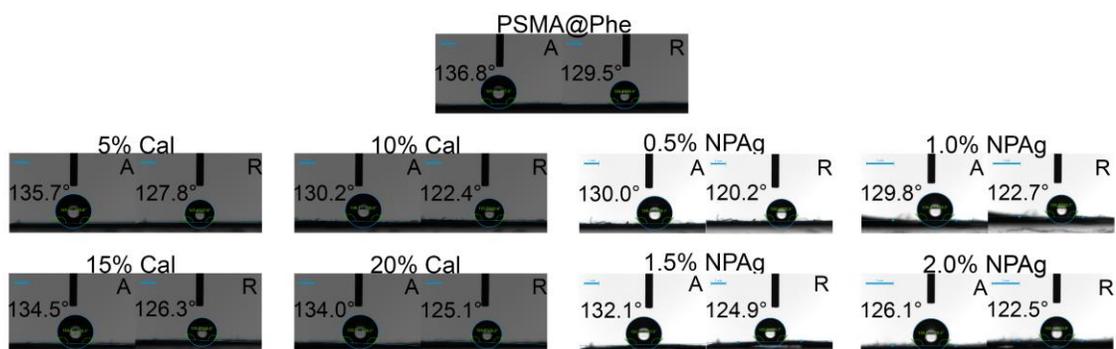


Figura S4: Angulo de contacto mallados de PSMA@Phe con diferentes concentraciones de agente activo.

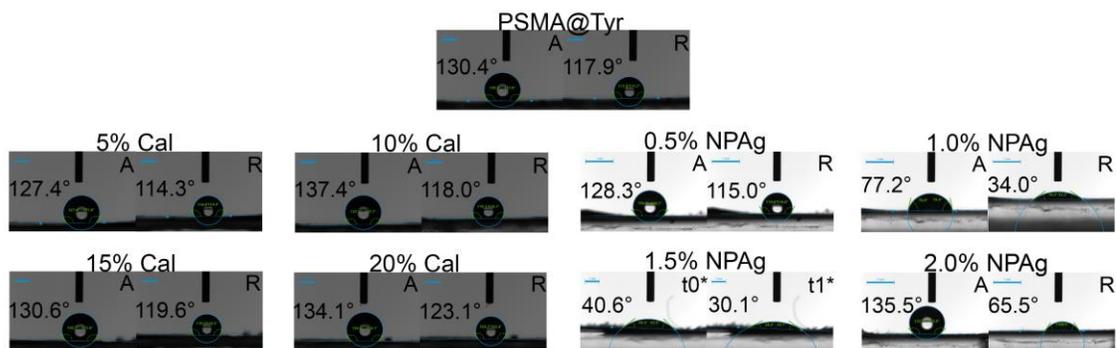


Figura S5: Angulo de contacto mallados de PSMA@Tyr con diferentes concentraciones de agente activo.

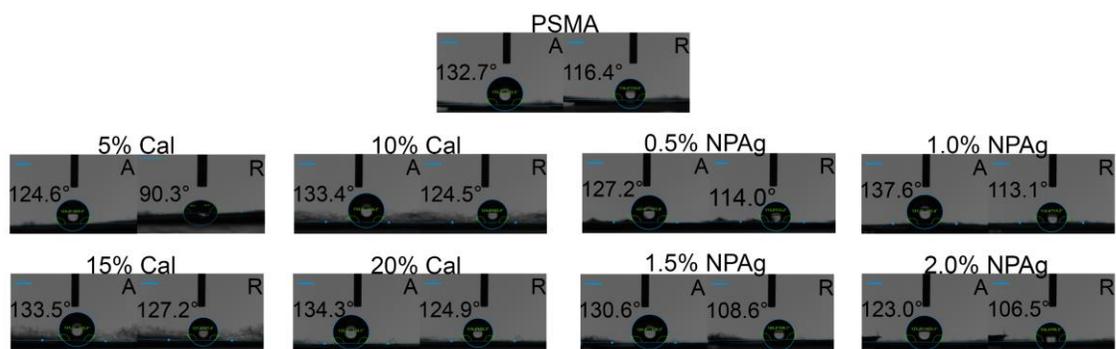


Figura S6: Ángulo de contacto mallados de PSMA con diferentes concentraciones de agente activo.

Tabla S1: Ángulo de contacto (avance y retroceso) e histéresis de los mallados de PSMA con diferentes concentraciones de agente activo.

	Agente activo	Ángulo de avance (°)	Ángulo de retroceso (°)	Histéresis (°)
PSMA	-	132,7	116,4	16,3
	5% cal	124,6	90,3	34,3
	10% cal	133,4	124,5	8,9
	15% cal	133,5	127,2	6,3
	20% cal	134,3	125,0	9,3
	0,5% NPAG	127,2	114,0	13,2
	1,0% NPAG	137,6	113,1	24,5
	1,5% NPAG	130,6	108,6	22,0
	2,0% NPAG	123,0	106,5	16,5

Tabla S2: Ángulo de contacto (avance y retroceso) e histéresis de los mallados de PSMA@Phe con diferentes concentraciones de agente activo.

	Agente activo	Ángulo de avance (°)	Ángulo de retroceso (°)	Histéresis (°)
PSMA@Phe	-	136,8	129,5	7,3
	5% cal	135,7	127,8	7,9
	10% cal	130,2	122,4	7,8
	15% cal	134,5	126,3	8,2
	20% cal	134,0	125,1	8,9
	0,5% NPAG	130,0	120,2	9,8
	1,0% NPAG	129,8	122,7	7,1
	1,5% NPAG	132,1	124,9	7,2
		2,0% NPAG	126,1	122,5

Tabla S3: Ángulo de contacto (avance y retroceso) e histéresis de los mallados de PSMA@Tyr con diferentes concentraciones de agente activo.

*Medición realizada en 2 tiempos diferentes, t0 y t1 (6 segundos).

	Agente activo	Ángulo de avance (°)	Ángulo de retroceso (°)	Histéresis (°)
PSMA@Tyr	-	130,4	117,9	12,5
	5% cal	127,4	114,3	13,1
	10% cal	137,4	118,0	19,4
	15% cal	130,6	119,6	11,0
	20% cal	134,1	123,1	11,0
	0,5% NPAg	128,3	115,0	13,3
	1,0% NPAg	77,2	34,0	43,2
	1,5% NPAg*	40,6	30,1	-
	2,0% NPAg	135,5	65,5	70,0

Tabla S4: Ángulo de contacto en 2 tiempos diferentes (t0 y t1 [6 segundos]) de los mallados de PSMA@Gln con diferentes concentraciones de agente activo.

	Agente activo	Ángulo t0 (°)	Ángulo t1 (°)
PSMA@Gln	-	28,7	25,5
	5% cal	29,7	19,8
	10% cal	41,5	28,1
	15% cal	82,6	46,0
	20% cal	32,1	26,0
	0,5% NPAg	22,9	20,8
	1,0% NPAg	36,2	35,6
	1,5% NPAg	27,7	24,2
	2,0% NPAg	32,7	28,9

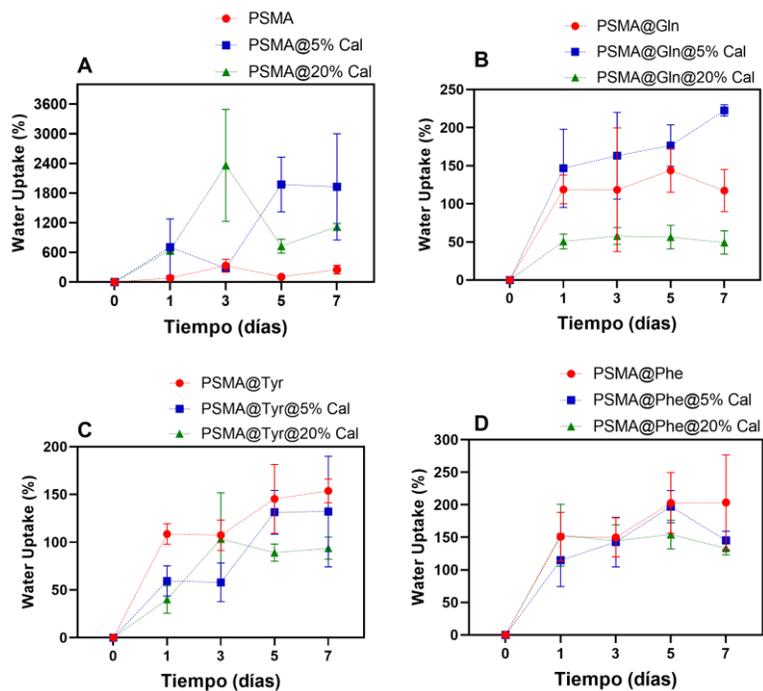


Figura S7: Capacidad de absorción de agua de los mallados de PSMA y PSMAf con diferentes concentraciones de caléndula respecto al tiempo.
 (A) PSMA, (B) PSMA@Gln, (C) PSMA@Tyr y (D) PSMA@Phe.

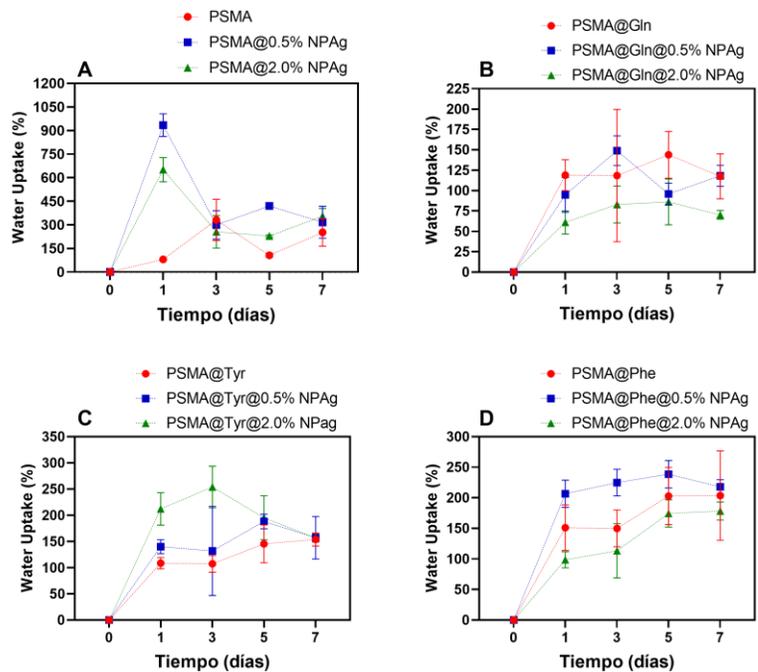


Figura S8: Capacidad de absorción de agua de los mallados de PSMA y PSMAf con diferentes concentraciones de NPAG respecto al tiempo.
 (A) PSMA, (B) PSMA@Gln, (C) PSMA@Tyr y (D) PSMA@Phe.

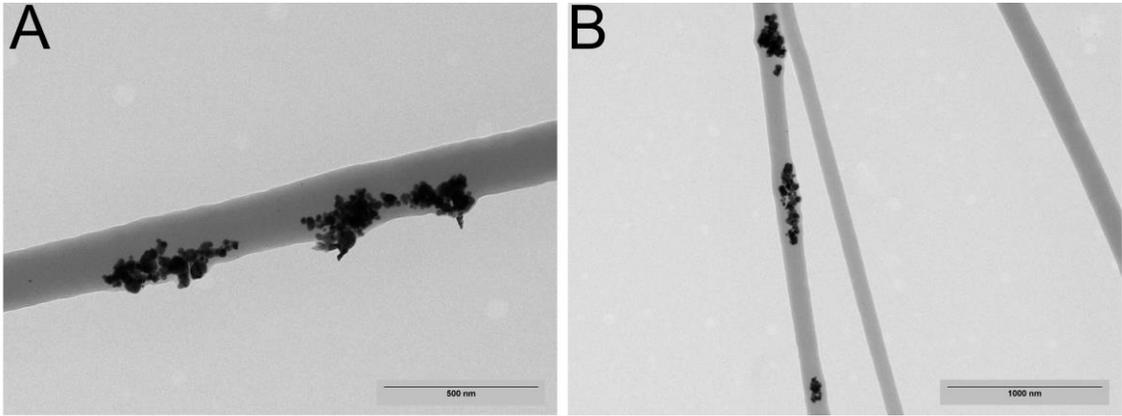


Figura S9: Imagen SEM de PSMA y PSMA@Phe con diferentes concentraciones de NPAg.
(A) PSMA 2,0% NPAg, (B) PSMA@Phe 2,0% NPAg.

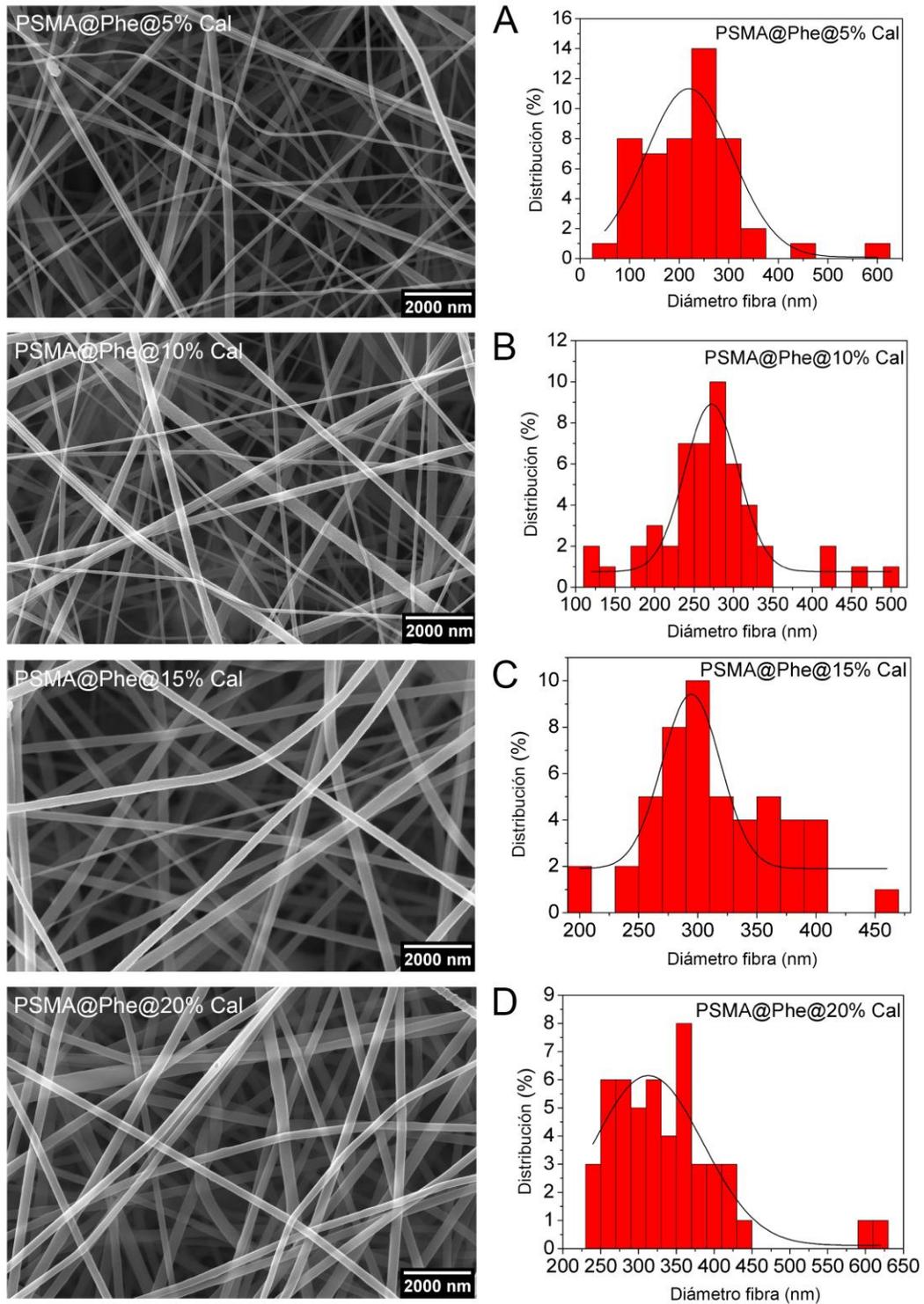


Figura S10: Imágenes SEM de los mallados de PSMA@Phe con diferentes concentraciones de Cal e histograma de distribución de los diámetros de las fibras. Aumento 30.000x, barra de escala: 2.000 nm. (A) 5% cal, (B) 10% cal, (C) 15% cal y (D) 20% cal.

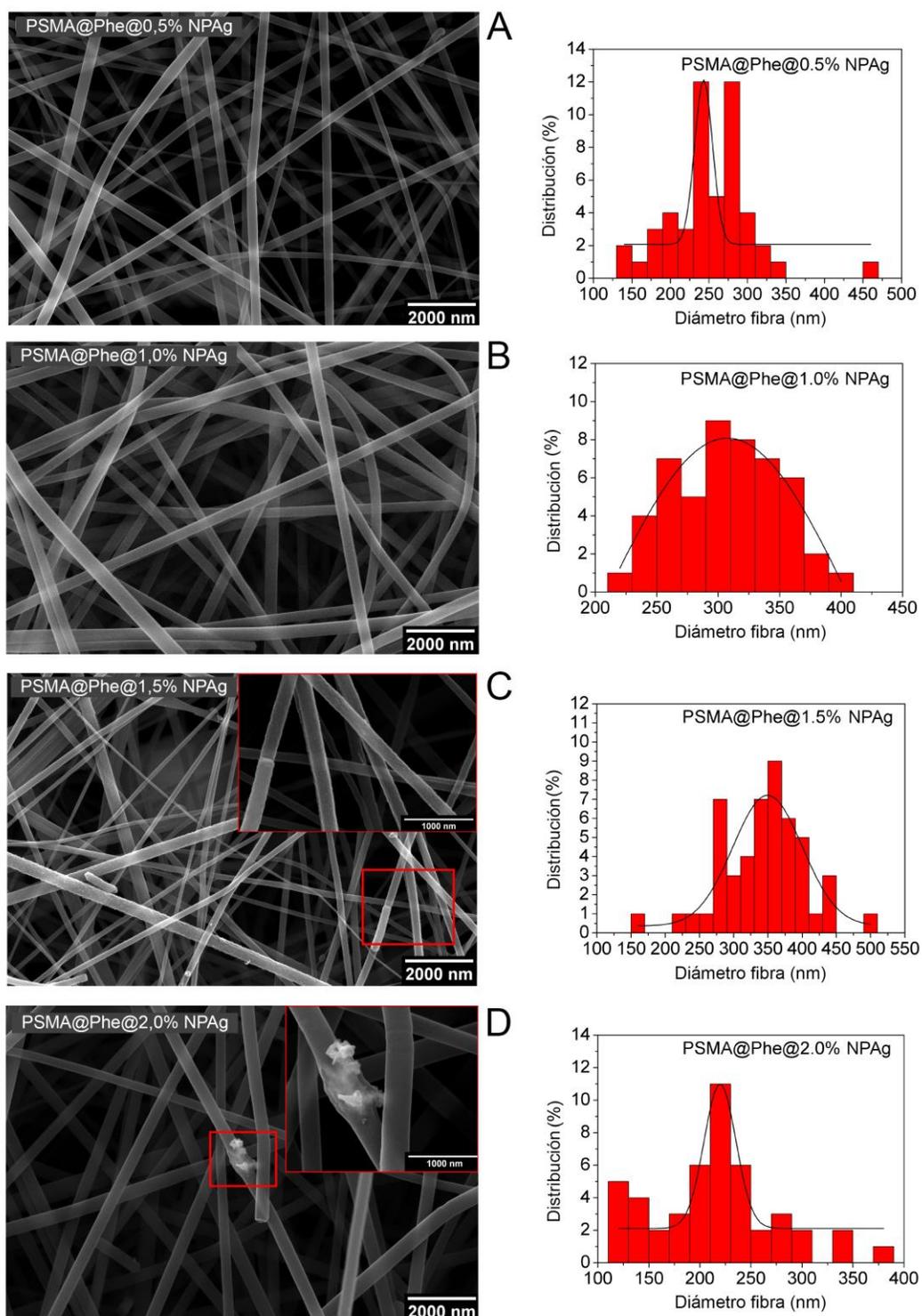


Figura S11: Imágenes SEM de los mallados de PSMA@Phe con diferentes concentraciones de NPAg e histograma de distribución de los diámetros de las fibras. Aumento 30.000x, barra de escala: 2.000 nm.
 (A) 0,5% NPAg, (B) 1,0% NPAg, (C) 1,5% NPAg y (D) 2,0% NPAg.

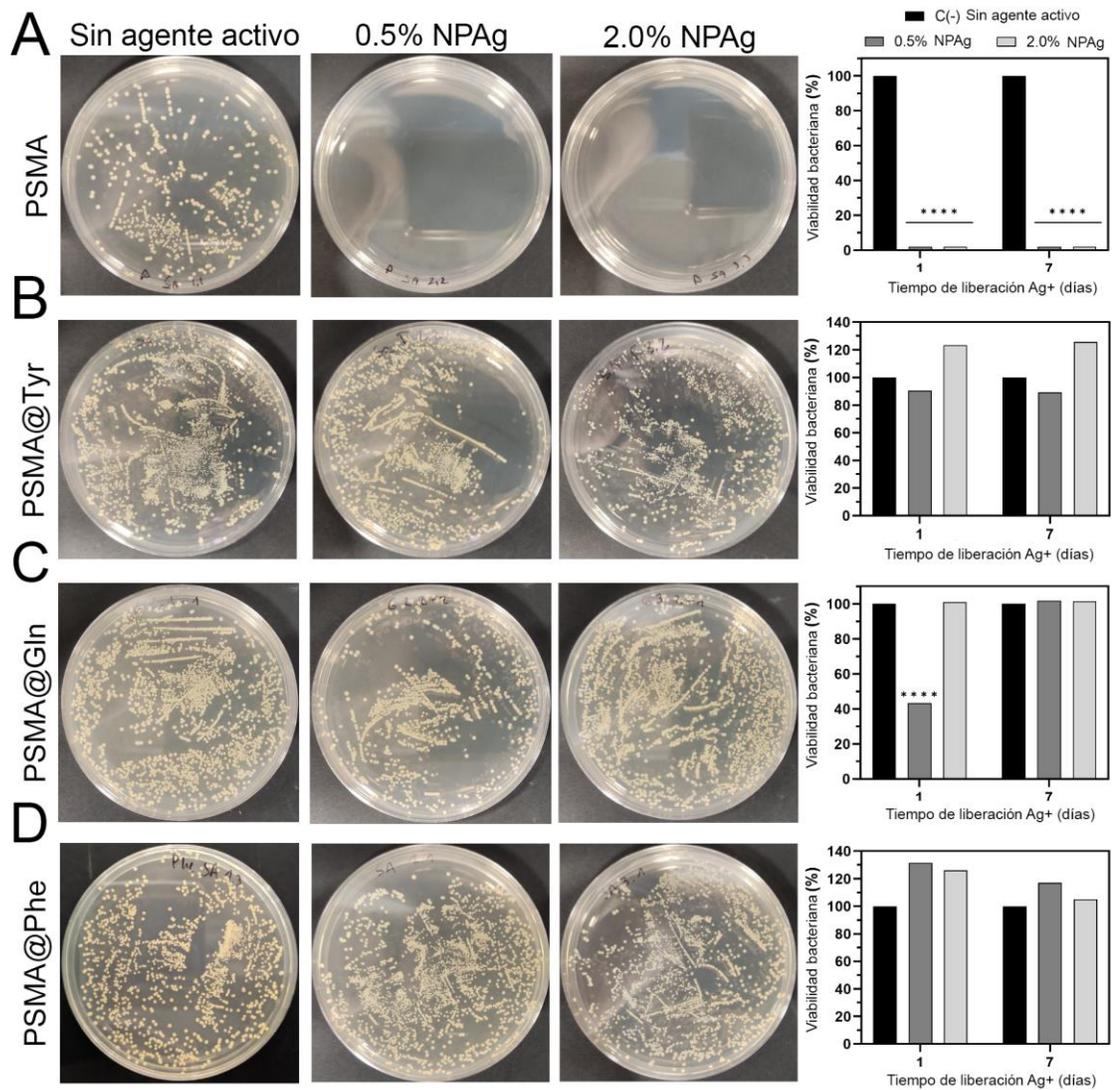


Figura S12: Viabilidad bacteriana de *S. aureus* ATCC 25923 [SA] incubada en solución de liberación de NPAg a diferentes concentraciones y días (A) PSMA, (B) PSMA@Gln, (C) PSMA@Tyr y PSMA@Phe. Imágenes corresponden a las placas incubadas en solución de liberación de 7 días. Los datos se analizaron utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett; **** $P < 0,0001$ en comparación con grupo control negativo (sin agente activo).

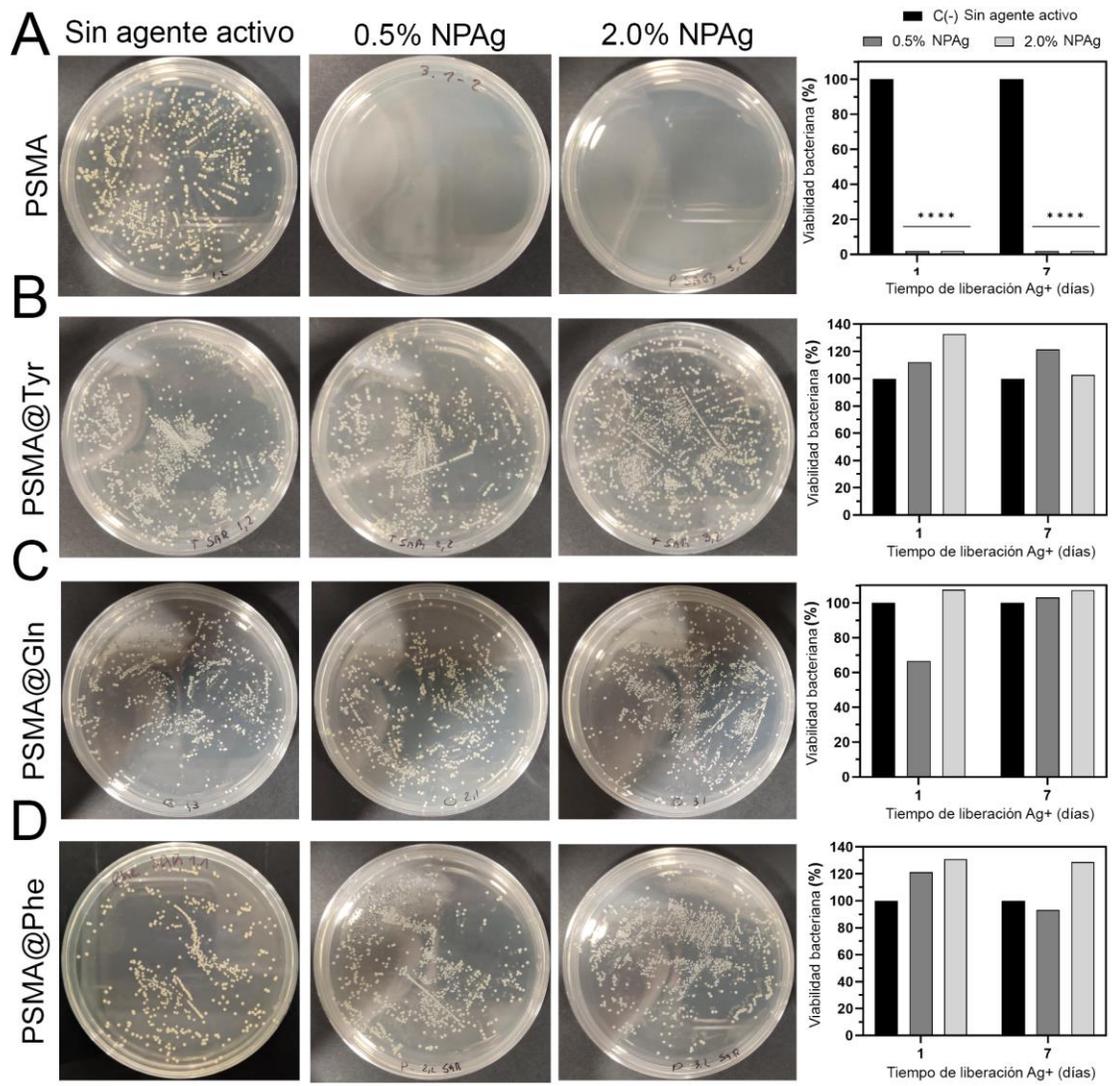


Figura S13: Viabilidad bacteriana de *S. aureus* ATCC 33592 [SAR] incubada en solución de liberación de NPAg a diferentes concentraciones y días (A) PSMA, (B) PSMA@Gln, (C) PSMA@Tyr y PSMA@Phe. Imágenes corresponden a las placas incubadas en solución de liberación de 7 días. Los datos se analizaron utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett; **** P < 0,0001 en comparación con grupo control negativo (sin agente activo).