

TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: NAYELI CHAVERO JUÁREZ

FIRMA

TITULO: Aplicación de Nanofibras de Poli(Fluoruro de Vinilideno) Preparadas por la Técnica de Electrohilado como Soporte en el Crecimiento de Células de Saccharomyces cerevisiae.

ASESORES: Dr. Ronald Ziolo

FIRMA

Dr. Jorge Romero García

FIRMA

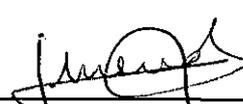
El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 27 de Noviembre de 2009



Sello de la Institución



Dr. Juan Méndez Nonell
Director General del CIQA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

Maestría en Tecnología de Polímeros

Tesis:

**Aplicación de Nanofibras de Poli(Fluoruro de Vinilideno)
Preparadas por la Técnica de Electrohilado como Soporte en el
Crecimiento de Células de *Saccharomyces cerevisiae***

Presentada por:

I.Q.I. Nayeli Chavero Juárez

Asesor:

Dr. Ronald F. Ziolo

Co-asesor:

Dr. Jorge Romero García

Saltillo, Coah.

Diciembre, 2009

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

Aplicación de Nanofibras de Poli(Fluoruro de Vinilideno) Preparadas por la Técnica de Electrohilado como Soporte en el Crecimiento de Células de *Saccharomyces cerevisiae*

Presentada por:

NAYELI CHAVERO JUÁREZ

Para obtener el grado de:

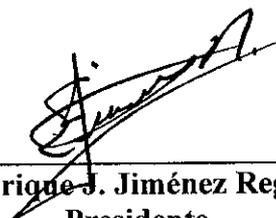
MAESTRO EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

Asesorada por:

Dr. Ronald Ziolo

Dr. Jorge Romero García

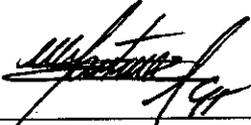
SINODALES



Dr. Enrique J. Jiménez Regalado
Presidente



Dr. Antonio S. Ledezma Pérez
Secretario

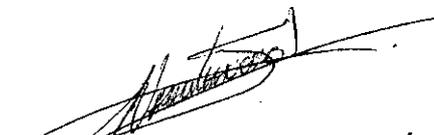


M.C. Gerado T. Martínez Alanís
Vocal

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 27 de noviembre de 2009



NAYELI CHAVERO JUÁREZ

Nombre y Firma

DEDICATORIA.

A DIOS por darme la oportunidad de vivir y realizar mis sueños día con día y a mi familia por apoyarme y confiar en mí incondicionalmente.

AGRADECIMIENTOS.

Al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) y su director Dr. Juan Méndez Nonel, por las facilidades brindadas para la elaboración del presente trabajo de investigación.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECyT), por el apoyo económico brindado mediante una beca terminal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado durante el periodo enero-2010 a agosto-2010, así como por la obtención de los recursos necesarios para la elaboración de la presente tesis.

A mis asesores: Dr. Ronald F. Ziolo y el Dr. Jorge Romero García por compartir sus conocimientos, además de brindarme su apoyo, confianza y excelente dirección para la realización de la tesis.

A mis sinodales: Dr. Enrique Jiménez Regalado; Dr. Antonio S. Ledezma Pérez y al M.C. Gerardo T. Martínez Alanis, por el tiempo dedicado a la revisión de este documento.

A todo el personal que participo en el transcurso de la elaboración del presente trabajo: M.C. Blanca Huerta Martínez, Lic. Ma. Guadalupe Mendez Padilla, M.C. Ma. del Rosario Rangel Ramirez y al L.C.Q. Luis E. Reyes Vielma por su ayuda en la caracterización del material; Q.F.B. Miriam Lozano Estrada por el soporte brindado en el SEM; Ing. Gilberto F. Hurtado López por su apoyo en la realización del equipo de oscilación utilizado para proveer de movimiento a las membranas de PVDF; Dr. Antonio S. Ledezma Pérez y a la Q.F.B. Gabriela Padrón Gamboa por todo el apoyo brindado en el laboratorio, así como, en la instrucción del equipo de microbiología; Dra. Verónica Corral Flores y a la L.C.Q. Diana I. Medellín Banda por su apoyo en el equipo de electrospinning y en el laboratorio (Edif. B); Dra. Raquel Ledezma Rodríguez y a la M.C. Mónica A. Ceniceros Reyes por su apoyo en la instrucción y enseñanza del equipo del laboratorio, así como, en la preparación del material utilizado (Edif. E).

A todos los profesores que participaron en mi formación intelectual y de los cuales aprendí las bases necesarias para salir adelante en esta nueva etapa de mi vida.

Un agradecimiento especial a la M.C. Isaura Gpe. Yáñez Flores y a la Dra. Rebeca Betancourt Galindo por el soporte y consejos, así como su amistad brindada a lo largo de cuatro años, ayudándome en mi crecimiento personal e intelectual.

Por último, pero no menos importante a mis AMIGOS quienes me han cuidado, procurado, ayudado y brindado sus consejos y enseñanzas en el transcurso de mi caminar a lo largo de todo este tiempo, convirtiéndose en parte de mi familia y seres muy queridos: la banda METALERA, el club de las PELIS, mis amigos del LAB, toda mi GENERACIÓN de maestría y especialidad, mis amigos LOCOS y todos mis amigos del DISTRITO que siempre han estado pendientes de mi. A todos por igual agradezco su soporte, paciencia y compañía, deseándoles todo el éxito, salud y felicidad... al igual que muchas nuevas y excitantes aventuras.

RESUMEN.

El presente trabajo fue elaborado en dos etapas. En la primera etapa se estudiaron las características de las membranas del poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) obtenidas mediante la técnica de electrohilado. En particular, el contenido de la fracción de fase β presente en las membranas en función del porcentaje de PVDF (p/v) disuelto en N,N-Dimetilformamida (DMF), explotando así las propiedades electroactivas y piezoeléctricas de este polímero. Las membranas fueron caracterizadas mediante espectroscopía infrarroja por reflexión total atenuada (FTIR-ATR), demostrando que a concentraciones menores del PVDF se obtienen valores mayores de la fracción β presente en las membranas, así como, por medio de la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) se observó el tipo de morfología y la distribución del diámetro de fibras a las diferentes concentraciones de PVDF/DMF. Posteriormente se evaluó el comportamiento térmico de las membranas a las diferentes concentraciones de PVDF/DMF, esto mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la obtención de las características térmicas del material electrohilado.

Por otra parte, a partir de una concentración determinada de PVDF/DMF se realizaron tratamientos térmicos en un amplio rango de temperaturas, donde se observó que no existe una disminución significativa de la fracción β presente en las muestras a tiempos cortos de exposición. Dichas muestras también fueron evaluadas mediante difracción de rayos-X (DRX), donde se confirmó la presencia de las fases polares (β , γ y δ), así como, la disminución de la fase menos polar (α). Por último se realizó un análisis mecánico dinámico (DMA) para observar el desempeño mecánico de la muestra, donde se observa un comportamiento elástico deseable.

Por otra parte, a partir de una concentración determinada de PVDF/DMF se realizaron tratamientos térmicos en un amplio rango de temperaturas, donde se observó que no existe una disminución significativa de la fracción β presente en las muestras a tiempos cortos de exposición. Dichas muestras también fueron evaluadas mediante rayos-X (XPS), donde se confirmó la presencia de las fases polares (β , γ y δ), así como, la disminución de la fase menos polar (α). Por último se realizó un análisis mecánico



dinámico (DMA) para observar su desempeño mecánico de la muestra, donde se observa un comportamiento elástico deseable.

En la segunda etapa, se evaluó el comportamiento de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como modelo biológico, sobre membranas de PVDF. Esta etapa comprendió la activación, cinéticas de crecimiento y la elaboración de un cultivo en medio sólido de la levadura mediante turbidimetría (Espectrofotómetro UV-vis), el cual fue puesto posteriormente en contacto directo con la membrana de PVDF. Se observó un crecimiento homogéneo en toda la muestra, lo cual exhibe a la membrana de PVDF como un material inerte a dicho microorganismo. Se realizaron cultivos a diferentes tiempos de crecimiento celular, los cuales fueron utilizados durante la prueba de contacto directo para posteriormente obtener el número de células recuperadas al finalizar la prueba. Se llevó a cabo una comparación entre las células por mililitro que se obtenían al ser puestas en contacto las células de levadura con las membranas de PVDF con respecto a las que se alimentaron por medio de diluciones seriadas y el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Se observó un incremento en el UFC después del contacto de las células de levadura con la membrana de PVDF, obteniendo así una membrana de PVDF como un buen soporte de células de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, lo cual provee de un gran potencial de uso de las membranas de PVDF obtenidas mediante electrohilado para ser utilizadas en ingeniería de tejido, y como un soporte de redes no tejidas tridimensionales.

Finalmente se elaboró un sistema de oscilación, con el objetivo de llevar a cabo una deformación mecánica controlada sobre las membranas de PVDF, las cuales fueron inoculadas con células *Saccharomyces cerevisiae* y posteriormente puestas en un periodo de incubación. Esta tarea se realizó con el fin de aprovechar las propiedades piezoeléctricas del material polimérico, obteniendo finalmente un soporte celular que presenta un efecto eléctrico entre las interacciones células-polímero, obteniendo así un aumento en la tasa celular.



CONTENIDO.**RESUMEN****CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN**

1. Introducción.....	1
Referencias	3

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Materiales Inteligentes: Materiales Piezoeléctricos.....	4
2.1.1 Relación entre la simetría del cristal y sus propiedades.....	8
2.1.2 Clasificación Piezoeléctrica.....	8
2.1.2 Polímeros Semicristalinos: Mecanismo de Piezoelectricidad.....	9
2.2 Poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF).....	12
2.2.1 Estructura Química.....	15
2.2.2 Descripción de las modificaciones del PVDF.....	18
2.2.3 Ferroelectricidad del Cristal β o Forma I.....	19
2.2.4 Nanofibras de PVDF.....	20
2.3 Electrohilado (electrospinning).....	21
2.3.1 Aplicaciones de las nanofibras.....	23
2.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
2.4.1 Nutrición de la Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
Referencias	28



CAPITULO 3. ENFOQUE DE LA TESIS

3.1 Justificación.....	31
3.2 Hipótesis.....	32
3.3 Objetivos.....	32
3.3.1 Objetivos Generales.....	32
3.3.2 Objetivos Específicos.....	32
Referencias	33

CAPITULO 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Reactivos y Material del Laboratorio.....	34
4.1.1 Reactivos.....	34
4.1.2 Material utilizado en el equipo de Electrohilado.....	35
4.1.3 Material utilizado en el Laboratorio.....	35
4.2 Equipos.....	36
4.2.1 Electrohilado.....	36
4.2.2 Caracterización de membranas de PVDF.....	36
4.2.3 Microbiología - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
4.3 Metodología Experimental.....	37
4.4 Electrohilado de las membranas poliméricas de PVDF.....	43
4.4.1 Preparación de las soluciones poliméricas.....	43
4.4.2 Electrohilado de las soluciones poliméricas.....	43
4.4.3 Tratamiento Térmico.....	44
4.5 Estudio de la Cinética de Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44



4.5.1 Microorganismo utilizado como Modelo Biológico.....	44
4.5.2 Preparación del Medio de Cultivo.....	44
4.5.3 Preparación del Pre-inoculo.....	45
4.5.4 Preparación del Inoculo.....	45
4.5.5 Cinética de Crecimiento.....	46
4.5.6 Desarrollo de los Cultivos a 8 y 12h.....	46
4.6 Estudio del Efecto de la membrana electrohilada de PVDF sobre el crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
4.6.1 Estudio del efecto de la membrana sobre el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante la resiembra en placa.....	47
4.6.2 Estudio del efecto de las membranas electrohiladas de PVDF sobre el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante el Método de Contacto Directo.....	47
4.6.3 Conteo Celular.....	48
4.6.4 Prueba de Contacto Directo.....	49
4.6.5 Recuento de Células Viables.....	52
4.7 Estudio del efecto de la membrana electrohilada de PVDF bajo un esfuerzo mecánico, sobre el crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Prueba del Sistema Dinámico.....	52
4.7.1 Preparación de los porta-muestras y las membranas de 18% (p/v) de PVDF.....	52
4.7.2 Prueba en el Sistema Oscilatorio.....	53
4.7.3 Recuento de células viables.....	55
Referencias.....	56



CAPITULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Electrohilado de las membranas poliméricas de PVDF.....	57
5.1.1 Electrohilado de las soluciones poliméricas.....	57
5.1.1.1 Espectroscopia infrarroja de reflexión total atenuada (FTIR-ATR).....	57
5.1.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	60
5.1.2 Tratamiento Térmico.....	64
5.1.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	66
5.1.3 Análisis Térmico (Calorimetría Diferencial de Barrido).....	66
5.1.4 Análisis Mecánico Dinámico.....	67
5.1.5 Rayos-X.....	69
5.2 Estudio de la Cinética de Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70
5.2.1 Cinética de Crecimiento.....	70
5.3 Estudio del Efecto de la membrana electrohilada de PVDF sobre el crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72
5.3.1 Estudio del efecto de la membrana sobre el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante la resiembra en placa.....	72
5.3.2 Estudio del efecto de las membranas electrohiladas de PVDF sobre el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante el Método de Contacto Directo.....	73
5.4 Estudio del efecto de la membrana electrohilada de PVDF bajo un esfuerzo mecánico, sobre el crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Prueba del Sistema Dinámico.....	75
Referencias.....	78



CAPITULO 6. CONCLUSIONES

6. Conclusiones.....80

CAPITULO 7. TRABAJO A FUTURO

7. Trabajo a Futuro.....81



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

FIGURA

Figura 2.1 Diagrama Heckman, el cual muestra la interrelación entre las propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas de los materiales. Así mismo, propiedades tales como la expansión piezoeléctrica, fenómeno piroeléctrico y térmico.....	9
Figura 2.2 Esquema del efecto de la tensión mecánica sobre el centro de gravedad de cargas negativas y positivas, produciendo un momento dipolar.....	10
Figura 2.3 Representación esquemática de los cambios micro estructurales durante la polarización y después de la eliminación de la polarización.....	11
Figura 2.4 Esquema representativo de las fases cristalina y amorfa del PVDF; a. material en fundido, b. posterior a la aplicación de un esfuerzo mecánico, c. muestra polarizada en fundido.....	13
Figura 2.5 Esquema químico del poli(fluoruro de vinilideno).....	14
Figura 2.6 Estructura molecular de las modificaciones cristalinas del PVDF.....	16
Figura 2.7 Esquema de las interacciones presentes entre las diferentes modificaciones cristalográficas del PVDF.....	17
Figura 2.8 Esquema de la Forma I (α) del cristal en el PVDF.....	18
Figura 2.9 Modificaciones de la forma cristalina en función del tipo de proceso y solvente utilizado.....	19
Figura 2.10 Cambios estructurales causados por la polarización del PVDF en el cristal de la Forma I (β).....	20
Figura 2.11 Reorientación del cristal de Forma I (β) del PVDF bajo un campo eléctrico externo aplicado.....	20
Figura 2.12 Esquema de la técnica utilizada de electrohilado (electrospinning).....	22
Figura 2.13 Imagen de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Figura 4.1 Metodología experimental del proyecto de tesis.....	37

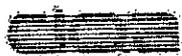


Figura 4.2 Metodología experimental utilizada en la Caracterización de membranas.....	38
Figura 4.3 Metodología experimental utilizada en el Tratamiento térmico.....	38
Figura 4.4 Metodología experimental utilizada en la Activación de la levadura.....	39
Figura 4.5 Metodología experimental utilizado en la obtención del Inoculo.	39
Figura 4.6 Metodología experimental utilizada para la obtención de la cinética de crecimiento, así como, selección de cultivos de 8 y 12 hrs.....	40
Figura 4.7 Metodología experimental utilizada para la recuperación de la biomasa y re-suspensión celular.....	40
Figura 4.8 Metodología experimental utilizada para el cultivo de 8 horas de manera estática y su caracterización.....	41
Figura 4.9 Metodología experimental utilizada para el cultivo de 12 horas sometidas a un esfuerzo mecánico y sin el, así como su caracterización.....	42
Figura 4.10 Imagen de la siembra en caja petri de forma directa (cualitativo).....	47
Figura 4.11 Biomasa de los cultivos de 8 y 12 horas re-suspendidas en un medio de dilución.....	48
Figura 4.12 Imagen de un Microscopio Óptico y el esquema de una cámara Neubauer.....	49
Figura 4.13 Esquema de la preparación de las muestras para tiempo cero y tiempo de 24 horas.....	51
Figura 4.14 Esquema utilizado en las diluciones realizadas para prueba por Contacto Directo.....	51
Figura 4.15 Imagen de una caja petri, donde se muestra las UFC.....	52
Figura 4.16 Imagen de los porta muestras utilizados para el anclaje de la membrana de PVDF.....	53
Figura 4.17 Imagen de una de las muestras en el porta muestra de PP al ser sembrada con 100µL de la suspensión celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre una membrana de PVDF (18% en peso).....	53



- Figura 4.18** Imagen de el porta muestras utilizado para el sistema oscilatorio, el cual contiene la muestra, la suspensión celular y esta sellado al ambiente.....54
- Figura 4.19** Esquema del Sistema Oscilatorio – MATAVAN110v 12A CIQA.....54
- Figura 4.20** Imagen del Sistema Oscilatorio – MATAVAN110v 12A CIQA en una incubadora LAB-LINE UL-125L a 37°C.....55
- Figura 4.21** Esquema de diluciones utilizado para la prueba del Sistema Dinámico...55
- Figura 5.1** Imagen de la membrana de 14% en peso del PVDF obtenida por electrohilado.....57
- Figura 5.2** Formas resonantes de la N,N-dimetilformamida.....58
- Figura 5.3** Esquema de la posible interacción entre el DMF y el PVDF.....58
- Figura 5.4** Gráfica $F(\beta)$ vs. %PVDF en solución, para las soluciones del 14, 16, 18 y 20%.....59
- Figura 5.5** Micrografías e Histogramas del diámetro de fibras de las membranas de PVDF a concentraciones de 14 y 15% en peso.....60
- Figura 5.6** Micrografía e Histograma del diámetro de fibras de la membrana de PVDF a la concentración de 16, 17 y 18% en peso.....61
- Figura 5.5** Micrografías e Histogramas del diámetro de fibra de las membranas de PVDF a concentraciones del 19 y 20% en peso.....62
- Figura 5.7** Gráfica de la membrana de 18% en peso del PVDF a diferentes temperaturas, fracción de β ($F(\beta)$) vs. Temperatura en °C.....65
- Figura 5.8** Micrografías de una membrana de 18% en peso de PVDF antes y después del tratamiento térmico de 80°C. s.t.: sin tratamiento térmico; c.t.: con tratamiento térmico.....66
- Figura 5.9** Curvas de DSC, a) temperatura de fusión, b) temperatura de cristalización; en una membrana del 18% en peso de PVDF.....67



Figura 5.10 DMA de una membrana de 18% en peso de PVDF por tensión, modulo elástico y Tan Delta vs. Temperatura en °C.....	68
Figura 5.11 Muestra obtenida mediante electrohilado y muestra de PVDF en polvo...	69
Figura 5.12 Grafica de la Cinética de Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; a. fase de adaptación; b. fase exponencial; c. fase estacionaria.....	71
Figura 5.13 Imagen de las biomasa de los cultivos de 8 y 12 horas re-suspendidas en un medio de dilución.....	72
Figura 5.14 Imagen de una membrana y el cultivo en agar (siembra en caja).....	72
Figura 5.15 Grafica del Cultivo de 8 horas para las muestras de cero y 24 horas de incubación.....	73
Figura 5.16 Grafica del Cultivo de 12 horas para las muestras de cero y 24 horas de incubación.....	74
Figura 5.17 Imagen del Sistema Oscilatorio en un ambiente húmedo.....	77



TABLA

Tabla 2.1 Comparación de las propiedades de materiales piezoeléctricos estándar de un polímero (PVDF) y un cerámico (PZT).....	7
Tabla 2.2 Clasificación cristalográfica de acuerdo a la polaridad ^a y los centros de simetría.....	8
Tabla 2.3 Comparación de propiedades piezoeléctricas de algunos materiales poliméricos semicristalinos.....	14
Tabla 2.4 Datos cristalográficos de las modificaciones del PVDF.....	17
Tabla 4.1 Reactivos utilizados para las Membranas de PVDF.....	34
Tabla 4.2 Reactivos utilizados en la parte microbiológica para la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
Tabla 4.3 Reactivo utilizado para la preparación de la solución fisiológica.....	35
Tabla 4.4 Medio de Cultivo YM utilizado en la preparación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
Tabla 4.5 Nomenclatura para las muestras utilizadas en el Método de Contacto Directo.....	50
Tabla 5.1 Fracción de fase β presente en las muestras del 14 al 20% de PVDF obtenidas mediante la Ley de Lambert -Beer	58
Tabla 5.2 Distribución de diámetro de fibras para las diferentes concentraciones de PVDF en DMF.....	63
Tabla 5.3 Valores obtenidos con un recuento de células de levadura al finalizar el experimento dinámico (Sistema Oscilatorio).....	75



1. INTRODUCCIÓN

Los materiales y su desarrollo han sido fundamentales para la modificación del comportamiento y la cultura humana a través de los tiempos. Debido a ello, los materiales han sido de gran importancia para el hombre, por lo que las investigaciones que se presentan en esta área exhiben avances acelerados.

El presente siglo se ha caracterizado por tener grandes adelantos en todas las áreas de la investigación, encaminándonos así a la nanociencia, la cual nos permite la manipulación de la estructura de la materia a escalas muy pequeñas, del orden de los nanómetros (nm), obteniendo diversos materiales con características, propiedades y procesamiento muy diferentes ^[1]. Estos materiales han alcanzado aplicaciones muy diversas en áreas como son la electrónica, ciencia de los materiales, medicina, biotecnología y polímeros de ingeniería entre otros. Para ello se ha realizado una intensa investigación que ha culminado con nuevos procesos y técnicas de fabricación de materiales nanométricos.

El electrohilado ha surgido como una técnica novedosa para la obtención de materiales unidimensionales (1D) y tridimensionales (3D) que permiten la fabricación de fibras y membranas fibrosas a partir de diversos materiales (polímeros, cerámicos, materiales compuestos, etc.) donde es posible el control del diámetro a escala nanométrica. Las membranas fibrosas no-tejidas obtenidas mediante esta técnica exhiben propiedades únicas como lo son: alta área superficial, bajo peso, absorción del solvente, espesor controlado, alta porosidad, así como una estructura porosa interconectada, las cuales pueden ser aplicadas como medios filtrantes, en ropa de protección en capas de absorción, etcétera ^[2]. Debido a las propiedades específicas exhibidas por los materiales electrohilados, éstos tienen un gran atractivo en un amplio rango de aplicaciones, incluyendo la ingeniería de tejido, vendajes, ropas protectoras para el sector militar, aplicaciones electrónicas, sensores, entre otras ^[3].



El interés en las membranas electrohiladas es debido a su estructura de redes 3D no tejidas completamente porosas ^[4], siendo esta propiedad en particular la que exhibe un gran atractivo como soporte celular ^[5].

En este documento, se presenta el trabajo de investigación que consistió en aprovechar la versatilidad que ofrece la técnica de electrohilado, aunado a las propiedades ferroeléctricas del poli(fluoruro de vinilideno)(PVDF) para la obtención de un soporte celular (en este caso se utilizó como modelo biológico la levadura *Saccharomyces cerevisiae*), con el fin de provocar estímulos eléctricos en las membranas de PVDF mediante un sistema de oscilación, evaluando el efecto que tiene la generación de este voltaje eléctrico en la tasa de crecimiento celular.

En una primera etapa de esta investigación, se prepararon soluciones de PVDF en N,N-dimetilformamida a diferentes concentraciones en peso del polímero, las cuales fueron electrohiladas mediante el equipo de electrohilado, y posteriormente caracterizadas mediante espectroscopia infrarroja (FTIR-ATR). A partir de los espectros de infrarrojo de las membranas electrohiladas, se calculó la fracción β ($F(\beta)$) presente en las membranas. La presencia de esta fase en las membranas electrohiladas de PVDF, exhibe propiedades ferroeléctricas, piezoeléctricas y piroeléctricas ^[6], lo que provoca una generación de cargas eléctricas al someter al material bajo una deformación mecánica, la cual se han utilizado como un estimulante axial en la regeneración en algunas células ^[7].

En una segunda etapa, se trabajó con células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con el fin de evaluar las membranas de PVDF como soporte celular, así como estudiar el efecto de sus propiedades piezoeléctricas sobre la estimulación en el crecimiento de dicho microorganismo. Esto se llevó a cabo mediante pruebas de contacto directo en presencia o ausencia de un esfuerzo mecánico inducido. En los siguientes capítulos se detallan los antecedentes donde se presenta el estado del arte relevante al avance y aplicación del electrohilado en general y específicamente en aplicaciones como soporte celular y las principales características del PVDF y del microorganismo utilizado. Finalmente, se describe la metodología utilizada y las técnicas de caracterización que permitieron llegar a los resultados y conclusiones alcanzadas.



Referencias.

1. Moncada Acevedo E., Nanotecnología y Nanocompositos, Tesis Doctoral en Química (Protocolo), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
2. Thandavamoorthy Subbiah; G.S. Bhat; R.W. Tock; S. Parameswaran; S.S. Ramkumar, Electrospinning of Nanofibers, Journal of Applied Polymer Science, Vol.96, 557-569, 2005.
3. Sung Won Choi; Jeong Rae Kim; Young Rack Ahn; Seong Mu Jo; and Elton J. Cairns, Characterization of Electrospun Fiber-Based Polymer Electrolytes, Chem. Mater., 19, 104-115, 2007.
4. S.W. Choi; Y.-Z. Fu; Y.R. Ahn; S.M. Jo; A. Manthiram, Nafion-impregnated electrospun polyvinylidene fluoride composite membranes for direct metanol fuel cells, Journal of Power Sources 180, 167-171, 2008.
5. Yi-Chin Toh; Susanne Ng; Yuet Mei Khong; Xin Zhang; Yajuan Zhu; Pao-Chun Lin; Chee-Min Te; Wanxin Sun and Henry Yu, Cellular responses to a nanofibrous environment, Nanotoday-Review Feature, Vol. 1, No. 3, 2006.
6. Muhamad Nasir; Hidetoshi Matsumoto; Mie Minagawa; Akihiko Tanioka; Tetsuya Danno; and Hideo Horibe, Formation of β -phase crystalline structure of PVDF nanofiber by electrospray deposition: Additive Effect of Ionic Fluorinated Surfactant, Polymer Journal, Vol.39, No.7, 670-674, 2007.
7. Eric G. Fine; Robert F. Valentini; Ravi Bellamkonda; and Patrick Aebischer, Improve nerve regeneration trough piezoelectric vinylidene fluoride-trifluoroethylene copolymer guidance channels, Biomaterials, 12, 775-780, 1991.



2. ANTECEDENTES

2.1 MATERIALES INTELIGENTES: MATERIALES PIEZOELÉCTRICOS

El término de material inteligente generalmente se utiliza en materiales que exhiben uno o varios cambios de sus propiedades en respuesta a un estímulo externo. En los últimos años se ha realizado un gran avance en el desarrollo de estructuras continuas y activas, para controlar y optimizar su desempeño en la simulación de sistemas biológicos, capacidades y diseños integrados. El campo de los materiales inteligentes es multidisciplinario e interdisciplinario, obteniendo así una serie de tecnologías para los materiales, en el control, procesamiento de información, detección, así como la amortiguación y la integración de sistemas en una amplia gama de aplicaciones industriales ^[1].

Las diversas tecnologías que componen el campo de los materiales inteligentes y sus respectivas estructuras se encuentran en diferentes etapas de comercialización. Los materiales piezoeléctricos, cerámicos electrorestrictivos, así como, polímeros piezoeléctricos y sistemas de sensores de fibra óptica están bien establecidos en los procesos de obtención comercial ^[1].

En 1880, los hermanos Curie descubrieron un efecto sumamente interesante: un cristal que al ser sometido a una presión mecánica a lo largo de un eje determinado, desarrolla una diferencia de potencial entre sus caras. También comprobaron experimentalmente el efecto recíproco, el cual frente a campos eléctricos externos, estos cristales evidenciaban una deformación mecánica. Dicha propiedad fue llamada *piezoelectricidad*, y a dichos materiales se les llamó *piezoeléctricos*. En años recientes estos materiales piezoeléctricos han tenido un gran auge como materiales inteligentes ^{[1][2]}. Estos materiales activos, son ampliamente utilizados debido a que exhiben una amplia respuesta electromecánica, así como, requerimientos relativamente bajos de energía y fuerzas generativas altas entre otras ^[2].



Los materiales piezoeléctricos exhiben un efecto, el cual está relacionado con los momentos dipolares existentes, ya que éstos se encuentran íntimamente ligados a la estructura física del material. Es por ello que una deformación mecánica (en el sentido adecuado) altera el conjunto de momentos y, por ende, el momento resultante. La resistencia interna que se presenta en el material es muy grande, y las cargas del aire no anulan inmediatamente la nueva distribución de cargas de polarización, por lo que se observa una diferencia de potencial neta transitoria en las caras del cristal (esto se presenta hasta que las cargas libres del aire vuelven a anular el efecto de las cargas internas generadas en el material). Dichos voltajes pueden ser del orden de los 10kV, como en los encendedores comunes ^[2].

Un cristal piezoeléctrico colocado en un campo eléctrico variable reaccionará de forma variable en armonía con el campo. En particular, si el material piezoeléctrico es colocado entre dos placas metálicas conectadas a un generador de corriente alterna (el cual produce un voltaje variable de acuerdo a una onda sinusoidal), el cristal deberá responder con un movimiento oscilante el cual intentará simular dicho voltaje oscilante. Hoy en día los materiales piezoeléctricos tienen aplicaciones diversas en la vida cotidiana.

El efecto piezoeléctrico directo se utiliza para obtener pequeños movimientos con precisión y rapidez, en donde es posible conocer la respuesta mecánica frente a un cierto voltaje aplicado. También se aprovecha este efecto para empujar los émbolos de los cartuchos de las impresoras de tinta, generando diminutas gotas en el momento preciso.

Los materiales piezoeléctricos más comunes son los cerámicos ^[1]. Pero debido a que éstos materiales son duros y quebradizos al aplicarse un gran esfuerzo mecánico, estos materiales sólo obtienen una deformación muy pequeña. Recientemente, algunos materiales de origen polimérico han sido fabricados y preparados con características piezoeléctricas. Debido a que los polímeros son materiales mucho más flexibles que los cerámicos pueden ser fabricados con mayor facilidad en forma de láminas delgadas. De esta forma, estos materiales son sometidos a un esfuerzo mecánico determinado, lo cual



provoca que la deformación producida pueda ser de varios cientos de veces mayor, haciendo que estos materiales sean lo suficientemente sensibles para ser usados como detectores de vibración (ondas sonoras o térmicas) en micrófonos u otros equipos especiales.

Estos materiales también están presentes en otros dispositivos, por ejemplo, un encendedor del tipo *Magiclick*. En este tipo de dispositivo el gatillo comprime un cristal piezoeléctrico que genera una diferencia de potencial entre la placa exterior de la boca del encendedor (usualmente en forma de corona redonda o cuadrada) y un eje metálico central. Esta diferencia de potencial es tan grande (aproximadamente 10kV) que produce la ruptura del aire, el aire se polariza generando una corriente eléctrica entre el eje y la corona en forma de chispa. Simultáneamente, el gatillo libera el gas del encendedor, y como resultado obtenemos la llama ^[3].

Existen diversos grupos de materiales piezoeléctricos incluyendo una gran variedad de polímeros sintéticos, tales como, el polipropileno (PP), poliestireno (PS) y el polimetilmetacrilato (PMMA), poliamidas semicristalinas como el nylon-11 y polímeros amorfos como el vinil acetato (PVAc). Sin embargo los efectos piezoeléctricos en estos materiales son relativamente débiles, inestables regularmente y son considerados con un significativo límite práctico ^[1].

Por otra parte, las propiedades de los materiales poliméricos son muy diferentes en comparación a las propiedades de los materiales inorgánicos (*Tabla 2.1*), siendo este tipo de materiales poliméricos de mayor facilidad para llenar espacios donde los cerámicos y algunos cristales son incapaces de obtener un desempeño eficaz debido a los requerimientos de diseño y proceso. La *Tabla 2.1* ilustra los valores para la constante de esfuerzo piezoeléctrico (d_{31}) determinada en un material polimérico y en un cerámico. Se puede apreciar que el valor registrado para el material polimérico (en este caso el PVDF), es más bajo que el material cerámico ^[2].



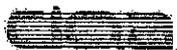
Sin embargo, los polímeros piezoeléctricos tienen valores mayores de la constante de tensión piezoeléctrica (g_{31}), lo cual indica que este tipo de materiales son mejores sensores que los cerámicos.

Tabla 2.1 Comparación de las propiedades de materiales piezoeléctricos estándar de un polímero (PVDF) y un cerámico (PZT).

Material	d_{31}^a (pm/V)	g_{31}^a (mV-m/N)	k_{31}	Características notables
Poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF)	28	240	0.12	Flexible, bajo peso, impedancia mecánica, baja acústica
Titanato de Plomo-Zirconio (PZT)	175	11	0.34	Alto peso, tóxico, quebradizo

Los sensores y actuadores obtenidos a partir de polímeros piezoeléctricos ofrecen una ventaja en la flexibilidad de procesamiento, esto debido a su menor densidad, mayor resistencia mecánica, disponibilidad en la manufacturación en grandes áreas, así como la facilidad de poder ser cortados y moldeados en formas complejas, exhibiendo altos valores de fuerza y resistencia al impacto.

Los polímeros, al poseer altos valores de descomposición dieléctricas, pueden resistir altos campos eléctricos de manejo en comparación con los materiales cerámicos. El poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF o PVF_2), es el único polímero que posee un valor del coeficiente piezoeléctrico (d_{31}) elevado ^[1]. A diferencia de los materiales cerámicos, donde la estructura cristalina del material proporciona las propiedades piezoeléctricas, en el caso de los polímeros, esto es debido al acomodo de las cadenas poliméricas, ya que las moléculas se atraen y repelen entre si mediante interacciones intermoleculares cuando estos materiales son expuestos a un campo eléctrico, confiriéndole de esta manera sus propiedades piezoeléctricas ^[4].



2.1.1 Relación entre la simetría del cristal y sus propiedades.

Los cristales pueden ser clasificados dentro de 32 tipos de cristales dependiendo de la simetría de su cristalografía, estos a su vez, pueden ser clasificados en dos clases de cristales: 1. aquellos que poseen centro de simetría y 2. Aquellos que no lo poseen. Generándose de esta manera 21 tipos de cristales que no poseen centro de simetría, y por lo tanto la presencia de propiedades piezoeléctricas. Sin embargo, dentro de este conjunto de cristales, 10 de estos cristales son polares en un solo eje ^[1].

Tabla 2.2 Clasificación cristalográfica de acuerdo a la polaridad ^a y los centros de simetría.

Polaridad	Simetría	Sistema del Cristal										
		Cúbico		Hexagonal		Tetragonal		Hecta-rombico		Orto-rombico	mono-clínico	triclínico
no-polar (22)	centro(11)	<i>m3m</i>	<i>m3</i>	<i>6/mmm</i>	<i>6/m</i>	<i>4/mmm</i>	<i>4/m</i>	<i>3m</i>	3	<i>mmm</i>	<i>2/m</i>	
	polar (pireoelectricidad) (10)	no-centro (21)	432	23	622	6	422	4	32		222	
43m				6m2		42m						
				6mm	6	4mm	4	3m	3	mm2	2	1

a. Los cristales piezoeléctricos son aquellos que se encuentran en la parte sombreada.

2.1.2 Clasificación Piezoeléctrica.

La piezoelectricidad es una propiedad que poseen pocos cerámicos, polímeros y algunos sistemas biológicos. Una variante de la piezoelectricidad es la piroelectricidad, donde la polarización esta en función de la temperatura, algunos de estos materiales son ferroeléctricos, aunque no todos los materiales ferroeléctricos son piroeléctricos.

Los materiales piezoeléctricos presentan una presión eléctrica, que es la generación de la polarización eléctrica en un material en respuesta a una fuerza mecánica, este fenómeno es conocido como efecto directo. Por otra parte, estos materiales también pueden mostrar un efecto inverso debido a la deformación mecánica sobre la aplicación de una carga eléctrica o una señal eléctrica. Se pueden encontrar diversos tipos de materiales, tales como, cerámicos electroactivos, materiales electro o magnetoreológicos y polímeros electroactivos (EAP), que ofrecen una respuesta activa, es decir, que experimentan un cambio significativo en sus propiedades físicas o dimensiones espaciales debido a la aplicación de estímulos eléctricos o térmicos y viceversa. La *Figura 2.1* esquematiza los



diferentes procedimientos que se pueden realizar sobre la materia para obtener propiedades específicas, en este caso piezoeléctricas ^{[1][2]}.

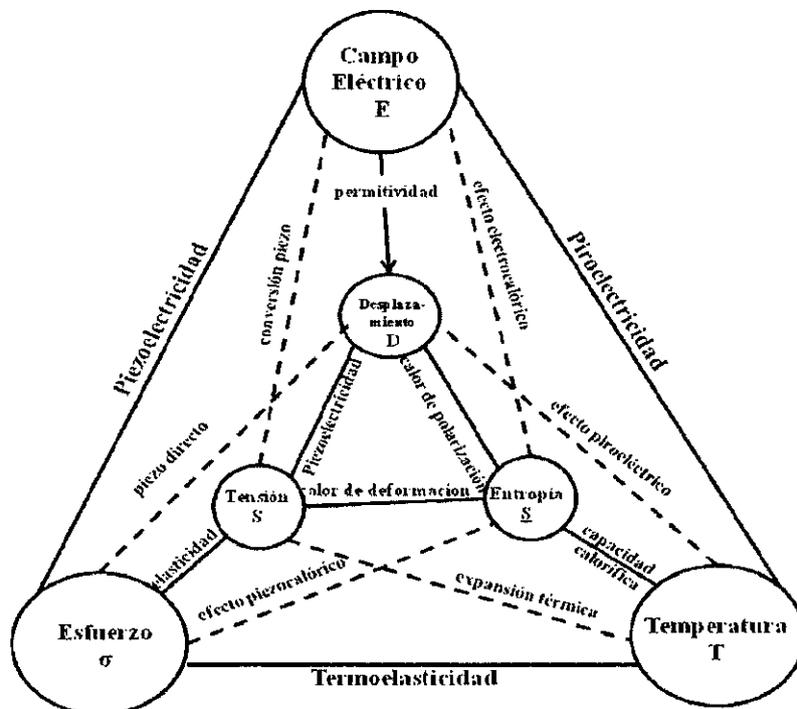


Figura 2.1 Diagrama Heckman, el cual muestra la interrelación entre las propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas de los materiales. Así mismo, propiedades tales como la expansión piezoeléctrica, fenómeno piroeléctrico y térmico ^[1].

2.1.3 Polímeros Semicristalinos: Mecanismo de piezoelectricidad.

Los polímeros semicristalinos deben tener una fase cristalina en la cual la morfología esté compuesta de cristales dispersos dentro de la fase amorfa. La fase amorfa tiene una temperatura de transición vítrea, la cual dicta las propiedades mecánicas del polímero, mientras que los cristales presentes presentan una temperatura de fusión, que a su vez limita la temperatura de uso del material.

El grado de cristalinidad en dichos polímeros depende del método de preparación y del historial térmico. La mayoría de los polímeros semicristalinos presentan varias fases cristalográficas, algunas de ellas pueden ser fases polares. En estos polímeros semicristalinos, la fase amorfa permite la orientación del cristal y así la polarización



permanece estable por arriba de la temperatura de Curie. Esta polarización llega a mantenerse constante durante muchos años, a menos de sea influenciada por efectos externos, como lo pueden ser la humedad o temperaturas elevadas^{[1][2]}.

En la *Figura 2.2* se puede observar un material cuyos cristales no poseen centro de simetría y que al ser sometidos a un esfuerzo mecánico (en este caso de tensión), disocia los centros de gravedad de las cargas positivas y de las cargas negativas. Apareciendo de este modo dipolos elementales en la masa y, por influencia, cargas de signo opuesto en las superficies.

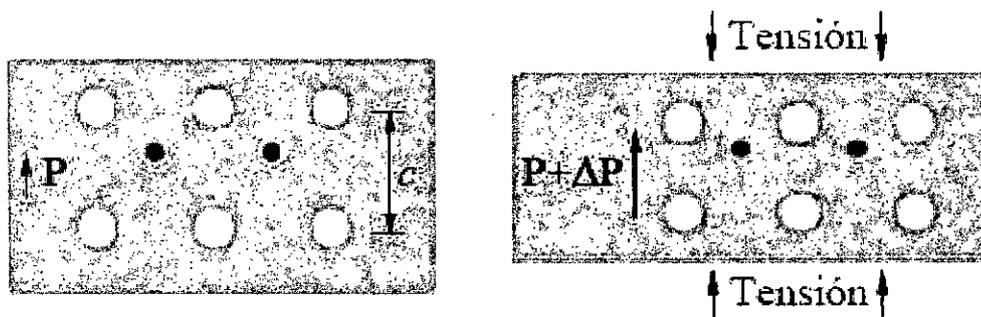


Figura 2.2 Esquema del efecto de la tensión mecánica sobre el centro de gravedad de cargas negativas y positivas, produciendo un momento dipolar (cargas superficiales).

Debido a la suma de los momentos dipolares, al presentarse una orientación al azar de la polarización genera la cancelación en el material. Es por esto que la aplicación de técnicas que proporcionen polarización en los materiales, se han obtenido materiales ferroeléctricos que exhiben una actividad electromecánica activa^[2]. Ya obtenidos, este tipo de materiales ferroeléctricos actúan como una sola entidad, la cual es caracterizada por la polarización macroscópica neta que es inducida por una polarización aplicada.



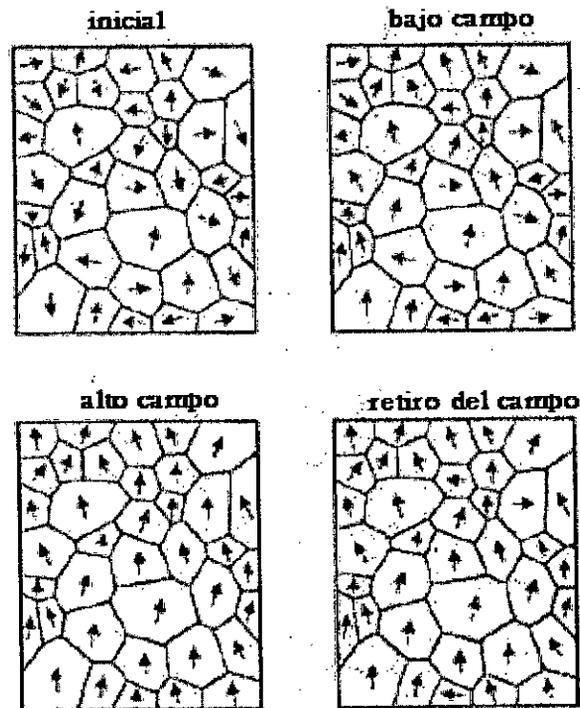
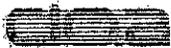


Figura 2.3 Representación esquemática de los cambios micro estructurales durante la polarización y después de la eliminación de la polarización.

Existen varios métodos de polarización, tanto para los materiales cerámicos, como los materiales poliméricos. Estos pueden ser por medio de un tratamiento corona, polarización en el vacío, electrohilado, orientación en medio fundido, esfuerzos mecánicos, entre otros. Uno de los procesos más efectuados dentro de estas técnicas de polarización es empleando electrodos sobre la superficie del material de modo que los dipolos dentro del material se reorientan y se alínean en la dirección del campo eléctrico aplicado (*Figura 2.3*).

Uno de los polímeros más utilizados en este tipo de técnicas con el fin de aumentar la polarización del mismo, es el poli(fluoruro de vinilideno), ya que por sí mismo este material polimérico posee propiedades ferroeléctricas, piezo y piroeléctricas.



2.2 POLI(FLUORURO DE VINILIDENO) (PVDF)

El poli(fluoruro de vinilideno) es un polímero semicristalino, el cual posee un 50% de cristalinidad, altos valores de esfuerzo mecánico, así como al impacto. Particularmente en fibras orientadas o películas de este material, además de poseer una alta resistencia a la cadencia bajo carga después de la fatiga por flexiones repetitivas.

Así mismo, este material posee un carácter polar, así como propiedades piezoeléctrico debidas a una efectiva separación macroscópica de las cargas negativas y positivas en su estructura, las cuales pueden ser producidas mediante la aplicación de un campo eléctrico, entre otros. Por otra parte, esta propiedad puede ser obtenida mediante la orientación de los dipolos o con la generación de cargas en el espacio a partir de la generación o creación de cargas libres ^[1]. En 1969, Kawai ^[5] encontró que el PVDF exhibe un inusual aumento en el efecto piezoeléctrico después de ser sometido a una polarización, demostrando así que en películas que fueron sometidas a una polarización de un espesor pequeño de este material revelan grandes coeficientes piezoeléctricos, teniendo un valor de $6-7\text{pCN}^{-1}$, el cual es un valor diez veces mayor que el que ha sido reportado en otros polímeros.

Esto puede ser atribuido a cuatro facetas estructurales que existen en la mayoría de la estimulación eléctrica de los polímeros. Estos elementos críticos son: i. la presencia de dipolos permanentes, ii. la habilidad de alinear u orientar los dipolos moleculares, iii. la habilidad de mantener los dipolos alineados durante un periodo largo de tiempo y iv. la habilidad del material de sufrir grandes deformaciones bajo un esfuerzo mecánico.

Estos elementos son necesarios para polímeros semicristalinos y amorfos para tener propiedades piezoeléctricas. La cristalinidad de estos polímeros depende significativamente sobre las condiciones de procesamiento, así como, el historial térmico del mismo.



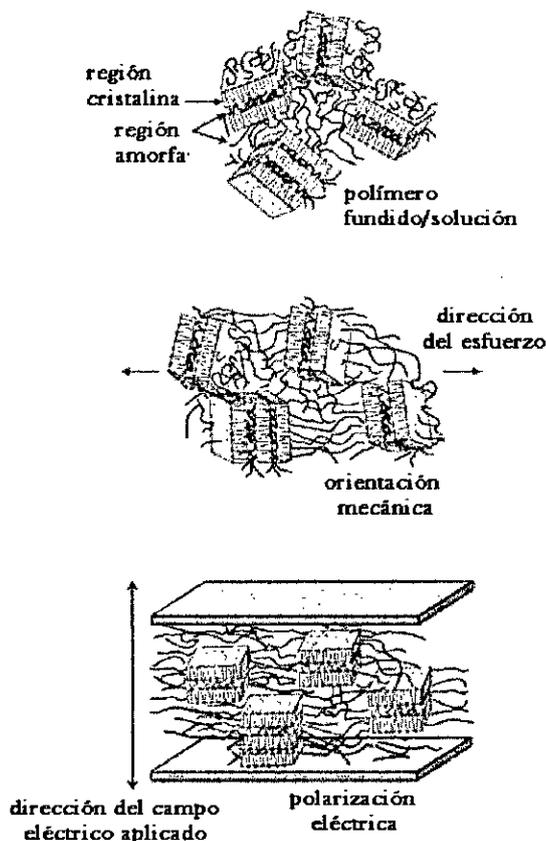


Figura 2.4 Esquema representativo de las fases cristalina y amorfa del PVDF; a. material en fundido, b. posterior a la aplicación de un esfuerzo mecánico, c. muestra polarizada en fundido ^[11].

La fase amorfa en el PVDF tiene una temperatura de transición vítrea, la cual se encuentra por debajo de la temperatura ambiente (-27°C), por lo que este polímero es un material flexible a temperatura ambiente ^[6].

Esto es debido a la naturaleza de este polímero, tal como: la orientación eléctrica, ya que los átomos de fluoruro son muy pequeños, los cuales tienen un radio de van der Waals de 1.35 angstroms, siendo ligeramente más grandes que los átomos de hidrógeno (1.2\AA), formando así bandas altamente polares con el átomo de carbono (*Figura 2.5*), teniendo así momentos dipolares de $\mu=6.4 \times 10^{-30}$ coulomb-m ^[5]. Debido a este acomodo molecular en la cadena principal, le confiere al PVDF de efectos polares únicos que influyen en la respuesta electromecánica, solubilidad, propiedades dieléctricas, morfología de los



cristales, así como, alto rendimiento de la constante dieléctrica. El valor de la constante dieléctrica del PVDF oscila entre 20-28, valor mayor al presentado por otros polímeros (Tabla 2.3). Esta característica hace del PVDF un polímero atractivo para su uso en dispositivos electrónicos, transductores que requieren de interconexión de energía mecánica y eléctrica, sensores, actuadores (músculos y órganos artificiales), imágenes médicas, monitores de flujo de sangre, micrófonos, piel inteligente, transductores acústicos de uso bajo el agua, bombas y válvulas de fluidos, entre otros [21][7].

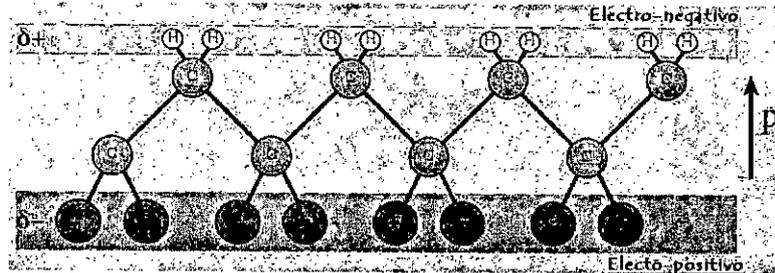


Figura 2.5 Esquema químico del poli(fluoruro de vinilideno).

Tabla 2.3 Comparación de propiedades piezoeléctricas de algunos materiales poliméricos semicristalinos [1].

Polímero	Estructura	Tg (°C)	Tm (°C)	Temp. Max de uso	d ₃₁
PVDF	$\left[\begin{array}{c} \text{F} \\ \\ \text{C}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{F} \end{array} \right]_n$	-35	175	80	20-28
PTrFE	$\left[\begin{array}{c} \text{F} \quad \text{F} \\ \quad \\ \text{C}-\text{CH} \\ \\ \text{F} \end{array} \right]_n$	32	150	90-100	12
Nylon-11	$\left[\text{NH}-(\text{CH}_2)_{10}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$	68	195	185	3 @ 25°C 14 @ 107°C
Poliurea-9	$\left[(\text{CH}_2)_9-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH} \right]_n$	50	180	--	--



El PVDF presenta una fase polar a la cual se le denomina fase β y que dentro de las fases polares del polímero es la más polar. Las cadenas poliméricas en esta fase se orientan en una celda unitaria, de forma tal que sus momentos dipolares se alinean en la misma dirección, resultando una estructura fuertemente polar.

En la fase α las cadenas poliméricas se ordenan de manera alternada, por lo que sus respectivos momentos dipolares son cancelados dando como resultado un momento bipolar neutro, presentado así un comportamiento paraeléctrico ^[8]. Así mismo, se ha utilizado la aplicación de campos eléctricos para la transformación de las fases α y γ en fase β , siendo el electrohilado una de las técnicas más utilizadas para aumentar la polarización en este tipo de materiales.

El electrohilado es una técnica que puede favorecer la obtención directa de la fase β a partir de soluciones poliméricas ^{[9][10][11]}.

Un proceso de polarización típico consiste en el calentamiento de una película polimérica a altas temperaturas, aplicando un campo eléctrico y posteriormente disminuyendo la temperatura hasta temperatura ambiente con el campo aplicado.

Por otra parte, los materiales ferroeléctricos son definidos como materiales cristalinos, en los cuales su celda unitaria es polar y la dirección de polarización puede ser cambiada por la aplicación de un campo eléctrico ^[12]. La polarización, sin embargo es un equilibrio térmico ^[1].

2.2.1 Estructura Química.

La estructura química del poli(fluoruro de vinilideno) consiste de dos átomos de carbono, hidrógeno y flúor, $-\text{CH}_2\text{-CF}_2-$. El peso molecular típico de este polímero que se utiliza comercialmente es de 4×10^6 o 60,000 unidades monoméricas. Este polímero es obtenido con un defecto común en la cadena polimérica, el cual es creado durante la polimerización como los carbonos, por ejemplo la estructura de carbonos en donde se encuentran los dos átomos de flúor, ya que estos se pueden colocarse de dos maneras: cabeza-cabeza (heat-to-heat; HH) $-\text{CF}_2\text{-CF}_2-$, o cola-cola (tail-to-tail; TT) $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$, generando así estos defectos dentro de la cadena polimérica. Tales defectos generalmente



ocurren en par, inmediatamente que se presenta la terminación TT, sigue la terminación HH. La concentración de estos pares de defectos en los materiales comerciales es de aproximadamente del 4-5% típicamente.

En el PVDF, el grupo CH_2 desempeña un papel importante en la dilución directa de las interacciones de los CF_2 , ya que se encuentra ubicado en una posición intermedia entre los CF_2 adyacentes. Tomando así, distintas conformaciones en isómeros trans y gauche, los cuales tienen una probabilidad estadística para su formación similar entre sí. Esto puede ser una de las razones principales por las que el PVDF (y sus copolímeros) puede tomar una variedad de conformaciones moleculares, así como estructuras cristalográficas, incluso en el estado cristalino.

El PVDF por lo tanto puede tomar al menos tres tipos de conformaciones moleculares, TGTE, TTTT, y TTTGTTTG, como se explica a continuación. Existen cuatro formas de empaquetamiento de la cadena de PVDF dentro de las celdas unitarias, denominándose así como β , α , γ y δ (o formas II, I, III y IV), en orden de descubrimiento en la historia de la PVDF. En la *Figura 2.6*, se muestran las estructuras moleculares y cristalinas de estas cuatro modificaciones.

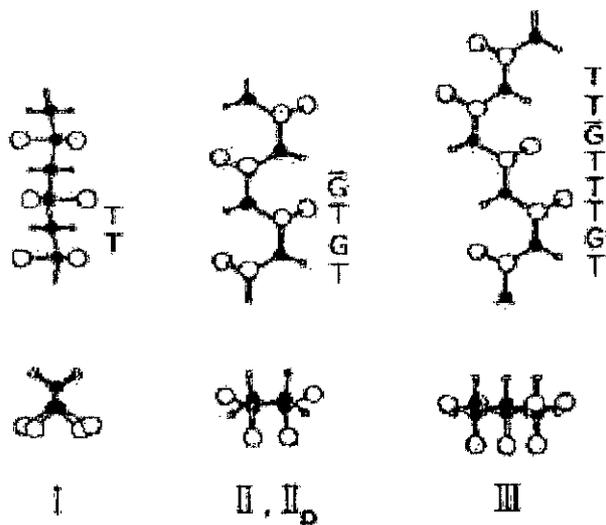


Figura 2.6 Estructura molecular de las modificaciones cristalinas del PVDF ^[2].



En la *Tabla 2.4*, se muestran los parámetros cristalográficos del PVDF, así como, las medidas de las celdas unitarias en las diferentes formas del cristal.

Tabla 2.4 Datos cristalográficos de las modificaciones cristalinas del PVDF.

	Parámetros de la celda unitaria	Cadena Molecular	N°
Forma I	$a = 8.58\text{Å}$, $b = 4.91\text{Å}$, c (f.a.) = 2.56Å	ligeramente torcida planar-zigzag	2
Forma II	$a = 4.96\text{Å}$, $b = 9.64\text{Å}$, c (f.a.) = 4.96Å , $\beta = 90^\circ$	TGTG	2
Forma III	$a = 4.96\text{Å}$, $b = 9.58\text{Å}$, c (f.a.) = 9.23Å , $\beta = 92.9^\circ$	TTTGTGTTG	2

*N = número de cadenas en una celda unitaria; f.a. = eje de la fibra

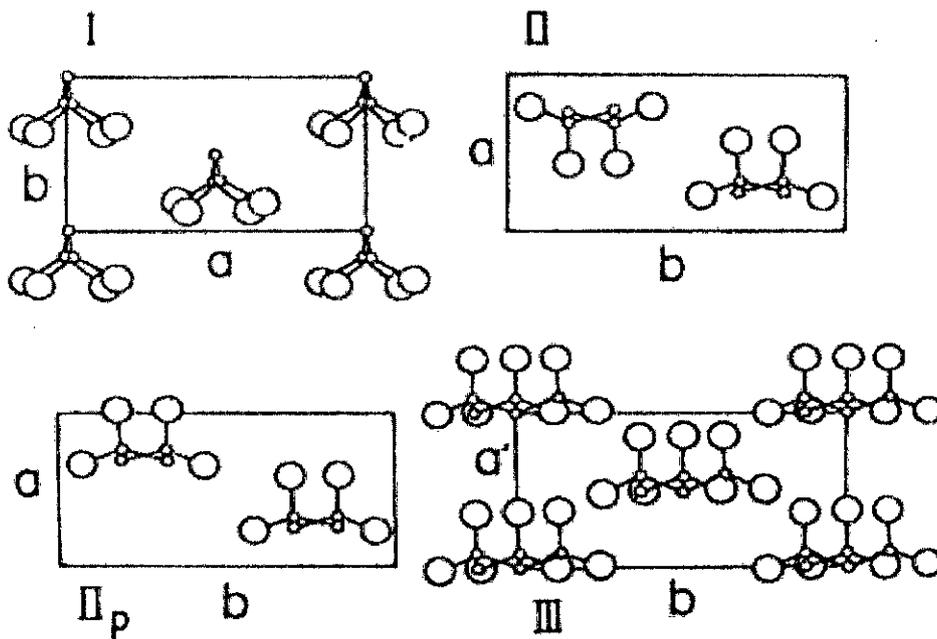


Figura 2.7 Esquema de las interacciones presentes entre las diferentes modificaciones cristalográficas del PVDF.



2.2.2 Descripción de las modificaciones cristalinas del PVDF.

La forma II o fase α , se prepara típicamente por estiramientos del material a temperatura ambiente a partir de la desorientación de la forma I (fase β y del enfriamiento del material fundido a una velocidad normal (10-20 °C/min o superior). Un enfriamiento lento del fundido no proporciona cristales de forma I, pero genera esferulitas con cristales de forma III, algunas veces genera cristales de la forma II.

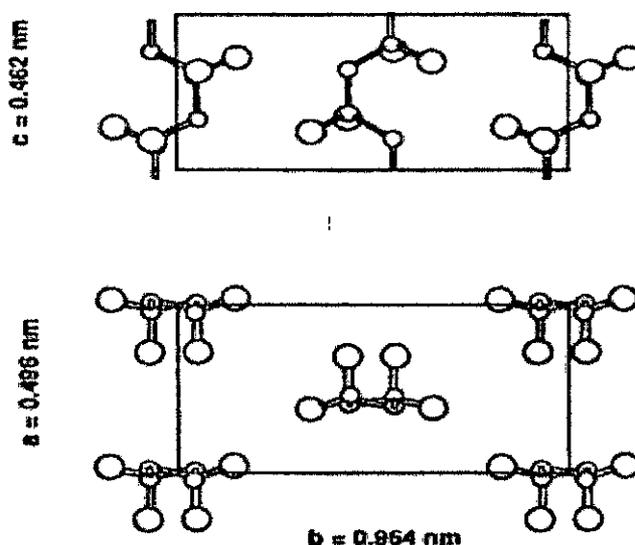


Figura 2.8 Esquema de la Forma I (α) del cristal en el PVDF.

El giro de la cadena en los cristales de forma II en películas es el resultado del enfriamiento a la temperatura ambiente. Una desorientación dentro de una película se puede obtener por medio del vaciado de una solución de PVDF en un solvente fuertemente polar como el triamida de hexametilfosforico (HMPTA), o por precipitación de una solución de dimetilacetamida en una solución acuosa de ácido acético. Otra manera de obtener una desorientación del material para la obtención de cristales de forma I puede ser realizada mediante el enfriamiento rápido en nitrógeno líquido.

En la *Figura 2.9* se muestran algunas formas de generar orientación o desorientación de las diferentes modificaciones cristalográficas dentro del PVDF.



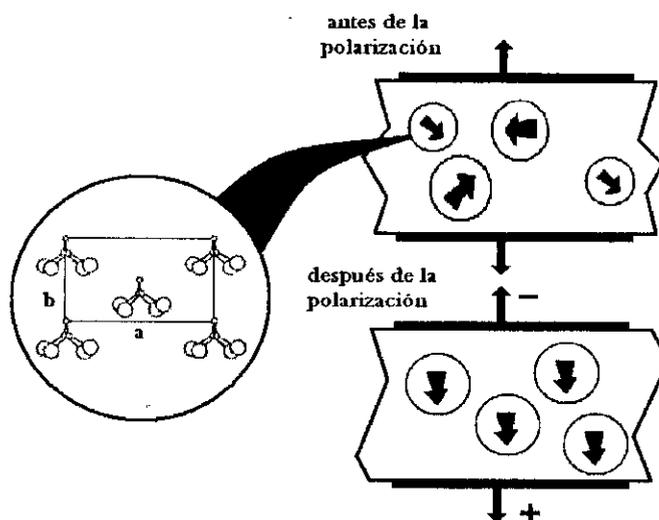


Figura 2.10 Cambios estructurales causados por la polarización del PVDF en el cristal de la Forma I (β).

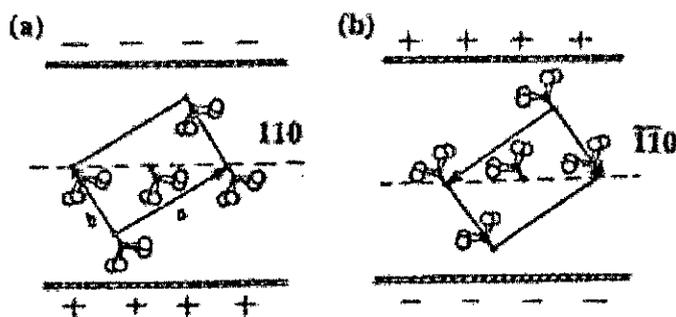


Figura 2.11 Reorientación del cristal de Forma I (β) del PVDF bajo un campo eléctrico externo aplicado.

2.2.4 Nanofibras de PVDF.

En años recientes las nanofibras han ganado mucha atención en las investigaciones dentro del campo científico y tecnológico, registrándose este proceso durante 1990's^{[13][14]}. Las nanofibras y membranas fibrosas no-tejidas tienen un gran potencial en diversas aplicaciones, tales como medios de filtración, ropa de protección, aeroespacial, dispositivos electrónicos, ingeniería de tejido, sensores y otros usos biomédicos^{[16][17]}. Dichas nanofibras pueden ser obtenidas mediante varias técnicas, dentro de las que se pueden encontrar: la deposición de vapor químico (CVD), autoensamblaje molecular, método de siembra de nanofibras, electro-*espray* (EDS), electrohilado.



2.3 ELECTROHILADO

Esta técnica se ha utilizado ampliamente como una herramienta poderosa para producir fibras ultra finas (en la escala de decenas hasta cientos de nanómetros), estas nanofibras son capaces de formar una malla altamente porosa con grandes relaciones de área superficial/volumen ^[12] que proveen a estas redes no-tejidas muchas aplicaciones debido a sus estructuras tridimensionales. Existen varios parámetros conocidos que afectan las propiedades físicas (diámetro, morfología de la superficie y porosidad de las fibras, resistencia, etc.) de las nanofibras obtenidas a partir del electrohilado de soluciones poliméricas. Estos parámetros se clasifican en tres categorías: **1. Parámetros internos:** en esta categoría se incluye la naturaleza y el peso molecular del polímero y las propiedades físicas de las soluciones poliméricas (concentración, viscosidad, conductividad, permeabilidad dieléctrica y tensión superficial); **2. Parámetros del proceso:** se incluyen el potencial eléctrico aplicado, la presión hidrostática en el tubo capilar, la distancia entre la aguja y el colector, la velocidad de dosificación, así como el tamaño de la boquilla; **3. Parámetros ambientales:** temperatura, humedad y flujo del aire en la cámara del equipo de electrohilado ^[15]. Esta técnica fue patentada por primera vez en 1934 por Formhals ^[13] ^[14], la cual consiste en la aplicación de un potencial eléctrico elevado sobre una solución polimérica, a través del uso de una jeringa con una aguja metálica, que contiene la solución polimérica (electrodo positivo).

Cuando el voltaje es lo suficientemente alto y sobrepasa la tensión superficial se produce la deformación de la solución polimérica dosificada mediante una jeringa, donde las fuerzas electrostáticas rompen la tensión superficial del fluido, generándose una estructura en forma de cono (cono de Taylor), lo cual posteriormente da lugar a la expulsión de la solución en forma de un hilo o *chorro* que viaja a lo largo del diferencial de potencial que se genera entre la aguja y la placa. Finalmente se depositando en la placa colectora o electrodo negativo (Aluminio). En el transcurso del viaje del material desde la punta de la aguja al colector, los hilos del material se estiran y se elongan conforme recorren cierta distancia, ocurriendo la evaporación del solvente durante este proceso. De esta manera, se forma una fibra continúa que se deposita al azar sobre el colector, la cual



después de cierto tiempo da lugar a la formación de una membrana fibrosa no-tejida ^[15] ^[16].

El voltaje requerido para producir este tipo de fibras se encuentra en un intervalo de 5kV a 30kV. Este intervalo de voltaje es suficientemente alto para sobrepasar la tensión superficial de las soluciones poliméricas y producir hilos cargados con tamaños de diámetro del orden nanométrico ^[13] ^[14] ^[16]. La *Figura 2.12* muestra un esquema de este proceso.

El diámetro de las fibras ultra finas obtenidas mediante el proceso de electrohilado está en función del proceso y los parámetros del sistema, tales como son el voltaje aplicado, la concentración del polímero y la distancia entre la aguja y el colector. La duración del proceso de electrohilado determina el espesor de las membranas ^[16].

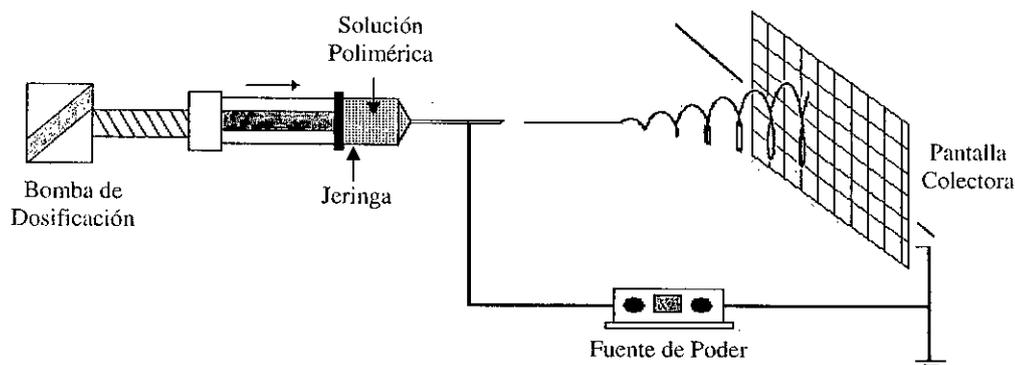


Figura 2.12 Esquema de la técnica utilizada de electrohilado (electrospinning).

El control de los parámetros de proceso produce membranas porosas con un 30% a 90% de porosidad ^[17], dando como resultado una estructura porosa abierta intercomunicada y una gran área superficial por unidad de volumen ^[18]. Debido a estas propiedades, en los últimos años la técnica de electrohilado ha ganado mayor atención ^[14], aumentando así el número de polímeros sintéticos y naturales que han sido procesados tales como: poli(óxido de etileno)(PEO) en agua, poliuretano en N,N-dimetilformamida (DMF), l-pilactido en diclorometano, poli(ϵ -caprolactona)(PCL) en acetona, entre otros ^[16].



Los materiales preparados por electrohilado pueden encontrar aplicaciones como: filtros de aire de alto rendimiento, textiles protectores, sensores, compuestos avanzados, celdas fotovoltaicas, así como andamios o soportes en ingeniería de tejido, y más recientemente como membranas de separación por afinidad ^[18].

2.3.1 Aplicaciones de las nanofibras.

Debido a su alta porosidad y gran área superficial, este tipo de membranas fibrosas han tenido enormes áreas de desarrollo y aplicación en la ingeniería mecánica estable, así como en los andamios de tejido biológicamente funcionales ^[14].

Li W. et al. ^[19], utilizaron poli(D, L-lactido-co-glicólido)(PLGA), un polímero biodegradable, comúnmente utilizado en ingeniería de tejido. Los autores obtuvieron membranas electrohiladas con alta porosidad y observaron que se genera suficiente espacio para el acomodamiento de las células y una fácil difusión de nutrientes, así como, la eliminación de subproductos del metabolismo. Por otra parte, concluyeron que las membranas deben tener altas propiedades elásticas (*módulo elástico*), así como, la deformación son de suma importancia para el uso de estos materiales como andamios o soportes en ingeniería de tejido ^[13].

Matthews et al. ^[21], encontraron que las propiedades estructurales del colágeno en función del origen del tejido tiene una influencia directa en el tipo de tejidos obtenidos. Encontraron diferentes tejidos tipo I (proveniente de la piel) y tipo III (proveniente de la placenta). Posteriormente, realizaron una variación de la concentración de la solución del colágeno, el cual fue utilizado durante la técnica de electrohilado para la obtención de fibras. Estos autores demostraron que es posible diseñar una matriz con propiedades mecánicas a medida que se controla la orientación de las fibras. Estas propiedades inherentes de la matriz, permite la obtención de estructuras tridimensionales complejas e ilimitadas. Encontraron también que el colágeno electrohilado promueve el crecimiento celular en la matriz, representando así un material ideal como andamio en ingeniería de tejidos.



Huang et al. ^[22], electrohilaron soluciones de colágeno/PEO. Estudiaron su potencial de la aplicación de este material en la cicatrización de heridas e ingeniería de tejido. Obtuvieron nanofibras uniformes de 100 nm a 150 nm de diámetro, observando que las propiedades mecánicas de estas nanofibras se podrían atribuir a las fuertes interacciones intermoleculares entre el PEO y el colágeno. Con este estudio, propusieron el uso de estos materiales en la liberación controlada de fármacos.

Kanawy et al. ^[23], investigaron la aplicación potencial de la liberación controlada de clorhidrato de tetraciclina embebida en membranas de poli(etilen-co-vinil acetato)(PEVA) y ácido poliláctico, las cuales fueron obtenidas mediante la técnica de electrohilado. Observaron que el electrohilado de PEVA en una composición 50/50 PLA/PEVA obtenían los mejores resultados para la liberación de este antibiótico.

Doris Klee et al. ^[24], estudiaron el comportamiento del poli(fluoruro de vinilideno)(PVDF) modificado superficialmente con ácido acrílico, utilizando plasma y deposición química en fase de vapor (CVD) para determinar su efecto en el crecimiento de células óseas. En este trabajo se evaluó la fijación y proliferación de los osteoblastos primarios humanos sobre las superficies de PVDF modificado. Se encontró que el PVDF modificado permite el anclaje de este tipo de células.

Otros campos, tales como: el biomédico, polimérico y ciencias de las fibras no han desarrollado por completo el potencial nano-tecnológico, por lo que la producción de nanofibras actualmente se encuentra aun en niveles de laboratorio y es de extrema importancia la realización de esfuerzos para su comercialización ^[13].

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que señales eléctricas pueden ayudar al anclaje, acoplamiento y proliferación de algunos tipos de microorganismos, así como a su diferenciación ^{[25] [26]}. Se ha demostrado que la aplicación de un campo eléctrico aumenta la osificación (formación de hueso o sustancia ósea) endocrina, la estimulación en la cicatrización de heridas crónicas, la regeneración de nervios, así como, la ayuda para la recuperación de la función en el daño de la médula espinal en roedores. De esta manera



para poder aprovechar el estímulo eléctrico, se ha investigado la incorporación de polímeros conductores en los biomateriales.

Por ejemplo, *Jun Hu et al.* ^[27], estudiaron el entrecruzamiento del quitosán con un pentámero de anilina para obtener un polímero electroactivo. Este polímero anfifílico tiene la capacidad de autoensamblarse en micelas con tamaño de 200 a 300 nm. A mayor porcentaje en un cierto nivel de pentámero, este influye positivamente en la diferenciación de células neuronales de rata (feocromocitoma PC-12). Este material pudiera tener aplicaciones en la liberación controlada de fármacos, así como en la aceleración y en la reparación de nervios, sin utilizar impulsos eléctricos externos, facilitando la extensión de las neuritas (células nerviosas inmaduras).

2.4 *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Saccharomyces cerevisiae (Figura 2.5), es un hongo unicelular incluido dentro del grupo de las levaduras. Este microorganismo se utiliza de manera industrial en la fabricación del pan, cerveza, vino y otros productos de importancia industrial. El ciclo de vida de las levaduras se alterna de dos formas biológicas, una haploide y otra diploide (las haploides son aquellos que contiene un solo juego de cromosomas o la mitad “n”, mientras que las diploide tienen un número doble de cromosomas “2n”). Ambas formas se reproducen de forma asexual por gemación, por lo que es uno de los modelos más adecuados para el estudio de problemas biológicos.

Esta levadura tiene un sistema eucariota (en este tipo de células, el núcleo está rodeado por una membrana nuclear, mientras que en las células procariotas no existe dicha membrana), con una complejidad sólo ligeramente superior a la de las bacterias pero compartiendo con ella muchas de sus ventajas técnicas, además de su rápido crecimiento, dispersión de las células y la facilidad con que se replican en cultivos. Por otro lado, la ausencia de patogenicidad permite su manipulación con las mínimas precauciones ^[28].

La fase haploide permite generar, aislar y caracterizar mutantes con mucha facilidad, mientras que en la diploide se pueden realizar estudios de complementación. Una ventaja



adicional de este microorganismo consiste en que se conoce la secuencia completa de su genoma y se mantiene en constante revisión.

Por estas razones, *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en una importante herramienta a gran escala de análisis de genómica funcional, proporcionando un punto de partida para el análisis de organismos eucariotas más complejos. Al ser un organismo unicelular con una tasa de crecimiento rápida, la levadura se puede utilizar para los estudios de células que resultarían muy complicados o costosos en organismos multicelulares ^[28].

Esta levadura puede tener 3 variantes, es decir, que sea: **1. Levadura activa:** la cual es una levadura viable con un conteo de 10 mil a 20 mil millones de células vivas por gramo, esta levadura se utiliza principalmente como probiótico (es todo aquel microorganismo vivo que administrado en la cantidad adecuada proporciona beneficios saludables al hospedador); **2. Levadura inactiva:** dicha levadura tiene casi nula viabilidad. El hecho de hacerse inactiva es para aprovechar otras bondades cuando es fermentada a pH bajo, como es el ser apetecible por ciertas especies que no toleran fácilmente consumir alimentos de origen vegetal (Felinos, Caninos, entre otros.); **3. Levadura inactiva enriquecida:** en este tipo de levaduras, se aprovechan principalmente el enriquecimiento orgánico a partir de algún micro-mineral, lo que se traduce en la obtención de una mejor biodisponibilidad de la misma, por lo que se genera una mejor retención del micro-mineral orgánico a comparación del mineral inorgánico, así como, una menor posibilidad de intoxicación siempre y cuando se aplique a dosis recomendadas. En estas levaduras podemos encontrar las enriquecidas con selenio, cromo, hierro, zinc, manganeso, cobre, molibdeno, etcétera ^[29].

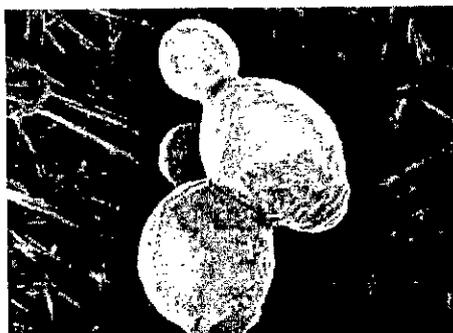


Figura 2.13 Imagen de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.



2.4.1 Nutrición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Como es elemental, el agua es un constituyente principal y componente orgánico, mientras que el oxígeno es un componente universal de las células y siempre se encuentra en grandes cantidades. Las fuentes de carbono utilizadas por las levaduras varían desde los carbohidratos hasta los aminoácidos, así mismo exhibe la capacidad de utilizar ciertos tipos de azúcares tradicionalmente empleados para la caracterización de las distintas cepas que esta especie presenta. Entre los azúcares que puede utilizar están monosacáridos como la glucosa, fructosa, maltosa y galactosa, entre otros.

Las levaduras además de necesitar una fuente de carbono, necesitan fuentes de nitrógeno como podrían ser el amonio, la urea o distintos tipos de aminoácidos, así como fuentes de fósforo. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* no se considera un patógeno común. En años recientes ha cobrado importancia su papel oportunista en la sepsis de enfermos de leucemia y otras infecciones de enfermos de sida ^[30], teniendo que para cada tipo de microorganismos se debe construir un Medio de Cultivo para balancear la mezcla de los nutrientes necesarios y concentración que permitan un buen crecimiento de los mismos [31].



Referencias.

1. Schwartz Mel, Encyclopedia of Smarts Materials, Vol. 1 and 2., 2002.
2. J.S. Harrison, Piezoelectric Polymers, ICASE-NASA Langley Research Center, Hampton, Virginia, December 2001, NASI-97046, 23681-2199.
3. Evángelista Carolina; Jáuregio-Lorda Esteban, Piezoelectricidad, Trabajo especial, Catedra de Química General para la ingeniería, 2001, www.geocities.com/Heartland/Ranch/8785/xlroch.html, 17-Junio-09.
4. Lovinger Andrew J., Ferroelectric Polymers, Vol. 220, No. 4602, 1115-1121, 1983.
5. H. Kawai, Piezoelectricity of poly(vinilidene fluoride), Jpn. J. Appl. Physic, 8, 975, 1969.
6. Zhehui Liu; Philippe Maréchal and Robert Jérôme, DMA and DSC investigations of the β transition of poly(vinylidene fluoride), Polymer, Vol. 38, No. 19, 4925-4929, 1997.
7. Q.M. Zhang; Vivek Bharti; George Kavarnos, Poly(vinylidene fluoride)(PVDF) and its copolymers,, Piezoelectric Polymer Book, 807-820, 2005.
8. S.P. Palto; L.M. Blinov and V.M. Fridkin, Physics of Two-Dimensional Ferroelectric Polymers, Center for Materials Research and Analysis, University of Nebraska, Lincoln, NE 68588-0111, USA, 2005.
9. J.S. Andrew and D.R. Clarke, Enhanced Ferroelectric Phase of Polyvinylidene Difluoride Fibers with the Addition of Magnetic Nanoparticles, American Chemical Society, Langmuir, 40, 20, A-D, 2008.
10. Chun-hui Du; Bao-Ku Zhu; You-Yi Xu, Effects of Stretching on Crystalline Phase Structure and Morphology of Hard Elastic PVDF Fibers, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 104, 2254-2259, 2007.
11. Marcia Cristina Branciforti; Vitor Sencadas, Senentxu Lanceros-Mendez; Rinaldo Gregorio JR., New Technique of Processing Highly Oriented Poly(vinylidene



- fluoride) Films Exclusively in the β Phase, *Journal Polymer Science, Part B: Physics*, Vol. 45, 2793-2801, 2007.
12. J.F. Nye, *Physical Properties of Crystals*, Oxford University Press, New York, 1957.
 13. Li W.; Laurencin C.T.; Caterson E.J.; Tuan R.S.; Ko F.K., *Journal of Biomedical Materials Research*, 60, 613-620, 2002.
 14. Li Dan; Xia Younan, *Electrospinning of Fibers*, *Advance Materials*, 16, No. 14, 1151-1170, 2004.
 15. Sung Won Choi; Jeong Rae Kim; Young Rack Ahn; Seong Mu Jo and Elton J. Cairns, *Characterization of Electrospun PVDF Fiber-Based Polymer Electrolytes*, *Chem Mater*, 19, 104-115, 2007.
 16. Zhizhen Zhao; Jingqing Li, Yuanyuan Zhang; Jing Sheng, *Preparation and Propierties of Electrospun Poly(Vinylidene Fluoride) Membranes*, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 97, 466-474, 2005.
 17. Jeong Rae Kim; Sung Won Choi; Seong Mu Jo; Wha Seop Lee; Byung Chul Kim, *Electrospun PVdF-based fibrous polymer electrolytes for lithium ion polymer batteries*, *Electrochimica Acta*, 50, 69-75, 2004.
 18. Renuga Gopal; Satinderpal Kkaur; Zuwei Ma; Casey Chan; Seeram Ramakrishna; Takeshi Matsuura, *Electrospun nanofibrous filtration membrane*, *Journal of Membrane Science*, 281, 581-586, 2006.
 19. Thandavamoorthy Subbiah; G.S. Bhat; R.W. Tock; S. Parameswaran; S.S. Ramkumar, *Electrospinning of Nanobibers*, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 96, 557-569, 2005.
 20. Matthews, J.A.; Wnek, G.E.; Simpson, D.G.; Bowlin, G.L., *Biomacromolecules*, 3, 230-237, 2002.
 21. Huang, L.; Nagapudi, K.; Apkarian, R.P.; Chaikof, E.L., *Journal of Biomater Sci Polymer Edn*, 12, 973-985, 2001.
 22. Kenawy, E.R.; Bowlin, G.L.; Mansfield, K.; Layman, J.; Simpson, D.G.; Sanders, E.H.; Wnek, G.E., *Jpurnal of Controlled Release*, 81, 50-61, 2002.



23. Doris Klee; Zahida Ademovic; Anja Bosserhof; Hartwig Hoecker; G. Maziolis; Hans-Josef Erli, *Biomaterials*, 24, 3663-3670, 2003.
24. Robert F. Valentini; Terrence G. Vargo; Joseph A. Gardella Jr. And Patrick Aebischer, Electrically charged polymeric substrates enhance nerve fibre outgrowth in vitro, *Biomaterials*, Vol. 13, No. 3, 183-190, 1992.
25. Silvia Panseri; Carla Cuhan; Joseph Lowery; Ubaldo Del Carro; Francesca Taraballi; Stefano Amadio; Angelo Vescovi and Fabrizio Gelain, Electrospun micro-and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections, *Biomedicalcentral.com*, 1472-6750, 8, 39, 2008.
26. Jun Hu; Lihong Huang; Xiuli Zhuang; Peibiao Zhang; Le Lang; Xuesi Chen; Yen Wei and Xiabin Jing, Electroactive Aniline Pentamer Cross-Linking Chitosan for Stimulation Growth of Electrically Sensitive Cells, *Biomacromolecules*, Vol. 30, No. 20, A-H, 2008.
27. González A.; Valenzuela L., *Saccharomyces cerevisiae*, Depto. de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular-UNAM.
28. Harrison, J. S., Ounias Z. 2001. *Piezoelectric Polymers*. NASA Langley Research
29. Center, 2001-43, NASA/CR-2001-211422.
30. Lewin B. (2001), *Genes Book VII*, Marban.
31. Roger Y. Stanier; Edward A. Adelberg; John Ingraham, *The Microbial World Book*, 4th. Edition, 1976.



3.1 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la nanociencia ha tenido un impacto potencial en el procesamiento tradicional de los polímeros ^[1], permitiéndonos la manipulación de las estructuras a niveles nanométricos y generando importantes aplicaciones tales como: sensores de gases, sistemas fotovoltaicos de alta eficiencia para la conversión de la energía solar, materiales con una elevada relación resistencia/masa para aplicaciones aeroespaciales, biomédicas, entre otros ^[2]. Una de las técnicas más utilizadas para la obtención de materiales a estas escalas es la técnica de electrohilado, ya que provee de membranas fibrosas. Estas membranas pueden estar compuestas de fibras naturales o sintéticas, obteniendo notables propiedades ^{[3][4]}. Algunas de las aplicaciones que se pueden encontrar son: en la ingeniería de tejido, los vendajes, la ropa protectora para el sector militar, medios de filtración, entre otros.

En décadas pasadas, se han fabricado soportes biológicos de carácter rígido, los cuales han reportado pérdidas en la tasa celular, debido a los esfuerzos generados por los pacientes sobre los cuales son aplicados durante su manejo, tal es el caso de las prótesis de nervios. Es por ello que la técnica de electrohilado, expone una nueva alternativa en la obtención de soportes celulares con mayor flexibilidad y de fácil manejo, para evitar o disminuir las pérdidas en la tasa celular.

Estudios recientes han demostrado que las señales eléctricas favorecen el anclaje y proliferación en células sensibles a estas señales eléctricas ^{[5][6][7]}. Es por ello que el uso de materiales inteligentes, en este caso el poli(fluoruro de vinilideno), proporciona la posibilidad de obtener membranas electrohiladas con características ferroeléctricas que pueden estimular el crecimiento celular, y así la obtención de materiales más flexibles.



3.2 HIPÓTESIS

Las membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) obtenidas mediante la técnica de electrohilado pueden ser utilizadas como soportes de células de *Saccharomyces cerevisiae* para ayudar al incremento de la tasa de crecimiento celular, en estado estático o con la inducción de esfuerzos mecánicos (piezoeléctrico) sobre las membranas, ya que éstas generarán un voltaje eléctrico que estimula el crecimiento celular.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 Objetivo General.

Obtener membranas de nanofibras de poli(fluoruro de vinilideno)(PVDF) mediante la tecnología de electrohilado capaces de generar un potencial eléctrico que estimule el crecimiento de células de *Saccharomyces cerevisiae*, previamente inmovilizadas en las membranas.

3.3.2 Objetivo Específicos.

- Obtener membranas con alto porcentaje de fase β , las cuales se encuentren a niveles nanométricos mediante la técnica de electrohilado.
- Comprobar que las membranas de PVDF pueden ser un material inerte en presencia de células de *Saccharomyces cerevisiae*, esto a partir de un estudio de contacto directo.
- Desarrollar un sistema de oscilación que imparta movimiento a las membranas de PVDF para la generación de un potencial eléctrico.



Referencias.

1. Li, D.;Xia, Y., *Advanced Materials*, 16, 1151-1170, 2004.
2. Moncada-Acevedo Edwin, *Búsqueda Bibliográfica de Nanotecnología y nanocompositos*, Tesis Doctoral en Química, Facultad de Ciencias Química y Farmacéutica, Universidad de Chile, 2006.
3. Panseri Silvia; Cunha Carla, Lowery Joseph; Del Carro Ubaldo; Taraballi Francesca; Amadio Stefano; Vescovi Angelo and Gelain Fabrizio, *Electrospun micro-and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections*, *BMC Biotechnology*, 8:39, 2008.
4. Choi S.W.; Fu Y.-Z.; Ahn Y.R.; Jo S.M.; Manthiram A., *Nafion-impregnated electrospun polyvinylidene fluoride composite membranes for direct metanol fuel cells*, *Journal of Power Sources*, 180, 167-171, 2008.
5. Klee Doris; Ademovic Zahida; Bossershoff Anja; Hoecker Hartwig; Maziolis G.; Erli Hans-Josef, *Surface nodification of poly(vinylidene fluoride) to improve the osteoblast adhesión*, *Biomaterials*, 24, 3663-3670, 2003.
6. Fine Eric G.; Valentini Robert F.; Bellamkonda Ravi and Aebischer Patrick, *Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidene fluoride-trifluoroethylene copolymer guidance channels*, *Biomaterials*, Vol. 12, 775-780, 1991.
7. Valentini Robert F.; Vargo Terrence G.; Gardella Jr. Joseph A. and Aebischer Patrick, *Electrically charged polymeric substrates enhance nerve fibre outgrowth in vitro*, *Biomaterials*, Vol. 13, No. 3, 1992.



4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 REACTIVOS Y MATERIAL DE LABORATORIO

4.1.1 Reactivos.

A continuación se presentan los reactivos, polímeros y materiales que fueron utilizados para el desarrollo de la parte experimental en la presente tesis.

a. Para la elaboración de las membranas poliméricas se utilizó:

Tabla 4.1 Reactivos utilizados para las elaboración de Membranas de PVDF.

SIGLAS	NOMBRE	FÓRMULA	MARCA
PVDF	Poli(fluoruro de vinilideno)	$-(CH_2CF_2)_n-$	Kynar 761, Boedeker
DMF	N,N-Dimetilformamida	C_3H_7NO	99.8% Sigma-Aldrich

b. Para la activación, cinética y resiembra de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó:

Tabla 4.2 Reactivos utilizados en la parte microbiológica para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

MATERIAL	CLAVE	MARCA
Levadura Instantánea <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	NEVADA	SAFMEX S.A. de C.V., Edo. de Mex., Toluca
Extracto de Levadura	MC-33	MERCK-Mikrobiologie
Extracto de Malta	MC-35	BD Bacto ^(TM)
Peptona	MC-22	DIFCO Laboratories
Glucosa (Dextrosa)	A-03	Analit/Química Dinámica S.A. de C.V.
Agar Bacteriológico	MC-01	BD Bioxon [®]



c. Para la preparación de la solución fisiológica se utilizó:

Tabla 4.3 Reactivo utilizado para la preparación de la solución fisiológica.

SIGLAS	NOMBRE	MARCA	PUREZA (%)
NaCl	Cloruro de Sodio	SIGMA	99

4.1.2 Material utilizado en el equipo de Electrohilado.

- Fuente de poder
- Bomba de Inyección
- Plataformas
- Soporte Universal
- Cables de conexión tipo Caimán
- Jeringa de plástico de 3 mL
- Aguja de 22Gx32 mm
- Láminas de aluminio purificado, J.T. Baker 0.001"
- Manguera de silicón (o teflón)
- Pinzas de punta plana

4.1.3 Material utilizado en el Laboratorio.

- Agitadores Magnéticos
- Viales cilíndricos de cristal
- Parrilla de agitación magnética con calentamiento
- Vasos de precipitado de 25, 50, 100 y 300 mL
- Campana de Flujo Laminar
- Micro pipetas de 100 μ L, 1 mL y 5 mL
- Puntillas de 100 μ L, 1 mL y 5 mL
- Tubos de vidrio con tapa de rosca
- Celdas de UV-vis
- Cubre y porta objetos
- Bolsas para análisis de Uro cultivo
- Cajas petri



- Agitador mecánico Vortex
- Autoclaves (esterilización del material de microbiología)
- Centrífuga

4.2 EQUIPOS

4.2.1 Electrohilado.

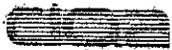
- Fuente de Poder, Spellman High Voltaje Electronics Corp. CZE1000R 30kV máximo de salida programable, corriente de 0-300 μA programable.
- Bomba de Dosificación, Cole Palmer C-74900 sencilla, velocidad de alimentación ajustable de 0.2 $\mu\text{L/h}$ hasta 500 $\mu\text{L/h}$.

4.2.2 Caracterización de las membranas de PVDF.

- Espectroscopia Infrarroja por Reflexión Total Atenuada (ATR-IFTR, siglas en ingles), NOCOLED MAGNA 5500, 110/220V 50/60 Hz, 400-5000 cm^{-1} (1500-400 cm^{-1}).
- Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, siglas en ingles), TOPCON SM-510, detector de energía dispersiva de R-X marca EDAX.
- Rayos-X, Difractómetro SIEMENS messplatz, 7KP2021 a 35 kV y 2.5 mA, Alemania.
- Análisis Dinámico Mecánico (DMA, siglas en ingles), DMAQ800 TA Instrument
- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, siglas en ingles), 2920 Modulado TA Instrument.

4.2.3 Microbiología – *Saccharomyces cerevisiae*.

- Incubadora con agitación mecánica SHAKER, New Brunswick Scientific Co. Inc. New Jersey USA, 0-100 °C y 1-500 rpm.
- Incubadora LAB-LINE Instruments, Inc. Imperial II, UL-125L
- Espectrofotómetro UV-vis portátil HACH – DR/2010, P/N 49300 – 60, 7-8 volts a 700 μA , S/N 001400020312
- Sistema Oscilatorio – MATAVAN110v 12A CIQA; motor 110v CA, regulado por un circuito basado en un TRIAC de 12A.



4.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

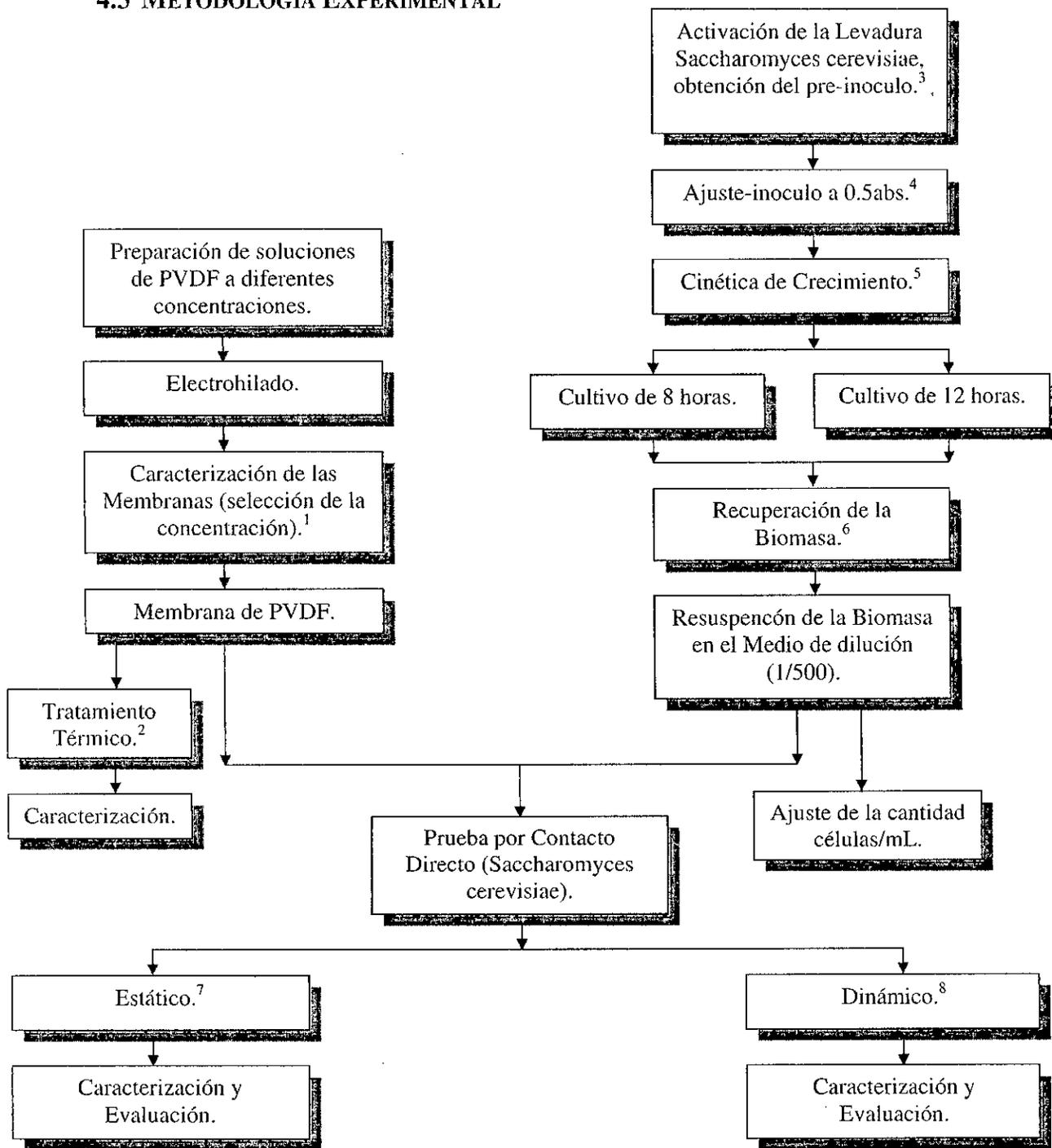


Figura 4.1 Metodología experimental del proyecto de tesis.



1. Metodología experimental utilizada para la caracterización de las membranas electrohiladas.

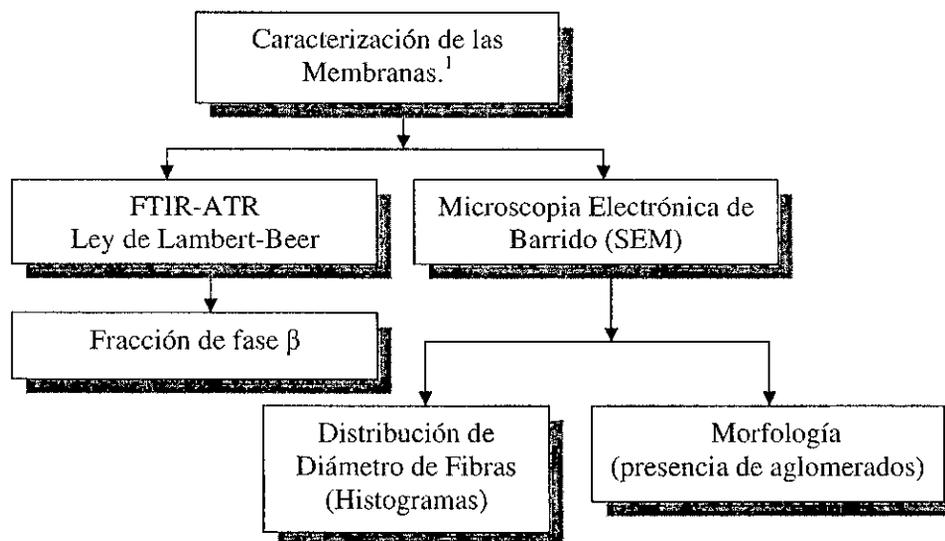


Figura 4.2 Metodología experimental utilizada en la Caracterización de membranas..

2. Metodología experimental utilizada para el Tratamiento térmico sobre las membranas electrohiladas.

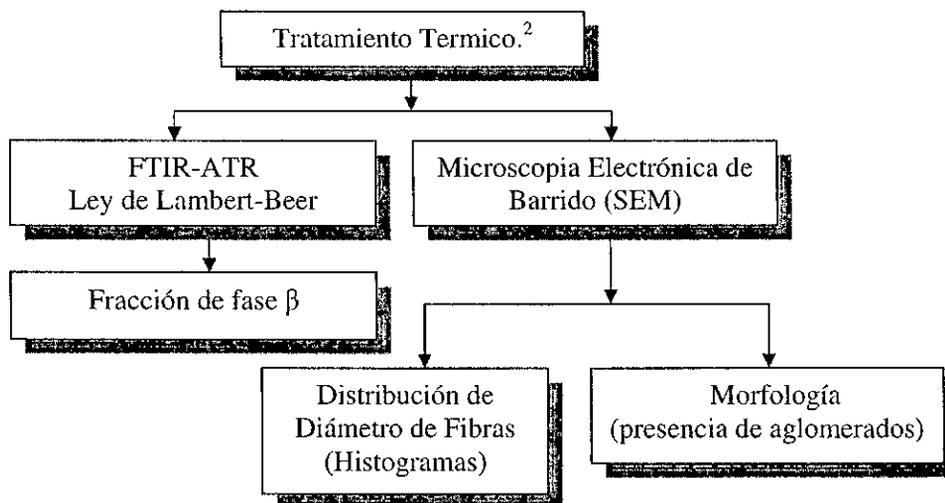
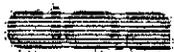


Figura 4.3 Metodología experimental utilizada en el Tratamiento térmico.



3. Metodología experimental utilizada en la Activación de la levadura comercial: *Saccharomyces cerevisiae*.

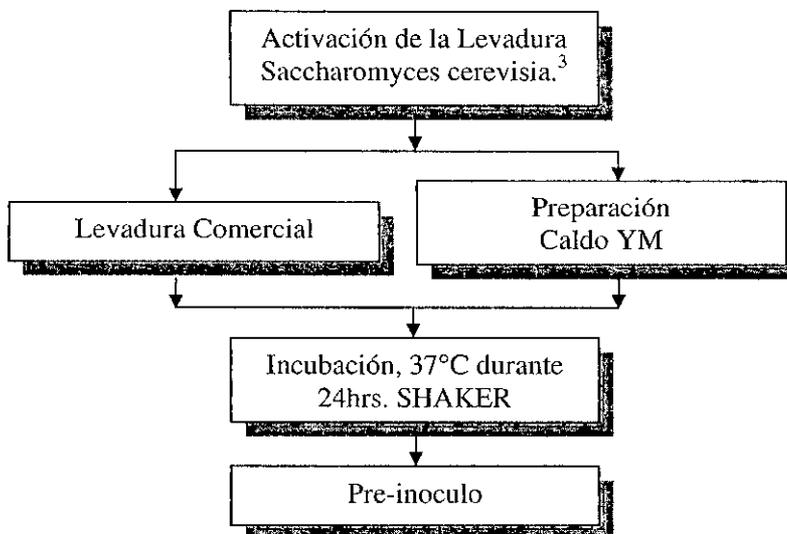


Figura 4.4 Metodología experimental utilizada en la Activación de la levadura.

4. Metodología experimental utilizado para la obtención del Inoculo utilizado en la cinética de crecimiento y en la parte de contacto el material polimérico.

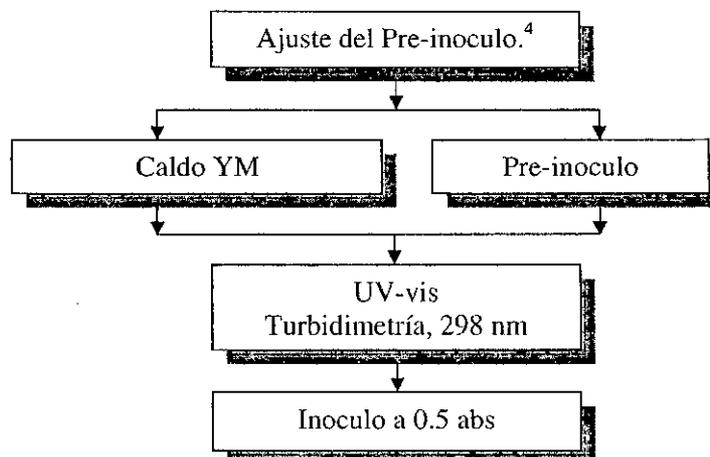


Figura 4.5 Metodología experimental utilizado en la obtención del Inoculo.



5. Metodología experimental utilizada para la obtención de las Curvas de la Cinética de Crecimiento para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

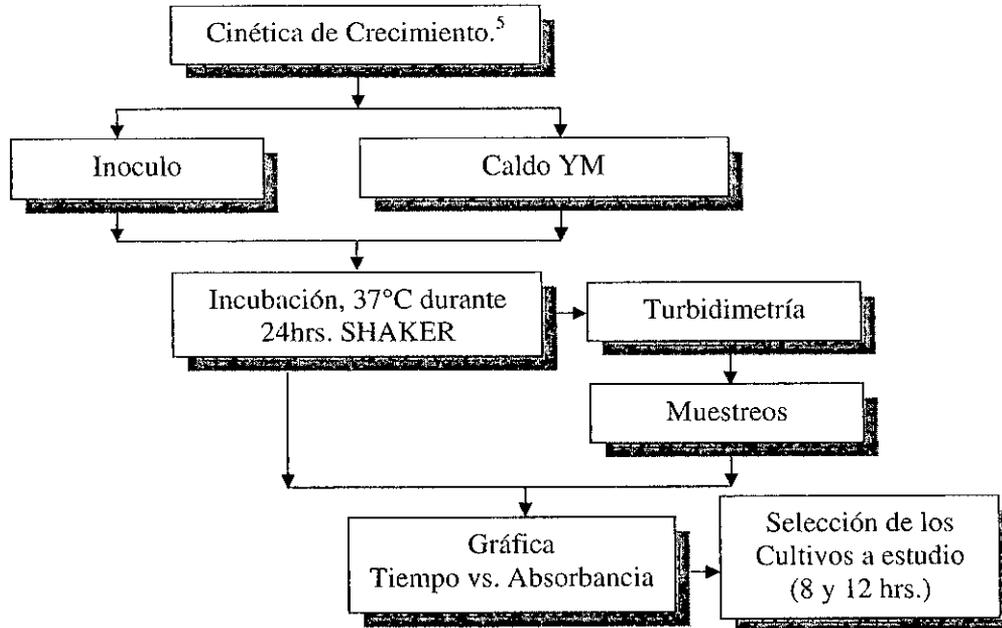


Figura 4.6 Metodología experimental utilizada para la obtención de la cinética de crecimiento, así como, selección de cultivos de 8 y 12 hrs.

6. Metodología experimental utilizada para la recuperación de la biomasa (paquete celular) y Resuspensión celular.

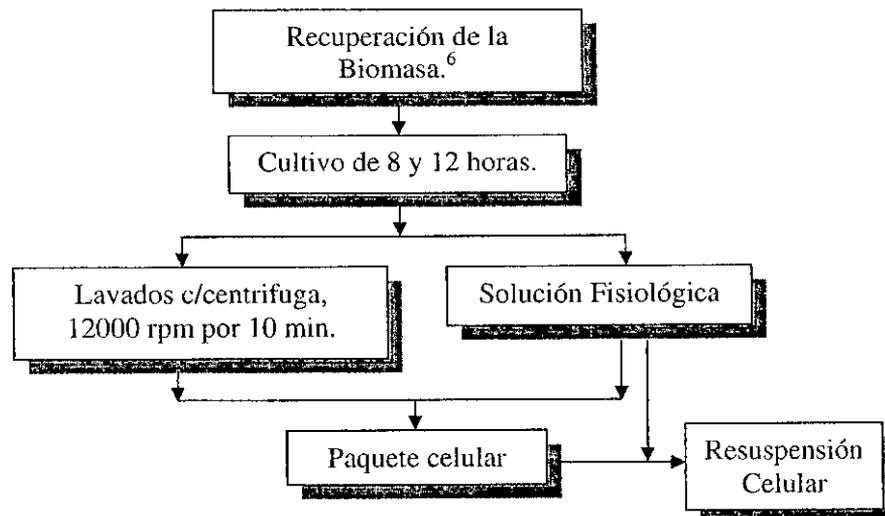


Figura 4.7 Metodología experimental utilizada para la recuperación de la biomasa y resuspensión celular.



7. Metodología experimental utilizada para el estudio del comportamiento de las células de *Saccharomyces cerevisiae* en contacto con la membrana de PVDF de manera estática para el cultivo de 8 horas.

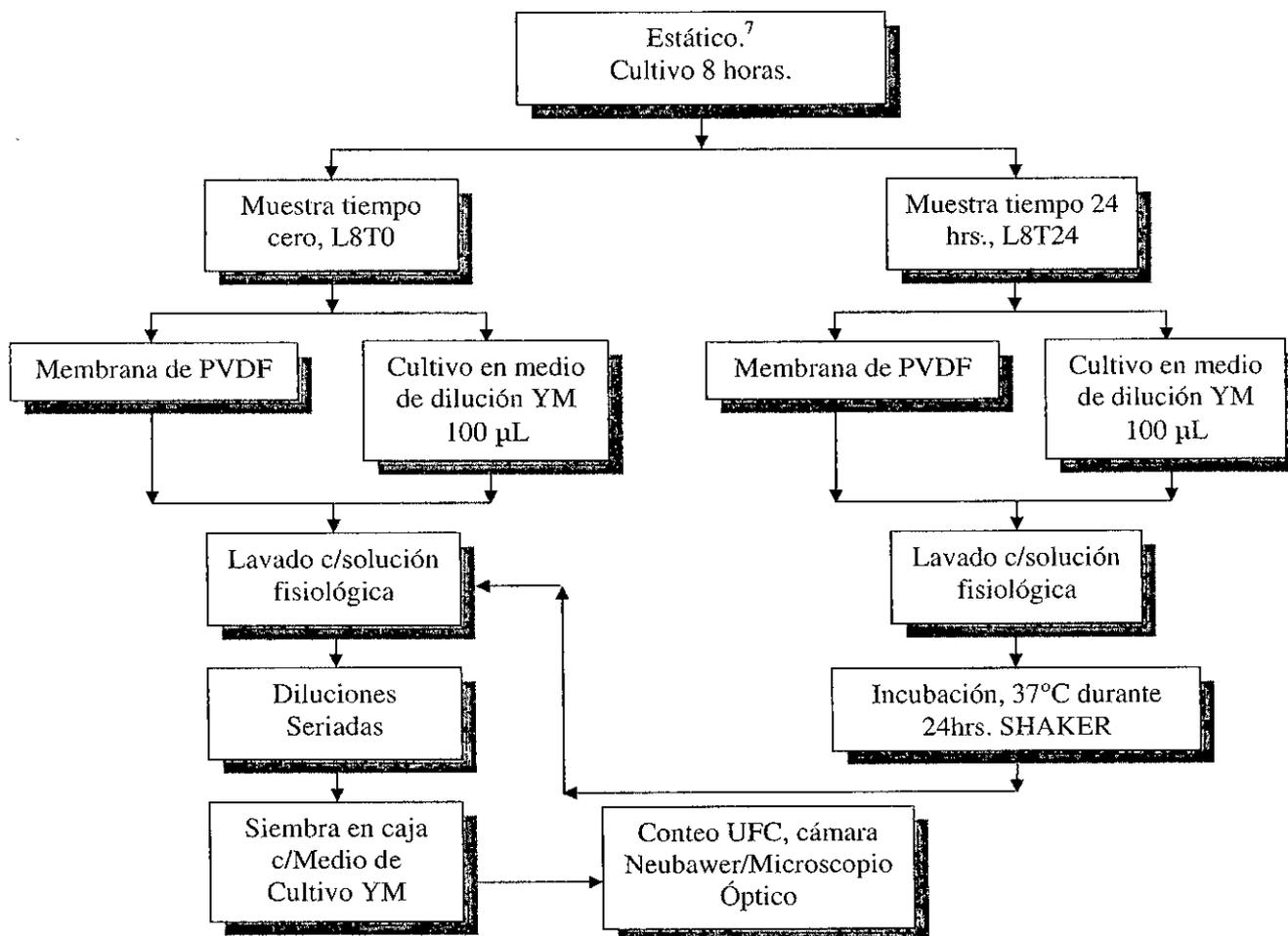


Figura 4.8 Metodología experimental utilizada para el cultivo de 8 horas de manera estática y su caracterización.

Para el cultivo de 12 horas de forma estática se siguió el mismo procedimiento descrito en el diagrama presentado en la Figura 4.8.



8. Metodología experimental utilizada para el estudio del comportamiento de las células de *Saccharomyces cerevisiae* en contacto con la membrana de PVDF sometidas a un esfuerzo mecánico y sin él, para el cultivo de 12 horas.

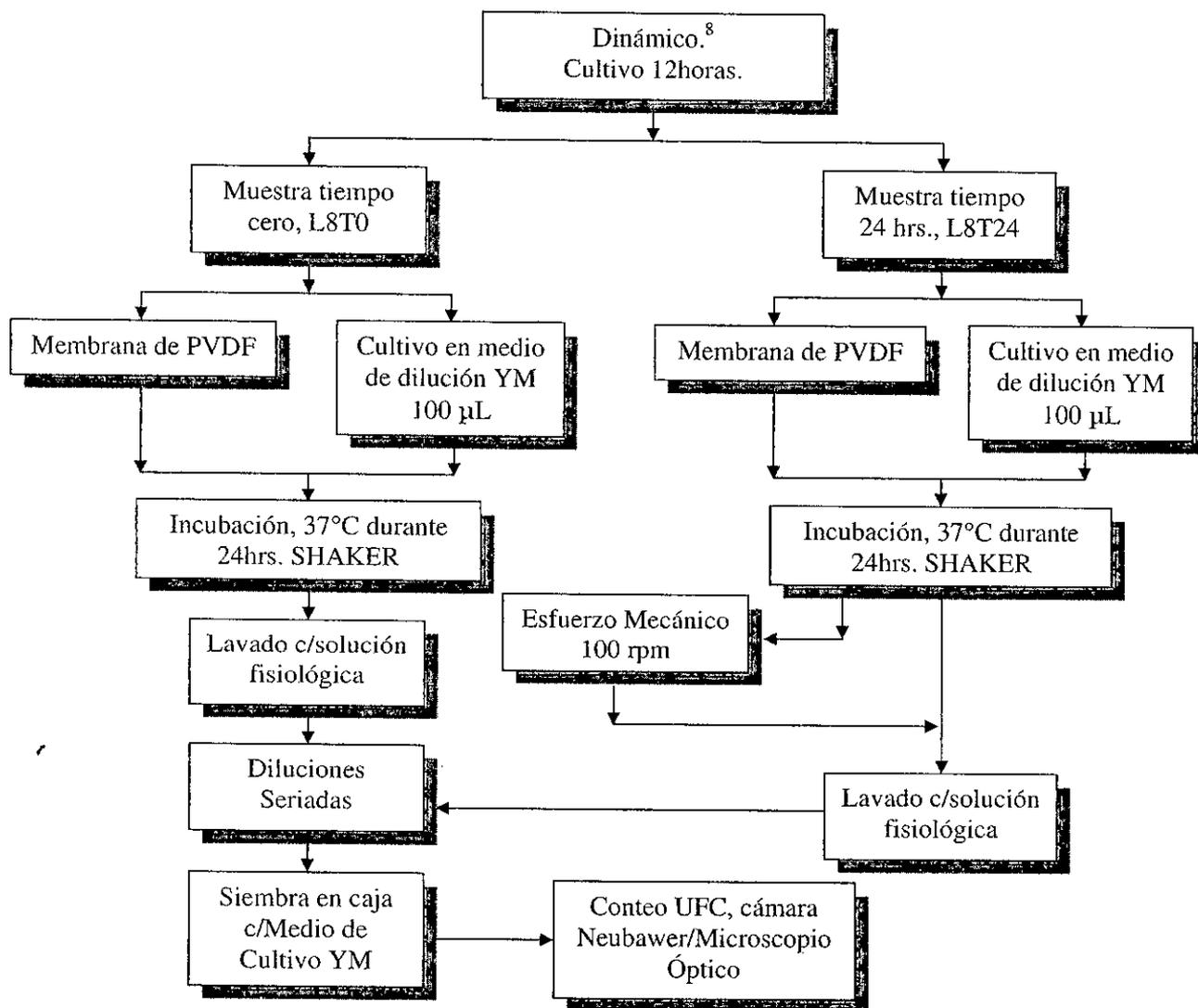


Figura 4.9 Metodología experimental utilizada para el cultivo de 12 horas sometidas a un esfuerzo mecánico y sin él, así como su caracterización.



4.4 ELECTROHILADO DE LAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS DE PVDF

4.4.1 Preparación de las soluciones poliméricas.

Las soluciones de poli(fluoruro de vinilideno)(PVDF) se prepararon en dimetilformamida (DMF) a diferentes concentraciones de 14 al 20% (p/v). Estas soluciones se calentaron a 60 °C y puestas en agitación durante un período de 24 horas, con la finalidad de permitir la completa dilución del polímero en el disolvente. Con estas soluciones se procedió a la obtención de las membranas por la técnica de electrohilado.

4.4.2 Electrohilado de las soluciones poliméricas.

Las membranas de PVDF se obtuvieron con las soluciones previamente preparadas (14 a 20% (p/v)). Para ello se utilizó un equipo de electrohilado, el cual consiste en una fuente de poder, una bomba de dosificación, colector y jeringa de plástico. Para la preparación de las membranas, se colocó la solución polimérica en una jeringa, la cual se posicionó sobre la bomba de dosificación. En la punta de la aguja se conectó un caimán metálico que se encuentra unido a la fuente de poder (electrodo positivo), y posteriormente se colocó a una distancia de 15 cm de la aguja una pantalla colectora de aluminio (electrodo negativo). Para obtención de las membranas, se aplicó un voltaje de 15 kV con una corriente de 30 μ A y un flujo de dosificación de la solución polimérica de 0.5 mL/h^[1].

El contenido de la fase β en las membranas de PVDF se cuantificó mediante espectroscopia infrarroja por reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) para obtener el porcentaje de fase β presente en las membranas. La difracción de rayos-X y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) fueron empleadas para la caracterización general del material polimérico. La Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) fue empleada para la obtención de la distribución de diámetros de las fibras, así como, la morfología de las membranas obtenidas y Análisis Dinámico Mecánico (DMA) para evaluar el comportamiento mecánico de las membranas de PVDF a diferentes temperaturas bajo un esfuerzo determinado.



4.4.3 Tratamiento Térmico.

Las membranas que se obtuvieron a partir de la técnica de electrohilado fueron colocadas en una estufa a diferentes temperaturas (40, 60, 80, 100, 120 y 140°C) durante un periodo de 2 horas ^[2], esto se hizo con el propósito de reblandecer al polímero en las membranas y aumentar el porcentaje de fase β presente en la muestra. Dichas membranas se caracterizaron mediante FTIR-ATR para obtener el porcentaje de fase β presente en las muestras y mediante SEM para observar el cambio en la morfología después del tratamiento térmico.

4.5 ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

4.5.1 Microorganismo utilizado como Modelo Biológico.

El microorganismo utilizado en el estudio fue la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el cual fue obtenido a partir de un producto comercial de la marca NEVADA.

4.5.2 Preparación del Medio de Cultivo.

Para el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó el medio de cultivo YM ^[3], el cual se preparó a partir de:

Tabla 4.4 Medio de Cultivo YM utilizado en la preparación de *Saccharomyces cerevisiae*.

COMPONENTE	CANTIDAD (g/L)
Extracto de Levadura	3
Extracto de Malta	3
Peptona	5
Dextrosa	10
Agar Bacteriológico	20

Tomando como base la formación descrita en la *Tabla 4.4*, se pesaron los componentes matraz de 300 mL y se disolvieron en agua destilada, teniendo en cuenta que para la



preparación del medio líquido se utiliza la misma formulación a excepción del agar bacteriológico.

4.5.3 Preparación del Pre-inoculo.

Para la activación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se prepararon matraces elenmeyer de 50 mL conteniendo medio de cultivo, el cual se esterilizó en Autoclave a 121 °C/ 103 kPa / 15 min. Una vez esterilizado el medio y bajo condiciones estériles utilizando una campana de flujo laminar, se procedió a inocular el medio adicionando 10 mg de la levadura comercial. Posteriormente el cultivo fue puesto en un agitador mecánico (SHAKER) a una temperatura de 37 °C y 200 rpm por un periodo de 24 horas.

4.5.4 Preparación del Inoculo.

Al término de las 24 horas de activación, el cultivo se retiro del agitador mecánico y colocado en un refrigerador a baja temperatura para detener la tasa de crecimiento celular, obteniendo así el pre-inoculo. Simultáneamente se prepararon 100 mL del medio líquido YM, el cual fue colocado en tubos con tapa de rosca y finalmente esterilizados en un Autoclave. Posteriormente se agregaron 4.5 mL del pre-inoculo en un tubo con tapa de rosca, el cual contenía aproximadamente 10 mL de medio líquido YM previamente esterilizados, y se agitó por medio de un agitador mecánico (vortex). Este procedimiento se realizó para asegurar una distribución homogénea de la biomasa (células de levadura) en el medio líquido (suspensión celular).

A partir de la suspensión celular, se tomaron 2 mL, los cuales se colocaron en un espectrofotómetro de UV-vis a una longitud de 298 nm, y consecutivamente obtener la lectura de la turbidez de la suspensión. El ajuste de esta suspensión celular se realizó hasta alcanzar un valor de 0.5 de absorbancia, ya que en suspensiones celulares este valor es directamente proporcional a un estimado de células presentes en la suspensión con un valor de 500,000 células/mL^[4], teniendo finalmente un control en la cantidad de células alimentadas por unidad de volumen en los pasos subsecuentes.



4.5.5 Cinética de Crecimiento.

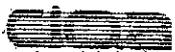
Para el desarrollo de los estudios cinéticos, se preparó un matraz con un contenido de 200 mL de medio líquido, esterilizado previamente de acuerdo a lo descrito anteriormente. Posteriormente, se inoculó el matraz agregando 5 mL del inóculo preparado en el punto 4.5.4. Finalmente, se colocó en un agitador mecánico a 200 rpm y una temperatura de 37°C.

Durante la cinética de crecimiento de la levadura, se efectuó la toma de muestras en intervalos de una hora. A cada muestra tomada se le midió la absorbancia utilizando un espectrofotómetro de UV-vis registrando los cambios de la absorbancia (en función de la turbidez) como una medida del crecimiento celular en el cultivo. Una vez que se registraron cambios de absorbancia significativos, se procedió a tomar muestras del cultivo en intervalos de media hora hasta llegar a una meseta de valores de absorbancia constantes. A partir de este punto se volvieron a tomar muestras en intervalos de una hora completando un periodo de experimentación de la prueba total de 24 horas.

Los estudios cinéticos se desarrollaron tres veces para confirmar el comportamiento de la curva de crecimiento celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Cinética de crecimiento).

4.5.6 Desarrollo de los Cultivos a 8 y 12h.

A partir de la curva de crecimiento celular, se propuso obtener dos cultivos celulares a 8 y 12 horas, ya que a estos tiempos las células de *Saccharomyces cerevisiae* se ubican dentro de la fase logarítmica, y por lo tanto las células tienen la máxima velocidad de división celular. La toma de los cultivos a tiempos de 8 y 12 horas se realizó con el propósito de estudiar el efecto y comportamiento de los cultivos en contacto con la matriz polimérica. Los cultivos fueron preparados en dos matraces Erlenmeyer con 200 mL del medio líquido previamente esterilizados, los cuales siguieron el procedimiento efectuado para la obtención de la cinética de crecimiento anteriormente mencionado. Estos matraces fueron retirados de la incubadora a tiempos de 8 y 12 horas. Consecutivamente los matraces se colocaron en el refrigerador para detener el aumento de la biomasa contenida en los cultivos.



4.6 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MEMBRANA ELECTROHILADA DE PVDF SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

4.6.1 Estudio del efecto de la membrana sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* mediante resiembra en placa.

Se prepararon membranas de PVDF por medio de la técnica de electrohilado, las cuales se colocaron dentro de cajas petri. Posteriormente se preparó un medio de cultivo YM (con agar) y se esterilizó. El medio de cultivo se colocó en viales de 5 mL previamente esterilizados, esto en cantidades aproximadas de 4mL, a los cuales se les agregó una cantidad de 100 μ L de una suspensión celular de un cultivo de 8 horas y se mezcló. Al término de la mezcla del cultivo con el medio de cultivo se vertió en las cajas petri, las cuales contenían las membranas de PVDF, y finalmente fueron colocadas en una incubadora a una temperatura de 37 °C durante un período de 24 horas. (Figura 4.10)



Figura 4.10 Fotografía de la siembra en caja petri de forma directa (cualitativo).

4.6.2 Estudio del efecto de las membranas electrohiladas de PVDF sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* mediante el Método de Contacto Directo.

Para este estudio, los cultivos de 8 y 12 horas fueron centrifugados a una temperatura de 20 °C y 12,000 rpm para la obtención de la biomasa celular. Dichos cultivos fueron lavados con solución fisiológica y posteriormente re-suspendidas en un medio de dilución 1/500, este medio se elaboró a partir de 1 mL de medio líquido en 500 mL de agua destilada, y distribuidos en tubos con tapa de rosca previamente esterilizados. (Figura 4.11)



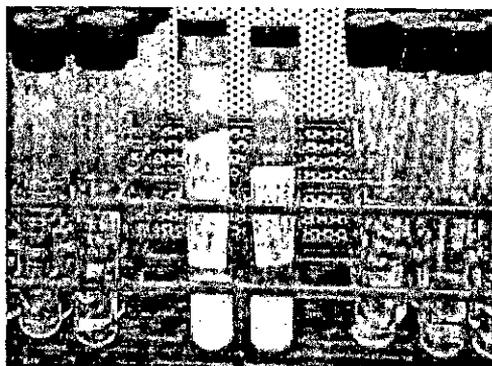


Figura 4.11 Biomasa de los cultivos de 8 y 12 horas re-suspendidas en un medio de dilución.

4.6.3 Conteo Celular.

El conteo celular se realizó preparando dos tubos con tapón de rosca conteniendo 9.9 mL de solución fisiológica, los cuales fueron esterilizados previamente. Para el cultivo de 8 horas se tomó uno de los tubos esterilizados y se le agregó 0.1 mL de la biomasa de 8 horas re-suspendida en el medio de dilución y se agitó utilizando un agitador mecánico. Por medio de una micropipeta se tomó una gota de la nueva suspensión (0.1 μL de la biomasa de 8 h en el medio de dilución + 9.9 mL de agua destilada), la cual fue colocada en una cámara de conteo Neubauer y ésta, a su vez, puesta en un microscopio óptico.

La cámara Neubauer esta compuesta de dos cuadrículas principales, cada una de ellas en los extremos de la cámara como se observa en la *Figura 4.12*. Estas cuadrículas, a su vez se encuentran divididas en 4 sub-cuadrículas, por lo que para la obtención de los valores de células totales, se cuentan la cantidad de células presentes en cada una de las sub-cuadrículas de cada una de las cuadrículas principales y posteriormente se calculó un promedio.

Finalmente, se reporta el valor total de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* por cada mililitro de la suspensión, la cantidad total de células es afectado por un valor de 10^4 debido a el factor de dilución de la cámara.



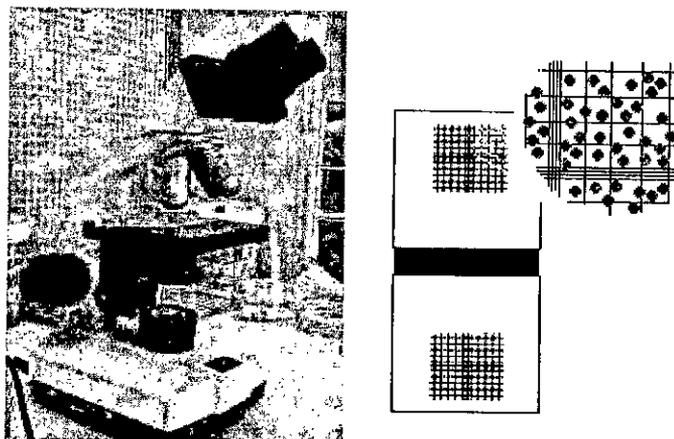


Figura 4.12 Imagen de un Microscopio Óptico y el esquema de una cámara Neubauer.

A partir del conteo se ajustó la suspensión celular a un valor estimado de células por unidad de volumen de 750,000 células/mL. Finalmente, se realizó el mismo procedimiento para el cultivo de 12 horas. En ambos casos estas suspensiones celulares se utilizaron para la prueba de contacto directo.

4.6.4 Prueba de Contacto Directo.

A partir de las membranas electrohiladas de PVDF, se prepararon muestras de 2.2cm^2 , las cuales se colocaron sobre portaobjetos y éstos, a su vez, fueron puestos en cajas petri. Posteriormente se agregaron $100\ \mu\text{L}$ de la biomasa (obtenida en los cultivos de 8 y 12 horas) en el medio de dilución sobre las membranas de PVDF, las cuales fueron cubiertas mediante un cubre objetos y finalmente tapadas.

Los blancos o referencias se prepararon mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero en ausencia de las muestras (las membranas electrohiladas de PVDF). Ambas muestras (blancos, muestras) se realizaron en las mismas condiciones, tal como se muestra en la *Figura 4.13*.

La nomenclatura utilizada para la identificación de las muestras se describe en la *Tabla 4.5*.

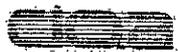


Tabla 4.5 Nomenclatura para las muestras utilizadas en el Método de Contacto Directo.

Identificación	Descripción
L8	muestra de los cultivos a 8 y 12 hrs.
L12	
BL8	blanco de los cultivos a 8 y 12 hrs.
BL12	
T0	tiempo cero
T24	tiempo 24 hrs.
1, 2, 3	últimos dígitos, número de muestra

La muestra y el blanco se manejaron de dos formas:

- a) *A tiempo cero:* A partir de las muestras y los blancos preparadas anteriormente se prosiguió al lavado en bolsas estériles (bolsas para uro cultivo), las cuales se les adicionó 10 mL de solución fisiológica estéril, esto fue realizado por cada muestra.

Dichas muestras fueron preparadas para el cultivo de 8 horas (L8T0, BL8T0), así como para el cultivo de 12 horas (L12T0, BL12T0), tomando en las mismas condiciones el blanco de las muestras. Posteriormente de cada una de las bolsas de lavado se realizaron diluciones en tubos de tapa de rosca, el cual consistió en la toma de 1mL del agua de lavado contenida en la bolsa estéril y agregado en un tubo con 9mL de solución fisiológica estéril y así sucesivamente hasta llegar a la dilución de 10^6 (el valor obtenido se encontrara afectado por 1,000,000 debido a la dilución). De las diluciones realizadas se tomó 1 mL de cada una de estas y se sembró en caja en un medio YM, finalmente se colocaron en una incubadora a 37°C durante un periodo de 24 horas.

- b) *A tiempo 24:* Las muestras utilizadas para los cultivos de 8 horas (L8T24, BL8T24) y 12 horas (L12T24, BL12T24) se colocaron en cajas perti con sus respectivos blancos y puestos en un recipiente con agua destilada, esto con la finalidad de mantener la humedad relativa y de esta manera evitar que se sequen



debido a la ausencia de medio líquido, posteriormente fueron colocadas en una incubadora a 37°C durante 24 horas. (Figura 4.5) Al término del periodo de incubación se procedió a realizar el recuento de células viables aplicando la misma metodología utilizada a las muestras de tiempo cero. (Figura 4.14)

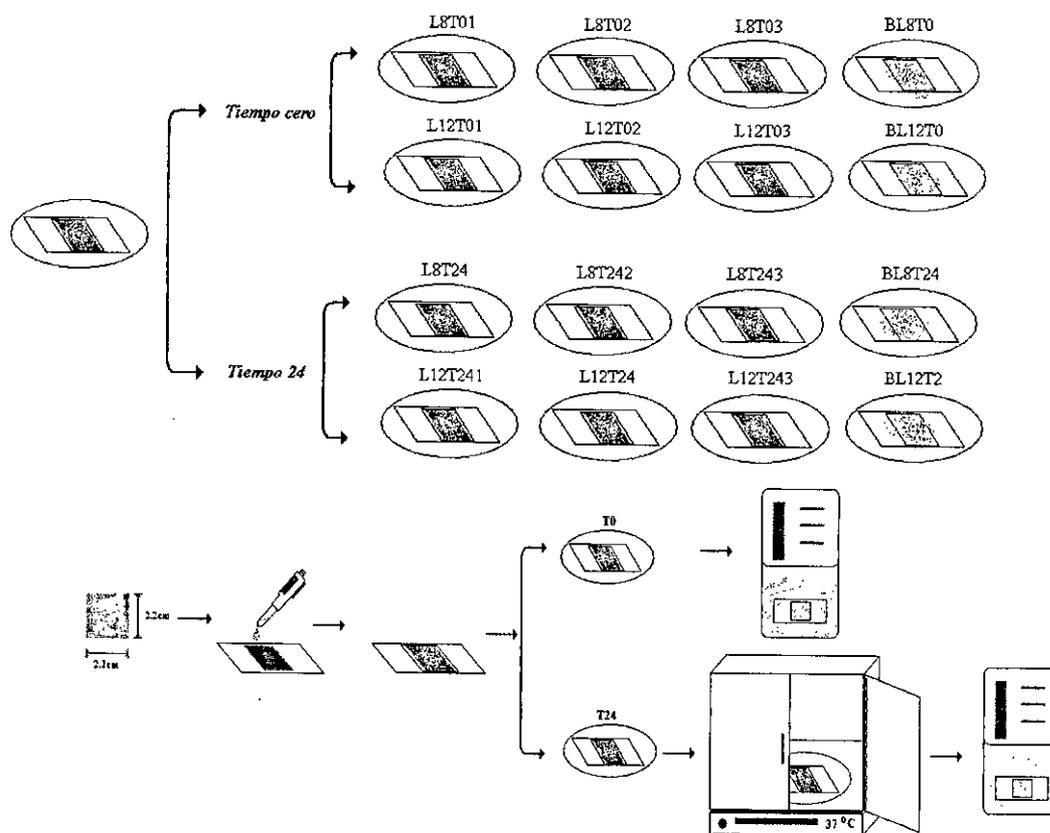


Figura 4.13 Esquema de la preparación de las muestras para tiempo cero y tiempo de 24 horas.

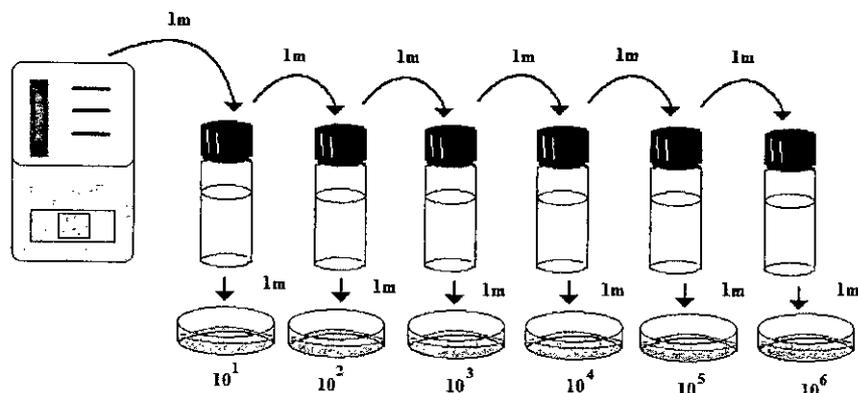
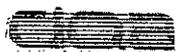


Figura 4.14 Esquema utilizado en las diluciones realizadas para la prueba por Contacto Directo.



4.6.5 Recuento de Células Viables.

Al término del período de incubación de las muestras a tiempo cero, así como para las de 24 horas, de los cultivos a 8 y 12 horas, se realizó un registro de las unidades formadoras de colonias (UFC) con un conteo directo en las cajas petri de cada una de las muestras L8T0(1,2,3), BL8T0, L12T0(1,2,3), BL12T0, L8T24(1,2,3), BL8T24, L12T24(1,2,3) y BL12T24. (Figura 4.15)

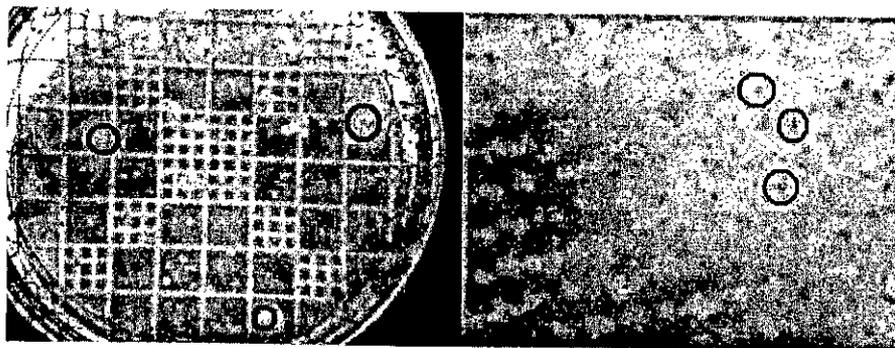


Figura 4.15 Imagen de una caja petri, donde se muestra las UFC.

4.7 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MEMBRANA ELECTROHILADA DE PVDF BAJO UN ESFUERZO MECÁNICO, SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*- PRUEBA DEL SISTEMA DINÁMICO.

Para el desarrollo de la prueba se preparó un cultivo de 12 horas de acuerdo al procedimiento mencionado anteriormente en el punto 4.5.5 (recuperación de la biomasa, re-suspensión de la misma en un medio de dilución y ajuste del número de células presentes por cada mililitro de la suspensión celular), este procedimiento fue llevado a cabo para tener un control en el número estimado de células de *Saccharomyces cerevisiae* por unidad de volumen que se siembran al inicio del experimento.

4.7.1 Preparación de los portamuestras y las membranas de 18% (p/v) de PVDF.

Se obtuvieron membranas de 18% (p/v) de PVDF a partir de la técnica de electrohilado anteriormente mencionado, las cuales fueron puestas en unos portamuestras de polipropileno debido a la facilidad de manejo y uso para poder darle la forma necesaria



para dicho experimento (*Figura 4.16*), dichos porta muestras fueron colocados en alcohol etílico para su desinfección y esterilización. Posteriormente se colocaron las membranas de PVDF en los portamuestras, quienes actúan como anclaje de la membrana para poder someterlas a un *Sistema Oscilatorio*.

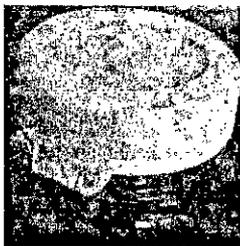


Figura 4.16. Imagen de los porta muestras utilizados para el anclaje de la membrana de PVDF.

Se prepararon dos porta muestras, el primero será sometido a la deformación mecánica y un segundo que actuará como blanco en dicho experimento el cual no tendrá alguna deformación de la membrana.

4.7.2 Prueba en el Sistema Oscilatorio.

Se utilizó un Sistema Oscilatorio, el cual fue fabricado en CIQA. Este sistema consta de un motor de 110 volts-CA, el cual se encuentra regulado por un circuito basado en un TRIAC de 12A (componente eléctrico que funciona como una llave, el cual trabaja con corriente eléctrica), en el cual se colocó el porta muestra con 100 μ L de la suspensión celular (*Figura 4.17*). Todo el procedimiento se realizó en un ambiente estéril. A su vez se sembró con un blanco con la misma cantidad (100 μ L) de la suspensión celular.



Figura 4.17 Imagen de una de las muestras en el porta muestra de polipropileno al ser sembrada con 100 μ L de la suspensión celular de *Saccharomyces cerevisiae* sobre una membrana de PVDF (18% en peso).



Dichas muestras fueron selladas para evitar la evaporación de la suspensión celular como se muestra en la *Figura 4.18*.



Figura 4.18 Imagen del porta muestras utilizado para el sistema oscilatorio, el cual contiene la muestra, la suspensión celular y esta sellado al ambiente.

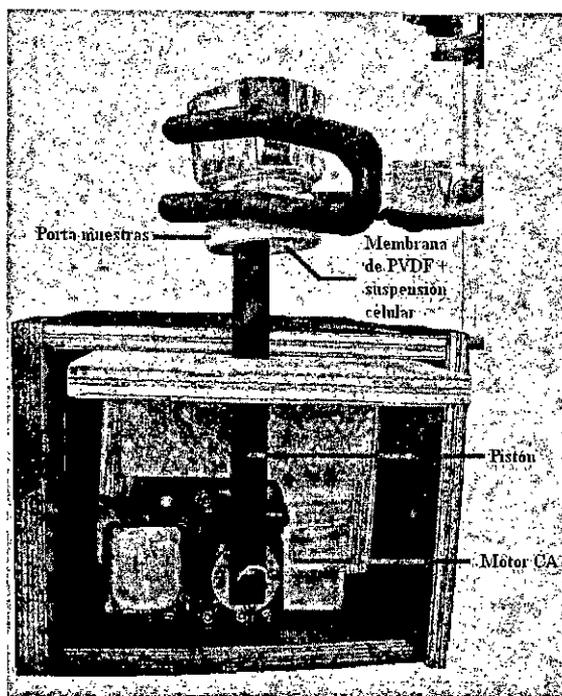


Figura 4.19 Esquema del Sistema Oscilatorio – MATAVAN110v 12A CIQA.

Finalmente, se colocó en el sistema oscilatorio con la muestra y el blanco dentro de una incubadora a 37 °C durante un periodo de 24 horas, como se muestra en la *Figura 4.20*.



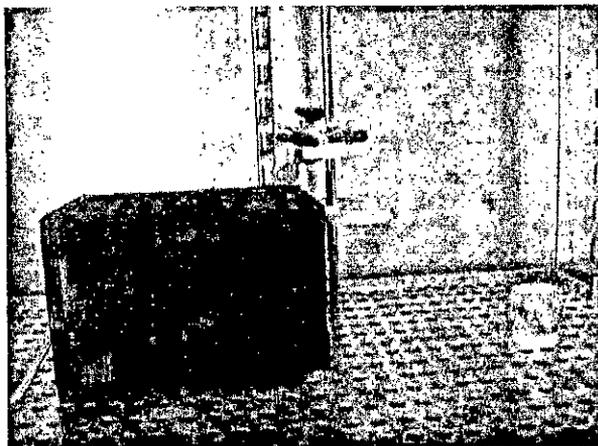


Figura 4.20 Imagen del Sistema Oscilatorio – MATAVANI 10v 12A CIQA en una incubadora LAB-LINE UL-125L a 37°C.

4.7.3 Recuento de Células Viables.

Una vez concluida la exposición de las membranas inoculadas en el *sistema oscilatorio*, las muestras fueron lavadas en bolsas de uro cultivo en un volumen de 10 mL de solución fisiológica y posteriormente se hicieron diluciones de las mismas desde 10^1 a 10^6 , siendo las últimas tres diluciones, las que se utilizaron para determinar las UFC. (Figura 4.21) Posteriormente, se prepararon 100 mL de medio de cultivo YM (con agar) para la siembra en caja de las últimas diluciones, los cuales fueron esterilizados y vaciado en las cajas petri con 1 mL de la dilución correspondiente.

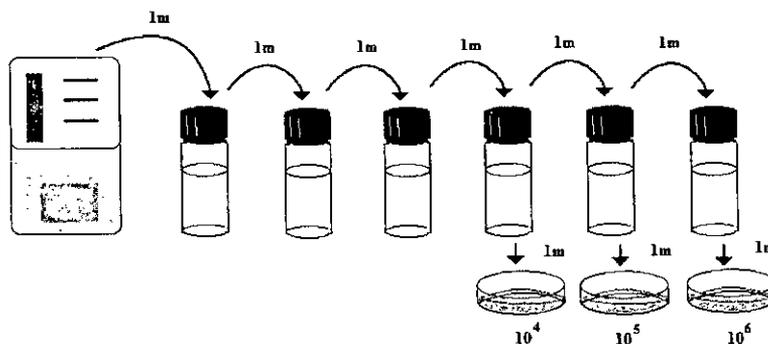


Figura 4.21 Esquema de diluciones utilizado para la prueba del Sistema Dinámico.

Las cajas petri fueron colocadas en una incubadora a 37 °C durante un periodo de 24 horas y posteriormente contadas de forma directa (UFC).



Referencias.

1. J. Pérez-Herrera; V. Corral-Flores; A. Castañeda-Facio; J. Romero García, R.F. Ziolo, Preparación de membranas de Poli(fluoruro de vinilideno) por la técnica de elctrohilado, Tesis de Licenciatura, CIQA, 2007.
2. Zhehui Liu; Philippe Maréchal and Robert Jérôme, DMA and DSC investigations of the β transition of poly(vinylidene fluoride), *Polymer*, Vol. 38, No. 19, 4925-4929, 1996.
3. A.I. Laskin; H.A. Lechevalier, *Handbook of Microbiology*, 2nd. Edition, Vol. IX, Part A.
4. Roger Y. Stanier; Edward A. Adelberg; John Ingraham, *The Microbial World Book*, 4th. Edition, 1976.



5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 ELECTROHILADO DE LAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS DE PVDF

5.1.1 Electrohilado de las soluciones poliméricas.

A partir de la técnica de electrohilado se obtuvieron membranas de poli(fluoruro de vinilideno) a concentraciones del 14 al 20% en peso del polímero en un tiempo de obtención de 30 min cada una. (Figura 5.1)

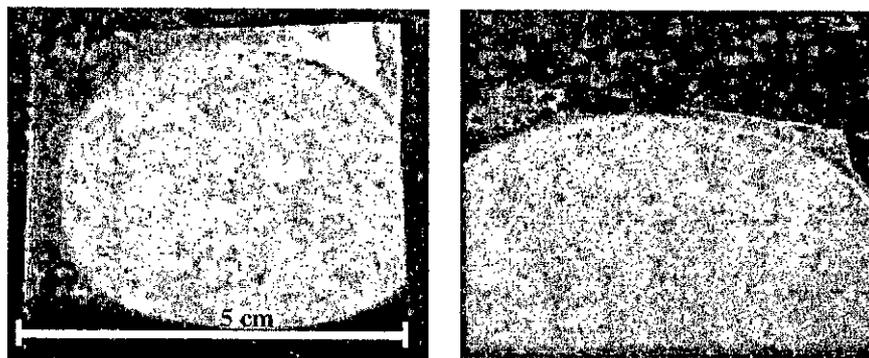


Figura 5.1 Imagen de una membrana de 14% en peso del PVDF obtenida por la técnica de electrohilado.

5.1.1.1 Espectroscopia infrarroja de reflexión total atenuada (FTIR-ATR).

A partir de las membranas obtenidas mediante la técnica de electrohilado, se realizó la caracterización pertinente para cada una de las membranas de PVDF. Por FTIR-ATR se analizaron las muestras en el intervalo de número de onda de $400\text{-}1000\text{cm}^{-1}$. A partir de esta información y aplicando la ley de Lambert-Beer, se utilizaron los coeficientes de absorción molar de $K_{\alpha} = 6.1 \times 10^4$ y $K_{\beta} = 7.7 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$ a 763 y 839 cm^{-1} característico de las fases α y β ^[1] y se determinó la fracción de la fase β presente en las membranas con diferente concentración de PVDF.



Tabla 5.1 Fracción de fase β presente en las muestras del 14 al 20% de PVDF obtenidas mediante la ley de Lambert-Beer.

% (p/v) de PVDF	F(β)
14	0.9192
16	0.8747
18	0.8577
20	0.8310

El comportamiento de la fracción β en función de la concentración de PVDF (p/v) en las membranas electrohiladas es reportado en la *Tabla 5.1*. Se observa una disminución de la fracción β a medida que se incrementa la concentración. Este comportamiento puede ser atribuido a las interacciones que presentan las soluciones en los sistemas polímero-solvente, así como, las propiedades físicas de estas soluciones electrohiladas^[17].

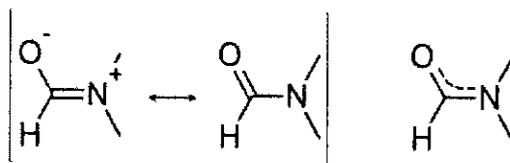


Figura 5.2 Formas resonantes del N,N-dimetilformamida.

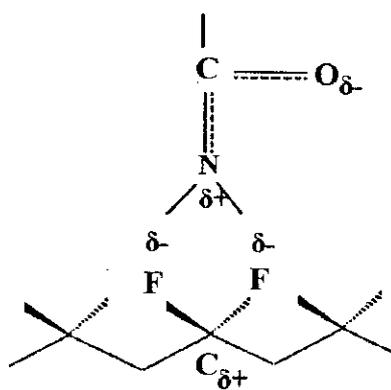


Figura 5.3 Esquema de posible interacción entre el DMF y el PVDF.



Estas interacciones intermoleculares pueden ser presentadas entre las cadenas del PVDF y las moléculas de DMF durante la cristalización, induciendo de esta manera una conformación planar toda TRANS de las cadenas de PVDF^[11] y así, el aumento de la fase polar (β) presente en las membranas electrohiladas. Dicho acomodo es favorecido debido a la alta electronegatividad que se presenta entre los átomos de fluoruro, en comparación con los átomos de carbono, obteniendo de esta manera una fuerte interacción intermolecular C-F^[11].

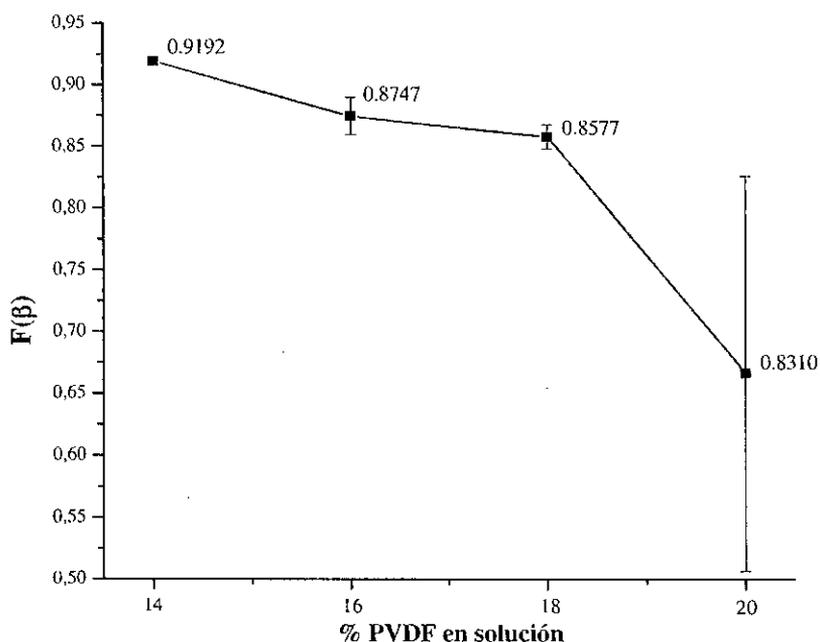


Figura 5.4 Gráfica $F(\beta)$ vs. %PVDF en solución, para las soluciones del 14, 16, 18 y 20%.

La muestra que registró un mayor valor de fracción β , es la que contiene 14% (p/v), con un valor de fracción β de 0.9192. Así mismo, a medida que aumenta la concentración de PVDF, se incrementa la variabilidad de los valores de β de una membrana a otra (Figura 5.4). Este comportamiento puede ser atribuido a los parámetros internos durante el proceso de electrohilado^[18]. Con el aumento de la concentración de PVDF en las soluciones, se incrementa la viscosidad, dicho parámetro se ha reportado dentro del régimen semidiluido sin entrecruzar para el caso de polímeros lineales en DMF^[17]. Debido a esto, la formación de fibras puede depender directamente de la concentración



del polímero en la solución ^[10], ya que la formación de los cuatro tipos de modificaciones cristalográficas del PVDF, esta en función de la velocidad de evaporación del solvente, la temperatura y la polaridad del mismo ^[11]. En la literatura se han empleado mezclas de solventes, esto con el fin de aumentar la polaridad, así como, la velocidad de evaporación del mismo y generar un aumento en la fracción β presente en las muestras ^{[10][11]}.

5.1.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Se obtuvieron micrografías a 2000x mediante microscopía SEM de las soluciones de 14 al 20% en peso de PVDF las cuales exhibieron las siguientes morfologías y distribución de diámetro de las fibras:

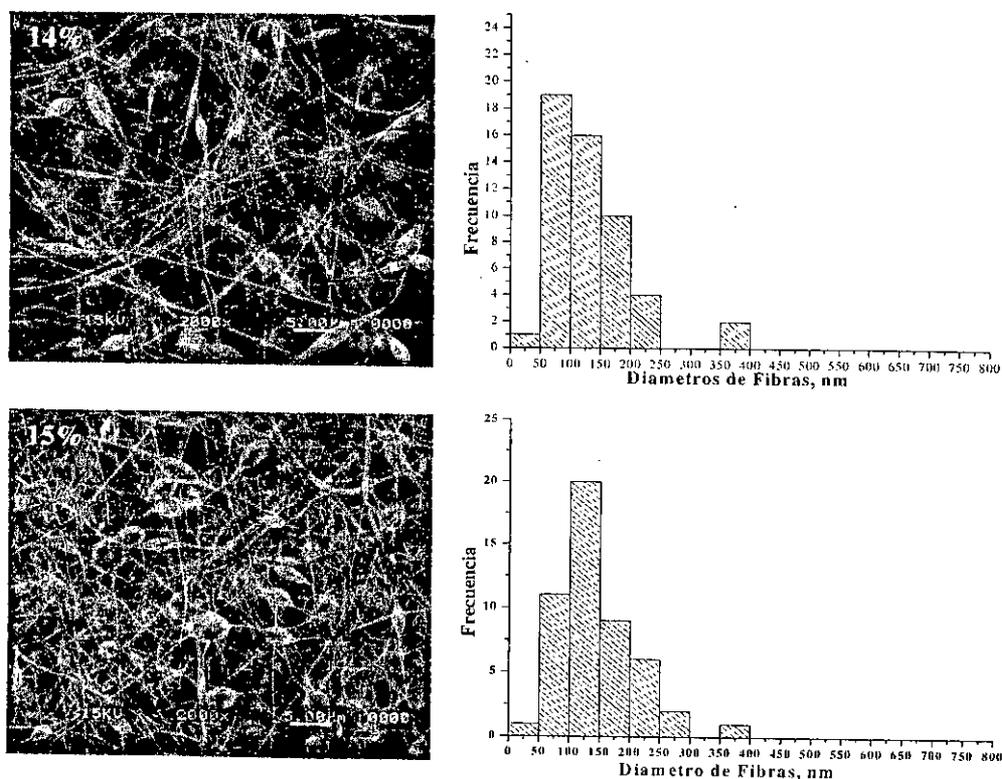


Figura 5.5 Micrografías e Histogramas del diámetro de fibra de las membranas de PVDF a concentraciones del 14 y 15% en peso.



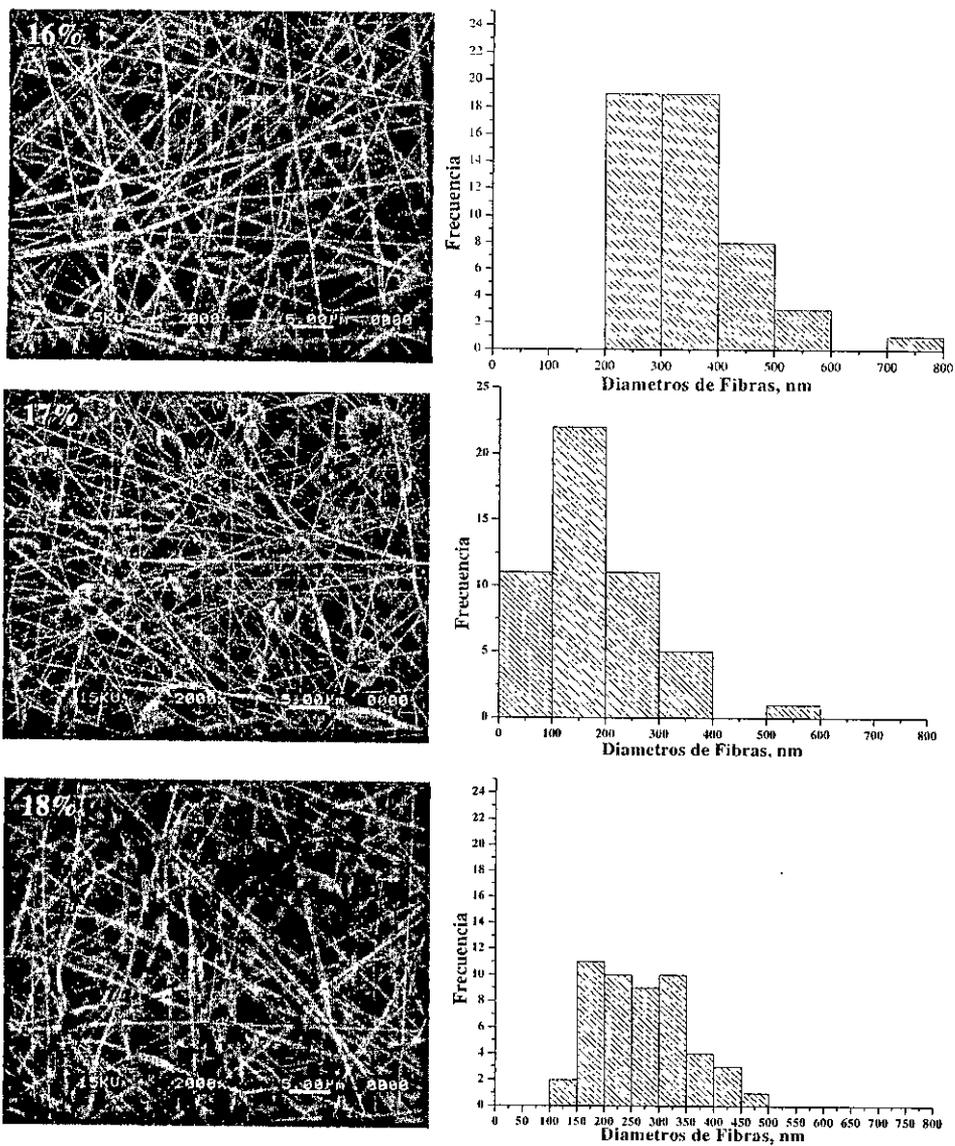


Figura 5.6 Micrografías e Histogramas del diámetro de fibra de las membranas de PVDF a concentraciones del 16, 17, 18% en peso.



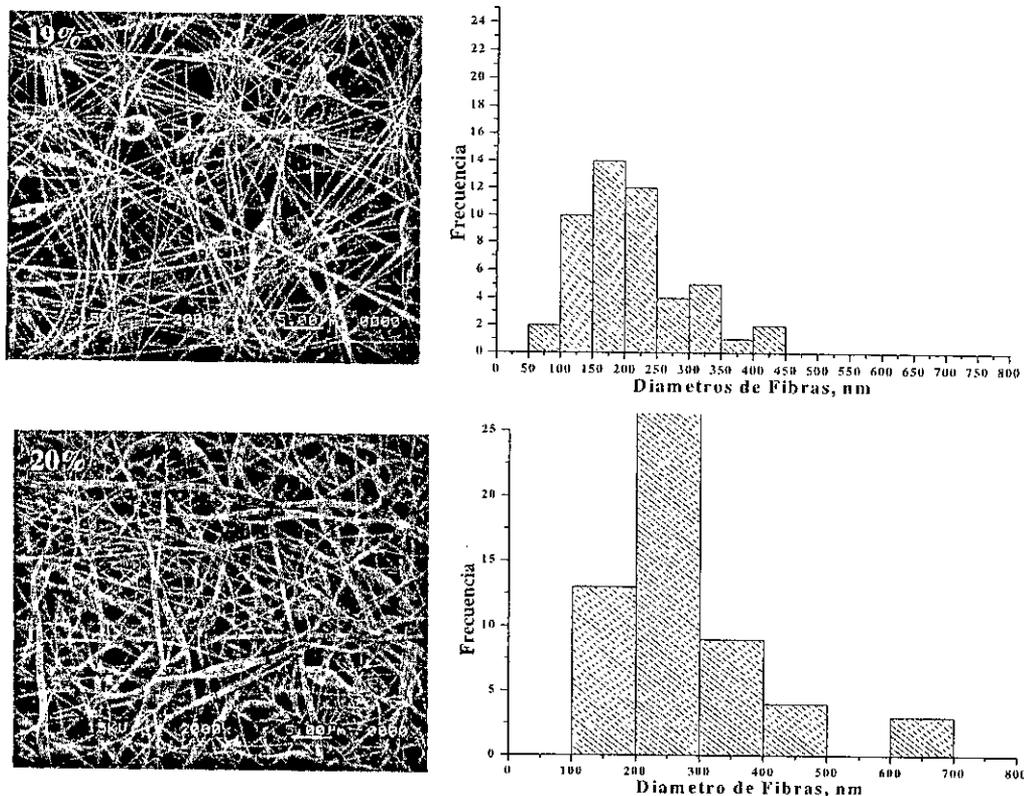


Figura 5.7 Micrografías e Histogramas del diámetro de fibra de las membranas de PVDF a concentraciones del 19 y 20% en peso.

Se observa que la concentración del polímero, es una variable efectiva para el control de la morfología de las fibras electrohiladas, debido a que las fluctuaciones que se pueden generar en el sistema de electrohilado están en función de la concentración del polímero en las soluciones ^[10].

En las Figuras 5.5, y 5.6, se observa el cambio en la morfología de las membranas obtenidas mediante la técnica de electrohilado a las diferentes concentraciones de PVDF en DMF. Se observa que la membrana perteneciente a la concentración de 14% (p/v), muestra un intervalo de diámetro de fibras más estrecho (50 a 250 nm) en comparación de las otras concentraciones, mientras que para las membranas subsecuentes, se presenta una distribución de diámetro de fibras más amplia. Esta distribución de diámetro de fibras



se encuentra desde valores de 50 nm hasta los 400 nm, los cuales se ubican dentro del rango reportado de diámetro de fibras obtenidas mediante la técnica de electrohilado ^[2].

Por otra parte, en las micrografías se observó la presencia de nudos (aglomerados del material), los cuales disminuyen en las membranas de 16 y 18% (p/v) de PVDF. Se ha reportado que el uso de mezclas de solvente polares ^{[10][24]}, favorecen a la formación de la fase más polar, así como una disminución en la presencia de estos nudos debido a el aumento en la velocidad de evaporación, como en las interacciones polímero-solvente.

La formación de fibras a partir de una solución polimérica, esta estrechamente relacionada con el tipo de solvente, la temperatura y la concentración del polímero ^[18]. En el caso de soluciones poliméricas de PVDF/DMF, se observó el favorecimiento de las interacciones polímero-solvente sobre las interacciones polímero-polímero ^[17].

Las membranas de 16 y 20% (p/v) de PVDF exhiben un incremento en el diámetro de las fibras, las cuales se encuentran comprendidos entre 200 y 600 nm, así como, de 100 a 700 nm respectivamente. La membrana del 20% presenta una morfología parecida a listones o de fibras aplastadas.

Tabla 5.2 Distribución de diámetro de fibras para las diferentes concentraciones de PVDF en DMF.

% PVDF	Rango de diámetro de Fibras (nm)	Mayor cantidad de fibras (nm)
14	50-250	50-150
15	50-300	100-150
16	200-600	200-400
17	0-400	100-200
18	150-500	150-350
19	100-350	100-250
20	100-500	200-300



A partir de la información reportada en la *Tabla 5.2*, así como, de la morfología y la fracción de fase β presente en las membranas de PVDF, se eligió la solución con un contenido de 18% (p/v) de PVDF para llevar a cabo los experimentos de inmovilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que se buscó un equilibrio entre la distribución de diámetro de fibras, la cantidad presente de nudos y la fracción de fase β para el uso de la membrana como un potencial soporte celular. Las membranas de 18% (p/v) de PVDF, mostraron una distribución amplia, proporcionando una red más uniforme (menor cantidad de nodos o aglomerados del material presentes), que permita ser utilizado como soporte en células de *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que este tipo de membranas son redes no-tejidas altamente porosas^[4].

La membrana de 18% (p/v) de PVDF reportó un valor de fracción β de 0.8577 (*Tabla 5.1*), dicho valor es de gran importancia en este tipo de materiales^{[19][20]}, debido que al incremento de la fase β (cristal más polar), es muy importante para la obtención de un material electroactivo y con características piezoeléctricas y piroeléctricas^{[5][10][11]}.

5.1.2 Tratamiento Térmico.

Se prepararon membranas al 18% (p/v) de PVDF, las cuales fueron caracterizadas mediante FTIR-ATR antes y después de ser sometidas a tratamientos térmicos desde 40 hasta 140 °C en incrementos de 20° durante un periodo de 2 horas en una estufa de secado, esto con el fin de estudiar el comportamiento térmico de las membranas, así como, si tal tratamiento induce un aumento en la fracción de la fase β presente en las membranas electrohiladas.



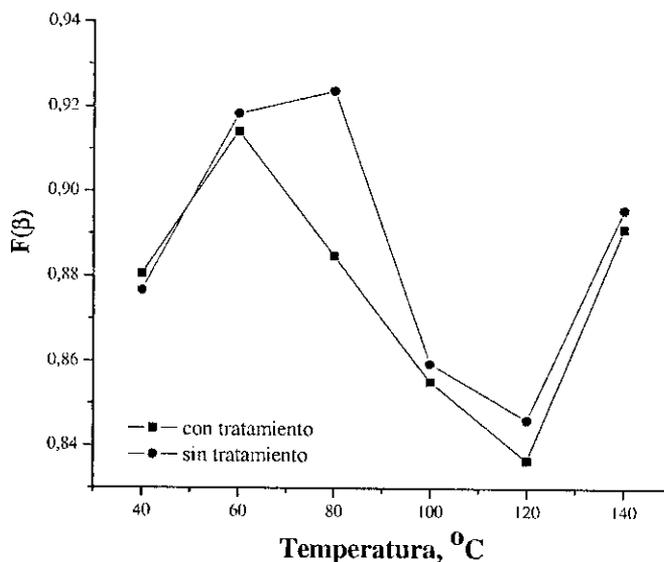
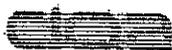


Figura 5.7 Gráfica de la membrana de 18% en peso del PVDF a diferentes temperaturas, fracción de β " $F(\beta)$ " vs. Temperatura en °C.

A partir de los datos obtenidos mediante la técnica de FTIR-ATR, se graficó la fracción de la fase β presente en las membranas al 18% (p/v) de PVDF en función de la temperatura, los resultados obtenidos se presentan en la *Figura 5.7*, donde se observa que al someter las membranas electrohiladas a las diferentes temperaturas, se genera un menor efecto sobre el cambio en el contenido de la fracción β . Este efecto se puede atribuir a que a medida que aumenta la temperatura, las cadenas de PVDF se relajan debido a la energía generada en el sistema. Esta relajación es tal que solo afecta la fracción de la fase β , la cual se encuentra conferida a la fase cristalina del polímero, pero no lo suficiente para perder el orden general del sistema. A excepción del cambio observado a la temperatura de 80 °C, ya que a esta temperatura se presentó la mayor caída relativa de la fracción de la fase β . Este comportamiento se observa en la mayoría del rango de temperaturas. Se observó que a la temperatura de 140 °C, aparece un incremento en la cantidad de fracción β , dicho comportamiento no es el esperado por la tendencia presentada en la *Figura 5.5*. Por otra parte, se observó una tendencia a la disminución de la fase β (la cual corresponde a un menor orden cristalino). Se ha encontrado en la bibliografía, que existe una pérdida del orden (fase β) en las fibras



electrohiladas de PVDF a una temperatura de 125 °C durante un período de exposición de 12 y 24 horas ^[5]. En este trabajo se reportan valores similares a los ya reportados, debido a que a temperaturas cercanas de 120 °C se encuentra el menor valor de la fracción de la fase β .

4.1.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

De los tratamientos térmicos realizados se tomó la muestra de 80°C y se analizó mediante microscopía (SEM) a 2000x, observando el siguiente comportamiento en la morfología entre la muestra antes y después del tratamiento.

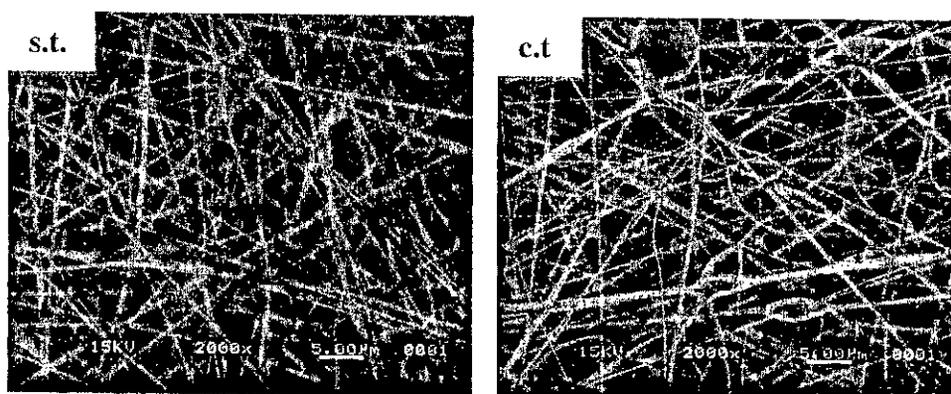


Figura 5.8 Micrografías de una membrana de 18% en peso de PVDF antes y después del tratamiento térmico de 80°C. *s.t.*: sin tratamiento térmico; *c.t.*: con tratamiento térmico.

En la *Figura 5.8*, se observa que después del tratamiento térmico de 80 °C se inicia la formación de nodos de mayor tamaño, lo cual puede ser debido a la unión de diferentes fibras, no obstante se conserva una distribución de diámetros de fibra similar a la inicial. La conservación de la morfología en las membranas, puede deberse a que no se provoca el suficiente desorden molecular (tiempo de exposición de la membrana al tratamiento térmico).

5.1.3 Análisis Térmico (Calorimetría Diferencial de Barrido).

Las membranas de 18% (p/v) de PVDF se caracterizaron mediante calorimetría diferencial de barrido. En la *Figura 5.9* se muestran las curvas de calentamiento y enfriamiento obtenidas para este tipo de material. Se observa que para la temperatura de



fusión (T_m) el valor obtenido fue de 170 °C, mientras que para la temperatura de cristalización el valor es de 136°C (Fig. 5.9a y 5.9b, respectivamente).

El PVDF es un material policristalino, debido a esto el contenido cristalográfico de las muestras están en función de las interacciones presentes polímero-solvente. Por esta razón, los valores reportados en la literatura de las transiciones térmicas de primer orden varían. Esta variación puede ser presentada incluso dentro de la misma fase obtenida, así como, de la fracción de estas presente en las muestras. Así mismo, se pueden encontrar diferentes valores en los picos de fusión dependiendo de las fases I, II y III (que se refieren a la fase α , β y γ) que han sido encontradas por su diferente naturaleza [6], encontrándose muchas veces dentro del rango de 160 a 200 °C [5].

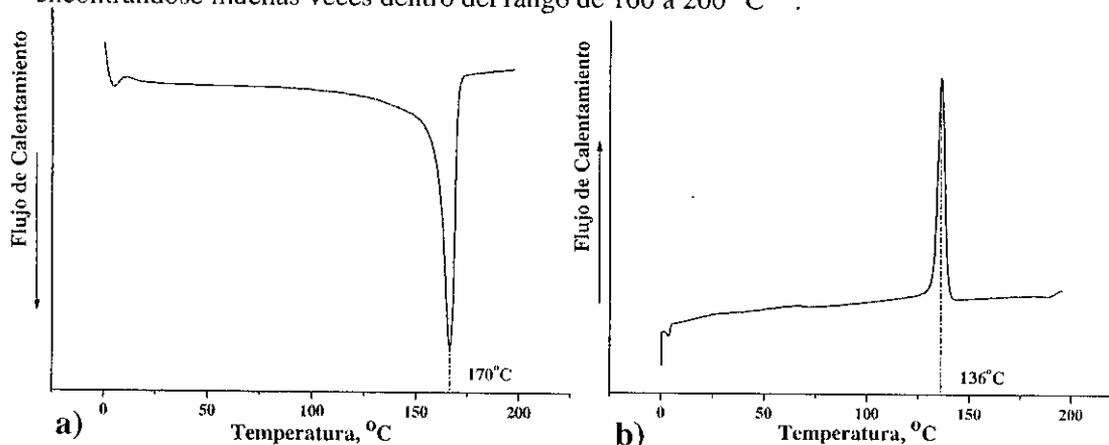


Figura 5.9 Curvas de DSC, a) temperatura de fusión, b) temperatura de cristalización; en una membrana del 18% (p/v) de PVDF.

En la curva de calentamiento no se alcanza a observar la temperatura de transición vítrea (T_g), debido a que se encuentra a temperaturas por debajo de la temperatura de cero °C. Así mismo, se realizó un análisis termodinámico para confirmar el valor de la T_g para las membranas electrohiladas de PVDF.

5.1.4 Análisis Mecánico Dinámico.

La membrana de PVDF al 18% (P/V) se caracterizó por medio de análisis mecánico dinámico (DMA). En la Figura 5.10, se graficó el modulo elástico, $\tan \delta$ en función de la temperatura. Se observó la presencia de dos zonas importantes en el PVDF. La primera zona va de -50 °C a 0 °C, la cual es atribuida a la presencia de la fase β en las



membranas, mientras que la segunda zona es atribuida a la fase α , en el intervalo de 50 a 150 °C. Para ambos casos, las zonas encontradas en este tipo de muestras coinciden con los reportados previamente ^[5].

El valor del módulo elástico encontrado fue de 5.55 Pa @ 25 °C, dicho valor es menor que al reportado por otros autores ^[5] a temperatura ambiente (aprox. de 8.4 Pa). La temperatura de transición vítrea (T_g) que se midió mediante DMA se encontró alrededor de -27 °C.

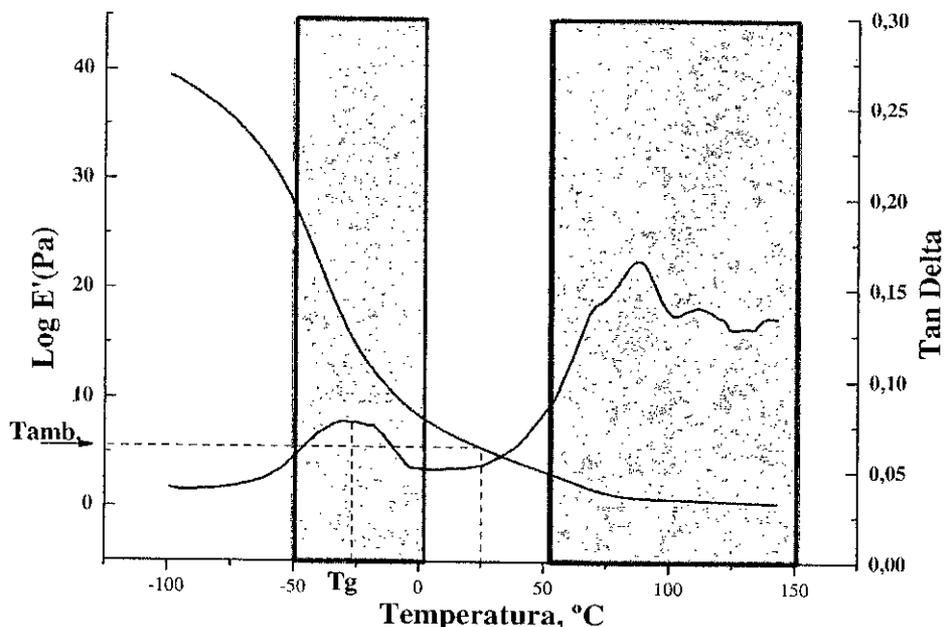


Figura 5.10 Curvas de DMA de una membrana de 18% (p/v) de PVDF obtenidas mediante tensión, módulo elástico y Tan Delta vs. Temperatura en °C.

Por otra parte, en la gráfica se observa la caída de el módulo elástico a medida que se incrementa la temperatura, ya que el módulo elástico esta en función a la rigidez del material. Dicho comportamiento se puede atribuir a la naturaleza de las muestras ya que dichas membranas electrohiladas tienen un espesor aproximado de 20 μm (valor obtenido mediante SEM a 15kV y 100x), valor que se encuentra por de bajo del espesor utilizado en este tipo de pruebas. Así mismo, la $\text{Tan } \delta$ presentó máximos y mínimos a temperaturas mayores a 0 °C, pudiéndose atribuir a las interacciones presente entre las interfaces presente entre las regiones amorfas y cristalinas de la muestra ^[5] electrohilada, así como de la alta porosidad de la misma.



En este tipo de membranas poliméricas, el comportamiento mostrado está en función del contenido de las fases cristalinas α y β presente en las muestras. A una temperatura de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, se puede relacionar a las interacciones y movimientos moleculares de la región cristalina de la fase α , por otra parte, a una temperatura de -27°C se relacionada con el contenido de fase β (movimientos Micro-Brownianos de las cadenas), así como de la transición vítrea (T_g)^[6].

5.1.5 Rayos-X.

El PVDF es un material de naturaleza semicristalina, por el cual exhibe un patrón de difracción de rayos-X bien definido. En este trabajo se obtuvo el patrón de difracción de rayos-X de la membrana electrohilada a 18% (p/v) de PVDF. En la *Figura 5.11*, se muestra los patrones de difracción de rayos-X del PVDF en polvo (original) y del PVDF como una membrana electrohilada. En la muestra de PVDF original se observaron la presencia de señales a 18.52° y 20.1° en 2θ , indexados a las conformaciones cristalinas de las reflexiones $\alpha(020)$ y $\beta(200/110)$ del PVDF^[14]. Por otra parte, la muestra de PVDF electrohilada presenta una disminución del pico a 18.52° correspondiente a la fase α , y presenta picos de difracción en 20.28° , 22.65° y 26.14° de 2θ los cuales son atribuibles a las fases β y γ ^[7]. Este comportamiento puede ser debido a que en la muestra electrohilada el PVDF es sometido a una fuerza electrostática y por lo tanto a deformaciones mecánicas durante el proceso de electrohilado, y por lo tanto el favorecimiento de la formación de la fase β dentro de las muestras.

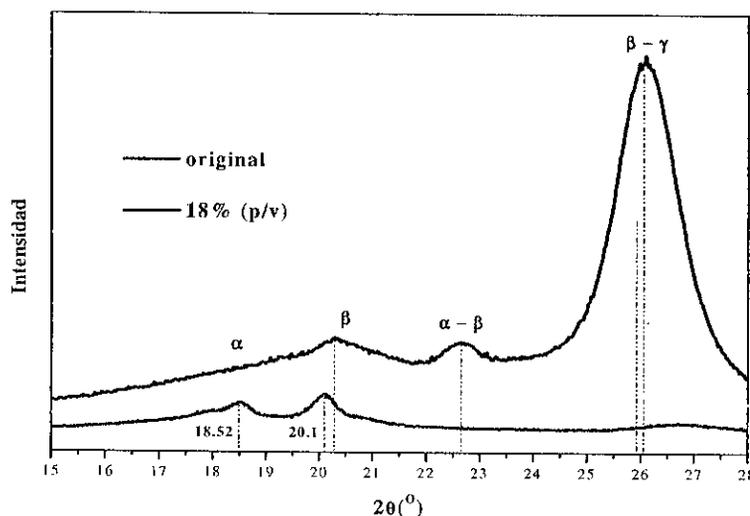


Figura 5.11 Muestra obtenida mediante electrohilado y muestra de PVDF en polvo.

Centro de Investigación en Química Aplicada

5.2 ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

5.2.1 Cinética de Crecimiento.

Posteriormente a la activación de las células de *Saccharomyces cerevisiae* y la obtención del inóculo, los cuales se mencionan en el procedimiento descrito en la parte de desarrollo experimental en los puntos 4.5.1, 4.5.2 y 4.5.3, se procedió a la cinética de crecimiento de este microorganismo. (Figura 5.12)

La curva que se obtuvo corresponde al comportamiento típico de crecimiento microbiano en medio líquido de *Saccharomyces cerevisiae*, a tiempos tempranos de cero a cinco horas se presenta una fase de adaptación debido a la abundancia de nutrientes y de las condiciones óptimas del cultivo.

A continuación se presenta la fase exponencial, donde se lleva la velocidad máxima de crecimiento de las levaduras (aproximadamente de 5 a las 14 horas) y finalmente se muestra la presencia de una fase estacionaria donde se puede observar que no existe un incremento de la masa celular (biomasa) que comprende desde la hora 14 hasta el final de la prueba (24 horas). Se alcanza este comportamiento debido al paulatino agotamiento de algún nutriente esencial del medio. También se puede presentar debido a los productos de desecho que se han liberado durante la fase exponencial que promueven que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano [8].



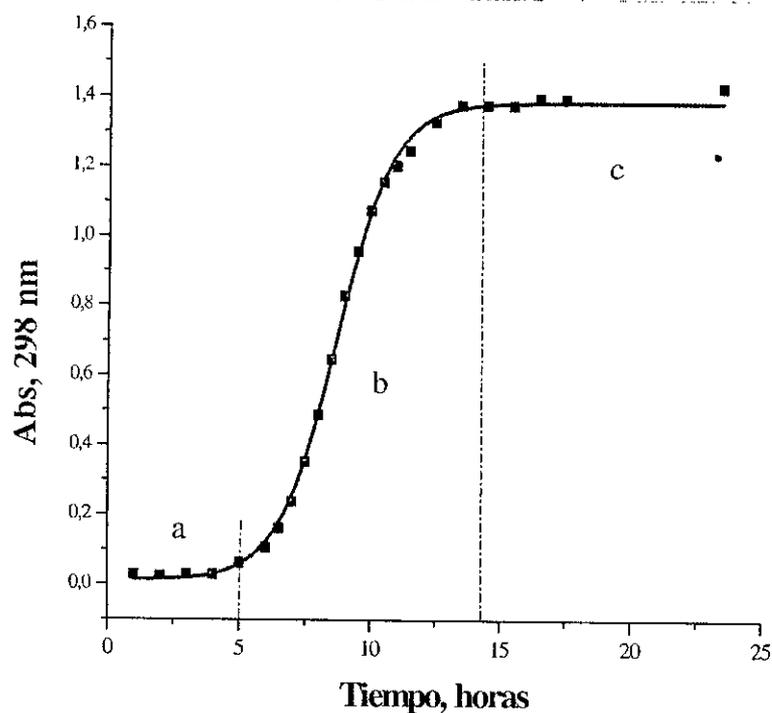


Figura 5.12 Gráfica de la Cinética de Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*; a. fase de adaptación; b. fase exponencial; c. fase estacionaria.

A partir del análisis de la gráfica (Figura 5.12) se decidió realizar cultivos celulares a tiempos de 8 (inicio de la fase exponencial) y 12 horas (final tardío de la fase exponencial), con el fin de evaluar el comportamiento de las células de levadura en contacto con las membranas de PVDF preparadas por electrohilado, según se describió en los apartados anteriores.

Las células se obtuvieron de acuerdo con el procedimiento ya mencionado anteriormente en el capítulo 3 para la preparación de los cultivos de 8 y 12 horas (3.5.5), de los cuales se recuperó la biomasa de ambos cultivos. Este procedimiento fue llevado a cabo a partir de lavados en solución fisiológica mediante una centrifuga y finalmente se re-suspendieron las biomásas de los cultivos en un medio de dilución (candó nutritivo "YM" 1/500mL de agua destilada). (Figura 5.13)



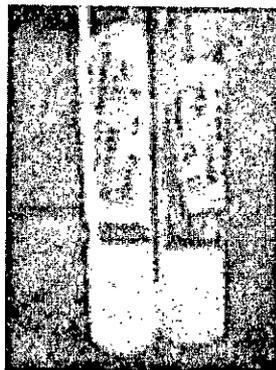


Figura 5.13 Fotografía de las biomasa de los cultivos de 8 y 12 horas re-suspendidas en un medio de dilución.

5.3 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MEMBRANA ELECTROHILADA DE PVDF SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

5.3.1 Estudio del efecto de la membrana sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* mediante resiembra en placa.

Posteriormente se realizó la prueba de siembra en medio sólido de acuerdo al procedimiento mencionado en la parte experimental en el punto 3.5.6. Se observó que las células de *Saccharomyces cerevisiae* crecen sin restricción en este medio de cultivo y que la membrana de PVDF (18%) actúa como un sustrato inerte para el crecimiento y propagación del cultivo celular, resultados que están de acuerdo con información publicada por otros autores^[9]. (Figura 5.14)

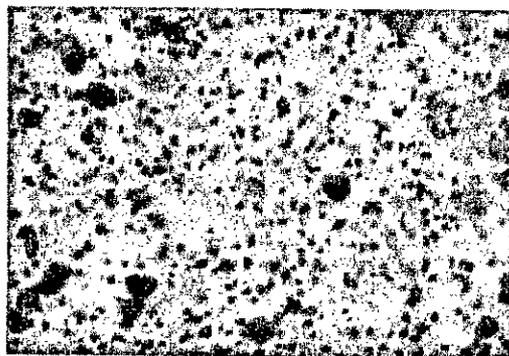


Figura 5.14 Imagen de una membrana inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* en Medio de cultivo YM (siembra en caja).



5.3.2 Estudio del efecto de las membranas electrohiladas de PVDF sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* mediante el Método de Contacto Directo.

A partir de la suspensión celular, una cámara Neubauer y un microscopio óptico se realizaron los conteos de células presentes en los cultivos de 8 y 12 horas obteniendo valores estimados de $7,500,000 \pm 500,000$ células/mL y $14,500,000 \pm 500,000$ células/mL respectivamente.

Posteriormente se ajustó el cultivo de 12 horas a una cantidad estimada de $7,500,000 \pm 500,000$ células/mL, ajuste obtenido mediante la adición del medio de dilución, permitiendo la realización de los experimentos a 8 y 12 horas de forma comparativa a partir de la misma cantidad estimada de células presentes.

En la *Figura 5.15*, se observa incrementos en las unidades formadoras de colonias con respecto a los blancos (control), comportamiento que es presentado por ambas muestras del cultivo de 8 horas (tiempo cero y tiempo 24). Por otra parte, se observa que en la muestra a tiempo cero se obtienen valores mayores de UFC (un incremento en 900,000 células/mL viables), valor que en comparación del cultivo de 8 horas a tiempo 24 se ubica por debajo de 100,000 células/mL (teniendo valores de 100 a 590 células/mL).

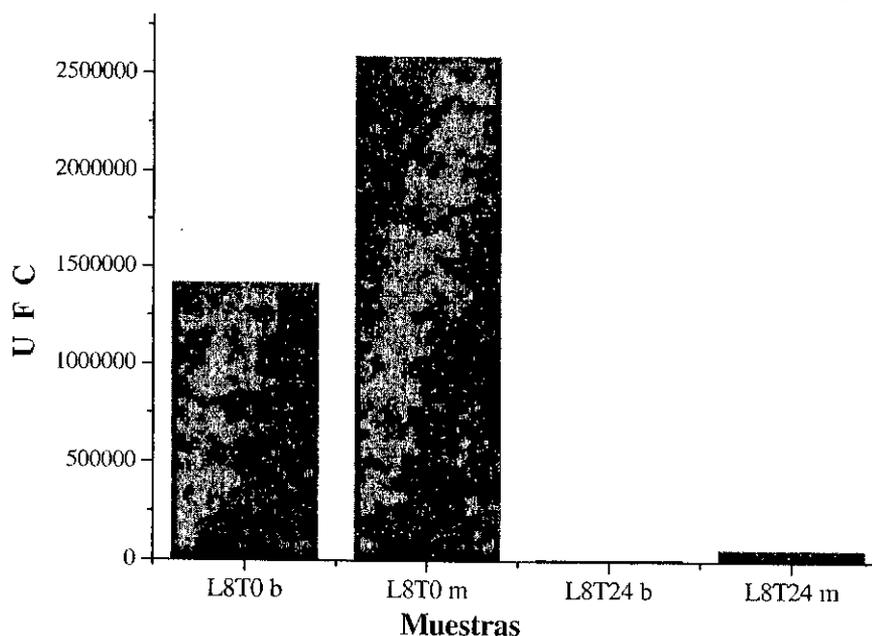


Figura 5.15 Grafica del Cultivo a 8 horas para las muestras de cero y 24 horas de incubación.



En la *Figura 5.16*, se observa el comportamiento del cultivo de 12 horas a tiempo cero y tiempo 24, en la cual se obtuvo una tendencia similar a la exhibida por el cultivo de 8 horas incrementándose el número de UFC en ambos casos (a tiempo cero y tiempo 24). La muestra obtenida a tiempo cero presenta un mejor comportamiento que la muestra a tiempo 24, dicho comportamiento es evaluado con respecto al número de células/mL inoculadas al inicio del experimento. A tiempo cero se reporta un incremento en 600,000 células/mL viables y a tiempo 24 de 420,000 células/mL, obteniendo de la muestra a tiempo 24 un incremento del más del doble de UFC que se hallaron en su respectivo blanco.

Las variaciones en las UFC entre las muestras de cero y 24 horas, se pueden adjudicar a las variaciones presentadas dentro de la elaboración de las muestras. Mostrando así un incremento significativo en el conteo de las UFC de la muestra a tiempo cero (6500,000 células/mL), en comparación con la muestra a tiempo 24 (6600,000 células/mL).

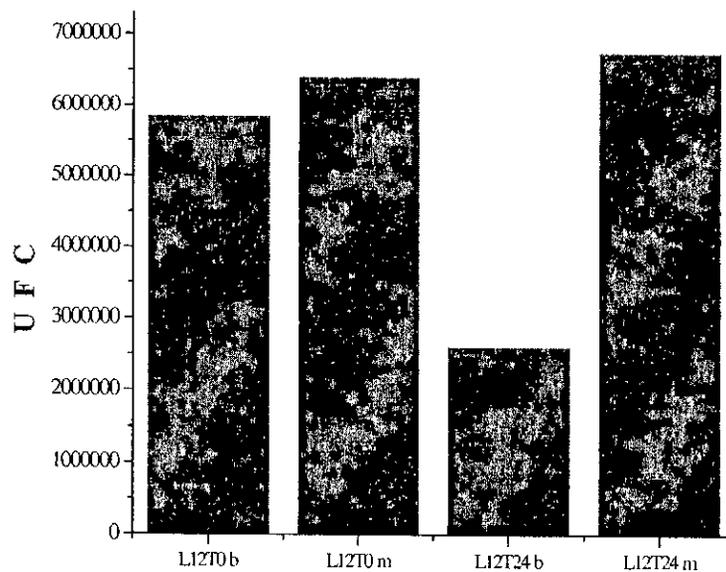


Figura 5.16 Gráfica del Cultivo de 12 horas para las muestras de cero y 24 horas de incubación.



Para este tipo de sistemas (matriz polimérica de PVDF-microorganismo) se ha reportado en la literatura un crecimiento y propagación de otras células, tales como, nervios, neuronas, músculos entre otros. Estos estudios han sido referidos a matrices de PVDF en película ^[16], mientras que las matrices que se presentan en este trabajo son membranas de PVDF compuestas de nanofibras.

Se puede concluir que los substratos de PVDF son buenos andamios biocompatibles, los cuales ya han sido establecidos para algunas aplicaciones de tejido suave, entre otras. Es posible combinar las propiedades mecánicas (inherentes del material) con las mejoras de biocompatibilidad ^[15].

5.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MEMBRANA ELECTROHILADA DE PVDF BAJO UN ESFUERZO MECÁNICO, SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*- PRUEBA DEL SISTEMA DINÁMICO.

A partir del estudio realizado anteriormente del comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de la membrana de PVDF (18% en peso), se decidió utilizar el cultivo de 12 horas para continuar el estudio dinámico, ya que dicho cultivo presenta los mejor valores de UFC tanto a tiempo cero, como a tiempo 24. Las membranas fueron inoculadas con una suspensión celular de la levadura. Posteriormente fueron sometidas a un esfuerzo de deformación durante el período de incubación de 24 horas y a una temperatura de 37°C. Se observó que los primeros dos experimentos (1 y 2), existe una pérdida del número células viables al someter las membranas a una deformación mecánica constante durante un período de 24 horas, en comparación con las membranas inoculadas que no fueron sometidas a algún esfuerzo. (Tabla 5.3)

Tabla 5.3 Valores obtenidos con un recuento de células de levadura al finalizar el experimento dinámico (Sistema Oscilatorio).

No. De Experimento	Sin Movimiento	Con Movimiento
1	1,500,000	40,000
2	1,000,000	50,000
3 (con humedad)	1,500,000	85,000



El decremento de los valores en las UFC puede deberse a la presencia de un problema de gradiente de esfuerzo, debido a que las membranas se encuentran compuestas de una gran cantidad nanofibras, causando así una generación de cargas localizadas en la superficie de las membranas. Debido a este efecto se puede generar un voltaje sobre la superficie de las muestras y por tal afectar de manera negativa a las células, causando su muerte.

Cuando las membranas electrohiladas de PVDF estas constituidas por una gran cantidad de fase β , estos materiales adquieren propiedades piezoeléctricas, generando así un potencial eléctrico en respuesta a una deformación mecánica. Se ha reportado que incluso cuando este tipo de muestras son colocadas en un equipo que conste de un motor o vibraciones mismas del funcionamiento, generan de 2 a 3 mV en películas a 1200 Hz ^[9] ^[15], donde el área superficial es menor al proporcionado por las membranas electrohiladas.

Por otra parte, este efecto puede ser atribuido al secado del cultivo inoculado sobre la membranas de PVDF provocado por los esfuerzos mecánicos, así como, por pérdidas celulares debido al movimiento oscilatorio provocado sobre las membranas, causando que el cultivo vibre y por lo tanto las células se caigan fuera del área de la membrana.

Debido los efectos discutidos anteriormente, se realizaron modificaciones al sistema de oscilación. Esto se realizó alimentando aire humedo al cultivo, para evitar o amortiguar el secado del cultivo inoculado, y por lo tanto la disminución en el número de células viables. Otra modificación que se realizó fue la disminución de la frecuencia de oscilación en el sistema, el cual partió de 300 rpm a 100 rpm, y así evitar la muerte de las células a tiempos tempranos de experimentación. (*Figura 5.17*)





Figura 5.18 Fotografía del Sistema Oscilatorio en un ambiente húmedo.

A partir de las modificaciones realizadas en el sistema (*Figura 5.17*), se obtuvo un incremento en el número de UFC aproximadamente del doble en comparación de los primeros resultados, lo que nos propone un arreglo y condiciones mejores para el crecimiento de *Saccharomyces Cerevisiae* en membranas de PVDF sometidas a un esfuerzo.



Referencias.

1. A. Salimi, A. A. Yousefi, Conformational Changes and Phase Transformation Mechanisms in PVDF Solution-Cast Films, *Journal Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, Vol. 42, 3487-3495, 2004.
2. Pankaj Gupta; Casey Elkins; Timothy E. Long; Garth L. Wilkes, Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl metacrilate): exploring relationship between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent, *Polymer*, 46, 4799-4810, 2005.
3. Sung Won Choi; Jeong Rae Kim; Young Rack Ahn; Seong Mu Jo and Elton J. Cairns, Characterization of Electrospun PVDF Fiber-Based Polymer Electrolytes, *Chem Mater*, 19, 104-115, 2007.
4. Zhizhen Zhao; Jingqing Li; Xiaoyan Yuan; Xiang Li; Yuanyuan Zhang;; Jing Sheng, Preparation and Properties of Electrospun Poly(Vinylidene Fluoride) Membranes, *Journal of Applied Polymer Scienc*, Vol. 97, 466-474, 2005.
5. Marcel Benz; William B. Euler, Determination of the Crystalline Phases of Poly(vinylidene fluoride) Under Different Preparation Conditions Using Differential Scanning Calorimetry and Infrared Spectroscopy, *Journal of Applied Polymer Scienc*, Vol. 89, 1093-1100, 2002.
6. Eric G. Fine; Robert F. Valentini; Ravi Bellamkonda and Patrick Aebischer, Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidene fluoride-trifluoroethylene copolymer guidance channels, *Biomaterials* Vol. 12, 775-780, 1991.
7. Wu Aik Yee; Masaya Kotaki; Ye Liu; Xuehong Lu, Morphology, polymorphism behavior and molecular orientation of electrospun poly(vinylidene fluoride) fibers, *Polymer*, Vol. 48, 512-521, 2007.
8. Gopal Renuga; Kaur Satinderpal; Ma Zuwei; Chan Casey; Ramakrishna Seeram; Matsuura Takeshin, *Journal of Membrane Science*, 281, 581-586, 2006.
9. J.S. Harrison, Piezoelétric Polymers, NASA/CR-2001-211422 ICASE Report No. 2001-43, 2001.



10. Andrew J. Lovinger, *Ferroelectric Polymers*, Science, Vol. 220, No. 4602, 1983.
11. Zhehui Liu; Philippe Maréchal and Robert Jérôme, DMA and DSC investigations of the β transition of poly(vinylidene fluoride), *Polymer*, Vol. 38, No. 19, 4925-4929, 1996.
12. J.S. Andrew and D.R. Clarke, Enhanced Ferroelectric Phase Content of Polyvinylidene Difluoride Fibers with the Addition of Magnetic Nanoparticles, *American Chemical Society, Langmuir* 40, 20, 2008.
13. Muhamad Nastir; Hidetoshi Matsumoto; Mie Minagawa; Akihiko Tanioka; Tetsuya Danno and Hideo Horibe, Formation of β -Phase Crystalline Structure of PVDF Nanofiber by Electro Spray Deposition: Additive Effect of Ionic Fluorinated Surfactant, *Polymer Journal*, Vol. 39, No. 7, 670-674, 2007.
14. I.S. Bhardwat, *Polymer science recent advances Book*, Vol. 2, 804-809.
15. Bachmann M.; Lando J., Unit-Cell of the Gamma-Phase of Poly(Vinylidene Fluoride), *Macromolecules*, 14, 40, 322, 1981.
16. J. Pérez-Herrera; V. Corral-Flores; A. Castañeda-Facio; J. Romero García, R.F. Ziolo, Preparación de membranas de Poli(fluoruro de vinilideno) por la técnica de elctrohilado, Tesis de Licenciatura, CIQA, 2007.
17. Roger Y. Stanier; Edward A. Adelberg; John Ingraham, *The Microbial World*, 4th Edition, 280-291, 1976.
18. Robert F. Valentini; Terrence G. Vargo; Joseph A. Gardella Jr. And Patrick Aebischer, *Biomaterials*, Vol. 13, No.3, 183-189, 2001.
19. Jun Hu; Lihong Huang; Xiuli Zhuang; Peibiao Zhang; Le Lang; Xuesi Chen; Yen Wei and Xiabin Jing, Electroactive Aniline Pentamer Cross-Linking Chitosan for Stimulation Growth of Electrically Sensitive Cells, *Biomacromolecules*, Vo. 30, No. 20, A-H, 2008.
20. Doris Klee; Zahida Ademovic; Anja Bosserhoff; Hartwig Hoecker; G. Maziolis; Hans-Josef Erli, Surface modification of poly(vinylidene fluoride) to improve the osteoblast adhesion, *Biomaterials*, 24, 3663-3670, 2003.



CONCLUSIONES.

A partir de la técnica de electrohilado se obtuvieron exitosamente membranas porosas, las cuales están compuestas de nanofibras de PVDF (100 a 500 nm) con altos porcentajes de fase β presente (0.8577).

Los parámetros de proceso de electrohilado, tales como la concentración, afectan de manera directa la morfología de las membranas, así mismo, los nudos observados en la morfología de las membranas son atribuidos al tipo de disolvente utilizado para la elaboración de las soluciones poliméricas.

Mediante las técnicas de caracterización térmicas y mecánico-dinámicas (DSC y DMA), se confirman los rangos de temperatura característicos para este tipo de materiales, obteniendo una T_m de 170 °C y una T_c de 136 °C, así como, un módulo elástico de 5.55 Pa @ 25 °C y una T_g de -27 °C.

Mediante la técnica de difracción por rayos-x, se identificaron la presencia de las fases α , β y γ , las cuales son características de este polímero, así como, las contribuciones dentro del plano.

Microorganismo en contacto con las membranas electrohiladas de PVDF.

Se observó un mejor comportamiento en el cultivo de 12 horas en contacto con las membranas de PVDF, comprobado así que las membranas de poli(fluoruro de vinilideno) pueden ser utilizadas como soportes para el crecimiento de células.

