UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA Escuela de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología Unidad Valle de las Palmas



EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN BACTERIANA EN NANOFIBRAS ELECTROHILADAS

Tesis que para obtener el título de:

BIOINGENIERO

Presenta:

Rodolfo Daniel Velasco Barraza

Director de tesis:

Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez

Tijuana, B.C.

Febrero, 2017

Contenido

Abrev	viaturas	6
RESU	JMEN	8
ANTE	ECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE	9
FUNI	DAMENTO TEÓRICO	11
2.1 Pr	opiedades ácido – base	11
2.2 Bi	iopolímeros	13
2.2.1	Poli (ácido acrílico) (PAA)	14
2.2.2	Quitosano (CS)	15
2.2.3	Alginato	16
2.3 Ba	acterias gram positivas y gram negativas	17
2.3.1	Características químicas y eléctricas de la pared celular de las bacterias gram negativas	18
2.3.2	Características químicas y eléctricas de la pared celular de las bacterias gram positivas	20
2.4 M	ecanismos de adhesión bacteriana	22
2.4.1	La capa condicionante	25
2.4.2	Adhesión reversible	25
2.4.3	Adhesión irreversible	27
2.5 El	ectrohilado	28
MET	DDOLOGÍA	32
3.1	Preparación de Biopolímeros	33
3.1.1	Poli (ácido acrílico)	33
3.1.2	Solución de Quitosano (CS)	33
3.1.3	Solución de Alginato (ALG)	34
3.2	Preparación de la solución PAA/CS y PAA/ALG	34
3.3	Preparación de caldo de cultivo para bacterias	36
3.4	Inoculación de bacterias	37
3.5	Electrohilado de biopolímeros	38
3.5.1	Electrohilado de PAA	38
3.5.2	Electrohilado de PAA/CS	39
3.5.3	Electrohilado de PAA/ALG	40
3.6	Ensayo de adsorción bacteriana	40

3.7	Medición de pH en cultivos bacterianos	. 43
3.8	Técnicas de caracterización de nanofibras electrohiladas	. 44
3.8.1	Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	. 45
3.8.2	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	. 45
3.8.3	Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido(DSC)	. 46
RESU	LTADOS Y CONCLUSIONES	. 47
4.1 Re	sultados	. 47
4.1.1 N	Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	. 47
4.1.2 I	Espectrofotometría infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	51
4.1.3 I	Ensayo de adsorción bacteriana	. 53
4.1.4 N	Medición de pH en cultivos bacterianos	. 56
4.1.5	Análisis Termogravimétrico (TGA)	. 57
4.1.6 0	Calorimetría Diferencial de Barrido	. 58
4.2 Di	scusión de resultados	. 59
4.3 Co	onclusiones	. 63
REFE	RENCIAS	. 64

Lista de figuras

Fig. 2. 1 Esquema general de una reacción ácido - base	
Fig. 2.2.1. 1 Monómero de PAA	
Fig. 2.2.2. 1 Estructura química del Quitosán	
Fig. 2.3. 1 Estructura general de las bacterias gram negativas	
Fig. 2.3. 2 Estructura de las bacterias gram positivas	
Fig. 2.3.1. 1 Estructura general de la pared celular de las bacterias gram negativas .	
Fig. 2.3.1. 2 Estructura química del lípido A	
Fig. 2.3.1. 3 Estructura química del antígeno O	
Fig. 2.3.2. 1 Estructura general de la pared celular de las bacterias gram positivas	
Fig. 2.4. 1 Micrografía de un biofilme (Shivesh, 2009)	
Fig. 2.4. 2 Unidades de anclaje y repetición en bacterias gram positivas	
Fig. 2.4.1. 1 Estructura general de la capa condicionante	
Fig. 2.4.2. 1 Interacciones reversibles en bacterias gram positivas	
Fig. 2.4.2. 2 Interacciones reversibles en bacterías gram negativas	
Fig. 2.4.3. 1 Mecanismos de adhesion bacteriana	
Fig. 2.5. 1 Esquema general de un equipo de electrohilado	
Fig. 2.5. 2 Efecto de la conductividad en la fabricación de nanofibras por electrohila	ıdo 30
Fig. 2.5. 3 Aplicaciones de las nanofibras	
Fig. 2.5. 4 Efecto de la humedad sobre la fabricación de nanofibras por electrohilad	o 32
Fig. 3.2. 1 Posibles interacciones PAA/CS	
Fig. 3.2. 2 Posibles interacciones PAA/ALG	
Fig. 3.4. 1 Procedimiento de esterilización del área para trabajo con bacteria	
Fig. 3.5. 1 Procedimiento de preparación de colector	
Fig. 3.6. 1 Placa de 96 pozos	
Fig. 3.6. 2 Distribución de Muestras en placa Microtest Primaria® 35	
Fig. 3.7. 1 Procedimiento de medición de pH en medios de cultivo	
Fig. 4.1.1. 1 Fibras electrohiladas de PAA a 1,000x	
Fig. 4.1.1. 2 Fibras electrohiladas de PAA a 9,000x	
Fig. 4.1.1. 3 Fibras de PAA/CS a 5,000	
Fig. 4.1.1. 4 Fibras de PAA/CS a 5,000x	
Fig. 4.1.1. 5 Fibras de PAA/CS a 25,000x	49
Fig. 4.1.1. 6 Fibras de PAA/ALG a 5,000x	50
Fig. 4.1.1. 7 Fibras de PAA/ALG a 10,000x	50
Fig. 4.1.2. 1 Espectro infrarrojo de PAA, CS y PAA/CS	
Fig. 4.1.2. 2 Espectro infrarrojo de PAA, ALG y PAA/ALG	
Fig. 4.1.3. 1 Absorbancia promedio de Micromonospora spp	53
Fig. 4.1.3. 2 Porcentaje de adsorción promedio de Micromonospora spp	
Fig. 4.1.3. 3 Absorbancia promedio de Streptomyces spp	
Fig. 4.1.3. 4 Porcentaje de adsorción promedio de Streptomyces spp	
Fig. 4.1.3. 5 Absorbancia promedio de Escherichia coli	
Fig. 413 6 Porcentaje de adsorción promedio de Escherichia coli	56
115. Inter of a or contraje de ausor cion prometito de Escherienta con information	

Fig. 4.1.4. 1 Valores de pH en cultivos	. 56
Fig. 4.1.5. 1 TGA comparativo de PAA, PAA/CS y PAA/ALG	. 57
Fig. 4.1.6. 1 DSC comparativo de PAA, PAA/CS y PAA/ALG	. 58

Lista de tablas

Tabla 4.1.1. 1 Diámetros promedio y porcentaje de porosidad medido	. 51
Tabla 4.1.5. 1 Resumen de temperaturas observadas en TGA	. 58
Tabla 4.1.6. 1 Temperaturas de transición vítrea observadas en DSC	. 59
Tabla 4.2. 1 Características presentadas por las fibras	. 60
Tabla 4.2. 2 Evaluación de las cargas de los polímeros ante el pH	. 62

Abreviaturas

ALG	Alginato						
CS	Chitosán o Quitosano						
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido (Differential Scanning Calorimetry en inglés)						
EPS	Sustancias exopoliméricas (Exopolymeric Substance en inglés)						
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (Fourier Transform						
	Infrared Spectroscopy en inglés)						
Нар	Hidroxiapatita						
Ka	Constante de acidez						
KDO	Ácido (2-keto-deoxioctonico)						
kV	Kilovoltio						
LPS	Lipopolisacárido (Lipopolysaccharide en inglés)						
PAA	Poli (ácido acrílico)						
рН	Potencial de Hidrógeno						
PVA	Poli (vinil alcohol)						
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido (Scanning Electron Microscopy en inglés)						
TGA	Análisis Termogravimétrico (Termogravimetric analysis en inglés)						

AGRADECIMIENTOS

El terminar este documento es altamente satisfactorio para mí. Ha sido fruto de mucha paciencia y esfuerzo en corto tiempo, además del apoyo de diversas personas en toda mi estancia en la universidad.

Primero me gustaría agradecer a mi familia, a mi padre, mi madre y mi hermana, que sin su apoyo incondicional y sin esas ganas de decirme que no me detuviera en mis proyectos, tal vez habría tomado otro camino.

También quiero agradecerle muy especialmente a Alan Álvarez, que sin su invitación a colaborar con él en la fabricación del equipo del electrohilado, no habría despertado en mí el interés por la investigación; además le agradezco a Dayana Gómez, una gran amiga que, a pesar de las situaciones adversas, siempre estuvo ahí animándome a no rendirme.

Quiero agradecer a todos mis maestros que me impartieron clase durante toda la licenciatura, que estuvieron ahí para atender mis dudas y compartir conmigo lo que saben. Aunque con algunos tuve diferencias con la forma de dirigir el programa, estoy seguro que lo hacían con la mejor de las intenciones y cumplir con su trabajo.

Un agradecimiento muy especial a los doctores Eduardo López y Teresita Oropeza, que a pesar de llevar poco tiempo conociéndome, me han brindado su confianza y me han dado un espacio en el CIDETEQ para trabajar con ellos.

Finalmente, y no menos importante, al doctor Luis Villarreal, mis profundos agradecimientos y respeto, por todo el apoyo que me ha dado, porque me ha enseñado a ser más espontáneo con mis acciones, a buscar nuevas posibilidades y a dejar que haga las cosas, sabiendo que puedo equivocarme.

A todos ustedes, muchas gracias.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es evaluar la adsorción bacteriana de andamios de tres tipos de biopolímeros: poli (ácido acrílico) (PVA), poli (ácido acrílico)/quitosano y poli (ácido acrílico)/alginato. Las líneas bacterianas Streptomyces spp., Micromonospora spp., y Escherichia coli fueron utilizadas para evaluar la adhesión. La formación de las nanofibras, porcentaje de porosidad y el diámetro promedio de porosidad de las fibras fue calculada utilizando Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). También, se realizaron mediciones de absorbancia por espectrofotometría a 600 nm. Las cepas Streptomyces spp., Micromonospora spp, indicaron poseer mejor adsorción a los andamios de poli (ácido acrílico)/quitosano; para Escherichia coli, se observó mejor adhesión a las fibras de poli (ácido acrílico) y al poli (ácido acrílico)/alginato. La concentración de la cepa Streptomyces spp., aumentó cuando estuvieron expuestos los andamios de poli (ácido acrílico)/alginato, mostrando que tales recubrimientos son prometedores para aplicaciones biotecnológicas. Estos resultados podrían servir para mejorar biorreactores de bacterias de la familia de los actinomicetos para la producción industrial de fármacos anticancerígenos y antibacterianos. Algunos biorreactores emplean matrices artificiales donde se encuentran inmovilizadas las bacterias, como los utilizados para la producción de ácido acético. En ellos se inmovilizan cepas como la Acetobacter spp., hasta que se conforma el biofilme. Así que, gracias a la alta porosidad y la amplia superficie de contacto de las nanofibras, es posible mejorar la interacción de microrganismos con otras sustancias, lo que puede llegar a hacer más fácil la asimilación de compuestos. Sin embargo, la producción de algunos compuestos por actinomicetos requiere de otro tipo de biorreactores al descrito anteriormente, por lo que se abren oportunidades para otro tipo de ensayos.

Palabras clave: Adsorción bacteriana, electrohilado, poli (ácido acrílico).

ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE

El electrohilado es una técnica que ha evolucionado hasta tener la solidez y confiabilidad para ser utilizado en varias aplicaciones en los años recientes, siendo el área biomédica la que ha reportado mayores avances. La ingeniería de tejidos, por ejemplo, utiliza andamios para darle soporte a las células y que estas logren regenerar una nueva matriz extracelular que pudiese haber sido destruida por heridas, enfermedades o defectos genéticos sin generar una respuesta inmune (Liang, Hsiao, & Chu, 2007). Así, se han utilizado andamios electrohilados para regeneración de nervios periféricos (Bini et al., 2004), cultivo de osteoblastos (Fujihara, Kotaki, & Ramakrishna, 2005), injertos vasculares (Tillman et al., 2009), regeneración de células musculares (Aviss, Gough, & Downes, 2010) y cubiertas para heridas (Abrigo, McArthur, & Kingshott, 2014).

En el caso de los sistemas de liberación de fármaco, se han empleado en gran medida para el tratamiento localizado de cáncer. Por ejemplo, el fármaco 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU) que se utiliza para el tratamiento de gliomas, se introduce al cuerpo por perfusión intravenosa pero su tiempo de vida en el cuerpo es de apenas 20 minutos después de su aplicación. Sin embargo, al suministrarse con nanofibras, su periodo de liberación puede prolongarse hasta por 10 horas (Xu et al., 2006). El mismo problema ocurre con otros compuestos anticancerígenos como el dicloruro de titanoceno ((η^5 -C₅H₅)₂TiCl₂), utilizado para tumores pulmonares; su liberación y estabilización puede lograrse al combinarlo con nanofibras (Chen et al., 2010). Las nanofibras producidas por combinaciones de polímeros también se han utilizado para disminuir los efectos que otros compuestos anticancerígenos tienen en el cuerpo, como el caso del fármaco Brefeldin A (C₁₆H₂₄O₄) (W. Liu et al., 2013).

En el área ambiental las nanofibras se han utilizado para entender el comportamiento de las bacterias y el ambiente con el que interaccionan. Dada la alta porosidad y la mayor área de contacto que ofrecen las nanofibras, es posible mejorar la interacción de microorganismos con otras sustancias; o bien, mejorar la supervivencia de especies bacterianas ante ambientes adversos. Generalmente, el electrohilado en la biotecnología se utiliza para contener bacterias dentro de un andamio o para filtrar bacterias de un medio (Teo, 2015).

Las primeras pruebas se realizaron sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus albus* y virus (T7, T4 y λ). Aunque *Escherichia coli* tuvo menor viabilidad que *Staphylococcus albus*, pudo comprobarse que las bacterias podían electrohilarse en contraste con los virus, que mostraron muy poca supervivencia (Salalha, Kuhn, Dror, & Zussman, 2006). Esto condujo a pruebas con bacterias probióticas como *Bifidobacterium animalis lactis* Bb12, una bacteria que habita en el intestino humano y ayuda a la correcta absorción de lactosa; la bacteria pudo preservarse por 130 días a una temperatura de 4°C contenida en las nanofibras (López-Rubio, Sanchez, Sanz, & Lagaron, 2009).

La contención de bacterias en andamios ha sido probada para su aplicación en biorreactores, pues se asegura la presencia de los microorganismos en un área determinada. *Pseudomonas fluorescens, Zymomonas mobilis* y *Escherichia coli* fueron inmovilizadas en nanofibras. *Zymomonas mobilis* se mantuvo viable en un 93% y después de días de conservación y posterior uso como fermentador, no se afectó el metabolismo de la bacteria (Ying Liu, Rafailovich, Malal, Cohn, & Chidambaram, 2009). Esta capacidad fue probada en otra combinación de polímeros electrohilados con *Escherichia coli* para la degradación de *Atrazina* (un herbicida) y se demostró su utilidad para técnicas de biorremediación (Tong, Mutlu, Wackett, & Aksan, 2013).

También se ha reportado el uso de bacterias electrohiladas en aplicaciones agrícolas. Las bacterias *Bradyrhizobium japonicum* y *Bradyrhizobium elkanii* se presentan en la rizósfera (la región comprendida entre el suelo y la raíz de las plantas) como auxiliares en la fijación de nitrógeno de la planta, lo cual ayuda a su crecimiento. Sin embargo, condiciones adversas del suelo minan la presencia de la bacteria; al ser encapsulada en polímeros capaces de retener el agua, la bacteria mejora su supervivencia (Damasceno, Roggia, Pereira, & de Sá, 2013).

En este estudio se analizó la actividad de tres biopolímeros, poli (ácido acrílico) (PAA), quitosano (CS) en combinación con poli (ácido acrílico) (PAA/CS) y alginato (ALG) en combinación con poli (ácido acrílico) (PAA/ALG), y su relación con diferentes bacterias, dos de origen marino (*Streptomyces spp.* y *Micromonospora spp.*) y una cepa proveniente de aguas residuales (*Escherichia coli*).

La elección de los polímeros tomó en cuenta su estructura química y las aplicaciones ya caracterizadas. De esta manera, se eligió el poli (ácido acrílico) por ser un polímero con una estructura sencilla y que presenta un ácido carboxílico como radical, por lo que debería promover la formación de puentes de hidrógeno entre el polímero y la bacteria, favoreciendo la adsorción. Por su parte, la presencia del quitosano, el cual es considerado como agente antibacteriano, debería inhibir o limitar la adhesión de las bacterias. Finalmente, el uso del alginato, un polisacárido que contiene sodio, debería incrementar la fuerza iónica del andamio y aumentar la adsorción de las bacterias.

FUNDAMENTO TEÓRICO

El proceso por el cual las bacterias se adhieren a las superficies, involucra muchos fenómenos que ocurren al mismo tiempo, las propiedades del medio y del material involucrado pueden causar efectos favorables o desfavorables para que ocurra dicho acontecimiento. Por ejemplo, el pH afecta el comportamiento eléctrico de las estructuras orgánicas que están interactuando, la estructura química de las superficies puede facilitar o dificultar la formación de enlaces que permitan la adhesión de la bacteria, y la morfología de los andamios permite una mejor interacción de las bacterias con el material. En los siguientes apartados se analizan con mayor profundidad estos factores.

2.1 Propiedades ácido – base

Los cambios en el pH del medio pueden modificar las propiedades eléctricas de los grupos funcionales que interactúan con los seres vivos. Estos cambios en la estructura de los radicales impactan en la formación de enlaces que pueden ayudar a la fijación de las bacterias.

Y ya que mucho del comportamiento de compuestos químicos se debe a sus propiedades ácido – base, es útil rescatar algunos conceptos clave. Existen dos definiciones muy utilizadas para ácidos y bases: la definición de Brønsted – Lowry y la definición de Lewis. La definición de Brønsted – Lowry dicta: *Un ácido es una sustancia que dona un protón (H*⁺) y una base es una sustancia

que acepta un protón (H⁺). En una reacción ácido – base, los ácidos producen bases conjugadas y las bases producen ácidos conjugados, tal como se observa en la figura 1.



Fig. 2. 1 Esquema general de una reacción ácido - base

Esta habilidad para donar protones depende del ácido. Esta "fuerza" se puede medir dada su constante de acidez (K_a). Esta constante es un valor numérico que puede calcularse dada la expresión en la ecuación 1.

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$
(1)

Donde [H⁺] es la concentración molar del ácido conjugado, [A⁻] es la concentración molar de base conjugada y [HA] es la concentración del ácido original. Por convención, las fuerzas de ácidos se expresan en valores de pK_a , donde este es el logaritmo negativo de K_a , como en la ecuación 2.

$$pK_a = -\log K_a \tag{2}$$

Una sustancia con un valor alto de K_a tendrá un pK_a menor, lo que indica un ácido fuerte; una sustancia con un valor bajo de K_a tendrá un pK_a mayor, lo que indicaría un ácido débil. Muchos compuestos químicos tienen su pK_a bien definido.

El **pH o potencial de hidrógeno** es una medida de la acidez de una solución. Está definido matemáticamente como *el logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno* (3).

$$pH = -\log[H^+] \tag{3}$$

Donde [H⁺] representa la concentración molar del ácido en cuestión.

Los compuestos químicos cambian su estructura ante los cambios de pH en relación a su pK_a. Esto principalmente afecta los grupos funcionales de los compuestos y modifica su carga eléctrica. Una forma de medir la presencia de formas protonadas (con exceso de cargas positivas) o desprotonadas (exceso de cargas negativas) es mediante la ecuación de **Henderson – Hasselbalch** (4).

$$pH = pK_a + \log\frac{[A^-]}{[HA]} \tag{4}$$

La importancia de la ecuación radica en el cociente del logaritmo. Cuando el pH de la solución es menor al pK_a de los compuestos presentes en la solución, la estructura se encontrará en su forma protonada. En cambio, cuando el pH de la solución es mayor al pK_a del compuesto, la sustancia se encontrará en su forma desprotonada. Cuando el pH es igual al pK_a , el compuesto estará en su forma neutra o *zwitterion*.

2.2 Biopolímeros

La estructura de los materiales tiene un papel determinante en la adhesión de las bacterias. La capacidad de que los materiales puedan formar puentes de hidrógeno, intercambiar iones o la distribución espacial del mismo afectan de manera positiva o negativa la interacción de las bacterias sobre la estructura (Moriarty, Poulsson, Rochford, & Richards, 2011).

Los biopolímeros son polímeros formados bajo condiciones naturales durante el desarrollo de todos los organismos, de ahí que también pueden ser llamados polímeros naturales. Estos se forman dentro de las células por procesos metabólicos (Rao, Bharathi, & Akila, 2014). Pueden provenir de crustáceos, hongos o madera, por mencionar algunos. Estos se consideran fuentes

renovables (D L Kaplan, 2013) y son intrínsecamente biodegradables, compatibles y antibacteriales (Rinaudo, 2006).

2.2.1 Poli (ácido acrílico) (PAA)

El poli (ácido acrílico) (PAA) es un polímero de alto peso molecular. Su monómero puede observarse en la figura 2.2.1.1 En soluciones acuosas a pH neutral, puede dar el hidrógeno de su grupo externo y adquirir carga negativa. En su forma deshidratada es un polvo blanco sólido, capaz de absorber agua por lo cual exhibe propiedades de hidrogel. Es por esto que se utiliza como material en pañales (Mergel, 2010).



Fig. 2.2.1. 1 Monómero de PAA

Su temperatura de transición vítrea es de 106°C. De los 200°C a 250°C, pierde toda el agua y se convierte en un polímero anhidro entrecruzado insoluble. Su solubilidad en agua incrementa con la temperatura.

En el área de biomateriales, el PAA se utiliza en la preparación de biomateriales compuestos con hidroxiapatita (PAA/Hap). Entre otras aplicaciones se encuentra el estudio de difusión de solutos de hidrogeles junto con el poli (vinil alcohol) (PVA), también se ha reportado la síntesis de bloques copoliméricos de poli (N–isopropilacrilamida) y el poli (ácido acrílico), los cuales responden a cambios de pH y temperatura, preparación de bloques copoliméricos de oligo(metilmetacrilato) y PAA para sistemas de entrega de medicamentos hidrofóbicos, entre otros (Sigma Aldrich, 2015b).

El PAA es un polímero de estructura sencilla que puede permitir la formación de puentes de hidrógeno con otros compuestos, lo que podría facilitar la fijación de las bacterias a una superficie recubierta con este material.

2.2.2 Quitosano (CS)

Es un biopolímero conocido como quitina o quitosano, que se diferencia uno del otro de acuerdo al grado de desacetilación el cual es determinado por la proporción de D – glucosamina y N–acetil– D–glucosamina. También es muy abundante y es el biopolímero básico, su estructura es similar a la de la celulosa.

Características como la solubilidad, biodegradación, reactividad y adsorción de muchos sustratos depende en la cantidad de grupos amino protonados en la cadena polimérica. Los grupos amino (pKa 6.2 a 7.0) están completamente protonados en ácidos con pKa menor a 6.2, lo que hace que el quitosano sea soluble. Es insoluble en agua, solventes orgánicos y bases acuosas y es soluble después de agitar en ácidos como el acético, nítrico, hidroclórico, perclórico y fosfórico (de Alvarenga, 2011).

El CS se puede utilizar como agente floculante, precipitador de proteínas, agente encapsulante y adelgazador acuoso. Éste también forma geles con aniones multivalentes y puede formar soluciones claras que al secarse forman películas fuertes y claras.



Fig. 2.2.2. 1 Estructura química del Quitosano

También el CS es biocompatible, antibacterial y biodegradable con el ambiente, puede utilizarse para tratamiento de aguas, cromatografía, aditivo para cosméticos, telas antibacterianas, papel fotográfico, películas biodegradables, uso en dispositivos biomédicos y como microcápsulas implantadas para la liberación controlada de medicamentos (Sigma Aldrich, 2015a).

2.2.3 Alginato

El alginato es un polisacárido lineal aniónico extraído de las algas cafés. Consiste en bloques alternados de α -L-gulurónico y β -D-manurónico. Sus propiedades físicas están determinadas por la longitud de la cadena polimérica.

Estos pueden formar geles en presencia de iones metálicos (Dalmoro, Barba, Lamberti, Grassi, & D'Amore, 2012). Las aplicaciones de los alginatos son muchas, pues se pueden utilizar en la industria alimenticia, textil y farmacéutica por su viscosidad y sus propiedades como agente gelificante (Hay, Rehman, Moradali, Wang, & Rehm, 2013).



Fig. 2.2.3.1 Estructura química del Alginato

2.3 Bacterias gram positivas y gram negativas

La composición de las membranas bacterianas es sumamente importante para entender el proceso de fijación de la bacteria. De acuerdo a la clasificación de las bacteria en gram positivas o gram negativas, unas presentarán elementos que las otras no. Por ejemplo, una de las diferencias más importantes entre estas membranas es la cantidad de capas fosfolipídicas. Otra diferencia importante, es la presencia de grupos fosfato en el exterior de la membrana de las bacterias gram positivas que interactúan con las superficies, mientras que en el exterior de la membrana gram negativa se encuentran lipopolisacáridos. Estas diferencias pueden determinar la forma en que las bacterias realizan sus procesos de fijación a las superficies; además de que la composición química de dicho sustrato favorezca o no tal unión.

Para entender el proceso de adsorción bacteriana en nanofibras, es central comprender las características de la pared celular de las bacterias. A continuación, se describe a detalle la estructura de las membranas celulares, con base en la clasificación de las bacterias en gram negativas y gram positivas.



Fig. 2.3. 1 Estructura general de las bacterias gram negativas

Las bacterias gram negativas están constituidas por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa; las bacterias gram positivas poseen una pared celular gruesa de peptidoglicano.



Fig. 2.3. 2 Estructura de las bacterias gram positivas

2.3.1 Características químicas y eléctricas de la pared celular de las bacterias gram negativas

En las bacterias gram negativas hay dos membranas lipídicas: una interna que se compone de glicerofosfolípidos y una membrana externa que consiste en su mayor parte de lipopolisacáridos (LPS). Estos últimos son de alto interés a la investigación, pues son las toxinas que estimulan el sistema inmunológico de hospederos multicelulares. (Christie, 2014).

Los LPS se dividen en tres secciones: lípido A, oligosacárido central y el antígeno O; estudios sobre estas secciones indican que están unidos por grupos fosfato, de manera que este les confiere una carga neta negativa (Ortolano et al., 2009).

Estos LPS varían entre cada especie de bacterias tanto en longitud como en distribución; éstas están ancladas a la membrana por una sección conocida como lípido A (Reyes, Romo González, Coria Jiménez, Ortiz Herrera, & Aquino Andrade, 2012).



Fig. 2.3.1. 1 Estructura general de la pared celular de las bacterias gram negativas



Fig. 2.3.1. 2 Estructura química del lípido A

Unidas al lípido A, se encuentra el ácido (2-keto-deoxioctonico) (KDO). Después de este se encuentran los lipopolisacáridos centrales que se dividen en dos secciones: una interna y una externa. La interna contiene hexosas y KDO, y la externa contiene hexosas y grupos hexosamino. La región externa se une al antígeno O, el cual se compone generalmente en grupos de cuatro o cinco hexosas de manera ramificada o lineal (Reyes et al., 2012).



Fig. 2.3.1. 3 Estructura química del antígeno O

2.3.2 Características químicas y eléctricas de la pared celular de las bacterias gram positivas

Las bacterias gram positivas tienen una pared gruesa de glicopolímeros llamados "ácidos teicoicos" en conjunto con láminas de peptidoglicano. Estos polímeros toman un papel importante en la morfología de la bacteria, en la regulación de su división y otros aspectos fisiológicos.

El peptidoglicano es una matriz lineal de carbohidratos (glicano) unidos por enlaces peptídicos. Los ácidos teicoicos son un conjunto de glicopolímeros que contienen fosfodiésteres; estos también incluyen los ácidos lipoteicoicos y están anclados a la membrana por un glucolípido que está unido por un enlace covalente al peptidoglicano (Brown, Santa Maria, & Walker, 2013). Químicamente, la pared de ácido teicoico se puede dividir en dos componentes principales: una unidad de enlace de disacáridos y una cadena principal de polioles unidos por enlaces fosfodiéster.

La unidad de enlace de disacáridos, se encuentra en todas las bacterias, se haya N– acetilmanosamina, N-acetilglucosamina–1–fosfato, junto con una o dos unidades de glicerol–3– fosfato unidas a la N–Acetilmanosamina. Estas uniones se extienden a lo largo de las cadenas de polioles mencionadas anteriormente. Sin embargo, la diversidad de estas estructuras es muy alta entre las mismas especies de bacterias (Shiraishi, Yokota, Fukiya, & Yokota, 2016).



Fig. 2.3.2. 1 Estructura general de la pared celular de las bacterias gram positivas

Eléctricamente, las bacterias gram positivas pueden modificar la carga superficial al unir el aminoácido D-alanina por enlace éster cuando la pared celular termina de ser sintetizada por la bacteria (Reichmann, Cassona, & Grundling, 2013). La unión de la D-alanina atenúa, de acuerdo a la especie de bacteria, las cargas negativas en la membrana de ésta exponiendo un grupo amino protonado.

2.4 Mecanismos de adhesión bacteriana

El proceso por el cual las bacterias se adhieren a los materiales puede ocurrir de dos formas: (1) la bacteria se adhiere de forma directa al material, predispuesta por las condiciones del ambiente, la estructura química del material y las interacciones de las estructuras externas de la bacteria con el material o, (2) la bacteria se adhiere de manera indirecta al material por medio de la formación de una capa condicionante que facilite la adhesión de la bacteria al tener afinidad con dicha capa (Moriarty et al., 2011).

De esta manera, cualquiera de las dos vías conduce a la acumulación de estos microorganismos sobre tal superficie. El proceso ha sido descrito y abordado de diferentes maneras a lo largo de los años; pero uno de los primeros reportes sobre el tema (Fletcher, 1977), lo describió como un proceso de tres etapas:

- 1. Adsorción: o acumulación de un organismo en una superficie
- 2. Fijación: consolidación de la interfase entre un organismo y una superficie. En este proceso se observa la formación de puentes de polímeros entre el organismo y la superficie.
- 3. Colonización: crecimiento y división de los organismos en la superficie.

Otros autores (Characklis & Marshall, 1990) han definido este proceso en ocho etapas que incluyen, la formación de una capa condicionante, procesos adhesivos reversibles e irreversibles y la separación de las bacterias de una superficie para colonización consecuente.

La colonización de bacterias en un área da lugar a un biofilme. Los biofilmes consisten en células inmovilizadas en una superficie y frecuentemente incrustadas en una matriz polimérica orgánica

de origen microbiano (Characklis & Marshall, 1990). Estas matrices son biológicamente activas con células y sustancias extracelulares en una superficie sólida, que le brindan una constitución elástica; además presentan una fase líquida (principalmente de agua) que separan microcolonias.

Las sustancias exopoliméricas (SEP o *EPS* por sus siglas en inglés) confieren una estabilidad mecánica a toda la estructura (Lembre, Lorentz, & Martino, 2012). Muchos de los polímeros presentes en la membrana microbiana son solubles en agua en soluciones salinas diluidas. Los polisacáridos formadores de cápsulas se adhieren a las células por medio de enlaces covalentes a otros polímeros. Sin embargo, las sustancias exopoliméricas presentes en los biofilmes son insolubles y es difícil separarlas de las células para su análisis, lo que complica la identificación de sus estructuras químicas y de sus propiedades físicas.



Fig. 2.4. 1 Micrografía de un biofilme (Shivesh, 2009)

Dependiendo del ambiente en el que se encuentren las bacterias, se obtendrán dos posibles formas del biofilme. Si este se forma en temperaturas elevadas y con bajas concentraciones de iones, se obtienen formas desordenadas. Ya que los polisacáridos interactúan con ellos mismos o con otros iones o moléculas, la presencia de iones juega un papel importante en la estructura del biofilme.



Fig. 2.4. 2 Unidades de anclaje y repetición en bacterias gram positivas

Estructuralmente, los biofilmes pueden adaptarse a las condiciones físicas del ambiente. Biofilmes formados en áreas con una exposición elevada a grandes esfuerzos, exhiben fuerzas de adhesión más grandes y una matriz base más fuerte (Lembre et al., 2012).

2.4.1 La capa condicionante

Esta capa establece los cimientos en los que crecerá un biofilme, se compone de muchas partículas orgánicas e inorgánicas que fluyen y se asientan por gravedad, modificando la superficie y facilitando la deposición de la bacteria.

Generalmente, esta capa tiende a modificar la carga superficial para favorecer las interacciones de la bacteria y la superficie, de manera que le provee anclaje y nutrientes para aumentar el crecimiento de estas.



Fig. 2.4.1. 1 Estructura general de la capa condicionante

Si esta capa tiene características similares a las *EPS* que sintetiza la bacteria, es más fácil que esta logre adherirse a la superficie en cuestión (Garrett, Bhakoo, & Zhang, 2008).

2.4.2 Adhesión reversible

Las bacterias se transportan a la superficie acondicionada por fuerzas físicas (gravedad, interacciones electrostáticas, etc.) o por estructuras en las bacterias como flagelos.

Factores como la funcionalización de la superficie, orientación de la bacteria, condiciones como temperatura y presión contribuyen a la adhesión de la bacteria. Sin embargo, el proceso puede ser reversible por fuerzas de repulsión electrostática.

También es posible encontrar fuerzas de van der Waals y cambios conformacionales de estructuras químicas. Una teoría que combina las posibles interacciones es la teoría DVLO (por las iniciales de sus autores Derjaguin, Verwey, Landau y Overbeek), la cual fue planteada para explicar la estabilidad de los coloides liofóbicos.



Fig. 2.4.2. 1 Interacciones reversibles en bacterias gram positivas

Esta teoría se aplica principalmente a partículas coloidales y su interacción con una superficie, relacionando las interacciones de van de Waals y Coulomb (Hori & Matsumoto, 2010). Sin embargo, la teoría no explica adecuadamente el comportamiento de las bacterias, ya que estas no son partículas desnudas, sino organismos cuya carga puede ser modificada por estructuras presentes en su parte externa (Atabek & Camesano, 2007).



Fig. 2.4.2. 2 Interacciones reversibles en bacterias gram negativas

2.4.3 Adhesión irreversible

Eventualmente, las células que han permanecido ancladas por el efecto de la adhesión reversible se unen irreversiblemente. Se consideran diferentes aproximaciones respecto a este proceso.

A lo largo de los años se ha sugerido que las bacterias inician el proceso de anclaje o fijación mediante sus propias estructuras físicas (flagelos, fimbrias, pili) para atravesar la barrera de fuerzas repulsivas (Kumar & Anand, 1998). Otros autores sugieren que la capacidad de adhesión depende de la estructura hidrofóbica–hidrofílica de las superficies con las que interactúan (Yu Liu et al., 2004); sin embargo, también se consideran las interacciones dipolo – dipolo, puentes de hidrógeno y enlaces iónicos y covalentes.



Fig. 2.4.3. 1 Mecanismos de adhesión bacteriana

2.5 Electrohilado

El electrohilado o *electrospinning* en inglés, es una técnica para la producción de fibras ultra finas y materiales fibrosos de origen natural y sintético con diámetro controlable a escala nanométrica.

En comparación con las superficies planas, los materiales electrohilados tienen una superficie de contacto mayor, lo que puede llevar al incremente de la tasa de reacción y sensibilidad (Luo et al., 2011). La técnica de electrohilado consiste en el uso de un gran campo eléctrico para estirar una solución polimérica en finas fibras. Un esquema de éste se muestra en la figura 2.5.1



Fig. 2.5. 1 Esquema general de un equipo de electrohilado (Velasco et al., 2016).

De manera descriptiva, se puede decir que este proceso se compone de tres fases (Leach, Feng, Tuck, & Corey, 2011): (1) una solución de un polímero se carga eléctricamente por medio de un campo eléctrico hasta que se forme un "jet", (2) el jet se atrae eléctricamente a la placa colectora que tiene una carga opuesta a la solución, (3) después de que la carga eléctrica sea suficiente para romper la tensión superficial de la solución, este "jet" se desestabiliza viajando en forma de cono. Durante este viaje, se evapora la mayor parte del solvente de la solución y (4) finalmente el "jet" cae depositado en la placa colectora de manera sólida o semisólida. Generalmente se somete a tratamientos posteriores para estabilizar la estructura de la membrana fabricada.

Aunque la técnica ha sido caracterizada en su mayor parte, aún existe una falta de consenso respecto a las escalas de los diámetros en las fibras. En nanotecnología, se acepta que la escala nanométrica oscila entre 1 y 100 nm, sin embargo, esto varía de acuerdo al área de estudio (Theis et al., 2006). Algunos otros consideran que las nanofibras oscilan entre 200 nm y 500 nm (Zhou & Gong, 2008). Este trabajo se apegará a la escala de 200 – 500 nm, ya que el número de combinaciones de polímeros para la síntesis de estas nanofibras es infinito, y las aplicaciones que se les han dado son igual de numerosas. La figura 2.5.3 resume las aplicaciones de las nanofibras en distintas áreas de investigación (Fang, Wang, & Lin, 2011).

Para la técnica son importantes los siguientes parámetros (Li & Wang, 2013):

Concentración: Dependiendo de la concentración de la solución, se pueden obtener nano-micro partículas a fibras, las primeras se obtienen a bajas concentraciones y las segundas a concentraciones medianas a altas, aunque eso depende totalmente del polímero.



Fig. 2.5. Efecto de la concentración en la fabricación de nanofibras por electrohilado. A) Microesferas, B) Fibras con esferas, C) Fibras.

En la figura anterior, se muestra el efecto de la concentración en la obtención de nanofibras. A medida que la concentración sube, se pueden obtener fibras con diámetros muy similares y superpuestas (es decir, fibras definidas) además de no presentar esferas o bulbos.

Viscosidad: Es un factor clave en la formación de fibras. Esta no debe ser muy baja o muy alta, pero como en el parámetro anterior, esta depende de cada polímero.

Conductividad: Esta está determinada por el polímero, el solvente utilizado y si se han agregado sales a la solución. Soluciones poliméricas con una alta cantidad de iones libres, permitirá electrohilar la solución con mayor facilidad que aquellas que no tienen. Mayor conductividad se puede obtener agregando sales iónicas como NaCl, KCl o KH₂PO₄, entre otras. Esto permitirá obtener fibras más delgadas, aunque esto también se ha observado con solventes orgánicos como ácido fórmico o ácido acético en mayor o menor concentración.



Fig. 2.5. 2 Efecto de la conductividad en la fabricación de nanofibras por electrohilado. A) Fibras de gelatina sin KCl, B) Fibras de gelatina con KCl, ambas a 9,000x.

La figura se pueden observar muestras de gelatina electrohilada con grafeno (a la derecha) y sin grafeno (a la izquierda). Como puede verse, con aproximadamente el mismo aumento, la presencia de grafeno reduce el diámetro de las fibras.

Voltaje: Es un factor crucial, solo cuando se aplica un voltaje mayor al de umbral, se pueden obtener fibras del cono de Taylor.

Gasto: El gasto con el que se empuja la solución, puede conducir a la formación de fibras o esferas. Los autores recomiendan que sea un gasto bajo, pues así se da tiempo suficiente a que la solución tome carga suficiente para electrohilarse.



Fig. 2.5. 3 Aplicaciones de las nanofibras

Distancia: Se ha comprobado que la distancia entre la aguja y el colector puede afectar el diámetro de las fibras y su morfología. Si la distancia es muy corta, la fibra podría no solidificarse ya que no se logra evaporar totalmente el solvente contenido en el polímero.

Condiciones del ambiente: Estas pueden afectar los diámetros de las fibras y la morfología. De acuerdo al polímero, el incrementar la temperatura puede producir fibras más delgadas, pues se reduce la viscosidad de la solución. La poca humedad del ambiente puede ayudar a que el solvente se seque fácilmente y puede producir fibras más delgadas. Sin embargo, nuestros experimentos han mostrado que la electrostática produce una formación de fibras fuera del colector, pues esta interfiere con el campo eléctrico producido por la fuente de voltaje.



Fig. 2.5. 4 Efecto de la humedad sobre la fabricación de nanofibras por electrohilado. Fibras de PAA en A) Altas condiciones de humedad y B) Bajas condiciones de humedad, ambas imágenes a 5,000x

La figura 2.5.4 se aprecia el electrohilado de PAA en diferentes épocas del año. A la izquierda, cuando el clima es húmedo (como lo es generalmente en verano en Tijuana, Baja California), se ve limitada la evaporación del solvente y esto produce fibras gruesas; durante las épocas de baja humedad (durante el otoño) (BBC, 2016), la evaporación es mayor y se pueden producir fibras más delgadas.

METODOLOGÍA

Se prepararon los biopolímeros utilizados para fabricar los andamios. En el caso del PAA, no se requirió preparación previa, ya que este fue adquirido en forma de solución al 35% p/v en agua. Posteriormente, se prepararon los medios de cultivo y se inocularon las bacterias; durante la primera hora de cultivo se midió el pH del medio. Finalmente, se electrohilaron los biopolímeros

y se tomaron muestras para la realización del ensayo de adsorción bacteriana y para las pruebas de caracterización fisicoquímica.

3.1 Preparación de Biopolímeros

3.1.1 Poli (ácido acrílico)

Poli (ácido acrílico) (PAA) (Número CAS 9003-01-4) de Sigma Aldrich (523925), $M_w \sim 100,000$, el cual viene en forma de solución al 35% p/v fue utilizado. No se realizaron modificaciones posteriores a su composición.

3.1.2 Solución de Quitosano (CS)

Quitosano (CS) (Número CAS 9012-76-4) de Sigma Aldrich (448877) de peso molecular mediano, ácido acético glaciar (Número CAS 64-19-7) de Jalmek (A0925-12) grado A.C.S. y agua destilada de Sparkletts fueron usados.

Se disolvió quitosano al 2% p/v en una solución de ácido acético al 90% v/v. Para esto, en un matraz Erlenmeyer se colocó 2 ml de agua destilada con una pipeta y posteriormente con otra pipeta se colocó 18 ml de ácido acético, de manera que se cumplió la relación (8):

$$\% \frac{v}{v} = \frac{ml \ de \ soluto}{ml \ de \ soluto + ml \ de \ solvente} * 100$$

$$\% \frac{v}{v} = \frac{18 \ ml \ de \ ácido \ acético}{18 \ ml \ de \ ácido \ acético + 2 \ ml \ de \ H_20} * 100 = 90\%$$
(8)

En los 20 ml de ácido acético al 90% preparado se colocó quitosano, de manera que el porcentaje de quitosano fue el 2% del volumen de la solución, utilizando la relación (9):

$$\%\frac{m}{v} = \frac{g \ de \ soluto}{ml \ de \ solvente} * 100$$

$$2\% = \frac{g \text{ de soluto}}{20 \text{ ml de solvente}} * 100$$

$$\frac{2}{100} * 20 = g \text{ de soluto}$$

$$0.4 \text{ g de Chitosán} = g \text{ de soluto}$$
(9)

Así se pesó 0.4 g de quitosano en una balanza analítica y se disolvió por 4 días con agitación constante en una plancha con agitador magnético.

3.1.3 Solución de Alginato (ALG)

El alginato (ALG) (Número CAS 9005-38-3) de Sigma Aldrich (W201502) y agua destilada de Sparkletts fueron utilizados. Se preparó una solución de alginato en agua al 10% p/v.

En un vial de vidrio se colocaron 10 ml de agua destilada y se disolvió 1 g de alginato, que se pesó en una balanza analítica, de manera que se cumplió la relación (10).

$$\% \frac{m}{v} = \frac{g \ de \ soluto}{ml \ de \ solvente} * 100$$

$$\% \frac{m}{v} = \frac{1 \ g \ de \ alginato}{10 \ ml \ de \ solvente} * 100 = 10\%$$
(10)

Se mezcló con una varilla de vidrio hasta que se logró una apariencia uniforme y sin grumos.

3.2 Preparación de la solución PAA/CS y PAA/ALG

En un vial de vidrio se combinó 1 ml de Quitosano con 3 ml de poli (ácido acrílico) para formar una combinación PAA/CS 2:1 que se mezcló con agitación manual hasta que se logró una apariencia uniforme. En otro vial se combinó 1 ml de alginato y 3 ml de Poli (ácido acrílico) y se logró la proporción PAA/ALG 3:1 y se mezcló de la misma manera que la solución anterior.

Ya que estas soluciones debían estar libres de burbujas para su posterior manipulación, los viales fueron colocados en una centrífuga por 45 s para removerlas.

Las figuras 3.4.1 y 3.4.2 muestran las posibles interacciones entre los polímeros y los solventes.



Fig. 3.2. 1 Posibles interacciones PAA/CS



Fig. 3.2. 2 Posibles interacciones PAA/ALG

3.3 Preparación de caldo de cultivo para bacterias

Para el cultivo de la bacteria *Escherichia coli* se empleó el caldo LB (Difco Caldo LB marca Becton, Dickinson & Company) y agua destilada. Se disuelven 20 g del caldo en polvo en 1 l de agua. Partiendo de esta relación, para preparar 50 ml de caldo (11):

20 g de polvo de caldo \rightarrow 1000 ml de agua X g de polvo de caldo \rightarrow 50 ml de agua

$$X g de polvo de caldo = \frac{50 ml de agua}{1000 ml de agua} * 20 g de polvo de caldo$$

$$X g de polvo de caldo = 1 g de polvo de caldo$$
(11)

En un matraz Erlenmeyer de vidrio se colocó 50 ml de agua destilada y 1 g de polvo de caldo de cultivo. Luego, el matraz se colocó en una plancha con agitador magnético a 100°C en agitación constante hasta que rompió en hervor. Posteriormente, la solución se colocó en otro matraz Erlenmeyer de plástico y se tapó sin cerrar totalmente.

Para el cultivo de las bacterias *Streptomyces spp.* y *Micromonospora spp.* se empleó el medio A1. Este medio utiliza almidón (10 g/l), peptona (4 g/l), extracto de levadura (2 g/l) y cloruro de sodio (35 g/l). Para preparar 50 ml de caldo, usando las expresiones (11) en (12):

 $X g de almidón = \frac{50 ml de agua}{1000 ml de agua} * 10 g de almidón$ X g de almidón = 0.5 g de almidón

$$X g de peptona = \frac{50 ml de agua}{1000 ml de agua} * 4 g de peptona$$
$$X g de peptona = 0.2 g de peptona$$
(12)

 $X g de extracto de levadura = \frac{50 ml de agua}{1000 ml de agua} * 2 g de extracto de levadura$ X g de extracto de levadura = 0.1 g de extracto de levadura

 $X g de cloruro de sodio = \frac{50 ml de agua}{1000 ml de agua} * 35 g de cloruro de sodio$ X g de cloruro de sodio = 1.75 g de cloruro de sodio

En dos matraces Erlenmeyer de vidrio se colocó 50 ml de agua destilada, 0.5 g de almidón, 0.2 g de peptona, 0.1 g de extracto de levadura y 1.75 g de cloruro de sodio. Luego los matraces se colocaron en planchas con agitador magnético a 100°C en agitación constante hasta que rompieron en hervor. Posteriormente, las soluciones se colocaron en dos matraces de plástico y se taparon sin cerrar totalmente. Los tres matraces de plástico con sus respectivos caldos se fueron esterilizados en autoclave, a 121°C por una hora. Antes de iniciar el proceso, se colocó cinta testigo en los matraces para corroborar el proceso de esterilización. Una vez concluido, se dejó enfriar los caldos a temperatura ambiente.

3.4 Inoculación de bacterias

El trabajo con bacterias requiere la previa esterilización del área. En una campana de flujo laminar, se sanitizó todas las superficies con alcohol etílico al 70% cubriendo toda el área de trabajo. Luego, con papel absorbente se limpió siguiendo el flujo del aire, usando la técnica de 4 puntos. El procedimiento se ilustra en la figura 3.6.1. Se colocaron las barreras primarias de seguridad, es decir: bata, guantes de látex o nitrilo y cubrebocas. Una vez concluido, se procedió a la inoculación de las bacterias en los caldos de cultivo. Los matraces inoculados se etiquetaron y se colocaron en la incubadora por 24 horas a 37°C. Una vez transcurrido este periodo, se retiraron de la incubadora y se colocaron un refrigerador a 4°C para conservar el cultivo.



Fig. 3.4. 1 Procedimiento de esterilización del área para trabajo con bacterias

3.5 Electrohilado de biopolímeros

El electrohilado de polímeros fue realizado en las instalaciones de la ECITEC utilizado el equipo reportado en (Velasco et al., 2016). En todos los casos, el colector se recubrió con papel aluminio y se fijó al colector colocando cinta adhesiva de papel (*"Masking Tape"* marca Tuck de 1 pulgada de ancho) (figura 3.5.1). El colector se conectó a tierra física para descargar el campo eléctrico.

Una vez cerrada la caja, se inició el programa del inyector, se confirmó visualmente el flujo de la solución por la punta de la aguja y se encendió la fuente de alimentación.



Fig. 3.5. 1 Procedimiento de preparación de colector

3.5.1 Electrohilado de PAA

En una jeringa de plástico de 3 ml se cargó 1 ml de la solución de PAA. Luego se colocó la aguja y se empujó el embolo hasta que la solución saliera por la aguja de manera constante. Después, la jeringa se colocó en el inyector y se programó para inyectar un volumen de 0.04 ml de solución a un gasto de 0.02 ml/h.

Se conectó la aguja metálica a la fuente de alimentación y se colocó el colector a 10 cm de distancia de la punta de la aguja. Se enciende la fuente de alimentación con una diferencia de potencial de 20 kV.

Una vez, transcurrido el tiempo de electrohilado, se apagó el equipo, se retiró el papel aluminio con el recubrimiento y se colocó en campana de extracción por 24 horas.



Fig. 3.5.1. 1 Procedimiento de electrohilado. A) Carga de la solución, B) Ajuste de los parámetros de inyección y montaje de la jeringa, C) Polarización de la solución, D) Electrohilado

3.5.2 Electrohilado de PAA/CS

Bajo la misma estructura del punto 3.7.1, se electrohiló la solución de PAA/CS cargando 1 ml de esta solución en la jeringa, y se inyectó un volumen de 0.04 ml de la solución a un gasto de 0.02 ml/h, con una distancia aguja – colector de 10 cm y una diferencia de potencial de 20 kV. Se retiró el papel aluminio con el recubrimiento y se colocó en campana de extracción por 24 horas.

3.5.3 Electrohilado de PAA/ALG

Al igual que en el punto 3.7.1, se electrohiló la solución de PAA/ALG cargando 1 ml de esta solución en la jeringa, y se inyectó un volumen de 0.06 ml de la solución a un gasto de 0.03 ml/h, con una distancia aguja – colector de 10 cm y una diferencia de potencial de 20 kV. Se retiró el papel aluminio con el recubrimiento y se colocó en campana de extracción por 24 horas.

3.6 Ensayo de adsorción bacteriana

Muchos compuestos absorben luz ultravioleta o luz visible (Clark & Gamini, 2016). Cuando la luz incide sobre un objeto, ésta puede ser reflejada, absorbida, transmitida o difractada. Estas propiedades pueden ser medidas electrónicamente con un espectrofotómetro.

La transmitancia (T) es una medida de comparación de la luz incidente (I_o) y la luz transmitida (I) y se obtiene dividiendo la cantidad de luz transmitida y la cantidad de luz incidente que atraviesan un medio (5):

$$T = \frac{I}{I_o} \tag{5}$$

La absorbancia (A) es la cantidad de luz absorbida por una muestra y se calcula a partir de la transmitancia (T) usando la relación (6) (Gallik, 2011):

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_o} \tag{6}$$

El cálculo de la absorbancia de una sustancia se utiliza principalmente para determinar la concentración de esta en una muestra. La ley de Beer-Lambert es una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de una sustancia (7):

$$A = \varepsilon * b * C \tag{7}$$

Donde ε es el coeficiente de absorción molar en $\frac{l}{mol \cdot cm}$, b es el grosor del vial donde está contenida la muestra en *cm* y C es la concentración del compuesto en la solución en $\frac{mol}{l}$ (National Tsing Hua University, 2000).

Un alto valor de absorbancia indicará una alta concentración del compuesto en cuestión.

El ensayo de adsorción requirió la esterilización del área para trabajo, para esto se siguieron los pasos descritos en el punto 3.4.

Una vez retirados los trozos de papel aluminio con el recubrimiento de la campana de extracción, se cortaron círculos de 5 mm de diámetro con un sacabocados para metal de cada trozo de papel aluminio. Se cortaron 12 muestras de papel aluminio recubierto con PAA, 12 muestras recubiertas con PAA/CS, 12 muestras recubiertas con PAA/ALG y 12 muestras de papel aluminio sin recubrir como control.



Fig. 3.6.1 Placa de 96 pozos

En los pozos de una placa estéril (Microtest Primaria® modelo 353872) se colocaron las muestras recubiertas, sin recubrir, caldo de cultivo solo y caldo inoculado de acuerdo a la distribución mostrada en la figura 3.6.2, todo dentro del área estéril.

	Micron	cromonospora spp.		Streptomyces spp.		Escherichia coli						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Α	1	Susp	3	1	Susp	3	1	Susp	3	NA	NA	NA
В	1	Susp	3	1	Susp	3	1	Susp	3	NA	NA	NA
С	1	Susp	3	1	Susp	3	1	Susp	3	NA	NA	NA
D	1	Susp	3	1	Susp	3	1	Susp	3	NA	NA	NA
Ε	Cal	2	4	Cal	2	4	Cal	2	4	NA	NA	NA
F	Cal	2	4	Cal	2	4	Cal	2	4	NA	NA	NA
G	Cal	2	4	Cal	2	4	Cal	2	4	NA	NA	NA
Η	Cal	2	4	Cal	2	4	Cal	2	4	NA	NA	NA

Cal Caldo sin inocular

Susp Caldo inoculado

NA No se colocó nada

1 Aluminio sin recubrir

2 Aluminio recubierto con PAA

3 Aluminio recubierto con PAA/CS

4 Aluminio recubierto con PAA/ALG

Fig. 3.6. 2 Distribución de muestras en placa Microtest Primaria® 35

En las casillas marcadas con "1" se colocaron círculos de papel aluminio sin recubrir, en las marcadas con "Cal" se colocaron 100 μ l del caldo de cultivo sin inocular con una micropipeta (marca eppendorf de 20–200 μ l) correspondiente a la bacteria, en las marcadas con "Susp" se colocaron 100 μ l de caldo cultivo inoculado, en las marcadas con "2" se colocaron círculos de papel aluminio recubierto con PAA, en las marcadas con "3" aquellos recubiertos con PAA/CS, en las marcadas con "4" aquellos recubiertos con PAA/ALG y en las marcadas con "NA" no se colocó nada. En todos los pozos, salvo en los marcados con "Susp" se colocaron 100 μ l del caldo inoculado; en las primeras tres columnas se colocó caldo inoculado con *Micromonospora spp.*, en las siguientes tres se colocó caldo inoculado con *Streptomyces spp.*, y en las últimas tres, caldo inoculado con *Escherichia coli*.

Después de esto, la placa se colocó en incubadora a 37°C por una hora. Finalmente se retiró y se colocó en refrigerador a 4°C una noche para conservar el ensayo.

Para probar la adsorción de la bacteria se realizó la medición de absorbancia de las soluciones en los pozos.

En un vial desechable para espectrofotómetro se colocó 1 ml de caldo de cultivo sin inocular que se utilizó como blanco (Medio A1 para *Micromonospora spp.* y *Streptomyces spp.* y medio LB para *Escherichia coli*). En otro vial primero se colocaron los 100 μ l de solución que se habían cultivado en la placa con pozos y 900 μ l de caldo cultivo sin inocular. Esta solución sirvió como objeto de comparación. En el espectrofotómetro (marca Beckman Coulter modelo DU730) se configuró para medir absorbancia a 600 nm. Primero se colocó la solución blanco que fue tomada como referencia en el espectrofotómetro, luego se retiró la solución y se colocó el objetivo, finalmente se realizó la medición de absorbancia y se anotó el resultado.

3.7 Medición de pH en cultivos bacterianos

La medición de pH en los cultivos requirió la preparación de caldos descrita en el punto 3.3 y la esterilización del área para trabajo del punto 3.4.

En seis vasos de precipitado de diferentes volúmenes se colocaron 50 ml de medio de cultivo A1 y en otros tres vasos de precipitado (marca Pyrex de diferentes volúmenes) se colocaron 50 ml de medio de cultivo LB.

Tres de los vasos con medio A1 se etiquetaron con las leyendas M1, M2 y M3, los otros tres con las leyendas S1, S2 y S3; los vasos que contenían medio LB se etiquetaron como E1, E2 y E3. Posteriormente, se midió el pH de la solución con un potenciómetro contenida en cada vaso y se anotó. Entre cada medición, la sonda del potenciómetro se sumergió en alcohol absoluto anhidro para asegurar que no se contaminaran los caldos de cultivo.

En los vasos etiquetados con las leyendas M1, M2 y M3 se inoculó *Micromonospora spp.*, en los marcados con S1, S2 y S3 se inoculó *Streptomyces spp.*, y en los marcados con E1, E2 y E3 se inoculó *Escherichia coli*. Estos vasos fueron cubiertos con papel parafina y se colocaron en incubadora a 37°C. Cada 15 minutos por una hora, las muestras se removieron de la incubadora y se transportaron a la campana de cultivo celular donde se midió el pH del caldo inoculado y el valor fue anotado.

La sonda del potenciómetro se esterilizó sumergiéndola en alcohol absoluto anhidro. El alcohol restante en la sonda se secó con papel absorbente expuesto previamente a luz ultravioleta por 15 minutos.



Fig. 3.7. 1 Procedimiento de medición de pH en medios de cultivo. A) Etiquetado, B) Medición del volumen de cultivo a medir, C) Trasvasado, D) Medición de pH, E) Limpieza de sonda, F) Nueva medición de pH

3.8 Técnicas de caracterización de nanofibras electrohiladas

Ya que las fibras se fabrican con polímeros, generalmente, las primeras siguen las técnicas de caracterización de éstos con base en, el análisis de su morfología (por Microscopía Electrónica de Barrido o *SEM*), los grupos funcionales que permitan determinar cambios en la estructura química (por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier o *FTIR*), su estabilidad térmica (por

Análisis Termogravimétrico o *TGA*) y sus temperaturas de transición vítrea, fusión y descomposición, entre otras características (por Calorimetría Diferencial de Barrido o *DSC*).

3.8.1 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La Microscopía Electrónica de Barrido o *SEM*, es un tipo de microscopía que emplea un rayo de electrones en lugar de luz para formar una imagen, esto permite que muestras de tamaños muy pequeños o cavidades muy reducidas puedan observarse con gran nitidez con grandes niveles de magnificación. Para que una muestra se analice, esta se coloca en un espacio sellado al vacío y cuando los electrones impactan la muestra, electrones reflejados y rayos X son captados por sensores que permiten reconstruir la imagen (Purdue University, 2014).

De los trozos de papel aluminio recubierto, se cortaron segmentos cuadrados de aproximadamente 1 cm x 1 cm de diferentes lugares para su análisis. Estos segmentos se fijaron a colectores con cinta adhesiva metálica y se analizaron en un microscopio electrónico de barrido.

Posteriormente, las imágenes obtenidas del microscopio electrónico se analizaron con software (Image J), con el fin de medir los diámetros de las fibras. De las imágenes con mayor aumento, se tomaron 30 mediciones y estas se promediaron para obtener el diámetro promedio de las fibras.

3.8.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Cada material tiene una composición química diferente. Cuando estos materiales se tratan con luz infrarroja, la energía que absorben las moléculas permite que ocurran movimientos en las moléculas si ésta energía se irradia a una frecuencia que coincide con la frecuencia de oscilación de los enlaces químicos. Puesto que los materiales tienen una frecuencia de oscilación característica, es posible determinar qué grupos funcionales se encuentran en la muestra analizada. Esta interacción entre el material y la luz, puede ser detectada y representada en una gráfica denominada "espectro infrarrojo de la muestra". (McMurry, 2008).

De las muestras electrohiladas, se tomó un pequeño trozo (alrededor de 0.5 cm x 0.5 cm) y se colocó sobre el lente del espectrofotómetro, después fue presionada contra el lente usando el tornillo de ajuste del equipo a un mismo nivel que se usó para todas las muestras. El análisis se realizó desde los 4000 cm⁻¹ a los 400 cm⁻¹.

3.8.3 Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido(DSC)

El análisis termogravimétrico o *TGA*, es una técnica que mide los cambios de masa en una muestra cuando ésta se calienta o enfría ante diferentes tipos de atmósfera (generalmente de nitrógeno u oxígeno). Un termograma típico muestra la disminución de masa por la pérdida de componentes volátiles de la muestra (humedad, solventes o monómeros), descomposición de polímeros, combustión, y residuos (como ceniza u otras fibras). Así, con esta técnica se puede estudiar la descomposición de un material para establecer conclusiones acerca de cada componente en la muestra (Hammer et al., 2008b).

La aparición de múltiples etapas de descomposición indica la presencia de diversos compuestos en la muestra, esto puede llegar a confirmase mediante el uso de la técnica *DSC*.

La calorimetría diferencial de barrido o *DSC*, es otra técnica de análisis térmico que permite medir la cantidad de flujo de calor en una muestra en función de la temperatura o del tiempo. Los cambios en el flujo de calor, indican transiciones físicas y reacciones químicas que pueden medirse. Una de las transiciones más observadas, es la temperatura de transición vítrea (T_g).

La temperatura de transición vítrea, es un fenómeno de transición reversible que ocurre en polímeros de estructura amorfa, característica de cada material y define el comportamiento del mismo. Por debajo de esa temperatura, el material se comporta de manera rígida; por arriba de ella se vuelve maleable, lo que permite deformarlo. De esta manera, se puede determinar si el material es apropiado para las aplicaciones en las que planea usarse (Hammer et al., 2008a).

Durante el análisis de un termograma de un *DSC*, la aparición de múltiples transiciones indica que la muestra está compuesta de distintos materiales

Cada uno de los análisis se llevó a cabo en equipos diferentes. El análisis termogravimétrico se realizó desde temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) hasta los 700°C, usando una rampa de calentamiento de 10°C/min en una atmósfera de nitrógeno. La calorimetría diferencial de barrido se llevó a cabo desde temperatura ambiente hasta los 300°C, usando una rampa de calentamiento de 10°C/ min en atmósfera de nitrógeno. Ambos análisis utilizaron una charola de alúmina para contener la muestra.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

4.1 Resultados

4.1.1 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

En la figura 4.1.1.1 se pueden apreciar las fibras electrohiladas de PAA. Las fibras tienen una apariencia uniforme y definida (véase sección 2.5)



Fig. 4.1.1. 1 Fibras electrohiladas de PAA a 1,000x

El acercamiento que se muestra en la figura 4.1.1.2 puede observarse que las fibras tienen, en promedio, diámetros grandes, aunque en algunas secciones se puede apreciar una gran variación en los diámetros de las fibras.



Fig. 4.1.1. 2 Fibras electrohiladas de PAA a 9,000x

Las fibras de PAA/CS también muestran una gran uniformidad, aunque también se pueden notar en la figura 4.1.1.3 rastros de fibras muy pequeñas.



Fig. 4.1.1. 3 Fibras de PAA/CS a 5,000

Sin embargo, en otras secciones se pueden notar fibras rotas, las cuales pudieron ser causadas por la degradación de la muestra o por problemas durante la fabricación, como puede observarse en la figura 4.1.1.4



Fig. 4.1.1. 4 Fibras de PAA/CS a 5,000x

Aún con los ligeros defectos que presenta la muestra, en la figura 4.1.1.5 pueden observarse que las fibras se mantienen aisladas unas de otras, lo cual es ideal en la fabricación de fibras por electrohilado.



Fig. 4.1.1. 5 Fibras de PAA/CS a 25,000x

En la figura 4.1.1.6 se muestran las fibras de PAA/ALG. Se logran observar fibras con muy similares en su mayoría, aunque también se pueden ver fibras que han empezado a fundirse entre sí, como la fibra que se bifurca, a la derecha de la imagen.



Fig. 4.1.1. 6 Fibras de PAA/ALG a 5,000x

Sin embargo, la fusión de las fibras solo es apreciable en ciertas áreas, pues en el resto de la imagen en la figura 4.1.17 se ven fibras separadas unas de otras.



Fig. 4.1.1. 7 Fibras de PAA/ALG a 10,000x

En la tabla 4.1.1.1 se muestran los diámetros promedio y el porcentaje de porosidad medidos con el software Image J.

Muestra	Diámetro promedio	Porcentaje de porosidad
PAA	495.03 nm ± 125.41	45.77%
PAA/CS	337.86 nm ± 61.62	44.76%
PAA/ALG	$278.52 \text{ nm} \pm 64.33$	42.38%

Tabla 4.1.1. 1 Diámetros promedio y porcentaje de porosidad medido

4.1.2 Espectrofotometría infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis por FTIR no muestra cambios significativos al combinar el PAA con el CS, tal como se ve en la figura 4.1.2.1.

El espectro en color azul corresponde al PAA, en morado al CS y en rojo al PAA/CS; el último espectro no muestra diferencias apreciables respecto del azul.



Fig. 4.1.2. 1 Espectro infrarrojo de PAA, CS y PAA/CS

Sin embargo, se debe destacar que la región entre los 1800 cm⁻¹ – 1500 cm⁻¹, cuyo pico máximo se da alrededor de los 1700 cm⁻¹ corresponde a la presencia de ácidos carboxílicos (1780 – 1710 cm⁻¹) y del grupo amida (1690 – 1630 cm⁻¹).

El espectro infrarrojo del PAA combinado con el ALG tampoco muestra diferencias muy pronunciadas, tal como puede verse en la figura 4.1.2.2.



Fig. 4.1.2. 2 Espectro infrarrojo de PAA, ALG y PAA/ALG

El espectro color azul corresponde al PAA, el morado a ALG y el rojo a PAA/ALG. En el espectro de PAA/ALG, el cambio más apreciable también se da en el pico cercano a los 1700 cm⁻¹; ya que, en este caso, la intensidad del pico se reduce y se ve más ancho respecto al espectro del PAA.

4.1.3 Ensayo de adsorción bacteriana



En la figura 4.1.3.1 se muestran los promedios de absorbancia del cultivo de *Micromonospora spp*.

Absorbancia promedio Micromonospora spp.

Fig. 4.1.3. 1 Absorbancia promedio de Micromonospora spp.

Las columnas etiquetadas como "PAA" indican los caldos expuestos a papel aluminio recubierto con PAA, y lo mismo para las etiquetadas como "PAA/CS" y "PAA/Alginato".

Como se observa en la figura 4.1.3.3, la bacteria *Micromonospora spp.*, redujo su absorbancia ante todos los recubrimientos, en especial en las fibras de PAA/CS.

Para el cálculo del porcentaje de adsorción, se utilizó la ecuación (13):

$$\%Adsorción = \frac{Abs_{Medida} - Abs_{Control}}{Abs_{Control}} * 100$$
⁽¹³⁾

Donde Abs_{Medida} representa la absorbancia promedio de las cepas y Abs_{Control} representa la absorbancia promedio del control. Si el porcentaje resulta un valor negativo, podría indicar fijación de la bacteria en la fibra, un valor positivo podría representar la reproducción de la bacteria.



Porcentaje de adsorción promedio Micromonospora spp.

Fig. 4.1.3. 2 Porcentaje de adsorción promedio de Micromonospora spp.

En comparación con el control, el porcentaje de adsorción de *Micromonospora spp*., es decir, de la reducción en la concentración de la solución es del 55.844%, de acuerdo a la ecuación (7).



Absorbancia promedio Streptomyces spp

Fig. 4.1.3. 3 Absorbancia promedio de Streptomyces spp.

En el caso de la bacteria *Streptomyces spp.*, no hubo adsorción significativa en los polímeros utilizados.



Porcentaje de adsorción promedio Streptomyces spp.

Fig. 4.1.3. 4 Porcentaje de adsorción promedio de Streptomyces spp.

Lo que es observable es un incremento en la concentración de la bacteria en las fibras de PAA del 9.877% y de PAA/Alginato de 39.506%.





Fig. 4.1.3. 5 Absorbancia promedio de Escherichia coli

La bacteria *Escherichia coli* redujo su concentración en todas las fibras, en especial en las fibras de PAA con 87.407% y PAA/Alginato con 65%.



Porcentaje de adsorción promedio Escherichia coli.

Fig. 4.1.3. 6 Porcentaje de adsorción promedio de Escherichia coli

4.1.4 Medición de pH en cultivos bacterianos

Las mediciones de pH en los cultivos mostraron una ligera tendencia a la acidificación de los medios de cultivo en las tres bacterias. El pH del medio LB previo al cultivo es alrededor de 7, el del medio A1 es alrededor de 6.3.



Fig. 4.1.4. 1 Valores de pH en cultivos





En el termograma podemos apreciar el comportamiento térmico de los polímeros ante la temperatura. En el eje de las abscisas tenemos a la temperatura y en el eje de las ordenadas al peso.

Se considera generalmente que entre 5% y 10% de pérdida se debe a evaporación de humedad contenida en la muestra. Como se aprecia, la pérdida de peso ocurre a una temperatura más baja en la muestra de PAA/ALG que en las otras muestras, pues a los 41.33°C ha perdido el 5% de masa y a los 120.92°C el 10%.

En todas las muestras se observa una descomposición en pasos, pues se muestran escalones a lo largo de la curva del termograma, la cual puede relacionarse al rompimiento de enlaces en los polímeros. Este fenómeno ocurre primero en la muestra de PAA a los 289.94°C, a los 296.65°C en PAA/ALG y a los 329.09°C.

Por dificultades técnicas, la muestra de PAA no pudo analizarse por encima de los 400°C, pero la muestra ha perdido cerca del 50% de masa a los 398.55°C, en el PAA/CS ocurre a los 412.87°C y en el PAA/ALG a los 418.91°C. Finalmente a los 699.57°C, la muestra de PAA/CS ha perdido el 98.42% de su masa, en cambio la muestra de PAA/ALG ha perdido el 88.13%, con lo cual muestra

qué, a pesar de perder masa rápidamente al principio es ligeramente más estable ante la temperatura.

Muestra	5% de pérdida	10% de pérdida	50% de pérdida	Ultima temperatura registrada
PAA	128.09°C	221.83°C	-	398.55°C
PAA/CS	125.3°C	235.26°C	412.87°C	699.57°C
PAA/ALG	41.33°C	120.92°C	418.91°C	699.61°C

 Tabla 4.1.5. 1 Resumen de temperaturas observadas en TGA

4.1.6 Calorimetría Diferencial de Barrido



La figura 4.1.6.1 muestra la comparación de los *DSC* realizadas a las muestras. El PAA, muestra una temperatura de transición vítrea a los 58.58°C, con una ligera etapa de deshidratación que inicia a los 120.74°C, alcanzando un máximo a los 138°C. En el caso del PAA/CS y PAA/ALG, el termograma muestra un fenómeno de desorción (evaporación de solventes contenidos) con un pico máximo a los 65.64°C (en PAA/CS) y 70.50°C (en PAA/ALG). El PAA/CS muestra dos temperaturas de transición vítrea, una a los 133.16°C la cual se atribuye a al PAA y otra a 167.39°C atribuida al CS contenido en la muestra; el PAA/ALG también muestra dos transiciones vítreas a

134.47°C relacionada al PAA y 209.9°C relacionada al ALG. Finalmente, ambas muestras muestran un pico endotérmico a los 216.45°C (PAA/CS) y a los 241.92°C (PAA/ALG).

Muestra	Temperatura de transición vítrea PAA	Temperatura de transición vítrea CS	Temperatura de transición vítrea ALG	
PAA	58.58°C	-	-	
PAA/CS	133.16°C	167.39°C	-	
PAA/ALG	134.47°C	-	209.9°C	

Tabla 4.1.6. 1 Temperaturas de transición vítrea observadas en DSC

4.2 Discusión de resultados

Un resumen de las características presentadas por las fibras se muestra en la tabla 4.2.1. El espectro infrarrojo del PAA mostrado en las figuras 4.1.2.1 y 4.1.2.2 muestra características similares a las reportadas por otros autores (Ghorbaniazar et al., 2015; Neira, Tarraga, & Catalan, 2007), con lo que podemos confirmar que el electrohilado no modifica la composición química del polímero.

Sin embargo, el espectro de CS y PAA/CS de la figura 4.1.2.1 no tienen similitud alguna con otro espectro reportado con anterioridad que relaciona la misma combinación de polímeros (Guo, Liu, Hong, & Li, 2010). Los picos más importantes en la identificación del CS corresponden al grupo amida (en 1665 cm⁻¹, 1620 cm⁻¹ y 1325 cm⁻¹ aproximadamente) y tales picos no se logran visualizar en el espectro. Ya que la relación de los polímeros es 3:1, es posible que el espectro del PAA se traslape sobre el espectro del CS.

En el caso del espectro de ALG también coincide con otro reportado (Ji Zhang, Shengjun Xu, Zhaoli Du, & Ke Ren, 2011), aunque en el caso del PAA/ALG parece suceder lo mismo que en el PAA/CS, pues el espectro no coincide con uno reportado previamente (Mohamed, Mahmoud, & Taleb, 2013). Un pequeño pico característico a los 840 cm⁻¹ indica el enlace del oxígeno con el sodio y logra visualizarse en el espectro de ALG, pero no en el de PAA/ALG. Otra característica que se debe resaltar es que, en ese espectro, el pico de 1700 cm⁻¹ reduce su intensidad y se vuelve más ancho respecto al espectro del PAA.



Tabla 4.2. 1 Características presentadas por las fibras

En lo que se refiere a los análisis térmicos, el PAA muestra en su termograma un patrón de comportamiento ligeramente diferente a otro reportado con anterioridad (Moharram & Allam, 2007); el TGA del PAA muestra una pérdida de masa en fases mientras que el reportado no.

También puede notarse un desgaste más rápido de la muestra ya que la masa se pierde a temperaturas menores. El DSC muestra características similares indicando un pico endotérmico a los 58°C y una transición vítrea cercana a los 55°C, temperaturas similares con un pico endotérmico a 59.15°C y una transición vítrea a los 58.58°C.

El TGA de la muestra PAA/CS muestra ligero cambios respecto a la muestra de PAA, exhibiendo una ligera mejoría en la pérdida de masa, notoria al 10% y al 50%. El DSC es muy similar a uno reportado con anterioridad (Jeung & Mishra, 2010), aunque el primer pico endotérmico de la muestra aparece aproximadamente 30°C antes que el reportado y el segundo pico endotérmico aparece a una temperatura cercana a los 245°C, muy cercana a la obtenida en los experimentos realizados (241.92°C).

Finalmente, la muestra de PAA/ALG también presenta cambios en su TGA respecto a la muestra de PAA y PAA/CS, mostrando un rápido desgaste de la muestra al 5% y 10%. Cuando alcanza una temperatura cercana a los 300°C, se nota una caída de masa menos prominente y mostrando una mayor cantidad de masa residual a los 700°C, respecto al PAA/CS. Esta formulación difiere mucho en el comportamiento respecto a otro termograma de la misma composición (Khalid, Ahmad, Usman Minhas, Barkat, & Sohail, 2016). Por otra parte, el DSC muestra algunas características similares a otro termograma (Bekin, Sarmad, Gürkan, Keçeli, & Gürdağ, 2014), ya que los picos endotérmicos a los 65.64°C y 216.45°C aparecen en el mismo rango de temperaturas (60° C - 80° C y 207°C – 219°C).

La adsorción de bacterias se atribuye a varios factores, como ya se expuso en la figura 2.4.3.1. Sin embargo, la adhesión de éstas parece seguir a pesar de las dificultades que se presentan en la etapa reversible. Por ejemplo, una evaluación teórica sobre las cargas de los grupos funcionales de los polímeros ante el pH de los medios de cultivo, puede visualizarse en la tabla 4.2.2.

Polímero	pKa	<i>Micromonospora</i> <i>spp.</i> pH = 6.3	<i>Streptomyces</i> <i>spp.</i> pH = 6.3	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> pH= 7
PAA	4.5	-1	-1	-1
PAA/CS	4.5/6.2-6.5	<-1	<-1	-1
PAA/ALG	4.5/3.38/3.65	-3	-3	-3

Tabla 4.2. 2 Evaluación de las cargas de los polímeros ante el pH

En rojo se marca la combinación en la que se observó una baja en la concentración de la bacteria y en azul donde hubo un aumento.

Como ya se ha mencionado, en las bacterias gram positivas, la carga superficial se considera modulada por la presencia de las D-Alaninas y en las gram negativas se considera una carga superficial negativa por la presencia de grupos fosfato. Sin embargo, los efectos de la carga electrostática varían en la fijación sobre el recubrimiento de bacteria a bacteria.

La adsorción de *Micromonospora spp.*, fue mayor en la combinación PAA/CS; en segundo lugar, en PAA/ALG y finalmente en PAA. Si la carga del polímero hubiese sido un factor, observaríamos una mayor fijación en PAA/CS, seguida de PAA y finalmente en PAA/ALG, pero no fue así. La bacteria presentó adsorción en todos los polímeros, es decir, la bacteria es afín al PAA, y esta afinidad incrementa con el ALG, pero el CS tiene mejor afinidad que el ALG. Esto significa que la combinación de fibras PAA/CS puede ser utilizada para el transporte de esta cepa, electrohilándola o fijándola sobre el sustrato podría mejorarse su viabilidad. También podría utilizarse para aumentar su reproducción, ya que es una bacteria de alto interés en la industria farmacéutica.

En el caso de *Streptomyces spp.*, la bacteria incrementó su concentración ante las fibras PAA y PAA/ALG y presentó una ligera baja en su concentración ante PAA/CS. Podría atribuirse que la adsorción y posterior reproducción de la bacteria fue influenciada por la carga del polímero. Si se considera una mayor presencia de D-Alaninas en la membrana de la bacteria, eso incrementaría la carga positiva de la bacteria, la cual se vería más atraída a superficies con cargas negativas que coincide con el orden de adsorción, primero en PAA/ALG, después en PAA y finalmente en PAA/CS. La alta afinidad de la bacteria por la combinación PAA/ALG indica que puede usarse

para mejorar su reproducción en biorreactores, pues también es de alto interés en la industria farmacéutica.

El comportamiento que tuvo *Escherichia coli* fue inverso al observado en *Micromonospora spp.* y *Streptomyces spp.* La carga del polímero no fue un obstáculo para que *Escherichia coli* se pudiese fijar en las fibras, pues presentó afinidad en todas. La mayor adsorción se presentó en las fibras de PAA, seguida de las fibras de PAA/ALG y finalmente en PAA/CS, lo que indica que la presencia de ALG y CS mermaron la afinidad de la bacteria por el sustrato. También es posible que ante el PAA la formación de puentes de hidrógeno fuese más fácil que al encontrar otros polímeros involucrados que pudiesen interferir en la formación de éstos.

4.3 Conclusiones

Se evaluó la adsorción bacteriana en tres biopolímeros electrohilados. Se observó que la adsorción bacteriana no se limita a una sola vía para lograr la adhesión; los efectos de las cargas electrostáticas, por ejemplo, no fueron un impedimento para que las bacterias lograran adsorberse a las fibras. Esto nos lleva a la consideración más importante en cuanto a la adsorción de las bacterias por una superficie; esto es, que las bacterias se unirán de cualquier manera.

Aunque *Micromonospora spp.* y *Streptomyces spp.*, tienen relativamente la misma composición en su membrana bacteriana, los polímeros ofrecen condiciones más favorables para adsorber *Streptomyces spp.*, que *Micromonospora spp.*, pues permiten un aumento en la concentración de la primera en comparación con la segunda. Esto también se observó con *Escherichia coli*, la cual en presencia de fibras hechas de combinaciones de polímeros presenta adsorción reducida. Hasta el momento, la única diferencia apreciable se puede notar al comparar los espectros de PAA, PAA/CS y PAA/ALG.

Es posible que el ligero cambio del pico presente en 1707 cm⁻¹ del PAA/CS a 1697 cm⁻¹ del PAA/ALG afecte la adsorción de *Streptomyces spp.*, pues, aunque en PAA/CS el pico se presenta más intenso, no afecta de manera positiva la fijación de la bacteria sobre la fibra.

La presencia de CS y ALG mejoraron la estabilidad térmica del PAA, aunque puede discutirse tal punto. Cerca de la temperatura ambiente, las fibras de PAA/ALG pierden una gran cantidad de masa, en comparación con las otras fibras. Sin embargo, si esta combinación de polímeros fuese a utilizarse a una aplicación a una temperatura más alta, es posible que pueda usarse sin problemas y aunque esta combinación tiene un gran impacto en la reproducción de *Streptomyces spp.*, que como ha sido mencionado, es de gran interés en la industria biotecnológica, dado el comportamiento térmico de la combinación, puede ser difícil su implementación en la industria. Es posible que el uso de PAA/CS también favorezca la reproducción de *Streptomyces spp.*, aunque puede ser un poco más lento.

REFERENCIAS

- Abrigo, M., McArthur, S. L., & Kingshott, P. (2014). Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: Advances, challenges, and future prospects. *Macromolecular Bioscience*, 14(6), 772–792. http://doi.org/10.1002/mabi.201300561
- Atabek, A., & Camesano, T. a. (2007). Atomic force microscopy study of the effect of lipopolysaccharides and extracellular polymers on adhesion of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8503–9. http://doi.org/10.1128/JB.00769-07
- Aviss, K. J., Gough, J. E., & Downes, S. (2010). Aligned electrospun polymer fibres for skeletal muscle regeneration. *European Cells and Materials*, 19, 193–204. http://doi.org/vol019a19 [pii]
- BBC. (2016). Clima anual de Tijuana. http://www.bbc.com/weather/6299875
- Bekin, S., Sarmad, S., Gürkan, K., Keçeli, G., & Gürdağ, G. (2014). Synthesis, characterization and bending behavior of electroresponsive sodium alginate/poly(acrylic acid) interpenetrating network films under an electric field stimulus. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 878–892. http://doi.org/10.1016/j.snb.2014.06.051
- Bini, T. B., Gao, S., Tan, T. C., Wang, S., Lim, A., Hai, L. Ben, & Ramakrishna, S. (2004).
 Electrospun poly(L-lactide- co -glycolide) biodegradable polymer nanofibre tubes for peripheral nerve regeneration. *Nanotechnology*, 15(11), 1459–1464. http://doi.org/10.1088/0957-4484/15/11/014
- Brown, S., Santa Maria, J. P., & Walker, S. (2013). Wall Teichoic Acids of Gram-Positive

Bacteria. Annual Review of Microbiology, 67(1), 313–336. http://doi.org/10.1146/annurevmicro-092412-155620

- Characklis, W. G., & Marshall, K. C. (1990). *Biofilms, Volume 1*. (W. G. Characklis & K. C. Marshall, Eds.) (Illustrate). California: Wiley.
- Chen, P., Wu, Q.-S., Ding, Y.-P., Chu, M., Huang, Z.-M., & Hu, W. (2010). A controlled release system of titanocene dichloride by electrospun fiber and its antitumor activity in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76(3), 413–420. http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.09.005
- Christie, W. (2014). Lipid A and Bacterial Lipopolysaccharides. http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39339
- Clark, J., & Gamini, G. (2016). The Beer Lambert Law. http://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/Electron ic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/The_Beer-Lambert_Law
- Dalmoro, A., Barba, A. A., Lamberti, G., Grassi, M., & D'Amore, M. (2012). Pharmaceutical applications of biocompatible polymer blends containing sodium alginate. *Advances in Polymer Technology*, 31(3), 219–230. http://doi.org/10.1002/adv.21276
- Damasceno, R., Roggia, I., Pereira, C., & de Sá, E. (2013). Rhizobia survival in seeds coated with polyvinyl alcohol (PVA) electrospun nanofibres. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(11), 716–719. http://doi.org/10.1139/cjm-2013-0508
- de Alvarenga, E. S. (2011). Characterization and Properties of Chitosan. In *Biotechnology of Biopolymers* (pp. 91–108). InTech. http://doi.org/10.5772/17020
- Fang, J., Wang, X., & Lin, T. (2011). Functional Applications of Electrospun Nanofibers. Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications, 287–326. http://doi.org/10.5772/916
- Fletcher, M. (1977). The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian Journal of Microbiology*, 23(1), 1–6. http://doi.org/10.1139/m77-001
- Fujihara, K., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2005). Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials*, 26(19), 4139– 4147. http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.014
- Gallik, S. (2011). Transmittance and Absorbance. http://cellbiologyolm.stevegallik.org/node/7

- Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049–1056. http://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001
- Ghorbaniazar, P., Sepehrianazar, A., Eskandani, M., Nabi-Meibodi, M., Kouhsoltani, M., & Hamishehkar, H. (2015). Preparation of Poly Acrylic Acid-Poly Acrylamide Composite Nanogels by Radiation Technique. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(2), 269–275. http://doi.org/10.15171/apb.2015.037
- Guo, L., Liu, G., Hong, R. Y., & Li, H. Z. (2010). Preparation and characterization of chitosan poly(acrylic acid) magnetic microspheres. *Marine Drugs*, 8(7), 2212–2222. http://doi.org/10.3390/md8072212
- Hammer, A., Fedelich, N., Giani, S., Elke, H., Jing, N., Nijman, M., ... Schubnell, M. (2008a). 2.3 Differential Scanning Calorimetry. In *Thermal Analysis of Polymers*. *Selected Applications* (pp. 10–11).
- Hammer, A., Fedelich, N., Giani, S., Elke, H., Jing, N., Nijman, M., ... Schubnell, M. (2008b).
 3.2 Thermogravimetric analysis (TGA). In *Thermal Analysis of Polymers. Selected Applications* (p. 15).
- Hay, I. D., Rehman, Z. U., Moradali, M. F., Wang, Y., & Rehm, B. H. A. (2013). Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology*, 6(6), n/an/a. http://doi.org/10.1111/1751-7915.12076
- Hori, K., & Matsumoto, S. (2010). Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3), 424–434. http://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.014
- Jeung, S., & Mishra, M. K. (2010). Hot Melt Reactive Extrusion of Chitosan with Poly(acrylic acid). *International Journal of Polymeric Materials*, 60(1), 102–113. http://doi.org/10.1080/00914037.2010.532524
- Ji Zhang, Shengjun Xu, Zhaoli Du, & Ke Ren. (2011). Preparation and Characterization of Montmorillonnite/Tamarind Gum/ Sodium Alginate Composite Gel Beads. *Journal of Composite Materials*, 45(3), 295–305. http://doi.org/10.1177/0021998309339632
- Kaplan, D. L. (2013). Biopolymers from Renewable Resources. (D. L. Kaplan, Ed.)Biopolymers from Renewable Resources. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-662-03680-8
- Khalid, I., Ahmad, M., Usman Minhas, M., Barkat, K., & Sohail, M. (2016). Cross-Linked Sodium Alginate-g-poly(Acrylic Acid) Structure: A Potential Hydrogel Network for Controlled

Delivery of Loxoprofen Sodium. *Advances in Polymer Technology*, 0(0), 1–11. http://doi.org/10.1002/adv.21747

- Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1–2), 9–27. http://doi.org/S0168-1605(98)00060-9 [pii]
- Leach, M. K., Feng, Z., Tuck, S. J., & Corey, J. M. (2011). Electrospinning Fundamentals: Optimizing Solution and Apparatus Parameters. *Journal of Visualized Experiments*, (47), 2– 5. http://doi.org/10.3791/2494
- Lembre, P., Lorentz, C., & Martino, P. Di. (2012). Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World. *The Complex World of Polysaccharides*, 371–392. http://doi.org/10.5772/51213
- Li, Z., & Wang, C. (2013). Effects of Working Parameters on Electrospinning. One-Dimensional Nanostructures, 15–29. http://doi.org/10.1007/978-3-642-36427-3
- Liang, D., Hsiao, B. S., & Chu, B. (2007). Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(14), 1392–1412. http://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.021
- Liu, W., Wei, J., Huo, P., Lu, Y., Chen, Y., & Wei, Y. (2013). Controlled release of brefeldin A from electrospun PEG–PLLA nanofibers and their in vitro antitumor activity against HepG2 cells. *Materials Science and Engineering: C*, 33(5), 2513–2518. http://doi.org/10.1016/j.msec.2013.02.013
- Liu, Y., Rafailovich, M. H., Malal, R., Cohn, D., & Chidambaram, D. (2009). Engineering of biohybrid materials by electrospinning polymer-microbe fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), 14201–14206. http://doi.org/10.1073/pnas.0903238106
- Liu, Y., Yang, S. F., Li, Y., Xu, H., Qin, L., & Tay, J. H. (2004). The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *Journal of Biotechnology*, *110*(3), 251–256. http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.02.012.
- López-Rubio, A., Sanchez, E., Sanz, Y., & Lagaron, J. M. (2009). Encapsulation of living bifidobacteria in ultrathin PVOH electrospun fibers. *Biomacromolecules*, 10(10), 2823–2829. http://doi.org/10.1021/bm900660b
- Luo, Y., Nartker, S., Wiederoder, M., Miller, H., Hochhalter, D., Drzal, L. T., & Alocilja, E. C. (2011). Novel Biosensor based on Electrospun Nanofiber and Magnetic Nanoparticles for the

Detection of E . coli O157: H7. *IEEE Transactions on Nanotechnology*, *PP*(99), 1–6. http://doi.org/10.1109/TNANO.2011.2174801

- McMurry, J. (2008). Determinación de la estructura: espectrometría de masas y espectroscopia de infrarrojo. In *Química Orgánica* (pp. 418–422). CENGAGE Learning.
- Mergel, M. (2010). Polyacrylic Acid. Recuperado el 28 de Marzo del 2016, de http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/Polyacrylic+Acid
- Mohamed, S. F., Mahmoud, G. A., & Taleb, M. F. A. (2013). Synthesis and characterization of poly(acrylic acid)-g-sodium alginate hydrogel initiated by gamma irradiation for controlled release of chlortetracycline HCl. *Monatshefte Fur Chemie*, 144(2), 129–137. http://doi.org/10.1007/s00706-012-0776-7
- Moharram, M. A., & Allam, M. A. (2007). Study of the interaction of poly(acrylic acid) and poly(acrylic acid-poly acrylamide) complex with bone powders and hydroxyapatite by using TGA and DSC. *Journal of Applied Polymer Science*, 105(6), 3220–3227. http://doi.org/10.1002/app.26267
- Moriarty, T. F., Poulsson, A. H. C., Rochford, E. T. J., & Richards, R. G. (2011). Bacterial Adhesion and Biomaterial Surfaces. In *Comprehensive Biomaterials* (Vol. 4, pp. 75–100). Elsevier. http://doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00007-6
- NationalTsingHuaUniversity.(2000).Beer-LambertLaw.http://life.nthu.edu.tw/~labcjw/BioPhyChem/Spectroscopy/beerslaw.htm
- Neira, A., Tarraga, M., & Catalan, R. (2007). DEGRADATION OF POLYACRYLIC ACID BY FENTON'S REAGENT. Journal of the Chilean Chemical Society, 52(4). http://doi.org/10.4067/S0717-97072007000400010
- Ortolano, G., Canonica, F., McAlister, M., Howard, G., Cervia, J., Bononi, I., ... Tognon, M. (2009). Bacterial Lipopolysaccharide Retention by a Positively Charged Filter. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1219–1219. http://doi.org/10.1128/AEM.02517-08
- Purdue University. (2014). Scanning Electron Microscope. https://www.purdue.edu/ehps/rem/rs/sem.htm
- Rao, M. G., Bharathi, P., & Akila, R. M. (2014). A Comprehensive Review on Biopolymers, 4(2), 61–68.
- Reichmann, N. T., Cassona, C. P., & Grundling, A. (2013). Revised mechanism of D-alanine incorporation into cell wall polymers in Gram-positive bacteria. *Microbiology*, *159*(Pt_9),

1868–1877. http://doi.org/10.1099/mic.0.069898-0

- Reyes, R. E., Romo González, C., Coria Jiménez, R., Ortiz Herrera, M., & Aquino Andrade, A. (2012). Mechanisms of O-Antigen Structural Variation of Bacterial Lipopolysaccharide (LPS). In *The Complex World of Polysaccharides* (pp. 71–98). InTech. http://doi.org/10.5772/48147
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632. http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001
- Salalha, W., Kuhn, J., Dror, Y., & Zussman, E. (2006). Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibres. *Nanotechnology*, 17(18), 4675–4681. http://doi.org/10.1088/0957-4484/17/18/025
- Shiraishi, T., Yokota, S., Fukiya, S., & Yokota, A. (2016). Structural diversity and biological significance of lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria: focusing on beneficial probiotic lactic acid bacteria. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 35(4), 147–161. http://doi.org/10.12938/bmfh.2016-006
- Shivesh, S. (2009). Biofilms: Bacteria's Elixer of Survival. Dartmouth Undergraduate Journal of Science, Fall 2009. http://dujs.dartmouth.edu/2009/11/biofilms-bacteria's-elixer-ofsurvival/#.WEC2yvnhCM9
- Sigma Aldrich. (2015a). Chitosan. Recuperado el 28 de Marzo del 2016 de http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448877?lang=es®ion=MX
- Sigma Aldrich. (2015b). Poly(acrylic acid). Recuperado el 28 de Marzo del 2016 de http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/523925?lang=es®ion=MX
- Teo, W.-E. (2015). Electrospun fibers in Biotechnology. Recuperado el 25 de Marzo del 2016 de http://electrospintech.com/espinbiotechnology.html#.VvXCeOLhCM-
- Theis, T., Parr, D., Binks, P., Ying, J., Drexler, K. E., Schepers, E., ... Ferrari, M. (2006). nan'o·tech·nol'o·gy n. *Nature Nanotechnology*, *1*(1), 8–10. http://doi.org/10.1038/nnano.2006.77
- Tillman, B. W., Yazdani, S. K., Lee, S. J., Geary, R. L., Atala, A., & Yoo, J. J. (2009). The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials*, 30(4), 583–588. http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.006
- Tong, H.-W., Mutlu, B. R., Wackett, L. P., & Aksan, A. (2013). Silica/PVA biocatalytic nanofibers. *Materials Letters*, *111*, 234–237. http://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.08.102

- Velasco, R. D., Álvarez, A. S., Villarreal, L. J., Paz, J. A., Iglesias, A. L., & Vera, R. (2016).
 Designing a Low Cost Electrospinning Device for Practical Learning in a Bioengineering Biomaterials Course. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 37(1), 27–36.
- Xu, X., Chen, X., Xu, X., Lu, T., Wang, X., Yang, L., & Jing, X. (2006). BCNU-loaded PEG– PLLA ultrafine fibers and their in vitro antitumor activity against Glioma C6 cells. *Journal* of Controlled Release, 114(3), 307–316. http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.05.031
- Zhou, F.-L., & Gong, R.-H. (2008). Manufacturing technologies of polymeric nanofibres and nanofibre yarns. *Polymer International*, *57*(6), 837–845. http://doi.org/10.1002/pi.2395