

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS E INGENIERIA



ANDAMIOS ELECTROHILADOS PARA CRECIMIENTO BACTERIANO

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

PRESENTA

ING. RODOLFO DANIEL VELASCO BARRAZA

DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS JESÚS VILLARREAL GÓMEZ

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 286

Tijuana, B. C., a 15 de Noviembre del 2019

C. Rodolfo Daniel Velasco Barraza
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

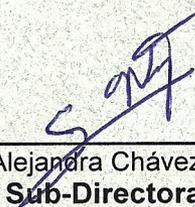
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

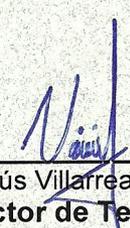
Es propuesto, por el C. Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez

Quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al
tema “Andamios Electrohilados para Crecimiento Bacteriano”

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- ANTECEDENTES
- III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
- IV.- JUSTIFICACION
- V.- OBJETIVO
- VI.- HIPÓTESIS
- VII.- FUNDAMENTO TEÓRICO
- VIII.- METODOLOGÍA
- IX.- RESULTADOS Y CONCLUSIONES
- X.- REFERENCIAS


Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy
Sub-Directora


Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez
Director de Tesis


Dr. José Luis González Vázquez
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Contenido

Lista de Figuras	3
Lista de tablas	4
ABREVIATURAS	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
RESUMEN.....	7
ANTECEDENTES	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	10
OBJETIVO	10
HIPÓTESIS	10
FUNDAMENTO TEÓRICO.....	10
2.1 Policaprolactona o PCL.....	11
2.2 Electrohilado.....	12
2.3 Mecanismo de adhesión bacteriana	16
2.3.1 La capa condicionante	17
2.3.2 Adhesión reversible	18
2.3.3 Adhesión irreversible.....	19
2.4 Morfología de las membranas celulares	20
2.4.1 Estructura de la membrana de E. coli	23
2.4.2 Estructura de la membrana de P. aeruginosa.....	24
2.4.3 Estructura de la membrana de S. aureus.....	25
2.5 Biofilmes	26
2.5.1 Biofilmes en la industria.....	27
2.5.2 Productos obtenidos a partir de biofilmes	27
METODOLOGÍA.....	29
3.1 Preparación de soluciones de PCL	29
3.2 Preparación de medio de cultivo, inoculación y ajuste	30
3.3 Electrohilado de PCL	30
3.4 Ensayo de proliferación bacteriana.....	31
3.5 Caracterización de fibras electrohiladas	32

3.5.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	33
3.5.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	33
3.5.3 Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) ...	33
3.5.4 Microscopía óptica	34
RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	35
4.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	35
4.2 Análisis termogravimétrico (TGA)	36
4.3 Calorimetría Diferencial de Barrido.....	38
4.4 Ensayo de proliferación bacteriana.....	40
4.5 Microscopía Óptica.....	44
4.6 Microscopía Electrónica de Barrido.....	54
4.7 Conclusiones.....	63
REFERENCIAS	65

Lista de Figuras

Fig. 2.3.1. 1 Compuestos comunes en la capa condicionante.....	17
Fig. 2.3.1. 2 Proceso de formación de la capa condicionante.....	18
Fig. 2.3.2. 1 Efectos del medio en el proceso de adhesión reversible	19
Fig. 2.3.3. 1 Mecanismo de adhesión bacteriana. Fases y características principales	20
Fig. 2.4. 1 Estructuras de los compuestos principales en LPS	21
Fig. 2.4. 2 Estructura general de las membranas en bacterias gram positivas	22
Fig. 2.4. 3 Estructura general de las bacterias gram negativas	22
Fig. 2.4.1. 1 Membrana de <i>E. coli</i>	23
Fig. 2.4.2. 1 Membrana de <i>P. aeruginosa</i>	24
Fig. 2.4.3. 1 Membrana de <i>S. aureus</i>	25
Fig. 2.5. 1 Proceso de formación de un biofilme	26
Fig. 3.4. 1 Distribución de fibras en placa de prueba	32
Fig. 3.4. 2 Distribución de cepas en la placa de control	32
Fig. 4.1. 1 Espectro infrarrojo de PCL y PCL con fuentes de carbono	35
Fig. 4.1. 2 Espectro infrarrojo de PCL y PCL con fuentes de nitrógeno	36
Fig. 4.2. 1 Análisis termogravimétrico de PCL y PCL con fuentes de carbono	37
Fig. 4.2. 2 Análisis termogravimétrico de PCL y PCL con fuentes de nitrógeno	37
Fig. 4.3. 1 Calorimetría Diferencial de Barrido de PCL y PCL con fuentes de carbono	39
Fig. 4.3. 2 Calorimetría Diferencial de Barrido de PCL y PCL con fuentes de nitrógeno.....	39
Fig. 4.4. 1 Ensayo de proliferación de <i>E. coli</i>	40

Fig. 4.4. 2	Ensayo de proliferación de <i>P. aeruginosa</i>	41
Fig. 4.4. 3	Ensayo de proliferación de <i>S. aureus</i>	42
Fig. 4.5. 1	Cultivo en microscopio a 40X en fibras - Hora 1	44
Fig. 4.5. 2	Cultivo en microscopio a 60X en fibras - Hora 1	45
Fig. 4.5. 3	Cultivo en microscopio a 10X en fibras - Hora 2	45
Fig. 4.5. 4	Cultivo en microscopio a 40X en fibras - Hora 2	46
Fig. 4.5. 5	Cambio de plano a 40X en fibras - Hora 2	47
Fig. 4.5. 6	Cultivo en microscopio a 60X en fibras - Hora 2	47
Fig. 4.5. 7	Cultivo en microscopio a 10X en fibras - Hora 3	48
Fig. 4.5. 8	Cultivo en microscopio a 40X en fibras - Hora 3	49
Fig. 4.5. 9	Segunda observación a 40X en fibras - Hora 3	49
Fig. 4.5. 10	Tercera observación a 40X en fibras - Hora 3	50
Fig. 4.5. 11	Cultivo en microscopio a 60X en fibras - Hora 3	50
Fig. 4.5. 12	Cultivo en microscopio a 10X en fibras - Hora 5	51
Fig. 4.5. 13	Cultivo en microscopio a 40X en fibras - Hora 5	52
Fig. 4.5. 14	Cultivo en microscopio a 60X en fibras - Hora 5	52
Fig. 4.5. 15	Cultivo en filtro verde a 60X en fibras - Hora 5	53
Fig. 4.6. 1	Fibras de PCL a 2,000X	54
Fig. 4.6. 2	Fibras de PCL a 4,000X	55
Fig. 4.6. 3	Fibras de PCL a 6,000X	55
Fig. 4.6. 4	Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 2,000X – 3 horas	56
Fig. 4.6. 5	Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 4,000X – 3 horas	57
Fig. 4.6. 6	Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 10,000X – 3 horas	57
Fig. 4.6. 7	Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 400X - 6 horas	58
Fig. 4.6. 8	Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 800X – 6 horas	59
Fig. 4.6. 9	Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 3,000X - 6 horas	59
Fig. 4.6. 10	Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 6,000X - 6 horas	60
Fig. 4.6. 11	Fibras de PCL en cultivo en caldo nutritivo a 2,000X - 3 horas	60
Fig. 4.6. 12	Fibras de PCL en cultivo en caldo nutritivo a 4,000X - 3 horas	61
Fig. 4.6. 13	Fibras de PCL en cultivo en caldo nutritivo a 10,000X - 3 horas	62
Fig. 4.6. 14	Fibras de PCL en cultivo en caldo nutritivo a 5,000X - 3 horas	62

Lista de tablas

Tabla 2.5.2. 1	Productos obtenidos a través de biofilmes	28
Tabla 3.3. 1	Características de electrohilado de PCL y sus variantes	31
Tabla 4.2. 1	Temperaturas características en el análisis termogravimétrico	38
Tabla 4.3. 1	Temperaturas características de la calorimetría diferencial de barrido	40
Tabla 4.4. 1	Valores de concentración bacteriana a las seis horas de incubación	43

ABREVIATURAS

ALG	Alginato
CS	Chitosán o Quitosano
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido (<i>Differential Scanning Calorimetry</i> en inglés)
EPS	Sustancias exopoliméricas (<i>Exopolymeric Substance</i> en inglés)
ECP	<i>Pili Común de E. coli</i> (<i>E. coli common pilus</i> en inglés)
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> en inglés)
Hap	Hidroxiapatita
Ka	Constante de acidez
KDO	Ácido (2-keto-deoxioctónico)
kV	Kilovoltio
LPS	Lipopolisacárido (<i>Lipopolysaccharide</i> en inglés)
MSCRAMM	<i>Componentes de la Superficie Microbiana que Reconocen Matrices de Moléculas Adhesivas</i> (<i>Microbial Surface Components that Recognize Adhesive Matrix Molecules</i> por sus siglas en inglés)
PAA	Poli (ácido acrílico)
PCL	Poli - ϵ - caprolactona
pH	Potencial de Hidrógeno
PVA	Poli (vinil alcohol)
MEB/SEM	Microscopía Electrónica de Barrido (<i>Scanning Electron Microscopy</i> en inglés)
TGA	Análisis Termogravimétrico (<i>Termogravimetric analysis</i> en inglés)

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos esta vez, son pocos, pero sinceros.

Primero quiero agradecer a mis padres que decidieron apoyarme durante un año y medio con mi manutención para dedicarme a la publicación de mi primer artículo científico, el cual fue un gran logro para mí, tanto personal como profesionalmente.

En segundo lugar, quiero agradecer enormemente a Daniella Pompa, mi eterna compañera de laboratorio, mi amiga y mi maestra. Con ella, aprendí mucho de lo que es en verdad trabajar en equipo en el mundo de la investigación y a como conducirme en el laboratorio, organizarme y planear mis propios experimentos, este pequeño párrafo no logra describir el enorme agradecimiento que le tengo hoy y siempre.

Tampoco puedo olvidar a Erick Torres, que a pesar que no trabajamos en la misma área de biotecnología, siempre pudimos compartir tiempo para discutir sobre el electrohilado y sobre nuestros propios proyectos, además de todas las risas y carcajadas que soltamos en el laboratorio.

Finalmente, a todos los alumnos y maestros que me acompañaron en este viaje que duró lo que tenía que durar. Termino mi aventura como investigador con la redacción de este documento con sentimientos encontrados, pero feliz por concluir esta etapa de mi vida.

A todos ustedes, muchas gracias.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de andamios fibrosos de policaprolactona (PCL) producidos por electrohilado como estructuras que promuevan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y si el agregar diferentes tipos de fuentes de carbono y de nitrógeno cambia la dinámica generada en el sistema al agregar las fibras. Las bacterias *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* fueron utilizadas para realizar la evaluación. La morfología de las fibras fue evaluada por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB); las características térmicas tanto de transición como de degradación fueron evaluadas por Calorimetría Diferencial de Barrido y Análisis Termogravimétrico; la concentración microbiana fue evaluada en placas ELISA por espectrofotometría visible a 600 nm y la evolución de las colonias fue visualizada tanto por MEB como por microscopía óptica.

Los cultivos con *E. coli* se vieron afectados por la presencia de fibras de PCL y sus diferentes variantes, sin embargo, los cultivos de *P. aeruginosa* y *S. aureus* se vieron favorecidos. Los andamios del PCL redujeron la concentración de *E. coli* en un 40% aproximadamente y aumentaron la concentración de *P. aeruginosa* en 21.8%. *S. aureus* tuvo mayor preferencia por los andamios de PCL/Gly ya que aumentaron la concentración en 47.9%. Las curvas de crecimiento muestran que en algunos cultivos la fase de adaptación termina antes al compararla con el cultivo de control.

Las observaciones en microscopía electrónica y óptica muestran que en las fibras ya existen los cimientos de un biofilme alrededor de las tres horas de cultivo cuya topología cambia dado el modo de cultivo: un cultivo estático da lugar a un biofilme irregular con la forma de hongo que se espera y un cultivo dinámico genera un biofilme totalmente liso.

Finalmente, las fibras de PCL tienen un diámetro promedio de 984 ± 241 nm con un porcentaje de porosidad del 44.31% con muy pocos cambios en sus características térmicas: una transición vítrea de 63.55°C que se reduce entre 0.5°C y 1.5°C y una temperatura crítica a los 338.39°C que aumenta alrededor de 4°C a 5°C al contener fuentes de carbono y nitrógeno

ANTECEDENTES

El electrohilado es ampliamente utilizado en diversas ramas de investigación biomédica, principalmente en ingeniería de tejidos, donde se utiliza como una matriz extracelular sintética que puede ser empleada para la regeneración de nervios (1), cultivo de osteoblastos (2), injertos vasculares (3), regeneración de células musculares (4) y apósitos dérmicos (5).

Sin embargo, su uso en biotecnología ha sido muy limitado, principalmente para aumentar la protección que se le brinda a las bacterias contra ambientes adversos, inmovilizarlas en la superficie o simplemente para filtrarlas de un medio (6).

Las primeras pruebas hechas en fibras y bacterias no datan de hace muchos años: Salalha *et al.* hizo pruebas en *E. coli*, *S. albus* y virus T7, T4 y λ , encontrando que al tratar de electrohilar polímeros y las bacterias de manera conjunta, estas sobrevivían al proceso caso contrario a los virus, pero *E. coli* mostró mejor viabilidad que *S. albus* (7). Otras bacterias como la *B. animalis lactis* Bb12 (presente en el intestino humano y auxiliar en la absorción de la lactosa) sobreviven sin ningún problema al proceso usando Polivinil Alcohol y pueden conservarse dentro de las fibras por hasta 130 días a 4°C (8). Estas modalidades de contención se han probado dentro de biorreactores utilizando *P. fluorescens*, *Z. mobilis* y *E. coli*. Tanto *P. fluorescens* como *E. coli* no sobrevivieron al proceso y *Z. mobilis* se mantuvo viable en un 93%, al igual que *B. animalis lactis*, se pudo conservar y utilizar para fermentar, comprobando que no se afectaba el metabolismo de la bacteria (9).

Otras aplicaciones de las fibras han sido utilizadas para mejorar la eficiencia de bacterias y contribuyen en el crecimiento de las plantas. Por ejemplo, *B. japonicum* y *B. elkanii* que se presentan en la rizosfera y ayudan a la fijación del nitrógeno en la raíz, pudieron mejorar el crecimiento de la planta en un suelo con condiciones adversas para su crecimiento empleando un polímero que pueda retener agua (10).

Recientemente se ha tratado de evaluar si existen efectos en la reproducción de bacterias utilizando fibras electrohiladas. En 2017, nuestro grupo publicó un estudio en el cual se

probaron tres cepas, *Micromonospora spp.*, *Streptomyces spp.* y *E. coli*. La presencia de fibras de Poliácido acrílico en conjunto con alginato incrementaron la concentración de *Streptomyces spp.* en 10% al compararla contra el control y en el caso de *Micromonospora spp.* y *E. coli* no hubo mejora alguna (11). Moffa *et al.* en el mismo año realizó pruebas para comprobar si las fibras ayudaban a la producción de metabolitos secundarios obtenidos de *S. lividans*, comprobando que se puede obtener un incremento de 50% en la concentración bacteriana, atribuyéndolo a la capacidad de *S. lividans* para generar micelios que se verían favorecidos al usar los andamios como un sitio de anclaje, reduciendo el tiempo de adaptación de la bacteria (12).

En este trabajo se evaluó el efecto de andamios de Policaprolactona (PCL), los efectos en la concentración bacteriana al agregar diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructosa, lactosa y galactosa), de nitrógeno (peptona, extracto de levadura, glicina y urea), el cambio fisicoquímico que ocurre en los andamios al agregar las fuentes y cómo es que evolucionan las colonias bacterianas en los andamios.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es el efecto de los andamios electrohilados en cultivos de bacterias? Si bien es cierto que se ha caracterizado en la mayor medida de lo posible la reproducción bacteriana en superficies, la información existente en cuanto a los efectos de estas fibras es limitada. Esta investigación permite determinar si los mismos efectos que se observan en las superficies también se observan al tener cultivos con andamios interactuando con cultivos de tres bacterias comúnmente utilizadas en muchos experimentos: *E. coli*, *P. Aeruginosa* y *S. Aureus*. En el campo de la ingeniería de tejidos, las células tienen una gran relación con los andamios ya que se logra conformar de una manera más rápida la formación de una matriz extracelular. Si consideramos que la matriz extracelular es un paralelismo de las sustancias exopoliméricas que conforman los biofilmes bacterianos,

JUSTIFICACIÓN

Todas las técnicas de optimización de cultivos involucran realizar una gran cantidad de experimentos en las que se modifican las condiciones de cultivo (temperatura, presión, concentración de oxígeno o dióxido de carbono) o la composición del mismo medio (cantidad de carbono, nitrógeno, oxígeno, compuestos traza, etc.). Sin embargo, el utilizar un material cuya estructura puede potenciar el crecimiento de las bacterias, puede facilitar la ingeniería de cultivos para optimizarlos. Consideremos, por ejemplo, la ingeniería de tejidos. En años recientes se ha desarrollado en gran medida este campo al emplear andamios electrohilados. Las células tienen una gran relación con los andamios ya que se logra conformar de una manera más rápida la formación de una matriz extracelular. Si consideramos que la matriz extracelular es un paralelismo de las sustancias exopoliméricas que conforman los biofilmes bacterianos, potencialmente pueden crecer de una manera más rápida manteniendo las mismas condiciones del medio.

OBJETIVO

Determinar si las fibras electrohiladas, con nutrientes agregados o sin nutrientes, favorecen o desfavorecen la concentración bacteriana en cultivos bacterianos

HIPÓTESIS

Las fibras electrohiladas favorecen el crecimiento de las cepas *E. coli*, *P. Aeruginosa* y *S.*

FUNDAMENTO TEÓRICO

Si bien el proceso de adhesión bacteriana no es comprendido del todo, muchos investigadores han tratado de comprender como es que se lleva a cabo. Muchos factores entran en juego al estudiarlo: la orientación de la bacteria, la composición de su membrana y de la superficie, elementos como pili o fimbrias, factores estéricos, entre otros. Es, hasta cierto punto,

asombroso como es que no hay impedimentos en la fijación de las bacterias, puesto que no dependen de una sola propiedad para que logren su propósito. En los próximos apartados se hablará sobre el polímero usado en esta investigación, las características de las membranas bacterianas, el mecanismo de adhesión y los biofilmes.

2.1 Policaprolactona o PCL

La policaprolactona [Poli (ϵ -caprolactona)] o PCL, es un polímero biodegradable sintético que tiene una gran variedad de usos, especialmente en la ingeniería de tejidos. El PCL se considera como un polímero caro, así que generalmente se mezcla con otros polímeros formando un copolímero con el fin de reducir costos y conseguir productos comercializables (13). Este poliéster cristalino tiene una gran ductilidad por su baja temperatura de transición vítrea, de -60°C , gracias a esto se considera un material ecológico que puede ser utilizado en materiales desechables para industria médica, de alimentos y agrícola (14). El PCL presenta algunos inconvenientes, por ejemplo, aunque es biodegradable tiene una baja tasa de degradación y esta a su vez genera productos acídicos, además de su temperatura de fusión de 60°C ; para algunas aplicaciones tiene el inconveniente de tener una carga neutra (15).

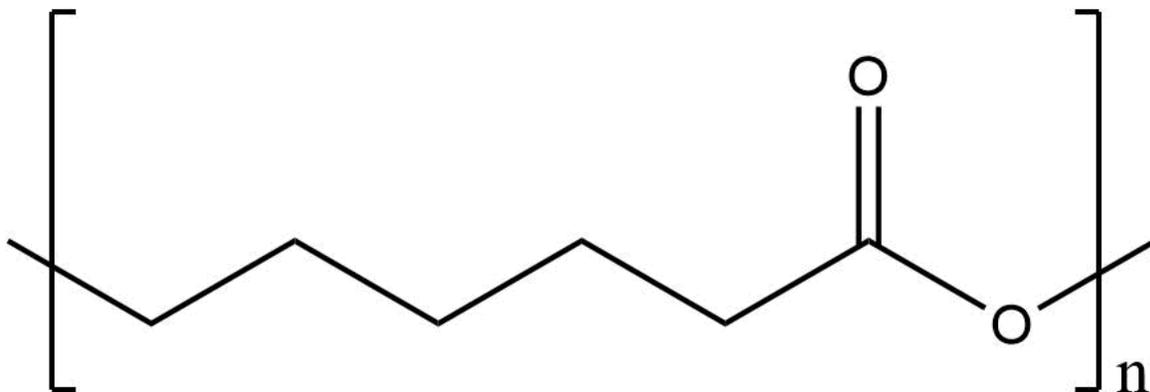


Fig. 2.1. 1 Estructura química del PCL

2.2 Electrohilado

El electrohilado (*electrospinning* en inglés) es una técnica utilizada para producir fibras finas a partir de soluciones poliméricas, ya sea naturales o sintéticos (16). El proceso puede ser controlado utilizando una variedad de colectores o modificando los parámetros con los cuales se produce el material, conocido como *andamio* (17), los cuales pueden tener una gran cantidad de aplicaciones dependiendo del campo de estudio.

Los andamios se producen en un equipo de electrohilado que se compone principalmente de una fuente de alto voltaje (15 – 50 kV), una bomba de inyección, una jeringa y un colector (18). La fabricación del andamio consiste en hacer pasar una solución a través de un campo eléctrico con el fin de impulsar y estirar el polímero a medida que este viaja entre la punta de aguja y el colector, a medida que se estira, el polímero empieza a girar y se deposita de manera aleatoria en el colector, que con condiciones apropiadas producirá un andamio con fibras continuas (19).

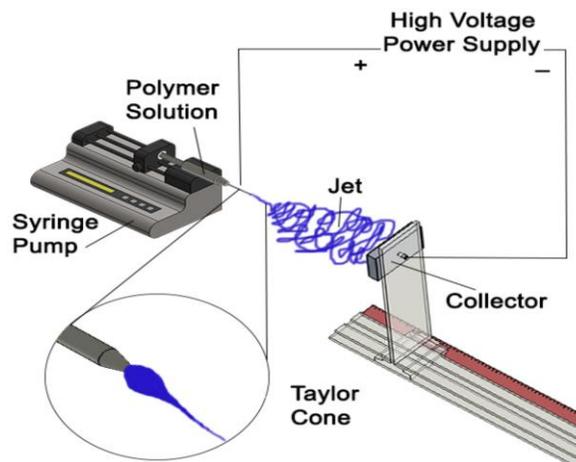


Fig. 2.2. 1 Esquema general de un equipo de electrohilado (16)

Si bien la técnica ha sido empleada y perfeccionada por cerca de 30 años, aún existen desacuerdos entre los expertos. Por ejemplo, no hay un consenso claro respecto a los rangos en los que las fibras se clasifican como microfibras y nanofibras. En nanotecnología se considera que la escala nanométrica va de 1 a 100 nm, pero esta cambia de acuerdo al área

nanotecnológica (20). En el campo del electrohilado, los autores consideran que para considerar que hay nanofibras, estas deben tener un diámetro promedio de entre 200 y 500 nm (21).

Para la técnica son importantes los siguientes parámetros (22,23):

Concentración: La cantidad de polímero en la solución puede cambiar el producto obtenido por la técnica. Soluciones a baja concentración pueden producir esferas, mientras que soluciones a altas concentraciones pueden producir fibras, esto depende finalmente del peso molecular del polímero.

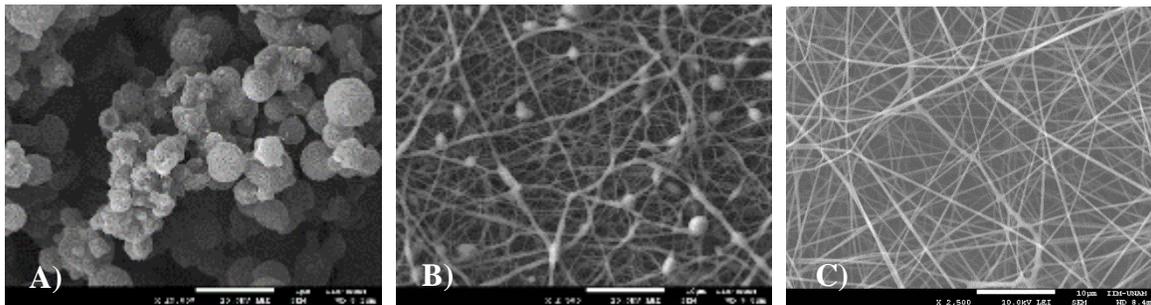


Fig. 2.2. 2 Efecto de la concentración en la fabricación de fibras por electrohilado. A) Microesferas, B) Fibras con esferas y C) Fibras

En la figura, se puede apreciar el efecto de la concentración en la obtención de fibras. A medida que la concentración se incrementa, se pueden obtener fibras con diámetros muy similares (es decir, fibras definidas) además de no presentar esferas o bulbos. Idealmente, siempre se buscará obtener una desviación estándar pequeña.

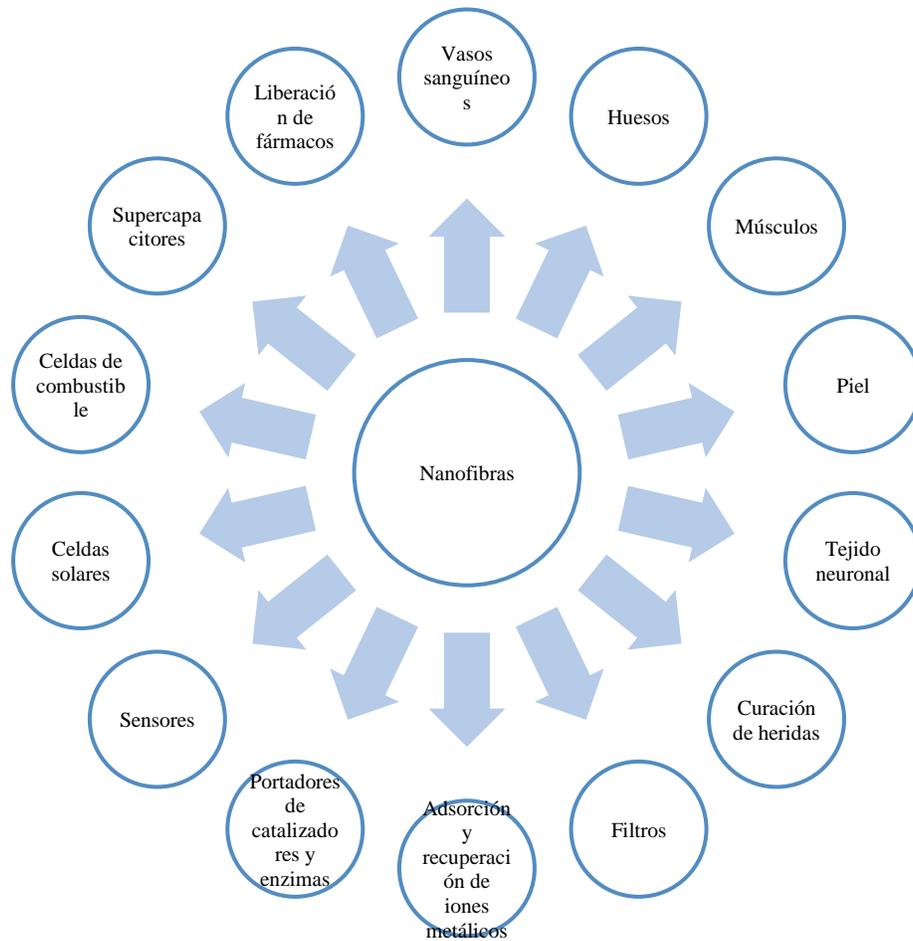


Fig. 2.2. 3 Aplicaciones de las nanofibras

Viscosidad: Juega un papel importante en la formación de fibras. Esta no debe ser muy baja o muy alta. Sin embargo, esto depende del polímero y se deben hacer pruebas para determinar cuál es el valor apropiado.

Conductividad: Es determinada por el polímero, el solvente utilizado y si se han agregado iones a la solución. En soluciones con grandes cantidades de iones libres, permitirán fabricar andamios con mayor facilidad que aquellas que no. Una mayor conductividad se puede obtener agregando sales iónicas como NaCl, KCl o KH_2PO_4 , entre otras. Con esto se pueden obtener fibras más delgadas, aunque se ha observado que solventes orgánicos como ácido fórmico o ácido acético en mayor o menor concentración pueden ayudar a este proceso.

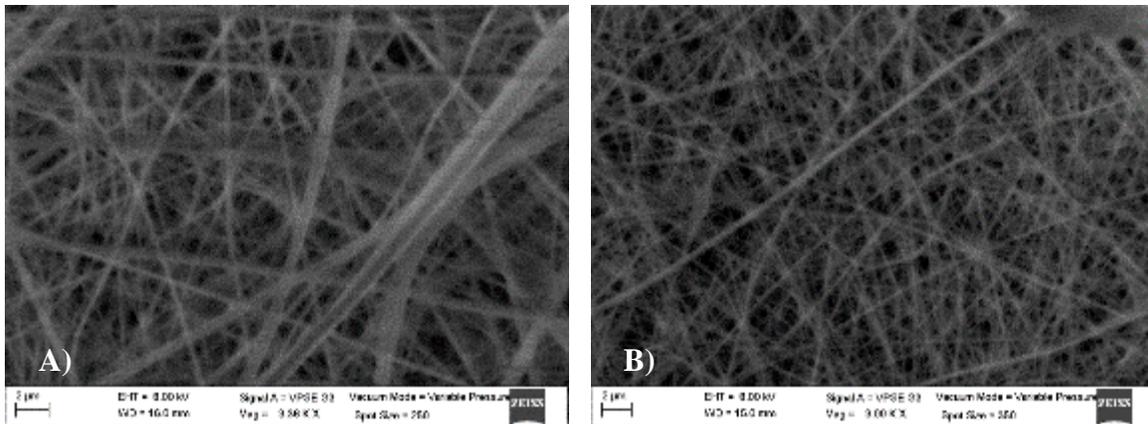


Fig. 2.2. 4 Efecto de la conductividad en la fabricación de fibras por electrohilado.
A) Fibras sin KCl y B) Fibras con KCl

Un efecto secundario de agregar sales a los polímeros, es que pueden acelerar la tasa de degradación de los mismos, lo que puede ser benéfico o perjudicial de acuerdo a la aplicación. En la figura se muestran fibras de gelatina con grafeno (a la derecha) y sin grafeno (a la izquierda). Como puede verse, la presencia de grafeno reduce el diámetro de las fibras.

Voltaje: Es un factor crucial para la obtención de fibras. El voltaje apropiado permite la formación del cono de Taylor, una forma que adquiere el polímero cuando está electrohilándose y de donde se obtienen las fibras.

Gasto: Es la velocidad a la que se inyecta la solución y puede conducir a la formación de fibras o esferas. Generalmente se recomienda que sea un gasto bajo, pues así la solución tiene tiempo suficiente para cargarse y electrohilarse. Sin embargo, esto está sujeto a la evaporación del solvente, así que debe haber un balance entre la evaporación del solvente y la inyección del polímero durante el proceso.

Distancia: La distancia entre la aguja y el colector puede afectar el diámetro de las fibras y su morfología general del andamio. Distancias es muy pequeñas pueden producir fibras que no llegan a solidificarse dada la poca evaporación del solvente contenido en el polímero.

Condiciones del ambiente: Estas también tienen efectos en el diámetro de las fibras y su morfología. Dependiendo del polímero, incrementar la temperatura puede producir fibras

más delgadas dada la reducción en la viscosidad de la solución. Bajos valores de humedad en el ambiente pueden ayudar a que el solvente se evapore rápidamente produciendo fibras más delgadas. Nuestros experimentos han mostrado que la electrostática dentro de la cámara de electrohilado forma fibras fuera del colector, ya que interfiere con el campo eléctrico producido por la fuente de voltaje.

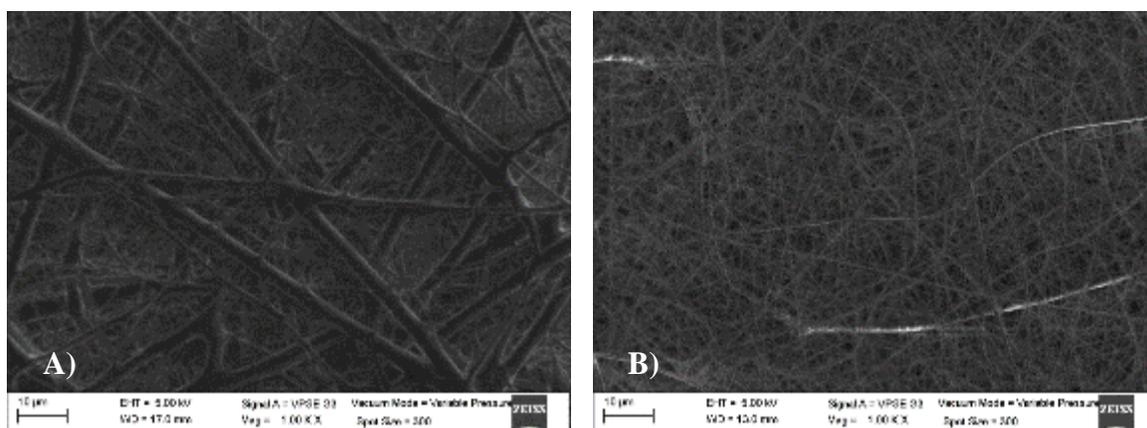


Fig. 2.2. 5 Efecto de la humedad en la fabricación de fibras. Fibras de PAA en A) Altas condiciones de humedad y B) Bajas condiciones de humedad

2.3 Mecanismo de adhesión bacteriana

Se considera que las bacterias pueden unirse a las superficies de dos maneras diferentes: (1) la bacteria se adhiere directamente al material, dadas las condiciones del ambiente, las propiedades químicas del material y las interacciones entre las estructuras de la superficie de la bacteria o (2) la bacteria se unirá de manera indirecta al material gracias a una capa condicionante que sirva de anclaje para la bacteria ya que esta presenta afinidad a ella (24).

Así pues, ambas vías llevarán a la acumulación de microorganismos sobre una superficie. Este proceso se ha descrito y abordado desde distintos enfoques a lo largo de los años, pero los primeros reportes sobre el tema (25), lo han descrito como un proceso de tres etapas:

1. Adsorción: o acumulación sobre una superficie de microorganismos.

2. Fijación: se consolida una interfase entre el microorganismo y la superficie. Aquí es donde se observa la formación de sustancias poliméricas que unen al microorganismo con la superficie.
3. Colonización: crecimiento y división de los organismos en la superficie.

Dentro de estas fases, otros autores acuñan más fases donde se forman capas que predisponen la fijación, procesos de adhesión reversibles e irreversibles y el cambio que sufren estos cúmulos de bacterias para colonizar otras áreas posteriormente (26).

2.3.1 La capa condicionante

Para que las bacterias que desplacen a las superficies, estas necesitan un motivo. Este motivo no es otra cosa que nutrientes que pueden utilizar y afortunadamente para ellas, estos se encuentran en las superficies dispuestos en forma de un filme a escala nanométrica (este fenómeno se conoce como *quimiotaxis*); para que se considere una capa condicionante no debe ser homogéneo, tanto en composición química como estructura y no ser continuo (27). Se considera que primero se depositan proteínas y posteriormente carbohidratos, que generalmente contienen ácido urónico, piruvato y sulfatos (28)

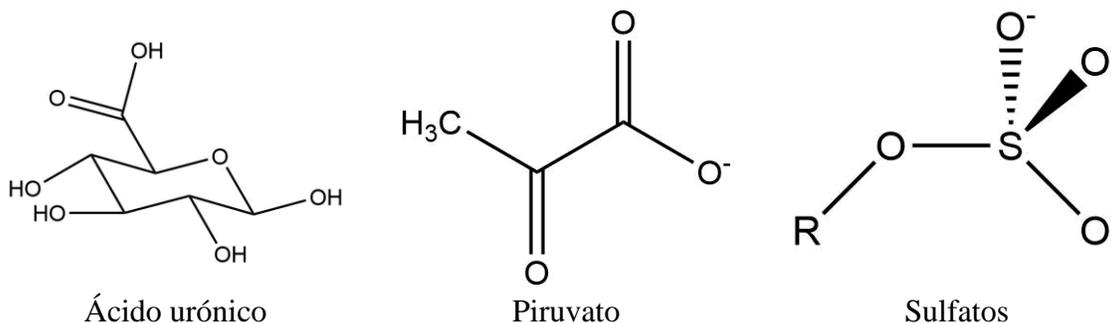


Fig. 2.3.1. 1 Compuestos comunes en la capa condicionante

La aparición de esta capa tiende a modificar la carga superficial de los materiales, lo que facilita las interacciones de la bacteria además de funcionar como un sitio de anclaje y si la composición química de la capa es similar a las SEP secretadas por la bacteria existe una afinidad mayor por la bacteria para unirse a la superficie (29)

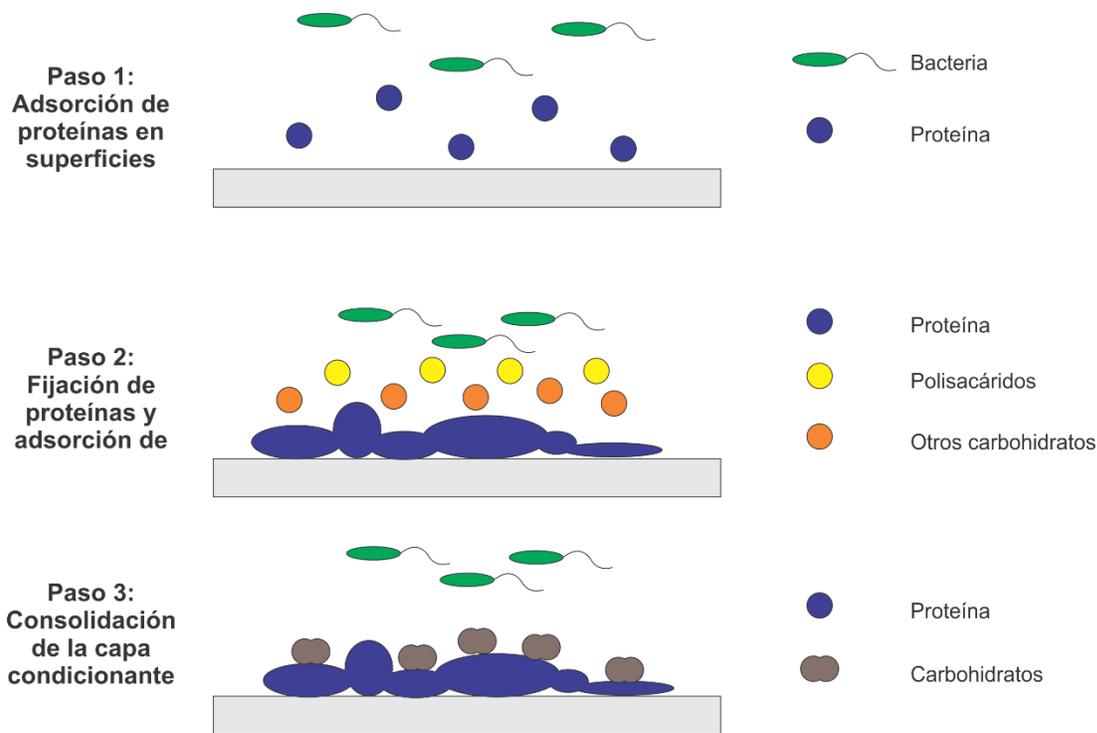
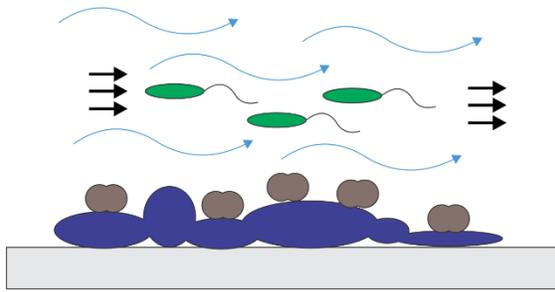


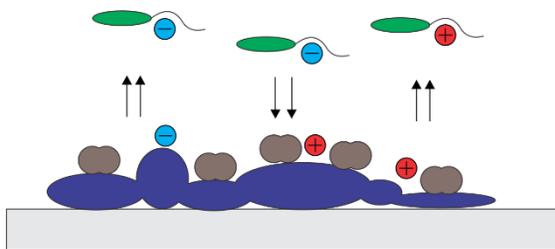
Fig. 2.3.1. 2 Proceso de formación de la capa condicionante

2.3.2 Adhesión reversible

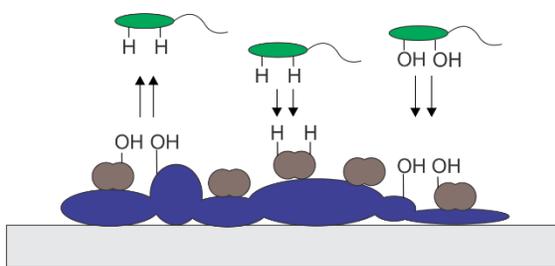
Una vez que las bacterias que han acercado a la superficie, ya sea por quimiotaxis, por efecto de otras fuerzas ambientales (como la gravedad o las interacciones electrostáticas) o por sus propias estructuras (flagelos, pili o fimbrias), estas quedan en una región en la que la unión puede y no puede darse. En ese momento, la bacteria entra en una fase reversible para su fijación a la superficie.



El flujo del medio puede afectar el proceso de adhesión, sea en agua o en aire.



De igual manera, las interacciones electrostáticas pueden acercar o alejar a la bacteria de la superficie.



Esos mismos efectos pueden observarse gracias a las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas

Fig. 2.3.2. 1 Efectos del medio en el proceso de adhesión reversible

La fase reversible esta mediada por muchos factores ambientales y físicos. Por ejemplo: los cambios en el flujo de un medio podrían mover a la bacteria fuera de un rango para que esta interaccione con el ambiente, las interacciones electrostáticas dadas por las cargas superficiales tanto de la superficie y estructuras de los microorganismos como por las superficies pueden acelerar o retrasar el proceso de unión (30) o las interacciones de Van der Walls y puentes de hidrógeno pueden intervenir en el proceso (31).

2.3.3 Adhesión irreversible

Una vez que las bacterias pueden sobreponerse a las barreras físicas y químicas que limitan su adhesión, pasan a la fase irreversible. En este punto, se han considerado diferentes posturas sobre esta fase con el paso del tiempo. Por un lado, se consideraba que las estructuras físicas

de las bacterias (pili, fimbrias o flagelos) pueden atravesar las fuerzas repulsivas (32). Otra postura sugería que la capacidad que tienen para adherirse depende de las características hidrofóbicas – hidrofílicas de las la superficies, interacciones dipolo – dipolo, puentes de hidrógeno y enlaces iónicos y covalentes (33). En la actualidad, se considera que ambos fenómenos juegan un papel en el fenómeno de adhesión, además de que este proceso no ocurre al primer contacto, sino que ocurren diversas aproximaciones a la superficie hasta que se une por completo (34). Podríamos resumir el mecanismo de adhesión bacteriana en la figura 2.3.3.1

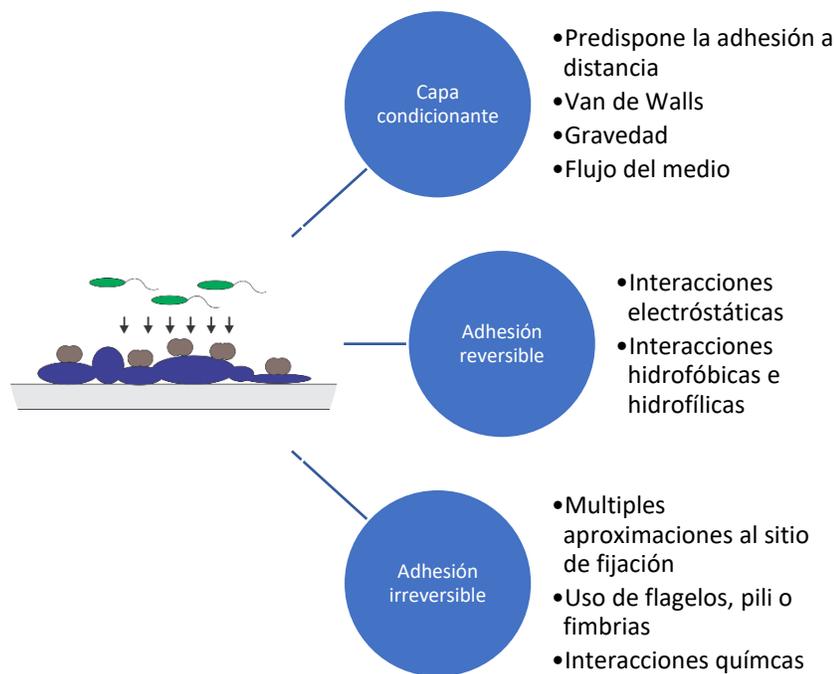


Fig. 2.3.3. 1 Mecanismo de adhesión bacteriana. Fases y características principales

2.4 Morfología de las membranas celulares

En el estudio del mecanismo de adhesión se tiene que tomar en cuenta la composición de las membranas. Generalmente, dividimos a las bacterias en dos grandes grupos para su estudio dada la composición de la membrana usando la tinción de gram: las bacterias gram positivas y las bacterias gram negativas.

En las bacterias gram positivas, la membrana está compuesta por una pared gruesa de polisacáridos, los ácidos teicoicos, como se puede ver en la figura 2.4.2. Estos son polímeros que contienen fosfodiésteres que se presentan a lo largo de toda la cadena como puntos de unión y junto con ellos se encuentran láminas de peptidoglicanos, matrices de polisacáridos que se unen por enlaces peptídicos, toda esta matriz se une a la membrana por una unidad de anclaje (35). La presencia de los fosfodiésteres genera una carga negativa en la superficie que puede modificarse al transportar una D-alanina desde el interior al exterior y fijarla por un enlace éster en la superficie (36).

Las bacterias gram negativas por el otro lado, tienen dos membranas lipídicas: una membrana interna compuesta de glicerofosfolípidos y una externa compuesta mayormente de lipopolisacáridos o LPS como se ve en la figura 2.4.2, responsables de la activación del sistema inmunológico (37); para su estudio se dividen en tres: el lípido A, unido directamente a la membrana externa (38); un oligosacárido central compuesto por hexosas, ácido 2-keto-deoxioctónico) y hexosaminas (figura 2.4.1); y el antígeno O, un conjunto de polisacáridos y hexosaminas, todas estas también unidas por grupos fosfato (39).

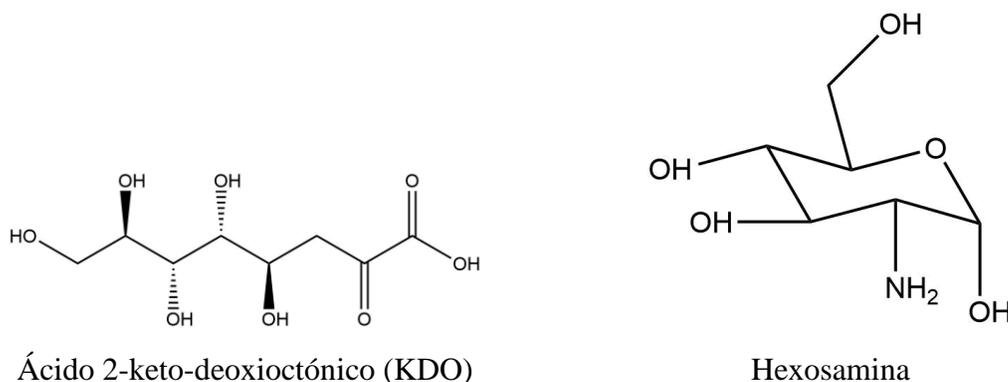


Fig. 2.4. 1 Estructuras de los compuestos principales en LPS

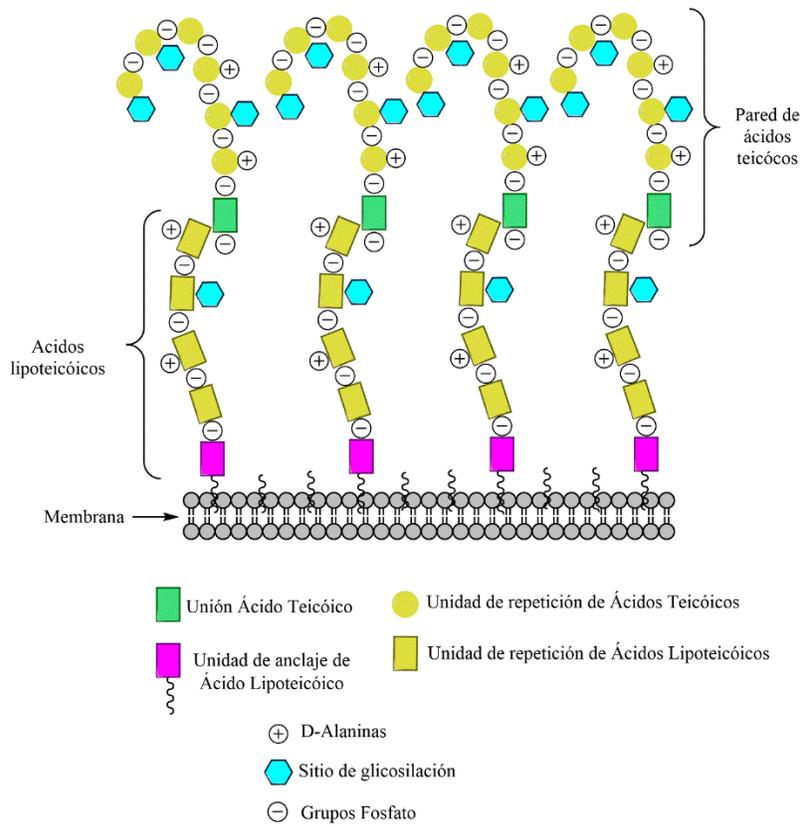


Fig. 2.4. 2 Estructura general de las membranas en bacterias gram positivas (23)

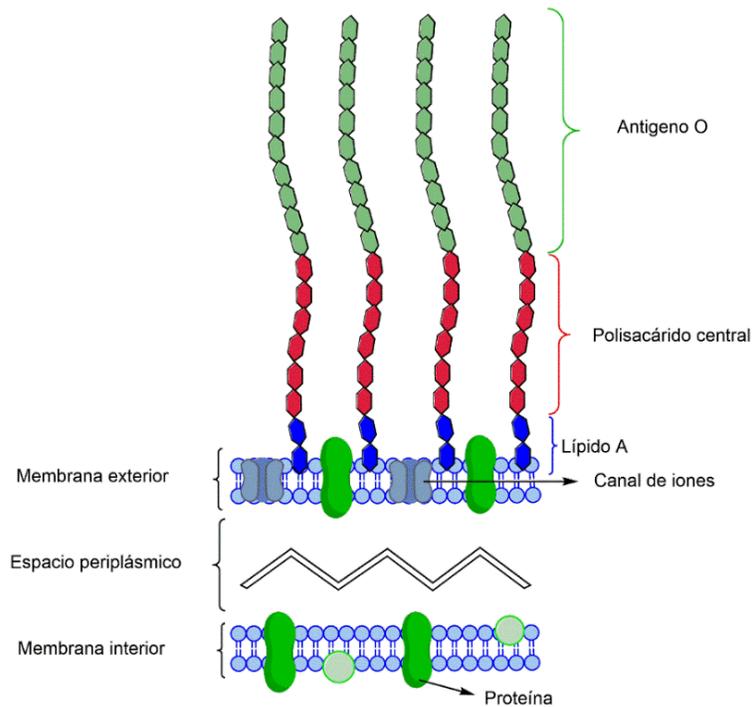


Fig. 2.4. 3 Estructura general de las bacterias gram negativas (23)

2.4.1 Estructura de la membrana de *E. coli*

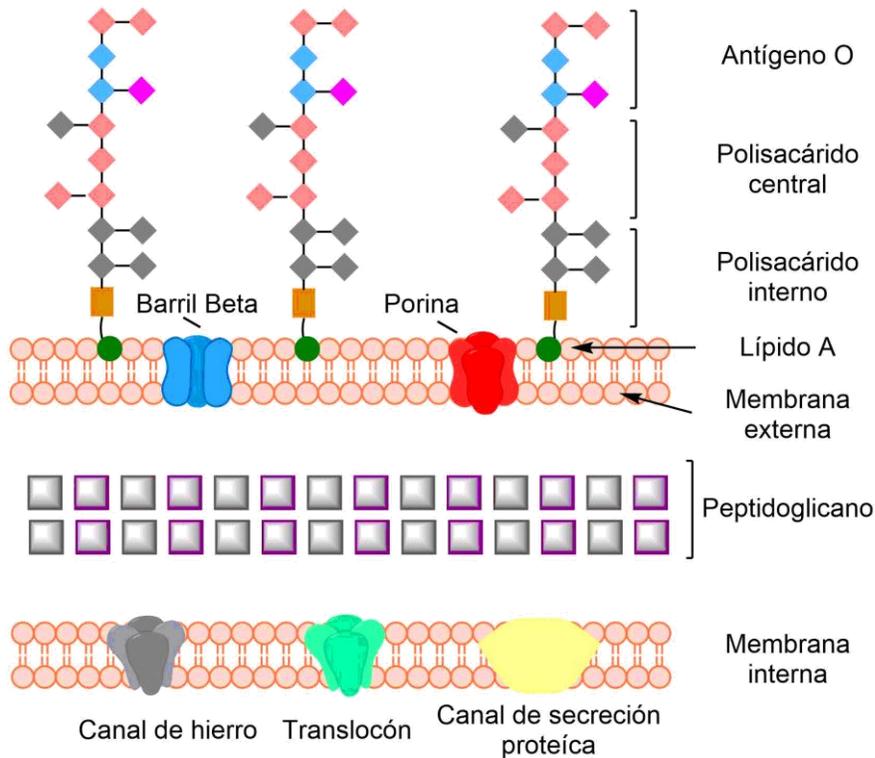


Fig. 2.4.1. 1 Membrana de *E. coli*

E. coli tiene una doble membrana con peptidoglicano en medio de ellas. La membrana interna compuesta de fosfolípidos, tiene proteínas que permiten entrada y salida tanto de iones y desechos como de proteínas que, se relocalizarán en la membrana o se transportarán a la membrana externa (40). La membrana externa en cambio, es una combinación de fosfolípidos en su parte interna y lipopolisacáridos en la parte externa (41). Esto implica que la membrana externa es menos hidrofóbica que la interna (42). Esta combinación produce una membrana asimétrica que presenta una gran variedad de fosfolípidos y lipopolisacáridos que cambian en función del estrés que enfrente la bacteria y además presenta una gran carga negativa que se debe a que presenta una estructura similar a la del lípido A (43). *E. coli* también presenta en su membrana el *Pili Común de E. coli* (*ECP* o *E. coli common pilus* en inglés) que juega un papel importante tanto en la formación de biofilmes como en el reconocimiento celular del hospedero cuando es un agente patógeno y sin él, no es capaz de adherirse a superficies hidrofóbicas (44).

2.4.2 Estructura de la membrana de *P. aeruginosa*

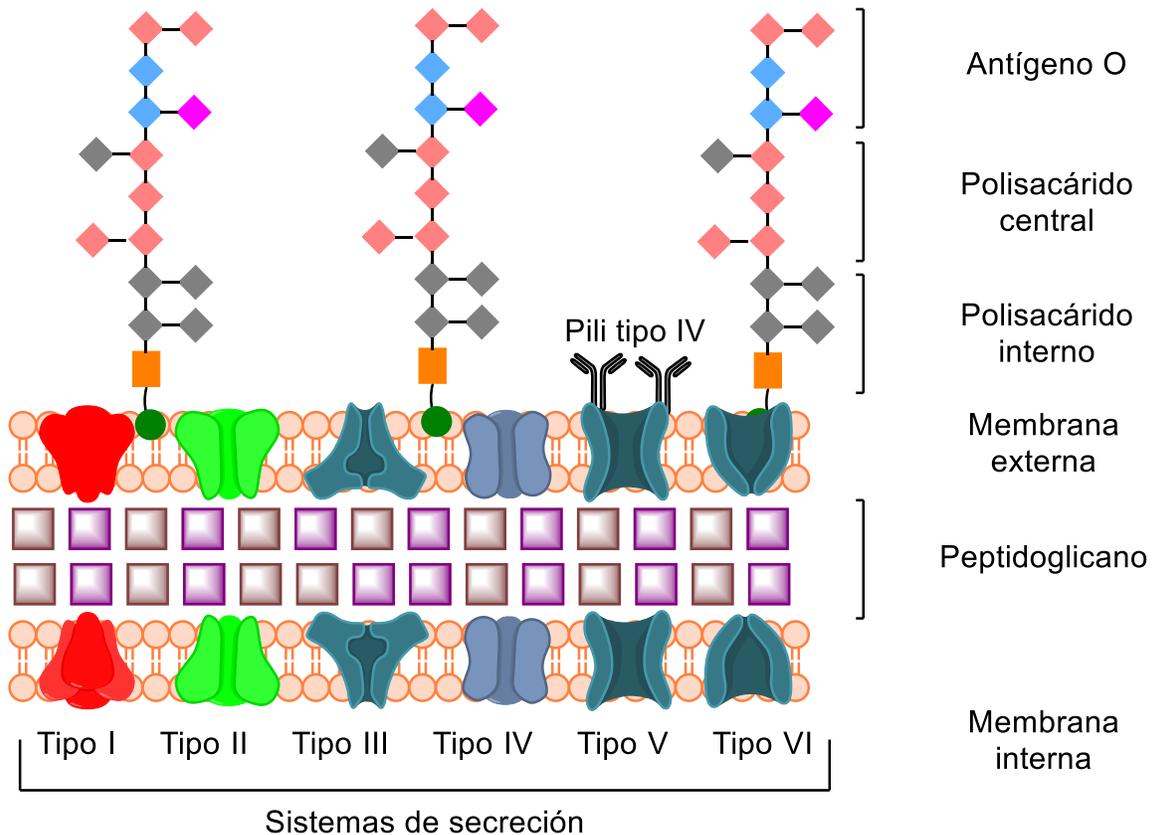


Fig. 2.4.2. 1 Membrana de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa presenta en su membrana una mayor cantidad de proteínas, que no son otra cosa que sistemas de secreción cuya activación depende de la superficie con la que tienen contacto. Se sabe, por ejemplo, que el sistema de secreción del tipo III secreta toxinas al entrar en contacto con células individuales de un hospedero (45); mucho del comportamiento de *P. aeruginosa* depende del contacto con las superficies y que tan rápida es la respuesta de la célula a ese estímulo. A pesar de que *P. aeruginosa* tiene lipopolisacáridos que pueden interferir en la adhesión, generalmente la unión de la bacteria depende diversos pili, principalmente del pili tipo IV (46). Recientemente se sabe que el pili tipo IV es una estructura retráctil que funciona como un sensor químico, puede inducir movimiento por quimiotaxis y que funciona como estructura principal para unir la bacteria a una superficie,

especialmente a superficies porosas; *P. aeruginosa* es 10 veces más propensa a unirse a un poro de diámetro de 100 nm que a uno de 300 nm. (47).

2.4.3 Estructura de la membrana de *S. aureus*

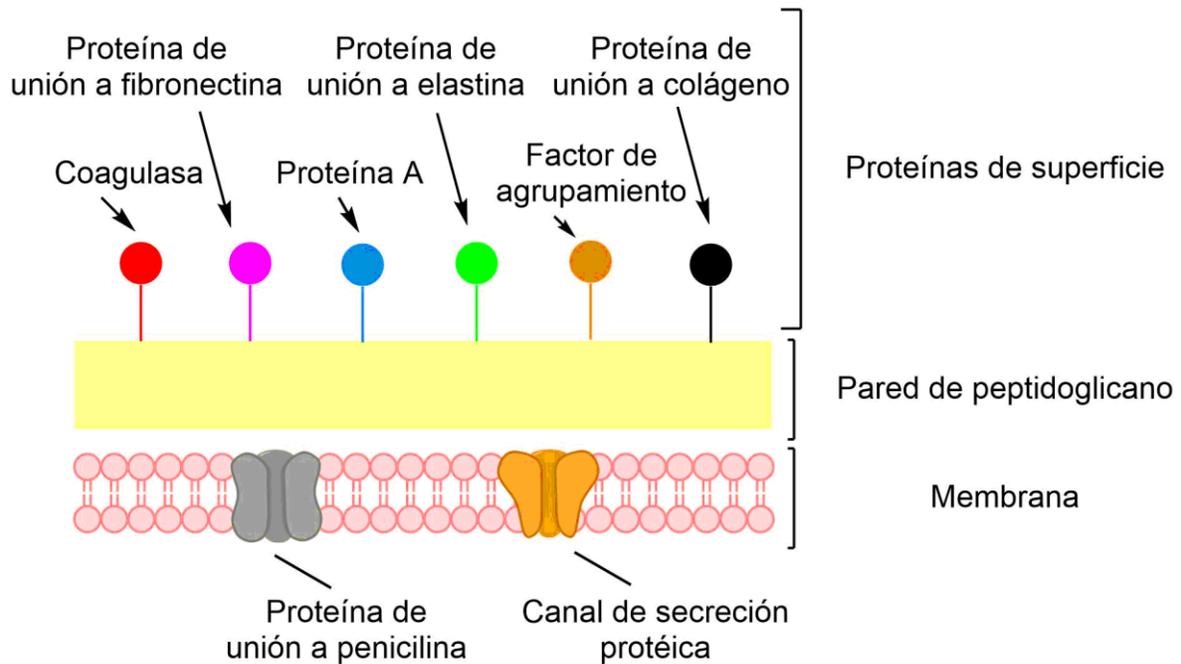


Fig. 2.4.3. 1 Membrana de *S. aureus*

La membrana de *S. aureus* presenta diversas proteínas unidas covalentemente a la pared de peptidoglicano, las cuales tienen en común un segmento en la terminal N que se corta al salir por el canal de secreción proteica, una señal que permite el arreglo de la proteína en la terminal C, un dominio hidrofóbico y cerca de la terminal C una cadena de aminoácidos cargados positivamente (48). Algunas de las proteínas de *S. aureus* tienen selectividad y estas se agrupan en un grupo conocido como *Componentes de la Superficie Microbiana que Reconocen Matrices de Moléculas Adhesivas* (MSCRAMM por sus siglas en inglés) y juegan un papel importante durante la fijación y colonización en plasma sanguíneo (49). *S. aureus* tiene una gran afinidad a las superficies hidrofóbicas, aunque no ha quedado establecido del todo por qué ocurre este fenómeno, se ha sugerido que la producción de tensoactivos por la bacteria puede tener influencia en dicho comportamiento (24).

2.5 Biofilmes

Los biofilmes han sido definidos como comunidades bacterianas asociadas a superficies que predominan en sistemas naturales y patogénicos que se encuentran en matrices y cuyas características difieren de sus contrapartes planctónicas (50). En este modo de crecimiento se sabe con certeza que las bacterias son más resistentes a agentes antibacterianos y a condiciones hostiles del medio ambiente y nuevas aproximaciones sobre el estudio de los biofilmes los consideran como matrices extracelulares similares a los hidrogeles usados como biomateriales (51). Un biofilme puede estar compuesto de una sola cepa bacteriana, sin embargo, en la mayoría de estos es común que estén formados por múltiples cepas (52).

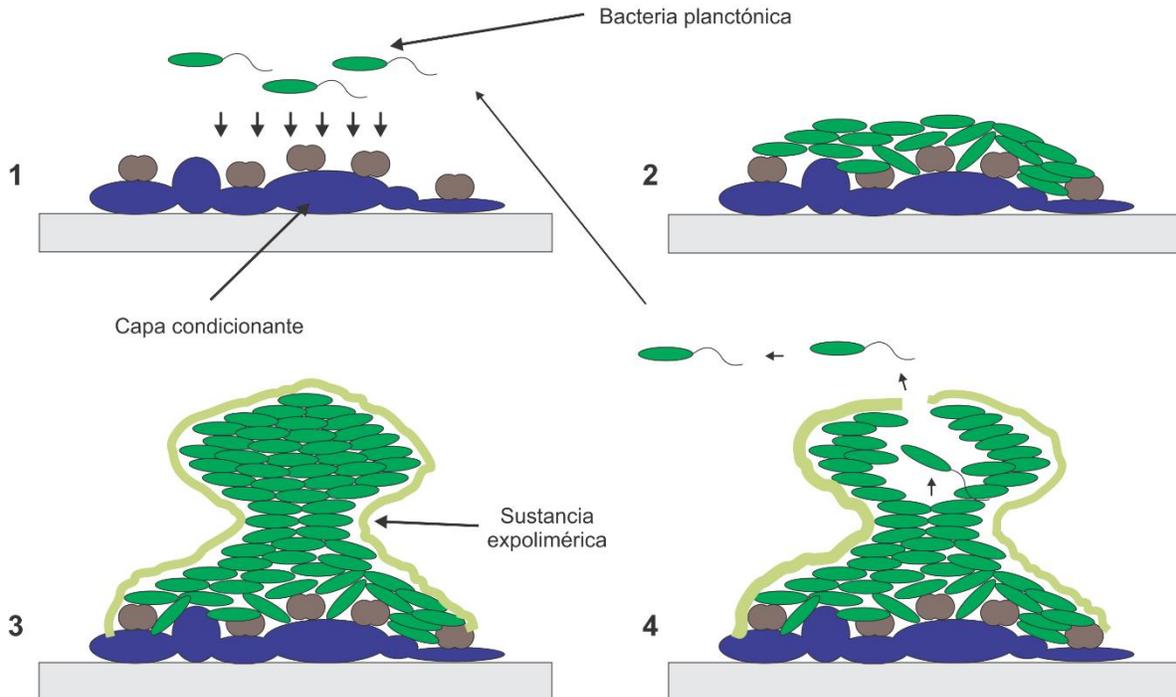


Fig. 2.5. 1 Proceso de formación de un biofilme

La formación de biofilmes, es una consecuencia directa del mecanismo de adhesión bacteriana del cual se ha hablado ampliamente en el apartado 2.3. El proceso de formación de un biofilme se ilustra en la figura 2.5.1 y se describe a continuación (53): (i) bacterias planctónicas se acercan a una superficie predisuestas por la capa condicionante y ocurren las interacciones correspondientes para fijar la bacteria a la superficie, (ii) una vez que se han

asentado las primeras bacterias, inicia una cascada de señalización que permite a otras bacterias orientarse y fijarse hacia esa superficie, (iii) a medida que las bacterias se van acumulando, estas se reorganizan en una matriz tridimensional y empiezan a generar sustancias exopoliméricas (*EPS* en inglés) que permiten crear un ecosistema adecuado para la supervivencia de las bacterias, (iv) una vez que el ecosistema tiene una cantidad de nutrientes limitada o una gran acumulación de desechos, este se reestructura por medio de lisis celular y una ruptura parcial de la matriz con el fin de liberar células que podrán migrar para colonizar un nuevo ambiente, es decir, en este punto ocurre una producción de enzimas degradadoras de polisacáridos, proteínas, ADN o surfactantes que faciliten ese proceso.

2.5.1 Biofilmes en la industria

En la industria, los biofilmes tienen un papel ambivalente, porque pueden ser tanto benéficos como perjudiciales. Un biofilme puede afectar un proceso industrial por su estructura, su metabolismo o por quien lo compone, es decir, las bacterias (54). Cuando trabaja en nuestro beneficio, pueden utilizarse para el tratamiento de aguas (55) o diversos tipos de fermentación sólida (56,57). Por otro lado, la formación de biofilmes puede conducir a la resistencia a antibióticos, rayos ultravioleta, altas tasas de intercambio genético, alteración en la biodegradación y un incremento en la producción de metabolitos que eventualmente lleva a pérdidas en la eficiencia y daños a los equipos, obstrucción de tuberías y reducción en los sistemas de intercambio de calor (58,59)

2.5.2 Productos obtenidos a partir de biofilmes

La producción industrial por medio de biofilmes no ha sido del todo establecida, aunque su factibilidad ha sido probada a escala de laboratorio. Sin embargo se debe considerar que puede ser un tanto más compleja, pues requiere el establecimiento de solo una cepa bacteriana, aunque es un tanto más económico dado el tiempo de vida de los organismos y las condiciones a las que pueden trabajar (60).

Hasta ahora se ha probado algunos procesos de manufactura de químicos y enzimas por medio de biofilmes usando una escala de laboratorio, las cuales se pueden observar en la tabla 2.5.2.1.

Tabla 2.5.2. 1 Productos obtenidos a través de biofilmes

<i>Producto</i>	<i>Organismo</i>	<i>Sustrato</i>	<i>Productividad</i>	<i>Referencias</i>
<i>Etanol</i>	<i>Z. mobilis</i>	Tubos de vidrio y poliestireno	13.40 ± 2.43 g/L	(61)
<i>Ácido succínico</i>	<i>A. succinogenes</i>	Gránulos de vidrio	23.8 ± 2.9 g/L	(62)
<i>Nisina</i>	<i>L. lactis</i>	Matriz fibrosa	1 x 10 ⁷ AU/L	(63)
<i>Celulosa</i>	<i>A. xylinum</i>	Matriz de PCS	13 g/L	(64)
<i>Bacteriana Polihidroxi-alcanoatos</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Matriz de PCS	7.3 g/L	(65)
<i>Ramrólpidos</i>	<i>P. aeruginosa</i>	-	242 ug/L	(66)

Es decir que si se puede facilitar la presencia de biofilmes en sistemas de producción industrial podría conducir a dos cosas: (i) facilitar la introducción de los biofilmes a la producción industrial y (ii) una optimización en la producción de compuestos por este método.

La utilización de organismos de control permite determinar si es posible extrapolar los resultados de las pruebas piloto en cepas cuyas características de crecimiento están bien definidas con bacterias que podrían ser optimizadas aún más o introducir nuevas cepas y explorar si pueden producir nuevos compuestos. Aún en la actualidad seguimos descubriendo por medio de los biofilmes nuevos compuestos que puedan ser explotados como biomarcadores (67) o tintas (68).

METODOLOGÍA

Para los experimentos, se empleó PCL disuelto en un sistema solventes compuesto por tetrahidrofurano (THF) y metanol; posteriormente se probó agregar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno a los andamios. Estos fueron caracterizados por técnicas fisicoquímicas y a través de microscopía además de ser probados en cultivos microbianos con el fin de observar el comportamiento de las bacterias sobre las fibras.

3.1 Preparación de soluciones de PCL

Poli (ϵ -caprolactona) (PCL) (Número CAS) de Sigma Aldrich, M_w fue disuelto al 13% p/v en un sistema de solventes de THF y metanol en proporción 3:1 v/v.

En un vial, se colocaron 3 ml de metanol y 9 ml de tetrahidrofurano y finalmente se calculaba el 13% del volumen siguiendo la relación (1):

$$\begin{aligned}\% \frac{m}{v} &= \frac{g \text{ de soluto}}{ml \text{ de solvente}} * 100 \\ 13\% &= \frac{g \text{ de PCL}}{12 ml THF/Metanol} * 100 \\ \frac{13}{100} * 12 &= g \text{ de PCL} \\ 1.56 &= g \text{ de PCL}\end{aligned}\tag{1}$$

Así que se agregaron 1.56 g de PCL al sistema de solventes y se agitaba a 500 rpm por 12 horas a 50°C.

Para producir las diferentes variantes de las soluciones de PCL se agregaron los azúcares glucosa, fructosa, lactosa y galactosa y las fuentes de nitrógeno peptona, extracto de levadura, glicina y urea. Sin embargo, dada la poca solubilidad de todos los tipos de fuentes, se decidió limitar la masa a agregar de cada una de las fuentes a 20 mg con el fin de estandarizar cantidad agregada. Para preparar la solución primero se agregaba metanol al vial, posteriormente la

fuelle de carbono o nitrógeno, después el THF y por último el PCL. Toda la solución igualmente se dejaba en agitación a 500 rpm por 12 horas a 50°C.

3.2 Preparación de medio de cultivo, inoculación y ajuste

Para el cultivo de todas las cepas se utilizó caldo nutritivo (Caldo Nutritivo No. 1 de Sigma Aldrich) y se disolvió en agua destilada. Su preparación requiere disolver 25 g/l y cada cultivo inicial se realizó en tubos de ensayo con un volumen inicial de 10 ml. La cantidad de caldo a agregar se calculó mediante la relación expresada en (2).

$$25 \text{ g de caldo en polvo} \rightarrow 1000 \text{ ml de agua}$$

$$X \text{ g de caldo en polvo} \rightarrow 10 \text{ ml de agua}$$

$$X \text{ g de caldo en polvo} = \frac{10 \text{ ml de agua}}{1000 \text{ ml de agua}} * 25 \text{ g de caldo en polvo} \quad (2)$$

$$X \text{ g de caldo en polvo} = 0.25 \text{ g de caldo en polvo}$$

Una vez que se disolvieron los caldos, se esterilizaron en autoclave a 121°C por una hora y al terminar se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente. Después se agregaron 0.5 ml de las cepas a cultivar provenientes cultivos previos y se colocaron en incubadora por 18 horas a 37°C. Posteriormente, los tubos se ajustaron a una turbidez usando la escala de McFarland al valor de 0.5 agregando solución salina al caldo.

3.3 Electrohilado de PCL

Tal y como se habló en el apartado 2.2, para el electrohilado del polímero, a pesar de la cantidad de consideraciones que se deben de tener existen tres parámetros cuya importancia resalta si no se tiene un equipo de electrohilado con un alto grado de sofisticación: voltaje, distancia aguja – colector y flujo. En la tabla 3.3.1 se enlistan todas las variantes de PCL producidas, su código, el voltaje empleado, la distancia y el flujo.

Tabla 3.3. 1 Características de electrohilado de PCL y sus variantes

<i>Código</i>	<i>Composición</i>	<i>Voltaje</i>	<i>Distancia</i>	<i>Flujo</i>
<i>PCL</i>	PCL	20 kV	18 cm	3 ml/h
<i>PCL/Glu</i>	PCL y Glucosa	20 kV	18 cm	3 ml/h
<i>PCL/Lac</i>	PCL y Lactosa	20 kV	18 cm	3 ml/h
<i>PCL/Fru</i>	PCL y Fructosa	20 kV	18 cm	3 ml/h
<i>PCL/Gal</i>	PCL y Galactosa	20 kV	18 cm	3 ml/h
<i>PCL/Pep</i>	PCL y Peptona	20 kV	18 cm	3 ml/h
<i>PCL/Gly</i>	PCL y Glicina	20 kV	18 cm	3 ml/h
<i>PCL/Lev</i>	PCL y Extracto de levadura	20 kV	18 cm	3 ml/h
<i>PCL/Urea</i>	PCL y Urea	20 kV	18 cm	3 ml/h

Para producir el andamio, todas las soluciones se electrohilaban por 1 hora.

3.4 Ensayo de proliferación bacteriana

Para probar el efecto que tienen las fibras sobre los cultivos bacterianos, se hicieron pruebas en placas ELISA en las que se colocaron fibras de PCL y sus variantes de acuerdo a la distribución mostrada en la figura 3.4.1.

En una placa estéril se colocaron muestras de las diferentes fibras por triplicado y se agregaron 150 μ l de caldo nutritivo estéril y 50 μ l del medio ajustado en el apartado 3.2. En otra placa se colocó la misma solución bacteriana, pero sin fibras, como control tal y como se muestra en la figura 3.4.2.

Una vez colocadas las fibras en los pocillos y agregadas las bacterias, las placas resultantes se colocaban en incubadora a 37°C. Ya que el PCL es un material de lenta degradación, no se puede medir directamente en el lector de placas la concentración bacteriana, por lo que cada hora las fibras se retiraban de una posición y se movían a otra para lavarlas con 150 μ l caldo estéril. Una vez realizado esto, las fibras se retiraban y se descartaban. Es decir que, para cada hora, corresponde un lote de tres placas (una por cada cepa a evaluar). Para la medición, se realizaba una agitación de fondo por 10 s y se tomaba el valor de absorbancia a 600 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12										
A																						
B													PCL	PCL	PCL	Glu	Glu	Glu	Lac	Lac	Lac	*
C													Fru	Fru	Fru	Gal	Gal	Gal	Pep	Pep	Pep	*
D													Gly	Gly	Gly	Lev	Lev	Lev	Urea	Urea	Urea	*
E													PCL	PCL	PCL	Glu	Glu	Glu	Lac	Lac	Lac	*
F													Fru	Fru	Fru	Gal	Gal	Gal	Pep	Pep	Pep	*
G													Gly	Gly	Gly	Lev	Lev	Lev	Urea	Urea	Urea	*
H																						

PCL Fibras de PCL
 Glu Fibras de PCL/Glu
 Lac Fibras de PCL/Lac
 Fru Fibras de PCL/Fru
 Gal Fibras de PCL/Gal
 Pep Fibras de PCL/Pep
 Gly Fibras de PCL/Gly
 Lev Fibras de PCL/Lev
 Urea Fibras de PCL/Urea
 * Caldo estéril

Cursivas – Indican donde se colocaron las fibras para su posterior lavado

Fig. 3.4. 1 Distribución de fibras en placa de prueba

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12											
A																							
B													E.C.	*									
C													E.C.	*									
D													P.A.	*									
E													P.A.	*									
F													S.A.	*									
G													S.A.	*									
H																							

E.C. – *E. coli*

P.A. – *P. aeruginosa*

S.A. – *S. aureus*

* - Caldo estéril

Fig. 3.4. 2 Distribución de cepas en la placa de control

3.5 Caracterización de fibras electrohiladas

Se evaluó la morfología de las fibras y las propiedades térmicas del polímero con el fin de observar cambios en las propiedades físicas del polímero que permitan inferir si se

depositaron nuevos compuestos al andamio. Finalmente, se observó en microscopio la evolución de los andamios cuando se hacen interaccionar con los cultivos.

3.5.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

De las fibras fabricadas, se recortaron segmentos de 0.5 cm x 0.5 cm para evaluar la morfología y porosidad de los andamios. Posteriormente se fijaron a colectores con cinta adhesiva metálica y se recubrieron con partículas de oro por medio de pulverización catódica.

Para las muestras con bacterias, se cultivaron bacterias y andamios en tiempos de 3 y 6 horas. Una vez concluido el tiempo, los andamios se recuperaron y se colocaron en portaobjetos previamente bañados en una solución de gelatina al 0.1%. Después, se secaron a temperatura ambiente por un día y finalmente se recubrieron por pulverización.

3.5.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Para observar si ocurrieron cambios químicos después del procesamiento del material a través del electrohilado, se evaluaron en un espectroscopio infrarrojo. Se tomaron muestras de cada andamio fabricado con dimensiones de 0.5 cm x 0.5 cm y se colocaron en el lente del módulo ATR. Se analizaron las muestras en un espectro de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

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

Para el análisis termogravimétrico, se cortaron muestras de los andamios con un peso de alrededor de 5 mg y se colocaron en charolas de platino, estas se calentaron desde temperatura ambiente (cerca de los 25°C) hasta los 600°C con una rampa de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en atmósfera de nitrógeno.

En el caso de la calorimetría diferencial de barrido, se tomaron muestras de la misma manera que para el análisis termogravimétrico, pero en este caso se colocaron en bandejas de platino que posteriormente se prensaron y sellaron. Las muestras se procesaron con las mismas características del análisis termogravimétrico.

3.5.4 Microscopía óptica

Se prepararon suspensiones bacterianas siguiendo la metodología planteada en el apartado 3.2 en tubos de ensayo. Trozos de fibras de 3 cm x 3 cm se colocaron en las paredes de los tubos de ensayo de manera que se adhirieran a las paredes y quedaran sumergidas en la suspensión. Los cultivos se colocaron en incubadora a 37°C; cada hora se recuperaba el andamio y se colocaba en un portaobjetos limpio, el cual se pasaba a una caja Petri para preservar la muestra. Se dejó secar por 24 horas y se observó con los objetivos 10x, 40x y 60x.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

4.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

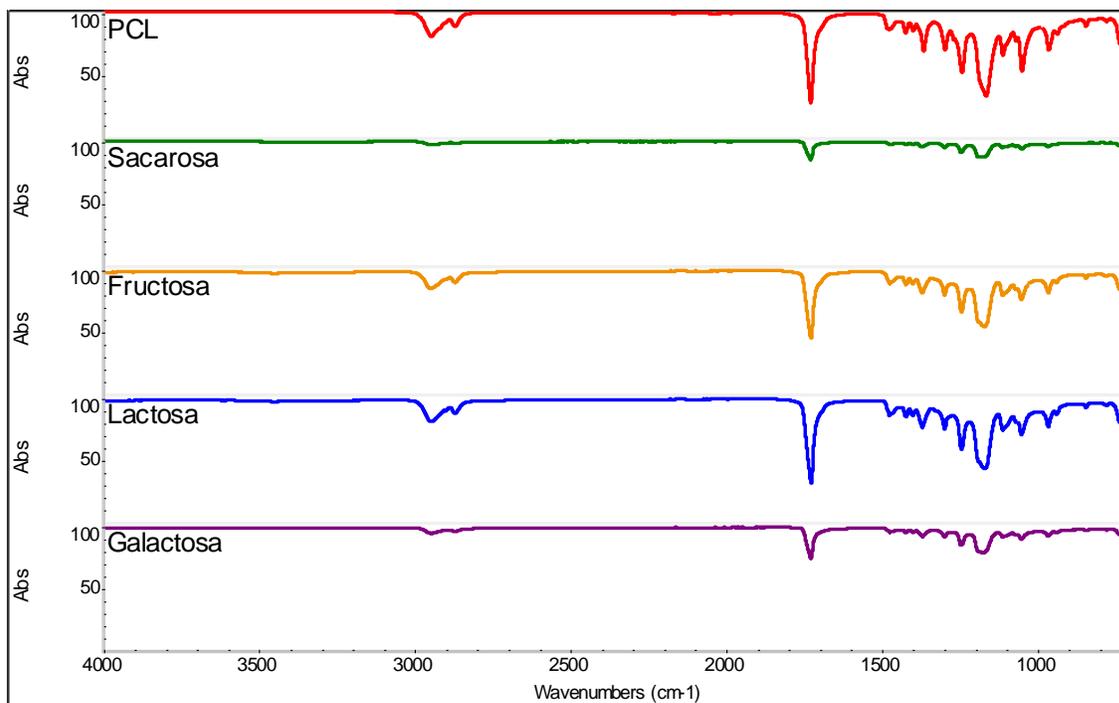


Fig. 4.1. 1 Espectro infrarrojo de PCL y PCL con fuentes de carbono

En la figura 4.1.1 se muestra el espectro infrarrojo de las muestras de PCL y PCL con fuentes de carbono. El grupo -CH₃ terminal presente en las muestras de PCL puro (en rojo) tiene un estiramiento en 2867 cm⁻¹ y el grupo -CH₂ tiene otro estiramiento a 2942 cm⁻¹. El estiramiento del grupo C=O se observa a 1724 cm⁻¹ y el estiramiento del grupo RCOOR' ocurre a 1160 cm⁻¹, características similares ya han sido reportadas (69).

Es posible que, dada la pequeña cantidad de azúcar dentro de la solución de PCL, el equipo no sea capaz de captar las diferencias en el espectro. Este mismo fenómeno puede estar ocurriendo en el espectro de PCL con fuentes de nitrógeno, ya que no se aprecian diferencias significativas que indiquen la presencia de otra sustancia o la modificación del polímero, como se muestra en la figura 4.1.2.

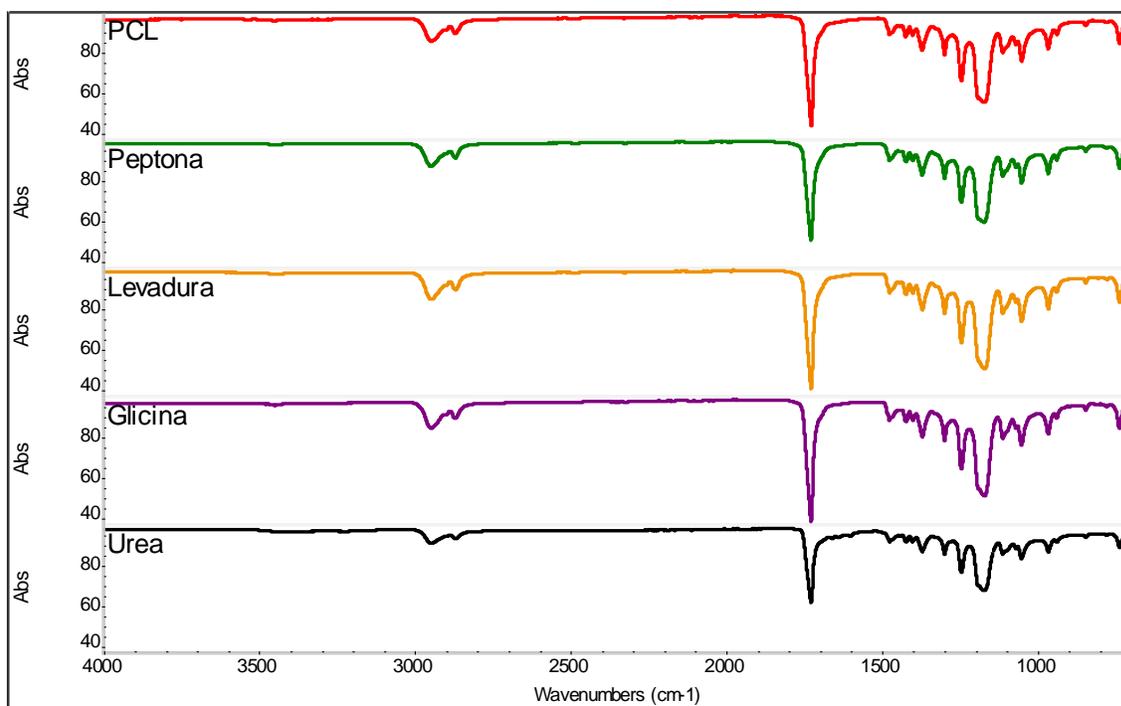


Fig. 4.1. 2 Espectro infrarrojo de PCL y PCL con fuentes de nitrógeno

4.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico de las fibras de PCL y PCL con las fuentes de carbono se observa en la figura 4.2.1. La muestra de PCL inicia su etapa de degradación a los 336.23°C y alcanza una temperatura crítica de degradación a los 388.39°C, un comportamiento que similar a otro reportado (13,70,71). Aunque el cambio de etapas es apenas visible dada la cantidad de azúcar agregada a la muestra, sus efectos pueden verse debido al cambio de temperatura de degradación, generalmente incrementándola. En la combinación de PCL/Lac, el azúcar incremento la temperatura en 13.64°C, este valor es seguido por las fibras de PCL/Glu en 11.28°C, PCL/Gal 10.1°C y PCL/Fru en 5.33°C.

En la figura 4.2.2 se presentan los termogramas de las fibras de PCL y PCL con las fuentes de nitrógeno. Al igual que en los azúcares, las fuentes de nitrógeno también cambian las temperaturas de degradación y el cambio de fases sigue diferentes tipos de comportamiento si se compara con las fibras de PCL/Carbono. La muestra PCL/Pep incrementa la temperatura de degradación en 8.3°C mientras que en PCL/Lev disminuye esta temperatura en 22.02°C, seguido de PCL/Urea con 42.26°C y PCL/Gly con 155.77°C.

Curve 1: PCL

DSC-TGA File: C:\Users\velas\Downloads\PCL.txt

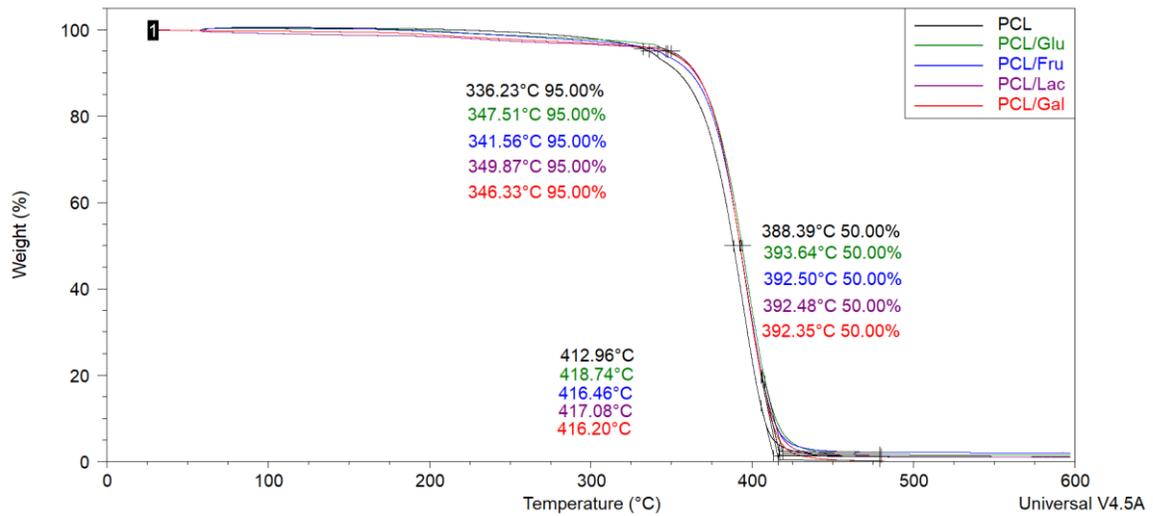


Fig. 4.2. 1 Análisis termogravimétrico de PCL y PCL con fuentes de carbono

Curve 1: PCL

DSC-TGA File: C:\Users\velas\Downloads\PCL.txt

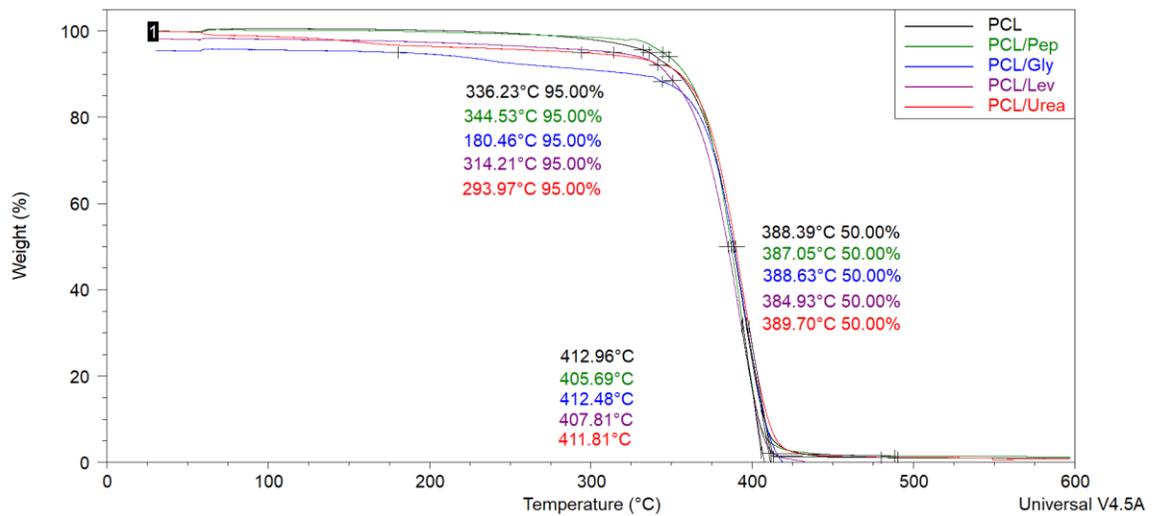


Fig. 4.2. 2 Análisis termogravimétrico de PCL y PCL con fuentes de nitrógeno

Las temperaturas de inicio, críticas y de calcinación se pueden observar en la tabla 4.2.1.

Tabla 4.2. 1 Temperaturas características en el análisis termogravimétrico

<i>Muestra</i>	<i>Inicio de degradación</i>	<i>Temperatura crítica</i>	<i>Temperatura de calcinación</i>
<i>PCL</i>	336.23°C	388.39°C	412.96°C
<i>PCL/Glu</i>	347.51°C	393.64°C	418.74°C
<i>PCL/Fru</i>	341.56°C	392.50°C	416.46°C
<i>PCL/Lac</i>	349.87°C	392.48°C	417.08°C
<i>PCL/Gal</i>	346.33°C	392.35°C	416.20°C
<i>PCL/Pep</i>	344.53°C	387.05°C	405.69°C
<i>PCL/Gly</i>	180.46°C	388.63°C	412.48°C
<i>PCL/Lev</i>	341.21°C	384.93°C	407.81°C
<i>PCL/Urea</i>	293.97°C	389.70°C	411.81°C

4.3 Calorimetría Diferencial de Barrido

En la figura 4.3.1 se muestran los termogramas de las muestras de PCL y PCL con fuentes de carbono. Como ya se ha reportado anteriormente (72), este tiene un punto de fusión alrededor de los 60°C. De acuerdo al termograma, la muestra tiene un punto de fusión a los 63.55°C y la adición de las fuentes de carbono reduce este valor, pasándolo a un rango entre 61.61°C a 62.44°C, posiblemente indicando no solo la fusión del material sino la evaporación del solvente, dadas las bajas temperaturas a las que ocurren estos fenómenos. El próximo evento relevante en el termograma ocurre a los 360°C, indicando la fase de descomposición del material, la cual ya ha sido reportada (71), alcanzando un pico en todas las muestras a los 398°C aproximadamente, teniendo pequeñas variaciones entre una y otra muestra.

La figura 4.3.2 muestra los termogramas de las muestras de PCL y PCL con fuentes de nitrógeno. Al igual que en las muestras con fuentes de carbono, la presencia de estas, reduce la temperatura de fusión del material, pasando a un rango entre 60.73°C y 62.92°C. La muestra de PCL/Urea es la que más rápido alcanza la fase de descomposición a los 351.89°C, seguida de PCL/Lev a 355.44°C, PCL/Gly con 358.68°C y finalmente PCL/Pep a los 362.13°C.

Las temperaturas de fusión e inicio de descomposición se muestran en la tabla 4.3.1.

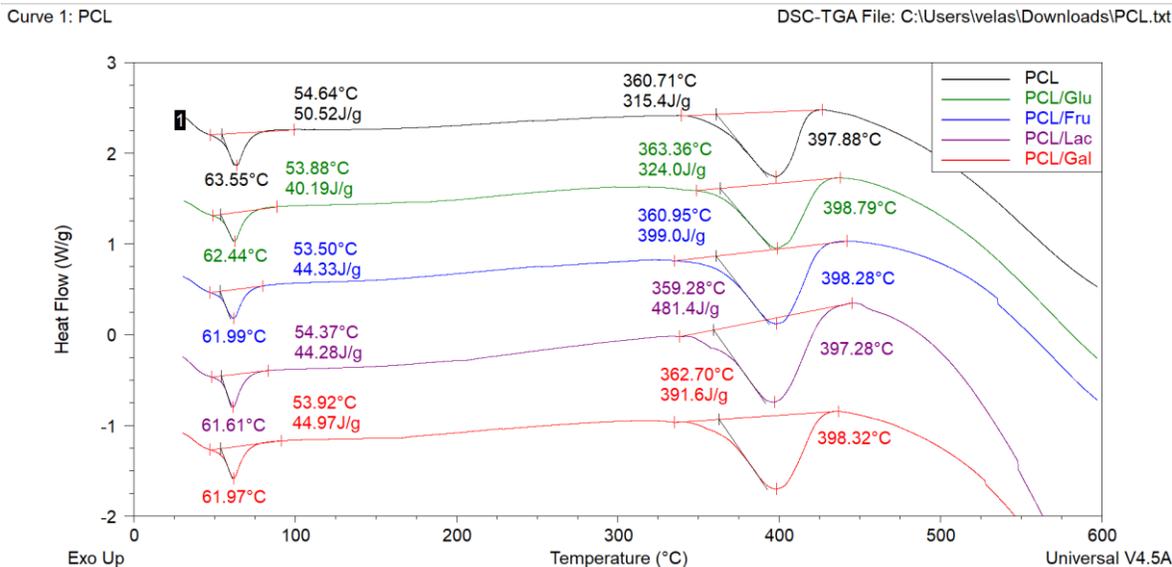


Fig. 4.3. 1 Calorimetría Diferencial de Barrido de PCL y PCL con fuentes de carbono

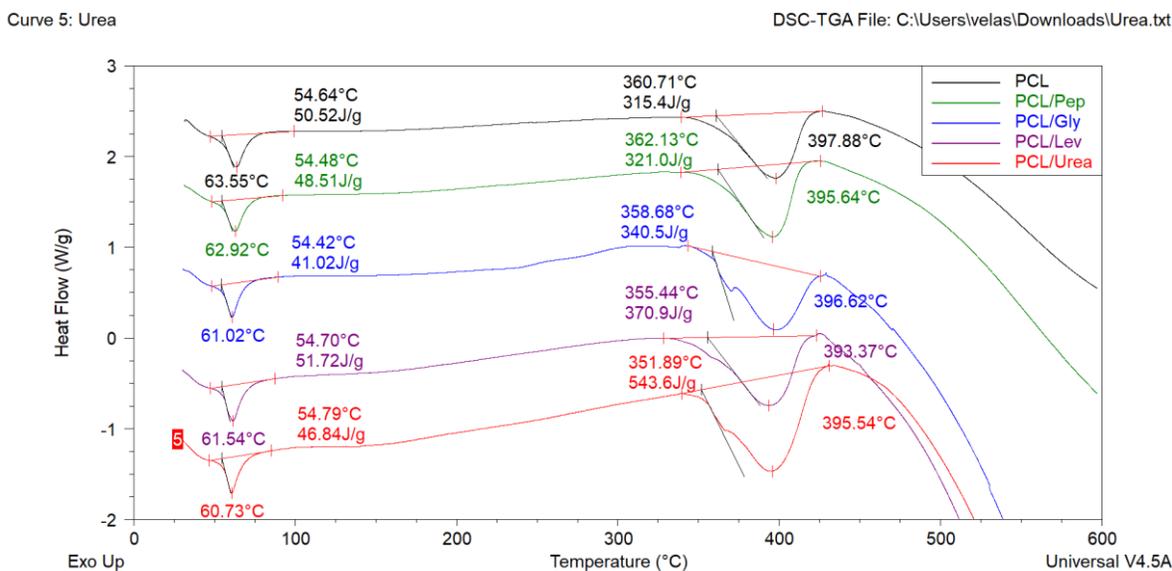


Fig. 4.3. 2 Calorimetría Diferencial de Barrido de PCL y PCL con fuentes de nitrógeno

Tabla 4.3. 1 Temperaturas características de la calorimetría diferencial de barrido

Muestra	Temperatura de fusión	Inicio de descomposición
PCL	63.55°C	360.71°C
PCL/Glu	62.44°C	363.36°C
PCL/Fru	61.99°C	360.95°C
PCL/Lac	61.61°C	359.28°C
PCL/Gal	61.97°C	362.70°C
PCL/Pep	62.92°C	395.64°C
PCL/Gly	61.02°C	396.62°C
PCL/Lev	61.54°C	393.37°C
PCL/Urea	60.73°C	395.54°C

4.4 Ensayo de proliferación bacteriana

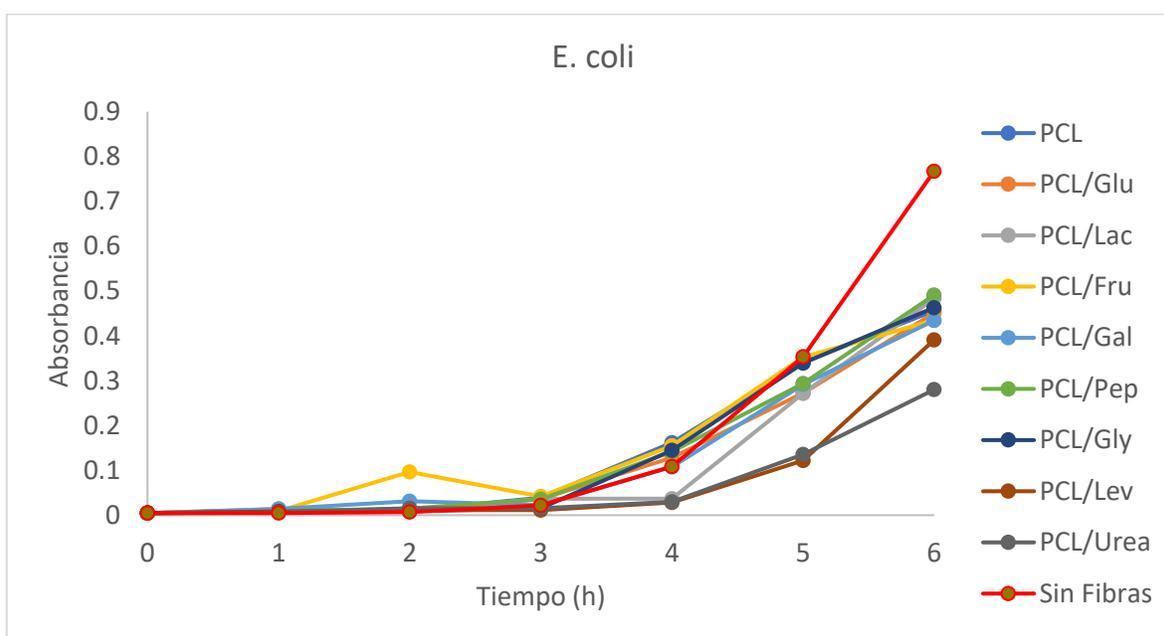


Fig. 4.4. 1 Ensayo de proliferación de E. coli

En la figura 4.4.1 se muestra la curva de crecimiento de *E. coli* con y sin fibras. En el caso de *E. coli*, la presencia no tuvo impacto en cuanto al mejorar el crecimiento de *E. coli*. Puede verse que las fibras reducen el crecimiento en un 50% comparando el cultivo sin fibras contra las fibras de PCL/Pep, siendo esta muestra la que mejor desempeño muestra de todas las combinaciones. Estos resultados son similares a un estudio publicado previamente (11) donde se analizaron las capacidades que tienen las fibras electrohiladas de PAA, PAA/Chitosán y PAA/Alginato para promover el crecimiento de actinomicetos y *E. coli*. Se determinó que las fibras pueden promover el crecimiento de los actinomicetos analizados,

pero no de *E. coli*. Aunque se emplearon para el estudio diferentes medios de cultivo y diferentes polímeros, los resultados entre ambos estudios muestran una dramática reducción en la concentración celular comparada con las muestras de control.

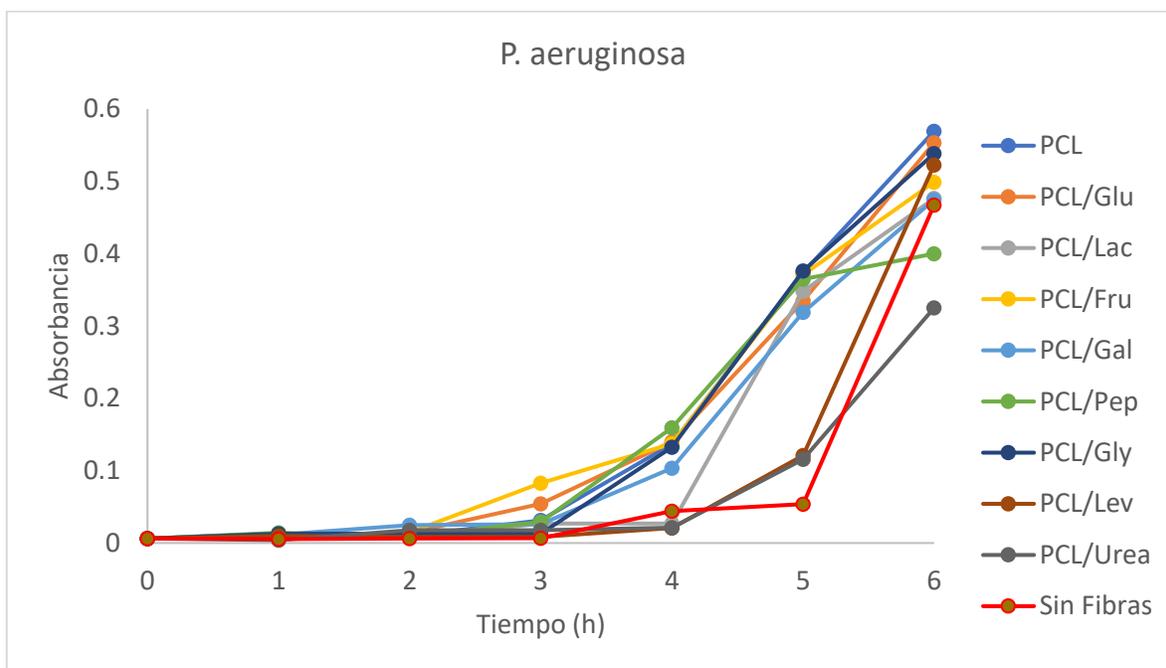


Fig. 4.4. 2 Ensayo de proliferación de *P. aeruginosa*

Mientras que en *E. coli* no se observa un cremento en el crecimiento bacteriano, tanto en *P. aeruginosa* (fig. 4.4.2) como en *S. aureus* (fig. 4.4.3) se pudo observar una mejoría en el desempeño del cultivo. En el caso de las fibras de *P. aeruginosa*, se puede observar de un incremento de 22% aproximadamente en la concentración bacteriana al usar las fibras de PCL, mientras que las fibras de PCL/Urea y PCL/Peptona mostraron un desempeño inferior al cultivo de control.

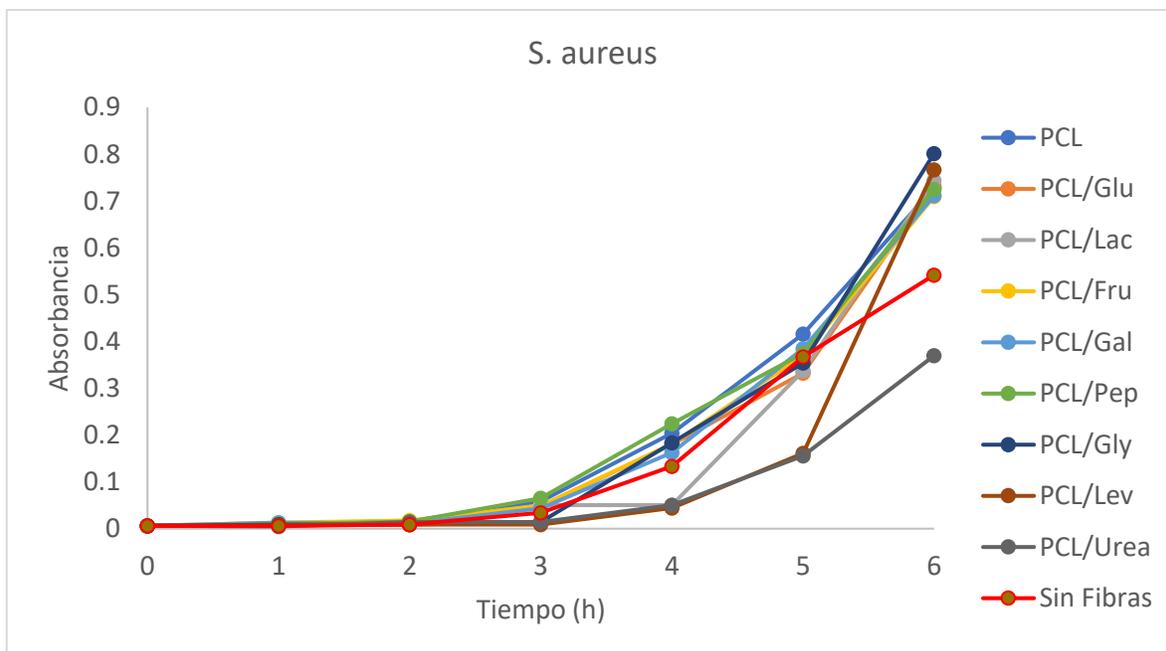


Fig. 4.4. 3 Ensayo de proliferación de *S. aureus*

S. aureus fue la cepa que mejores resultados reportó en cuanto al incremento en la concentración bacteriana. Al ponerse en contacto con las fibras de PCL/Gly, la concentración incremento en un 48% respecto al cultivo de control. Las fibras de PCL/Urea, al igual que en *P. aeruginosa*, entorpecieron el cultivo comparado al cultivo de control.

Moffa *et al.* (12) mostró que es posible optimizar el rendimiento de cultivos en la producción de metabolitos secundarios utilizando andamios electrohilados a partir de *Streptomyces lividans*. El reporte indica que la cepa utilizada en sus experimentos parecía preferir un soporte fibroso que el soporte de vidrio que ofrece el matraz y que posiblemente utiliza el andamio como sitio de anclaje donde puede generar micelios. Se sabe que la movilidad de *S. aureus* es reducida en comparación con *E. coli* y *P. aeruginosa*, sin embargo, es posible que la movilidad entre cepas contribuya de cierta manera al desempeño de los cultivos con las fibras, aunque también se debe tomar en cuenta el efecto de la porosidad en *P. aeruginosa* (47) y como el posible ajuste de este parámetro podría conducir a cultivos que puedan tener el mismo potencial que *S. aureus*.

Un resumen de todos los valores de concentración y el porcentaje de cambio respecto al control de todas las cepas, se puede observar en la tabla 4.4.1.

Tabla 4.4. 1 Valores de concentración bacteriana a las seis horas de incubación

<i>Muestra</i>	<i>Cepa</i>	<i>Absorbancia (6 horas)</i>	<i>Porcentaje de cambio</i>
<i>Control</i>	<i>E. coli</i>	0.767	
<i>PCL</i>		0.456	-40.54%
<i>PCL/Glu</i>		0.451	-41.19%
<i>PCL/Fru</i>		0.435	-43.28%
<i>PCL/Lac</i>		0.483	-37.02%
<i>PCL/Gal</i>		0.434	-43.41%
<i>PCL/Pep</i>		0.491	-35.98%
<i>PCL/Gly</i>		0.463	-39.63%
<i>PCL/Lev</i>		0.391	-49.02%
<i>PCL/Urea</i>		0.280	-63.49%
<i>Control</i>		<i>P. aeruginosa</i>	0.467
<i>PCL</i>	0.569		21.84%
<i>PCL/Glu</i>	0.553		18.41%
<i>PCL/Fru</i>	0.499		6.85%
<i>PCL/Lac</i>	0.476		1.92%
<i>PCL/Gal</i>	0.475		1.71%
<i>PCL/Pep</i>	0.400		-14.34%
<i>PCL/Gly</i>	0.538		15.20%
<i>PCL/Lev</i>	0.523		11.99%
<i>PCL/Urea</i>	0.325		-30.40%
<i>Control</i>	<i>S. aureus</i>		0.542
<i>PCL</i>		0.728	34.31%
<i>PCL/Glu</i>		0.732	35.05%
<i>PCL/Fru</i>		0.710	30.99%
<i>PCL/Lac</i>		0.744	37.26%
<i>PCL/Gal</i>		0.712	31.36%
<i>PCL/Pep</i>		0.725	33.76%
<i>PCL/Gly</i>		0.802	47.97%
<i>PCL/Lev</i>		0.767	41.51%
<i>PCL/Urea</i>		0.370	-31.73%

4.5 Microscopía Óptica

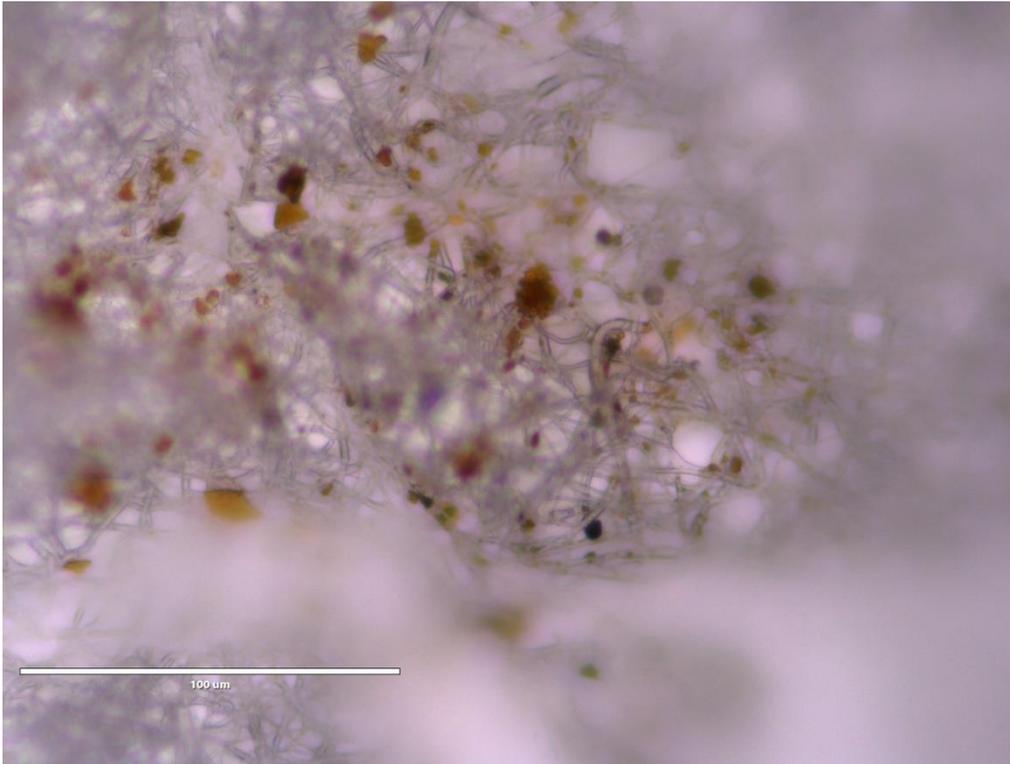


Fig. 4.5. 1 Cultivo en microscopio a 40X en fibras - Hora 1

En la figura 4.5.1 se observa la imagen en microscopio de fibras de PCL después de primera hora de estar sumergidas en suspensión bacteriana. Se pueden ver muchas colonias asentadas con formas irregulares, fijadas en las fibras o en los poros formados por las mismas. Estas colonias solo parecen extenderse en forma bidimensional. Un acercamiento, como se aprecia en la figura 4.5.2, no muestra nuevas características en el cultivo, mas allá de las que se aprecian en la figura 4.5.1

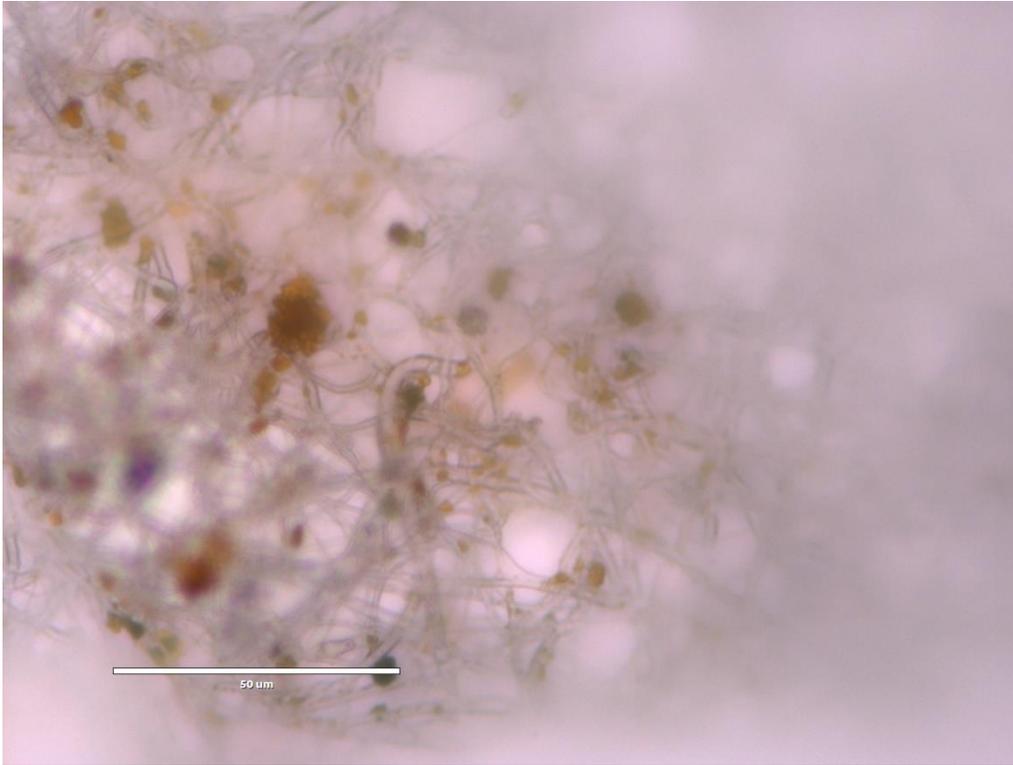


Fig. 4.5. 2 Cultivo en microscopio a 60X en fibras - Hora 1

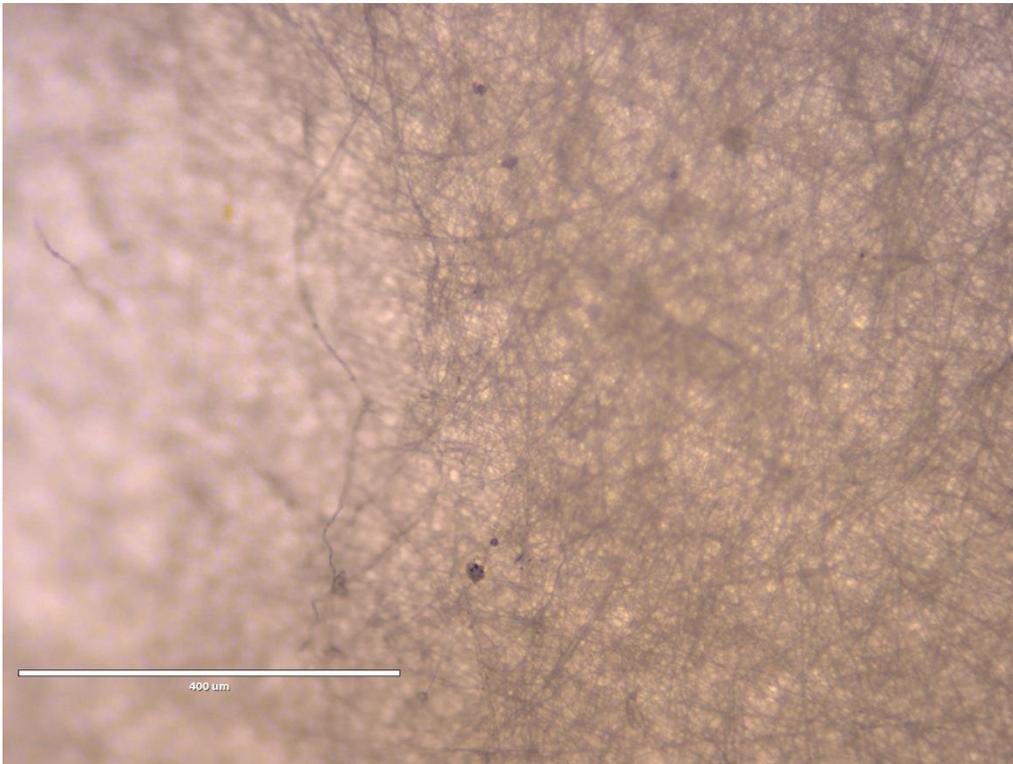


Fig. 4.5. 3 Cultivo en microscopio a 10X en fibras - Hora 2

En la figura 4.5.3 se muestra un cultivo sobre fibras a las dos horas de incubación. Aunque se aprecian algunas colonias dispersas en las fibras. El acercamiento en la figura 4.5.4 muestra que el cultivo se dispersa de manera horizontal, generando una placa traslúcida. Tanto en las colonias pequeñas a la izquierda como en la colonia más grande, se observan sombras amorfas que parecen estar encima de la placa principal

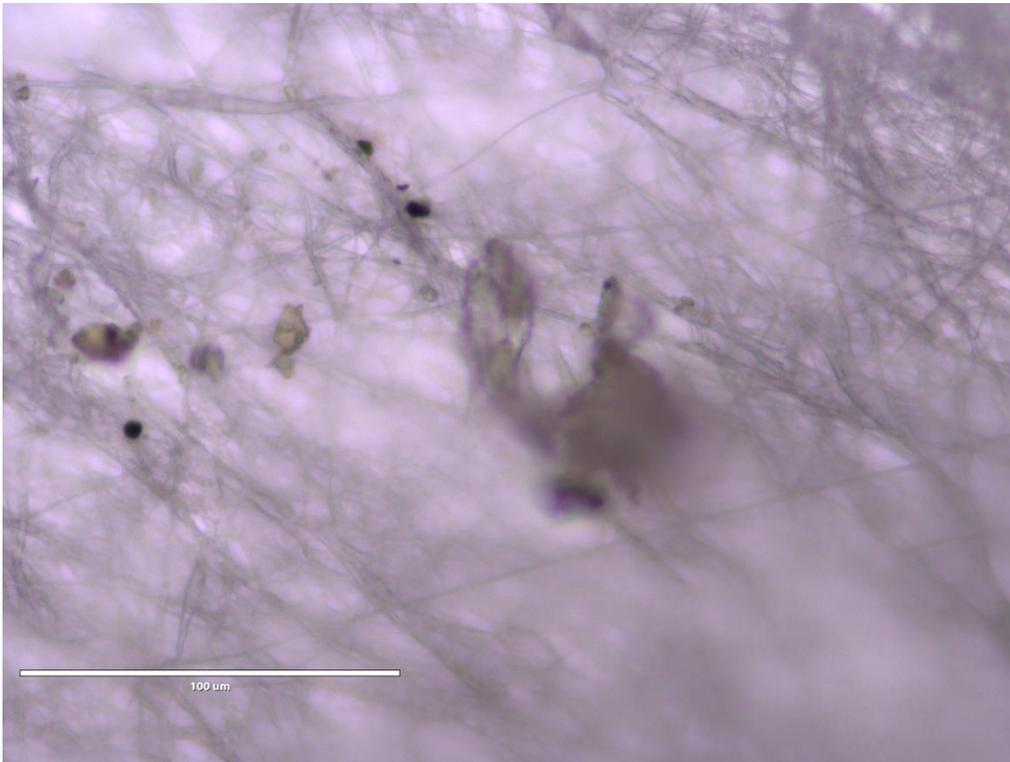


Fig. 4.5. 4 Cultivo en microscopio a 40X en fibras - Hora 2

Un cambio en el plano del microscopio (fig. 4.5.5), muestra que no solo hay un crecimiento horizontal, sino vertical. Esta forma de crecimiento nos muestra la forma en la que se empieza a generar un biofilme en las fibras, tal como se habló en el apartado 2.5. Las placas traslúcidas serían las sustancias exopoliméricas y en la forma en la que se va generando esta placa, casi no se muestran células independientes (fig. 4.5.6).

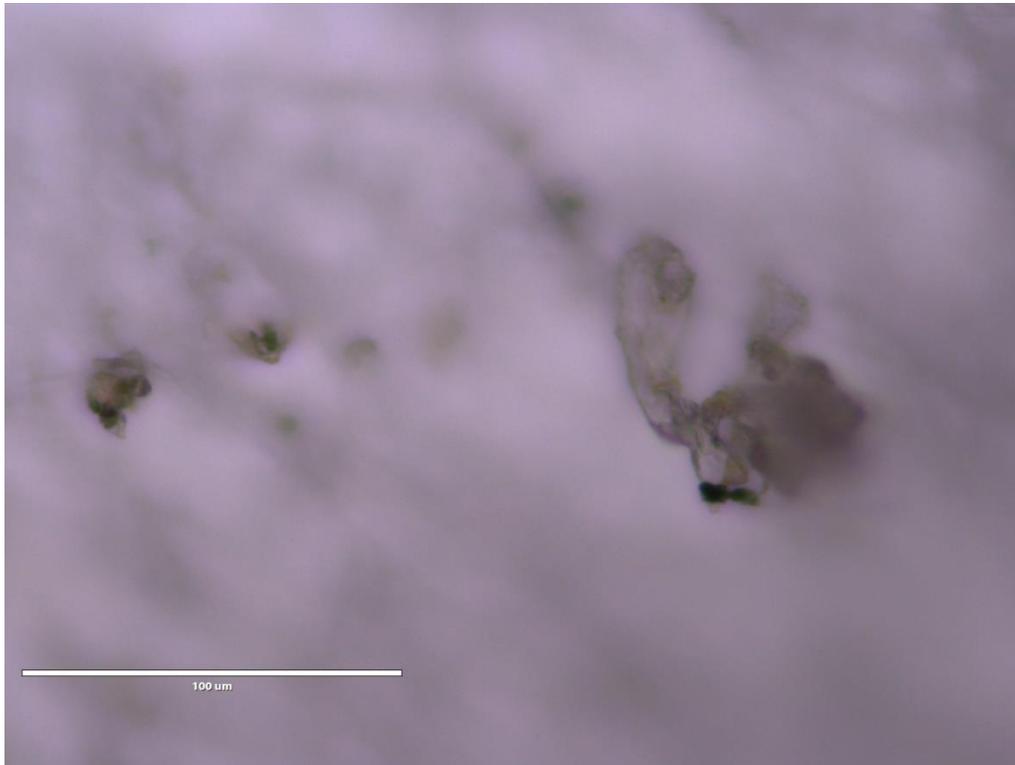


Fig. 4.5. 5 Cambio de plano a 40X en fibras - Hora 2



Fig. 4.5. 6 Cultivo en microscopio a 60X en fibras - Hora 2

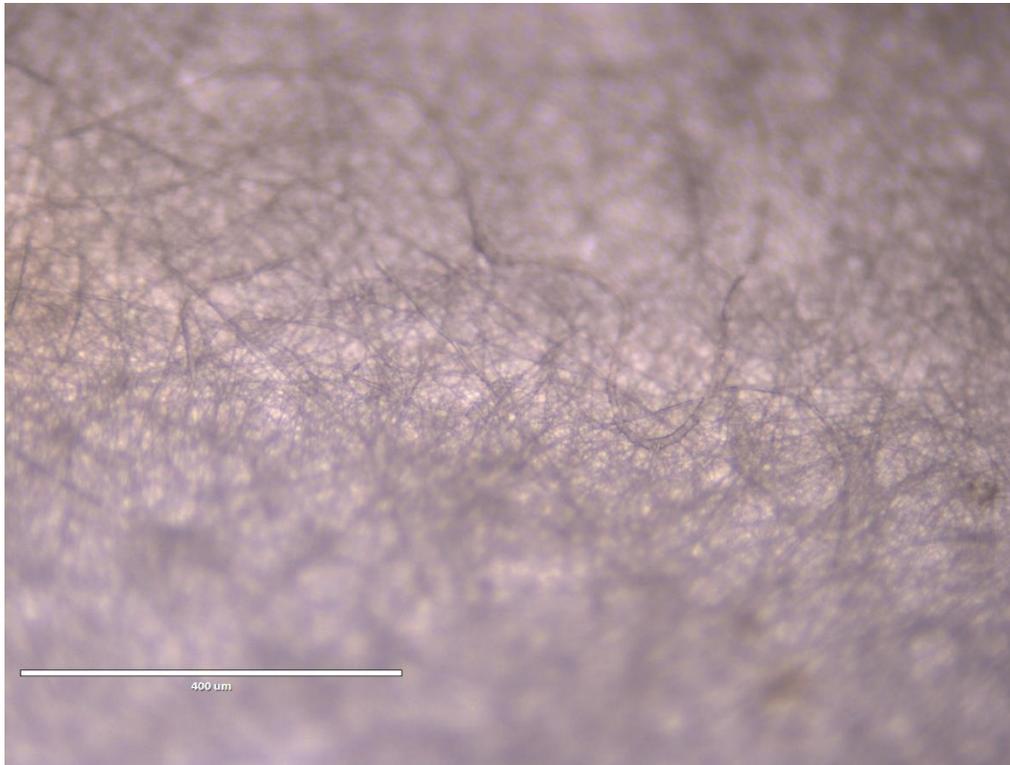


Fig. 4.5. 7 Cultivo en microscopio a 10X en fibras - Hora 3

Hacia la tercera hora, aparecen más colonias, pero no se presentan directamente sobre la superficie, esto se puede apreciar mejor en las figuras 4.5.8, 4.5.9 y 4.5.10.

Las colonias siguen su crecimiento tridimensional, de manera que van uniendo las fibras, dispersándose por el andamio. En la figura 4.5.10, en el centro, se puede apreciar como la colonia va formando una especie de hongo; dicha observación se confirma en la figura 4.5.11. También se observan las diferentes formas en las que se expresa el biofilme, ya sea que inicie la fijación en los poros o en la superficie de las fibras y posteriormente se extienden hasta alcanzar otra fibra.



Fig. 4.5. 8 Cultivo en microscopio a 40X en fibras - Hora 3

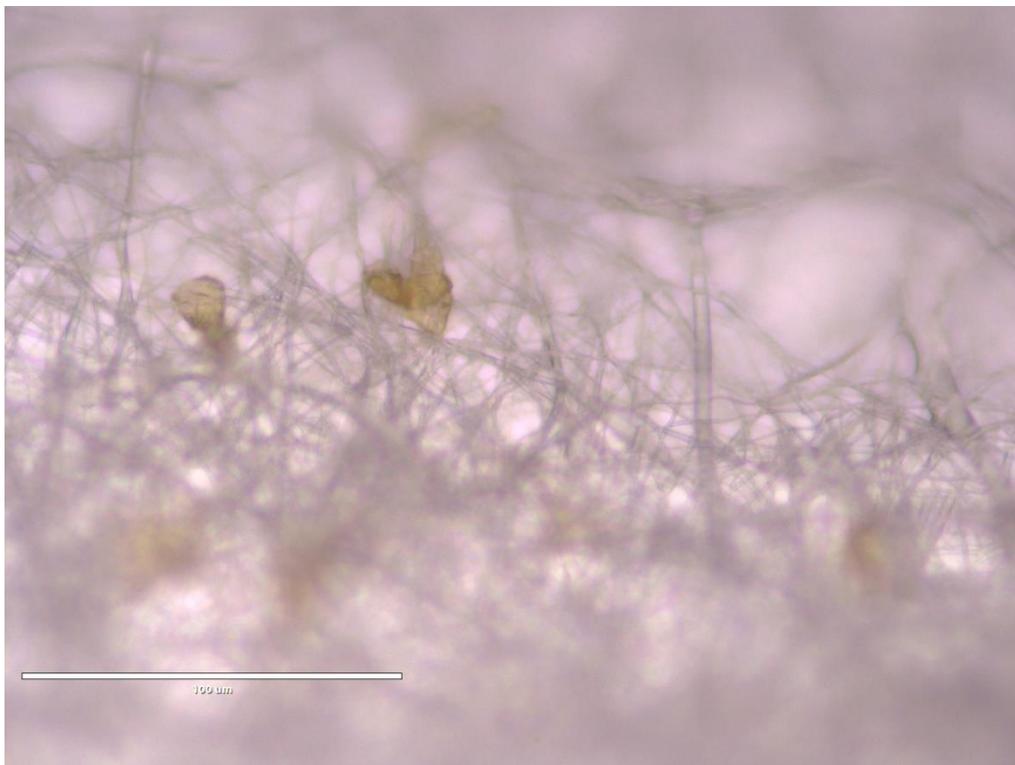


Fig. 4.5. 9 Segunda observación a 40X en fibras - Hora 3



Fig. 4.5. 10 Tercera observación a 40X en fibras - Hora 3

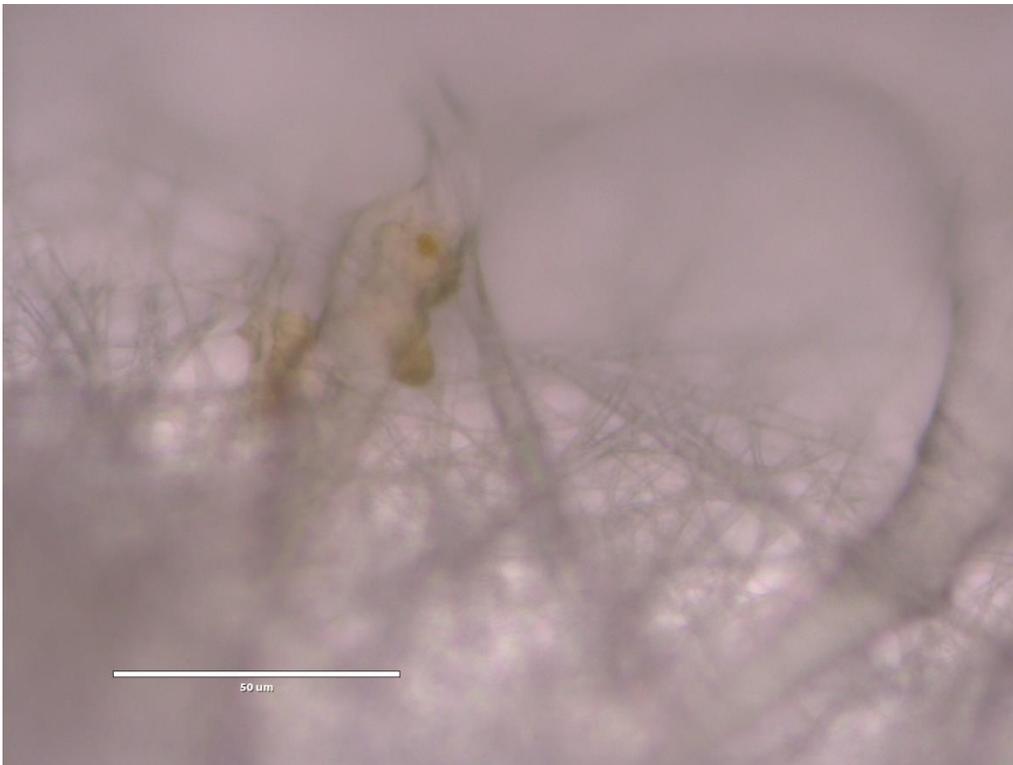


Fig. 4.5. 11 Cultivo en microscopio a 60X en fibras - Hora 3

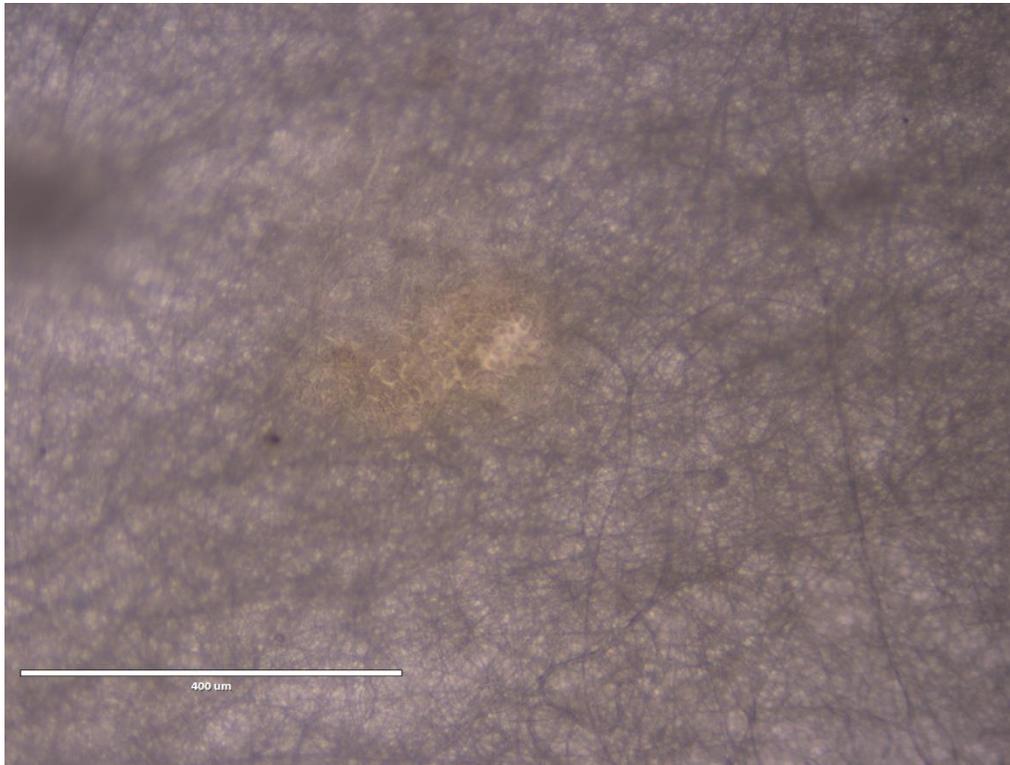


Fig. 4.5. 12 Cultivo en microscopio a 10X en fibras - Hora 5

En la quinta hora (fig. 4.5.12), ya se puede observar la sólida formación de una placa bacteriana. Un acercamiento a las fibras, muestra que el núcleo del biofilme cubre totalmente el andamio, llenando los poros y extendiéndose por las fibras. La colonia se extiende a sobre las fibras, ramificándose sobre la estructura. Esta forma de dispersión podría ser la que favorece el crecimiento de las bacterias con los andamios , confirmando el reporte de Moffa *et al.* (12), agregando que no solo las bacterias que producen micelios, sino la forma de dispersión de las bacterias juega un papel en la dinámica establecida entre bacterias y andamios.

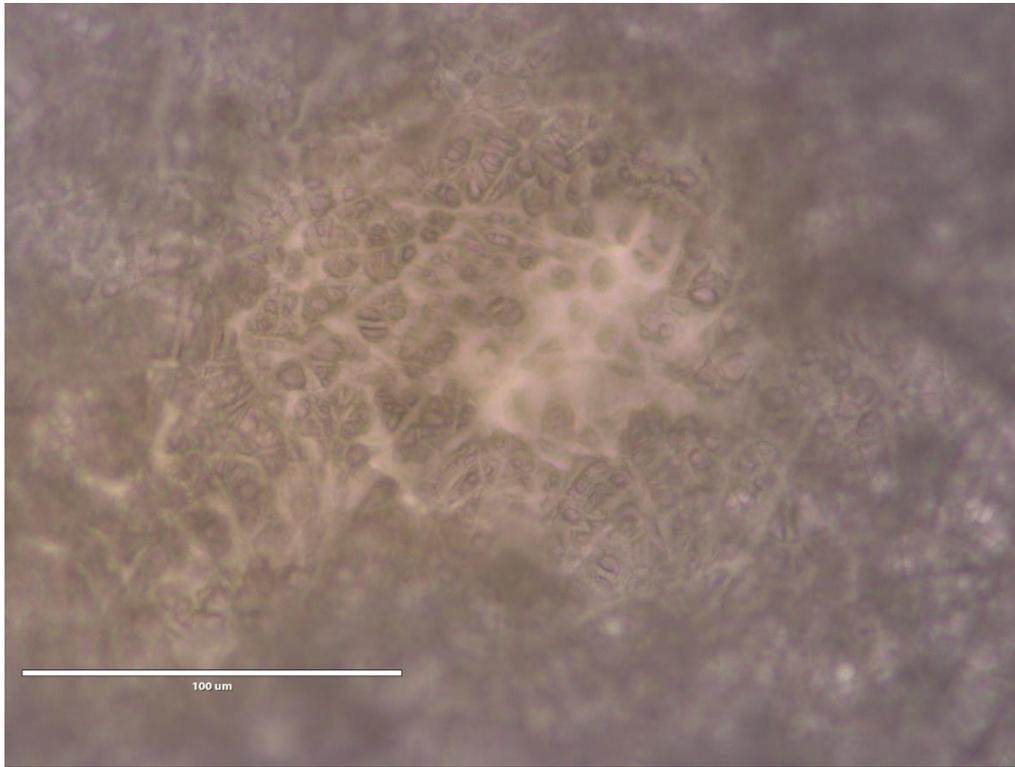


Fig. 4.5. 13 Cultivo en microscopio a 40X en fibras - Hora 5

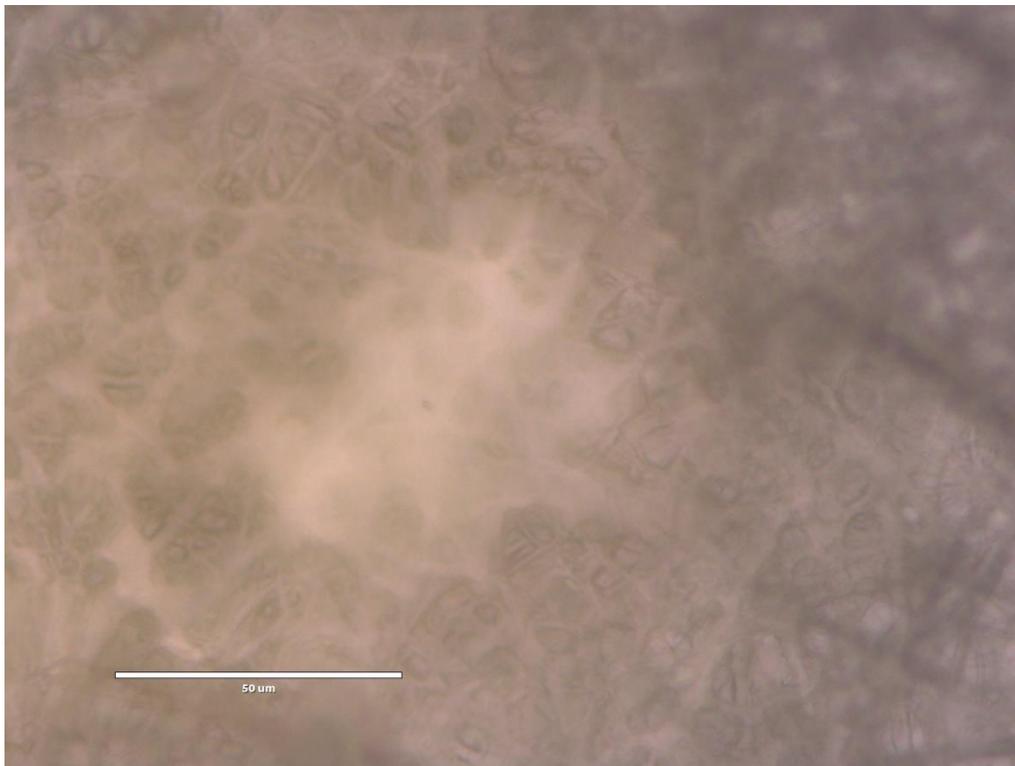


Fig. 4.5. 14 Cultivo en microscopio a 60X en fibras - Hora 5

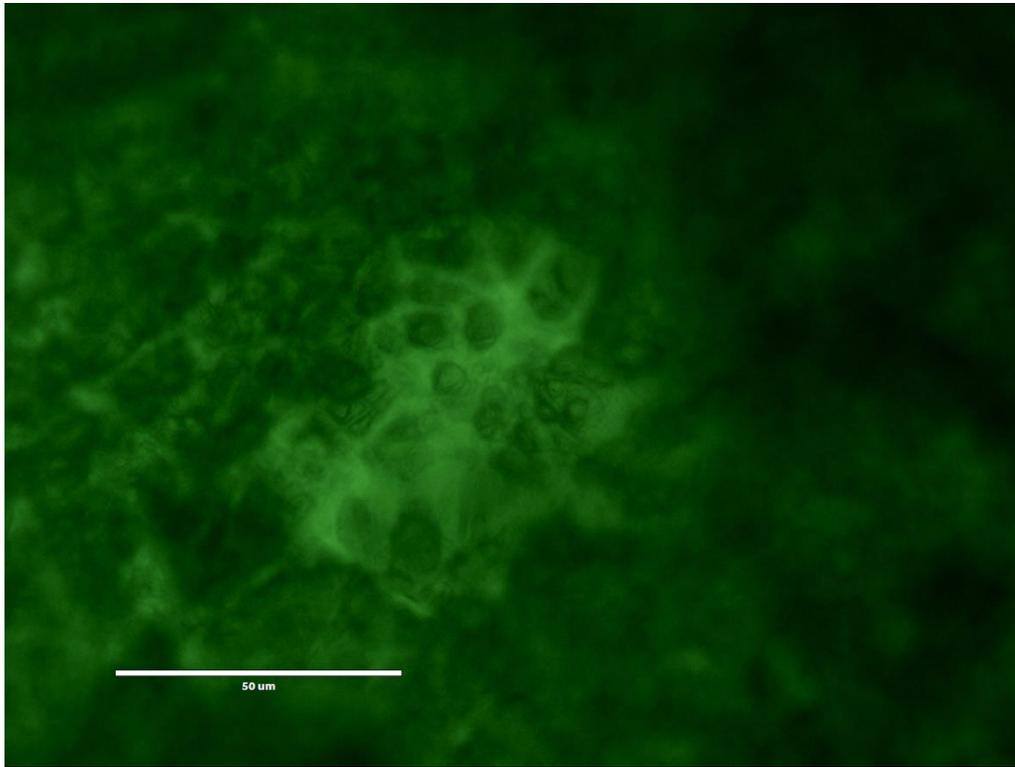


Fig. 4.5. 15 Cultivo en filtro verde a 60X en fibras - Hora 5

4.6 Microscopía Electrónica de Barrido

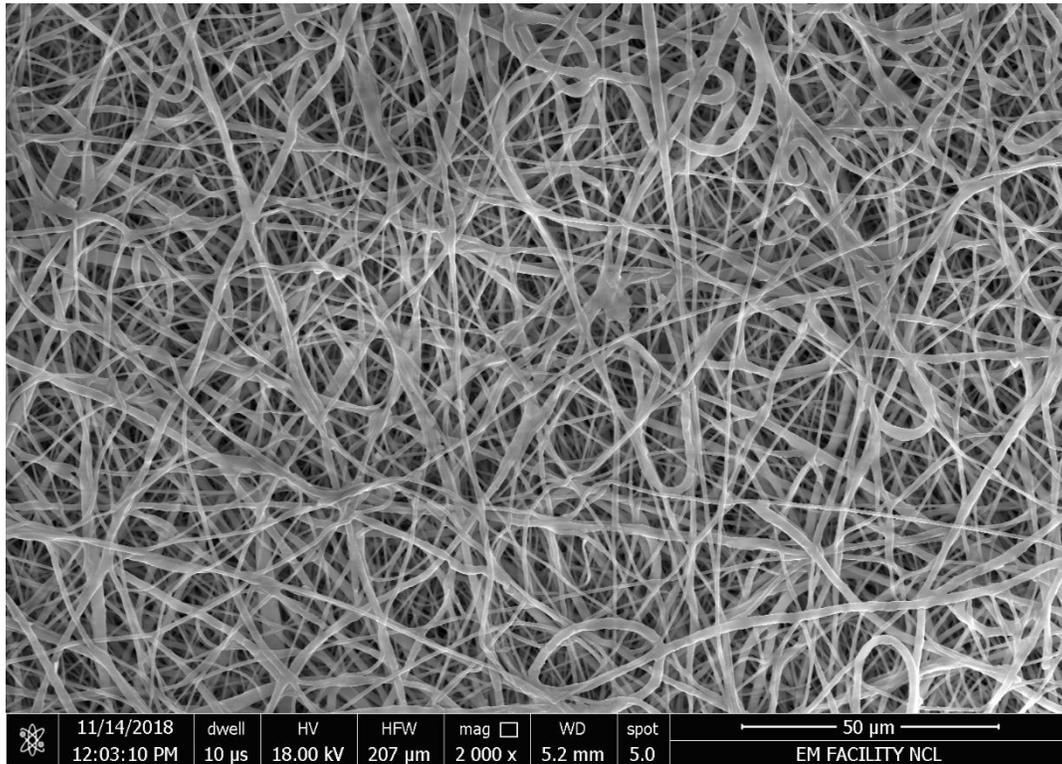


Fig. 4.6. 1 Fibras de PCL a 2,000X

En la figura 4.6.1, se muestra un andamio de PCL. Las fibras tienen una apariencia medianamente uniforme. En ciertos puntos las fibras cambian de ser gruesas a ser delgadas y muestran algunos ligeros defectos en su morfología.

Un acercamiento al material en las figuras 4.6.2 y 4.6.3, muestran que no todos los defectos se deben a la fabricación sino al estado del material, que empezó a fundirse consigo mismo, posiblemente debido a los cambios en las condiciones ambientales y de transporte del material.

El diámetro promedio de las fibras es de 984 ± 241 nm con un porcentaje de porosidad de 44.31% aproximadamente.

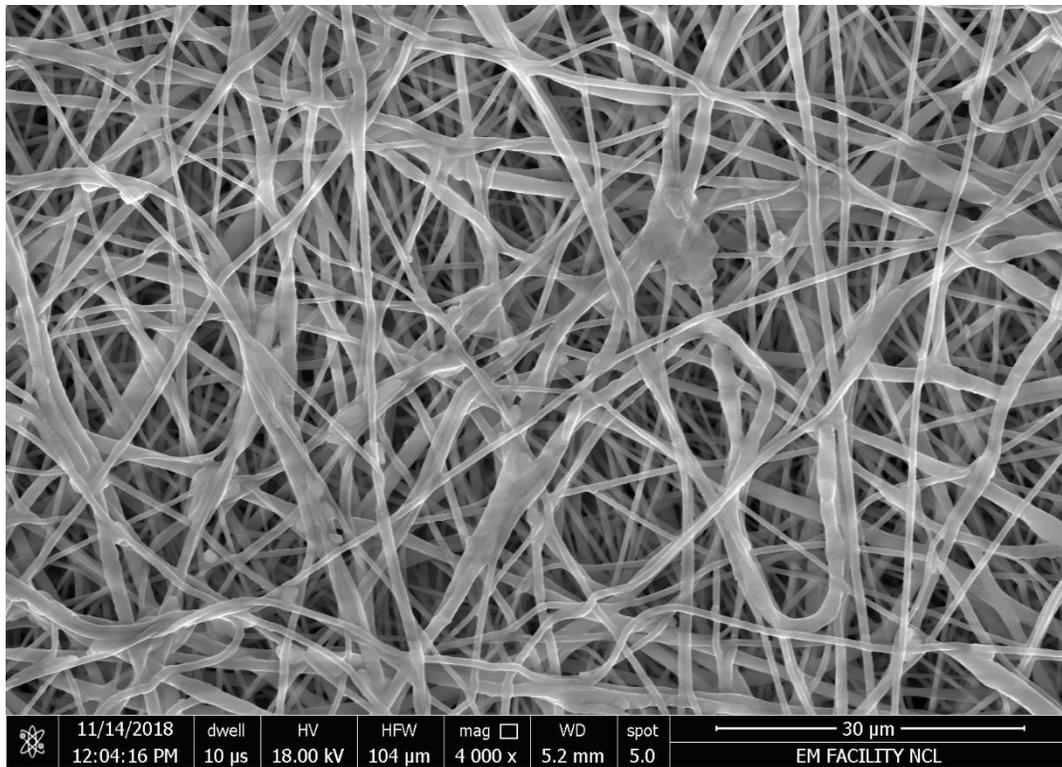


Fig. 4.6. 2 Fibras de PCL a 4,000X

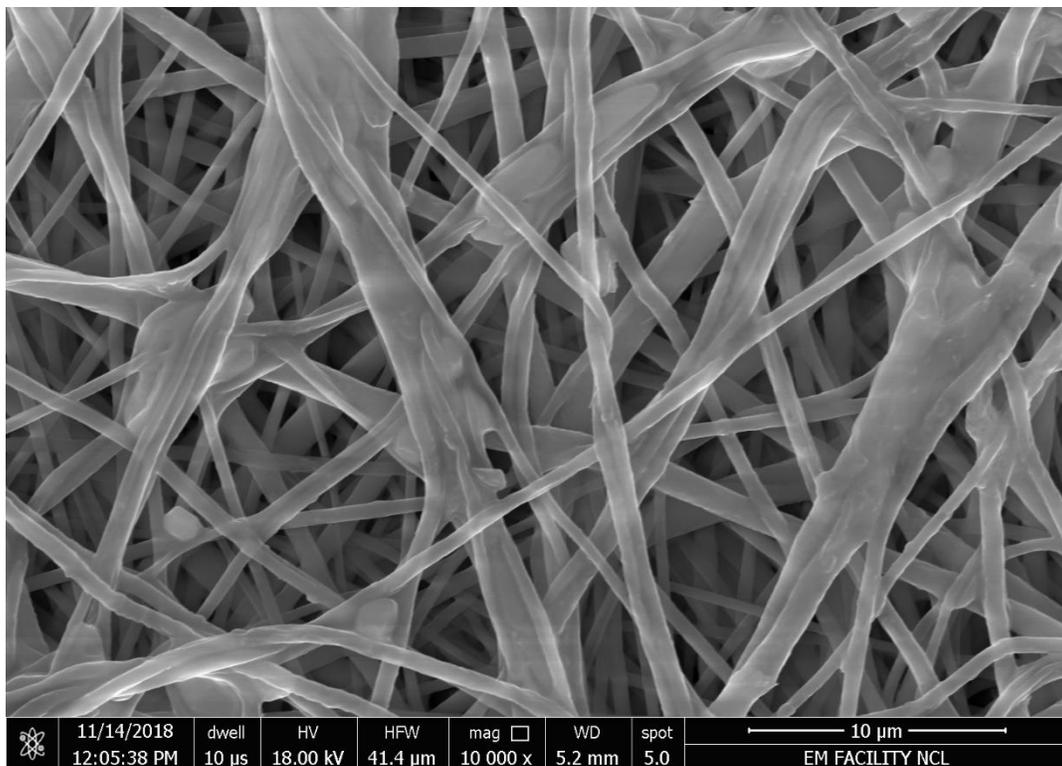


Fig. 4.6. 3 Fibras de PCL a 6,000X

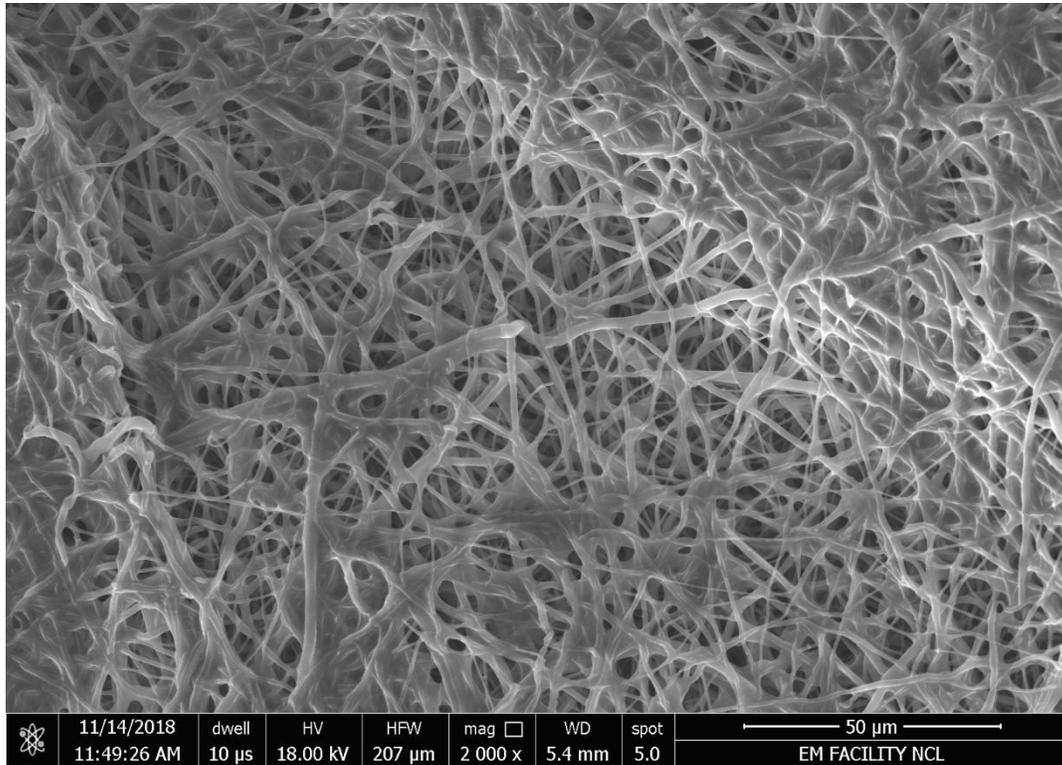


Fig. 4.6. 4 Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 2,000X – 3 horas

La figura 4.6.4 muestra a fibras en cultivo bacteriano en medio de sales mínimas. A las tres horas, se empiezan a desarrollar una clase de recubrimiento que empieza a cubrir los poros y une las fibras, posiblemente indicando el desarrollo del biofilme en el andamio. Al evaluar las imágenes en 4,000X y 6,000X (fig. 4.6.5 y 4.6.6 respectivamente), el recubrimiento solo parece traslúcido y amorfo.

En la parte superior de la figura 4.6.6, se puede observar una formación irregular en capas sobre la fibra, este comportamiento es similar al observado en la figura 4.5.6. También se pueden observar algunos cúmulos sobre las fibras, con forma de pequeñas esferas.

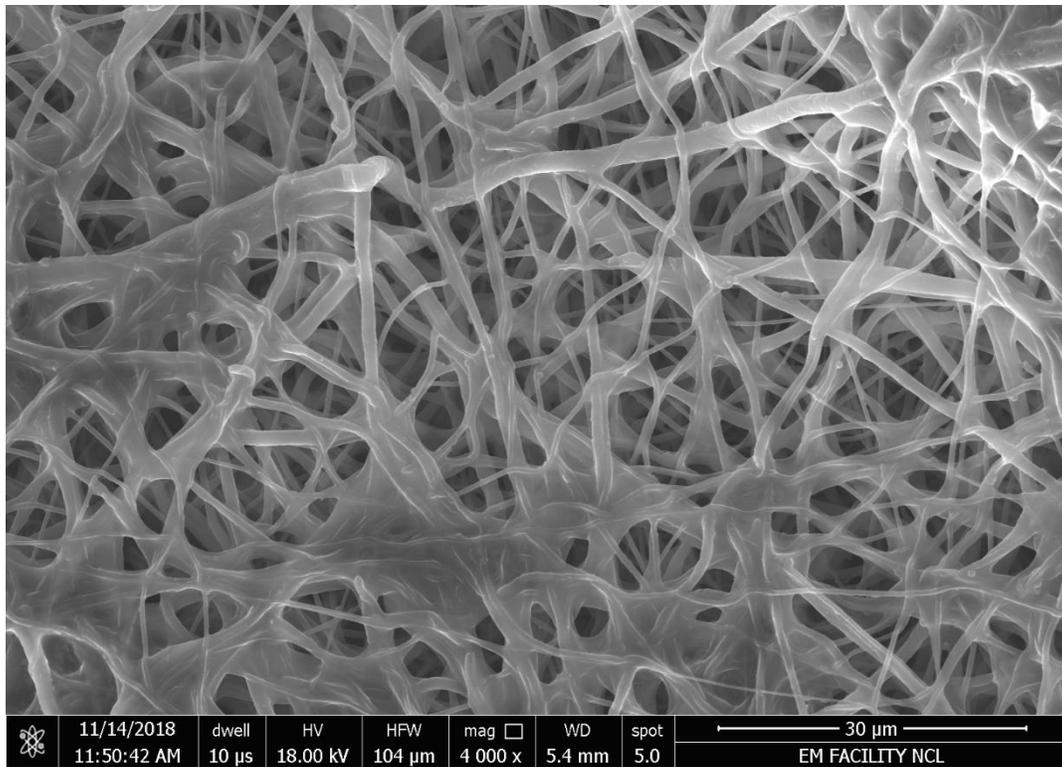


Fig. 4.6. 5 Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 4,000X – 3 horas

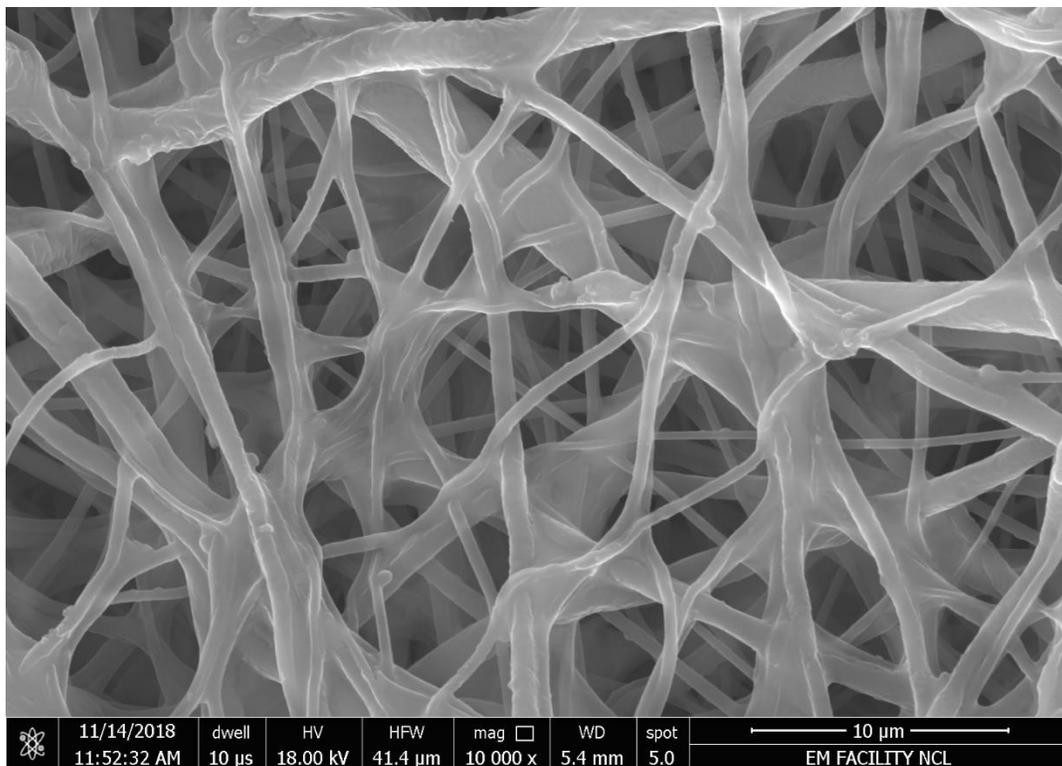


Fig. 4.6. 6 Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 10,000X – 3 horas

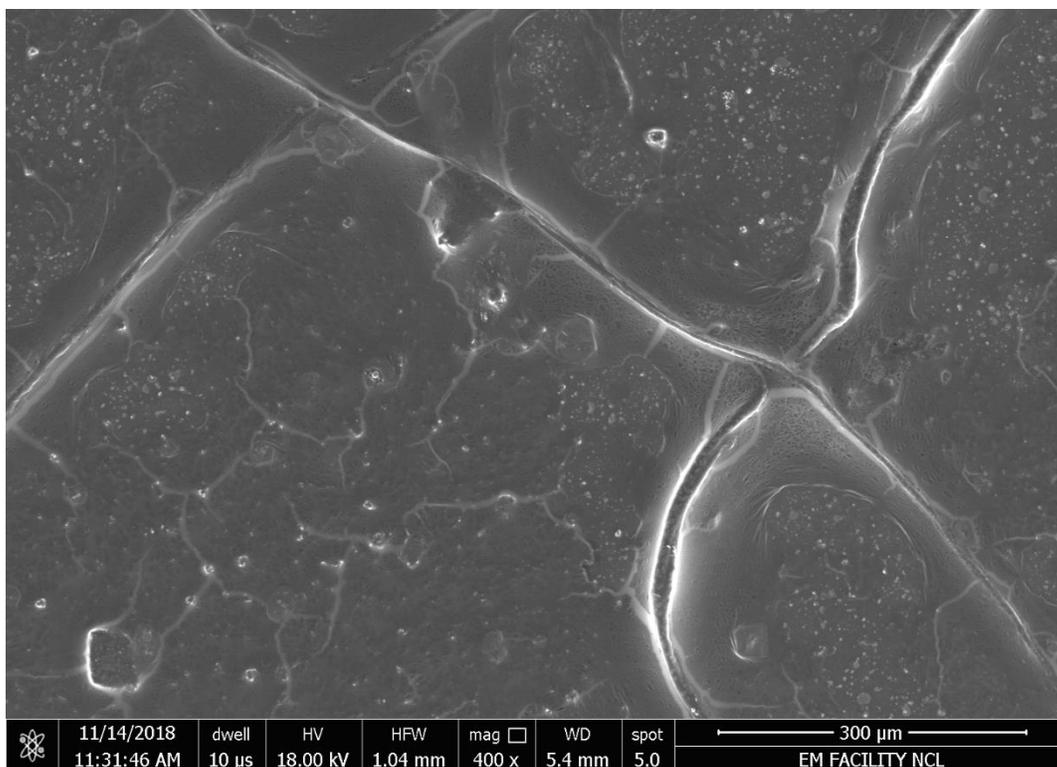


Fig. 4.6. 7 Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 400X - 6 horas

A las seis horas, el andamio ha “desaparecido” y solo parecen quedar las fibras más gruesas en la superficie.

El relieve del filme es interesante. En las figuras 4.6.8, 4.6.9 y 4.6.10, se observa una topología irregular en la que ya no se observa rastro alguno de las fibras, en las secciones donde ya no se aprecia filme, se pueden ver formaciones de cristales que muy probablemente son las sales del medio en las que se encontraban sumergidas las fibras.

La figura 4.6.11 muestra ahora fibras de PCL en un cultivo con caldo nutritivo a las tres horas. Al igual que en la figura 4.6.4, se logra apreciar una formación muy nítida de una placa, la cual parece distorsionar la forma de las fibras.

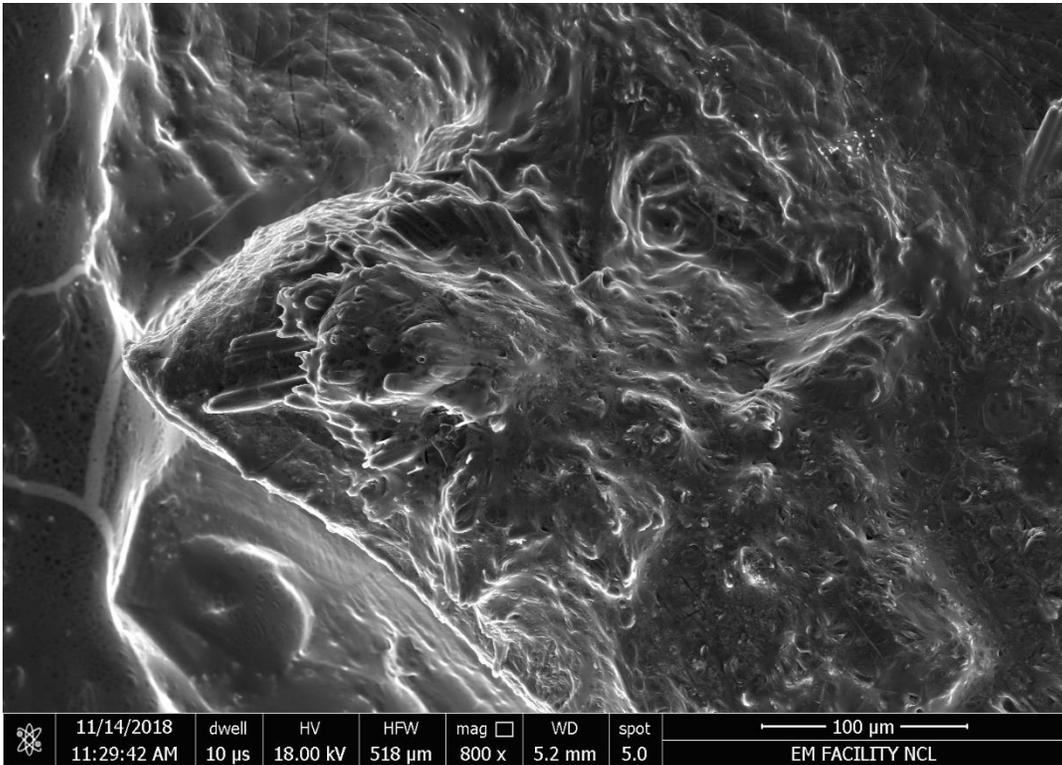


Fig. 4.6. 8 Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 800X – 6 horas

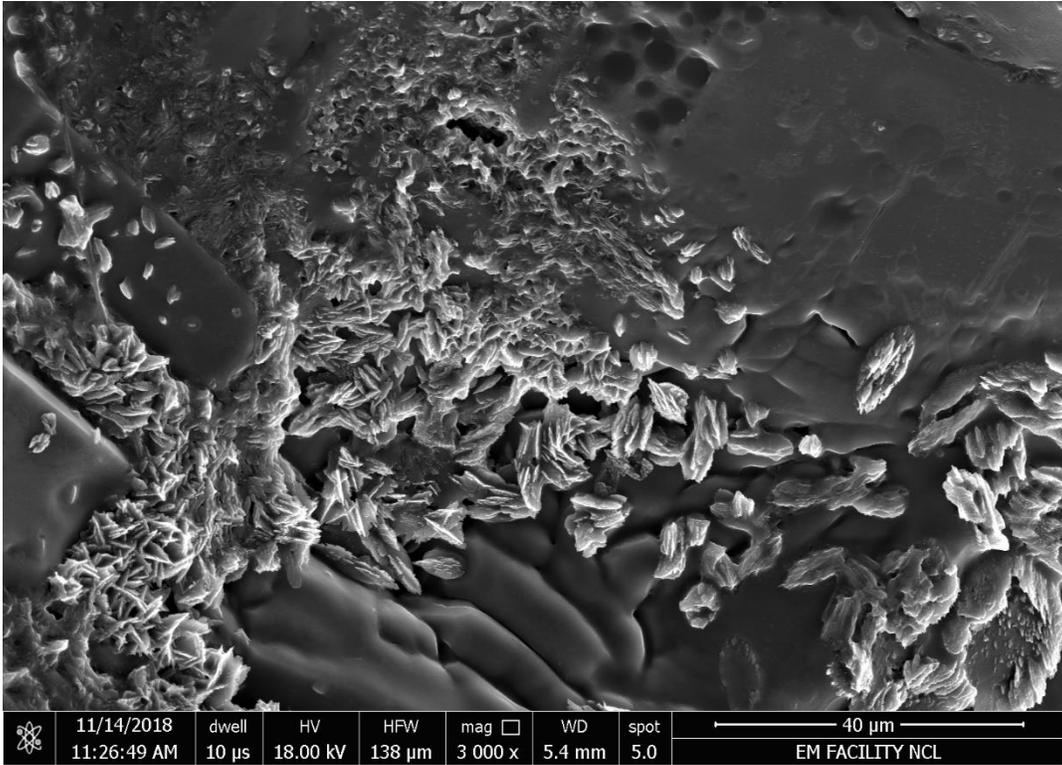


Fig. 4.6. 9 Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 3,000X - 6 horas

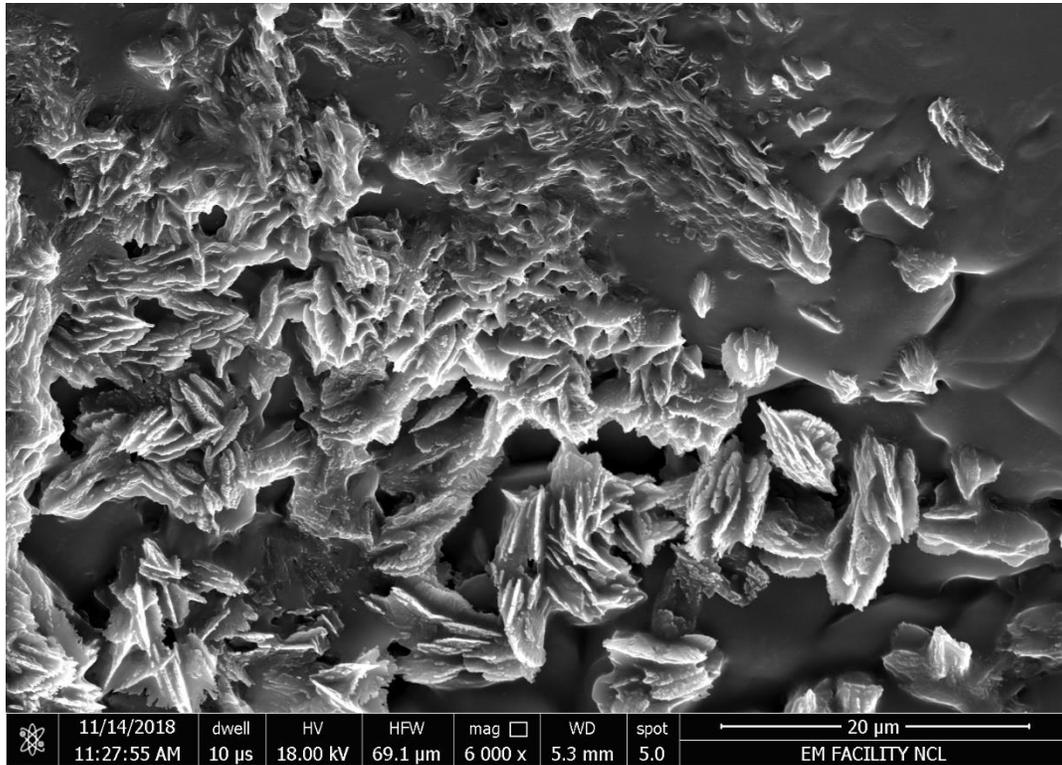


Fig. 4.6. 10 Fibras de PCL en cultivo en medio de sales a 6,000X - 6 horas

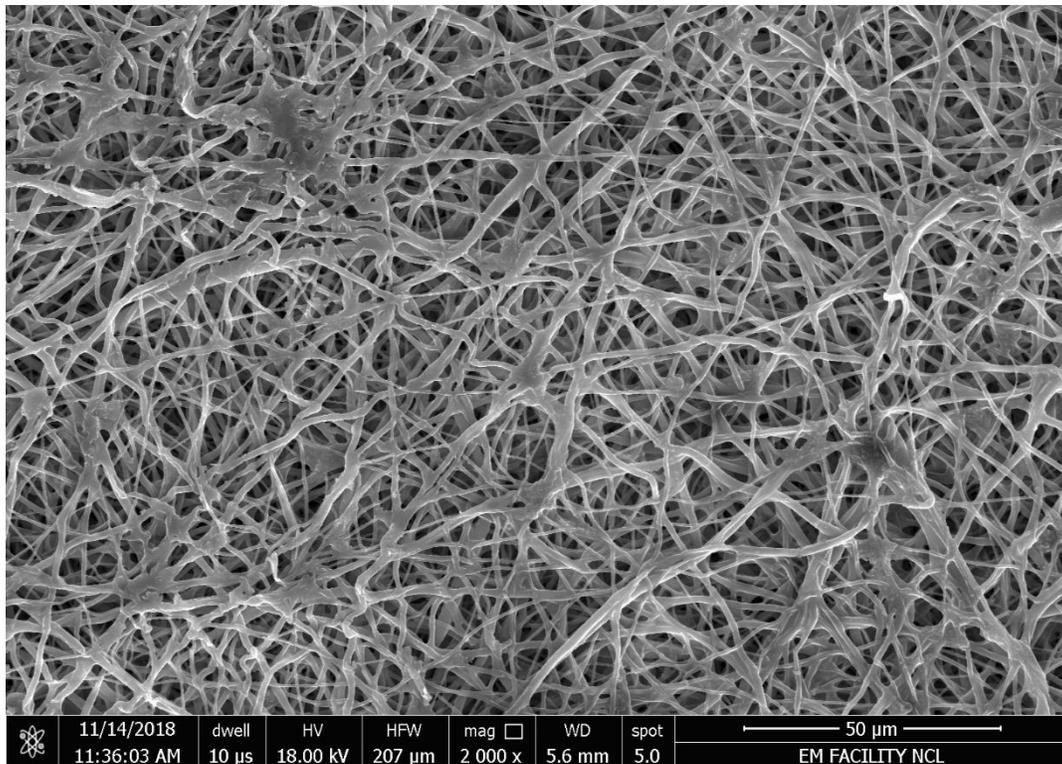


Fig. 4.6. 11 Fibras de PCL en cultivo en caldo nutritivo a 2,000X - 3 horas

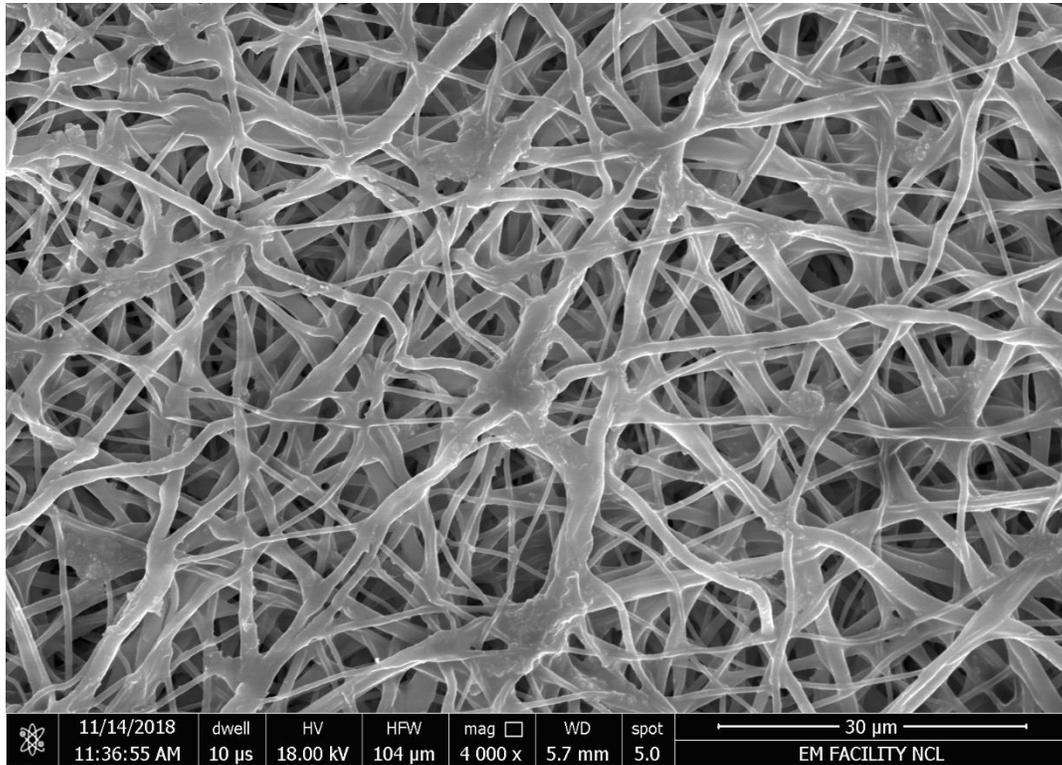


Fig. 4.6. 12 Fibras de PCL en cultivo en caldo nutritivo a 4,000X - 3 horas

En la figura 4.6.12 y 4.6.13, se logran ver cúmulos de bacterias, los cuales tienen una forma consistente con la figura 4.5.13. La figura 4.6.13 muestra, además de las fibras y los filmes bacterianos, también se pueden observar pequeños puntos muy bien iluminados, aunque dado el tamaño que tienen, podrían no ser las bacterias.

Finalmente, en la figura 4.6.14 se puede apreciar un filme bien consolidado y en los espacios vacíos se puede observar una clase de red, que debería ser el andamio de PCL. Sin embargo, los puntos bien iluminados de la figura 4.6.13 se repiten en esta sección de la fibra en toda la placa, pudiendo en efecto, ser las bacterias con características diferentes a las dimensiones comunes de la cepa.

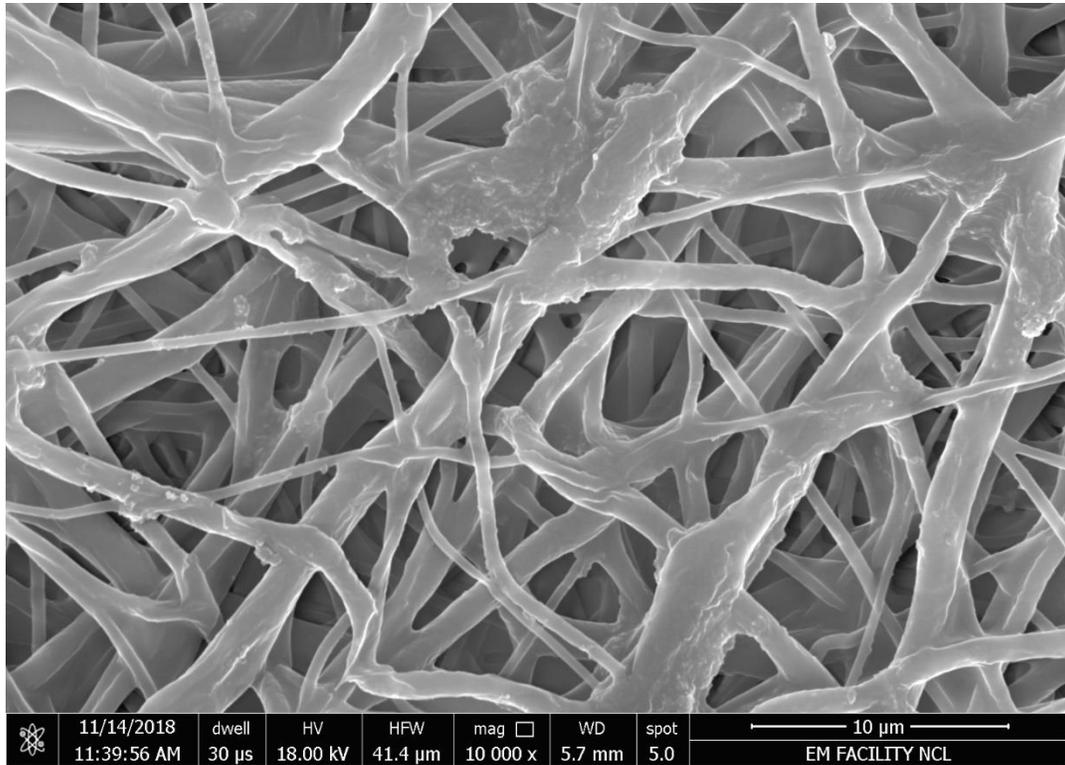


Fig. 4.6. 13 Fibras de PCL en cultivo en caldo nutritivo a 10,000X - 3 horas

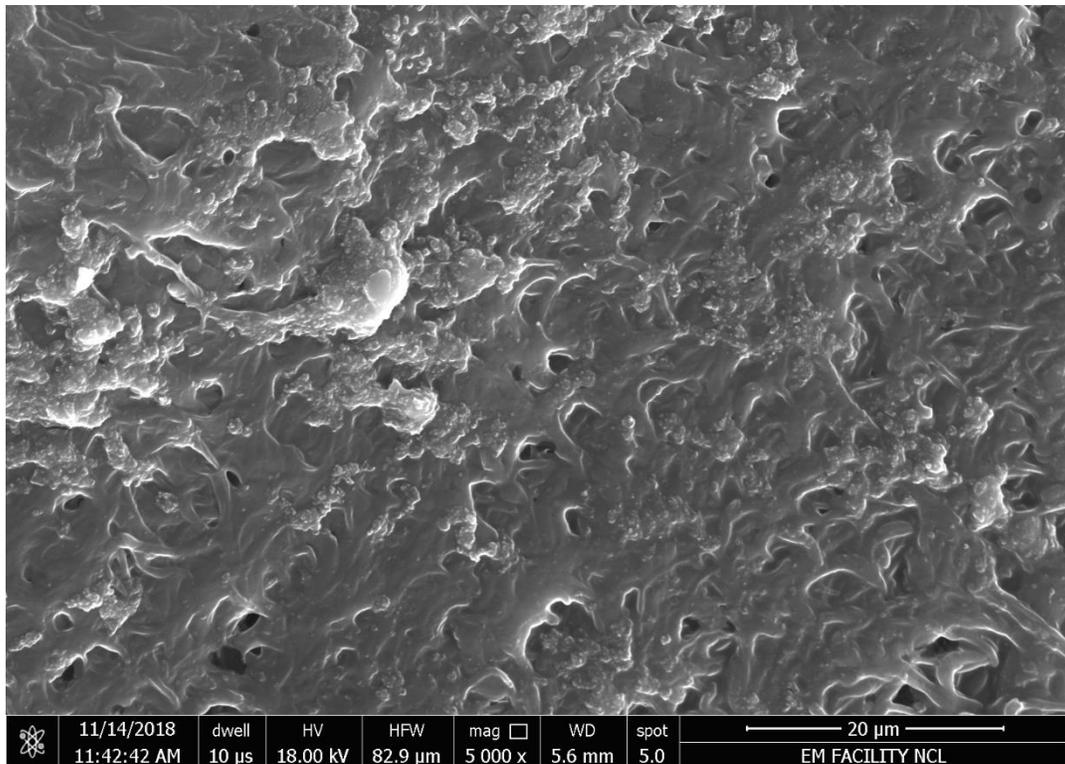


Fig. 4.6. 14 Fibras de PCL en cultivo en caldo nutritivo a 5,000X - 3 horas

4.7 Conclusiones

Se evaluaron los efectos de la presencia de las fibras sobre los cultivos microbianos. *E. coli* no muestra una respuesta favorable al encontrar fibras, pues su crecimiento se ralentiza en la fase exponencial. Tanto *P. aeruginosa* y *S. aureus* muestran un incremento en la concentración bacteriana en un 22% y 48% respecto al cultivo de control. La presencia de fuentes de carbono y nitrógeno dentro de las fibras muestra efectos tanto positivos como negativos al comparar las curvas de crecimiento. En *P. aeruginosa*, las fibras de PCL fueron las que mayor concentración bacteriana muestran, sin embargo, las diferencias entre estas y las fibras cargadas tiene un rango de 100 centésimas, aproximadamente. Este valor posiblemente puede incrementarse dadas las conclusiones de algunos reportes en los que señalan la preferencia de *P. aeruginosa* a poros de tamaño pequeño, lo que podría explicar porque un material sin ningún agregado es más que suficiente para incrementar la concentración de esta cepa. *S. aureus* muestra una mayor concentración al estar en presencia de fibras de PCL/Glicina; de esta última se sabe que juega un papel importante en la formación de peptidoglicano en la bacteria, por lo que no debería extrañar su preferencia por esta formulación, aunque también se debe resaltar que no hay variaciones tan grandes entre la concentración bacteriana con diferentes fibras, la cual es de aproximadamente 90 centésimas.

La presencia de las fuentes de carbono y nitrógeno en general no tienen un gran impacto en la estabilidad térmica del PCL. Las diferentes fuentes de carbono incrementan las temperaturas a las que ocurre la degradación del material en 5°C aproximadamente; las fuentes de nitrógeno presentan comportamientos que, aunque incrementan y disminuyen los fenómenos de degradación inicial, no modifican de manera importante las temperaturas de degradación críticas del polímero, es decir, la cantidad de masa de las fuentes agregadas al polímero no lo inutilizan para otros propósitos. Esto incluso se puede ver en la espectroscopía infrarroja donde la impureza añadida no es visible para el equipo.

En las fibras, las bacterias parecen tener una evolución normal cuando crecen en una superficie, empiezan por adherirse a las fibras o se fijan a los poros del material, establecen

pequeñas colonias que, de acuerdo a las posibilidades de movimiento de la bacteria, se dispersan por todo el material y empiezan a generar un biofilme en las fibras.

Aún deben establecerse qué relación ocurre entre las fibras y el biofilme generado, en especial en *S. aureus* que parece ser más sensible a la composición química del polímero. La presencia de glicina y el resto de las fuentes de carbono y nitrógeno dentro de las fibras se ha confirmado por el análisis termogravimétrico y la calorimetría diferencial de barrido, pero cómo es que se comportan estas una vez dentro del cultivo no queda claro. A partir de este punto, pueden establecerse dos posibilidades: (i) las fuentes se encuentran cerca de las superficies de las fibras y con un ligero desgaste en las superficies de estas debido a la hidrólisis del material, estos agregados se liberan al medio y son posteriormente captados y metabolizados por las bacterias o (ii) a medida que las bacterias van fijándose en las fibras y formando colonias, las bacterias degradan el polímero y estos agregados se van liberando al medio poco a poco.

Finalmente, se debe concluir que es difícil establecer un mecanismo general que explique los factores o las condiciones por las cuales se adhieren las cepas a las fibras, ya que pueden ser factores físicos o químicos los que interfieren en este proceso, sin embargo, el comportamiento que tienen una vez en las fibras parecer ser similar al que ya han descrito muchos investigadores con anterioridad.

REFERENCIAS

1. Lee YS, Arinze TL. Electrospun nanofibrous materials for neural tissue engineering. *Polymers (Basel)*. 2011;3(1):413–26.
2. Guihard P, Danger Y, Brounais B, David E, Brion R, Delecrin J, et al. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells*. 2012;30(4):762–72.
3. Tillman BW, Yazdani SK, Lee SJ, Geary RL, Atala A, Yoo JJ. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials* [Internet]. febrero de 2009;30(4):583–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.006>
4. Aviss KJ, Gough JE, Downes S. Aligned electrospun polymer fibres for skeletal muscle regeneration. *Eur Cells Mater*. 2010;19:193–204.
5. Abrigo M, McArthur SL, Kingshott P. Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: Advances, challenges, and future prospects. *Macromol Biosci*. 2014;14(6):772–92.
6. Wee-Eong T. Electrospun Fibers in Biotechnology [Internet]. *ElectrospinTech*. 2015 [citado el 24 de diciembre de 2018]. p. 1. Disponible en: <http://electrospintech.com/epinbiotechnology.html#.XCFdT1xKhPY>
7. Salalha W, Kuhn J, Dror Y, Zussman E. Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibres. *Nanotechnology*. 2006;17(18):4675–81.
8. López-Rubio A, Sanchez E, Sanz Y, Lagaron JM. Encapsulation of living bifidobacteria in ultrathin PVOH electrospun fibers. *Biomacromolecules*. 2009;10(10):2823–9.
9. Liu Y, Rafailovich MH, Malal R, Cohn D, Chidambaram D. Engineering of bio-hybrid materials by electrospinning polymer-microbe fibers. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. el 25 de agosto de 2009;106(34):14201–6. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0903238106>
10. Damasceno R, Roggia I, Pereira C, de Sá E. Rhizobia survival in seeds coated with polyvinyl alcohol (PVA) electrospun nanofibres. *Can J Microbiol* [Internet]. noviembre de 2013;59(11):716–9. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24206353>

11. Velasco-Barraza RD, Vera-Graziano R, López-Maldonado EA, Oropeza-Guzmán MT, Dastager SG, Álvarez-Andrade A, et al. Study of nanofiber scaffolds of PAA, PAA/CS, and PAA/ALG for its potential use in biotechnological applications. *Int J Polym Mater Polym Biomater* [Internet]. el 14 de septiembre de 2017;1–8. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00914037.2017.1378887>
12. Moffa M, Pasanisi D, Scarpa E, Marra AR, Alifano P, Pisignano D. Secondary Metabolite Production from Industrially Relevant Bacteria is Enhanced by Organic Nanofibers. *Biotechnol J* [Internet]. noviembre de 2017;12(11):1700313. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201700313>
13. Aliah NN, Ansari MNM. Thermal analysis on Characterization of Polycaprolactone (PCL) – Chitosan Scaffold for Tissue Engineering. *Int J Sci Res Eng Technol* [Internet]. 2017;6(2):2278–882. Disponible en: www.ijret.org
14. Bezerra EB, Diniz D, Morais DS, Maria R, Wellen R, Grande C. Hydrolytic and Thermal Degradation of PCL and PCL/Bentonite Compounds. 2016;19(3):618–27.
15. Wan Y, Lu X, Dalai S, Zhang J. Thermophysical properties of polycaprolactone/chitosan blend membranes. *Thermochim Acta*. 2009;487(1–2):33–8.
16. Velasco RD, Álvarez AS, Villarreal LJ, Paz JA, Iglesias AL, Vera R. Designing a Low Cost Electrospinning Device for Practical Learning in a Bioengineering Biomaterials Course. *Rev Mex Ing Biomédica*. 2016;37(1):27–36.
17. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv* [Internet]. mayo de 2010;28(3):325–47. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975010000066>
18. Wei Q, Tao D, Xu Y. Nanofibers: Principles and manufacture. *Funct Nanofibers their Appl*. 2012;(1999):3–21.
19. Sarabi-Maneji S, Scott J, Pagé D. Process Optimization for the Electrospinning of Polycaprolactone Nanofibers Using Non-halogenated Solvents. *Proc Int Conf New Trends Transp Phenom* [Internet]. 2014;(82):1–8. Disponible en: http://avestia.com/NTTP2014_Proceedings/papers/82.pdf
20. Theis T, Parr D, Binks P, Ying J, Drexler KE, Schepers E, et al. nanotechnology

- n. *Nat Nanotechnol* [Internet]. octubre de 2006;1(1):8–10. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nnano.2006.77>
21. Zhou F-L, Gong R-H. Manufacturing technologies of polymeric nanofibres and nanofibre yarns. *Polym Int* [Internet]. junio de 2008;57(6):837–45. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pi.2098/full>
 22. Li Z, Wang C. Effects of Working Parameters on Electrospinning. *One-Dimensional nanostructures* [Internet]. 2013;15–29. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-36427-3>
 23. Velasco-Barraza RD, Villarreal-Gómez LJ, Alvarez-Andrade A. Evaluación de la absorción bacteriana en nanofibras electrohiladas. Editorial Académica Española; 2017. 96 p.
 24. Moriarty TF, Poulsson AHC, Rochford ETJ, Richards RG. Bacterial Adhesion and Biomaterial Surfaces. En: *Comprehensive Biomaterials* [Internet]. Elsevier; 2011. p. 75–100. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00007-6>
 25. Fletcher M. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Can J Microbiol* [Internet]. enero de 1977;23(1):1–6. Disponible en: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m77-001>
 26. Characklis WG, Marshall KC. *Biofilms, Volume 1. Illustrate*. Characklis WG, Marshall KC, editores. California: Wiley; 1990. 796 p.
 27. Kanematsu H, Barry DM. Conditioning Films. En: *Biofilm and Materials Science*. 1a ed. Springer; 2015. p. 9–16.
 28. Jain A, Bhosle NB. Biochemical composition of the marine conditioning film: implications for bacterial adhesion. *Biofouling J Bioadhesion Biofilm Res*. 2010;25(1):37–41.
 29. Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci*. 2008;18(9):1049–56.
 30. Atabek A, Camesano T a. Atomic force microscopy study of the effect of lipopolysaccharides and extracellular polymers on adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* [Internet]. 2007;189(23):8503–9. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2168939&tool=pmcentre>

z&rendertype=abstract

31. Hori K, Matsumoto S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochem Eng J* [Internet]. febrero de 2010;48(3):424–34. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X09003465>
32. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol*. 1998;42(1–2):9–27.
33. Liu Y, Yang SF, Li Y, Xu H, Qin L, Tay JH. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *J Biotechnol*. 2004;110(3):251–6.
34. Hoffman MD, Zucker LI, Brown PJB, Kysela DT, Brun Y V., Jacobson SC. Timescales and Frequencies of Reversible and Irreversible Adhesion Events of Single Bacterial Cells. *Anal Chem*. 2016;87(24):12032–9.
35. Brown S, Santa Maria JP, Walker S. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. el 8 de septiembre de 2013;67(1):313–36. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-micro-092412-155620>
36. Reichmann NT, Cassona CP, Grundling A. Revised mechanism of D-alanine incorporation into cell wall polymers in Gram-positive bacteria. *Microbiology* [Internet]. el 1 de septiembre de 2013;159(Pt_9):1868–77. Disponible en: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.069898-0>
37. Christie W. Lipid A and Bacterial Lipopolysaccharides [Internet]. *AOCS Lipid Library*. 2014. Disponible en: <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39339>
38. Ortolano G, Canonica F, McAlister M, Howard G, Cervia J, Bononi I, et al. Bacterial Lipopolysaccharide Retention by a Positively Charged Filter. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2009;75(4):1219–1219. Disponible en: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02517-08>
39. Reyes RE, Romo González C, Coria Jiménez R, Ortiz Herrera M, Aquino Andrade A. Mechanisms of O-Antigen Structural Variation of Bacterial Lipopolysaccharide (LPS). En: *The Complex World of Polysaccharides* [Internet]. InTech; 2012. p. 71–98. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/mechanisms-of-o-antigen-structural-variation-of-bacterial-lipopolysaccharide-lps->

40. Luirink J, Yu Z, Wagner S, de Gier J-W. Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. junio de 2012;1817(6):965–76. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.12.006>
41. Wu EL, Fleming PJ, Yeom MS, Widmalm G, Klauda JB, Fleming KG, et al. *E. coli* Outer Membrane and Interactions with OmpLA. *Biophys J* [Internet]. junio de 2014;106(11):2493–502. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349514004093>
42. Lomize AL, Pogozheva ID, Mosberg HI. Anisotropic Solvent Model of the Lipid Bilayer. 2. Energetics of Insertion of Small Molecules, Peptides, and Proteins in Membranes. *J Chem Inf Model* [Internet]. el 25 de abril de 2011;51(4):930–46. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci200020k>
43. Wu EL, Engström O, Jo S, Stuhlsatz D, Yeom MS, Klauda JB, et al. Molecular dynamics and NMR spectroscopy studies of *E. coli* lipopolysaccharide structure and dynamics. *Biophys J*. 2013;105(6):1444–55.
44. Garnett JA, Martinez-Santos VI, Saldana Z, Pape T, Hawthorne W, Chan J, et al. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. el 6 de marzo de 2012;109(10):3950–5. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1106733109>
45. Ince D, Sutterwala FS, Yahr TL. Secretion of flagellar proteins by the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion-injectisome system. *J Bacteriol*. 2015;197(12):2003–11.
46. Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. el 13 de octubre de 2012;66(1):493–520. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-092611-150055>
47. Persat A, Inclan YF, Engel JN, Stone HA, Gitai Z. Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. el 16 de junio de 2015;112(24):7563–8. Disponible en: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1502025112>
48. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. el 1 de enero de 2014;12(1):49–62. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nrmicro3161>

49. Ghasemian A, Najar Peerayeh S, Bakhshi B, Mirzaee M. The Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) Genes among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Hospitalized Children. *Iran J Pathol* [Internet]. 2015;10(4):258–64. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26351495>
50. Schaechter M. *Encyclopedia of Microbiology* [Internet]. 3a ed. Academic Press, editor. Vol. 16, *Encyclopedia of Microbiology*. Cambridge: Elsevier; 2009. vii. Disponible en: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781107415324A009/type/book_part
51. Wilking JN, Angelini TE, Seminara A, Brenner MP, Weitz DA. Biofilms as complex fluids. *MRS Bull* [Internet]. el 18 de mayo de 2011;36(05):385–91. Disponible en: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0883769411000716
52. Yang L, Liu Y, Wu H, Høiby N, Molin S, Song Z. Current understanding of multi-species biofilms. *Int J Oral Sci* [Internet]. abril de 2011;3(2):74–81. Disponible en: <http://www.nature.com/ijos/journal/v3/n2/abs/ijos201112a.html>
53. A. Garnett J, Matthews S. Interactions in Bacterial Biofilm Development: A Structural Perspective. *Curr Protein Pept Sci* [Internet]. el 1 de diciembre de 2012;13(8):739–55. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23305361> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3601411>
54. Fratamico PM, Annous BA, Gunther NWI. Biofilms in the Food and Beverage Industries [Internet]. 1a ed. Vol. 18, *Biofilms in the Food and Beverage Industries*. Elsevier; 2009. 600 p. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845694777500223>
55. Yousra Turki, Mehri I, Lajnef R, Rejab A Ben, Khessairi A, Cherif H, et al. Biofilms in bioremediation and wastewater treatment: characterization of bacterial community structure and diversity during seasons in municipal wastewater treatment process. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. el 22 de febrero de 2017;24(4):3519–30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-8090-2>
56. Gamarra NN, Villena GK, Gutiérrez-Correa M. Cellulase production by *Aspergillus*

- niger in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;87(2):545–51.
57. Singh V, Verma N, Banerjee B, Vibha K, Haque S, Tripathi CKM. Enzymatic degradation of bacterial biofilms using *Aspergillus clavatus* MTCC 1323. *Microbiology* [Internet]. 2015;84(1):59–64. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1134/S0026261715010130>
 58. Zou M, Liu D. A systematic characterization of the distribution, biofilm-forming potential and the resistance of the biofilms to the CIP processes of the bacteria in a milk powder processing factory. *Food Res Int* [Internet]. noviembre de 2018;113(June):316–26. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.020>
 59. Blana V, Georgomanou A, Giaouris E. Assessing biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on abiotic substrata in the presence of quorum sensing signals produced by *Hafnia alvei*. *Food Control* [Internet]. octubre de 2017;80:83–91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.037>
 60. Muffler K, Ulber R. Productive Biofilms [Internet]. Vol. 146. 2014. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-09695-7>
 61. Todhanakasem T, Sangsutthiseree A, Areerat K, Young GM, Thanonkeo P. Biofilm production by *Zymomonas mobilis* enhances ethanol production and tolerance to toxic inhibitors from rice bran hydrolysate. *N Biotechnol* [Internet]. septiembre de 2014;31(5):451–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.06.002>
 62. Maharaj K, Bradfield MFA, Nicol W. Succinic acid-producing biofilms of *Actinobacillus succinogenes*: reproducibility, stability and productivity. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. el 10 de septiembre de 2014;98(17):7379–86. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-5779-3>
 63. Cheng K-C, Demirci A, Catchmark JM. Advances in biofilm reactors for production of value-added products. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. el 2 de junio de 2010;87(2):445–56. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2622-3>
 64. Cheng K-C, Catchmark JM, Demirci A. Effects of CMC Addition on Bacterial Cellulose Production in a Biofilm Reactor and Its Paper Sheets Analysis.

- Biomacromolecules [Internet]. el 14 de marzo de 2011;12(3):730–6. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm101363t>
65. Khiyami MA, Al-Fadual SM, Bahklia AH. Polyhydroxyalkanoates production via *Bacillus plastic* composite support (PCS) biofilm and date palm syrup. *J Med Plants Res* [Internet]. 2011;5(14):3312–20. Disponible en: [http://www.academicjournals.org/JMPR/PDF/pdf2011/18July/Khiyami et al.pdf](http://www.academicjournals.org/JMPR/PDF/pdf2011/18July/Khiyami%20et%20al.pdf)
 66. VAN GENNIP M, CHRISTENSEN LD, ALHEDE M, PHIPPS R, JENSEN PØ, CHRISTOPHERSEN L, et al. Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS* [Internet]. el 23 de junio de 2009;117(7):537–46. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2009.02466.x>
 67. Secor PR, Jennings LK, James GA, Kirker KR, Pulcini E deLancey, McInnerney K, et al. Phevalin (aureusimine B) Production by *Staphylococcus aureus* Biofilm and Impacts on Human Keratinocyte Gene Expression. Sumbly P, editor. *PLoS One* [Internet]. el 13 de julio de 2012;7(7):e40973. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0040973>
 68. Ramos I, Dietrich LEP, Price-Whelan A, Newman DK. Phenazines affect biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* in similar ways at various scales. *Res Microbiol* [Internet]. abril de 2010;161(3):187–91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2010.01.003>
 69. Vogel C, Siesler HW. Thermal Degradation of Poly (ϵ -caprolactone), Poly (L-lactic acid) and their Blends with Poly (3-hydroxy-butyrate) Studied by TGA / FT-IR Spectroscopy. 2008;183–94.
 70. Shoja M, Shameli K, Ahmad MB, Zakaria Z. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF POLY (ϵ -CAPROLACTONE)/TiO₂ MICRO-COMPOSITES. *Dig J Nanomater Biostructures*. 2015;10(2):471–7.
 71. Siham A, Metref HF. Thermal stability and decomposition kinetic studies of antimicrobial PCL / nanoclay packaging films. *Polym Bull*. 2017;
 72. Bezerra EB, França DC, Morais DD de S, Rosa M de F, Morais JPS, Araújo EM, et al. Processing and Properties of PCL/Cotton Linter Compounds. *Mater Res* [Internet]. el 19 de enero de 2017;20(2):317–25. Disponible en:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-14392017000200317&lng=en&tlng=en