

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y**  
**Biotechnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica**



“EFECTO DEL USO DE UN LIQUIDO IONICO EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA SU OBSERVACIÓN EN EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB)”

Tesis presentada por la bachiller:

**Condori Quispe Mónica Daysi**

Para optar el título profesional de:

**Ingeniero Biotecnólogo**

Asesor: **Dr. Gómez Valdéz Badhín**

Co-Asesoras:

**Dra. Calderón Domínguez Georgina**

**Dra. Salgado Cruz María de la Paz.**

Arequipa – Perú

2020

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20190000041448

N° Trámite en Fac. 462-2019  
Fecha Recep. Fac. 13-12-2019

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL


DE: **CONDORI QUISPE, Monica Daysi**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**"EFECTO DEL USO DE UN LIQUIDO IONICO EN LA PREPARACION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA SU OBSERVACION EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (MEB)"**

DICTAMINADORES: **Dr. Gonzalo Dávila del Carpio** 2) **Dr. Francisco Roque Rodríguez**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"EFECTO DEL LIQUIDO IONICO ACETATO DE 1 ETIL 3 METIL IMIDAZOLIO Y TRATAMIENTOS TRADICIONALES SOBRE LAS CARACTERISTICAS MORFOMETRICAS DE UNA MUESTRA ORGANICA CON ALTA HUMEDAD ANALIZADAS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO"**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

FIRMAS:  FECHA 10/01/2020

ASESOR: **Dr. Badhin Gómez Valdez**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad  
Atentamente

FIRMA  FECHA 17-01-20

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Mgter. Cinthia Córdova Barrios** 3) **Dr. Francisco Roque Rodríguez**  
2) **Dr. Gonzalo Dávila del Carpio**

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por la recurrente, debiendo cambiar el título a: **"EFECTO DEL USO DE UN LIQUIDO IONICO EN LA PREPARACION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA SU OBSERVACION EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (MEB)"**, luego de lo cual y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.  
Atentamente

FIRMA  FECHA 16/10/20

JURADOS: PRESIDENTE  
VOCAL  
SECRETARIO

FECHA HORA LOCAL

FIRMA DEL DECANO FECHA

## DEDICATORIA

A Dios y la Virgen María por guiarme y acompañarme durante todo el proceso de este bonito proyecto, porque hicieron que disfrutara cada día trabajando juntos. A mi familia por su amor, apoyo constante, sus palabras de aliento y motivación.

A mis Co-Asesoras; la Dra. Georgina Calderón Domínguez y la Dra. María de la Paz Salgado Cruz por abrirme las puertas de sus laboratorios, darme la oportunidad de trabajar a su lado y guiarme en todo momento.



## AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mis padres por darme la oportunidad de realizar mi trabajo final en México, ya que pude conocer a personas maravillosas que cambiaron mis perspectivas y me enseñaron a soñar en grande.

Al Dr. Gonzalo Trujillo Chávez, director de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN por brindar el apoyo a universidades extranjeras y aceptar a sus alumnos como tesista para continuar con su formación profesional.

A las Dras. Georgina Calderón Domínguez y María de la Paz Salgado Cruz por guiarme en esta etapa de culminación de licenciatura y enseñarme que con disciplina, esfuerzo y dedicación se pueden cumplir grandes metas.

A los Dres. Edgar López Villegas, Hugo Martínez Gutiérrez y la Dra. María de Jesús Perea Flores por abrirme las puertas de sus laboratorios, su apoyo, disposición de tiempo y enseñarme a utilizar los equipos como; el microscopio electrónico de barrido y el secador de punto crítico. Así mismo al Mgtr. Miguel Ángel Romero Flores por presentarme cada área de trabajo del departamento de Ingeniería Bioquímica.

A mi mejor amiga Laura Hill Pastor, por su gran corazón, ayudarme y cuidarme en los momentos que enferme, por sus palabras y acciones que me motivaron día a día a continuar y hacer que esta experiencia lejos de mi país la recuerde con mucha felicidad.

A mis compañeras de laboratorio por su amistad y sobre todo porque me hicieron conocer la rica gastronomía de México, la cual nunca olvidare.

A la Universidad Católica de Santa María por ser mi alma mater durante estos cinco años de formación profesional, así mismo a las directoras de mi escuela, ing. Eugenia Zeballos y la Ing. Cinthia Córdoba Barrios por solicitar las estancias de investigación en el extranjero y apoyar de esta manera a los alumnos.

Al Dr. Badhín Gómez Valdéz y el Dr. Jorge Vázquez por apoyar y recibir a los alumnos de la escuela profesional de Ingeniería Biotecnológica en sus laboratorios y permitirnos realizar una estancia de investigación en sus instalaciones.

## RESÚMEN

El microscopio electrónico de barrido (MEB) permite estudiar estructuras morfológicas y superficiales de los materiales, a través de la obtención de microfotografías con alta magnificación y una resolución menor a 1 nm. En la presente investigación se evaluó el efecto del uso de un líquido iónico (LI) y cuatro tratamientos tradicionales, como tratamientos de muestras biológicas con alto contenido de humedad para su observación en el MEB en condiciones de alto vacío.

Para este trabajo se obtuvieron perlas de alginato calcio-mucílago de *Salvia hispánica* L. (*chía*), como muestra orgánica, con alta humedad y baja conductividad debido a su naturaleza polimérica, por lo que se sugiere darle un tratamiento antes de introducirlas en una cámara de alto vacío del MEB al igual que otras muestras biológicas con estas mismas características.

Los cuatro tratamientos tradicionales han utilizado el secado de punto crítico con y sin la incorporación de fijadores químicos por ejemplo co-reticulantes, aminoácidos y colorantes que preservan la estructura del espécimen, aumentan el brillo y contraste en las microfotografías, así también se usa el recubrimiento con metales con el objetivo de incrementar la conductividad de la muestra y evitar que se cargue.

Aparte de estos cuatro tratamientos tradicionales también se evaluó el efecto del uso del 1 etil 3 metil imidazolio, como tratamientos químico reciente, el cual es un líquido iónico que permanece líquido a temperatura ambiente o menos de 100 °C debido a la carga electrostática deslocalizada de sus componentes, también tiene una presión de vapor insignificante, una conductividad que aumenta con la temperatura, posee una naturaleza hidrofílica y baja densidad; estas características lo hacen óptimo para utilizarlo en una cámara de alto vacío de un MEB.

Estos métodos se proponen para mantener las características morfométricas iniciales (diámetro de Féret máximo, relación de aspecto y circularidad) y de textura de las perlas; durante los tratamientos hasta la observación con el MEB a través de un análisis de imagen y estadístico utilizando los programas ImageJ y Sigma Plot 14.0 respectivamente.

Los resultados mostraron que las perlas, durante la preparación con los tratamientos tradicionales y el LI disminuyeron el diámetro de Feret inicial de las perlas en un 22.93% y 8.69% en promedio respectivamente; sin embargo, las demás características

morfométricas no se vieron afectadas. Luego los resultados de las perlas en la cámara de alto vacío con los distintos tratamientos mostraron las microfotografías de su morfología, resaltando el uso del LI al proporcionarle la suficiente conductividad a las perlas para observar su forma completa en la pantalla, y debido a su naturaleza hidrofílica y presión de vapor insignificante, la muestra se mantuvo húmeda dentro de la cámara de alto vacío durante el análisis, además por su baja densidad se pudo obtener imágenes con una resolución y contraste que proporcionan información de los distintos componentes de la superficie de las perlas al igual que los cuatro tratamientos tradicionales.

En cuanto a sus características morfométricas se observó que el LI sólo afectó el diámetro de Féret inicial de las perlas disminuyéndolo en un 30.54%; así mismo, la viscosidad del 1 etil 3 metil imidazolio no permitió una distribución homogénea del LI por toda la superficie de la muestra, de tal forma que se observó la acumulación de este en ciertas zonas, proporcionando una información de textura superficial lisa a comparación de los tratamientos tradicionales que resultaron dar una información de textura superficial rugosa.

En conclusión el efecto del uso del 1 etil 3 metil imidazolio y los tratamientos tradicionales, como métodos propuestos para mantener las características morfométricas iniciales de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L. (chía)* y su observación en el MEB en condiciones de alto vacío, se concluye que todos los tratamientos disminuyen el tamaño de las perlas pero mantienen la forma de estas, resaltando el tratamientos con LI, el cual proporcionó una forma simple de preparar muestras orgánicas y biológicas de alta humedad, por lo que no se necesita un secado y recubrimiento de las muestras orgánicas como en el caso de los otros tratamientos, además de conservar su estructura lo que permitió obtener microfotografías de buena calidad, proporcionando información de su topografía y morfología a través de un análisis de imagen.

**Palabras clave:** microscopio electrónico de barrido, vacío, perlas, características morfométricas, textura, humedad, conductividad, análisis de imagen.

## ABSTRACT

The Scanning Electron Microscope (SEM) allows the study of morphological and superficial structures of the materials, through the obtaining of microphotographs with high magnification and a resolution of less than 1 nm. In this research, the effect of the use of an ionic liquid (LI) and four traditional treatments, such as treatments for biological samples with high moisture content, for observation in the SEM under high vacuum conditions was evaluated.

For this work, we obtained calcium-mucilage alginate pearls from *Salvia hispánica* L. (Chía) as an organic sample, with high humidity and low conductivity due to their polymeric nature, characteristics that makes us suggest giving them a treatment before introducing them into one high vacuum chamber of the MEB, like it has been done to other biological samples with these same characteristics.

The four traditional treatments have used critical point drying with and without the incorporation of chemical fixatives; a usage of co-cross linkers, amino acids and dyes to preserve the structure of the specimen, increase brightness and contrast in microphotographs, and also metal recognition with the aim of increasing the conductivity of the sample and preventing it from loading.

Aside from these four traditional treatments, the effect of the use of 1-ethyl-3-methylimidazolium was also evaluated, as recent chemical treatment, which is an ionic liquid that remains liquid at room temperature or less than 100 ° C due to its electrostatic charge, delocalized of its components, it also has negligible vapor pressure, a level of conductivity that increases with temperature, a hydrophilic nature and low density; all these characteristics make it optimal for use in a high vacuum chamber of a MEB.

These methods are proposed to maintain the initial morphometric characteristics (maximum Féret diameter, aspect ratio and circularity) and the texture of the beads; during the treatments until the observation with the SEM through an image and statistical analysis using the ImageJ and Sigma Plot 14.0 programs respectively.

The results showed that the pearls, during the preparation with the traditional treatments and the LI, decreased their initial Féret diameter by 22.93% and 8.69% on average respectively; however, the other morphometric characteristics were not affected.

Then, the results of the pearls in the high vacuum chamber with the different treatments affected the microphotographs of their morphology, highlighting the use of the LI by providing the pearls sufficient conductivity in order to observe their full shape on the

screen; and due to their hydrophilic nature and negligible vapor pressure, the sample was kept moist inside the high vacuum chamber during the analysis; in addition, due to its low density, it was possible to obtain images with a resolution and contrast that provide information of the different components of the pearl surface, as well as the four traditional treatments.

Regarding its morphometric characteristics, it was observed that the LI only affected the initial Férret diameter of the pearls, decreasing it by 30.54%; likewise, the viscosity of 1-ethyl-3-methyl-imidazolium did not allow a homogeneous distribution of the LI throughout the area of the sample, in such a way that the accumulation of it has been observed in certain areas, providing a smooth surface texture information in comparison to traditional treatments that turned out giving rough surface texture information. In conclusion, the effect of the usage of 1-ethyl-3-methyl-imidazolium and traditional treatments, as proposed methods to maintain the initial morphometric characteristics of the calcium alginate-mucilage beads of *Salvia hispánica* L. (chía) and their observation in SEM under high vacuum conditions, concludes that all treatments decrease the size of the pearls but do not affect the shape of them, highlighting the treatments with LI, which provided a simple way to prepare high-humidity organic and biological samples, a reason why it is not needed to effectuate the drying and coating of organic samples as in the case of other treatments, in addition to preserving their structure, which allowed obtaining microphotographs of good quality, providing information on its topography and morphology through image analysis.

keywords: Scanning Electron Microscope (SEM), vacuum, beads, morphometric characteristics, texture, humidity, conductivity, image analysis.



## OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto del uso de un líquido iónico en la preparación de muestras biológicas para su observación en el microscopio electrónico de barrido (MEB).

Objetivos específicos:

1. Determinar las características morfométricas iniciales de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* L. (*chía*), como muestra biológica de alta humedad a través del primer análisis de imagen.
2. Comparar el efecto de los métodos de preparación en la observación de muestras con alto contenido de agua utilizando tratamientos tradicionales y un líquido iónico por microscopía electrónica de barrido a partir del segundo y tercer análisis de imagen sobre las características morfométricas iniciales de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (*Chía*) durante la preparación de muestras.
3. Establecer las diferencias entre los métodos de preparación de muestras con tratamientos tradicionales (físicos y físico-químicos) y químicos (líquido iónico) que se observan por microscopía electrónica de barrido a través de un análisis cualitativo.
4. Comparar el efecto de los métodos de preparación utilizando el líquido iónico y los tratamientos tradicionales sobre las características morfométricas iniciales y de textura de las perlas dentro del microscopio electrónico de barrido a través de un cuarto análisis de imagen.



## HIPÓTESIS

Es posible comparar el uso de un líquido iónico y otros tratamientos tradicionales con el fin de recolectar mayor cantidad de información sobre la estructura y morfología de una muestra biológica con alto contenido de humedad a través de un análisis de imagen y la microscopía electrónica de barrido.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad los procedimientos para la preparación o tratamiento de muestras orgánicas y biológicas que son observadas en el microscopio electrónico de barrido son complejos y dependientes de la naturaleza y de las propiedades del material a analizar (conductividad, contenido de humedad, estabilidad térmica, composición) y de las condiciones de operación de equipo (alto y bajo vacío, voltaje de aceleración, distancia de trabajo, tipo de detector)<sup>1</sup>.

La microscopía electrónica de barrido tiene la capacidad de analizar la topografía tridimensional y la distribución de las características expuestas de un espécimen, alcanzando una amplificación de imagen, manteniendo la resolución a escala manométrica, en su forma natural y en tiempo real. Para obtener ésta información el microscopio electrónico de barrido (MEB) utiliza un haz de electrones en condiciones de alto vacío, para el libre desplazamiento de los electrones, hasta interactuar con un espécimen que se encuentra en una cámara a bajo o alto vacío, producto del choque se genera una dispersión de electrones, que provienen de un volumen de interacción y son reconocidos como señales, los cuales serán recolectados por un detector y procesados para generar una imagen en la pantalla de un monitor. Por lo tanto el uso del MEB convencional se limita a materiales conductores y que no se evaporen fácilmente bajo las condiciones existentes <sup>2,3</sup>.

Las muestras biológicas y orgánicas se les consideran materiales frágiles, térmicamente sensibles y no conductores, debido a que se componen de elementos de bajo número atómico, y cuando un haz de electrones del MEB incide sobre la muestra, la penetración es profunda, lo que genera un gran volumen de interacción a medida que la energía se absorbe dentro del espécimen. Los electrones dispersos provienen de un nivel tan amplio alrededor del punto de entrada que la resolución se reduce considerablemente. Así mismo la penetración profunda contribuye a la pérdida de señal dentro de la muestra <sup>2</sup>.

Las muestras no conductoras, cuando se bombardean con electrones, producen artefactos conocidos como carga. Esto se manifiesta como distorsión de la imagen, daño térmico y áreas oscuras dentro de una microfotografía debido a la repulsión de los electrones <sup>1</sup>.

Además las muestras biológicas y orgánicas están compuestas principalmente de agua, esta tiene una fuerte tensión superficial debido a los enlaces de hidrógeno y cuando se

evapora desde un espécimen, las fuerzas de adhesión del agua causan contracción, arrugas o roturas, por lo que la deshidratación adecuada de las muestras es fundamental para evitar el colapso de la estructura al vacío <sup>4,5</sup>.

En la búsqueda de alternativas para mantener las características morfométricas iniciales para muestras con alto contenido de humedad, se han propuesto tratamientos físicos, químicos y ambos los cuales se han empleado para preservar y evitar el colapso de sus estructuras durante la aplicación del tratamiento hasta su análisis dentro del MEB, proporcionándole a la muestra las condiciones necesarias para tolerar los parámetros con los que opera el equipo y obtener imágenes de buena calidad <sup>1</sup>.

Entonces en el presente estudio se evaluará el efecto de distintos tratamientos físicos, físico-químicos tradicionales <sup>1,6</sup> y el líquido iónico acetato de 1 etil 3 metil imidazolio <sup>7,8</sup>, como tratamiento químico reciente, buscando mantener la calidad de una muestra orgánica que posee alta humedad y utilizada como material de recubrimiento para encapsulados, durante la preparación y dentro de la cámara de alto vacío de un MEB, proporcionándole las características necesarias para tolerar las condiciones en las que opera el equipo, además de monitorear las características morfométricas de las muestras antes y después de su respectivo análisis con el MEB, utilizando herramientas cuantitativas como es el análisis de imagen para modelar el proceso de preparación y mantener la estructura de las muestras <sup>9,10</sup>.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESÚMEN</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>ix</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>x</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>xi</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Microscopía electrónica</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.1. Fundamentos de la microscopía electrónica</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.2. Definición de la microscopía electrónica</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.3. Definición de Microscopía electrónica de barrido (MEB):</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.4. Componentes de un microscopio electrónico de barrido (MEB):</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.5. Parámetros instrumentales de MEB</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2. Preparación o tratamiento de muestras para MEB</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2.1. Tratamiento tradicional físico</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2.2. Tratamientos tradicionales físico-químicos</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2.3. Tratamiento reciente químico utilizando líquidos iónicos (LIs):</b> .....	<b>23</b>
<b>1.3. Encapsulación</b> .....	<b>27</b>
<b>1.3.1. Pared de encapsulados</b> .....	<b>27</b>
<b>1.4. Análisis de imagen</b> .....	<b>30</b>
<b>1.4.1. Definición y aplicaciones</b> .....	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>32</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1. Material biológico</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2. Materiales de laboratorio</b> .....	<b>32</b>
<b>2.3. Reactivos</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4. Equipos e instrumentación</b> .....	<b>33</b>
<b>2.5. Otros</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6. Metodología</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6.1. Determinación de las características morfométricas iniciales de las perlas de Alginato de calcio-mucilago de Salvia hispánica L. (chía), como muestra biológica de alta humedad a través del primer análisis de imagen ...</b>	<b>33</b>
<b>2.6.2. Comparación del efecto de los métodos de preparación física y físico-química tradicionales y química (líquidos iónicos) en la observación de muestras con alto contenido de agua en un microscopio electrónico de barrido a partir de un segundo y tercer análisis de imágenes sobre las características morfométricas</b>	

iniciales de las perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica L. (chía) durante la preparación de muestras .....	35
2.6.3. Establecimiento en las diferencias entre los métodos de preparación de muestras con tratamientos tradicionales (físicos y físico-químicos) y químicos (líquido iónico) que se observan por microscopía electrónica de barrido a través de un análisis cualitativo.....	43
2.6.4. Comparación del efecto de los métodos de preparación utilizando el líquido iónico y los tratamientos tradicionales sobre las características morfométricas iniciales y de textura de las perlas dentro del microscopio electrónico de barrido a través de un cuarto análisis de imagen.....	44
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>53</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
3.1. Obtención de perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica L. (chía), como muestra biológica de alta humedad y la determinación de las características morfométricas iniciales a través del primer análisis de imagen .	53
3.2. Comparación del efecto de los métodos de preparación en la observación de muestras con alto contenido de agua utilizando tratamientos tradicionales y un líquido iónico por microscopía electrónica de barrido a partir del segundo y tercer análisis de imágenes sobre las características morfométricas iniciales de las perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica (Chía) durante la preparación de muestras .....	55
3.2.1. Segundo análisis de imagen .....	55
3.2.2. Tercer análisis de imagen .....	62
3.3. Establecimientos en las diferencias entre los métodos de preparación de muestras con tratamientos tradicionales (físicos y físico-químicos) y químicos (líquido iónico) que se observan por microscopía electrónica de barrido a través de un análisis cualitativo .....	66
3.4. Comparación del efecto de los métodos de preparación utilizando el líquido iónico y los tratamientos tradicionales sobre las características morfométricas iniciales y de textura de las perlas dentro del microscopio electrónico de barrido a través de un cuarto análisis de imagen.....	76
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....</b>	<b>86</b>
<b>7. ANEXOS:.....</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1: Partes de un MEB convencional<sup>11</sup>.....</b>	<b>3</b>
<b>Figura 2: Diagrama de un cañón de electrones termoiónico convencional<sup>11</sup>.....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 3: Corte transversal de una lente electromagnética<sup>11</sup>.....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 4: Configuración de una lente magnética<sup>14</sup>.....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 5: Configuración de una lente óptica<sup>14</sup>.....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 6: Sistema de deflexión<sup>11</sup>.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 7: Señales producidas por la interacción del haz primario con un átomo de la muestra<sup>2</sup>.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 8: Volumen de excitación primaria y profundidad de penetración con sus respectivas señales<sup>15</sup>.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 9. Funcionamiento de un detector<sup>11</sup>.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 10: Fistema de evacuación de un MEB de emisión termoiónica<sup>14</sup>.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 11: Sistema de evacuación de un MEB de emisión de campo<sup>14</sup>.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 12: Parámetros instrumentales<sup>11</sup>.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 13. Estructura del líquido iónico acetato de 1 etil 3 metil imidazolio<sup>36</sup>.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 14: Tratamiento físico y físico-químico de una muestra según su naturaleza<sup>2</sup>.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 15: Modelo caja de huevo que se describe en el texto<sup>44</sup>.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 16. Sistema de réplicas.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 17. Selección de partículas para la aplicación del tratamiento 1 (t<sub>1</sub>).....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 18. Selección de perlas para la aplicación del tratamiento 2 (t<sub>2</sub>).....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 19. Selección de perlas para la aplicación del tratamiento 3 (t<sub>3</sub>).....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 20. Selección de perlas para la aplicación del tratamiento 4 (t<sub>4</sub>).....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 21. Selección de perlas de alginato de calcio-mucílago de salvia hispánica l. (chía) para la aplicación de líquidos iónicos (t<sub>5</sub>).....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 22. Preparación de las perlas con métodos tradicionales.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 23. Secuencia de preparación de perlas con el método de líquido iónico....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 24. Selección de perlas sin tratamiento (t<sub>0</sub>) para su respectivo análisis de imagen.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 25: Ajuste del umbral de imagen con el software imagej.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 26. Distribución del mucílago de chíá delimitada con círculos rojos en cada perla reticulada con iones calcio.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 27. Gráficos del segundo análisis de imagen i) diámetro de féret, ii) relación de aspecto y iii) circularidad.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 28. Interacción del acetato de 1etil 3 metil imidazolio con el agua<sup>37</sup>.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 29: co-reticulación de los polímeros que forman las perlas alginato de calcio-mucílago de salvia hispánica l (chía).....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 30. Gráficos del tercer análisis de imagen: i) diámetro de feret, ii) relación de aspecto y iii) circularidad.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 31. Visualización de las perlas de alginato de calcio-mucílago de salvia hispánica l. (chía) preparadas con líquido iónico (t<sub>5</sub>) y métodos tradicionales (t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub>, t<sub>3</sub> y t<sub>4</sub>).....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 32: microfotografías de las perlas de alginato de calcio-mucílago de salvia hispánica l. (chía) con tratamiento físico tradicional (t<sub>1</sub>).....</b>	<b>69</b>

**Figura 33. Microfotografías de perlas de alginato de calcio-mucílago de salvia hispánica l. (*chía*) con tratamiento físico-químico tradicional incorporando una solución fijadora primaria ( $t_2$ )..... 70**

**Figura 34. Microfotografías de perlas de alginato de calcio-salvia hispánica l. (*chía*) con tratamiento físico-químico tradicional incorporando una solución fijadora primaria y secundaria ( $t_3$ )..... 71**

**Figura 35: microfotografías de perlas de alginato de calcio-mucílago de salvia hispánica l. (*chía*) con tratamiento físico-químico tradicional incorporando una solución de tinción ( $t_4$ )..... 73**

**Figura 36. Microfotografías de perlas de alginato de calcio-mucílago de salvia hispánica (*chía*) tratadas con acetato de 1 etil 3 metil imidazolio..... 74**

**Figura 37. Análisis estadístico: i) diámetro de féret, ii) relación de aspecto y iii) circularidad..... 78**

**Figura 38. Gráficos del análisis de textura de las perlas de alginato de calcio-mucílago de salvia hispánica l. (*chía*): i) homogeneidad y ii) entropía..... 81**





## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1: Pistolas de emisión para MEB y sus características<sup>14</sup>.....</b>	<b>6</b>
<b>Tabla 2: Aplicaciones de las señales producidas por la dispersión de electrones<sup>2</sup>. 13</b>	<b>13</b>
<b>Tabla 3:Características morfométricas iniciales de las perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica L. (Chía). .....</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 4 Diámetro de feret máximo (mm) del Segundo análisis de imagen .....</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 5 Relación de aspecto del Segundo análisis de imagen.....</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 6 Circularidad del Segundo análisis de imagen .....</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 7 Diámetro de feret máximo (mm) del Tercer análisis de imagen .....</b>	<b>62</b>
<b>Tabla 8 Relación de aspecto del tercer análisis de imagen .....</b>	<b>63</b>
<b>Tabla 9 Circularidad del tercer análisis de imagen.....</b>	<b>63</b>
<b>Tabla 10 Diámetro de feret máximo (mm) del Cuarto análisis de imagen .....</b>	<b>77</b>
<b>Tabla 11 Relación de aspecto del Cuarto análisis de imagen .....</b>	<b>77</b>
<b>Tabla 12 Circularidad del Cuarto análisis de imagen .....</b>	<b>77</b>
<b>Tabla 13 Homogeneidad del análisis de textura de las perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica .....</b>	<b>80</b>
<b>Tabla 14 Entropía del análisis de textura de las perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica .....</b>	<b>80</b>

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. Microscopía electrónica

##### 1.1.1. Fundamentos de la microscopía electrónica:

En 1926 H. Busch, padre de la óptica electromagnética, presentó el diseño de un lente electromagnético, logrando enfocar un haz de electrones como lo hace una lente óptica con un rayo luminoso, esta aportación abrió el camino al diseño por parte de Ernest Ruska y Max Knoll del primer microscopio electrónico, consiguiendo en 1934 superar el poder resolutivo del microscopio óptico<sup>2</sup>, esto se logró con el estudio de los fundamentos de la microscopía electrónica como se señala a continuación:

La resolución está relacionada con la capacidad de distinguir detalles finos en una imagen y se define como la distancia en la cual dos puntos pueden ser reconocidos como dos objetos separados. El límite de resolución  $r$  en un microscopio electrónico teóricamente está determinado por la siguiente ecuación<sup>2</sup>:

$$r = \frac{0.61 * \lambda}{\alpha} \quad \dots \dots \dots eq. (1.)$$

Donde  $\alpha$  (rad) es el ángulo de desviación y  $\lambda$  (nm) es la longitud de onda que está relacionada con el voltaje de aceleración ( $V_r$ ) según la ecuación de longitud de onda de De Broglie, en términos de diferencia de potencial acelerada para un electrón, como se muestra a continuación:

$$\lambda = \frac{12.26}{\sqrt{V_r}} \quad \dots \dots \dots eq. (2.)$$

Donde  $\lambda$  esta en unidades de Å y  $V_r$  en eV

Estos dos grandes principios permitieron asociar a electrones en rápido movimiento con una radiación de longitud de onda corta, de acuerdo con la teoría cuántica de Max Planck y la teoría de la relatividad de Albert Einstein, que fue demostrado por De Broglie, donde una partícula moviéndose a una velocidad cercana a la velocidad de la luz tenía una forma de radiación asociada con ella. Esta relación está expresada por la ecuación de longitud de onda de De Broglie:

$$\lambda = \frac{h}{m * v} \quad \dots \dots \dots eq. (3.)$$

Donde  $h$  es la constante de Planck ( $6.63 \cdot 10^{-34} J \cdot s$ ),  $v$  la velocidad de la partícula ( $m \cdot s^{-1}$ ) y  $m$  la masa de la partícula ( $kg$ ).

Si la partícula es un electrón y su velocidad  $1/3$  de la velocidad de la luz, entonces  $\lambda = 0.05 \text{ \AA}$ , la resolución de un microscopio que emplee este tipo de radiación será mucho mejor que la de un microscopio de luz.

Con base en los fundamentos antes descritos se generaron los principios que definen a la microscopía electrónica<sup>2</sup>.

### **1.1.2. Definición de la microscopía electrónica:**

Es una técnica en la cual una nube de electrones es acelerada en presencia de vacío mediante la aplicación de un voltaje de aceleración, estos serán alineados y enfocados con lentes electromagnéticas formando una sonda fina y ésta será direccionada hasta interactuar con una muestra.

### **1.1.3. Definición de Microscopía electrónica de barrido (MEB):**

Cuando el haz de electrones o sonda es enfocado sobre la muestra y se escanea a lo largo de un patrón de líneas paralelas se conocerá como microscopía electrónica de barrido (MEB). Un generador de barrido es el responsable de producir el movimiento del haz, de manera que barre la muestra punto a punto. Se generan varias señales como resultado de esta interacción, que se recolectarán para formar una imagen en una pantalla; la cual se formará según los detectores específicos para cada una de las señales<sup>2,3</sup>.

El detector capta esta información y las convierte en una señal electrónica que es proyectada en una pantalla con un tubo de rayos catódicos (CRT). El barrido del haz está sincronizado con el barrido de CRT y produce una relación uno a uno entre puntos de la muestra y puntos en el CRT<sup>2</sup>.

### **1.1.4. Componentes de un microscopio electrónico de barrido (MEB):**

En la Figura 1, se muestran los dos componentes principales de un MEB: La columna de electrones y la consola de control. La primera consta de un cañón de electrones, lente electromagnética, bobinas de deflexión, lente óptica, detectores y sistema de vacío.

La consola de control consta de una pantalla de visualización de tubo de rayos catódicos (CRT), las perillas y el teclado de la computadora que controlan el haz de electrones<sup>11</sup>.

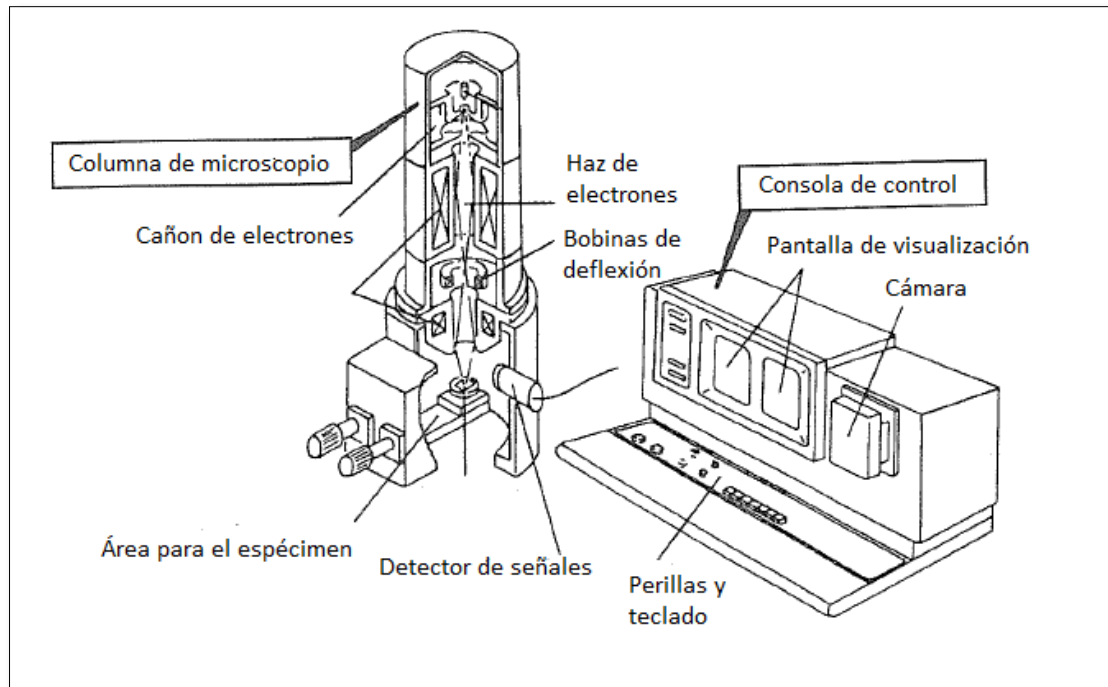


Figura 1: Partes de un MEB convencional<sup>11</sup>.

#### 1.1.4.1. Cañón de electrones:

El propósito de la pistola o cañón es proporcionar un haz estable de electrones de energía ajustable y debe reunir ciertos requerimientos, entre ellos que produzca un alto brillo y tenga alta estabilidad<sup>2</sup>. El más común consta de tres componentes: un filamento que actúa como cátodo (electrodo negativo), la tapa o rejilla de Webnelt (electrodo de control) y el ánodo (electrodo positivo), como se observa en la Figura 2. Estos componentes se mantienen a diferentes voltajes eléctricos mediante conexiones apropiadas al suministro de alto voltaje, que varía en el rango de 0.1-30 kV<sup>11</sup>.

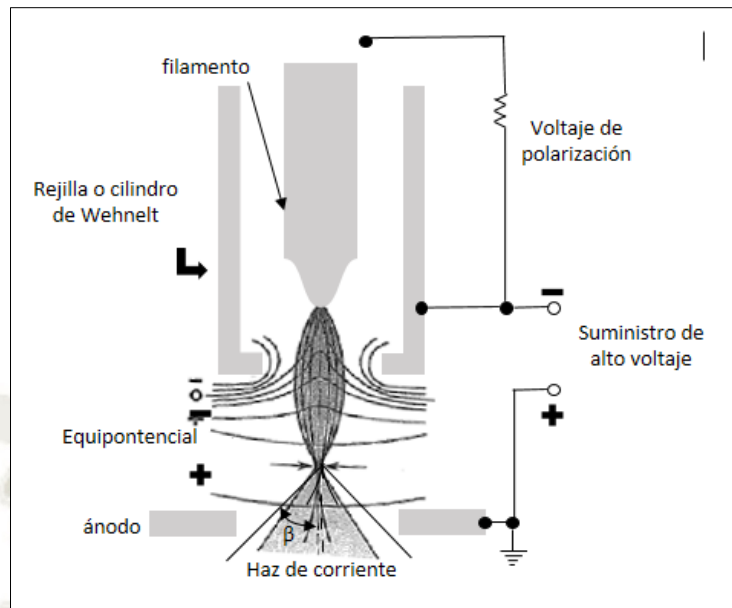


Figura 2: Diagrama de un cañón de electrones termoiónico convencional<sup>11</sup>.

A través del filamento (Figura 2) se hace circular una alta corriente para calentarlo, a temperaturas entre 2000 y 2700 K lo que provoca el desprendimiento de electrones, los cuales forman una nube alrededor del filamento. Mediante la aplicación de un elevado voltaje al ánodo, los electrones son direccionados desde la nube y atraídos hacia esta terminal.

La tapa o rejilla es para controlar la cantidad de electrones emitidos y enfocarlos dentro de la pistola, además está conectada al filamento por una resistencia variable, por esta se generará una polarización negativa entre el filamento y la rejilla. En la Figura 2 se trazan líneas con potencial de campo electrostático constante (equipotencial) que varían de negativo, cero y positivo, los electrones se mueven hacia potenciales positivos, dejando al filamento solo donde las líneas positivas del campo se encuentran con la superficie del filamento.

El voltaje de polarización provoca una alta curvatura en los equipotenciales cerca del agujero de la rejilla, produciendo una acción de enfoque en los electrones emitidos. Esto los obliga a realizar un cruce de diámetro y crear un ángulo de divergencia ( $\beta$ ) entre la rejilla y el ánodo.

Los electrones emitidos en la pistola se aceleran desde el alto potencial negativo del filamento (por ejemplo, -20,000 V) hasta el potencial de tierra (0 V) en el ánodo. Un agujero en el ánodo permite que una fracción de estos electrones avance por la columna hacia las lentes<sup>11</sup>.

Se utilizan varios tipos de pistolas de electrones en un microscopio electrónico de barrido comerciales, los más comunes son las de tipo termoiónica, las de campo y las de clase Schottky.

Bogner et al. 2007<sup>12</sup>, informó que la primera y más extendida fuente de electrones fue la pistola termoiónica. Un grupo consiste en un filamento de tungsteno (W) doblado como una horquilla en forma de “V”, con un radio en la punta de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , este tiene una temperatura de fusión suficientemente alta (3650 K), lo que permite que el material soporte temperaturas elevadas por más tiempo (~2600~3000 K); entonces cuando se calienta con el paso de la corriente eléctrica hasta aproximadamente 2700 K genera espontáneamente electrones termoiónicos. Esta fuente tiene la ventaja de ser económica y requerir un vacío relativamente bajo, sin embargo, la vida útil de los cátodos de W se limita a 100 h aproximadamente debido a la evaporación del material y en consecuencia volviéndose más delgado en algunas partes.

Otro grupo de emisor termoiónico son los de hexaborato de lantano ( $\text{LaB}_6$ ); este tiene una función de trabajo inferior comparado con el primer grupo, lo que significa que pueden emitir la misma cantidad de electrones a una temperatura de calentamiento más baja. Y dependiendo de la nitidez de la punta, llegan a exhibir un brillo de 5 a 10 veces más que la de un filamento de tungsteno, además su vida útil es 10 veces mayor<sup>13</sup>.

En cuanto a las pistolas de campo, estas utilizan un proceso de tunelización mecánica cuántica al acercarse a un electrodo de extracción con polarización positiva para la emisión de electrones.

Existen dos tipos de fuentes de emisión de campo: emisión de campo frío (CFE) y emisión de campo térmico (TFE), incluida la emisión de campo Schottky (SFE). En la CFE, el alto campo eléctrico hace que los electrones atraviesen la barrera de potencial y dejen el cable del cátodo a temperatura ambiente. Los electrones se emiten desde una fuente virtual con un área de solo unos pocos nanómetros de diámetro. Los TFE son similares en principio, pero operan a una temperatura más alta. Esto ayuda a mantener una punta limpia, reducir el ruido y la inestabilidad. El principal beneficio de estas fuentes de emisión de campo es la obtención de un brillo más alto. Este es un límite fundamental para la resolución en MEB, ya que determina la corriente disponible en un tamaño de sonda determinado y establece el tiempo de grabación por píxel de la imagen. Además del alto brillo, las pistolas de emisión de campo muestran otra ventaja importante: la

fente virtual es pequeña, generalmente en un rango de 5–25 nm. La óptica requerida hacia desmagnificar esta sonda para observaciones de alta resolución se simplifica, por lo tanto, en comparación con el caso de los emisores termoiónicos, donde el tamaño de fuente efectivo es del orden de 5  $\mu\text{m}$ , se produce una baja desmagnificación lo que contribuye a reducir las aberraciones de la lente<sup>12</sup>.

En la Tabla 1 se muestran las principales características de las fuentes de emisión que se usan en MEB:

Tabla 1: Pistolas de emisión para MEB y sus características<sup>14</sup>.

<b>Tipo de pistola de electrones</b>	<b>Horquilla de tungsteno</b>	<b>LaB<sub>6</sub></b>	<b>Emisión de campo</b>	<b>Schottky</b>
Material del cátodo.	Tungsteno	Cristal de hexaborato de lantano	Tungsteno	Cristal de tungsteno solo/óxido de Zirconio
Calentamiento del cátodo (K).	2600	1800	Temperatura ambiente	1700 a 1800
Función de trabajo del cátodo (eV).	4.4	2.6 a 2.7	4.1	2.7 a 2.9
Diámetro de la fuente de electrones.	30 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$	5 nm	20 nm
Brillo (A/cm <sup>2</sup> *sr.).	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>
Ancho de energía (eV)	2.0	1.5	0.2	0.3 a 1.0
Presión de trabajo (Pa).	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>
Tiempo de vida del cátodo.	~50 horas	~1000 horas	1 año o más	~9 meses

#### 1.1.4.2. Lentes electromagnéticas:

Una lente electromagnética está constituida por un cilindro anular de hierro dulce (pieza polar) el cual está rodeado por una bobina de cobre y una envoltura de hierro dulce, como se muestra en la Figura 3. Al circular una corriente por los enrollamientos de la bobina, se genera un campo magnético en el espacio anular de la pieza polar<sup>11</sup>.

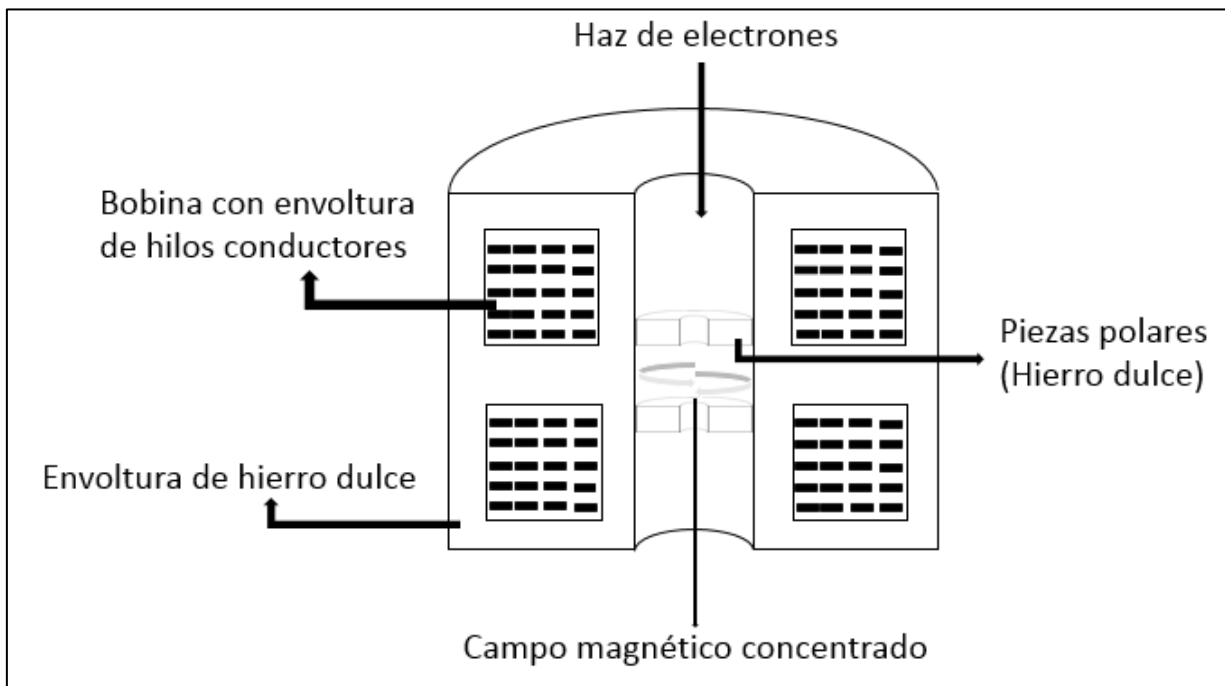


Figura 3: Corte transversal de una lente electromagnética<sup>11</sup>.

En la Figura 4 se observa que los electrones al llegar a la lente virtual o magnética, son influenciados por este, siguiendo una trayectoria helicoidal alrededor del eje óptico de tal manera que convergen, el movimiento no afecta las condiciones de focalización y pueden aplicarse las mismas leyes ópticas que rigen los diagramas de rayos de microscopía de luz (2), resultando una imagen reducida del haz en el plano de la imagen. El ángulo de apertura se determina geoméricamente a partir del diámetro de apertura y la distancia focal, el mismo tiene una gran influencia en las características de la lente, como las aberraciones y la profundidad focal<sup>2,14</sup>.



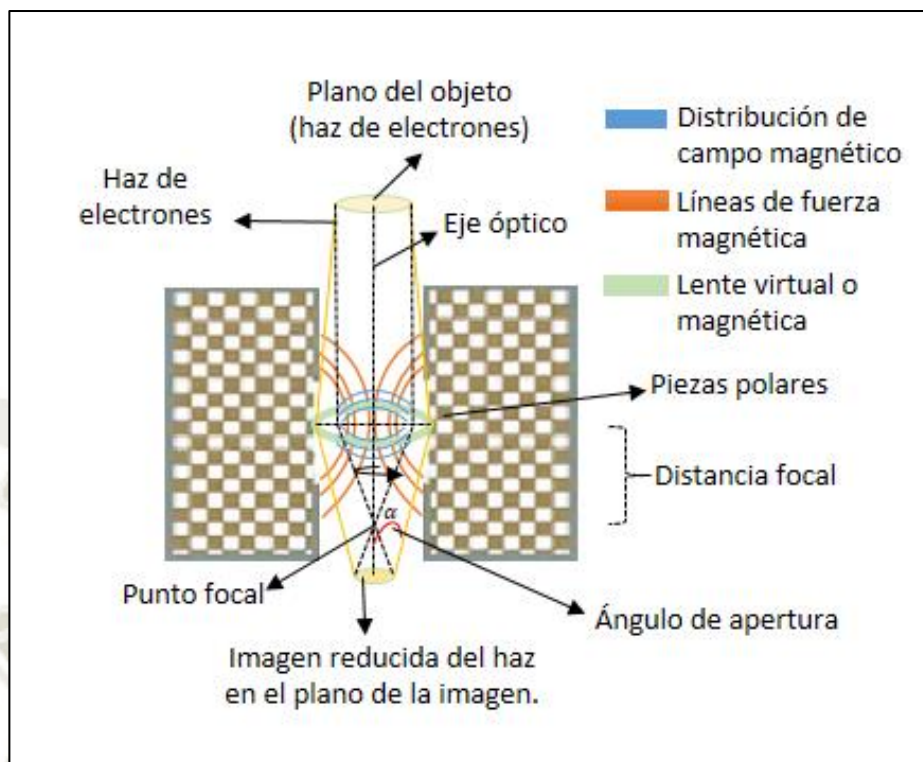


Figura 4: Configuración de una lente magnética<sup>14</sup>.

La amplificación de la lente está controlada por la intensidad y la variación de corriente permitiendo modificar la distancia focal.

La distancia focal puede cambiarse variando la corriente que circula por los enrollamientos de la bobina. A medida que incrementamos la corriente que pasa por la bobina, se incrementa el campo magnético, las lentes se hacen más potentes y la longitud focal decrece<sup>2</sup>.

#### 1.1.4.3. Lentes objetivos:

El lente objetivo toma la imagen reducida de la primera lente y se convierte en su haz de electrones contribuyendo a una desmagnificación adicional, como se muestra en la Figura 5; entonces esta es la lente final en la columna del MEB que enfocará a los electrones en la superficie de la muestra<sup>11</sup>.

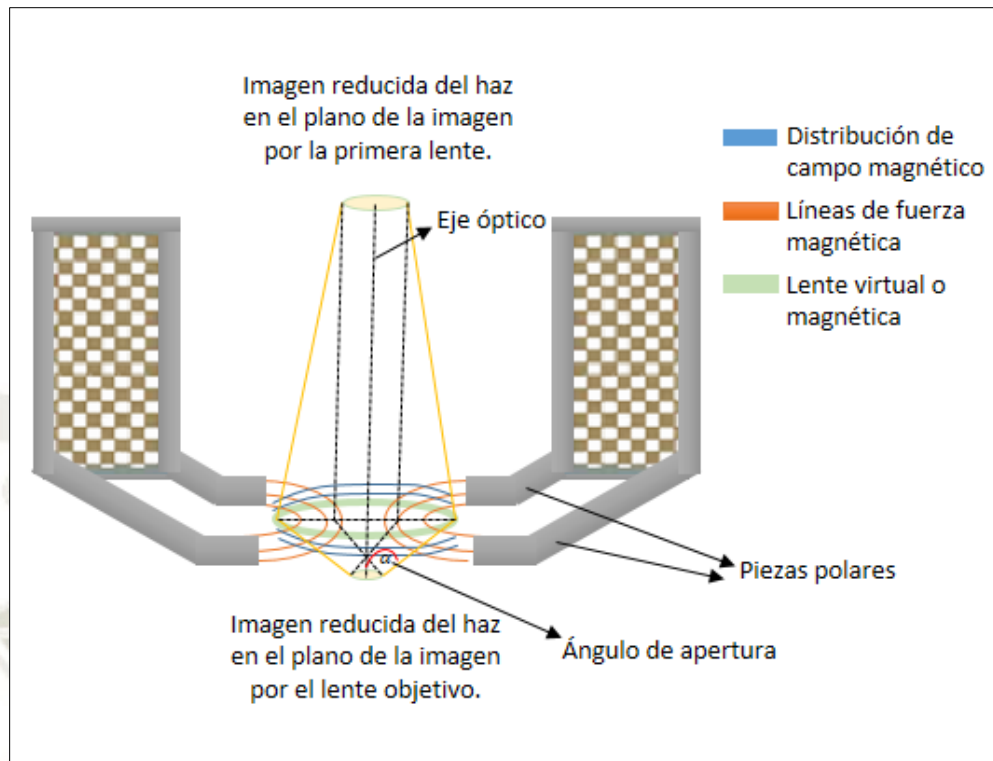


Figura 5: Configuración de una lente óptica<sup>14</sup>.

#### 1.1.4.4. Bobinas o sistemas de deflexión:

El sistema de desviación hace que el haz se mueva hacia una serie de ubicaciones contraladas a lo largo de una línea y luego a lo largo de otra debajo de la primera, y así sucesivamente, hasta que se genere un ráster rectangular en la muestra. Simultáneamente, el mismo generador de escaneo crea un ráster similar en la pantalla de visualización. Se utilizan dos pares de bobinas de desviación electromagnética (bobinas de exploración) para barrer con el haz a través de la muestra, como se observa en la Figura 6. El primer par de bobinas desvía el haz del eje óptico del microscopio y el segundo par dobla el haz de nuevo sobre el eje en el punto de giro de la exploración. El aumento de la imagen es la relación entre la longitud del ráster en la pantalla de visualización y la longitud correspondiente del ráster en la muestra. Por ejemplo, un ráster de 100  $\mu\text{m}$  de ancho en el espécimen que se muestra en una pantalla de visualización de 10 cm de ancho genera una imagen de 1000X aumentos. Cuando se necesita un aumento en la ampliación de la imagen, las bobinas de exploración se excitan con menos fuerza, de modo que el haz se desvía a través de una distancia más pequeña en la muestra. Teniendo en cuenta que el tamaño del ráster en la muestra también depende de la distancia de trabajo, la distancia desde la muestra hasta la parte inferior de la lente final<sup>11</sup>.

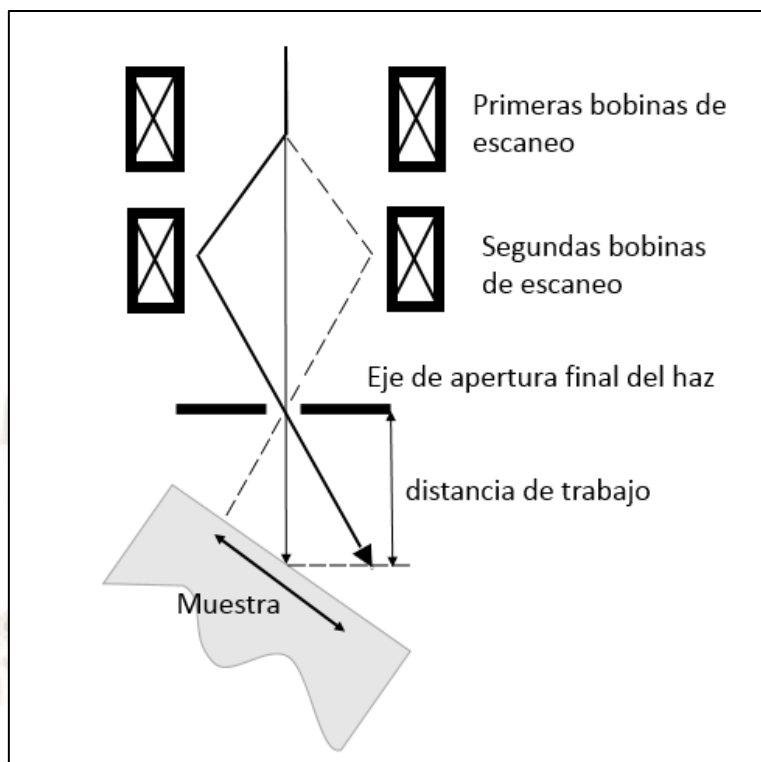


Figura 6: Sistema de deflexión<sup>11</sup>

#### 1.1.4.5. Señales y detectores:

##### 1.1.4.5.1. Señales:

Una vez que el lente objetivo enfoca el haz de electrones, estos interactúan con los electrones y el núcleo de los átomos de la muestra produciendo una dispersión o señales, las cuales serán captadas por detectores<sup>2,11</sup>. Existen dos tipos de dispersión (o scattering):

- i. Dispersión elástica
- ii. Dispersión inelástica

La primera es un proceso en el cuál un electrón incidente, puede cambiar su dirección, sin pérdida apreciable de energía. Este cambio se da por las interacciones de tipo Coulómbicas entre un electrón incidente, el núcleo y los electrones del átomo. La probabilidad de dispersión elástica aumenta fuertemente con el número atómico  $Z$ , porque los átomos más pesados tienen una carga positiva mucho más fuerte en el núcleo atómico, y disminuye a medida que aumenta la energía electrónica<sup>2,11</sup>.

La segunda consiste en que un electrón incide sobre un átomo y pierde parte de su energía, a menudo ionizando los átomos de la muestra, pero no sufre cambios significativos en su dirección. Si la interacción inelástica tiene lugar entre el núcleo y un electrón de alta energía, el electrón primario perderá parte de su energía cinética debido al efecto de

frenado que ejerce el campo coulombico del núcleo atómico, provocando también una disminución de su velocidad desviando su trayectoria en un pequeño ángulo. En cambio, si el electrón incidente interactúa con un electrón del átomo, entonces sus energías se distribuyen. La energía con la que impacta el electrón incidente se distribuye de manera que una parte es absorbida por la muestra y la otra generará señales como; rayos X, electrones secundarios, luz visible, electrones Auger.

En la Figura 7 se observa las señales que se generan por la interacción de los electrones primarios y los átomos de la muestra<sup>2</sup>.

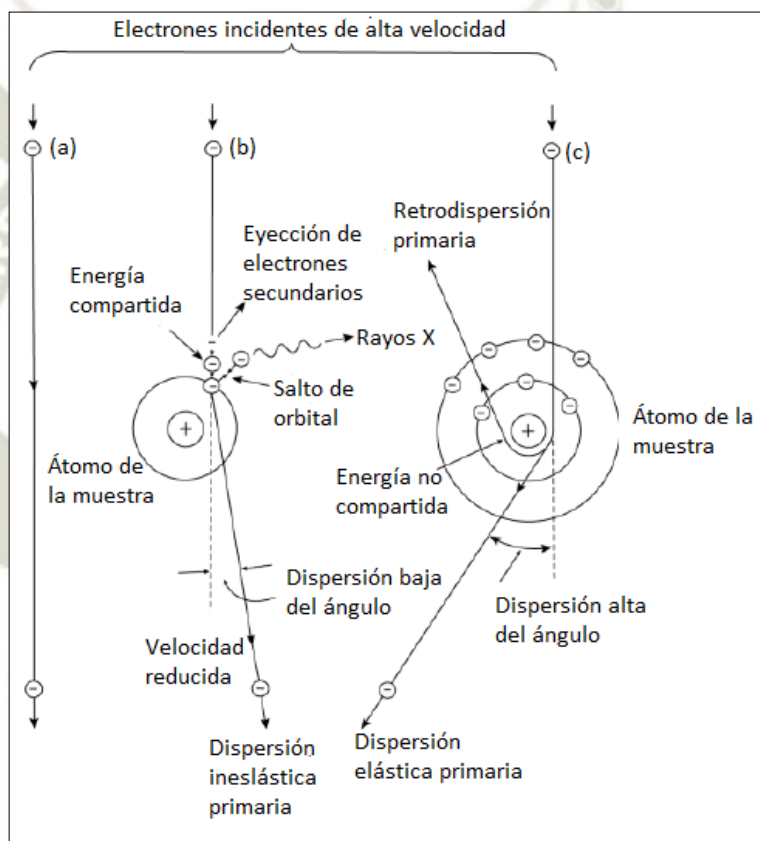


Figura 7: Señales producidas por la interacción del haz primario con un átomo de la muestra<sup>2</sup>.

Todas las señales resultan de un volumen de excitación primaria que se formó debido a la interacción de electrón con el espécimen (Figura 8); los electrones incidentes penetran a una profundidad que es directamente dependiente de la energía del haz e inversamente subalterno al número atómico de la muestra.

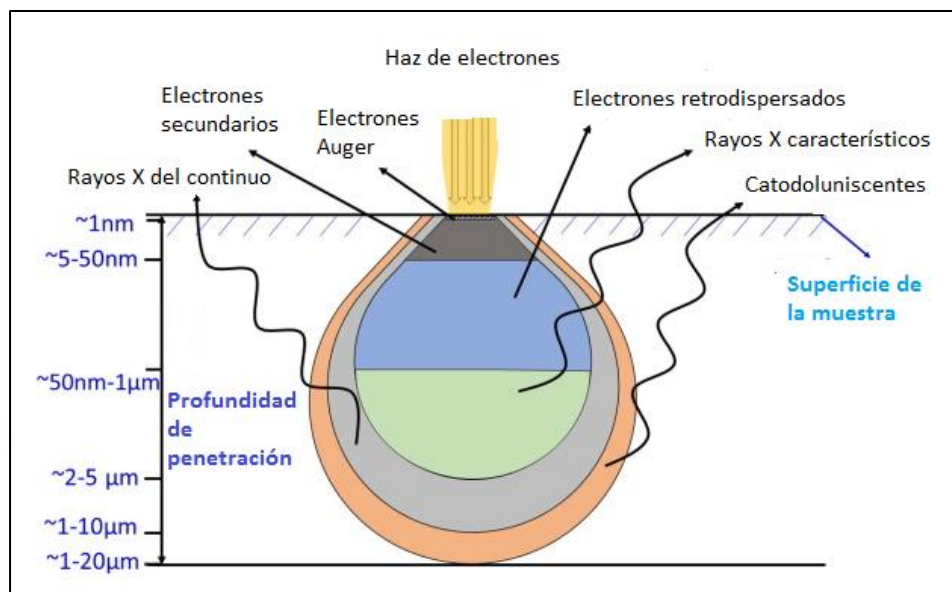


Figura 8: Volumen de excitación primaria y profundidad de penetración con sus respectivas señales<sup>15</sup>.

Los electrones generados presentan características diferentes como se describe a continuación:

**Electrones secundarios:** Emergen de los átomos de la muestra que se liberan a través de la ionización. Son relativamente bajos en energía  $< \sim 25$  eV y tienden a escapar sólo de las decenas de nanómetros superiores de la superficie. Proporcionan imágenes topográficas fuertes de superficies

**Electrones retrodispersados:** Proviene de las interacciones elásticas y, por lo tanto, tienen energías cercanas a la del haz incidente. La fuerza de la dispersión que puede devolver los electrones a la superficie depende en gran medida del número atómico  $Z$ , por lo que las imágenes de electrones retrodispersados proporcionan un contraste de composición, así como topográfico.

**Rayos X característicos:** Este tipo de señal; se produce cuando un electrón de un orbital interno de un átomo es desalojado por un electrón del haz incidente (descomposición de los átomos ionizados). La vacancia es llenada con un electrón de un orbital más externo. En este salto el exceso de energía es liberado en forma de radiación electromagnética (rayos X). Puede proporcionar tanto una identificación cualitativa como información elemental cuantitativa de las regiones de una muestra<sup>2,11,15</sup>.

**Electrones Auger:** Cuando un electrón de una capa externa llena una vacancia de una capa más interna, el exceso de energía puede inducir la eyección de un electrón de una órbita

externa; convirtiendo esta energía en energía cinética. Este es más alta en elementos de bajo número atómico debido a que los electrones están débilmente ligados al núcleo.

Catodoluminiscencia: Es la emisión de fotones en longitudes de onda en los rangos del ultravioleta, visible o infrarrojo, para disipar el exceso de energía que se genera en la transición electrónica entre orbitales. Esta técnica permite realizar estudios de concentración de impurezas en un material<sup>2,15</sup>.

La energía del fotón de rayos X emitido es característica del elemento ionizado, por lo que la espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX) permite el mapeo de las especies de elementos<sup>13</sup>.

En la Tabla 2 se observa un resumen de las aplicaciones para las principales señales<sup>2</sup>.

Tabla 2: Aplicaciones de las señales producidas por la dispersión de electrones<sup>2</sup>.

<b>interacción</b>	<b>Señal</b>	<b>Aplicación</b>
$e^-$ . Incidente / $e^-$ del núcleo	$e^-$ . Secundarios	Morfología superficial
$e^-$ . Incidente / núcleo	$e^-$ . Retrodifundido	Contraste por número atómico. . Contraste topográfico.
$e^-$ . Incidente / Vacancias	Cátodo luminiscencia Rayos X 1967 Electrones Auger	Concentración de impurezas.  Composición elemental.  Composición superficial.

#### 1.1.4.5.2. Detectores:

La electrónica del sistema de detección convierte todas estas señales en cambios de intensidad punto por punto en la pantalla de visualización y produce una imagen. Las dos señales más utilizadas para producir imágenes en MEB son electrones secundarios (SE, por sus siglas en inglés) y retrodispersados (BSE, por sus siglas en inglés). El detector estándar Everhart-Thornley (ET) y el detector de estado sólido (vCD) recogen este tipo de señales. En el caso del detector ET, los SE y BSE se recolectan cuando se aplica un voltaje positivo a la pantalla de un colector frente al detector. Los electrones capturados

por el centelleador/fotomultiplicador se amplifican para ser mostrados con el tubo de rayo catódico de visualización<sup>15</sup>.

En el caso de los BSE de baja energía y SE es necesario aplicar un gran potencial positivo (+10 kV a +12 kV) a un revestimiento de metal delgado en la cara del centelleador (objetivo de plástico o vidrio dopado, o un compuesto cristalino como  $\text{CaF}_2$  dopado con europio) para acelerarlos y que adquieran energía suficiente de modo que generan luz en este. Este gran potencial podría desviar y distorsionar el haz en la cámara de muestra, para evitar esto el centelleador está rodeado por una jaula de Faraday. El cual recolectará los electrones de baja energía con mayor eficiencia geométrica que simplemente recolectando la fracción definida por el ángulo sólido de la línea de visión, aplicando un potencial de polarización separado en la jaula, el cual tiene un rango de -50 V a +250 V que se pueden seleccionar, este rango de negativo a positivo ofrece la posibilidad de rechazar por completo los electrones secundarios (-50 V) o recogerlos eficientemente (+250 V). Mostrando así una ventaja en el detector por sus dos condiciones de polarización. En caso de los electrones retrodispersados no es necesario aplicar un gran potencial ya que estos transportan suficiente energía, 10 a 30 keV, para excitar directamente el centellador<sup>11</sup>.

Entonces una vez que se emite luz, esta se conduce por reflexión interna total en una varilla sólida de plástico o vidrio (tubo de luz) a un fotomultiplicador. Esta señal puede pasar a través de una ventana de cristal de cuarzo (fotocátodo), que forma una barrera de vacío, hacia el primer electrodo de un fotomultiplicador. En este fotocátodo, los fotones se convierten de nuevo en electrones, y estos se aceleran en los electrodos sucesivos (dinodos) del fotomultiplicador, produciendo una cascada cada vez mayor de electrones hasta que se alcanza el colector final. La ganancia típica del fotomultiplicador es ajustable seleccionando el voltaje en los electrodos. El proceso de fotomultiplicación proporciona alta ganancia con poca degradación de ruido y un alto ancho de banda<sup>11</sup>.

La Figura 9 muestra el funcionamiento de un detector de Everhart-Thornley después de una dispersión<sup>11,15</sup>.

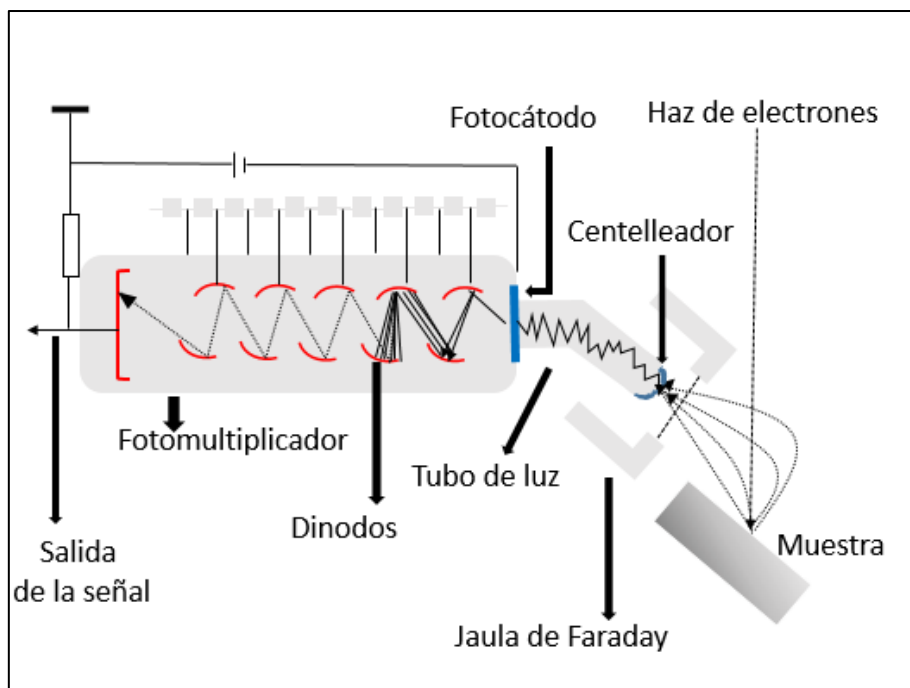


Figura 9. Funcionamiento de un detector<sup>11</sup>.

#### 1.1.4.6. Sistema de vacío:

La columna del microscopio electrónico y la cámara de muestra requieren ser evacuados, para libre desplazamiento de los electrones y por seguridad del equipo.

En el segundo caso si se presentan moléculas de gas entre el filamento y el ánodo pueden convertirse en iones cargados positivamente. Estos iones pueden aumentar la conductividad en el espacio filamento-ánodo lo suficientemente para provocar descargas eléctricas discontinuas, en lugar de un haz de electrones estable o continuo. La vida del filamento disminuye cuando el vacío es ineficiente; tanto el bombardeo de iones positivos como la oxidación los debilitan<sup>16,17</sup>.

Con los MEB que utilizan pistolas termoiónicas, como se muestra en la Figura 10; el sistema se evacúa mediante una bomba de difusión de aceite (ODP, por sus siglas en inglés) o una bomba turbo molecular (TMP, por sus siglas en inglés), las cuales mantienen el sistema bajo una presión controlada de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  Pa, también se utiliza una bomba de respaldo o bomba rotativa de aceite (ORP) para la evacuación previa al intercambio de muestras y posterior con el fin de mantener baja la contrapresión de ODP/TMP. La bomba de difusión puede trabajar eficientemente sólo cuando la presión inicial del gas es reducida por la bomba ORP.



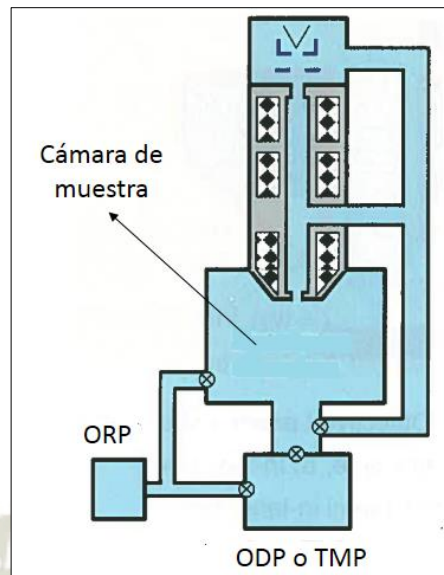


Figura 10: Sistema de evacuación de un MEB de emisión termoiónica<sup>14</sup>.

En el caso de microscopios electrónicos con pistolas de emisión de campo; (Figura 11), además de usar estas fuentes de evacuación utilizan las bombas de iones de sputter (SIP), para mantener limpia la superficie de la fuente de electrones a un nivel atómico, alcanzando un vacío ultra alto de alrededor de  $10^{-8}$  Pa. En estos MEB la columna que contiene la trayectoria del haz de electrones posee un número de pequeños compartimentos divididos conectados por medio de orificios, y se utiliza un mecanismo de evacuación diferencial para aumentar gradualmente la presión hacia la cámara de muestras. Esto permite mantener constante la presión de la pistola de electrones incluso si la presión en la cámara de la muestra varía<sup>14,16,17</sup>.

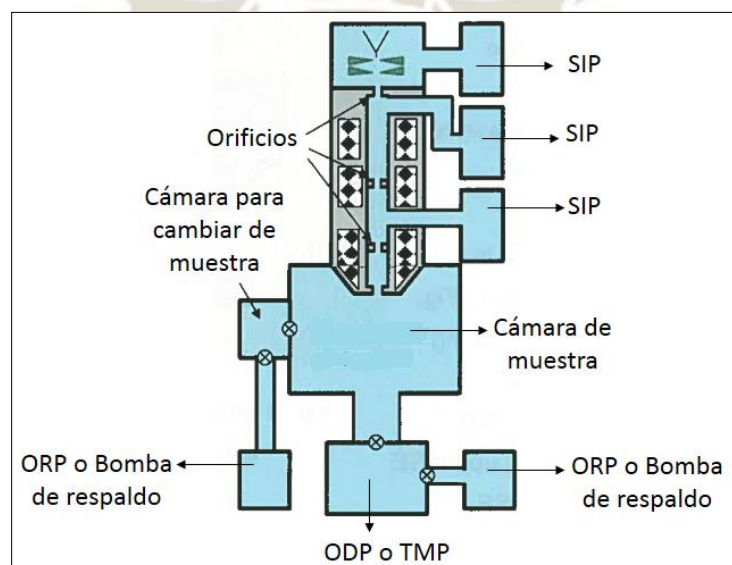


Figura 11: Sistema de evacuación de un MEB de emisión de campo<sup>14</sup>.

#### 1.1.4.7. Controles del operador:

Los primeros controles que un operador debe dominar son aquellos que controlan la creación del haz de electrones como, el voltaje de aceleración y la corriente de emisión, de los lentes (la primera lente determina tanto la cantidad de corriente de haz disponible como el tamaño mínimo de su diámetro), y el control del lente objetivo permite enfocar el haz de manera que el diámetro más pequeño se ubique exactamente en la superficie de la muestra. Finalmente, debido a que algunas ubicaciones en la superficie de la muestra pueden aparecer demasiado claras u oscuras en la pantalla de visualización, se proporcionan controles de señal, contraste marcado (o "nivel oscuro") y brillo para recortar o expandir la intensidad mostrada hasta que se obtenga una imagen razonable. Esta se muestra en la pantalla de visualización<sup>11</sup>.

#### 1.1.5. Parámetros instrumentales de MEB:

La resolución final alcanzada en MEB se controla optimizando los parámetros instrumentales y la preparación de muestras. De acuerdo con Southworth 1975<sup>11</sup>, estos dependerán de la nitidez limitante y la visibilidad característica de las microfotografías de MEB, dichos parámetros son: el tamaño del haz, su intensidad de corriente con la que viaja, el ángulo de convergencia y el voltaje de aceleración del haz de electrones; como se muestra en la Figura 12:

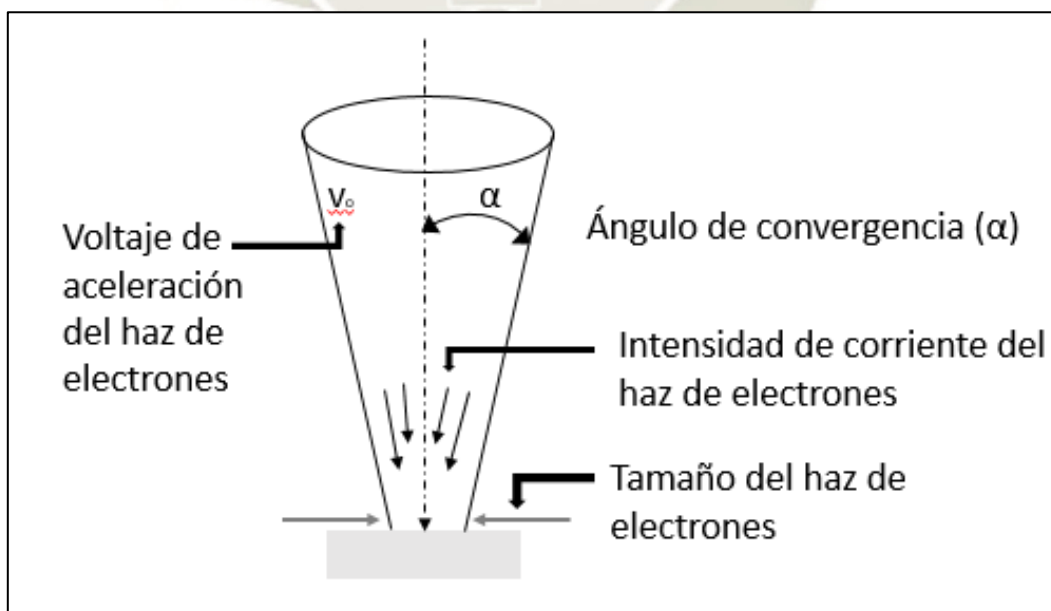


Figura 12: Parámetros instrumentales<sup>11</sup>.

## 1.2. Preparación o tratamiento de muestras para MEB:

De acuerdo con los fundamentos con los que opera el microscopio electrónico, la muestra debe presentar ciertas características para ser analizada como: tolerar el alto vacío, el cual es necesario para un camino libre en la trayectoria del haz, ser térmicamente estable y producir una alta dispersión de electrones (propiedad conductora).

Las muestras inorgánicas en su mayoría cumplen con estas condiciones, pero las muestras orgánicas y biológicas no, debido a que generalmente están compuestas de material frágil, no conductor y térmicamente sensible. Por lo anterior la preparación de la muestra es fundamental para evitar los cambios en la estructura manteniendo la calidad de la muestra con el fin de obtener información correcta de lo observado en el microscopio, para lo cual se han realizado diferentes estudios respecto a este tema, un claro ejemplo sucedió en 1934 donde Bill Marton (Bruselas) montó técnicas de preparación de muestras, consiguiendo las primeras microfotografías de modelos biológicos, en este estudio observó que había aumentado el contraste, entonces interpretó que era debido a la dispersión de electrones y no a la absorción después de la interacción electrón-espécimen. Con este descubrimiento se iniciaron las primeras técnicas de preparación en modelos biológicos, obteniendo microfotografías a través de la dispersión de electrones<sup>2</sup>.

Es importante destacar que las muestras biológicas que quieran ser analizadas con un MEB deben ser secadas antes de ser introducidas en el microscopio, de otro modo la baja presión del equipo causará que el agua (y otros líquidos volátiles) se evapore saliendo violentamente del espécimen, alterando la estructura<sup>1</sup>.

Existen diferentes técnicas para mantener la estructura de las muestras biológicas intacta dentro de un MEB; estos pueden ser métodos físicos, físico-químicos y químicos. Aunque el primero puede ser el método preferido para la preservación óptima del estado nativo, requiere una instrumentación costosa y habilidades avanzadas<sup>1</sup>.

### 1.2.1. Tratamiento tradicional físico:

La liofilización y secado en punto crítico (CPD, por sus siglas en inglés) son los métodos más usados para preservar la estructura del espécimen, ya que aparte de secarlas permiten un recubrimiento conductivo inmediato lo que proporciona una carga reducida y mejoras en el contraste. Se ha observado que estas pueden provocar daños en la muestra como aparición de grietas y contracciones hasta un 50% en el caso de la primera, mientras que

la segunda puede causar distorsiones y daños por la formación de cristales de hielo. Otros métodos poco comunes son la congelación instantánea o la congelación a alta presión, a menudo son utilizadas para reducir la formación de cristales de hielo<sup>4</sup>.

El CPD es el método más comercial, se conoce como punto crítico al estado particular de un gas en el cual todavía puede sufrir licuefacción. Este estado viene determinado por la presión y temperatura crítica, por encima de este punto el gas no puede experimentar licuefacción, debido a que el límite entre la fase gaseosa y líquida ha desaparecido: en este punto ambos estados son igualmente densos. El principio de esta técnica está en que una muestra orgánica hidratada (polímeros hidrogeles, almidón, etc.) o biológica (células, tejidos, sangre, parásitos, espermatozoides, entre otros) será previamente tratada con diferentes solventes como el etanol o acetona para que el fluido inicial contenido en la muestra sea desplazado con el fin de mantener la microestructura inicial del estado hidratado<sup>18</sup>.

### 1.2.2. Tratamientos tradicionales físico-químicos:

Este método incluye varios pasos que incorporan una fijación con soluciones químicas, su posterior secado de punto crítico y recubrimiento con metales, a continuación se describe este método:

#### Pretratamiento

En algunas muestras se requieren lavados y eliminación de componentes, con el fin de exponer una región de interés ya sea a través de métodos químicos o mecánicos, otras requieren un etiquetado para la identificación de elementos no visibles, por ejemplo el etiquetado inmunológico<sup>9</sup>.

#### Fijación:

Los fijadores químicos pueden ser compuestos orgánicos e inorgánicos, los cuales estabilizan estructuras, las preparan para posteriores tratamientos, conservan o provocan determinadas reacciones químicas, mantienen las propiedades físicas y aumentan la conductividad al espécimen. Algunas muestras requieren de dos fijaciones y cuando es así, se conocerán como fijación primaria y post-fijación o fijación secundaria estos se preparan en soluciones previamente tamponados<sup>1</sup>.

Los aldehídos son utilizados como fijadores primarios ya que conservan principalmente proteínas y otras macromoléculas asociadas con proteínas, por ejemplo, las lipoproteínas

y las histoproteínas asociadas con el ADN. El Glutaraldehído (GA) sigue siendo el fijador primario más utilizado y es un fuerte agente de reticulación de proteínas, en el caso de materiales densos pueden fijarse mejor si se agrega paraformaldehído (PFA) fresco junto con GA. Aunque PFA no se entrecruza tan rápido como GA, su forma de penetrar los tejidos es más acelerada<sup>1,19</sup>.

Otro ejemplo de fijador primario es el N,N'Diciclohexilcarbodiimida (DCCD), el cual es un reticulante que se usa para muestras con alto contenido de polisacáridos<sup>1</sup>. En estudios anteriores se utilizó este compuesto como un precursor polimérico<sup>20</sup>, de modo que interacciona con grupos carboxilo para entrecruzarlos.

En la literatura se reportaron resultados que demostraron que la incorporación de aminas en las soluciones fijadoras mejora la conservación estructural de biomoléculas sensibles, un ejemplo de amina es la lisina. Cuando se incorporó lisina a una solución fijadora primaria con aldehídos produjo las mejores imágenes de filamentos de actina pura. La lisina tiene la capacidad de formar polímeros grandes, los cuales pueden controlarse mediante la temperatura de fijación, la duración de la fijación, la relación y concentración de amina y reticulante, conservando y mejorando la visibilidad de ciertas estructuras lábiles en microfotografías con microscopios electrónicos<sup>21</sup>.

La adición de colorantes al fijador primario no solo se usan para obtener un buen contraste en las microfotografías sino que también ayudan a estabilizar clases particulares de lípidos como es el caso del verde de malaquita o también incorporando rojo de rutenio y azul de alcian con lisina para asegurar los polisacáridos que habitualmente se pierden al utilizar el fijador de Karnovsky<sup>1,22,23</sup>.

Para optimizar el proceso se utilizan fijadores secundarios; como el tetróxido de osmio y aunque es más lento para penetrar en la célula, es un fuerte oxidante que reacciona vigorosamente con los enlaces dobles de los lípidos insaturados, volviendo la estructura más estable y evitando su colapso, el osmio también reaccionan lentamente con proteínas<sup>1</sup>.

La fijación se puede realizar por el método de inmersión, el cual consiste en sumergir directamente la muestra en un recipiente que contenga la solución fijadora en un volumen 10 veces mayor por lo menos, también se puede realizar montando primero la muestra en soportes tales como vidrio, plástico o filtros millipore en forma de monocapa para luego

sumergirlas en el fijador. Otros autores recomiendan el uso de vapores del fijador, durante 10-15 min, cuando la muestra es muy lábil<sup>2</sup>.

La calidad de la fijación está influenciada por el pH y los iones presentes, en cuanto a esto la elección del tampón juega un rol muy importante ya que protegerá a la muestra durante el proceso. Los buffers más usados en microscopía electrónica son: tampón fosfato, cacodilato y los orgánicos como HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1 piperazinaetanosulfónico) este último se ha considerado fuertemente como un reemplazo para los dos primeros ya que ocasionan menos efectos perjudiciales sobre la fina estructura de la muestra y no son tóxicos<sup>24</sup>.

Por otro lado, es importante conocer la naturaleza bioquímica del material, para seleccionar el tipo y condiciones que debe tener el fijador, con el fin de obtener imágenes con estructuras similares a su estado natural. Si no se conoce, se podría determinar empíricamente el mejor fijador probando múltiples reactivos de reticulación.

#### Deshidratación:

La deshidratación es un paso previo al secado de las muestras, el objetivo de la deshidratación es disminuir la tensión superficial del agua contenida en las muestras. El agua tiene una fuerte tensión superficial debido a los enlaces de hidrógeno y cuando se evapora de una muestra biológica, las fuerzas de adhesión del agua causan arrugas, roturas o el colapso de estructuras. Es por lo que se utiliza una serie de lavados por inmersión con solventes orgánicos como etanol o acetona a distintas concentraciones.

Se dice que es un paso previo un secado porque estos solventes luego se reemplazan con CO<sub>2</sub>, que puede alcanzar su punto crítico, reduciendo la tensión superficial a cero bajo temperatura y presión tolerables para la mayoría de las muestras biológicas. El gas se liberará lentamente y la estructura permanecerá en gran parte intacta<sup>1</sup>.

#### Secado:

Es necesario secar la muestra, para evitar que moléculas de agua se liberen dentro de la columna de vacío del microscopio electrónico de barrido, ya que estas podrían interferir con la trayectoria libre de los electrones y también dañarían el filamento. Además, la muestra debe montarse en un sustrato adecuado para cumplir con los requisitos de la platina del microscopio, y las consideraciones adicionales pueden incluir orientación,

propiedades de adherencia y suficiente contacto de la superficie con el montaje conductivo para evitar la carga.

La deshidratación con solventes seguida de un secado de punto crítico (CPD) es el método más común para eliminar el agua de las muestras, como su nombre lo indica, la muestra se calienta hasta el punto crítico del agente de transición, donde a temperaturas y presiones específicas las fases gaseosa y líquida son indistinguibles. En esta fase, el agente puede liberarse lentamente como un gas, y los artefactos asociados con la contracción se minimizan. El punto crítico para el agua y etanol es alto (aproximadamente  $374\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $2.19 \times 10^7\text{ Pa}$  y  $241\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $6.08 \times 10^6\text{ Pa}$ , respectivamente), pero otros agentes como el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) están en un rango tolerable para la mayoría de las muestras biológicas ( $31.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $7.39 \times 10^6\text{ Pa}$ )<sup>1,18</sup>.

Montaje:

Antes del recubrimiento de las muestras orgánicas y biológicas para aumentar su conductividad se realiza el montaje después del secado, las muestras se montan en un soporte, el cual es un cilindro de bronce, aluminio o carbón, presentan diferentes tamaños con diámetros de 1 cm y 2,5 cm. La muestra se puede colocar sobre un adhesivo conductor y/o pegarse sobre el portamuestra usando pintura conductora esperando que se seque para que se observe en un MEB<sup>1</sup>.

Recubrimiento:

Luego del montaje de las muestras se realiza el recubrimiento con un metal, para formar una delgada capa sobre ella con el fin de minimizar el daño, volverla conductora y mejorar su contraste topográfico en las imágenes durante el escaneo en el MEB. La elección del metal se debe considerar cuidadosamente según la aplicación. Las aleaciones de oro, oro/paladio, oro/platino, o platino (Au, Au / Pd, Au / Pt y Pt, respectivamente) son opciones comunes para las imágenes de baja resolución. Iridio (Ir), tungsteno (W) o carbono (C), proporcionan un mejor recubrimiento para imágenes de alta resolución. En todos los casos, la aplicación de una capa mínima es importante para evitar oscurecer los detalles estructurales<sup>1</sup>.

Otro procedimiento químico para la preparación de muestras es el uso de líquidos iónicos, el cual se realiza en función de características especiales, como su estructura y forma, así como del contenido de agua<sup>4,7,8</sup>.

### 1.2.3. Tratamiento reciente químico utilizando líquidos iónicos (LIs):

Algunos investigadores han propuesto recientemente metodologías químicas utilizando líquidos iónicos, ya que éstos permiten la observación de muestras en MEB sin la necesidad de fijaciones, secado y recubrimiento a pesar de su alto contenido de agua en la muestra<sup>7,8,25,26</sup>.

#### 1.2.3.1. Líquido iónico:

##### 1.2.3.1.1. Definición:

Los líquidos iónicos (LIs, por sus siglas en inglés) son compuestos orgánicos que permanecen líquidos a temperatura ambiente o menos de 100 °C, debido a que sus iones no se empaquetan bien (carga electrostática deslocalizada). Estos resultan de la interacción de un catión orgánico voluminoso y un anión orgánico o inorgánico dando una estructura regular uniforme, es decir, una fase líquida. Además la combinación de un catión orgánico asimétrico más grande y sus equivalentes inorgánicos más pequeños reducen la energía de la red del compuesto dando bajos puntos de fusión en los LIs<sup>27,28</sup>.

##### 1.2.3.1.2. Composición:

En el diseño de un LI, generalmente se utilizan aniones fluorados. Los aniones más populares consisten en cloruro, nitrato, acetato, hexafluorofosfato y tetrafluoroborato. Y en cuanto a los cationes más estudiados se tienen; amonio, sulfonio, fosfonio, imidazolio, piridinio, picolinio, pirrolidinio, tiazolio, oxazolio y pirazolio<sup>28</sup>.

##### 1.2.3.1.3. Propiedades:

La composición y propiedades específicas de estos líquidos dependen del tipo de catión y anión en la estructura e incluyen aquellas que son superácidas, básicas, hidrófilas, miscibles en agua, inmiscibles en agua e hidrófobas. Por lo general, el anión controla la miscibilidad del agua, pero el catión también influye en la capacidad de enlace de hidrógeno o hidrofobia<sup>29,30</sup>.

Otras propiedades son: una presión de vapor insignificante ( $6.67 \times 10^{-7}$  Pa), (no se evaporan y pueden aplicarse a sistemas de alto vacío), poseen una conductividad eléctrica de alrededor de  $100 \text{ mS} \times \text{cm}^{-1}$ , son electroquímicamente estables (tienen una ventana electroquímica de alrededor de 5.8 V). También son térmicamente estables a altas temperaturas (600 K) y condiciones de vacío durante varias horas<sup>8</sup>.



#### 1.2.3.1.4. Clasificación:

Los LIs pueden ser clasificados en próticos (PIL, por sus siglas en inglés) y apróticos (AIL, por sus siglas en inglés); el primero está compuesto sólo por el catión y anión. Su síntesis es más simple, consiste en la transferencia de un protón desde un ácido de Brønsted hasta una base del mismo tipo. De esta forma se origina la presencia de al menos un protón capaz de promover enlaces de hidrógeno. El segundo está formado por una sal con un enlace iónico débil pero no lo suficiente para ser líquida a temperatura ambiente. Por tanto, necesitan ser mezclados con otro compuesto que disminuya el enlace catión-anión de la sal a través de la formación de enlaces de puente de hidrógeno. Entonces en su estructura se tendrá al catión, anión y otra molécula. Estas son conocidas también como disolvente eutéctico profundo (DES)<sup>31,32</sup>.

Los líquidos iónicos con las propiedades mencionadas proporcionan un contraste de imagen en MEB comparable al uso de recubrimiento de metal y carbono cuando se usan con muestras aislantes<sup>25</sup>. Por lo cual se han utilizado para obtener microfotografías de muestras biológicas, como algas, células cultivadas, tejidos de animales, un bizcocho y cromosomas condensados<sup>33-35</sup>. En este estudio se utilizará el líquido iónico acetato de 1 etil 3 metil imidazolio, el cual se describe a continuación:

#### 1.2.3.1.5. Acetato de 1 etil 3 metil imidazolio:

##### 1.2.3.1.5.1. Definición:

Es un líquido iónico prótico compuesto por el catión imidazolio rodeado del anión acetato y viceversa, formado interacciones reticulares entre los iones a través de fuerzas Coulomb combinadas con la fluxionalidad rotacional y/o torsional de los componentes, además de enlaces puente de hidrógeno<sup>36</sup> como se muestra en la Figura 13.

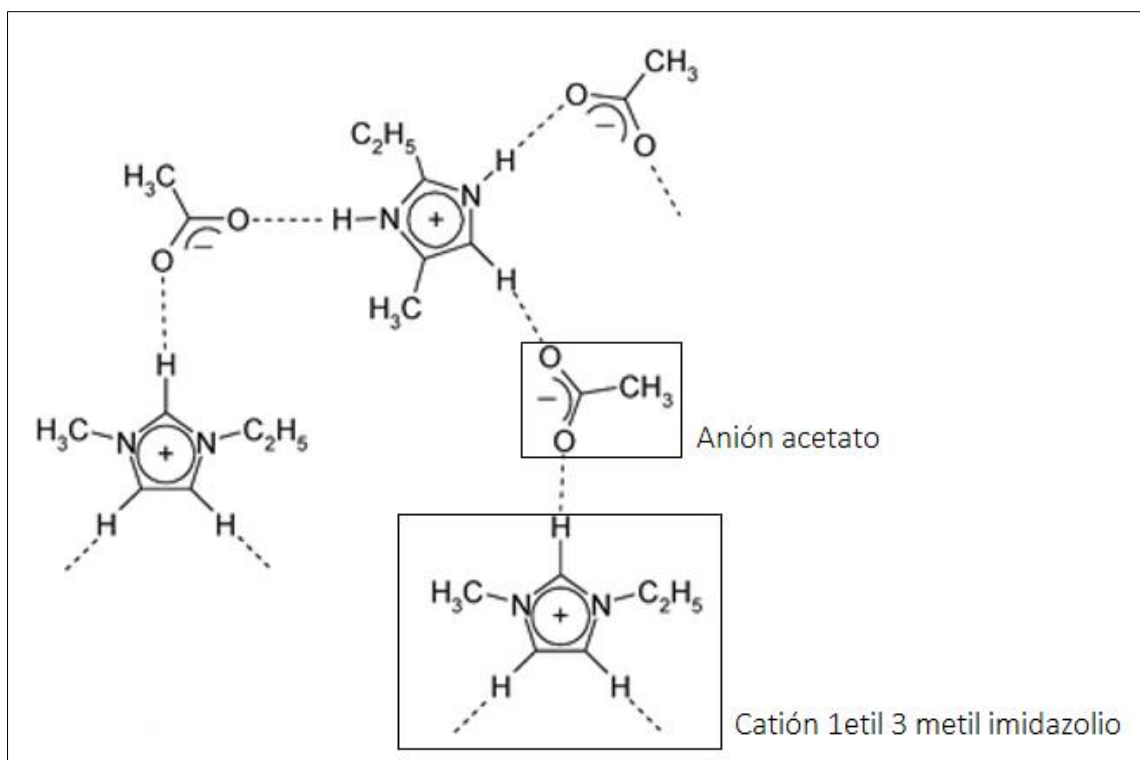


Figura 13. Estructura del líquido iónico acetato de 1 etil 3 metil imidazolio<sup>36</sup>.

Los LIs a base del catión imidazolio presentan en general alta estabilidad térmica, bajos puntos de fusión y viscosidad<sup>37</sup> y el anión acetato, el cual es pequeño, polar, posee una cola de metilo hidrófoba y un grupo carboxilato hidrofílico<sup>36</sup>.

#### 1.2.3.1.5.2. Propiedades físicas y químicas:

El acetato de 1 etil 3 metil imidazolio es un líquido transparente, cuyo punto de fusión es  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , su densidad y viscosidad es  $1.027\text{ g}\times\text{cm}^{-3}$  y  $143.61\text{ cP}$  respectivamente a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el pH es 5.4, la conductividad es  $2.55\text{ mS}\times\text{cm}^{-1}$  y el peso molecular es  $170.21\text{ g}\times\text{mol}$ .

#### 1.2.3.1.5.3. Aplicaciones:

Este sal orgánica se ha empleado en estudios para observar muestras biológicas con alto contenido de humedad, tales como la matriz extracelular de un microorganismo, a través de la microscopía electrónica de barrido convencional en condiciones de alto vacío sin previo secado o recubrimiento con metales pesados<sup>7</sup>. Además se destacó su uso entre 6 diferentes líquidos iónicos para observar un biopolímero hidratado dentro de la cámara de alto vacío del MEB<sup>8</sup>.

Por lo tanto, todo el proceso convencional de preparación de la muestra biológica de deshidratación, secado en puntos críticos y hacer que la superficie de la muestra sea conductora pueda reemplazarse por tratamiento con un LI<sup>7</sup>.

Uno de los objetivos de estas metodologías de tratamiento físico, químico y físicos/químico para la preparación de muestras es obtener información de esta en condiciones idénticas a su estado natural, sin que aparezcan artefactos que introduzcan errores durante la interpretación de las imágenes. Los artefactos son errores o malformaciones y pueden presentarse por el tratamiento que se dio a la muestra antes de introducirlas en el MEB.

Para disminuir estos artefactos es necesario conocer la naturaleza de la muestra y su composición con el fin de darle un tratamiento adecuado. Como se observa en la Figura 14:

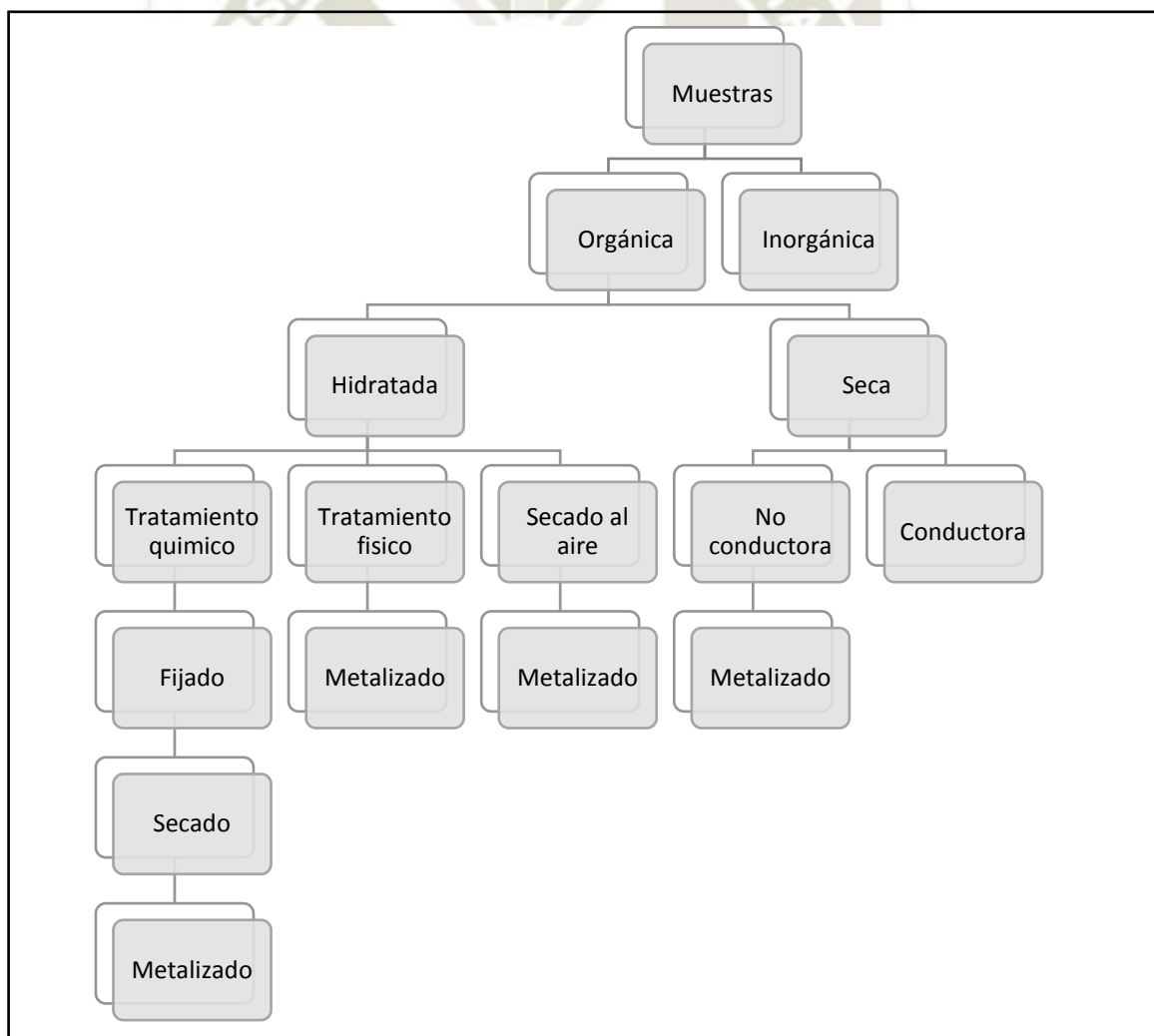


Figura 14: Tratamiento físico y físico-químico de una muestra según su naturaleza<sup>2</sup>

Como se observa en la Figura 14, las muestras hidratadas pueden someterse a varios tratamientos, lo cual dependerá de la cantidad de agua o humedad que presenten en su estructura, por ejemplo las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de los microorganismos, presentan una gran cantidad de agua, iones y productos solubles de baja y alta masa molecular que están atrapados en el interior de las células, por lo cual el método para su observación en MEB sería un tratamiento físico o físico-químico, sin embargo ciertos estudios no los recomiendan debido a que el glucocálix de los microorganismos suele colapsar con estos tratamientos por lo que se ha recomendado el uso de líquidos iónicos o utilizar otro tipo de equipo como el microscopio electrónico de barrido ambiental y de presión variable (ESEM y VPSEM por sus siglas en inglés respectivamente) para muestras con esta naturaleza<sup>38</sup>.

Es importante destacar que el uso de LIs, resultan ser una alternativa para la observación de muestras con alto contenido de agua, entre las cuales podemos mencionar capsulas elaboradas con materiales poliméricos, que sirven para preservar o mantener en su interior moléculas de interés alimentario o farmacéutico<sup>39</sup>.

### 1.3. Encapsulación:

Es una técnica en la cual partículas líquidas, sólidas o gaseosas, denominadas como núcleo, sustancia activa, fase interna o carga útil, son cubiertas con una película polimérica porosa llamada cápsula, material de pared, membrana, acarreador, caparazón, perlas o partículas de manera muy general<sup>40</sup>.

#### 1.3.1. Pared de encapsulados:

El material de pared que se utiliza son polisacáridos, como alginatos, mucílago o gomas, almidones maltodextrinas y quitosanos, que al contacto con el agua forman hidrogeles<sup>41</sup>.

##### 1.3.1.1. Hidrogeles:

Los hidrogeles son biomateriales, cualquier sustancia diseñada para estar en contacto con sistemas biológicos o sistemas con vida, también conocidos como materiales poliméricos entrecruzados de origen natural o sintético; estructuralmente son tridimensionales, y se hinchan al entrar en contacto con una solución acuosa. Como consecuencia, se forman materiales blandos y elásticos con una cantidad significativa de agua retenida en su estructura, pero no llegan a disolverse. Pueden obtenerse mediante polimerización y entrecruzamiento simultáneo de uno o varios monómeros polifuncionales, es decir,

monómeros que posean al menos un grupo funcional, como, por ejemplo, grupos hidroxilos (-OH), carboxilos (-COOH), sulfonilos (-SO<sub>3</sub>H), amidas (-CONH<sub>2</sub>), entre otros. Estos grupos son los que le aportarán la naturaleza hidrofílica (afín con el agua) al material polimérico resultante. Se los denomina inteligentes por la posibilidad de liberar compuestos absorbidos en los mismos, de manera controlada, al ser sometidos a un estímulo externo como puede ser un cambio en la temperatura, pH del medio, luz, moléculas biológicas, campo eléctrico o magnético, concentración iónica entre otros<sup>39</sup>.

Estos biomateriales se han convertido en una clase de material de pared absolutamente necesaria en el campo de encapsulación ya que algunos pueden exhibir una buena biocompatibilidad por sus similitudes naturales a un tejido blando (contenido en agua relativamente alto, consistencia blanda y elástica y baja tensión superficial), además de una alta permeabilidad para gases, nutrientes y desechos metabólicos<sup>42</sup>. Convirtiéndolos en andamios atractivos para su uso en la encapsulación de una variedad de cargas como células, microbios, enzimas, medicamentos, vitaminas, minerales, colorantes, prebióticos, probióticos, sabores, nutraceuticos, antioxidantes, olores, aceites, bacterias, etc<sup>43</sup>.

#### 1.3.1.2. Alginatos:

Los alginatos son hidrocoloides que se extraen de tres especies de algas marrones y representan una familia de polisacáridos lineales que contienen cantidades variables de ácido  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-glucorónico, estos grupos se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo bloque G (-GGG), bloques M (-MMM-) o heteropolímeros en los que M y G se alternan (-MGMG-). Tanto la distribución de los monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen de los grupos carboxilos, confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido de glucorónico. Las sales del ácido algínico están formados por 3 bloques, M, G y MG. Cuando dos cadenas de bloque G se alinean, se forman sitios de coordinación. Debido a la forma de bucles de estas cadenas, existen cavidades entre ellas que tienen el tamaño adecuado para acomodar al ion calcio y además están revestidas de grupos carboxilos y otros átomos de oxígeno electronegativo. Después de la adición de iones calcio, el alginato sufre cambios conformacionales, dando lugar al conocido “caja de huevo” Figura 15. Esto se basa en la dimerización de la cadena y, finalmente, en la mayor agregación de los dímeros. Se sabe que la fuerza de los geles de alginato depende del

número de enlaces cruzados formados, del tipo reticulación iónica, de la longitud y la rigidez de los bloques entre los enlaces. Esto es importante ya que los alginatos que presentan grandes regiones de bloques G forman un gel de forma alta y exhiben mayor porosidad y los que presentan grandes bloques M forman un gel de fuerza media, pero con una alta resistencia a la sinéresis y muestran poros más pequeños que los hacen más suaves<sup>44</sup>.

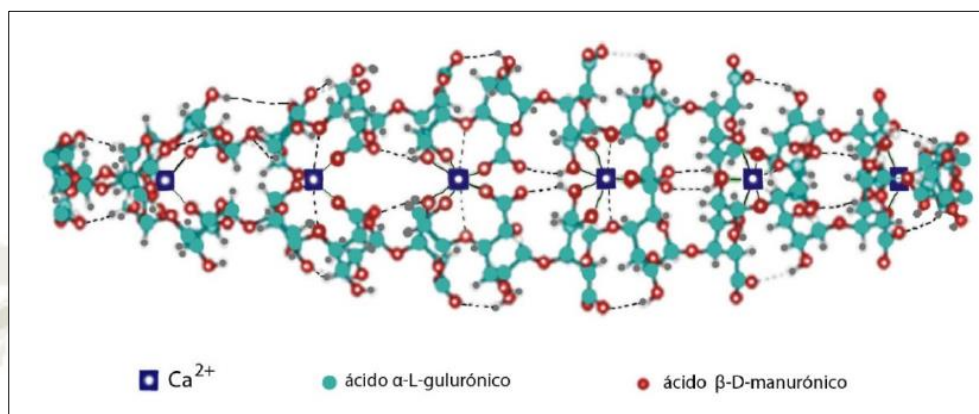


Figura 15: Modelo caja de huevo que se describe en el texto <sup>44</sup>.

#### 1.3.1.3. Mucilago o gomas:

Otros materiales utilizados como materiales de pared para la elaboración de cápsulas es el mucílago, estos son polímeros biodegradables muy complejos y de gran diversidad funcional, se extraen de fuentes vegetales y están formados por polisacáridos no celulósicos con igual número de azúcares que las gomas y pectinas, por lo que tienden a confundirse, y se les diferencia solamente por sus propiedades físicas. Estos polímeros de origen vegetal destacan por sus aplicaciones industriales como formadoras de gel y quelantes, un ejemplo es el mucílago de chía por sus propiedades como; solubilidad en agua, alto peso molecular y una alta viscosidad<sup>45</sup>.

##### 1.3.1.3.1. Mucílago de *Salvia hispánica* L. (*chía*):

El mucílago que se obtiene de la semilla de *Salvia hispánica* L. (*chía*), (es un polisacárido ramificado altamente ácido formado principalmente por residuos de D-xilosa, D-manosa, D-arabinosa, D-glucosa, ácido galacturónico y ácido glucurónico que ha unido un pequeño porcentaje de material proteínico que forma parte integral de la estructura. Debido a esta composición y a su capacidad de formar soluciones altamente viscosas a bajas concentraciones es que se consideran un material de pared potencial para encapsulación<sup>46,47</sup>. Sin embargo, por la cantidad de agua que presentan es muy compleja

la observación de la muestra en MEB, por lo cual resulta interesante evaluar el uso de líquidos iónicos y comparar los resultados obtenidos con metodologías tradicionales para la preparación de muestras orgánicas húmedas.

Refiriéndose al material de recubrimiento de los encapsulados a base de polímeros con alto contenido de humedad no se han reportado estudios que hagan un seguimiento de la muestra durante su preparación para observarlas en un MEB, y es que solo se analizan las posibles causas de los daños por el tratamiento en las microfotografías. Es por ello que este estudio se complementara con el análisis de imagen en ciertos puntos durante la preparación y la microscopía para modelar el proceso de preparación y mantener la calidad de las muestras (forma y tamaño).

#### **1.4. Análisis de imagen:**

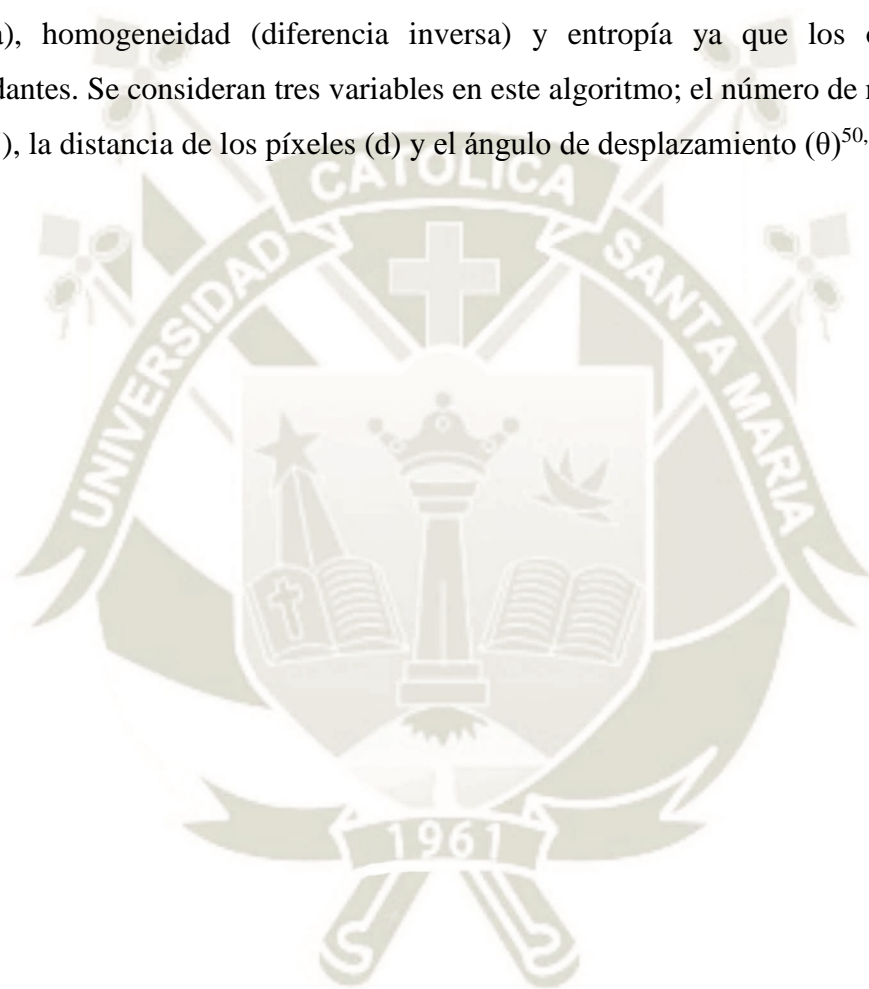
##### **1.4.1. Definición y aplicaciones:**

El análisis de imagen (AI) se ha utilizado como herramienta cuantitativa para la evaluación de las características; por ejemplo las morfométricas y de textura las cuales han sido una de las más aplicadas en la industria de los alimentos como herramienta para monitorear la deshidratación de rodajas de bananas y manzanas, así como determinar la forma de semillas o migas de pan, a partir de un sistema estandarizado de adquisición de imágenes, en donde se han analizado parámetros relacionados con la forma (área, diámetro, perímetro, circularidad, etc.)<sup>9,10,47,48</sup>. y los parámetros relacionados con la textura visual, el cual es un método para la medición de la rugosidad sin contacto que se forma por la interacción de la luz con la superficie rugosa, se basa en la variación local del brillo de un pixel al siguiente (o dentro de una región pequeña), los cuales se almacenan como una matriz de pixeles con diferentes intensidades o niveles de gris formando la superficie de una imagen digital<sup>49</sup>.

Para realizar el análisis de estas características es importante la manera en que se obtienen las imágenes, en este estudio se propone el uso de un escáner, a parte de las microfotografías MEB, ya que este ofrece todas las ventajas de los sistemas basados en cámaras, así como la adquisición de imágenes en 2D mediante escaneo plano, el cual es rápido, fácil de usar, económico e independiente de las condiciones de luz externa y tiene buena precisión<sup>10</sup>.

El programa para analizar estas imágenes es el software gratuito ImageJ (National Institutes Health, Bethesda, Md, EE. UU.), ya que este tiene incorporado herramientas

para el análisis morfométrico de partículas y permite instalar complementos como el GLCM que calcula las características de textura establecidas en matrices de coincidencia de nivel de gris a partir de una imagen, también se define como algoritmo estadístico de segundo orden que compara dos píxeles vecinos a la vez y compila la frecuencia con la que se pueden encontrar diferentes niveles de grises dentro de un área restringida. Con este algoritmo es posible calcular catorce parámetros de textura, sin embargo, solo se considera útil: energía (uniformidad o segundo momento angular), contraste (varianza o inercia), homogeneidad (diferencia inversa) y entropía ya que los otros resultan redundantes. Se consideran tres variables en este algoritmo; el número de niveles de gris (0-255), la distancia de los píxeles ( $d$ ) y el ángulo de desplazamiento ( $\theta$ )<sup>50,51</sup>.





## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS:

#### 2.1. Material biológico:

- Semilla de Salvia hispánica L. (*chía*) obtenida de la localidad de la Palma, municipio de Nopala (Villagran, Hidalgo, México).

#### 2.2. Materiales de laboratorio:

- Termómetro.
- Frascos de plástico termoresistentes de 2 L.
- Cernidor (Mainstays, China, malla de 1mm).
- Tamices de plástico de menor apertura (malla 250 micras).
- Mortero.
- Bolsas con cierre hermético de 2 x 2”.
- Jeringa de plástico de 10mL de la marca BD plastipak.
- Colector de aluminio de 12 cm de diámetro.
- Frascos de vidrio ámbar de 50 mL.
- Tubos fálcon.
- Micropipeta automática de 100 – 1000  $\mu$ L.
- Micropipeta para líquidos viscosos.
- Cintas de pH.
- Cintas parafilms.
- Cintas conductoras doble cara de cobre.
- Material de vidrio.
- Malla de nylon del filtro del poliéster o tela filtrante para la filtración líquida

#### 2.3. Reactivos:

- Alginato de sodio (Sigma Aldrich, 9005-38-3).
- Acetona.(Fermont PQ06016)
- $\text{CaCl}_2$  (JT. Baker, 1313-01).
- N, N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCCD) (Sigma-Aldrich, D80002).
- Lisina (Sigma-Aldrich, L5501-5G).
- Azul de alcian 1% (Aqueous-26026-01).
- Cacodilato de sodio trihidratado (Sigma-Aldrich, C0250).
- Tetróxido de Osmio ( $\text{OsO}_4$ , 1%).
- Ácido tánico (Sigma-Aldrich, 403040).

- Agua desionizada.
- Alcohol etílico 96°LG (LITIMEX)
- Etanol etílico puro (Sigma Aldrich E7023).
- Acetato de 1-etil-3-metilimidazolio (Sigma-Aldrich, 689483).

#### 2.4. Equipos e instrumentación:

- Hot plate (Thermo Scientific SP131325 Cimarec Hot Plate Magnetic Stirrer).
- Baño ultrasónico (Limpiador ultrasónico Cole-Parmer, calentador/temporizador digital; 2.5 galones, 230V).
- Micro tamices (Mini-Sieve Micro Sieve Set).
- Estufa (TERLAB MR, México).
- Molino (KRUPS, México).
- Secador de punto crítico (K850 Critical Point Dryer).
- Equipo de Recubrimiento de pulverización catódica (Denton Vacuum Desk II Sputter Coater # 60174).
- Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Schottky (JSM-7800F).
- Microscopio electrónico de barrido (Jeol Mod. JSM-5800 LV).
- Bomba de jeringa. (CICATA- IPN. Querétaro).
- Escáner fotográfico (HP Scanjet G3010).
- Medidor de pH (Hanna Instruments - PH211).
- Campana de extracción.
- Balanza analítica digital (OHAUS).

#### 2.5. Otros:

- Programa ImageJ incluido con Java de 64 bits 1.8.0\_112 (70 MB) para Windows.
- Programa estadístico Sigma Plot 14.0 para Windows.

#### 2.6. Metodología:

##### 2.6.1. Determinación de las características morfométricas iniciales de las perlas de Alginato de calcio-mucilago de Salvia hispánica L. (chía), como muestra biológica de alta humedad a través del primer análisis de imagen:

Primero se obtuvieron las perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica L. (*chía*) el cual se detalla a continuación:

**a) Extracción con solventes orgánicos y secado de mucílago de Salvia hispánica****L. (*chía*):**

El proceso de extracción se realizó pesando 15 g de semilla de Salvia hispánica L. (*chía*), este se colocó en un litro de agua destilada previamente acondicionada a 40 °C. La semilla hidratada se agitó durante 1 h a 40 °C, posteriormente se colocó en un baño de sonicación por 53 minutos y se congeló por 40 horas. Después se acondicionó a temperatura ambiente y se filtró, primero una filtración gruesa utilizando un cernidor (Mainstays, China, malla de 1mm) frotando las semillas contra las aspas para generar mayor liberación del material, posteriormente por dos tamices de plástico de menor apertura (malla 250 micras) y por ultimo por una tela filtrante de nylon. El líquido obtenido se colocó en una solución etanol-acetona (70:30), en una pera de decantación, esta se agitó y se dejó en reposo hasta la separación de fases. Se decantó la fase acuosa y se recuperó la fase orgánica; esta se lavó con una misma cantidad de acetona, luego con una espátula se extrajo el mucílago y se procedió a exprimirlo contra las paredes del vaso, después se extendió en una placa petri, se secó en estufa a 40 °C por 4 horas. El material obtenido se pulverizó en un molino y después en un mortero hasta obtener un polvo fino, este luego se tamizó utilizando una malla número 60, obteniendo un tamaño de partícula de 250 micras aproximadamente, luego se almacenó en bolsas de plástico herméticamente cerrados a temperatura ambiente<sup>41</sup>.

**b) Elaboración de las perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica****L. (*chía*), como muestra orgánica de alta humedad:**

Después se continuó con el proceso de elaboración de perlas; esta metodología se tomó de trabajos similares<sup>(52)</sup> con ciertas modificaciones. Primero se mezcló el alginato de sodio y mucílago de Salvia hispánica L. (*chía*) a una concentración 1:1 para generar una solución al 1% (p/v) de ambos materiales. La mezcla obtenida se agitó suavemente hasta su homogenización, la solución se colocó en una jeringa de plástico de 10 mL, con aguja de acero inoxidable de diámetro interno y externo de 0.6 y 0.8 mm respectivamente, la cual estuvo adaptada a una bomba de jeringa (CICATA- IPN. Querétaro). La solución se extruyó a temperatura ambiente (25 °C), a una velocidad de flujo constante de 2.5 mL/h y una distancia de trabajo constante de 5.5 cm, cayendo en un colector de aluminio de 12 cm de diámetro que contenía 30 mL de solución de reticulación (CaCl<sub>2</sub> al 2% (p/v))<sup>41</sup>.

Las perlas obtenidas se distribuyeron en 4 placas Petri con 20 mL de solución reticulante, estas placas se colocaron dentro de un escáner HP Scanjet G3010, las imágenes se obtuvieron a 2400 ppp en formato JPEG. El conteo de las perlas se realizó por análisis de imagen utilizando el programa gratuito ImageJ (National Institutes Health, Bethesda, MD, EE. UU.), del cual se utilizaron las herramientas “ROI Manager” y Multi-point.

Para establecer el sistema de réplicas, las perlas recolectadas se dividieron en 5 grupos (A, B, C, D y E) y se almacenaron en tubos fálcon debidamente rotulados a 4 °C con solución reticulante.

La Figura 16 muestra la distribución de las perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica L. (chía).

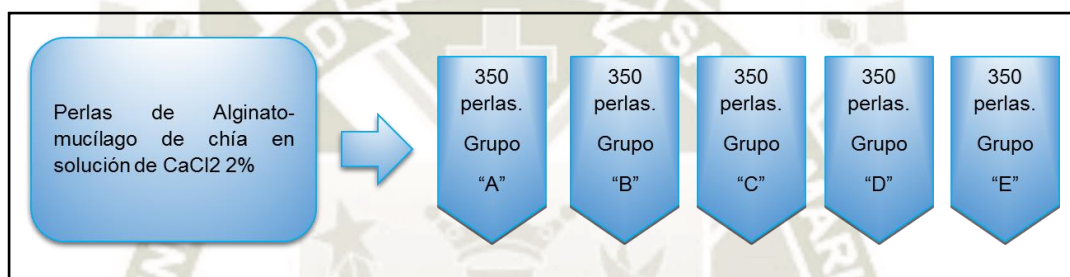


Figura 16. Sistema de réplicas.

La determinación de las características morfométricas iniciales se describe más adelante en el ítem I. Inciso A).

### **2.6.2. Comparación del efecto de los métodos de preparación física y físico-química tradicionales y química (líquidos iónicos) en la observación de muestras con alto contenido de agua en un microscopio electrónico de barrido a partir de un segundo y tercer análisis de imágenes sobre las características morfométricas iniciales de las perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica L. (chía) durante la preparación de muestras.**

Se aplicaron métodos de preparación para muestras biológicas y orgánicas con alto contenido de humedad, dichas metodologías fueron extraídas de diferentes referencias bibliográficas. Los métodos de preparación se detallan a continuación:

- 2.6.2.1. Método de preparación física tradicional o secado de punto crítico (CPD) para la observación de muestras orgánicas húmedas en un microscopio electrónico de barrido.

El secado de puntos críticos es el método físico más comercial, el objetivo de este tratamiento es reducir la tensión superficial del agua contenida a cero, de este modo se evita el colapso de las estructuras durante el secado. Además se incorporó un programa de deshidratación estándar en frío, utilizando etanol en concentraciones crecientes como fluido intermedio<sup>19</sup>.

Este tratamiento se identificó como tratamiento 1 ( $T_1$ ) y se detalla a continuación:

### Tratamiento 1 ( $T_1$ ):

#### i. Selección de perlas de alginato de calcio-mucílago de chíá:

Del sistema de réplicas (A, B, C, D, y E) se tomaron 50 perlas de cada uno y se colocaron en tubos fálcon, como se muestra en la Figura 17:

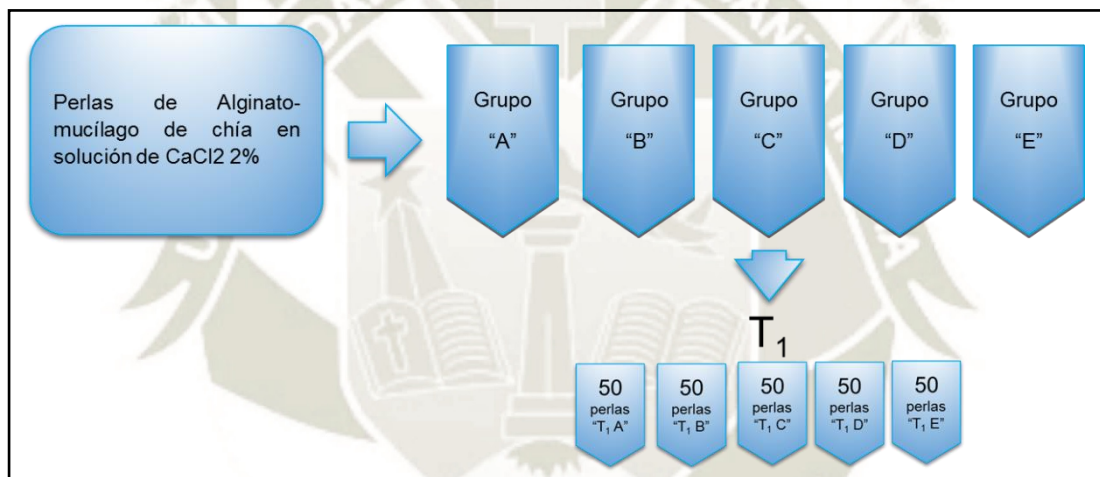


Figura 17. Selección de partículas para la aplicación del tratamiento 1 ( $T_1$ )

#### ii. Lavado:

A las perlas contenidas en los tubos fálcon se les añadió 2mL de agua destilada y se dejaron en estado reposo por 5 min a temperatura ambiente, luego con una pipeta pasteur se retiró el agua. Este paso se realizó por triplicado.

#### iii. Secado de punto crítico (CPD):

Una muestra generalmente se procesa a través de concentraciones variables con un líquido de deshidratación, que culmina en el reemplazo completo del agua con este líquido intermedio. Debido a que tiene una tensión superficial baja, es menos probable que la muestra experimente daños debido a la evaporación mientras se transfiere a la cámara, además de ser miscible con  $CO_2$  (el fluido de transición) garantiza condiciones satisfactorias después del lavado para que comience el proceso de CPD<sup>5</sup>.

Entonces el secado de puntos críticos se realiza en dos etapas:

- **Deshidratación con el fluido intermedio o etapa intermedia:**

Entonces después del tercer lavado se retiró el agua con una micropipeta, y se continuó con un programa de deshidratación en gradiente de etanol frío dejando en reposo a 4 °C por 10 min, utilizando 2mL de solución como se indica a continuación<sup>19</sup>.

- a) 30% etanol frío por 10 min a 4°C
- b) 40% etanol frío por 10 min a 4°C
- c) 50% etanol frío por 10 min a 4°C
- d) 60% etanol frío por 10 min a 4°C
- e) 70% etanol frío por 10 min a 4°C
- f) 80% etanol frío por 10 min a 4°C
- g) 90% etanol frío por 10 min a 4°C
- h) 100% etanol frío por 10 min a 4°C (por triplicado).

Terminado el proceso de deshidratación se seleccionaron muestras para el segundo análisis de imagen, el cual se describe más adelante en el ítem I. inciso B).

- **Secado o etapa de transición:**

De las perlas contenidas en etanol al 100% y 4°C se tomaron 3 perlas por cada repetición y se introdujeron en una bolsa hecha de papel china rotulada, después se colocaron dentro de la cámara del secador de punto crítico; y se continuó con el siguiente proceso<sup>(53)</sup>:

- ✓ Se colocaron las muestras dentro de la cámara de CPD.
- ✓ Se llenó la cámara con etanol hasta cubrir las muestras y se enroscó la tapa de la cámara.
- ✓ Se abrió la llave de suministro de gas para enfriar la cámara hasta la licuefacción del CO<sub>2</sub> (4 °C – 6 °C) con flujo lento.
- ✓ Una vez alcanzada la temperatura se abrió la válvula de llenado de cámara para mezclar las muestras con CO<sub>2</sub> líquido; se suministró CO<sub>2</sub> hasta que el manómetro marque 300 psi, luego se cerró la válvula y se incubó por 10 min. En este tiempo ambos líquidos se mezclaron.
- ✓ La temperatura se mantuvo entre (4 °C – 6 °C) durante todo el proceso.

- ✓ Se evacuó una parte del etanol lentamente de la cámara de muestra, ya que se encuentra mezclado con CO<sub>2</sub>, nuevamente se inyectó CO<sub>2</sub> líquido hasta los 600 psi y se dejó incubar por 10 min. Este paso se realizó por cuadruplicado.
- ✓ Una vez que todo el etanol fue eliminado de la cámara, se encendió la temperatura para calentar la cámara de las muestras hasta alcanzar las condiciones de punto crítico del CO<sub>2</sub>, es decir, 34 °C y 1200 psi, cuando se alcanzó estas condiciones se apagó la temperatura y se incubó por 5 min.
- ✓ Pasado los 5 min se abrió lentamente la válvula de salida para el gas y se evacuó el CO<sub>2</sub>, la presión fue disminuyendo lentamente hasta que en el manómetro llegue a los 0 psi, se abrió la cámara y se pudo retirar las bolsas secas con mucho cuidado utilizando pinzas.

El proceso de secado duró 4 horas.

Terminado el proceso de secado de punto crítico se seleccionaron muestras para el tercer análisis de imagen, el cual se describe más adelante en el ítem I. inciso C).

#### iv. **Recubrimiento:**

Previamente a este proceso se fijó una cinta conductora de cobre de doble cara sobre un portamuestra y se retiró la capa protectora para fijar las muestras secas.

Las perlas secas se retiraron cuidadosamente de las bolsas de papel china y con unas pinzas de plástico se distribuyeron cuidadosamente sobre la cinta conductora, el portamuestra se introdujo en el equipo de pulverización al vacío (Equipo "Sputter/Carbon Coaters" modelo 12157-AB), las condiciones para el recubrimiento fueron 50 segundos a presión de  $5 \times 10^{-1}$  bar con atmósfera de argón<sup>1</sup>.

#### 2.6.2.2. Métodos de preparación física-química tradicionales para la observación de muestras con alto contenido de agua en MEB.

Las metodologías físico-químicas tradicionales utilizadas para la preparación de perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia Hispánica L. (chía)* incorporan el uso de fijadores químicos antes de un CPD, estos se establecieron de acuerdo a la naturaleza de la muestra y se escogieron protocolos en los cuales se propone el uso de colorantes catiónicos para

la identificación de polímeros aniónicos, uso de agentes reticulantes que estabilizan o crean nuevos entrecruzamientos de cadenas poliméricas como el N,N diciclohexilcarbodiimida o el ácido tánico que permite incrementar la cantidad de electrones secundarios en las muestras con el fin de obtener mayor contraste en las microfotografías; estos protocolos también permitieron fijar las condiciones del MEB tales como aceleración de voltaje, distancia de trabajo y el tipo de detector<sup>(1,23,53,54)</sup>, teniendo en cuenta estas referencias se establecieron las condiciones de las metodologías física-químicas tradicionales y se identificaron como tratamiento 2 (T<sub>2</sub>), 3 (T<sub>3</sub>) y 4 (T<sub>4</sub>); los cuales se detallan a continuación:

**Tratamiento 2 (T<sub>2</sub>):**

**i. Selección de perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica**

**L. (chía):**

Se tomaron 50 perlas de cada repetición y se colocaron en tubos fálcon como se muestra en la Figura 18:

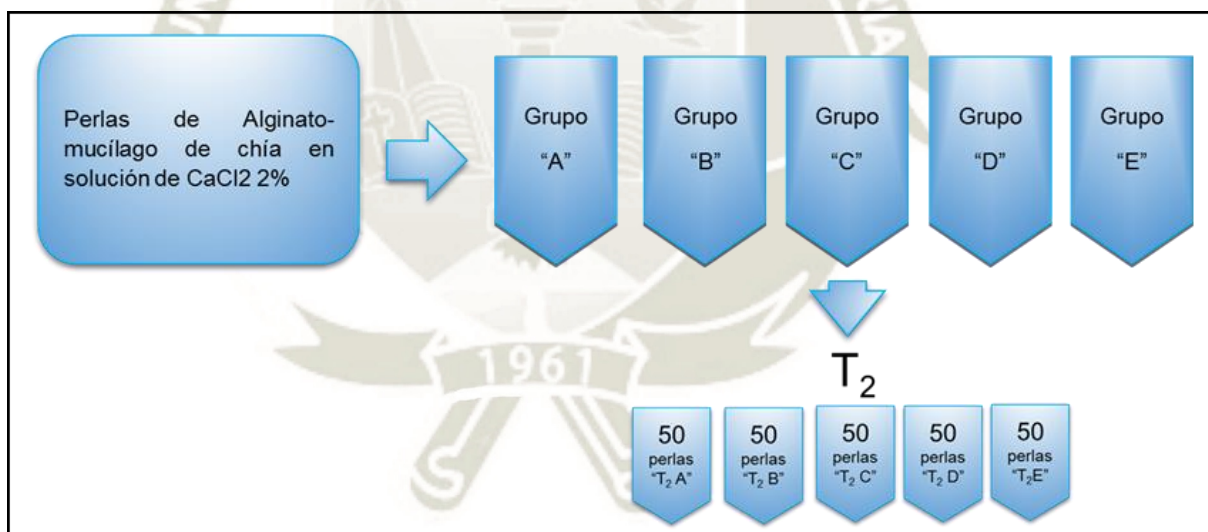


Figura 18. Selección de perlas para la aplicación del tratamiento 2 (T<sub>2</sub>)

**ii. Lavado:**

Las partículas contenidas en los tubos fálcon se lavaron siguiendo el mismo método que el tratamiento 1 inciso ii).



### iii. Fijación primaria

Después del tercer lavado se retiró el agua con una pipeta pasteur con mucho cuidado y se añadió por las paredes del tubo fálcon 2mL de la solución fijadora, se mezcló, se recubrió con papel aluminio y se dejó en reposo durante 2 hora a temperatura ambiente.

Una solución fijadora se preparó mezclando N,N'-Diciclohexilcarbodiimida 2.5% en buffer de cacodilato de sodio 0.2 M pH 7 a 40°C, una vez disuelto se bajó la temperatura a 20°C para añadir la L-lisina 75 mM, se ajustó el pH a 7 con HCl 0.5 M y luego se incorporó azul de alcian 0.075%. La concentración final del buffer fue 0.1M.

Posteriormente se retiró la solución fijadora primaria y se procedió con el lavado, el cual se realizó como se indica en el tratamiento 1 inciso ii). Luego las perlas continuaron con los procesos de deshidratación, secado, montaje, recubrimiento con oro y la selección de muestras para el segundo y tercer análisis de imagen como se detalla en T<sub>1</sub><sup>1</sup>.

#### Tratamiento 3 (T<sub>3</sub>):

##### i. Selección de perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L. (chía)*:

Se tomaron 60 perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L. (chía)* de cada repetición y se colocaron en tubos fálcon como se muestra en la Figura 19:

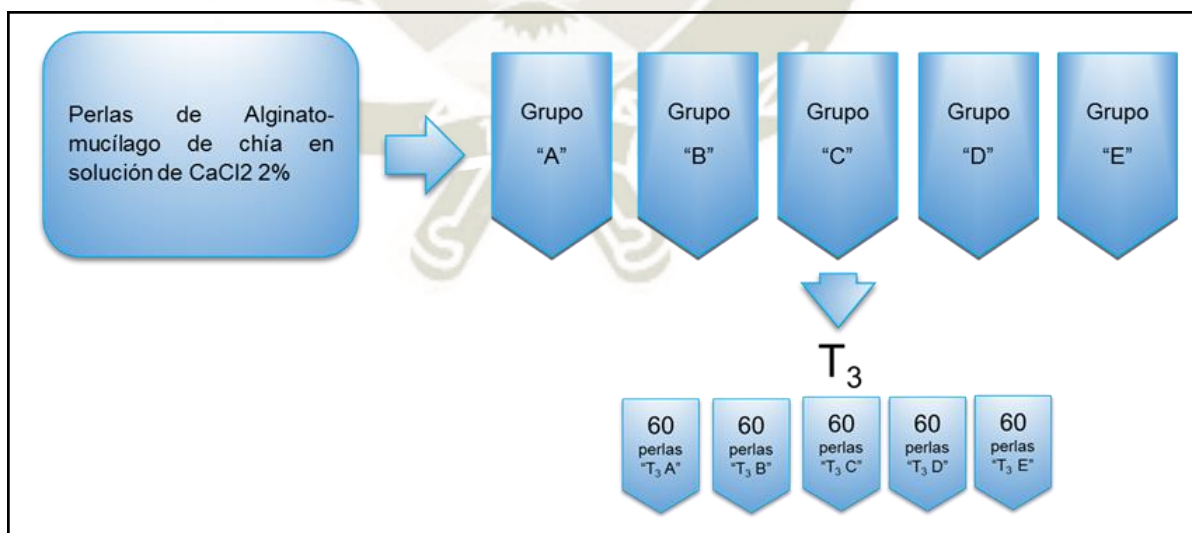


Figura 19. Selección de perlas para la aplicación del tratamiento 3 (T<sub>3</sub>)

El procedimiento de lavado y fijación primaria se realizó de acuerdo con lo descrito en el tratamiento 2 hasta el inciso iv).

**ii. Fijación secundaria:**

A las perlas contenidas en los tubos fálcon se les retiró el agua del último lavado, dentro de una campana de extracción, se les añadió 1mL de la solución fijadora secundaria, se colocaron las tapas a cada tubo y se dejó en estado de reposo por 30min.

La solución fijadora secundaria se preparó con tetraóxido de osmio al 1% en tampón cacodilato de sodio 0.1 M y pH 7 con cuidado y dentro de una campana de extracción<sup>1</sup>.

Posteriormente se retiró la solución fijadora y se añadió 2mL de agua destilada para el lavado, como se describe en el tratamiento 1, inciso ii). Luego las perlas continuaron con los procesos de deshidratación, secado, montaje, recubrimiento con oro y la selección de muestras para el segundo y tercer análisis de imagen como se detalla en T<sub>1</sub>.

**Tratamiento 4 (T<sub>4</sub>):**

**i. Selección de perlas de alginato de calcio - mucílago de Salvia hispánica L. (chía):**

Se tomaron 60 perlas de cada repetición y se colocaron en tubos fálcon como se muestra en la Figura 20:

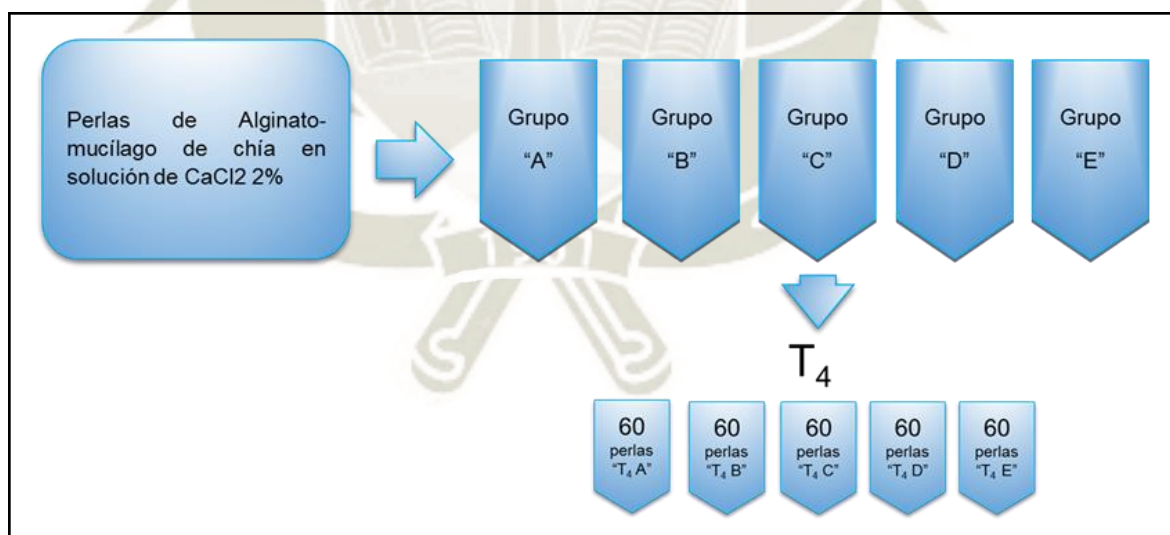


Figura 20. Selección de perlas para la aplicación del tratamiento 4 (T<sub>4</sub>)

Las perlas continuaron con los procesos de lavado, fijación primaria/lavado, fijación secundaria/lavado como se detalla en T<sub>3</sub>.

## ii. Tinción:

A las perlas contenidas en los tubos fálcon se les retiró el agua del último lavado y se les añadió una solución de ácido tánico al 1% en cacodilato de sodio trihidratado 0.1M, se agitó y se dejó en reposo durante una hora.

Al finalizar la tinción se retiró la solución con mucho cuidado y se procedió con el lavado como se detalla en el tratamiento 1 (T<sub>1</sub>) inciso ii). Luego las perlas continuaron con los procesos de deshidratación, secado, montaje, recubrimiento con oro y la selección de muestras para el segundo y tercer análisis de imagen como se detalla en T<sub>1</sub><sup>53</sup>.

### 2.6.2.3. Método de preparación química utilizando un líquido iónicos para la observación de muestras con alto contenido de agua en MEB:

En esta metodología para la preparación de perlas de alginato de calcio-mucílago de chía se consideró la forma de secado según lo reportado por otros autores<sup>7,8</sup> y se continuó con las indicaciones para el correcto uso del líquido iónico. El cual se detalla a continuación:

#### i. Selección de perlas:

Se tomaron 50 perlas y se colocaron en tubos fálcon como se muestra en la Figura 21:

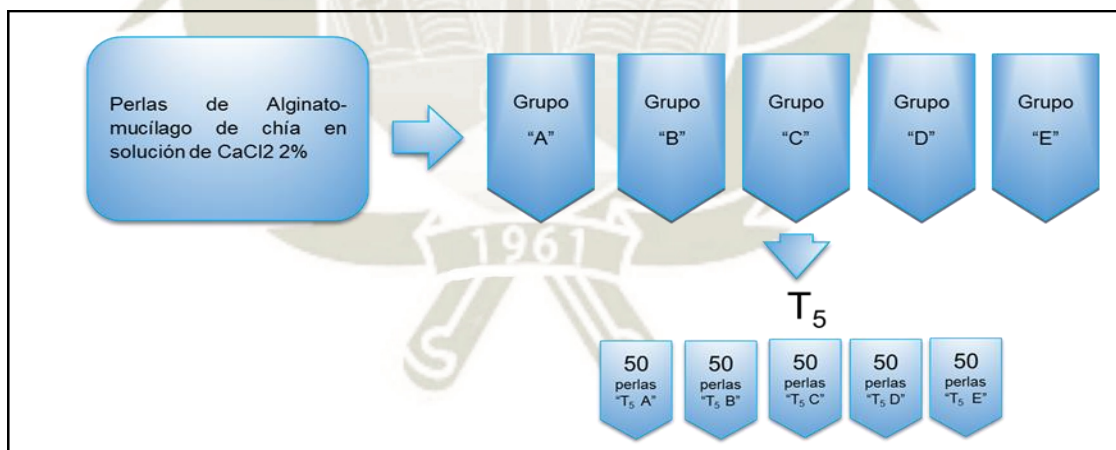


Figura 21. Selección de perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L. (chía)* para la aplicación de líquidos iónicos (T<sub>5</sub>).

#### ii. Lavado:

A las perlas contenidas en el tubo fálcon se les añadió 2mL de agua destilada y se dejó en estado de reposo por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se retiró el agua con una pipeta pasteur. Este paso se realizó por triplicado.

**iii. Secado por absorción:**

Después del tercer lavado se seleccionaron 3 perlas por cada repetición y se colocaron sobre parafilm, se eliminó el exceso de agua por capilaridad con una pipeta pasteur y por absorción utilizando papel kimwipe<sup>8</sup>.

**iv. Inmersión de las perlas de alginato de calcio-mucílago de chíá:**

Al finalizar el secado se tomaron 100  $\mu$ L de acetato de 1-etil-3-metilimidazolio con una micropipeta de líquidos viscosos, se cubrieron las perlas y se dejó en estado de reposo por 5 min. Luego se seleccionaron algunas perlas para realizar el segundo análisis de imagen como se describe más adelante en el ítem I. inciso B).

**v. Secado por absorción:**

Después de los 5 min se eliminó el exceso de líquido iónico por capilaridad con una pipeta pasteur y secado por absorción utilizando kimwipes<sup>8</sup>. Luego se seleccionaron algunas perlas para realizar el tercer análisis de imagen como se describe más adelante en el ítem I. inciso C).

**vi. Montaje:**

Sobre un portamuestras se colocó la cinta conductora de doble cara de cobre, las 3 perlas secas se montaron con mucho cuidado sobre la cinta para que queden fijas. De tal forma que éstas quedarán listas para introducir las en el MEB<sup>1</sup>.

**2.6.3. Establecimiento en las diferencias entre los métodos de preparación de muestras con tratamientos tradicionales (físicos y físico-químicos) y químicos (líquido iónico) que se observan por microscopía electrónica de barrido a través de un análisis cualitativo:**

Las perlas fijadas en los portamuestras y preparadas con los tratamientos tradicionales se introdujeron en un microscopio electrónico de barrido JSM-7800 Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope.

Entonces el portamuestra con las perlas recubiertas con oro se introdujo primero en una precámara de intercambio, ya que la cámara principal o de análisis se encuentra en alto vacío, esta precámara se abrió introduciendo una corriente de nitrógeno, a continuación se cerró la cámara de intercambio y se volvió a hacer vacío en la misma, cuando se equilibró el vacío en ambas cámaras se introdujo el portamuestra en la cámara de análisis.

Una vez que se alcanzó alto vacío se encendió el filamento y se establecieron los parámetros del equipo como aceleración de voltaje (15 V), distancia de trabajo ( $Z=30$  mm) y se programó el uso del detector de electrones secundarios. Estos parámetros se establecieron mediante pruebas preliminares.

Para las perlas tratadas con el líquido iónico, el portamuestra se introdujo en la cámara de vacío del microscopio electrónico de barrido (Jeol Mod. JSM-5800 LV), se esperó hasta que alcance el alto vacío, luego se establecieron los mismos parámetros del microscopio con las perlas con tratamientos tradicionales.

Se utilizaron dos equipos diferentes debido a que el microscopio electrónico de barrido (Jeol Mod. JSM-5800 LV) no estuvo disponible debido a fallas técnicas por lo cual se tomó la decisión de trabajar con el microscopio electrónico de barrido JSM-7800 Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope.

Se tomaron 15 microfotografías con magnificaciones de 40X y otras a 200X, 500X y 1000X para observar la estructura completa de las perlas y la diferencia entre los métodos de preparación de muestras con tratamientos tradicionales (físicos y físico-químicos) y químicos (líquido iónico) a través de un análisis cualitativo.

#### **2.6.4. Comparar el efecto de los métodos de preparación utilizando el líquido iónico y los tratamientos tradicionales sobre las características morfométricas iniciales y de textura dentro del microscopio electrónico de barrido a partir de un cuarto análisis de imagen.**

De las 15 microfotografías de las perlas tomadas a 40X se realizó el cuarto análisis de imagen como se describe más adelante en el ítem I inciso D). el cual fue para evaluar el efecto de los tratamientos sobre las características morfométricas iniciales dentro de los microscopios. Así mismo se tomaron 15 microfotografías a 500X para evaluar el efecto de los tratamientos sobre las características de textura de las perlas.

##### **I. Descripción de los análisis de imágenes respectivos:**

Para monitorear el efecto de los tratamientos sobre las perlas se realizaron 4 análisis de imagen. A continuación la Figura 22 y la Figura 23 muestran un resumen de los tratamientos tradicionales y del líquido iónico respectivamente indicando los puntos donde se efectuaron los análisis de imagen (puntos marcados con asteriscos):

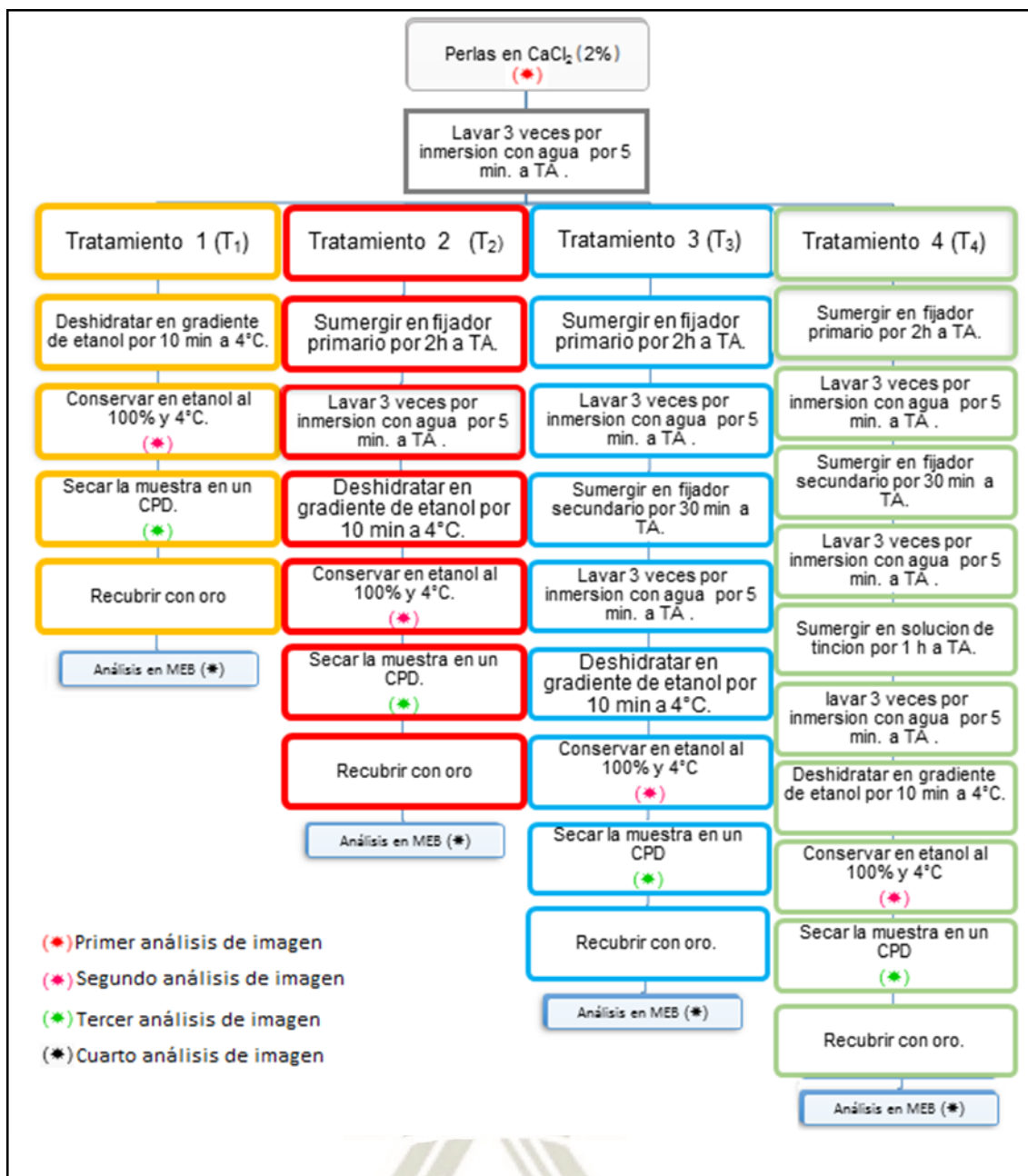


Figura 22. Preparación de las perlas con métodos tradicionales

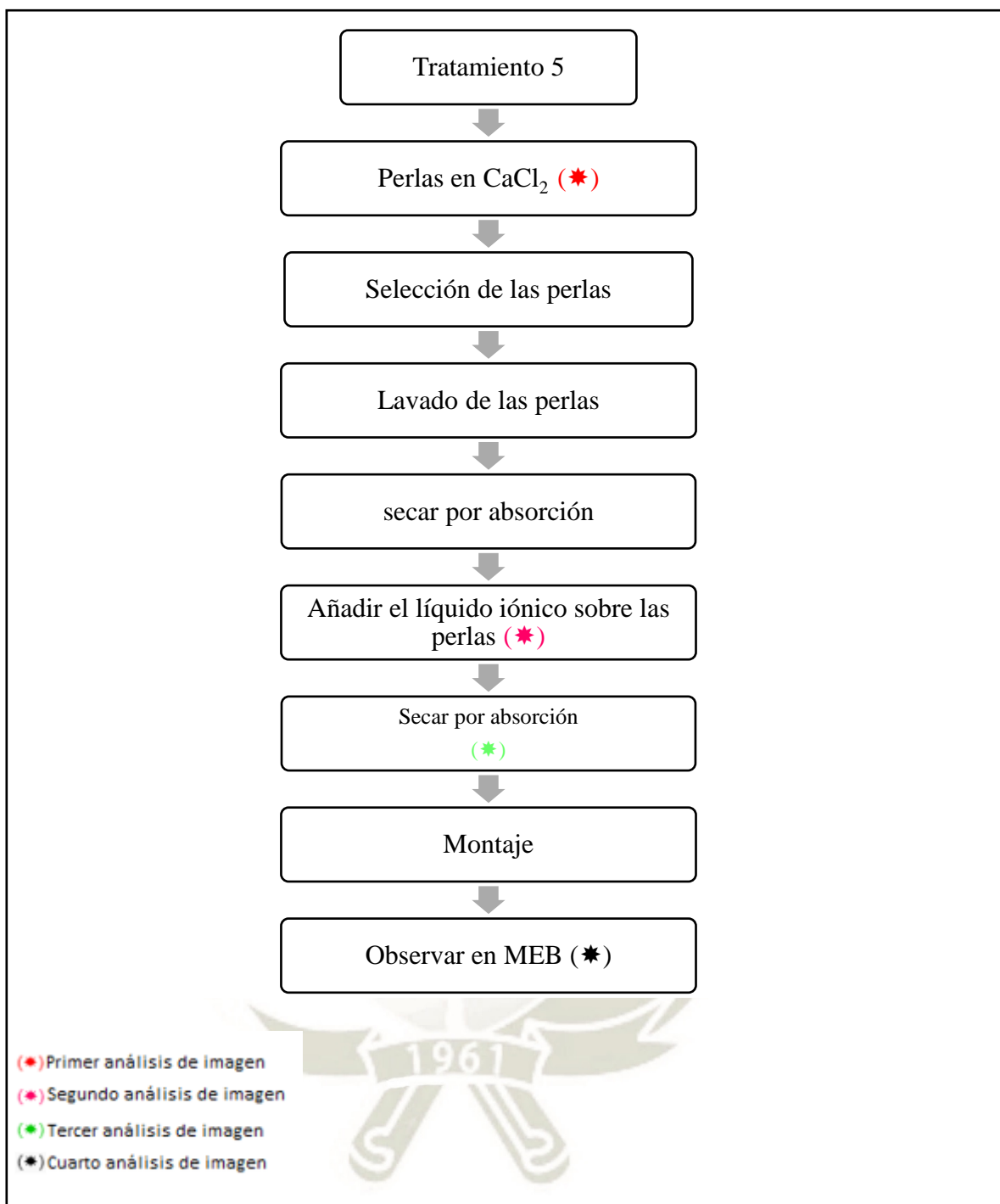


Figura 23. Secuencia de preparación de perlas con el método de líquido iónico.

#### A. Primer análisis de imagen:

En este punto se determinó las características morfométricas iniciales de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L. (Chía)* mediante un análisis de imagen, el cual se detalla a continuación<sup>9</sup>:

**i. Selección de las muestras:**

Se aislaron 50 perlas por cada repetición y se colocaron en placas Petri con 20 mL de agua destilada, la Figura 24 muestra la selección de perlas para la obtención de las características morfométricas iniciales ( $T_0$ ):

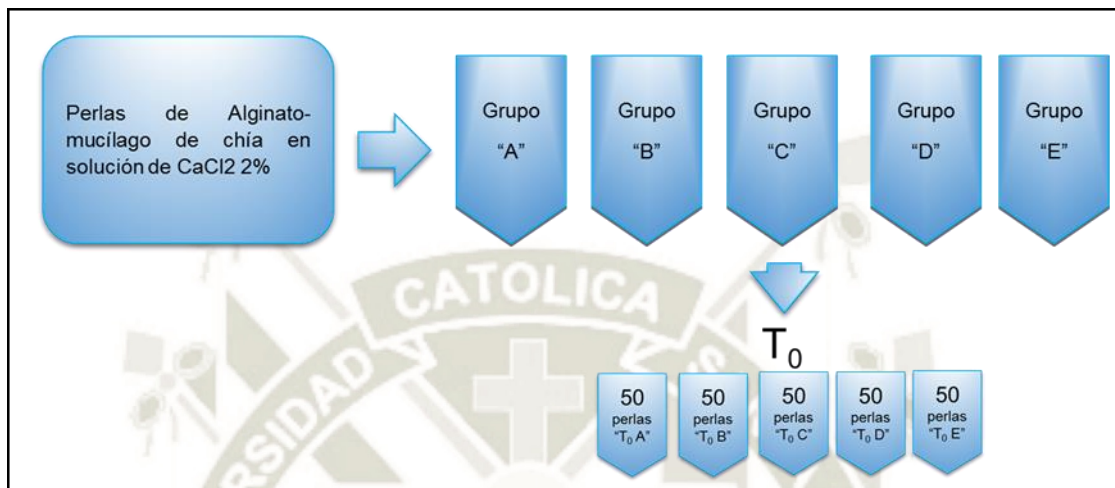


Figura 24. Selección de perlas sin tratamiento ( $T_0$ ) para su respectivo análisis de imagen.

**ii. Obtención de imágenes:**

Las placas se colocaron dentro del escáner (HP Scanjet G3010) junto con una regla metálica de 20 cm para fijar la escala, las imágenes se adquirieron a una resolución de 2400ppp y se guardaron en formato JPEG<sup>10</sup>.

**iii. Procedimiento para el análisis de imagen de las características morfométricas:**

Las imágenes obtenidas se cambiaron a escala de grises (8 bits) utilizando el software ImageJ (National Institutes Health, Bethesda, Md, EE. UU.), luego se ajustó la imagen con la herramienta Umbral para obtener un histograma, el cual nos muestra las imágenes segmentadas a escala de grises en características de interés y fondo. Se ajustó el valor máximo y mínimo hasta obtener la forma de las perlas originales, luego se estableció los píxeles del umbral en negro y todos los demás píxeles en blanco, como se muestra en la siguiente Figura 25:



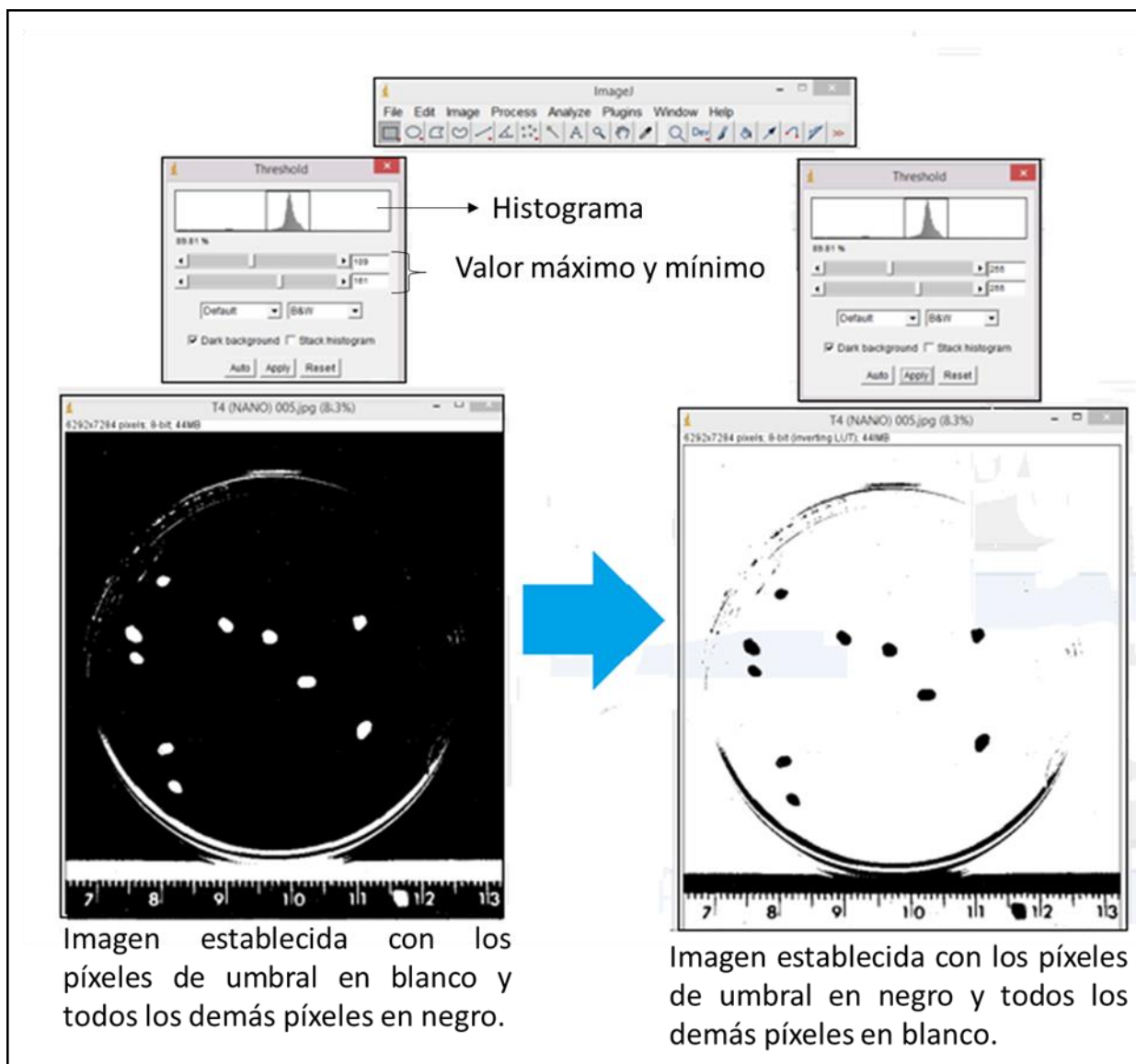


Figura 25: Ajuste del umbral de imagen con el software ImageJ.

Una vez obtenido el umbral en negro se procedió a fijar la escala utilizando la regla como distancia conocida, resultando un valor de 94.4 pixels/mm de manera que se obtuvieron las medidas en unidades milimétricas.

Luego con la herramienta “limpiar” se eliminó todo el fondo, hasta quedarse solo con las perlas. Se procedió a utilizar nuevamente la herramienta de umbral, luego en el menú de análisis se seleccionaron las siguientes herramientas para determinar las características morfométricas, estas fueron diámetro de Féret (mm), relación de aspecto (AR) y factores de forma (circularidad).

Por último se utilizó la herramienta de analizador de partículas con las que se obtuvieron los valores de estas características morfométricas iniciales<sup>55</sup>.

## **B. Segundo análisis de imagen:**

En este punto se comparó el efecto de los tratamientos tradicionales y la aplicación del líquido iónico durante la preparación de las perlas sobre sus características morfométricas iniciales por primera vez, la cual se detalla a continuación:

### **i. Selección de muestras:**

En el último punto de deshidratación con etanol al 100%, para los tratamientos tradicionales, se aislaron 10 perlas por cada repetición y se colocaron en placas Petri con 20 mL de etanol frío 96%.

En el caso de las perlas con tratamiento de líquido iónico, después de su inmersión se tomaron 2 perlas por cada repetición y colocaron en una placa Petri.

La obtención de imágenes y el procedimiento para el análisis de imagen de las características morfométricas se realizó como se describe en A inciso ii) y iii) respectivamente.

Para comparar el efecto de los tratamientos sobre las características morfométricas en este punto se realizó un análisis estadístico con los valores obtenidos por el análisis de imagen; como se detalla a continuación:

### **ii. Análisis estadístico:**

#### **a. Análisis estadístico:**

Los datos cuantitativos obtenidos por el análisis de imagen serán procesados por el programa estadístico Sigma Plot 14.0 para Windows, el cual es un paquete de gráficos y visualización, con funcionalidades de análisis estadístico, que permite exportar los gráficos generados a Excel y PowerPoint. Este programa permite realizar el análisis de varianza o ANOVA (por sus siglas en inglés) para comparar y observar las diferencias significativas entre distintos tratamientos<sup>56</sup>.

Entonces los valores obtenidos por el análisis de imagen se ordenaron por tratamientos y característica morfométrica, posteriormente estos valores se analizaron con el programa Sigma Plot 14.0 con el cual se corrió un análisis de varianza (ANOVA), este permitió comparar el efecto de cada tratamiento sobre las características morfométricas iniciales de las perlas e identificar la diferencia significativa entre cada uno ( $P < 0.05$ )<sup>56</sup>.

### **C. Tercer análisis de imagen:**

En este punto se comparó el efecto de los tratamientos tradicionales y líquido iónico sobre las características morfométricas iniciales de las perlas durante la preparación por segunda vez, la cual se detalla a continuación:

#### **i. Selección de muestras:**

Al finalizar el secado de punto crítico, en el caso de los tratamientos tradicionales, se aislaron 10 perlas de cada tratamiento y se colocaron en placas Petri.

En el caso de las perlas con tratamiento de líquido iónico, después del secado por absorción se tomaron 2 perlas por cada repetición y se colocaron en una placa Petri.

La obtención de imágenes y el procedimiento para el análisis de imagen de las características morfométricas se realizaron como se describe en el punto A inciso ii) y iii) respectivamente y el análisis estadístico como se puntualiza en B inciso ii).

### **D. Cuarto análisis de imagen:**

Este cuarto análisis se realizó para precisar la diferencia entre los métodos de preparación de muestras con tratamientos tradicionales (físicos y físico-químicos) y químicos (líquido iónico) que se observan por microscopía electrónica de barrido, y para determinar el efecto del uso de líquido iónico sobre las características morfométricas iniciales y superficiales dentro del MEB.

#### **i. Selección de muestras:**

Este análisis se realizó a partir de las perlas que se introdujeron en los respectivos MEB; Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Schottky (JSM-7800F) para las perlas con tratamientos tradicionales y (Jeol Mod. JSM-5800 LV) para el tratamiento con líquido iónico.

#### **ii. Obtención de imágenes:**

Se tomaron 15 microfotografías de cada tratamiento con aumentos de 40X y 15 KV, también se tomaron microfotografías a mayores aumentos para observar con más detalle la superficie de las perlas.

### iii. Procedimiento para el análisis de imagen:

A las microfotografías obtenidas a 40X se les realizaron dos tipos de análisis de imagen; uno para obtener el efecto de los tratamientos sobre las características morfométricas y el segundo para observar el efecto sobre las características topográficas o superficiales de las perlas, a través de un análisis de textura.

El procedimiento para obtener las características morfométricas, se realizó como se describe en el punto A inciso ii), pero se modificó la escala ya que se utilizó la medida de la barra que aparece en cada microfotografía; en el caso de las microfotografías obtenidas con el microscopio (JSM-7800F) la escala fue de 440 pixels/mm y las microfotografías obtenidas con el (Jeol Mod. JSM-5800 LV) fue 470 pixels/mm. Las características morfométricas que se seleccionaron fueron área ( $\text{mm}^2$ ), diámetro de Féret máximo (mm), relación de aspecto (AR) y factores de forma (circularidad)<sup>47</sup>.

El procedimiento para obtener las características de textura o superficiales a partir de las microfotografías, se determinó con el complemento GLCM versión 0.4 del programa ImageJ ya que este calcula las características de textura establecidas en matrices de coincidencia de nivel de gris. Para este análisis primero se capturó una región de interés (FOV), el cual representa el 50 % del área central de cada perla, luego se ajustó el FOV a escala de grises (8 bits), después se seleccionaron los parámetros del complemento GLCM, los cuales analizaron la textura de la imagen estudiando la dependencia espacial de los valores de píxeles representados por una matriz de coincidencia  $P_{(d, \theta)}$  con la entrada  $P_{(d, \theta)}(I, J)$  siendo la frecuencia o distancia relativa para dos píxeles (d) separados en la dirección ( $\theta$ ) para tener valores I y J respectivamente.

Estos parámetros se midieron a una distancia (d) igual a 1, el ángulo de desplazamiento ( $\theta$ ) igual a  $0^\circ$ , y se activaron los parámetros de momento de diferencia inversa (homogeneidad) y entropía, la primera mide la homogeneidad local de píxeles en la imagen y es lo opuesto a la entropía, por ejemplo a valores altos de homogeneidad se tiene una superficie homogénea mientras que en la entropía a valores altos indican que se está frente a una superficie rugosa por su distribución irregular de píxeles en la imagen<sup>49,50</sup>.

**iv. Análisis estadístico:**

El análisis estadístico se realizó como se describe en el punto B inciso ii). Tanto para el análisis de las características morfométricas como para las características de textura o superficiales<sup>56</sup>.



## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

#### 3.1. Obtención de perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L.* (chía), como muestra biológica de alta humedad y la determinación de las características morfométricas iniciales a través del primer análisis de imagen.

Se obtuvieron perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L.* (*Chía*) homogéneas con las siguientes características morfométricas iniciales:

Tabla 3: Características morfométricas iniciales de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L.* (*Chía*).

<i>Diámetro de feret máximo</i>	<i>Relación de aspecto</i>	<i>Circularidad</i>
3.29 mm $\pm$ 0.05	1.25 $\pm$ 0.02	0.82 $\pm$ 0.01

Estas características morfométricas iniciales que se observan en la Tabla 3 se obtuvieron de 5 repeticiones (A, B, C, D y E) con por lo menos 50 objetos por repetición, estas presentaron un diámetro de Feret máximo de 3.29 mm  $\pm$  0.05, una relación de aspecto de 1.25  $\pm$  0.02 y la circularidad fue 0.82  $\pm$  0.01, el diámetro de Feret indica el tamaño inicial de las perlas, la relación de aspecto muestra que el diámetro de Feret máximo es 1.25  $\pm$  0.02 veces más que el diámetro de Feret menor, por lo tanto la forma inicial de las perlas no es circular como se esperaba, esto coincide con el factor de forma que resultó 0.82  $\pm$  0.01, la circularidad es un parámetro de factor de forma (SF, por sus siglas en inglés) donde un círculo perfecto tiene un SF de 1.0 y una línea tiene un SF cercano a cero. Por lo tanto la metodología para la obtención de perlas utilizando la bomba de jeringa a presión, flujo y distancia de trabajo constante permitió obtener muestras homogéneas.

Por otro lado en las imágenes de las perlas sin tratamiento  $T_0$  obtenidas utilizando el escáner, también se pudo observar que el mucílago de *Salvia hispánica L.* (*Chía*) se distribuye de forma no homogénea en cada perla, como se muestra en la Figura 26:

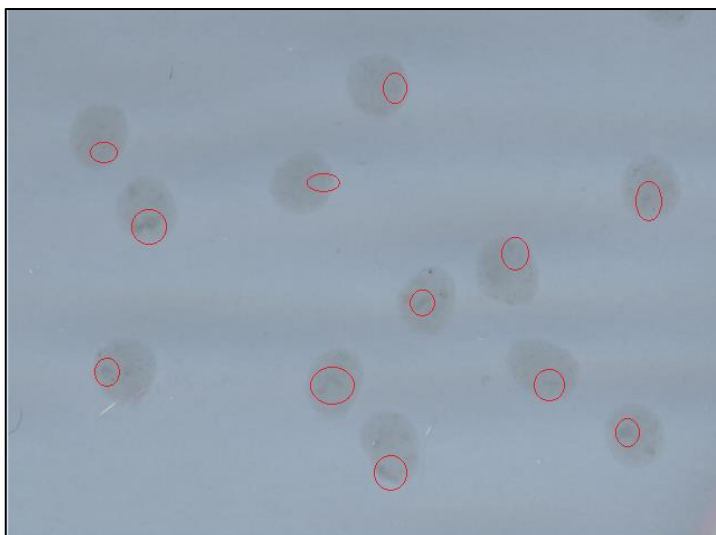


Figura 26. Distribución del mucílago de chíá delimitada con círculos rojos en cada perla reticulada con iones calcio.

Esta distribución no homogénea del mucílago en las perlas estaría provocando un cambio considerable en la forma de cada perla, esta misma distribución afecta la deformación de la gota al desprenderse de la aguja, esto puede estar relacionado con la alta viscosidad y microestructura que presenta el mucílago. Refiriéndose a la microestructura se han identificado moléculas con hidrocarburos insaturados que podrían ser lípidos y otros polisacáridos como la D-Xilosa, D-Manosa, D-Arabinosa, D-Glucosa<sup>46</sup>, se propone que por sus estructuras no estarían formando parte de la red polimérica reticulada con el calcio por lo que se distribuyen de forma diferente. Pero otros polisacáridos identificados como ácido glucorónico y ácido galacturónico del mucílago de *Salvia hispánica* L. (*chía*), que por su estructura química se podrían estar uniendo a los monómeros de los ácidos urónicos del alginato para formar parte de la red polimérica que interacciona con el calcio.

Otro factor que podría estar afectando la forma de las perlas es el tamaño de la partícula del polvo fino del mucílago de *Salvia hispánica* (*chia*), ya que se observó que al momento de mezclar la solución de alginato y la solución de mucílago este último no se homogenizaba del todo y cuando se dejaba de agitar estas partículas precipitaban y otras pocas quedaban en suspensión, por lo cual se sugiere que se trabaje con una polvo más fino para que se llegue a homogenizar del todo con el alginato o filtrar la solución y así también obtener perlas con mejores propiedades.

A través de la imagen en la Figura 26 también se pudo observar que los polisacáridos se mantienen en su forma hidratada o estado semisólido, lo cual la asemeja a la sustancia

polimérica extracelular (EPS) de los microorganismos en donde el agua, como componente principal, ocupa el 97% de la red polimérica, considerándose así a las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (*chía*) como una muestra biológica de alta humedad y por lo tanto un medio de inmovilización como los EPS el cual en dicha red quedan atrapadas células, iones y productos solubles de baja y alta masa molecular<sup>38</sup>.

Esta observación proporcionó la información necesaria sobre la naturaleza de las perlas, de manera que se pudo establecer los métodos de preparación de las muestras para observarlas en un microscopio electrónico de barrido.

### **3.2. Comparación del efecto de los métodos de preparación en la observación de muestras con alto contenido de agua utilizando tratamientos tradicionales y un líquido iónico por microscopía electrónica de barrido a partir del segundo y tercer análisis de imágenes sobre las características morfológicas iniciales de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (Chía) durante la preparación de muestras:**

#### **3.2.1. Segundo análisis de imagen:**

Se presentan los resultados del segundo análisis de imagen que muestran el promedio y coeficiente de variación de 5 repeticiones por tratamiento con por lo menos 10 objetos por repetición. Letras iguales en cada barra de los gráficos de la Figura 27 significa que no hay diferencia significativa entre tratamientos ( $P < 0.05$ ):

En las tablas 4, 5, y 6 y en la figura 27 con los Gráficos i), ii) y iii), se muestran la comparación del efecto de la deshidratación en gradiente de etanol frío ( $T_1$ ) con el efecto de la aplicación de fijadores químicos seguido de la deshidratación ( $T_2$ ,  $T_3$  y  $T_4$ ) y el uso de líquido iónico ( $T_5$ ), sobre el diámetro de Féret, la relación de aspecto y la circularidad inicial ( $T_0$ ), donde se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de ( $P = < 0.001$ ), ( $P = 0.001$ ) y ( $P = 0.003$ ) respectivamente. Los datos completos del ANOVA se muestran en el ANEXO 2 inciso A).

Es importante resaltar que para los tratamientos físico-químicos, se evaluó el efecto de los fijadores químicos después de la deshidratación porque en pruebas previas se observó que las perlas se disgregaban luego de la aplicación de tetróxido de osmio y ácido tánico de los tratamientos  $T_3$  y  $T_4$  respectivamente, esto sucedía al extraer las muestras para el análisis de imagen. En el caso de  $T_2$  no se observó este inconveniente ya que estas perlas presentaron mayor dureza después de su fijación.



Tabla 4 Diámetro de feret máximo (mm) del Segundo análisis de imagen

<i>Segundo análisis de imagen</i>		
<i>Tratamiento</i>	<i>Diámetro de feret máximo (mm)</i>	
	<i>T0</i>	<i>Final</i>
T1	3.29 ± 0.05	2.97 ± 0.12
T2	3.29 ± 0.05	3.29 ± 0.08
T3	3.29 ± 0.05	3.29 ± 0.13
T4	3.29 ± 0.05	3.86 ± 0.18
T5	3.29 ± 0.05	3.00 ± 0.19

Tabla 5 Relación de aspecto del Segundo análisis de imagen

<i>Segundo análisis de imagen</i>		
<i>Tratamiento</i>	<i>Relación de aspecto</i>	
	<i>T0</i>	<i>Final</i>
T1	1.25 ± 0.02	1.23 ± 0.04
T2	1.25 ± 0.02	1.30 ± 0.06
T3	1.25 ± 0.02	1.33 ± 0.03
T4	1.25 ± 0.02	1.30 ± 0.03
T5	1.25 ± 0.02	1.25 ± 0.14

Tabla 6 Circularidad del Segundo análisis de imagen

<i>Segundo análisis de imagen</i>		
<i>Tratamiento</i>	<i>Circularidad</i>	
	<i>T0</i>	<i>Final</i>
T1	0.82 ± 0.01	0.79 ± 0.05
T2	0.82 ± 0.01	0.77 ± 0.02
T3	0.82 ± 0.01	0.72 ± 0.05
T4	0.82 ± 0.01	0.75 ± 0.04
T5	0.82 ± 0.01	0.80 ± 0.05

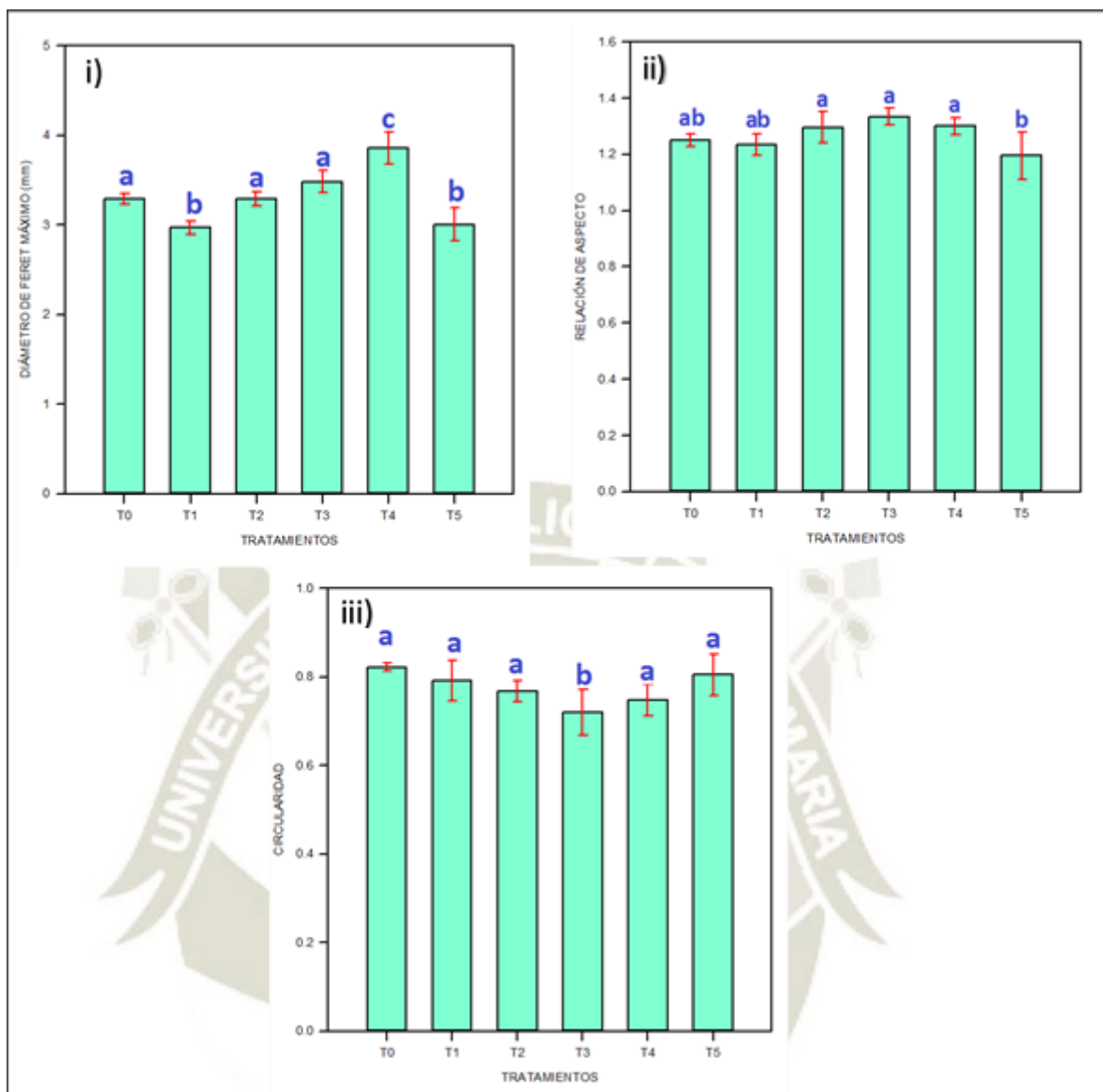


Figura 27. Gráficos del segundo análisis de imagen i) Diámetro de Féret, ii) relación de aspecto y iii) circularidad.

En la tabla 4 y en el Gráfico i) (ver Figura 27), se observa que la deshidratación en gradiente de etanol frío (T<sub>1</sub>) y la aplicación del líquido iónico (T<sub>5</sub>) reducen el diámetro de Feret inicial (T<sub>0</sub>) de  $3.29 \pm 0.05$  mm a  $2.97 \pm 0.12$  mm y  $3.00 \pm 0.19$  mm respectivamente, entre ambos tratamientos no se observa diferencia significativa, en cuanto a T<sub>1</sub>, esta disminución podría estar atribuida a la reducción de la fuerte tensión superficial del agua en la muestra por el etanol, ya que este debilita los enlaces puente de hidrógeno del agua, afectando el tamaño de las perlas<sup>5</sup>. En el caso de T<sub>5</sub> se conoce que el acetato de 1etil 3 metil imidazolio es hidrofílico y se une con moléculas de agua a través de enlaces puente de hidrógeno, como lo propone Brehm et al. 2012<sup>37</sup> y es el anión acetato que se encarga de formar esta interacción, como se muestra en la Figura 28, debilitando los enlaces

puente de hidrógeno del agua, disminuyendo así la tensión superficial y por consecuencia el tamaño de las perlas al igual que el etanol.

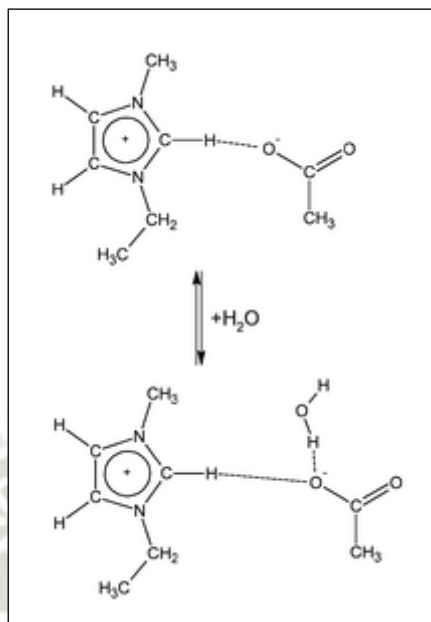


Figura 28. Interacción del acetato de 1etil 3 metil imidazolio con el agua<sup>37</sup>.

En cuanto a las perlas con T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> no se observó una disminución en sus diámetros iniciales a comparación de los otros tratamientos, sus valores fueron  $3.29 \pm 0.08$  mm y  $3.48 \pm 0.13$  mm respectivamente, así mismo no hubo diferencia significativa entre sus diámetros con las de T<sub>0</sub>, estos resultados sugieren que la aplicación de la solución fijadora primaria de T<sub>2</sub> y secundaria en T<sub>3</sub> mantienen el diámetro de las muestras, esto podría atribuirse a la incorporación de los agentes reticulantes como: el DCC, la L-lisina y azul de alcian en la solución fijadora primaria y el tetróxido de osmio, en la solución fijadora secundaria. La combinación de L-lisina, azul de alcian y glutaraldehído se ha demostrado que estabilizan polisacáridos extracelulares aniónicos fibrosos de tres especies de *Staphilococcus* para microscopia electrónica de transmisión<sup>22</sup>. Debido a que el glutaraldehído tiene una baja afinidad por los polisacáridos se reemplazó por N, N-diciclohexilcarbodiimida (DCC), el cual se ha propuesto como agente reticulante porque entrelaza los grupos carboxilo presentes en polisacáridos<sup>1</sup>. Por otro lado, el DCC se usa ampliamente como un agente de condensación eficaz para la aglomeración directa de ácidos carboxílicos con aminas y alcoholes para dar fácilmente amidas y ésteres respectivamente<sup>57</sup>. Además, el DCC también se utilizó como agente de condensación en la síntesis de péptidos y ha sido el reactivo más importante para la activación y acoplamiento desde entonces, esta carbodiimida reacciona con los acil aminoácidos para

dar anhídridos simétricos, ésteres activados o actuar directamente como un agente acoplante. En cualquier caso el primer evento de la activación es la formación de una O-acilurea, la cual es muy reactiva<sup>58</sup>.

Se conoce también que los ésteres activados de la O-Acilurea reaccionan fácilmente con una variedad de polímeros funcionales que tienen grupos hidroxilo o amino terminales<sup>57</sup>. En el caso de la estructura del alginato de calcio presentan abundantes grupos hidroxilo. Por otro lado, un espectro Raman reveló la presencia de grupos funcionales como hidroxilo en mucílago de *Salvia hispánica L. (Chía)* pertenecientes a polisacáridos tales como glucomanano, xilanos y arabinoxilanos entre otros<sup>47</sup>.

Por lo descrito anteriormente se propone que la lisina activó al DCC para formar O-Acilurea en la solución fijadora primaria, la cual es muy reactiva por su grupo éster activado, esta molécula interactuará con los grupos hidroxilo de los ácidos urónicos que forman el polímero para establecer nuevos entrecruzamientos, volviendo la estructura más rígida y finalmente resultarían perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica (Chía)* co-reticulados. Esto se describe en la figura 29.

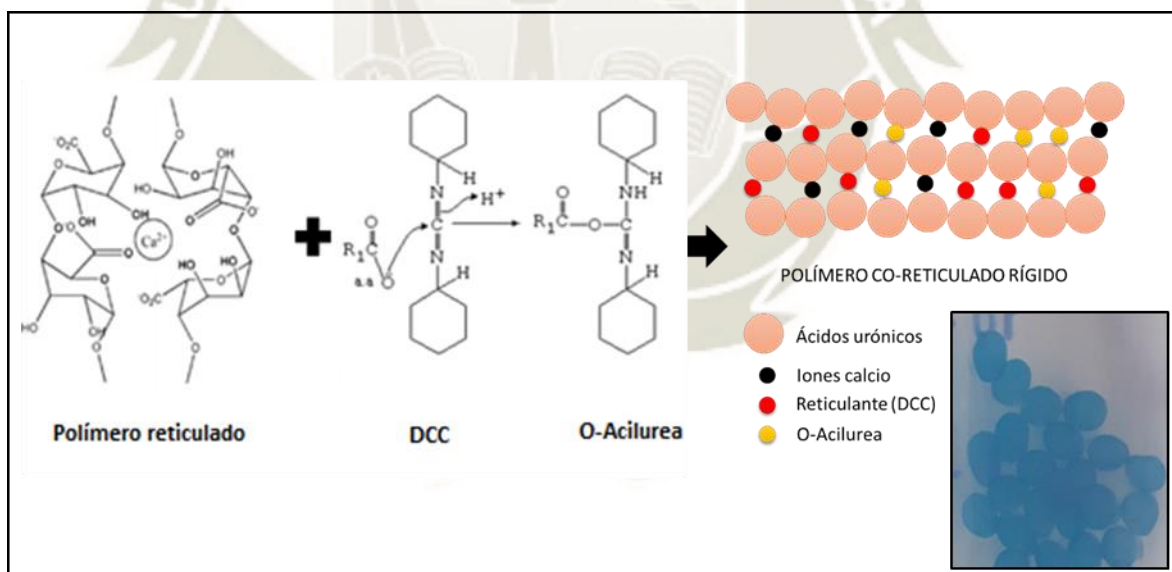


Figura 29: Co-reticulación de los polímeros que forman las perlas alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L (Chía)*.

Además, como el reticulante está en mayor concentración en la solución fijadora primaria hace que la red del gel sea más densa, lo que restringe la penetración de moléculas de agua en las redes del hidrogel y por lo tanto, disminuye su capacidad de hinchamiento, esto coincide con lo reportado por Mohan et. al 2007<sup>59</sup>.

En la figura 29 también se observa que las perlas se tiñeron de color azul, esto se dio porque el azul de alcian (AB, por sus siglas en inglés) actúa a través de enlaces electrostáticos o iónicos con restos de carga negativa, especialmente polisacáridos complejos<sup>22</sup>.

Los colorantes catiónicos, como el AB, estarían mejorando las interacciones de reticulación entre el DCC y la L-lisina con los polímeros aniónicos, resultando una estabilización mejorada de todo el complejo y una estructura más resistente. Este resultado coincide con lo reportado por Fassel et al. 1993<sup>22</sup>, donde se determinó que la lisina es capaz de mejorar la interacción de AB con glutaraldehído en la estabilización del glucocálix de distintas especies de staphilococcus, observándose material fibroso más extenso utilizando la combinación de lisina con AB que con otros colorantes catiónico a través de un microscopio electrónico de transmisión.

En el caso del tratamiento 3, en el cual se incorporó el fijador secundario, este contiene el tetróxido de osmio, oxidante fuerte, se sabe que este reacciona con hidrocarburos insaturados para fortalecer estas interacciones, en el caso de los grupos funcionales del mucílago de Salvia hispánica L. (*Chía*) se ha observado mediante un espectro Raman la presencia de interacciones de doble enlace entre carbonos<sup>47</sup>. Este fuerte oxidante hizo que las muestras se vuelvan más sensibles después de su incorporación, pero no altero el tamaño de las perlas.

En la tabla 4 y en el Gráfico i), también se observa un aumento en el diámetro inicial de las perlas con T<sub>4</sub>, debido a que las perlas responden a ligeros cambios en su entorno tales como los componentes químicos de la solución de tinción. Un estudio en el que se evaluó el carácter polianiónico de las redes poliméricas del acrilato de sodio sobre hidrogeles de poli (*N*-isopropilacrilamida), para que este tenga la capacidad de absorber agua del medio, afirmaron que esta respuesta se relaciona con la incorporación de pequeñas cantidades de unidades iónicas en las redes poliméricas no iónicas, este es un método empleado para aumentar la hinchazón y las características de respuesta de los hidrogeles<sup>59</sup>. Entonces el incremento en el diámetro de las perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica (*Chía*) sería la consecuencia de la formación de unidades iónicas en la solución de tinción, el cual contiene el ácido tánico y cacodilato de sodio trihidratado; pues el ácido tánico es un polímero compuesto por glucosa y ácido gálico y este último es considerado un ácido fuerte por el valor de su pKa<sup>4.2</sup>, este puede reaccionar con los iones sodio del buffer, formándose un polímero con unidades iónicas en la solución de tinción, proporcionándole

el carácter polianiónico a las cadenas poliméricas de las perlas co-reticuladas provocando el aumento del diámetro en las perlas por la absorción de agua. Este mismo efecto de aumento de diámetro se observó en la fijación de filamentos de actina donde se utilizó diferentes soluciones de ácido tánico a diferentes concentraciones y cocadilato de sodio 0.1M, las microfotografías obtenidas por microscopia electrónica mostraron deformación e hinchamiento de los filamentos a comparación de otros fijadores que contienen aminas y glutaraldehído<sup>21</sup>.

La incorporación de ácido tánico protege a las muestras del efecto oxidante del tetraóxido de osmio<sup>21</sup>, tiene la capacidad de unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas<sup>2</sup>, también mejora la conductividad de las muestras lo cual serviría para visualizar detalles topográficos diminutos<sup>(53)</sup>, sin la necesidad del pulverizador con oro<sup>1</sup>; entonces se podría sugerir el uso de otro buffer para aprovechar las ventajas del ácido tánico en MEB.

En la tabla 5 y en el Gráfico ii) (ver Figura 27), se observa que entre la deshidratación en gradiente de etanol frío (T<sub>1</sub>), la incorporación de soluciones con fijadores químicos (T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>) y el líquido iónico (T<sub>5</sub>) no hay diferencia significativa con la relación de aspecto inicial (T<sub>0</sub>), así mismo los valores obtenidos fueron  $1.23 \pm 0.04$ ,  $1.30 \pm 0.06$ ,  $1.33 \pm 0.03$ ,  $1.30 \pm 0.03$ ,  $1.25 \pm 0.14$  para T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub> respectivamente. Entonces no hay cambios en la relación de aspecto inicial de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* L. (*Chía*) por los tratamientos, estos resultados también indican que las perlas que han aumentado o disminuido de tamaño lo han hecho de forma proporcional sin alterar la relación entre sus diámetros iniciales.

En la tabla 6 y en el Gráfico iii) (ver Figura 27), se comparan los efectos en el factor de forma de circularidad inicial (T<sub>0</sub>) por T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub>; se observa que solo T<sub>3</sub> altera la circularidad inicial de las muestras porque hubo diferencia significativa en donde el valor inicial del factor de forma varió de  $0.82 \pm 0.01$  a  $0.72 \pm 0.05$ . Esto podría atribuirse al fuerte efecto oxidante del tetróxido de osmio, ya que se observó que después de la fijación secundaria, las muestras resultaban más frágiles por lo que se tuvo que realizar los lavados y deshidratación con mucho cuidado para no alterar la forma de las perlas por causas mecánicas. Se esperaba que las perlas tratadas con ácido tánico (T<sub>4</sub>) resultaran también con cambios en su circularidad, ya que a estas también se les sometió a una fijación secundaria previamente, pero según la gráfica nos dice que no existe diferencia significativa entre T<sub>4</sub> y T<sub>0</sub> por lo que el ácido tánico estaría estabilizando la muestra a

nivel del entrecruzamiento de los polímeros ya que también tiene efecto reticulante<sup>60</sup>. Con esta observación se podría decir que las perlas no se deforman por el entrecruzamiento entre los polímeros.

Por otro lado los valores del factor de forma con los otros tratamientos fueron  $0.77 \pm 0.02$ ,  $0.72 \pm 0.05$ ,  $0.75 \pm 0.04$  y  $0.80 \pm 0.05$  para T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub> respectivamente, con los cuales no se observó diferencia significativa con el valor de factor de forma inicial.

### 3.2.2. Tercer análisis de imagen:

Se presentan los resultados del tercer análisis de imagen que muestra el promedio y coeficiente de variación de 5 repeticiones independientes por tratamiento con por lo menos 10 objetos por repetición. Letras iguales en cada barra de los gráficos de la Figura 30 significa que no hay diferencia significativa entre tratamientos ( $P < 0.05$ ):

En las tablas 7, 8 y 9 y en la Figura 30 con los gráficos i), ii) y iii), muestran la comparación del efecto del secado de punto crítico (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>) y el secado por absorción después de la aplicación del líquido iónico (T<sub>5</sub>) sobre el diámetro de Feret, la relación de aspecto y la circularidad inicial (T<sub>0</sub>), donde se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de ( $P = < 0.001$ ), ( $P = 0.020$ ) y ( $P = 0.040$ ) respectivamente de las perlas. Los datos completos del ANOVA se muestran en el ANEXO 2 inciso B).

Tabla 7 Diámetro de feret máximo (mm) del Tercer análisis de imagen

<i>Tercer análisis de imagen</i>		
<i>Tratamiento</i>	<i>Diámetro de feret máximo (mm)</i>	
	<i>T0</i>	<i>Final</i>
T1	$3.29 \pm 0.05$	$2.53 \pm 0.11$
T2	$3.29 \pm 0.05$	$2.55 \pm 0.24$
T3	$3.29 \pm 0.05$	$2.43 \pm 0.11$
T4	$3.29 \pm 0.05$	$2.63 \pm 0.30$
T5	$3.29 \pm 0.05$	$3.00 \pm 0.19$

Tabla 8 Relación de aspecto del tercer análisis de imagen

<b><i>Tercer análisis de imagen</i></b>		
<b><i>Tratamiento</i></b>	<b><i>Relación de aspecto</i></b>	
	<b><i>T0</i></b>	<b><i>Final</i></b>
T1	1.25 ± 0.02	1.25 ± 0.14
T2	1.25 ± 0.02	1.19 ± 0.13
T3	1.25 ± 0.02	1.30 ± 0.12
T4	1.25 ± 0.02	1.42 ± 0.16
T5	1.25 ± 0.02	1.20 ± 0.08

Tabla 9 Circularidad del tercer análisis de imagen

<b><i>Tercer análisis de imagen</i></b>		
<b><i>Tratamiento</i></b>	<b><i>Circularidad</i></b>	
	<b><i>T0</i></b>	<b><i>Final</i></b>
T1	0.82 ± 0.01	0.80 ± 0.04
T2	0.82 ± 0.01	0.82 ± 0.03
T3	0.82 ± 0.01	0.85 ± 0.02
T4	0.82 ± 0.01	0.82 ± 0.02
T5	0.82 ± 0.01	0.80 ± 0.04



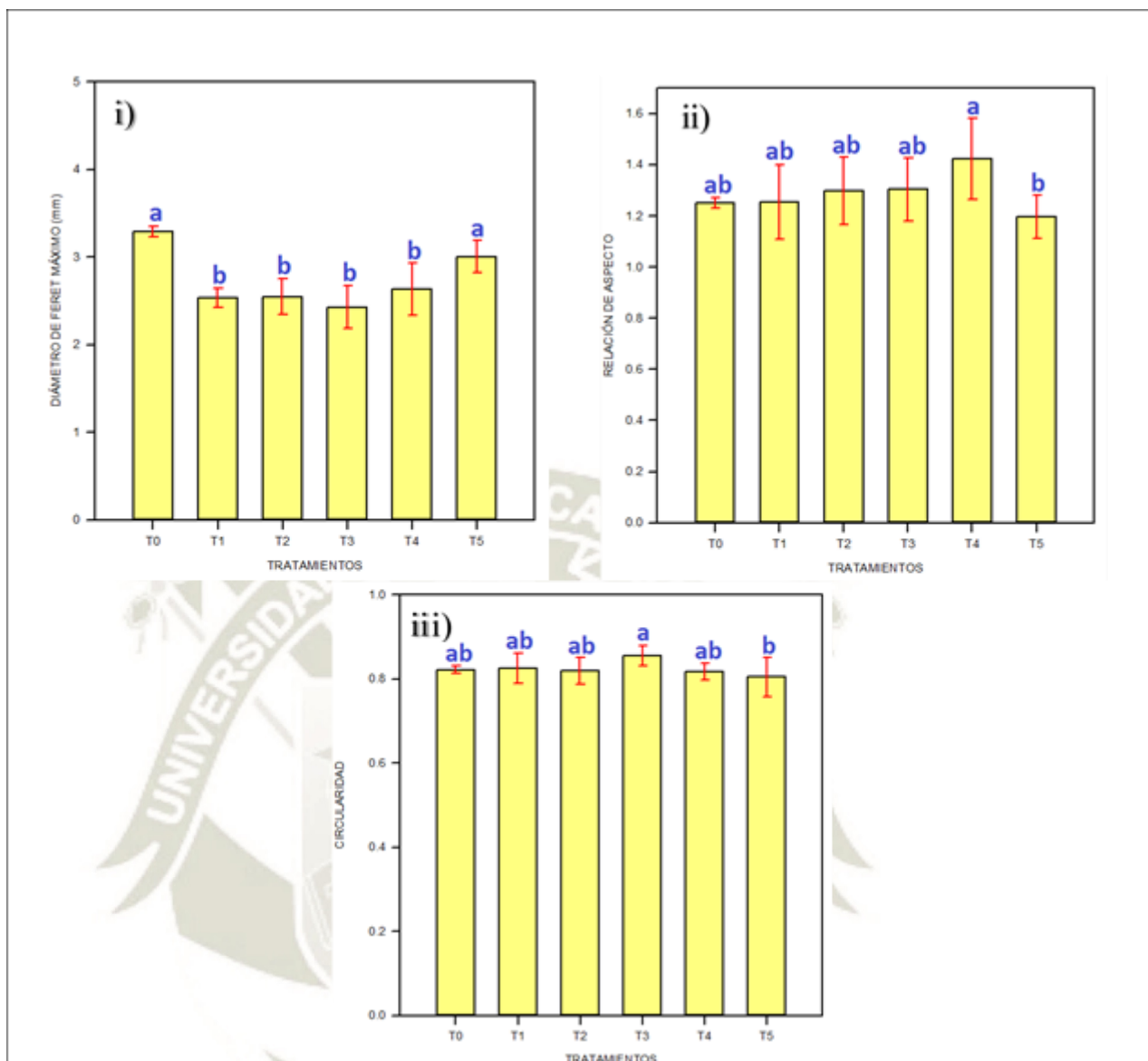


Figura 30. Gráficos del tercer análisis de imagen: i) Diámetro de Feret, ii) relación de aspecto y iii) circularidad.

En la tabla 7 y en el Gráfico i) (ver Figura 30), se observó que no hay diferencia significativa entre las perlas que se trataron con el método de secado de punto crítico (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>), sin embargo, si existe diferencia significativa entre estos y el diámetro de Feret inicial (T<sub>0</sub>). Los tratamientos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> disminuyeron el diámetro inicial de  $3.29 \pm 0.05$  mm a  $2.53 \pm 0.11$  mm,  $2.55 \pm 0.24$  mm,  $2.43 \pm 0.11$  mm y  $2.63 \pm 0.30$  mm respectivamente, representando un promedio de disminución del 22.93%. Esta disminución es debida al alto porcentaje de humedad que tiene la muestra, lo cual hizo que se extendiera el tiempo de la etapa de transición del etanol por el CO<sub>2</sub> líquido, la cual fue de 4 horas, sin embargo no se logró cambiar todo el fluido intermedio, provocando esta disminución cuando se llevó la muestra hasta el punto crítico.

Comparando el secado de los métodos tradicionales con el de líquido iónico se observa que el diámetro de Feret de estas perlas disminuyen de  $3.29 \pm 0.05$  mm a  $3.00 \pm 0.19$  mm. Pero no hay diferencia significativa entre estos valores.

El secado de punto crítico y el de absorción les proporcionaron las propiedades de adherencia sobre el portamuestra a las perlas. Lo cual es importante para colocar las muestras en la cámara de vacío del microscopio.

En la tabla 8 y en el Gráfico ii) (ver Figura 30), se observa que entre la relación de aspecto de  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_4$  y  $T_5$  no hay diferencia significativa con respecto a  $T_0$ , así mismo los valores obtenidos fueron  $1.25 \pm 0.14$ ,  $1.29 \pm 0.13$ ,  $1.30 \pm 0.12$ ,  $1.42 \pm 0.16$  y  $1.20 \pm 0.08$  respectivamente lo cual indica que si hay una disminución en sus tamaños, este se da de forma proporcional, es decir que se mantiene la relación entre el diámetro mayor y menor en las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (*chía*).

Y en la tabla 9 y en el Gráfico iii) (ver Figura 30), se observa que todos los tratamientos mantienen la forma inicial de las perlas, porque no hay diferencia significativa entre los valores de circularidad de  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_4$  y  $T_5$  con el valor de la circularidad inicial de  $T_0$ . Siendo estos valores  $0.8 \pm 0.04$ ,  $0.82 \pm 0.03$ ,  $0.85 \pm 0.02$ ,  $0.82 \pm 0.02$  y  $0.80 \pm 0.04$  respectivamente.

Hasta este punto las muestras preparadas con líquidos iónicos ya tienen las características necesarias para ingresar a la cámara de vacío del MEB y puedan ser observadas. Debido a que el acetato de 1 etil-3 metil imidazolio puede enlazarse con el agua a través de un enlace puente de hidrógeno permitiendo que las perlas permanezcan húmedas durante la observación en el microscopio electrónico de barrido, ya que los líquidos iónicos resisten la evaporación incluso en condiciones de alto vacío por su baja presión de vapor. Además, le proporciona una conductividad de  $2.5 \text{ mS} \times \text{cm}^{-1}$  a las perlas, por lo que no es necesario secarlas y recubrirlas como los tratamientos físicos y fisicoquímicos tradicionales. Es importante resaltar que la preparación de las perlas con el líquido iónico se realizó en 7 minutos en total, mientras que con los tratamientos tradicionales hasta este punto llevaron 8 horas de preparación, a este tiempo se le tiene que agregar el tiempo de montaje y los 50 segundos de recubrimiento para introducirlas finalmente en la cámara de alto vacío del microscopio electrónico de barrido.

**3.3. Establecimientos en las diferencias entre los métodos de preparación de muestras con tratamientos tradicionales (físicos y físico-químicos) y químicos (líquido iónico) que se observan por microscopía electrónica de barrido a través de un análisis cualitativo.**

En la Figura 31 y en el ANEXO 3 se observan las microfotografías de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L. (chía)* con los métodos de preparación utilizando tratamientos físicos (T<sub>1</sub>), físico-químicos (T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>) y líquido iónico (T<sub>5</sub>) obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

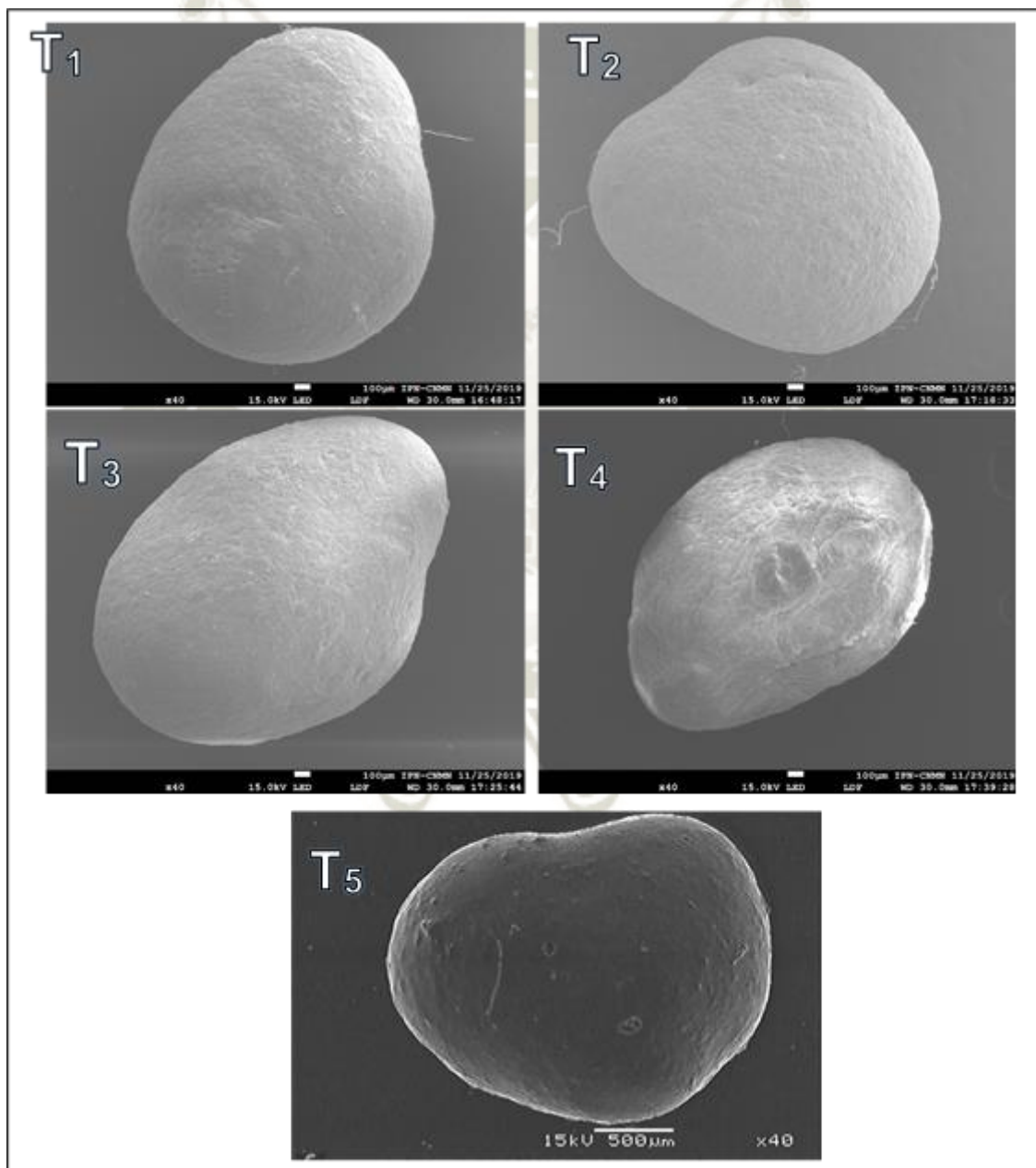


Figura 31. Visualización de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L. (chía)* preparadas con líquido iónico (T<sub>5</sub>) y métodos tradicionales (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>).

Las microfotografías de las perlas con tratamientos tradicionales (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>) se obtuvieron con un Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Schottky (JSM-7800F), y las microfotografías de las perlas tratadas con el líquido iónico acetato de 1 etil-3metil imidazolio, se tomaron con un MEB (Jeol Mod. JSM-5800 LV). Para todas las microfotografías se utilizó un voltaje 15kV, un detector de electrones secundarios y un aumento de 40X, manteniendo una distancia de trabajo de 30 mm, estos parámetros se observan en la parte inferior de las microfotografías, área conocida como la huella digital de la imagen, en esta también se muestra una barra la cual se usa para fijar la escala y determinar las características morfométricas de las perlas. En este caso los microscopios electrónicos utilizaban diferente software, por eso las huellas digitales no son iguales tanto para las microfotografías obtenidas con JSM-7800F como para las microfotografías tomadas por Jeol Mod. JSM-5800 LV.

Como se observa en la Figura 31, con todos los tratamientos se obtuvo una imagen de las perlas de Alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica L. (*Chía*) tridimensional, bien conservada y claramente enfocada; estas se formaron por la dispersión de electrones secundarios que abandonaron la parte más superficial de las muestras generando una imagen de su morfología superficial; en el caso de las perlas con tratamientos tradicionales (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>) es la pulverización con oro, cuya conductividad es de  $4.55 \times 10^8 \text{ mS} \times \text{cm}^{-1}$ , que aumentó la dispersión de electrones, y en el caso de las muestras tratadas con (T<sub>5</sub>) fue el acetato de 1 etil 3 metil imidazolio, cuya capacidad conductora a temperatura ambiente es mucho menor que la del oro ( $2.55 \text{ mS} \times \text{cm}^{-1}$ ). Esto sucedió porque la conductividad eléctrica de los líquidos iónicos aumenta con la temperatura, esta propiedad está relacionada con la carga deslocalizada de sus iones, es decir a menor interacción entre estos, mayor será la conductividad; por lo que se logró observar una imagen sin acumulación de cargas eléctricas en la superficie de la muestra<sup>31</sup>.

Para estudiar la topografía superficial de muestras con alto contenido de agua, como los encapsulados, hidrogeles, biopelículas de microorganismos, etc., manteniendo su calidad, se han utilizado técnicas como; microscopía electrónica de presión variable (VPSEM, por sus siglas en inglés) y microscopía electrónica ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés)<sup>43,61,62</sup>, los cuales utilizan vapor de agua en la cámara de la muestra para ionizar los electrones secundarios y aumentar las señales para formar una imagen en la pantalla<sup>12</sup>, de modo que no es necesario un pretratamiento,

En la literatura, las observaciones con MEB se utilizan a menudo para mostrar aspectos morfológicos generales de las cápsulas, como la forma y el tamaño. Hasta ahora solo perlas observadas con ESEM y VPSEM profundizan en los detalles finos de la rugosidad de la superficie de la muestra y detalles importantes como porosidades, asperezas, continuidad del recubrimiento y grietas siendo esta información crucial para evaluar correctamente las características de las paredes de las capsulas<sup>66</sup>. Es importante el estudio de estas características ya que se ha demostrado que este material polimérico hecho a partir de alginato de calcio y mucílago de Salvia hispánica (*chía*) tiene importancia en el área de alimentos sobre todo en la preparación de aditivos enzimáticos o nutraceuticos, con posible aplicación en la panificación y otras industrias alimentarias<sup>67</sup>.

Sin embargo el tiempo para observar las muestras con un ESEM o VPSEM es más corto porque las muestras biológicas se ven afectadas térmicamente por el haz de electrones y empiezan a colapsar dentro de la cámara, pero esto no sucede cuando se emplean los líquidos iónicos, debido a que son térmicamente estables hasta los 600°C o más<sup>63</sup>, además de tener una presión de vapor insignificante ( $\leq 5 \times 10^{-9}$  Torr)<sup>35</sup>, por lo que se ha utilizado para el estudio de muestras biológicas en condiciones de alto vacío en un microscopio electrónico de barrido, así también las microfotografías obtenidas en este estudio se parecen a las observadas por ESEM y VPSEM en cuanto al contraste y resolución además de mantenerlas más tiempo en la cámara de alto vacío y no se dañaron<sup>7,61</sup>.

En estas microfotografías de las perlas tomadas a 40X con los tratamientos tradicionales (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>) se pudo observar fibras que se desprenden de la superficie de las perlas, esto sucedió por el pre-tratamiento que se le dio a la muestra antes de introducirla en la cámara del microscopio electrónico de barrido; este desprendimiento de fibras no se llega a observar en las perlas recubiertas con el líquido iónico (T<sub>5</sub>), por lo que se pudo conocer su interacción con otros polímeros que forman la topografía de la muestra sin alterarla. Estas fibras se muestran con más detalle y a mayores aumentos en las siguientes Figuras:

La Figura 32 muestra las microfotografías de las perlas con el tratamiento físico o secado de punto crítico y recubrimiento con oro a mayores magnificaciones.

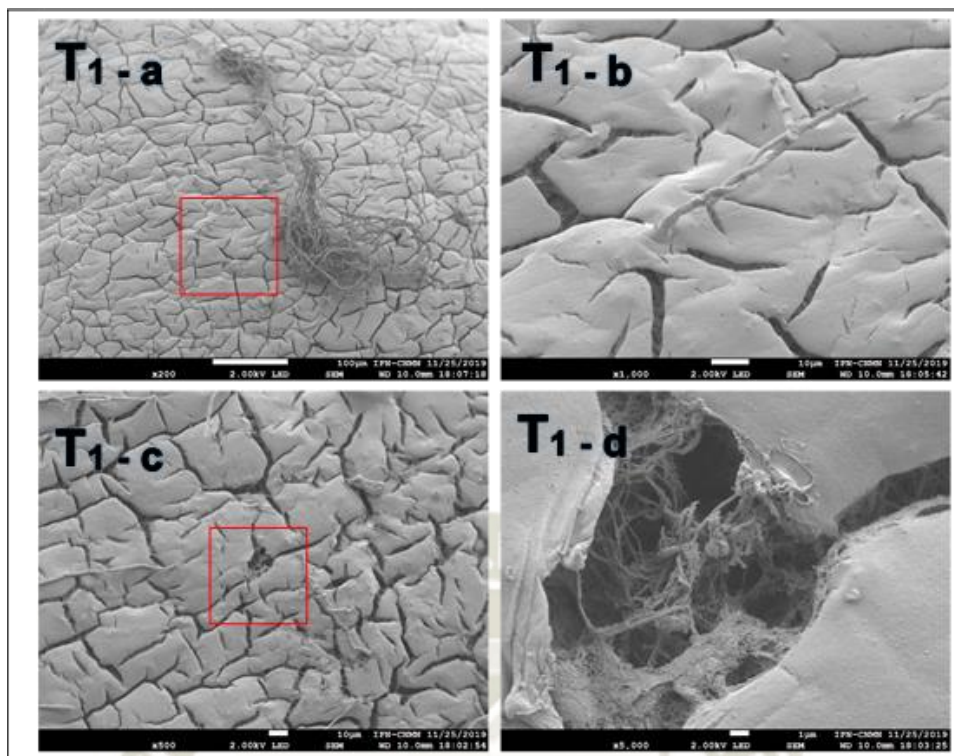


Figura 32: Microfotografías de las perlas de alginato de calcio-mucilago de *Salvia hispanica* L. (*chia*) con tratamiento físico tradicional ( $T_1$ ).

Las microfotografías  $T_1 - a$ ,  $T_1 - b$ ,  $T_1 - c$  y  $T_1 - d$ ; muestran la capacidad del microscopio electrónico de barrido para observar la morfología superficial a 200X, 500X, 1000X y 5000X respectivamente; en todas las microfotografías se observa una estructura del borde exterior compacta y gruesa. El efecto del tratamiento físico sobre la superficie de las perlas de alginato de calcio-mucilago de *Salvia hispanica* L. (*chia*) provocan numerosas grietas sobre la superficie (ver cuadro rojo de la microfotografía  $T_1 - a$ ), también se observa la presencia de fibras que salen desde el interior de las perlas ( $T_1 - b$ ), así como el colapso de estructuras (ver cuadro rojo de la microfotografía  $T_1 - c$ ), este colapso proporcionó información sobre la ultraestructura en el interior de las perlas ( $T_1 - d$ ), en la cual se observan más fibras; naturalmente estas deberían observarse como una matriz polimérica gelatinosa, debido a la naturaleza y composición de la muestra, pero por el efecto del secado de punto crítico este condujo a una considerable distorsión de la superficie, como las rajaduras. Estos artefactos también se observaron en las matrices poliméricas extracelulares o biopelículas de microorganismos y lo atribuyeron a los tratamientos físicos que se le proporciona para observarlas en microscopio electrónico de barrido<sup>64</sup>. Sin embargo este tratamiento pudo mantener la estructura tridimensional de las perlas y no se presentaron muchos colapsos como se observan con otros métodos físicos,

por ejemplo el secado en estado de congelación que consiste en una liofilización seguida de una sublimación del hielo directamente en condiciones de vacío<sup>42</sup>.

La Figura 33 muestra las microfotografías de las perlas tratadas con solución fijadora primaria, secado de punto crítico y recubrimiento con oro a diferentes magnificaciones.

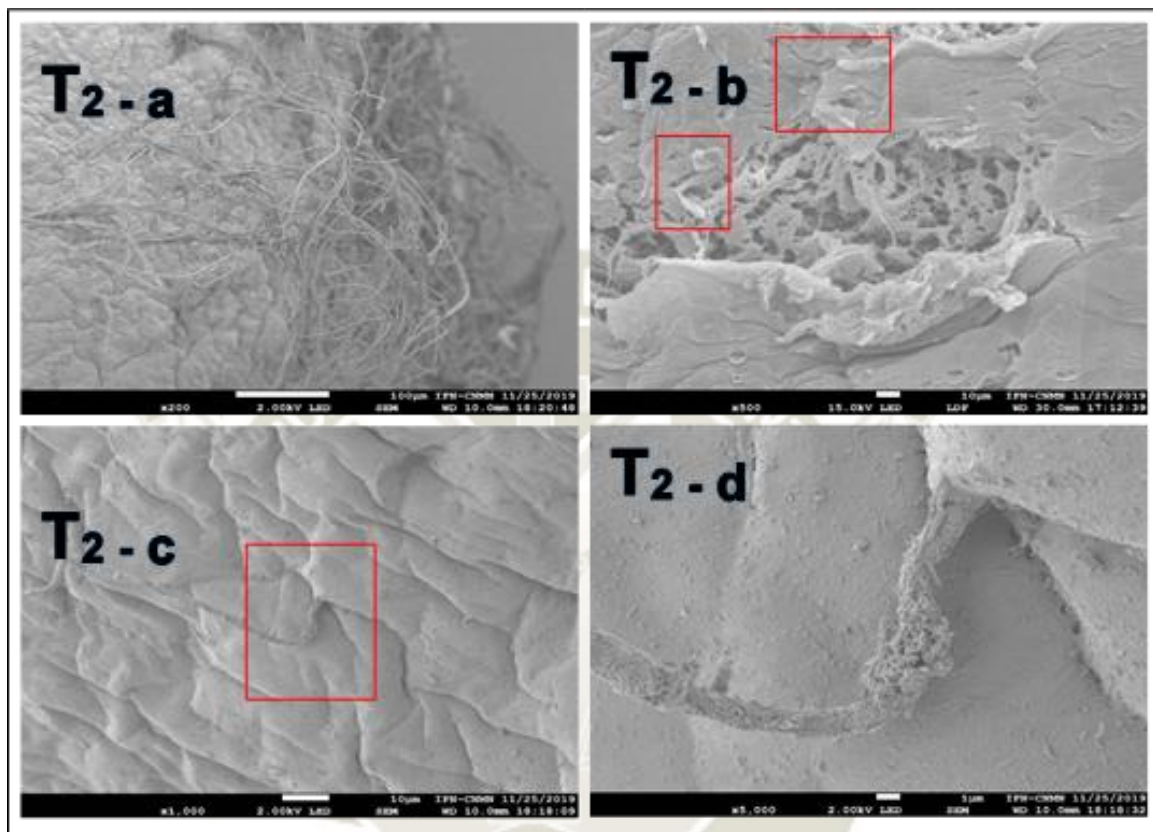


Figura 33. Microfotografías de perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispanica* L. (*chía*) con tratamiento físico-químico tradicional incorporando una solución fijadora primaria (T<sub>2</sub>).

En estas microfotografías se observa que la superficie de las perlas presentan una estructura del borde exterior más compacta y más gruesas que las perlas tratadas con T<sub>1</sub>, además no presentan grietas (T<sub>2</sub> - a). En los cuadros rojos de la microfotografía (T<sub>2</sub> - b) se observa el colapso de la superficie de las perlas ocasionado por daños mecánicos, ya que se observan las huellas de las pinzas; este colapso proporcionó información de la estructura interior, y se observan matrices y no fibras como en la estructura interior de las muestras tratadas con T<sub>1</sub>. Entonces se podría decir que la solución fijadora primaria protege la estructura interior durante el secado de punto crítico por la co-reticulación en el borde superficial de las perlas; pero esto no ocurre con las matrices de la superficie ya que se observan como fibras (ver los cuadros rojos de las microfotografías (T<sub>2</sub> - c) y (T<sub>2</sub> - d), esto podría ser porque están más expuestas durante el proceso de secado.

Por lo tanto, la aplicación de esta solución fijadora primaria antes del secado de punto crítico permitió obtener perlas sin colapso de estructuras, sin grietas y además le proporcionó mayor fuerza al gel lo que la hizo más compacta. A comparación del uso de otras soluciones fijadoras primarias que incorporan glutaraldehído<sup>6</sup>, con la que no se pudo mantener la estructuras de perlas de alginato y presentaron mayor colapso después del secado, debido a que el glutaraldehído tiene baja afinidad con los polisacáridos<sup>1</sup>.

En la Figura 34, se muestran las microfotografías de las perlas de alginato de calcio-Salvia hispánica L. (*chía*) tratadas con solución fijadora primaria, secundaria, secado de punto crítico y recubrimiento con oro a diferentes magnificaciones.

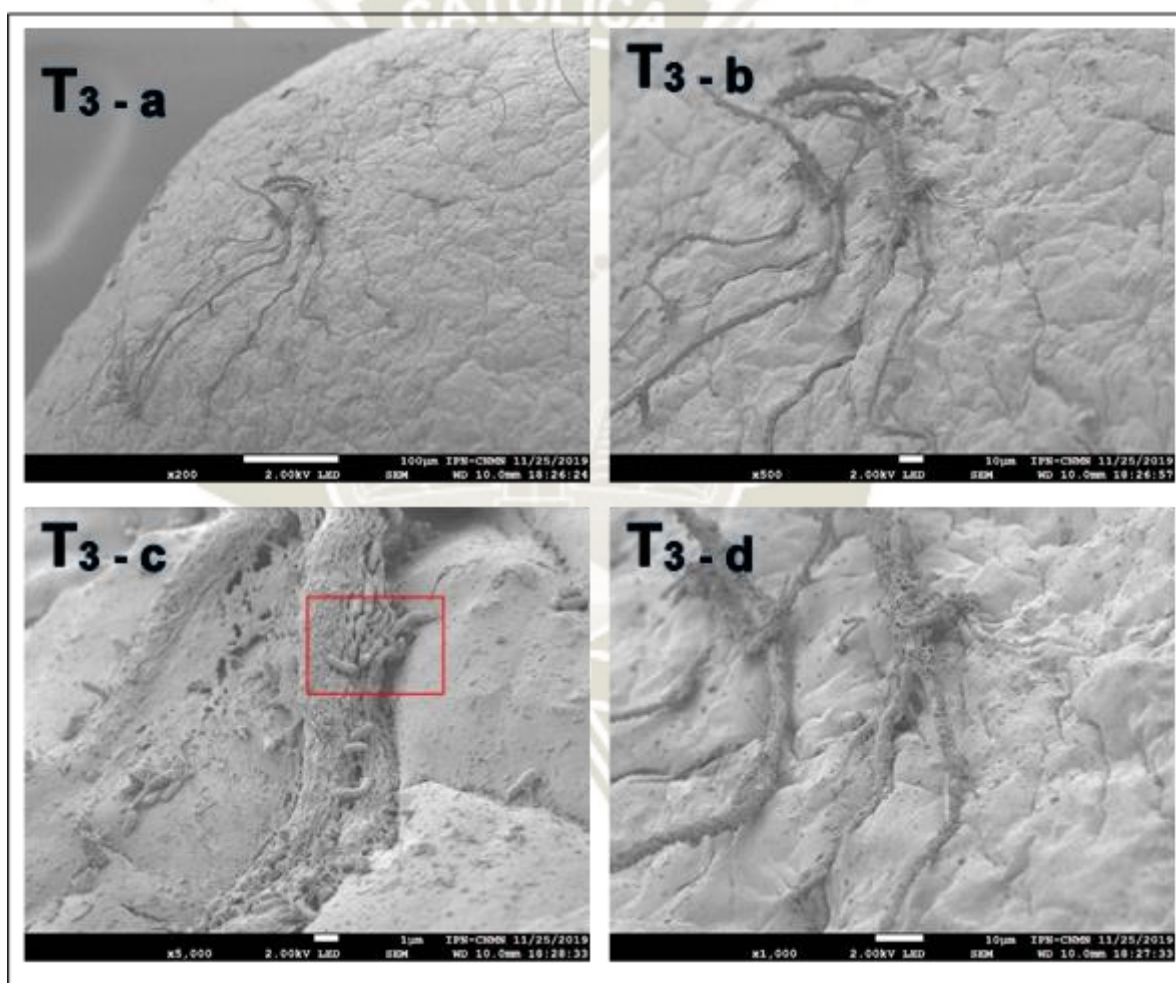


Figura 34. Microfotografías de perlas de alginato de calcio-Salvia hispánica L. (*chía*) con tratamiento físico-químico tradicional incorporando una solución fijadora primaria y secundaria (T<sub>3</sub>).

Este tratamiento es el más convencional que se ha utilizado para observar muestras biológicas en un microscopio electrónico de barrido, con la diferencia que se empleó una solución fijadora primaria específica para polímeros<sup>1</sup> en vez de una fijación química con glutaraldehído. En este tercer tratamiento físico-químico se evaluó el efecto al incorporar



la solución fijadora secundaria; en estas microfotografías no se observan grietas en la superficie de las perlas por el efecto del secado de punto crítico, además presentan una topografía compacta ( $T_3 - a$ ), sin embargo se obtuvo una superficie más arrugada ( $T_3 - b$ ) y a comparación de los tratamientos anteriores se observa que las matrices poliméricas exteriores no se desprenden del borde superficial de las perlas ( $T_3 - c$  y  $T_3 - d$ ), además en el cuadro rojo de la microfotografía  $T_3 - c$  se observó la presencia de microorganismos adheridos a las matrices poliméricas, y a estos se consideraron como un factor contaminante, ya que no se esterilizaron durante la preparación de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* L. (*chía*).

Por lo tanto, la incorporación de la solución fijadora secundaria estabilizó la estructura de la superficie de las perlas y su aplicación hizo que no se desprendieran las matrices durante el secado de punto crítico como en el caso de los tratamientos tradicionales  $T_1$  y  $T_2$ .

La Figura 35 muestra las microfotografías de las perlas tratadas con solución fijadora primaria, secundaria, tinción, secado de punto crítico y recubrimiento con oro a diferentes magnificaciones.

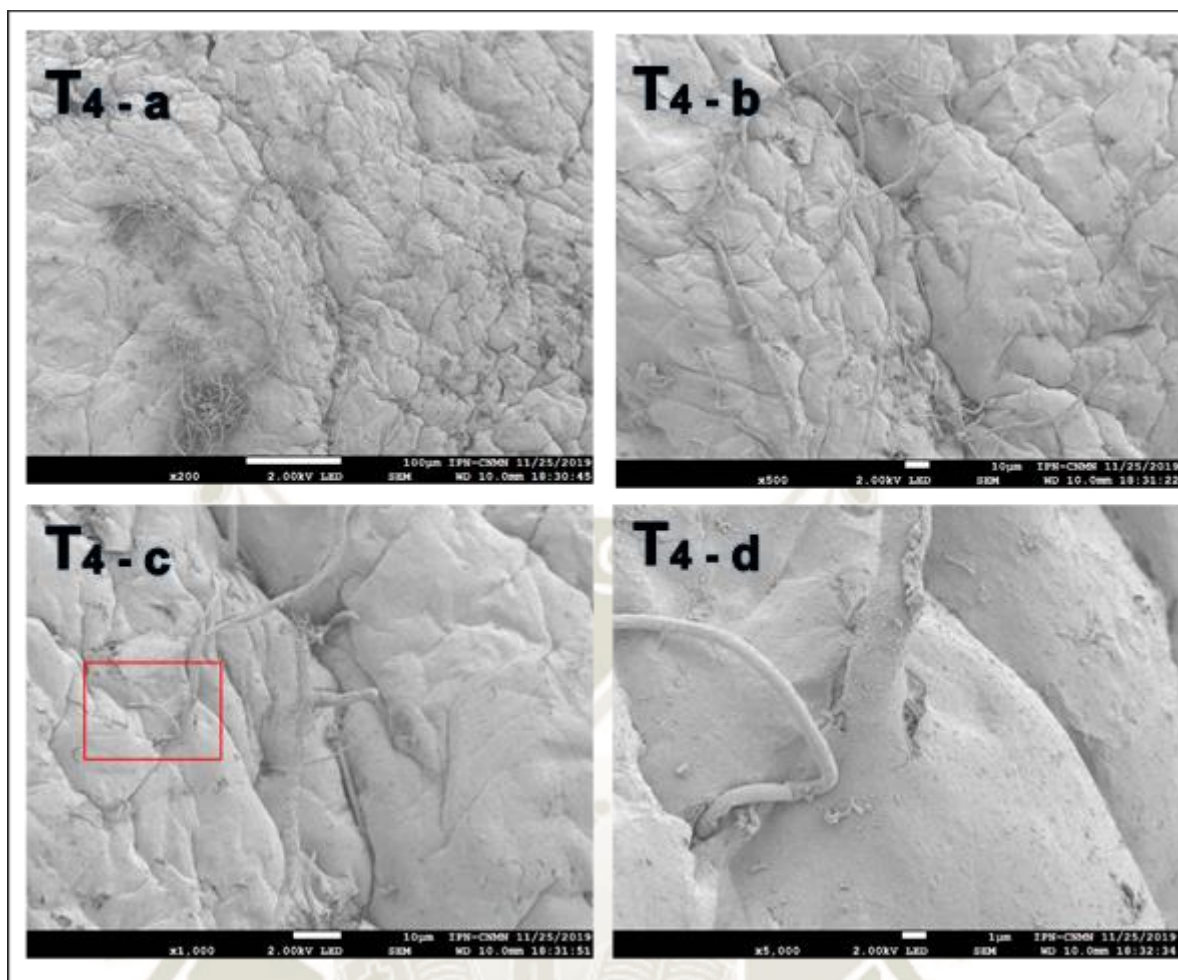


Figura 35: Microfotografías de perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* L. (*chía*) con tratamiento físico-químico tradicional incorporando una solución de tinción (T<sub>4</sub>).

La incorporación del ácido tánico en la solución de tinción para la preparación de muestras biológicas se ha utilizado en microscopía electrónica de barrido para estabilizar y mejorar su conductividad<sup>(53)</sup>. Las microfotografías de las perlas con solución de tinción se observan más brillantes cuando se enfocan a 40X (ver Figura 31, T<sub>4</sub>), y con aumentos de 200X (Figura 35, T<sub>4</sub> - a), se aprecia la profundidad de las arrugas a comparación de los tratamientos anteriores, esta superficie más arrugada se atribuye a la cantidad de agua que se incorporó en la muestra durante la tinción, esto se observa en el segundo análisis de imagen (ver Figura 27, Gráfico i)), provocando que se arrugue más durante el secado de punto crítico. Sin embargo el ácido tánico también es considerado como un agente reticulante por lo que se observa una superficie más gruesa y compacta de las perlas (T<sub>4</sub> - b), así también las fibras se mantienen adheridas sobre la superficie de las muestras (ver cuadro rojo de la microfotografía (T<sub>4</sub> - c) y la microfotografía (T<sub>4</sub> - d), además no se presenta el colapso de estructuras y grietas.

La Figura 36 muestra las microfotografías de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* L. (*chía*) tratadas con el líquido iónico (T<sub>5</sub>) a diferentes magnificaciones:

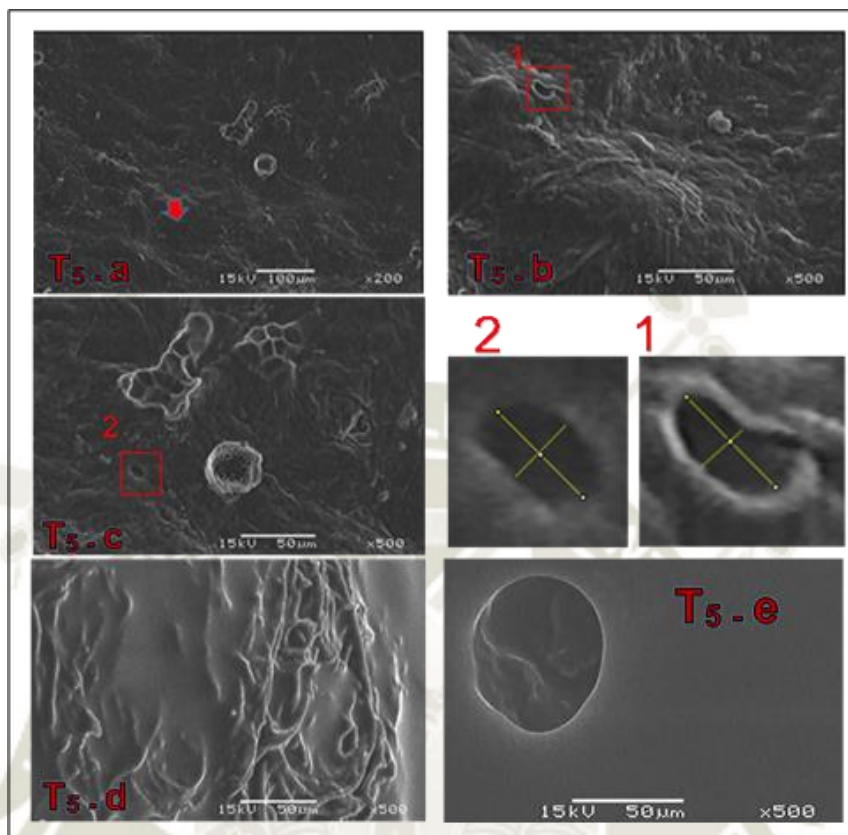


Figura 36. Microfotografías de Perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (*chía*) tratadas con acetato de 1 etil 3 metil imidazolio.

Este líquido iónico se ha utilizado para observar muestras con alto contenido de agua en un microscopio electrónico de barrido, esto es atribuido por la presión de vapor insignificante de los LI ( $\leq 6.67 \times 10^{-7}$  Pa) lo que permite que permanezcan en estado líquido y no se evaporen durante la medición, mientras siguen siendo conductores<sup>4</sup>. Además, se obtienen microfotografías con alta resolución y contraste; sin la necesidad de un recubrimiento con metales, esto se debe a la baja densidad del acetato de 1 etil 3 metil imidazolio (1.099 g/mL), la cual es cercana a la del agua. En general, la profundidad de penetración del haz de electrones primario es inversamente proporcional a la densidad del material objetivo<sup>63</sup>, entonces cuando la muestra fue previamente recubierta con el LI y bombardeada por el haz primario, los electrones secundarios fueron fácilmente emitidos desde la superficie de las perlas, obteniendo información real de la topografía de las muestras.

En la primera microfotografía (T<sub>5</sub> - a) tomada con una magnificación de 200X, se observa una topografía muy compacta con algunas zonas hundidas en la superficie de la perla

(flecha roja), esto pudo ocurrir por la interacción entre el líquido iónico y las moléculas de agua, ya que se observa una disminución en el tamaño cuando este interacciona con la muestra (ver Figura 27, Gráfico i)). La segunda microfotografía ( $T_5 - b$ ) tiene una magnificación a 500X, donde se pueden observar las fibras gelatinosas o polímeros entrecruzados (flecha roja), estas se asemejan a las biopelículas de los microorganismos recubiertas con un LI<sup>7</sup>. Y en la siguiente microfotografía ( $T_5 - c$ ) se aprecian dos tipos de fibras gelatinosas que forman la superficie de las perlas, unas se hallan entrecruzadas y otras se encuentran por encima y unidas a estas, también poseen formas más definidas como hexagonales y cuadradas, así mismo en estas dos imágenes se apreciaron poros los cuales se midieron de acuerdo a lo reportado por Zehnder et al.2015<sup>65</sup> los cuales tienen un largo de 0.13 mm y un ancho de 0.07 mm aproximadamente.

En la microfotografía ( $T_5 - d$ ) se puede observar la acumulación del líquido iónico sobre la superficie de las perlas, dificultando la medición de la textura de la superficie porque cubren las fibras como también se observa en la microfotografía ( $T_5 - e$ ) mostrando una superficie más lisa. Estos artefactos se pudo generar por la forma de secado que se empleó después de la inmersión con el LI ya que no se pudo extraer el exceso totalmente, por lo que otros autores han utilizado un secado al vacío para distribuir el LI de forma homogénea por toda la superficie de las muestras<sup>34</sup>. Otros estudios lo atribuyen a la alta viscosidad de este líquido (143.61 cP a 25 °C) por lo que se sugiere diluir a diferentes concentraciones con agua Milli-Q, seguido de un mezclado por vórtice y posteriormente precalentado a 40 °C antes de su uso<sup>35</sup>. Ya que si sólo se diluye el LI, la muestra altamente hidratada sufre cambios drásticos causados por el vacío de la cámara del microscopio electrónico de barrido<sup>8</sup>.

En el análisis de la superficie de estas perlas se observó que el voltaje con las que se obtuvieron las microfotografías no permitió observar la topografía de las muestras a mayores magnificaciones de 500X con el LI, por lo que se perdía la resolución; sin embargo, utilizando este tratamiento químico se pudo obtener muy buena información acerca de la topografía superficial de las perlas con apenas 500X de aumento a comparación de los tratamientos tradicionales con los cuales se requieren de hasta 5000X de magnificación, y por consiguiente mayor cantidad de microfotografías para analizar una muestra completa.

**3.4. Comparar el efecto de los métodos de preparación utilizando el líquido iónico y los tratamientos tradicionales sobre las características morfométricas iniciales y de textura de las perlas dentro del microscopio electrónico de barrido a partir de un cuarto análisis de imagen.**

Se presentan los resultados del cuarto análisis de imagen que muestran el promedio y coeficiente de variación de 5 repeticiones independientes por tratamiento con por lo menos 3 objetos por repetición. Tanto para el análisis de imagen de las características morfométricas y superficiales. Letras iguales en cada barra significa que no hay diferencia significativa entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

- a) En las tablas 10, 11 y 12 y en la Figura 37 con los Gráficos i), ii) y iii), se muestran las comparaciones de los efectos de los distintos tratamientos sobre el diámetro de Feret, relación de aspecto (AR) y circularidad inicial, donde se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de ( $P = < 0.001$ ), ( $P = 0.048$ ) y ( $P = < 0.001$ ) respectivamente de las perlas dentro del microscopio electrónico de barrido y durante el análisis de microfotografías. Los datos completos del ANOVA de estas características morfométricas se muestran en el ANEXO 2 inciso C) punto a).

Tabla 10 Diámetro de feret máximo (mm) del Cuarto análisis de imagen

<i>Cuarto análisis de imagen</i>		
<i>Tratamiento</i>	<i>Diámetro de feret máximo (mm)</i>	
	<i>T0</i>	<i>Final</i>
T1	3.29 ± 0.05	2.12 ± 0.17
T2	3.29 ± 0.05	2.21 ± 0.13
T3	3.29 ± 0.05	2.19 ± 0.27
T4	3.29 ± 0.05	1.99 ± 0.21
T5	3.29 ± 0.05	2.29 ± 0.23

Tabla 11 Relación de aspecto del Cuarto análisis de imagen

<i>Cuarto análisis de imagen</i>		
<i>Tratamiento</i>	<i>Relación de aspecto</i>	
	<i>T0</i>	<i>Final</i>
T1	1.25 ± 0.02	1.20 ± 0.09
T2	1.25 ± 0.02	1.35 ± 0.17
T3	1.25 ± 0.02	1.27 ± 0.15
T4	1.25 ± 0.02	1.32 ± 0.15
T5	1.25 ± 0.02	1.34 ± 0.15

Tabla 12 Circularidad del Cuarto análisis de imagen

<i>Cuarto analisis de imagen</i>		
<i>Tratamiento</i>	<i>Circularidad</i>	
	<i>T0</i>	<i>Final</i>
T1	0.82 ± 0.01	0.83 ± 0.02
T2	0.82 ± 0.01	0.82 ± 0.02
T3	0.82 ± 0.01	0.81 ± 0.04
T4	0.82 ± 0.01	0.75 ± 0.06
T5	0.82 ± 0.01	0.79 ± 0.03

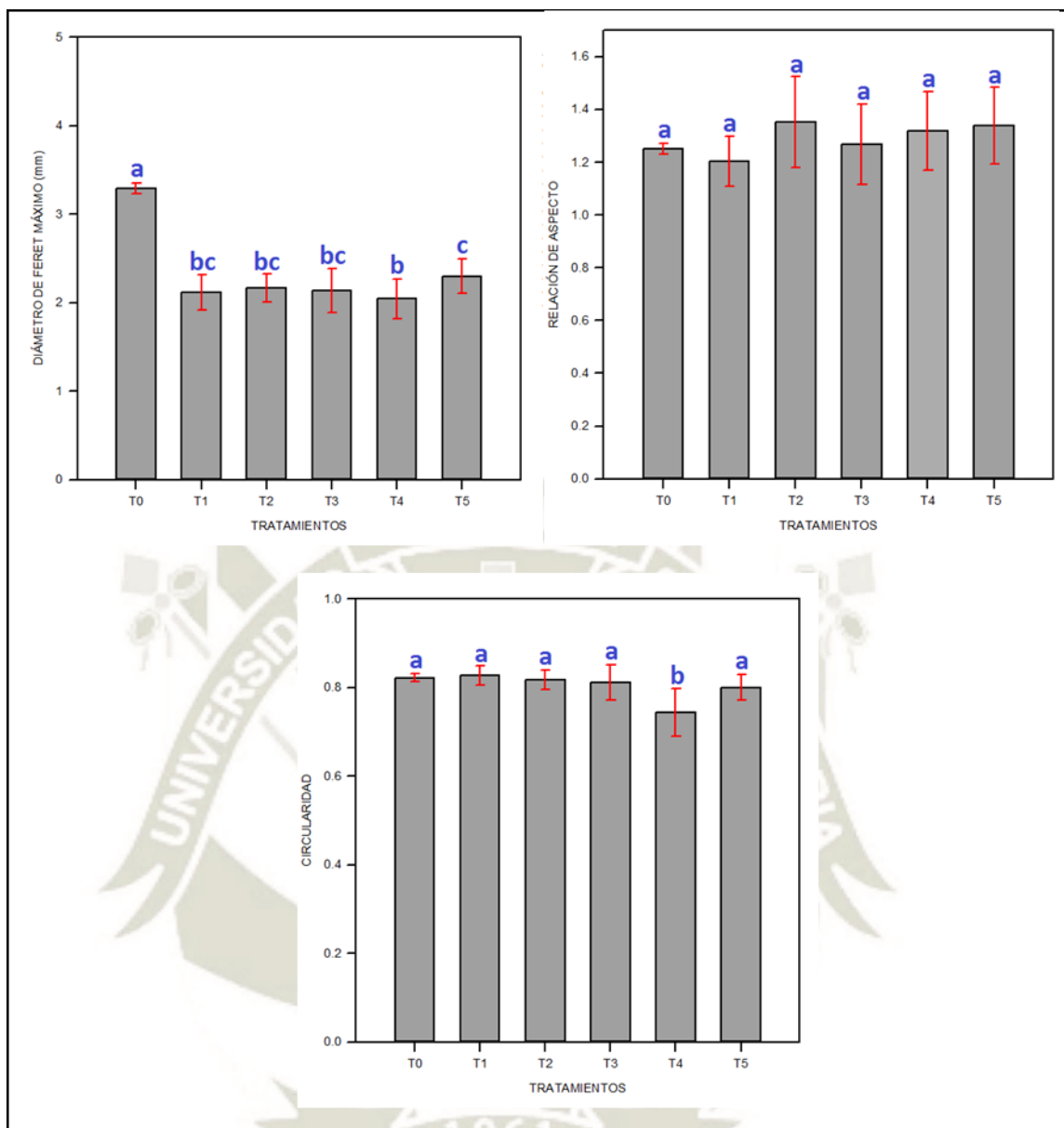


Figura 37. Análisis estadístico: i) Diámetro de Féret, ii) relación de aspecto y iii) circularidad.

En la tabla 10 y en el Gráfico i) (ver Figura 37), se muestra el efecto de los tratamientos en la cámara de alto vacío del MEB sobre el diámetro de Feret inicial ( $T_0$ ) de las perlas, este gráfico indica que el diámetro inicial de las perlas tratadas con el líquido iónico disminuyó de  $3.29 \pm 0.05$  mm hasta  $2.29 \pm 0.23$  mm, mientras que el diámetro de las perlas con  $T_4$  fueron las que disminuyeron hasta los  $1.99 \pm 0.21$  mm en comparación con los otros tratamientos tradicionales ( $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$ ), los cuales no presentan diferencia significativa, además de mostrar una reducción en el diámetro inicial de  $3.29 \pm 0.05$  mm hasta  $2.12 \pm 0.17$  mm,  $2.21 \pm 0.13$  mm y  $2.19 \pm 0.27$  mm respectivamente. Entonces las perlas con y sin tratamiento del líquido iónico, mostraron diferencias significativas con respecto al diámetro de Feret inicial, mostrando una reducción en el tamaño de las perlas

en un 30.54 % con el T<sub>5</sub>, el 33.95 % con los tratamiento T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> y el 39.55 % con el T<sub>4</sub>, siendo este último el tratamiento que más afectó el diámetro de las muestras y las tratadas con el líquido iónico el que menos redujo el tamaño.

Un comportamiento similar también se observó en un polímero superabsorbente a base de acrilato, ácido acrílico y monómeros reticulables hidratado recubierto por el acetato de 1 etil 3 metil imidazolio puro, para observarlo en un microscopio electrónico de barrido, donde se reportó una reducción de tamaño del 17.65% mientras que el de este estudio fue del 30.54 %, por lo que se explicó que esta disminución se ocasionó por la evaporación de una cantidad limitada del agua, sin embargo, una vez que el comportamiento de la evaporación alcanzó un estado estable, el tamaño de la partícula se conservó independiente del tiempo que se mantuvo la muestra en la cámara del microscopio electrónico de barrido<sup>8</sup>. En este estudio se estaría confirmando que existe una reducción de tamaño, pero a consecuencia de la falta de recubrimiento en algunas zonas de la superficie de la muestra, ya que en algunas microfotografías se observó que este líquido no se dispersó por toda la superficie, ocasionando la evaporación del agua, entonces se recomienda colocar las perlas de alginato de calcio-mucílago de salvia hispánica L. (*chía*) en un secador de vacío después del recubrimiento, como se reporta en otros trabajos<sup>8</sup>, para que el LI se disperse por toda la superficie de forma homogénea.

En la tabla 11 y en el Gráfico ii) (ver Figura 37), se presenta el efecto de los tratamientos sobre la relación de aspecto de las perlas en el MEB, es decir la relación entre los diámetro máximo y mínimo de Feret, indicando que este no se alteró con ninguno de los tratamientos ya que no se observa diferencia significativa entre sus valores, siendo estos  $1.20 \pm 0.09$ ,  $1.35 \pm 0.17$ ,  $1.27 \pm 0.15$ ,  $1.32 \pm 0.15$  y  $1.34 \pm 0.15$  para T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub> respectivamente con la relación de aspecto inicial la cual fue  $1.25 \pm 0.02$ .

En la tabla 12 y en el Gráfico iii) (ver Figura 37), se indica el efecto de los tratamientos sobre la circularidad de las muestras en el microscopio electrónico de barrido, como factor de forma de las perlas, se observa que solo el tratamiento 4 afectó la circularidad inicial de estas en comparación con los otros tratamientos, ya que es el único que presenta diferencia significativa con respecto a la circularidad inicial, esta variación se pudo ocasionar por manipulación mecánica de las perlas al montarlas sobre el portamuestra, el cual se realiza después del secado de punto crítico, ya que se observó que estas se vuelven más sensibles en comparación con las otras perlas tratadas.



- b) Las siguientes tablas, 13 y 14 y en la Figura 38 muestran los Gráficos i), ii) que representan el efecto de los tratamientos sobre las características de textura o superficiales, como la homogeneidad y entropía de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* L. (*chía*) dentro del microscopio electrónico de barrido respectivamente, expresadas de forma cuantitativa a partir de 15 microfotografías obtenidas a 40X mediante un análisis de imagen de textura, en donde se obtuvieron diferencias significativas de ( $P = <0.001$ ) para homogeneidad y entropía. Los datos completos del ANOVA para la cuantificación de estas características superficiales se muestran en el ANEXO 2 inciso C) punto b).

Tabla 13 Homogeneidad del análisis de textura de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica*

	<b><i>Homogeneidad</i></b>
T1	0.19 ± 0.05
T2	0.20 ± 0.05
<b><i>Tratamiento</i></b> T3	0.14 ± 0.02
T4	0.23 ± 0.05
T5	0.56 ± 0.05

Tabla 14 Entropía del análisis de textura de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica*

	<b><i>Entropía</i></b>
T1	7.77 ± 0.31
T2	7.40 ± 0.26
<b><i>Tratamiento</i></b> T3	7.87 ± 0.31
T4	7.75 ± 0.38
T5	4.96 ± 0.52

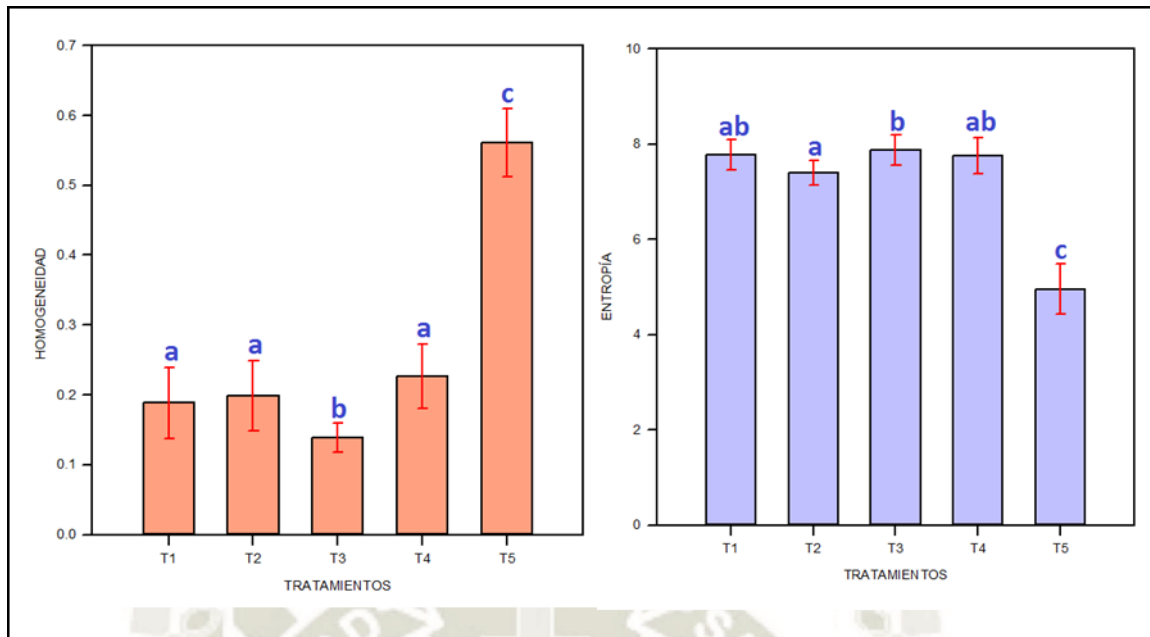


Figura 38. Gráficos del análisis de textura de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* L. (*chía*): i) Homogeneidad y ii) entropía.

En la tabla 13 y en el Gráfico i) (ver Figura 38) se mide y se compara la homogeneidad local de píxeles en la superficie de las perlas con los distintos tratamientos, indicando que las muestras con tratamientos tradicionales; T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> presentan las mismas características de textura, porque no hay diferencia significativa entre estos en comparación con la superficie de las muestras con el tratamiento tradicional T<sub>3</sub>; por lo que se puede decir que la superficie de estas perlas son más rugosas que las otras perlas preparadas con T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, porque el análisis de imagen de textura cuantificó mayor variación local de píxeles en la superficie de las perlas preparadas con este tratamiento. Sin embargo, al comparar los valores de homogeneidad de la topografía de las perlas con tratamientos tradicionales y las que fueron recubiertas con el LI, se observa una gran diferencia, es decir que existe mayor homogeneidad local de píxeles sobre la superficie de las muestras tratadas con T<sub>5</sub>, indicando que las perlas poseen una superficie homogénea.

En la tabla 14 y en el Gráfico ii) (ver Figura 38) se mide la entropía la cual cuantifica la distribución de los píxeles en una zona determinada, en este gráfico se observa que la superficie de las perlas con tratamientos tradicionales muestran la misma distribución irregular de los píxeles en las microfotografías, por lo que se indicaría que las perlas tienen una textura superficial rugosa, en cambio los valores de entropía de las perlas

tratadas con el LI son menores a comparación de los otros tratamientos, presentando un distribución regular, por lo tanto, una textura superficial más lisa.

Como se observa en ambos análisis estadísticos, la superficie de las perlas tratadas con acetato de 1 etil 3 metil imidazolio mostraron una superficie más homogénea y lisa, esto se atribuye a la acumulación de líquido iónico en la superficie de las perlas lo que interfiere con la visualización de algunos detalles topográficos. En otros estudios se observaron las mismas consecuencias del uso del líquido iónico a concentraciones puras y lo atribuyeron a la viscosidad, por lo que se sugirió realizar un pretratamiento, el cual consiste en diluir el líquido iónico, mezclar y calentar la mezcla antes de su aplicación sobre las muestras o colocarlas en un secador de vacío para retirar el exceso del LI de manera que se distribuya de forma homogénea por toda la superficie de los especímenes, antes de introducirlas en la cámara del microscopio electrónico de barrido, para conocer su textura real y mejorar de manera eficiente tanto la resolución como el contraste de las microfotografías<sup>35</sup>.

#### 4. CONCLUSIONES:

El uso del acetato de 1 etil 3 metilimidazolio afecta solo el tamaño de las muestras, reduciéndola hasta un 30 % de la medida inicial; mas no afecta la forma inicial de las perlas de alginato de calcio-mucílago de salvia hispánica L. (*chia*) durante el tratamiento y su observación dentro del microscopio electrónico de barrido, así mismo este líquido iónico permitió obtener microfotografías bien conservadas, claramente enfocadas y su morfología tridimensional donde se pudo observar la interacción entre los polímeros, la forma que presentan y la presencia de algunos poros.

Respecto al primer objetivo específico se concluye que el uso de la bomba de jeringa permitió obtener perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica L. (*chia*) con características morfométricas iniciales homogéneas, ya que el análisis de imagen reportó un diámetro máximo de Féret de  $3.29 \pm 0.05$  mm, la relación de aspecto de  $1.25 \pm 0.02$  y la circularidad de  $0.82 \pm 0.01$ , sin embargo la distribución no homogénea del mucílago y el tamaño de partícula del polvo fino no permitió obtener perlas con factor de forma igual a 1.

Para el segundo objetivo específico se concluye que durante la aplicación de los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> no afectan el tamaño de las perlas ni la relación de aspecto inicial pero solo T<sub>3</sub> afecta la circularidad inicial de las perlas, mientras que T<sub>1</sub> y T<sub>5</sub> disminuye el tamaño inicial en un 9.75% y 8.69% respectivamente mas no afecta su forma inicial, por lo contrario con el T<sub>4</sub> se observa un incremento en el tamaño de las muestras pero manteniendo la forma inicial de las perlas. Entonces del segundo análisis de imagen se observa que la primera etapa de preparación de las perlas con los tratamientos afecta algunas características morfométricas iniciales. En cuanto al tercer análisis de imagen, se observa que en el caso de los tratamientos tradicionales, el secado de punto crítico, disminuye el tamaño de las perlas en un 22.93% a comparación del tratamiento con el líquido iónico, el cual mantiene el tamaño de las mismas, también se observa que las metodologías de secado de los 5 tratamientos no afectan la forma inicial de las muestras.

En cuanto a las diferencias entre los métodos de preparación de muestras con tratamientos tradicionales (físicos y físico-químicos) y químicos (líquido iónico) que se observan en las microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido se concluye que a pesar de que el acetato de 1 etil 3 metilimidazolio tenga una menor capacidad conductora que el oro se obtuvieron microfotografías con imágenes tridimensionales bien

conservadas y claramente enfocadas, observándose también que las perlas con tratamientos tradicionales provocan colapsos de estructuras en algunas zonas de la superficie de las muestras, en cambio las perlas preparadas con el líquido iónico muestran una topografía húmeda, observándose la interacción de las matrices poliméricas gelatinosas y la presencia de poros.

Por último del cuarto análisis de imagen se observa que las características morfológicas iniciales de las perlas, tal como el diámetro de feret inicial se ven afectadas por las condiciones de la cámara de vacío de ambos microscopios electrónicos de barrido, siendo el tratamiento 4 el que lo disminuye en mayor porcentaje, es decir en un 39.55 %, a este le siguen los tratamientos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> con una disminución en promedio del 33.95 % y por último el T<sub>5</sub> el cual sólo le afecta variando el diámetro inicial en un 30.54 %; es decir las muestras tratadas con los líquidos iónicos causan menos cambios en el tamaño y la morfología inicial de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* L. (chía). En cuanto al efecto del uso del acetato de 1 etil 3 metilimidazolio; sobre las características superficiales de textura de las perlas indica que las muestras poseen una superficie lisa y una rugosa para los tratamientos tradicionales, debido a la incorporación de algunas soluciones fijadoras que provocaron la deformación durante la aplicación de tratamientos así mismo la deshidratación en el secado de punto crítico; mientras que el recubrimiento con el líquido iónico debida a su alta viscosidad no permitió una distribución homogénea por lo que se recomienda un secado al vacío.

## 5. RECOMENDACIONES:

- Recomiendo que para obtener perlas de alginato de calcio – mucilago de Salvia hispánica L. (chía) con un factor de forma de 1 o cerca a este valor es importante obtener polvo fino de mucilago y trabajar con un tamaño de partícula menor a 250 micras, ya que estoy proporcionaría una mejor disolución al mezclarlo con el alginato.
- Es necesario cambiar la solución con mucho cuidado para evitar su contaminación ya que durante el proceso se puede observar la presencia de microorganismos que contaminan las muestras.
- Recomiendo utilizar otro tipo de buffer ya que el cacodilato de sodio ocasionó que las perlas se disolvieran al momento de efectuar los respectivos lavados en los tratamientos tradicionales.
- Se debe preparar la solución fijadora primaria el mismo día que se realizará la fijación ya que el reactivo DCC precipita porque es insoluble en agua a temperatura ambiente.
- Aconsejo que en el secado de punto crítico no colocar más de 15 perlas por tratamiento, debido a que estas pueden sufrir cambios en su morfología y tamaño por causas mecánicas.
- Sugiero que en el procedimiento de montaje de perlas sobre el portamuestras utilizar pinzas de plástico en el caso de los tratamientos tradicionales, ya que después del secado de punto crítico estas se adhieren a la pinza.
- Recomiendo que en la etapa de absorción del exceso de líquido iónico no desechar este reactivo ya que se puede someter a un secado al vacío para volverlo a utilizar.
- La investigación nos indica que las perlas deben observarse directamente en el microscopio electrónico de barrido después de su secado y recubrimiento con oro ya que son de naturaleza higroscópica.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, W DD. Scanning Electron Microscopy. *Br Museum Tech Res Bull* [Internet]. 2012;4:79–86. Available from: [http://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/SEM.html](http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html)
2. Sorrias V, Morales A, Yañez M. Principios y práctica de la microscopía electrónica. 1ra edició. Sorrias de Lozano V, editor. Bahia Blanca; 2014. 1-499 p.
3. Sharma V, Bhardwaj A. Scanning electron microscopy (SEM) in food quality evaluation. In: *Evaluation Technologies for Food Quality* [Internet]. Elsevier Inc.; 2019. p. 743–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00029-9>
4. Golding CG, Lamboo LL, Beniac DR, Booth TF. The scanning electron microscope in microbiology and diagnosis of infectious disease. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(February):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep26516>
5. CIENCIAS EM. [https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/critical\\_drying.aspx](https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/critical_drying.aspx). 2019.
6. Santana BP, Nedel F, Perelló Ferrúa C, e Silva RM, da Silva AF, Demarco FF, et al. Comparing different methods to fix and to dehydrate cells on alginate hydrogel scaffolds using scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech*. 2015;78(7):553–61.
7. Asahi Y, Miura J, Tsuda T, Kuwabata S, Tsunashima K, Noiri Y, et al. Simple observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids. *AMB Express*. 2015;5(1):0–8.
8. Tsuda T, Mochizuki E, Kishida S, Iwasaki K, Tsunashima K, Kuwabata S. SEM observation of hydrous superabsorbent polymer pretreated with room-temperature ionic liquids. *PLoS One*. 2014;9(3):1–7.
9. Balma JS. El análisis de imágenes como herramienta de monitoreo en la deshidratación de rodajas de banana. *BRAZILIAN J FOOD Technol*. 2019;22:1–14.

10. Farrera-Rebollo RR, Salgado-cruz MDP, Chanona-Pérez J, Calderón-domínguez G. Evaluation of Image Analysis Tools for Characterization of Sweet Bread Crumb Structure. *Food Bioprocess Technol.* 2012;5:474–84.
11. Southworth HN. *Scanning Electron Microscopy and Microanalysis*. Third Edit. *Physicochemical Methods of Mineral Analysis*. 1975. 421-450 p.
12. Bogner A, Jouneau PH, Thollet G, Basset D, Gauthier C. A history of scanning electron microscopy developments: Towards “wet-STEM” imaging. *Micron.* 2007;38(4):390–401.
13. Joy D. *Scanning Electron Microscopy: Theory , History and Development of the Field Emission Scanning Electron Microscope*. In: *Biological Field Emission Scanning Electron Microscopy*. © 2019 Joh. Tennessee, Knoxville, TN, USA; 2019. p. 1–6.
14. High-Tech CH. *SEM Information Packet*.PDF. 2008. 31-60 p.
15. Mazumder M, Ahmed R, Wajahat Ali A, Lee SJ. SEM and ESEM techniques used for analysis of asphalt binder and mixture: A state of the art review. *Constr Build Mater* [Internet]. 2018;186:313–29. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.07.126>
16. Ribadeneira DE. *Microscopía Electrónica: Fundamentos, Teoría y Aplicaciones*. Escuela Politécnica Nacional; 1998.
17. Kang KW, Echarri JM, Llorente CL. Servicio de microscopía electrónica de barrido y microanálisis del limf – facultad de ingeniería – unlp. *Segundas Jornadas Investig y Transf.* 2013;35(3):660–5.
18. Prin J, Gonzáles N, Villarroel H, Ramírez M, Rojas B. El secado de punto crítico (SPC) como técnica aplicada en la preparación de geles de poli (acrilamida-co-ácido acrílico) por microscopía electrónica de barrido. 2012;5:20–3.
19. Kou J. *Electron Microscopy Methods and Protocols*. second edi. Kuo J, editor. New Jersey; 2007. 449-467 p.
20. Shirazi AN, Imani M, Sharifi S. Direct Condensation Reaction for Grafting of Polyethylene Glycol Monomethyl Ether on Poly(Methacrylic Acid-co-Methyl Methacrylate) for Application in Biomedical Engineering. *Am J Biomed Eng.*



- 2012;1(1):13–9.
21. Boyles J, Anderson L, Hutcherson P. A new fixative for the preservation of actin filaments: Fixation of pure actin filament pellets. *J Histochem Cytochem.* 1985;33(11):1116–28.
  22. Fassel TA, Sanger JR, Edmiston CE. Lysine effect on Ruthenium red and Alcian Blue preservation and staining of the staphylococcal glycocalyx. *Cell Mater.* 1993;3(9):328–36.
  23. Fassel TA, Mozdziak PE, Sanger JR, Edmiston CE. Paraformaldehyde effect on ruthenium red and lysine preservation and staining of the staphylococcal glycocalyx. *Microsc Res Tech.* 1997;36(5):422–7.
  24. Priester JH, Horst AM, Van De Werfhorst LC, Saleta JL, Mertes LAK, Holden PA. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *J Microbiol Methods.* 2007;68(3):577–87.
  25. Arimoto S, Sugimura M, Kageyama H, Torimoto T, Kuwabata S. Development of new techniques for scanning electron microscope observation using ionic liquid. *ScienceDirect.* 2008;53(21):6228–34.
  26. Miyata T, Mizoguchi T. Fabrication of thin TEM sample of ionic liquid for high-resolution ELNES measurements. *Ultramicroscopy* [Internet]. 2017;178(November 2015):81–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultramic.2016.10.009>
  27. Przybysz K, Drzewińska E, Stanisławska A, Wysocka-Robak A, Cieniecka-Rosłonkiewicz A, Foksowicz-Flaczyk J, et al. Ionic liquids and paper. *Ind Eng Chem Res.* 2005;44(13):4599–604.
  28. Welton T. Ionic liquids: a brief history. *Biophys Rev.* 2018;10(3):691–706.
  29. Padua AAH, Costa Gomes MF, Canongia Lopes JNA. Molecular Solutes in Ionic Liquids: A Structural Perspective. *ChemInform* [Internet]. 2008;39(6):1087–96. Available from: <papers://e4d0d4eb-961c-498c-89f9-821aeadc1e24/Paper/p3318>
  30. Xue H, Verma R, Shreeve JM. Review of ionic liquids with fluorine-containing anions. *J Fluor Chem.* 2006;127(2):159–76.

31. Rodríguez I. Líquidos Iónicos. Propiedades, Síntesis Y Aplicaciones [Internet]. 2017. Available from: [http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Irodriguez/Rodriguez\\_Celma\\_Ignacio\\_TFM.pdf](http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Irodriguez/Rodriguez_Celma_Ignacio_TFM.pdf)
32. Marín-Sánchez M, Gracia-Escosa E, Conde A, Palacio C, García I. Deposition of zinc-cerium coatings from deep eutectic ionic liquids. *Materials (Basel)*. 2018;11(10):1–18.
33. Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Nemoto N, Kurihara T, Koga H, et al. Ionic liquid enables simple and rapid sample preparation of human culturing cells for scanning electron microscope analysis. *Microsc Res Tech*. 2011;74(5):415–20.
34. Kawai K, Kaneko K, Kawakami H, Yonezawa T. Bioinspired choline-like ionic liquids: Their penetration ability through cell membranes and application to sem visualization of hydrous samples. *Langmuir*. 2011;27(16):9671–5.
35. Dwiranti A, Lin L, Mochizuki E, Kuwabata S, Takaoka A, Uchiyama S, et al. Chromosome observation by scanning electron microscopy using ionic liquid. *Microsc Res Tech*. 2012;75(8):1113–8.
36. Bowron DT, D'Agostino C, Gladden LF, Hardacre C, Holbrey JD, Lagunas MC, et al. Structure and Dynamics of 1-Ethyl-3-methylimidazolium Acetate via Molecular Dynamics and Neutron Diffraction. *J Phys Chem B*. 2010;114(23):7760–8.
37. Brehm M, Weber H, Pensado AS, Stark A, Kirchner B. Proton transfer and polarity changes in ionic liquid-water mixtures: A perspective on hydrogen bonds from ab initio molecular dynamics at the example of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate-water mixtures - Part 1. *Phys Chem Chem Phys*. 2012;14(15):5030–44.
38. Sutherland L. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology*. 2001;147(1):3–9.
39. Soledad Lencina M (Universidad N del S. Síntesis y caracterización de Hidrogeles De alginato y N-isopropilacrilamida para aplicaciones biomédicas [Internet]. Universidad Nacional del Sur; 2013. Available from: <http://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/123456789/3123/1/Tesis Lencina%2C M.M.S..pdf>

40. Borgogna M, Bellich B, Zorzin L, Lapasin R, Cesàro A. Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chem* [Internet]. 2010;122(2):416–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.043>
41. Moran HF. Optimización del proceso de extracción del mucílago de la semilla de chíá (*Salvia hispanica* L.) mediante diseño de experimentos y su aplicación como material de pared en encapsulación. 2015.
42. Li L, Chen Y, Wang Y, Shi F, Nie Y, Liu T, et al. Effects of concentration variation on the physical properties of alginate-based substrates and cell behavior in culture. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;128:184–95. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018356617#bb0190>
43. Conforto E, Joguet N, Buisson P, Vendeville JE, Chaigneau C, Maugard T. An optimized methodology to analyze biopolymer capsules by environmental scanning electron microscopy. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2015;47:357–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.054>
44. Avendaño-Romero GC, López-Malo A, Palou E. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *J Anxiety Disord*. 2013;14(6):549–62.
45. García-Salcedo AJ, Torres-Vargas OL, del Real A, Contreras-Jiménez B, Rodríguez-García ME. Pasting, viscoelastic, and physicochemical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) flour and mucilage. *Food Struct* [Internet]. 2018;16:59–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2018.03.004>
46. Avila-de la Rosa G, Alvarez-Ramirez J, Vernon-Carter EJ, Carrillo-Navas H, Pérez-Alonso C. Viscoelasticity of chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage dispersion in the vicinity of an oil-water interface. *Food Hydrocoll*. 2015;49:200–7.
47. Salgado M de la P, Calderón G, Chanona J, Farrera RR, Méndez J V., Díaz M. Chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage release characterisation. A microstructural and image analysis study. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2013;51:453–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.036>
48. Fernández L, Castellero C, Aguilera JM. An application of image analysis to dehydration of apple discs. *J Food Eng*. 2005;67:185–93.

49. Quevedo, Roberto; López-G, Carlos; Aguilera, José; Cadoche L. Description of food surfaces and microstructural changes using fractal image texture analysis. *J Food Eng.* 2002;53:361–71.
50. Arzate-Vázquez I, Chanona-Pérez JJ, Calderón-Domínguez G, Terres-Rojas E, Garibay-Febles V, Martínez-Rivas A, et al. Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. *Carbohydr Polym.* 2012;87:289–99.
51. Malegori C, Franzetti L, Guidetti R, Casiraghi E, Rossi R. GLCM , an image analysis technique for early detection of bio film. *J Food Eng* [Internet]. 2016;185:48–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.04.001>
52. Arriola NDA, Chater PI, Wilcox M, Lucini L, Rocchetti G, Dalmina M, et al. Encapsulation of stevia rebaudiana Bertoni aqueous crude extracts by ionic gelation – Effects of alginate blends and gelling solutions on the polyphenolic profile. *Food Chem.* 2019;275(April 2018):123–34.
53. MacDonald JA, Fowle WH, Shin E, Woods DC. A method for freeze-fracture and scanning electron microscopy of isolated mitochondria. *ScienceDirect* [Internet]. 2018;5(May):593–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.006>
54. Weber K, Delben J, Bromage TG, Duarte S. Comparison of SEM and VPSEM imaging techniques with respect to *Streptococcus mutans* biofilm topography. *FEMS Microbiol Lett.* 2014;350(2):175–9.
55. Java PI and A in. *Processing Image and Analysis in Java.* <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>.
56. MexicoDocuments. <https://vdocuments.mx/analisis-de-la-varianza-559798356a25b.html>. 2017.
57. Tsubokawa N, Hosoya M, Kurumada J. Grafting reaction of surface carboxyl groups on carbon black with polymers having terminal hydroxyl or amino groups using N,N'-dicyclohexylcarbodiimide as a condensing agent. *React Funct Polym.* 1995;27(1):75–81.
58. Navarrete EL. Síntesis de péptidos. Universidad nacional autonoma de méxico,

- Instituto de Biotecnología. 2007.
59. Mohan YM, Premkumar T, Joseph DK, Geckeler KE. Stimuli-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-sodium acrylate) hydrogels: A swelling study in surfactant and polymer solutions. *React Funct Polym.* 2007;67(9):844–58.
  60. Menezes M do LLR, Pires N da R, da Cunha PLR, de Freitas Rosa M, de Souza BWS, Feitosa JP de A, et al. Effect of tannic acid as crosslinking agent on fish skin gelatin-silver nanocomposite film. *Food Packag Shelf Life* [Internet]. 2019;19(November 2018):7–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.11.005>
  61. Ding WK, Shah NP. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *J Food Sci.* 2009;74(2):53–61.
  62. Joubert L. Variable Pressure-SEM : a versatile tool for visualization of hydrated and non- conductive specimens . *Variable Pressure-SEM : a versatile tool for visualization of hydrated and non-conductive specimens.* 2017.
  63. Mignon A, De Belie N, Dubruel P, Van Vlierberghe S. Superabsorbent polymers: A review on the characteristics and applications of synthetic, polysaccharide-based, semi-synthetic and ‘smart’ derivatives. *Eur Polym J* [Internet]. 2019;117(October 2018):165–78. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.04.054>
  64. Hrubanova K, Krzyzanek V, Nebesarova J, Ruzicka F, Pilat Z, Samek O. Monitoring Candida parapsilosis and Staphylococcus epidermidis Biofilms by a Combination of Scanning Electron Microscopy and Raman Spectroscopy. *Sensors (Basel).* 2018;18(12):1–19.
  65. Zehnder T, Sarker B, Boccaccini AR, Detsch R. Evaluation of an alginate-gelatine crosslinked hydrogel for bioplotting. *Biofabrication.* 2015;7(2).
  66. Conforto E, Jouget, N, Buisson P, Vendeville J, Chaigneau C, Maugard. An optimized methodology to analyze biopolymer capsules by environmental scanning electron microscopy. *Materials Science and Engineering C-*. 2015: 357 - 366.

67. Renteria-Ortega M, De la Paz Salgado-Cruz M, Morales-Sanchez E, Alamilla-Beltran L, Farrera-Rebollo R, Valespino M, Calderon-Dominguez G. Effect of electrohydrodynamic atomization conditions on morphometric characteristics and mechanical resistance of chia mucilage-alginate particles. *CyTA - Journal of Food*. 2020: 461-471.

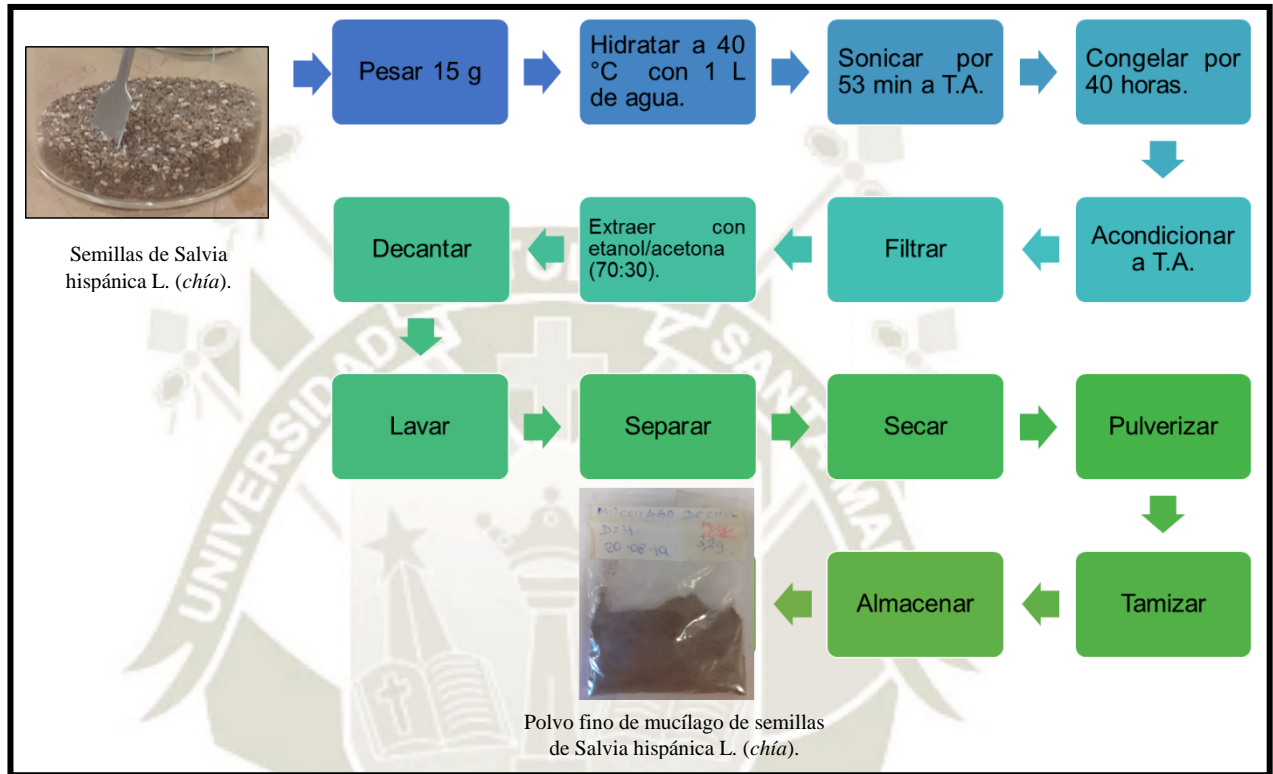


7. ANEXOS:

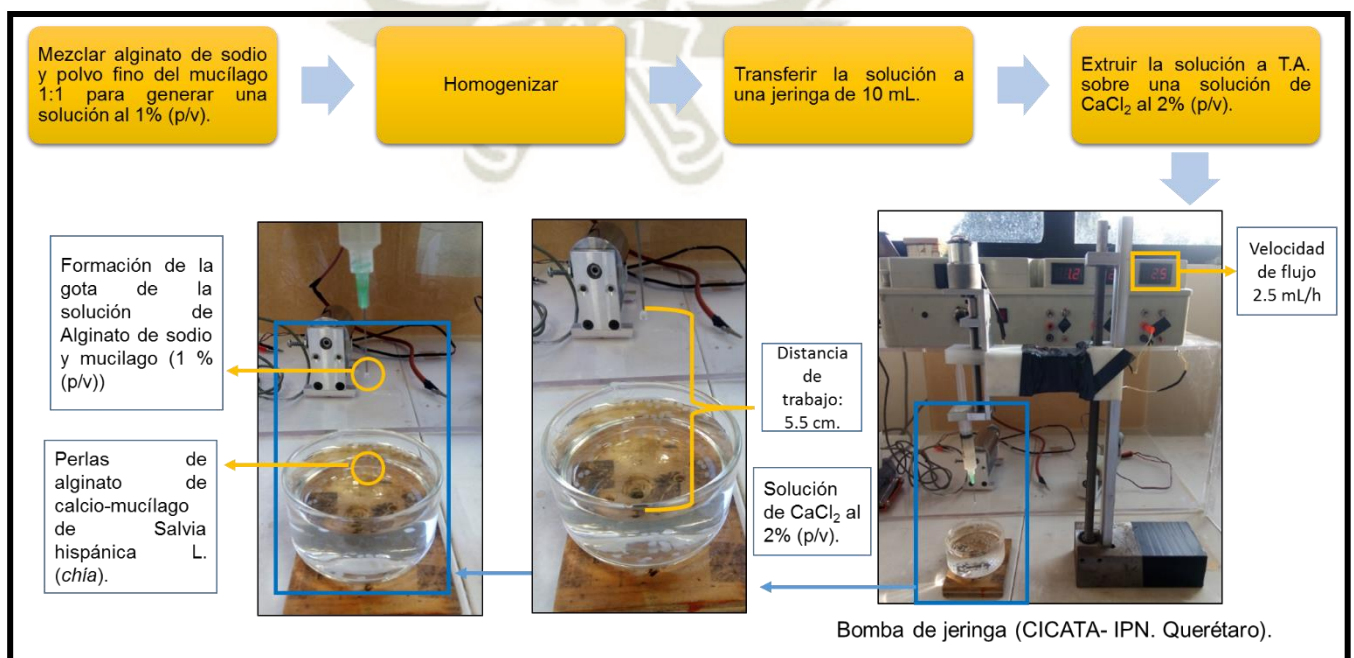
**ANEXO 1**

**PROCEDIMIENTO DETALLADO**

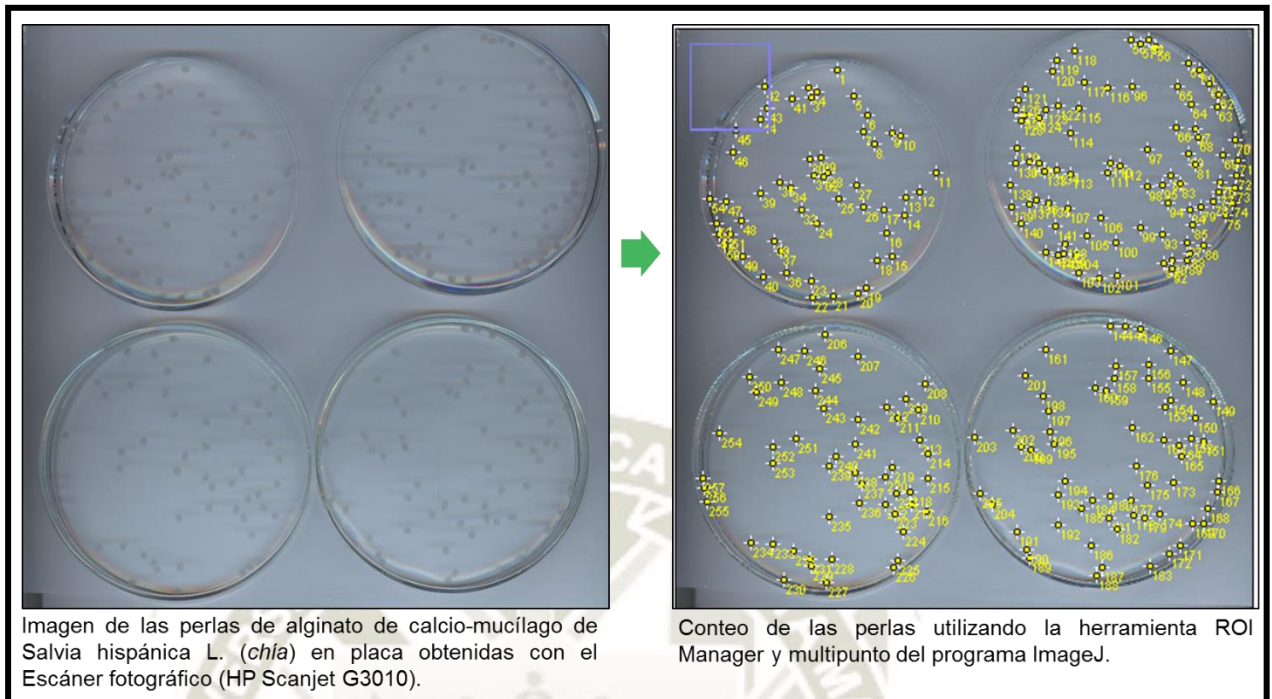
**i) Diagrama de flujo para la obtención de polvo fino de mucílago de *Salvia hispánica L. (chía)*.**



**ii) Diagrama para la obtención de perlas de Alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L. (chía)*.**

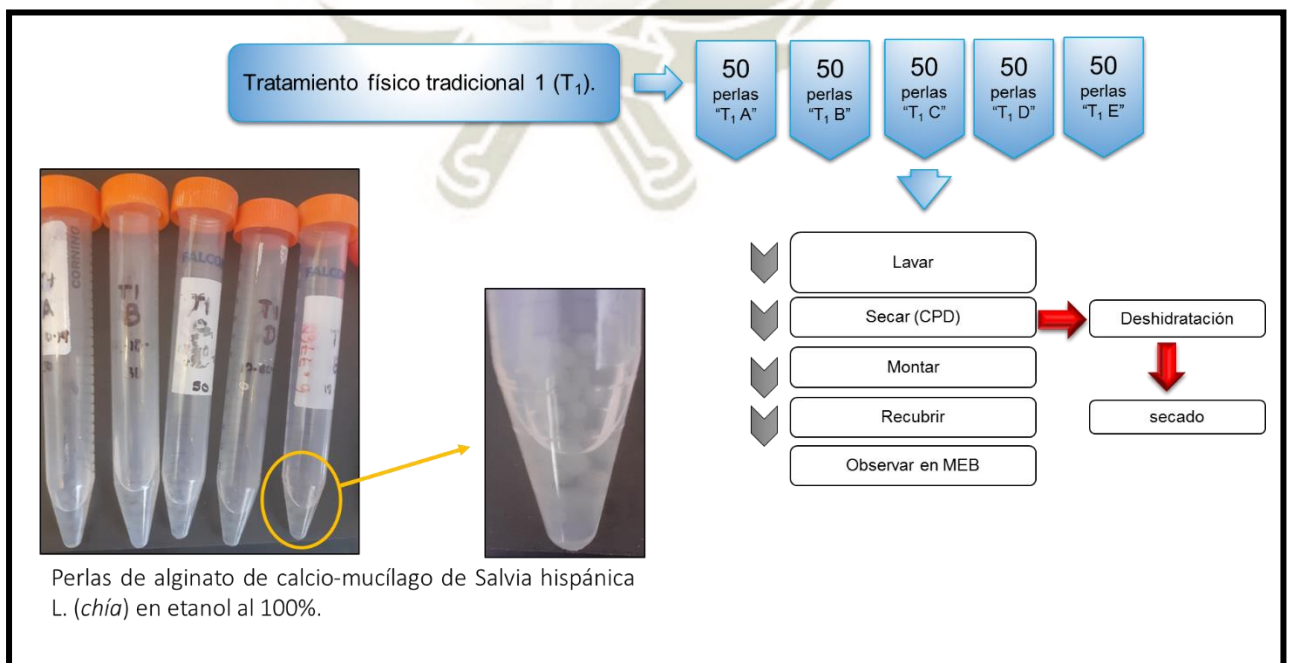


iii) **Conteo de las perlas de Alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica L. (chía).**



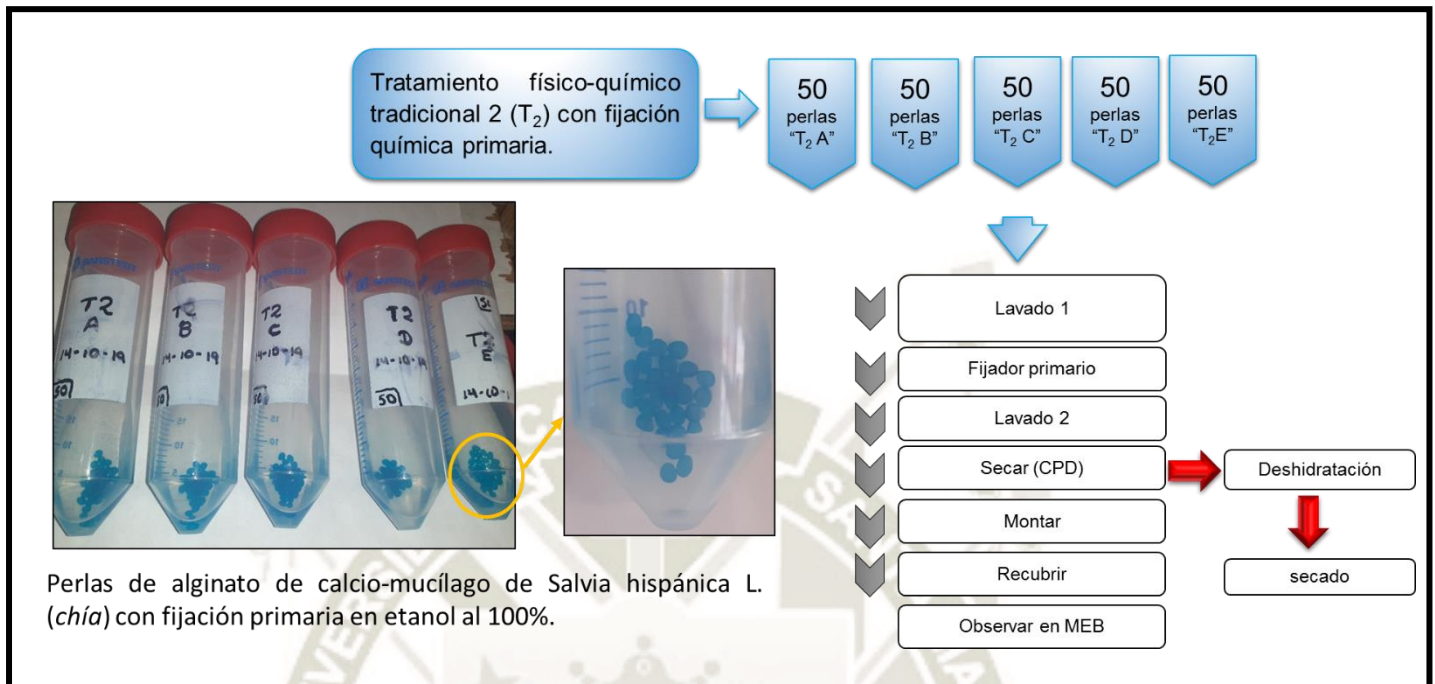
iv) **Aplicación de los métodos de preparación física y físico-química tradicionales y líquidos iónicos para la observación de muestras con alto contenido de agua en MEB.**

**Tratamiento 1 (T<sub>1</sub>) Método físico tradicional:**





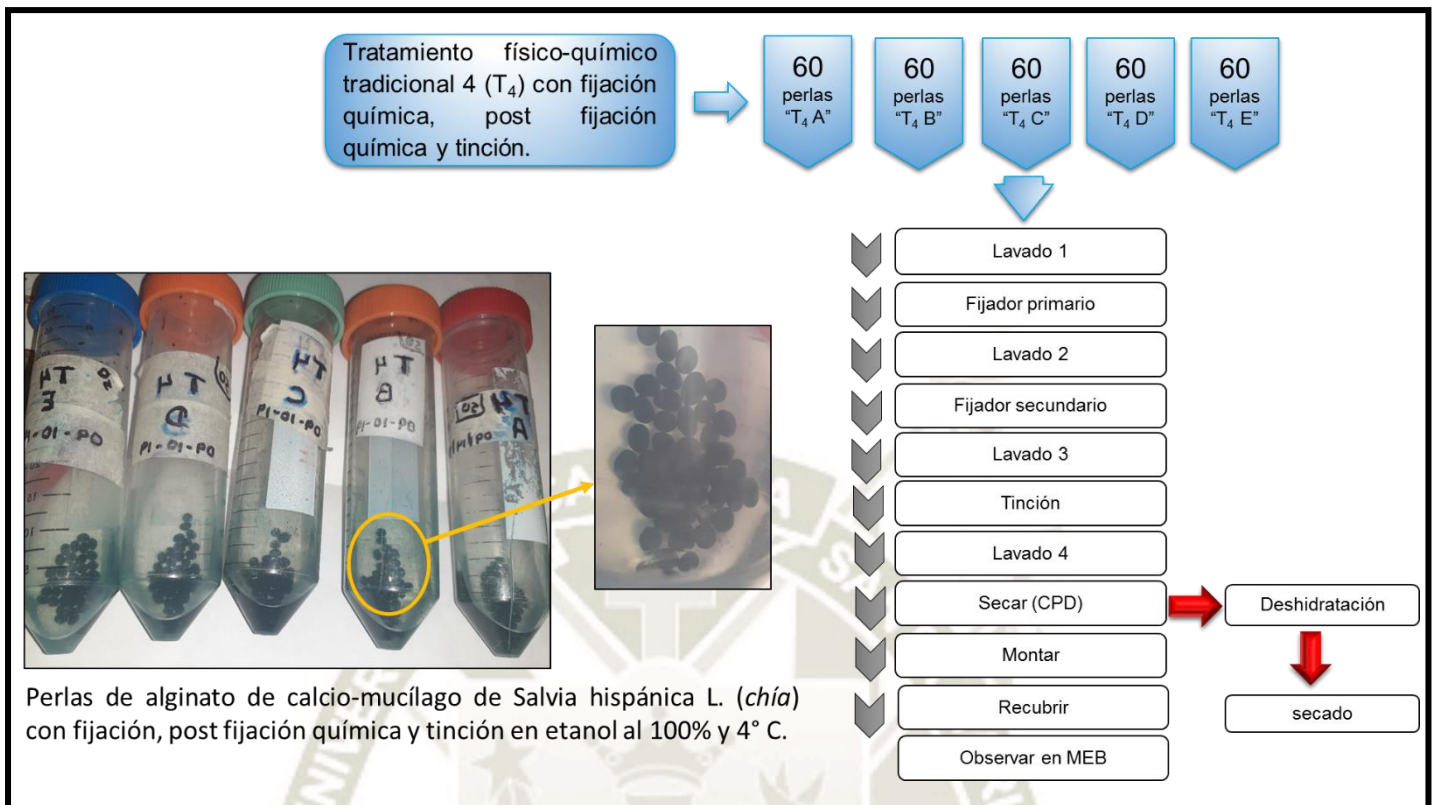
### Tratamiento 2 (T<sub>2</sub>): Método de preparación físico-químico tradicional.



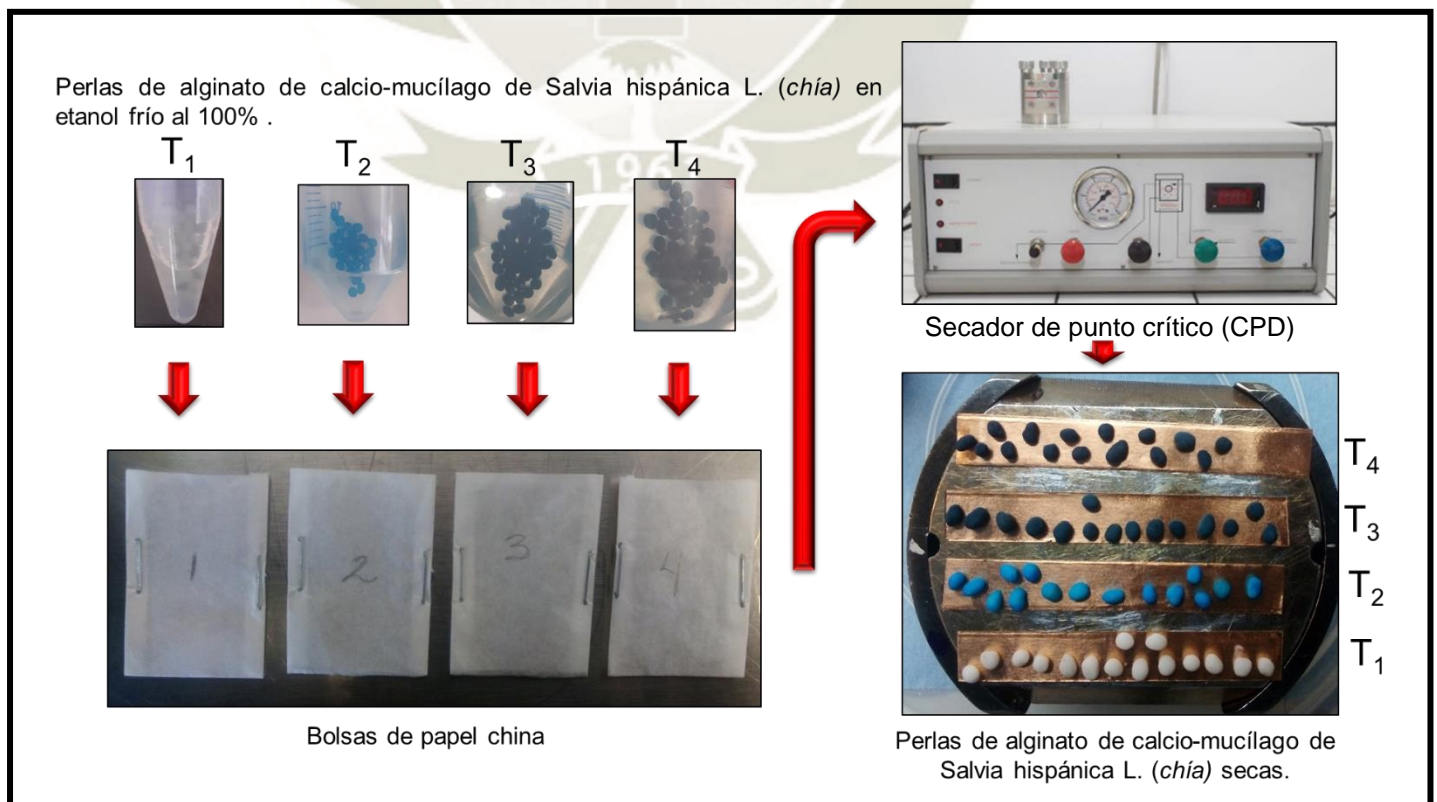
### Tratamiento 3 (T<sub>3</sub>): Método de preparación físico-químico tradicional.



**Tratamiento 4 (T<sub>4</sub>): Método de preparación físico-químico tradicional.**



**Secado con puntos críticos de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica L. (chía)*.**



**Tratamiento 5 (T<sub>5</sub>): Método de preparación química utilizando el líquido iónico  
Acetato de 1 etil 3 metilimidazolio.**



v) **Perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* L. (*chía*) antes de observarlas en un MEB**

T<sub>4</sub>

T<sub>3</sub>

T<sub>2</sub>

T<sub>1</sub>

T<sub>5</sub>

Perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* L. (*chía*) montadas en cinta conductora de cobre y recubiertas con oro. (tratamientos tradicionales).

Estas muestras se observaron en un MEB JSM-7800F Schottky Field Emission Scanning Electron Microscope.

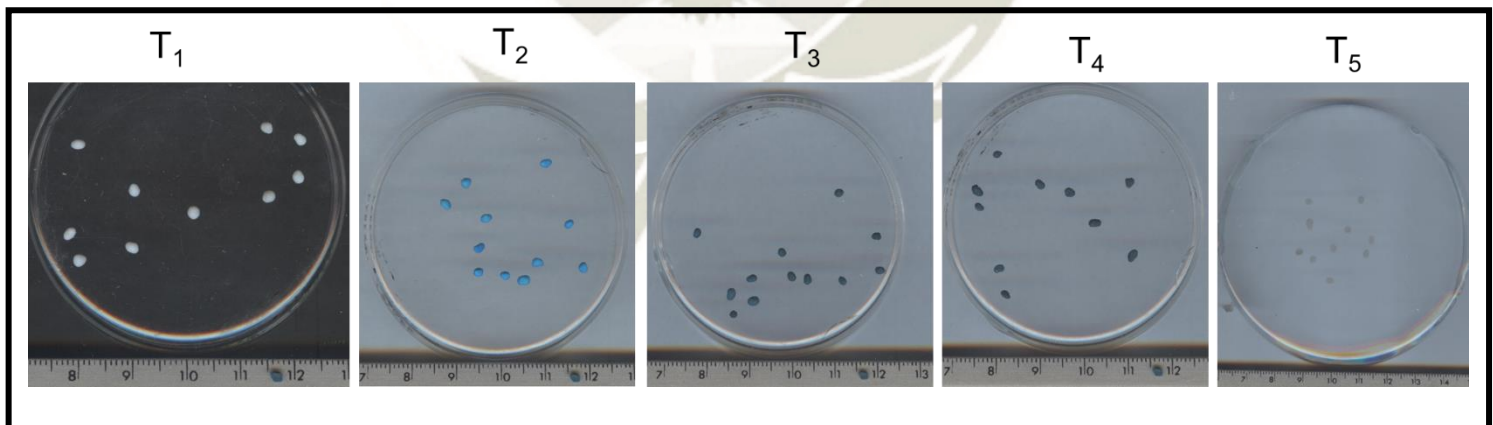
Perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* L. (*chía*) montadas en cinta conductora de cobre. (tratamiento con líquido iónico).

Estas muestras se observaron en un MEB (Jeol Mod. JSM-5800 LV)

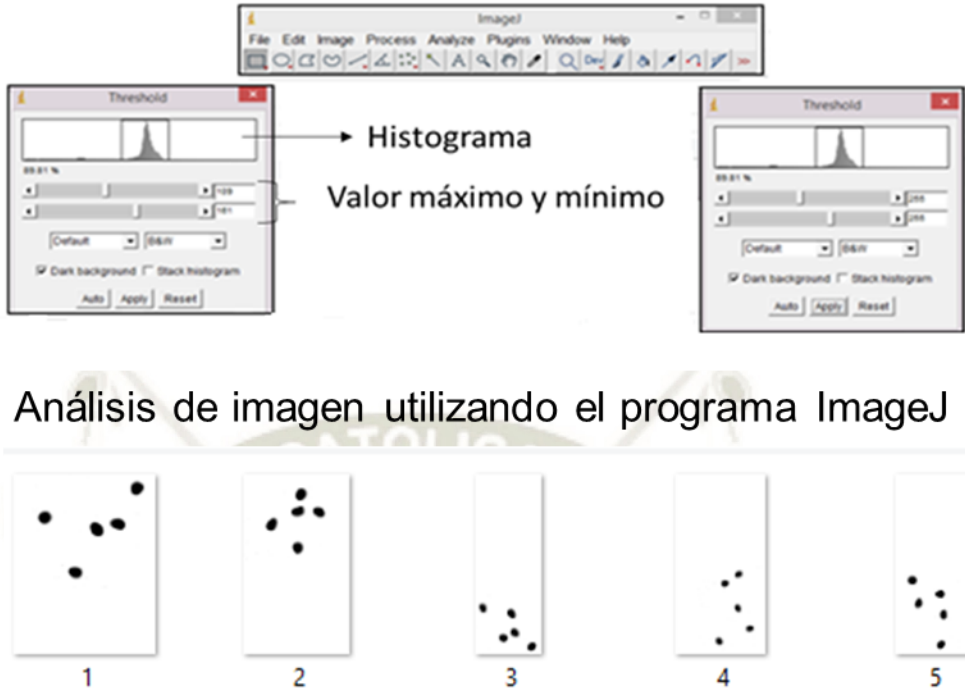
vi) **Introducción de las perlas de Alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica (chía) dentro de los Microscopios electrónicos de barrido correspondientes.**



vii) **Obtención de imágenes de las perlas con tratamientos tradicionales (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>) y tratamiento con líquido iónico (T<sub>5</sub>) utilizando un escáner (HP Scanjet G3010) durante la aplicación de los tratamientos.**



viii) procedimiento para el análisis de imagen utilizando el programa ImageJ.



The screenshot shows the ImageJ interface with the Threshold dialog box open. The dialog box includes a histogram, sliders for 'Max' and 'Min' values, and options for 'Dark background' and 'Stack histogram'. Below the dialog box, five small images labeled 1 through 5 show the progression of thresholding on a set of black dots on a white background. Image 1 shows the original image, image 2 shows the image with the threshold applied, and images 3 through 5 show the resulting binary image with the dots highlighted in black.

Análisis de imagen utilizando el programa ImageJ

Las características morfométricas que se establecieron fueron: Diámetro de Feret máximo (mm), relación de aspecto (AR) y circularidad. La escala establecida fue de 94.4pixels/mm

**ANEXO 2**

**TABLAS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO (ANOVA)**

**A) SEGUNDO ANÁLISIS DE IMAGEN**

Análisis estadístico i (Diámetro de Feret)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	3.764	0.753	17.678	<0.001
Residual	45	1.916	0.0426		
Total	50	5.681			

Análisis estadístico ii (Relación de aspecto)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	0.0742	0.0148	5.503	0.001
Residual	26	0.0701	0.00270		
Total	31	0.144			

Análisis estadístico iii (Circularidad)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	0.0387	0.00775	4.848	0.003
Residual	28	0.0447	0.00160		
Total	33	0.0835			

**B) TERCER ANALISIS DE IMAGEN**

Análisis estadístico i (Diámetro de Feret)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	3.764	0.753	17.678	<0.001
Residual	45	1.916	0.0426		
Total	50	5.681			

Análisis estadístico ii (Relación de aspecto)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	0.247	0.0495	3.026	0.020
Residual	43	0.703	0.0164		
Total	48	0.951			

Análisis estadístico iii (Circularidad)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	0.0129	0.00258	2.565	0.040
Residual	45	0.0453	0.00101		
Total	50	0.0583			

### C) CUARTO ANÁLISIS DE IMAGEN

#### a) Características morfométricas:

Análisis estadístico i (Diámetro de Feret)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	6.551	1.310	32.751	<0.001
Residual	72	2.881	0.0400		
Total	77	9.432			

Análisis estadístico ii (Relación de aspecto)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	0.235	0.0470	2.367	0.048
Residual	72	1.431	0.0199		
Total	77	1.666			

Análisis estadístico iii (circularidad)

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	5	0.0643	0.0129	11.020	<0.001
Residual	72	0.0840	0.00117		
Total	77	0.148			

#### b) Características superficiales:

Análisis estadístico de la Homogeneidad

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	1.663	0.416	202.890	<0.001
Residual	64	0.131	0.00205		
Total	68	1.794			

Análisis estadístico de la Entropía

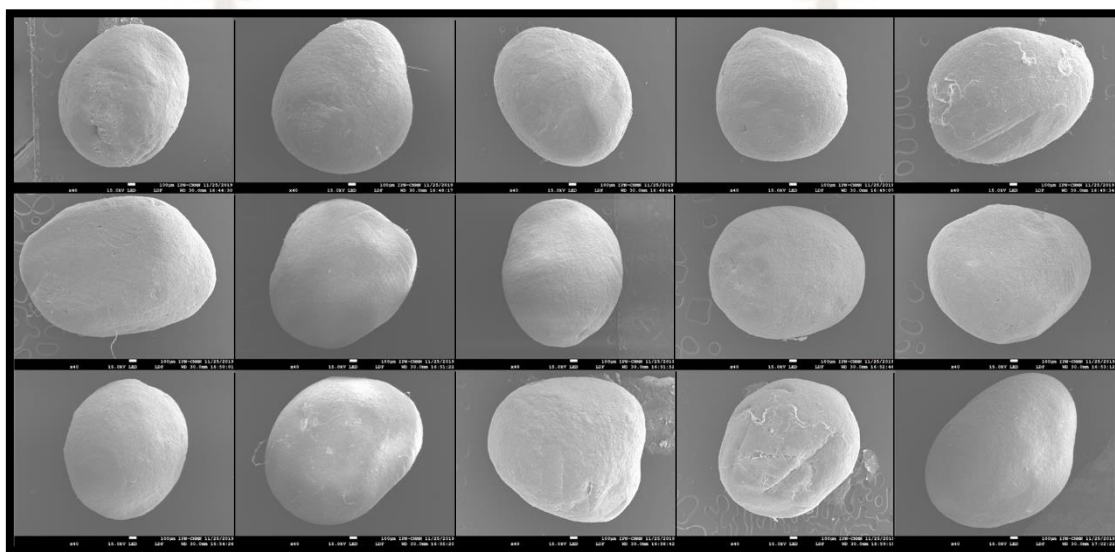
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	89.391	22.348	160.059	<0.001
Residual	64	8.936	0.140		
Total	68	98.327			

**ANEXO 3**

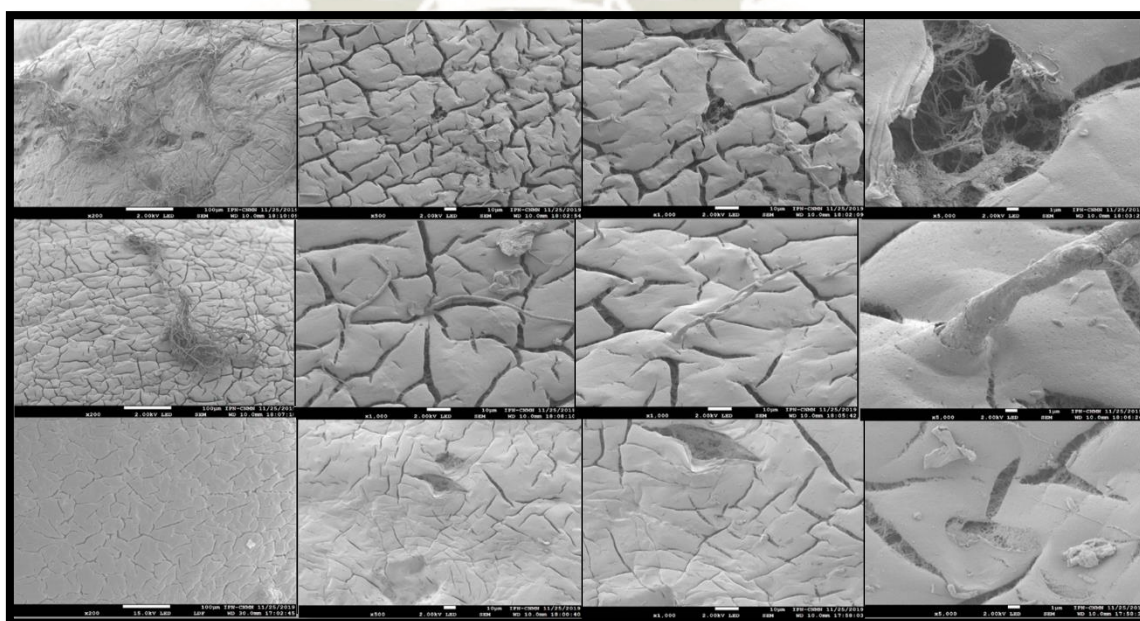
**MICROFOTOGRAFÍAS CON MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO  
DE LAS PERLAS DE ALGINATO DE CALCIO-MUCÍLAGO DE SALVIA  
HISPÁNICA (CHIA) EMPLEANDO DIFERENTES TRATAMIENTOS.**

TRATAMIENTO 1

Microfotografías de las perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica (*chía*) secadas con el método de puntos críticos y recubiertos por pulverización al vacío con oro, tomadas a 40X con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Schottky (JSM-7800F):



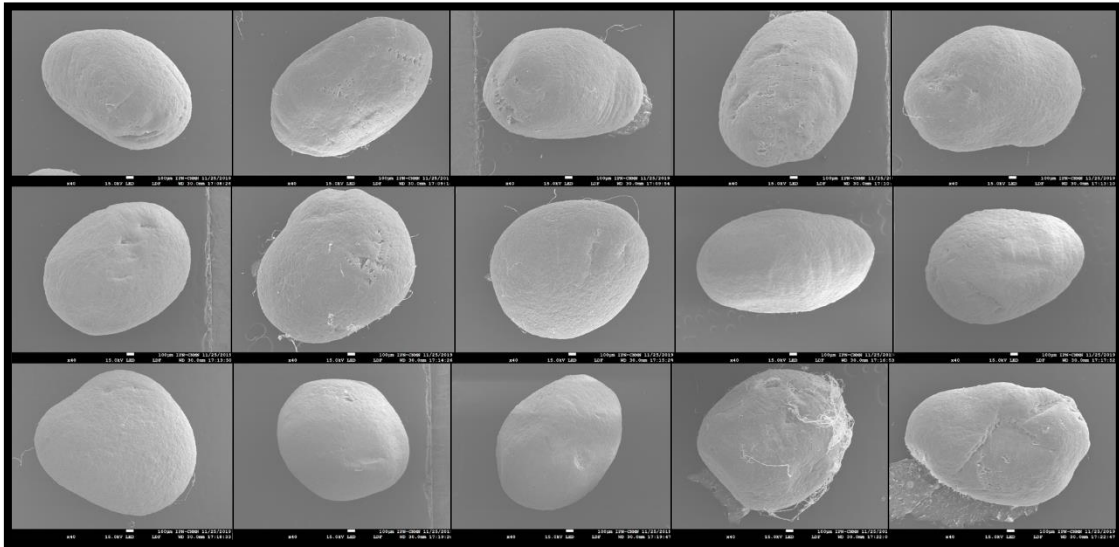
Microfotografías de la superficie de las perlas de alginato de calcio-mucílago de Salvia hispánica (*chía*) con el tratamiento 1 a diferentes aumentos tomadas con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Schottky (JSM-7800F):



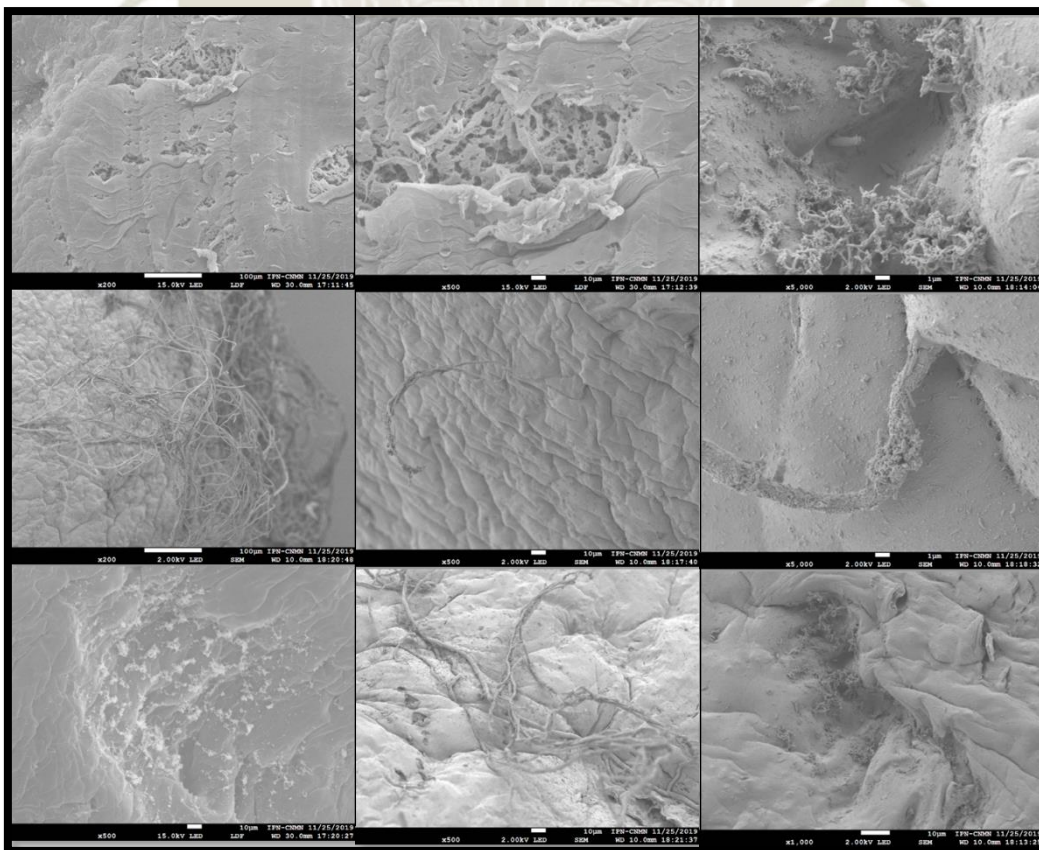


TRATAMIENTO 2:

Microfotografías de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (*chía*) previamente fijadas con solución fijadora primaria, secadas con el método de puntos críticos y recubiertos por pulverización al vacío con oro, tomadas a 40X con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Schottky (JSM-7800F):

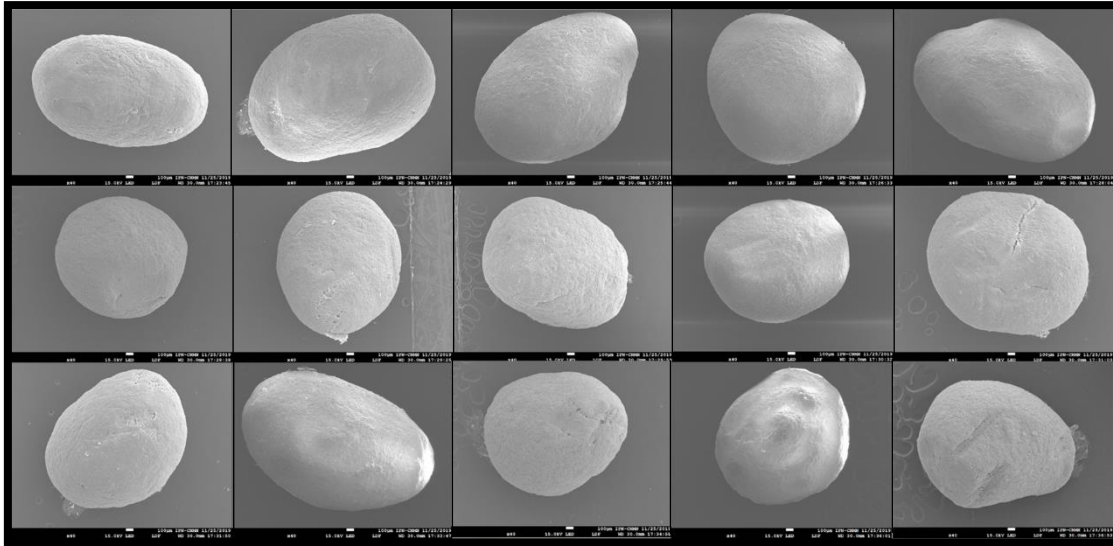


Microfotografías de la superficie de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (*chía*) preparadas con el tratamiento 2 a diferentes aumentos tomadas con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Schottky (JSM-7800F):

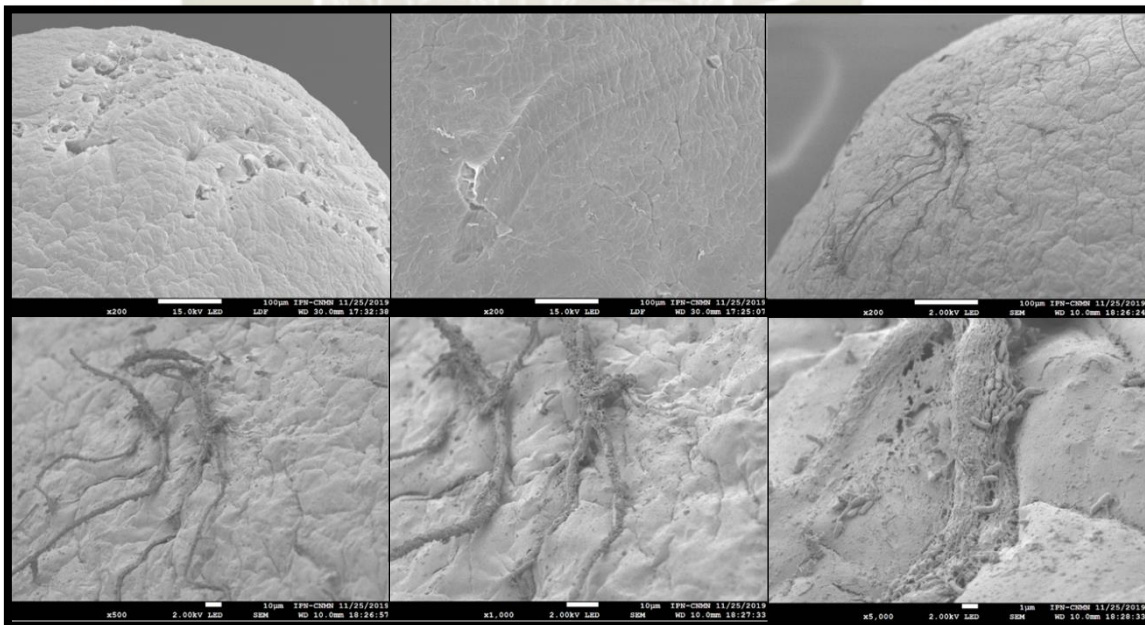


TRATAMIENTO 3:

Microfotografías de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (*chía*) previamente fijadas con solución fijadora primaria y posteriormente con solución fijadora secundaria, secadas con el método de puntos críticos y recubiertos por pulverización al vacío con oro, tomadas a 40X con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Schottky (JSM-7800F):

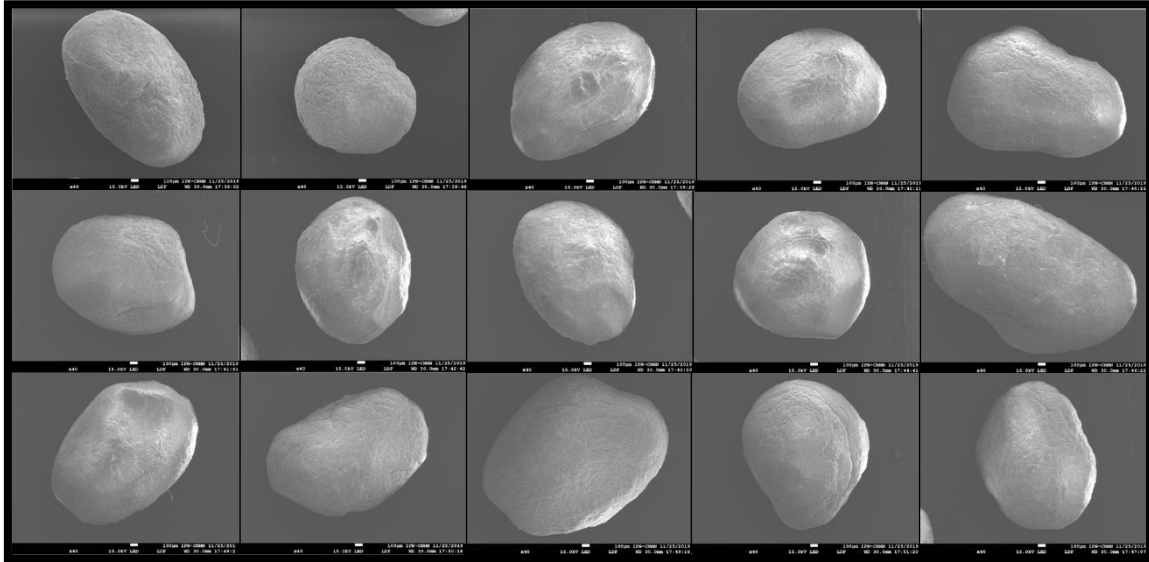


Microfotografías de la superficie de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (*chía*) preparadas con el tratamiento 3 a diferentes aumentos tomadas con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Schottky (JSM-7800F):

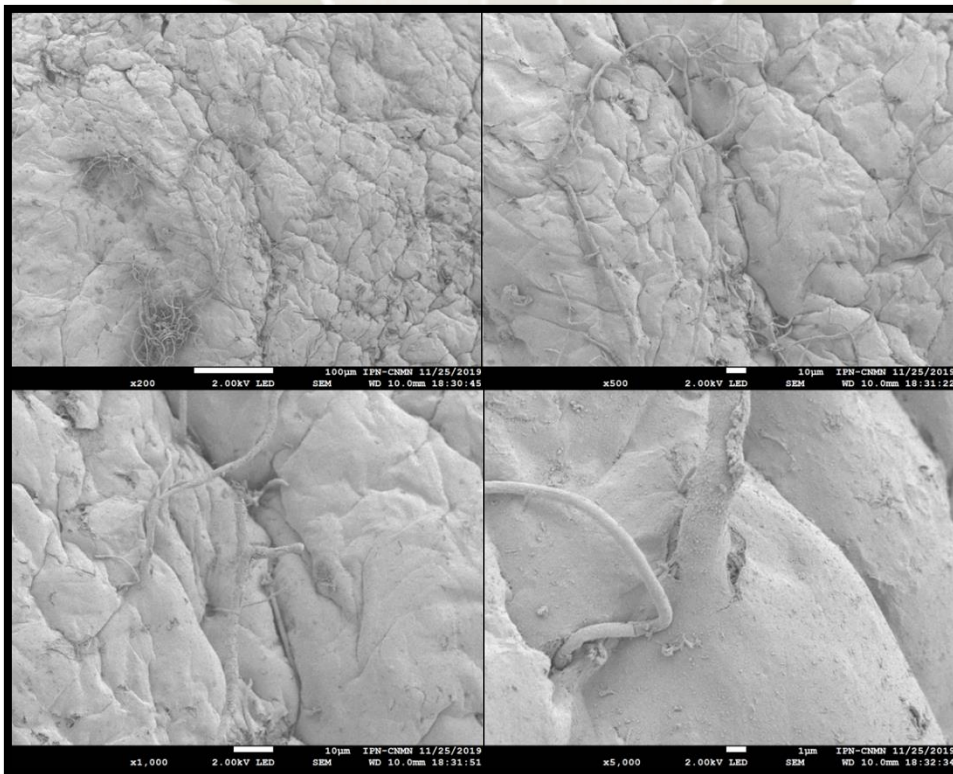


TRATAMIENTO 4:

Microfotografías de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (*chía*) previamente fijadas con solución fijadora primaria y posteriormente con solución fijadora secundaria, incorporando una solución de tinción, secadas con el método de puntos críticos y recubiertos por pulverización al vacío con oro, tomadas a 40X con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Schottky (JSM-7800F):

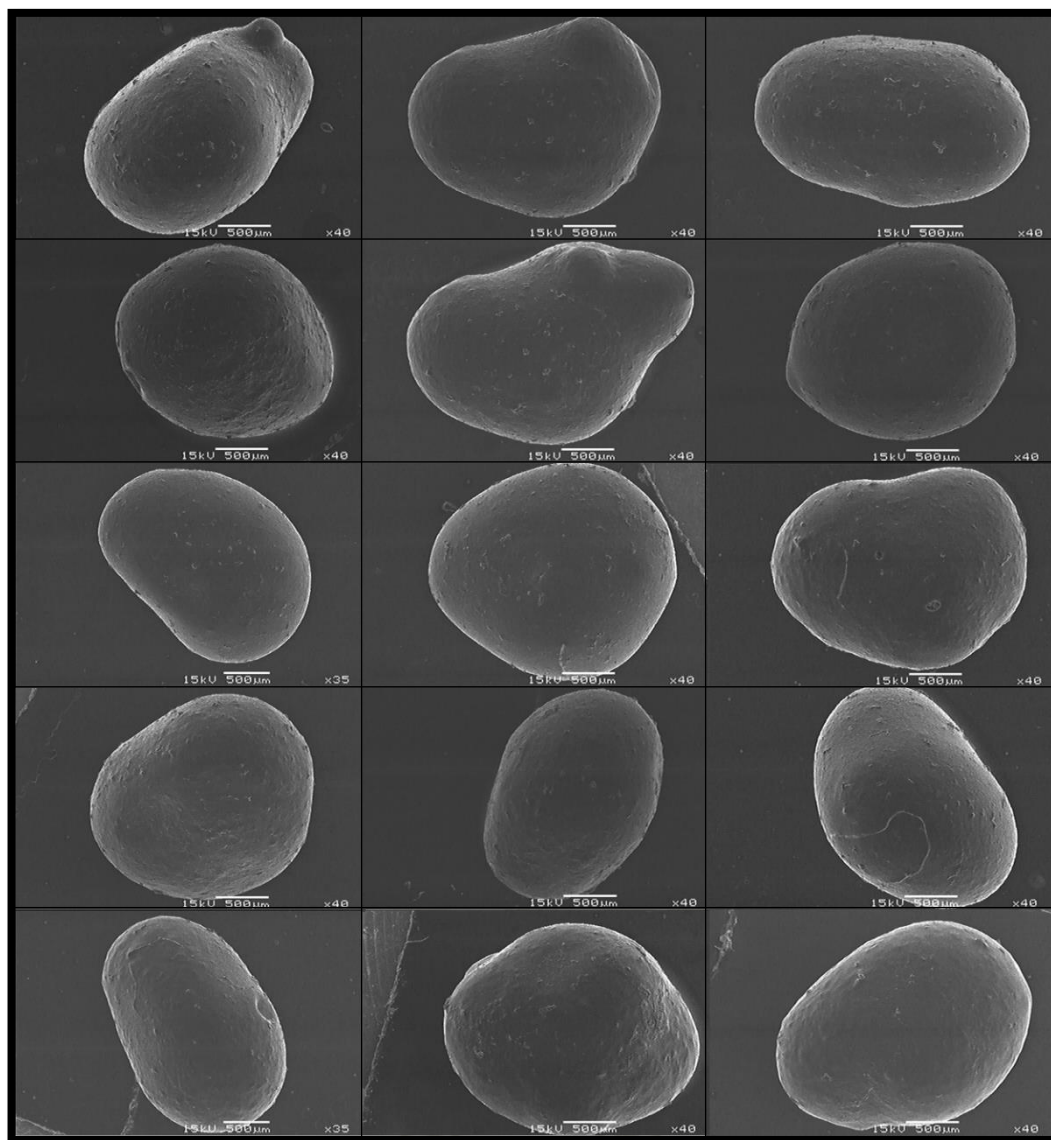


Microfotografías de la superficie de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (*chía*) preparadas con el tratamiento 4 a diferentes aumentos tomadas con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Schottky (JSM-7800F):

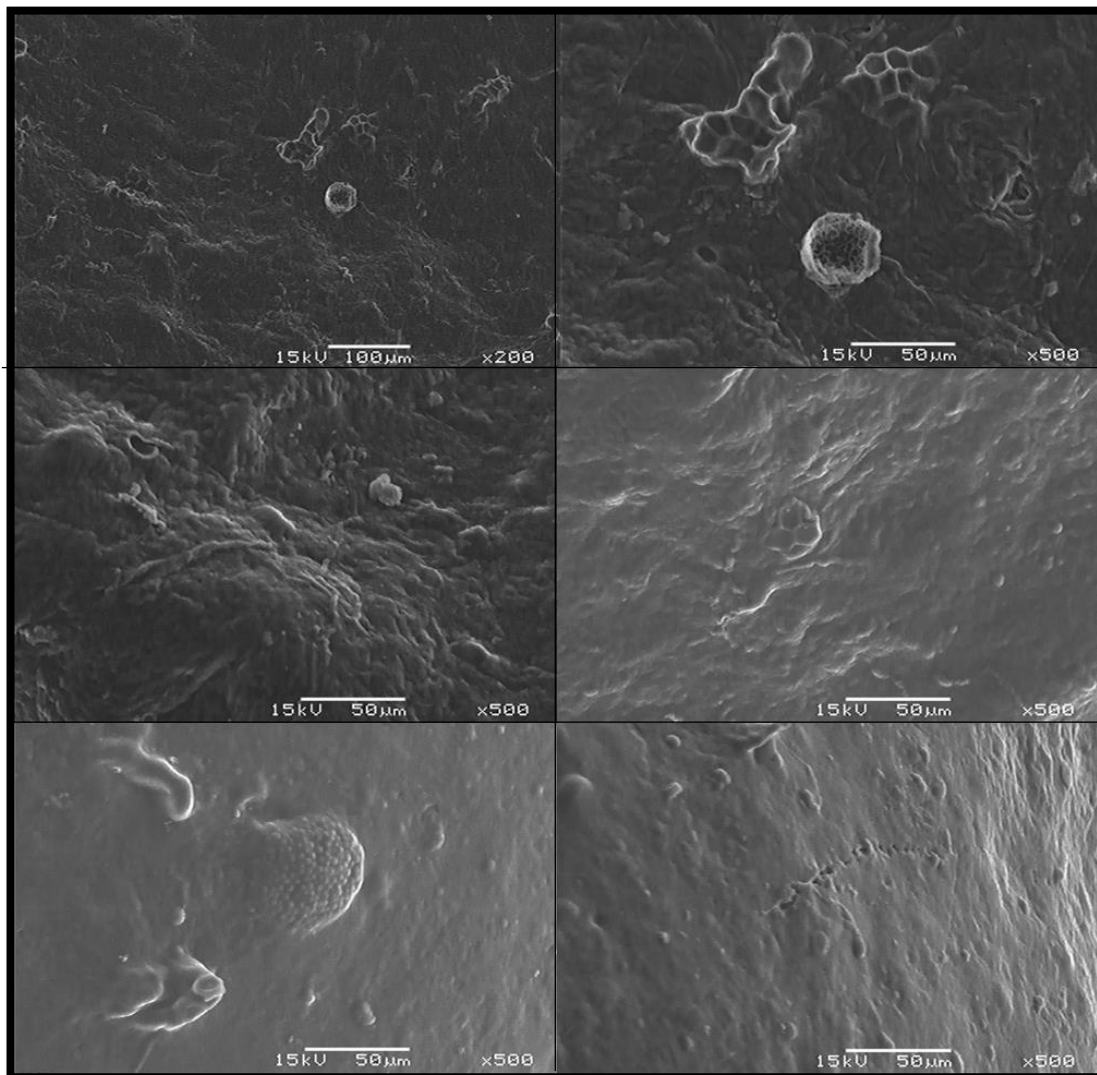


TRATAMIENTO 5:

Microfotografías de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (*chía*), tratadas con el líquido iónico acetato de 1etil 3 metilimidazolio tomadas a 40X con el microscopio electrónico de barrido Jeol Mod. JSM-5800 LV:





Microfotografías de la superficie de las perlas de alginato de calcio-mucílago de *Salvia hispánica* (*chía*) preparadas con el tratamiento 5 a diferentes aumentos tomadas con el microscopio electrónico de barrido Jeol Mod. JSM-5800 LV:



**ANEXO 4:**

**Constancia de haber realizado este proyecto de investigación en el departamento de Ingeniería Bioquímica, laboratorio de investigación II de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México.**

 **EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

 **Instituto Politécnico Nacional**  
"La Técnica al Servicio de la Patria"

**Escuela Nacional de Ciencias Biológicas**  
Subdirección Académica

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"  
175 Aniversario de la Escuela Superior de Comercio y Administración  
125 Aniversario de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía  
80 Aniversario del CECyT 6 "Miguel Othón de Mendizábal"  
75 Aniversario de la Escuela Nacional de Biblioteconomía y Archivonomía

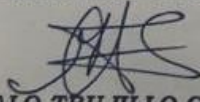
**A QUIEN CORRESPONDA:**


Por medio de la presente se hace constar que **MÓNICA DAYSI CONDORI QUISPE**, Bachiller en Ingeniería Biotecnológica de la Universidad Católica de Santa María (UCSM), sita en Arequipa, Perú, realizó trabajo experimental relacionado a la preparación de muestras biológicas con alto contenido de humedad para su observación mediante microscopía electrónica de barrido, la información obtenida durante su estancia del 24 de mayo al 16 de diciembre de 2019 en el Laboratorio de Investigación II-Ingeniería, del Departamento de Ingeniería Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN) en la Ciudad de México., le permitirá generar el documento para su titulación de Ingeniera Biotecnóloga en su Universidad de origen.

El trabajo fue dirigido por las Doctoras **Georgina Calderón Domínguez y Ma. de la Paz Salgado Cruz**, profesoras investigadoras de esta Institución.

A solicitud de la interesada se extiende la presente **CONSTANCIA** para los fines legales que ella estime conveniente, a los veintinueve días del mes de enero del año dos mil veinte.


**ATENTAMENTE**  
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

  
**DR. GONZALO TRUJILLO CHÁVEZ**  
DIRECTOR

  
**S. E. P.**  
INSTITUTO POLITECNICO  
NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCION

GTCH/MPCC/plg\*

Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, Alcaldía de Miguel Hidalgo, C.P. 11340, Ciudad de México.  
Teléfono 5729 6300, extensiones 46271 y 62432

  
**2020**  
LEONA VICARIO  
BENEMÉRITA MADRE DE LA PATRIA