

EL SECADO DE PUNTO CRÍTICO (SPC) COMO TÉCNICA APLICADA EN LA PREPARACIÓN DE GELES DE POLI(ACRILAMIDA-CO-ÁCIDO ACRÍLICO) POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

José Luis Prin¹, Neudys González¹, Haidetty Villarroel¹, Marvelis Ramírez² y Blanca Rojas de Gáscue^{1*}

1: Universidad de Oriente. Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas “Dra. Susan Tai”, IIBCAUDO, Apdo. Postal 245, Cerro del Medio, Av. Universidad. Cumaná, Estado Sucre, Venezuela

2: Universidad de los Andes. Departamento de Química, Grupo de Polímeros, Estado Mérida, Venezuela.

*e-mail: joseluis_prin@hotmail.com y blanca_gascue@yahoo.com

RESUMEN

En este trabajo se presentan los parámetros de la técnica del secado de punto crítico (SPC) como herramienta de la microscopía electrónica de barrido (MEB) para observar la morfología en hidrogeles. El tratamiento de los hidrogeles en el SPC los transforma en aerogeles, redes tridimensionales en estado seco, los cuales mantienen el tamaño de los poros que tenían cuando estaban hidratados. Las morfologías analizadas de los hidrogeles, reveló que la técnica empleada fue adecuada, ya que permitió establecer diferencias significativas producidas por efecto de la síntesis en el tamaño de poros, tal como lo reflejan los histogramas obtenidos a partir de las micrografías MEB.

Palabras Claves: Hidrogeles, secado de punto crítico, microscopía electrónica de barrido, morfología.

ABSTRACT

In this paper, the technical parameters of the critical point drying (CPD) as a tool for scanning electron microscopy (SEM) to observe the hydrogel morphology is presented. The hydrogel processing in the SPC transforms into aerogels, three dimensional networks in the dry state, which maintain the pore size than when they were hydrated. The morphologies of the gels analyzed, revealed that the technique used for the hydrogels was appropriate to establish significant differences effect produced by the synthesis in the pore size, as reflected in the histograms obtained from SEM micrographs.

Keywords: Hydrogels, critical point drying (CPD), scanning electron microscopy.

1. INTRODUCCIÓN

La microscopía electrónica de barrido (MEB) permite el estudio morfológico externo de todo tipo de muestras. No obstante, cada muestra requiere el desarrollo de una metodología o protocolo apropiado. El objetivo de este trabajo es presentar los parámetros instrumentales de la técnica del secado de punto crítico (SPC) como herramienta de la MEB para observar la morfología en geles.

La apariencia externa que tiene un gel depende de su proporción líquido / sólido. Los hidrogeles, por ser polímeros entrecruzados mantienen su aspecto de sólidos elásticos al estar solvatados; sin embargo, la forma no hidratada suele ser vítrea y dura (xerogel). La consistencia suave y elástica en el estado hidratado está determinada por la baja densidad de entrecruzamiento del polímero y por los monómeros hidrófilos de partida[1].

El secador de punto crítico (SPC) es utilizado generalmente en la preparación de muestras biológicas (órganos, tumores) a ser analizadas en el MEB. Su principio se basa en que una muestra orgánica hidratada (polímeros hidrogeles, almidón) o biológica (células, tejidos, sangre, parásitos, espermatozoides, entre otros) es previamente tratada con diferentes solventes y posteriormente el fluido es desplazado con el fin de mantener la microestructura inicial del estado hidratado [2]. Es importante destacar que las muestras que quieran ser investigadas mediante microscopía electrónica de barrido deben ser secadas antes de ser introducidas en el microscopio, de otro modo la baja presión en el microscopio electrónico causará que el agua (y otros líquidos volátiles) se evapore saliendo violentamente del espécimen, alterando la estructura del mismo. Muestras con una rigidez inherente como metales, rocas, huesos, etc. se pueden secar al aire o en un desecador de vacío sin que su estructura sufra alteración alguna [3]. Sin embargo, las estructuras blandas con un alto contenido en agua se deformarán si se dejan secar al aire ya que las fuerzas de tensión superficial asociadas a la salida del agua causarán daños estructurales.

Para evitar los efectos dañinos que las fuerzas anteriormente mencionadas tienen en la estructura de los especímenes secados al aire, durante el proceso de secado debe pasarse el límite entre la fase “líquido-gas”. Entre los métodos que existen para conseguirlo se encuentra el método del punto crítico en el cual el líquido pasa directamente a la fase gas. De este modo, las fuerzas de deformación se evitan debido a que el proceso de secado tiene lugar por encima del punto crítico del líquido, donde el límite entre la fase líquida y la fase gas no existe. El punto crítico es aquel estado particular de un gas en el cual todavía puede sufrir licuefacción. Este estado viene determinado por la presión crítica y la temperatura crítica, por encima de este punto el gas no puede experimentar licuefacción debido a que el límite entre la fase gaseosa y la fase líquida ha desaparecido: en este punto el estado líquido y el estado gas son igualmente densos. En el punto crítico el líquido pasa a la fase gas sin pasar por el límite de fases “líquido-gas”, y la muestra se seca sin los efectos dañinos del secado en aire. Según los valores de presión y temperatura crítica del agua (228.5 bar y 374 °C), si una muestra contiene agua no puede ser secado mediante el método del punto crítico ya que los valores tan altos de presión y temperatura podrían destruirlo. Así, la muestra debe ser transferida a un agente apropiado, llamado fluido transicional, tal como es el dióxido de carbono cuyos valores de punto crítico son considerablemente más ventajosos (73.8 bar y 31 °C) [4]. En el caso de los hidrogeles, es de especial interés investigar su estructura en el estado hinchado, una vez alcanzado el equilibrio. Si se deja secar al aire, el tamaño de los poros se reduce debido a la expulsión del agua, por lo que es importante emplear el método antes descrito.

Es importante destacar que el aporte de este trabajo se basa en que los hidrogeles fueron tratados como una muestra biológica, considerando sus propiedades físicas semejantes a las de los tejidos vivos (contenido en agua relativamente alto, consistencia blanda y elástica y baja tensión superficial). Por otro lado, se puede mencionar que en trabajos previamente reportados sobre la morfología de los hidrogeles, las micrografías presentadas reflejan que ocurre el cierre de los poros cuando previamente se prepara el gel para ser observado por MEB en forma seca (xerogel) [5], o se deforma cuando es fracturado criogénicamente [6] impidiendo, en tales casos, poder distinguir la estructura porosa característica de los hidrogeles y poder reportar las dimensiones reales de los poros que posee este material al alcanzar el equilibrio.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Preparación de los hidrogeles

Los geles se prepararon en forma de poliacrilamida (PAAm) y de copolímeros de poli(acrilamida-co-ácido acrílico), a partir de una alimentación AAm/AAC, 90/10. Para todos los hidrogeles se utilizó como agente entrecruzante N,N'-metilenbisacrilamida (NNMBA) y persulfato de amonio como iniciador. Los hidrogeles obtenidos se colocaron en agua desionizada, donde se realizaron lavados continuos (cada 24 h) hasta ajustar el pH de agua aproximadamente a 7 y por último, se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron protegidos de la luz y el aire [7].

2.2 Análisis de los hidrogeles en el MEB y tratados previamente por SPC

Los geles fueron analizados en un microscopio electrónico de barrido y preparados en un secador de punto crítico (SPC). En el SPC se incrementa la temperatura hasta que en la muestra se alcance una temperatura y presión crítica, en la cual la densidad de la fase líquida sea iguala al de la fase gaseosa y la diferencia entre una fase a la otra desaparece, por lo cual la tensión superficial es cero y la ultraestructura se mantiene en el estado seco. Este es el punto crítico o estado supercrítico de la materia, en que la densidad del fluido es igual en cualquier punto del volumen que ocupa dentro de la muestra. Una vez culminado este proceso la muestra se prepara para que sea conductora y su topografía puede ser analizada en el microscopio electrónico [3,4].

De manera que para su análisis en el MEB primero una porción de la pastilla se dejó hinchar hasta el equilibrio fisicoquímico en agua desionizada. Luego se les realizó una deshidratación paulatina en soluciones de etanol/agua 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% y 70% por 25 min. en cada solución. Posteriormente se colocó en el porta muestra y se llevó al SPC, marca Hitachi modelo HCP-2, donde se hicieron lavados sucesivos con CO₂ con la finalidad de deshidratar la muestra sin modificar su estructura. Seguidamente se colocaron en un taco de aluminio con cinta conductora de doble adhesión y evaporación de cromo en un evaporador de alto vacío, marca Hitachi modelo HUS-5GB. Para poder obtener las micrografías se analizaron los geles

secos en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo analítico, modelo S-800 FE marca Hitachi operado a 10 KeV. Posteriormente se comprobó que al menos en los geles de PAAm, podía obviarse el paso de la deshidratación en soluciones de etanol/agua, y se mantenía la misma estructura porosa, gracias al uso del SPC. No obstante, esto debe optimizarse en función de la composición del gel, ya que en hidrogeles con almidón la deshidratación paulatina ha sido requerida [8].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las morfologías analizadas de los hidrogeles revelaron que la técnica empleada fue adecuada, ya que permitió establecer diferencias significativas producidas por efecto de la síntesis en el tamaño de poros, tal como lo reflejan los histogramas obtenidos a partir de las micrografías (Figura 1).

En la figura 2 se muestran las micrografías obtenidas para los hidrogeles sintetizados a partir de poliacrilamida y poli (acrilamida-co-ácido acrílico). Es de resaltar que en este último se midieron poros que iban desde 14 micras a 121 μm , aunque la mayor población de poros está entre 40 y 60 μm , mientras que en el hidrogel de poliacrilamida el tamaño de los poros no llegaba a 2 μm , como se puede apreciar en su micrografía.

El tratamiento con el SPC, convierte los hidrogeles en “aerogeles” tal como han sido denominados recientemente [9,10]. De igual forma, se pudo apreciar la estructura tridimensional en forma de malla en ambos tipos de polímeros, característica de estos geles. Pero la presencia de poros interconectados se destacó especialmente en las micrografías del copolímero, característica que le confiere al material la propiedad de capilaridad que le permite recibir una mayor cantidad de líquido.

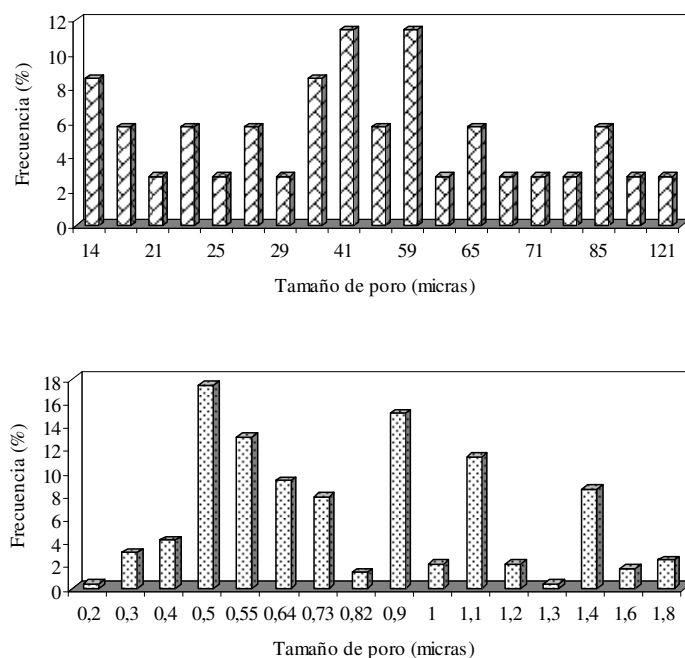


Figura 1. Histogramas de tamaños de poro en los hidrogeles de: poli(AAm-coAAc) (superior) y poliAAm (inferior).

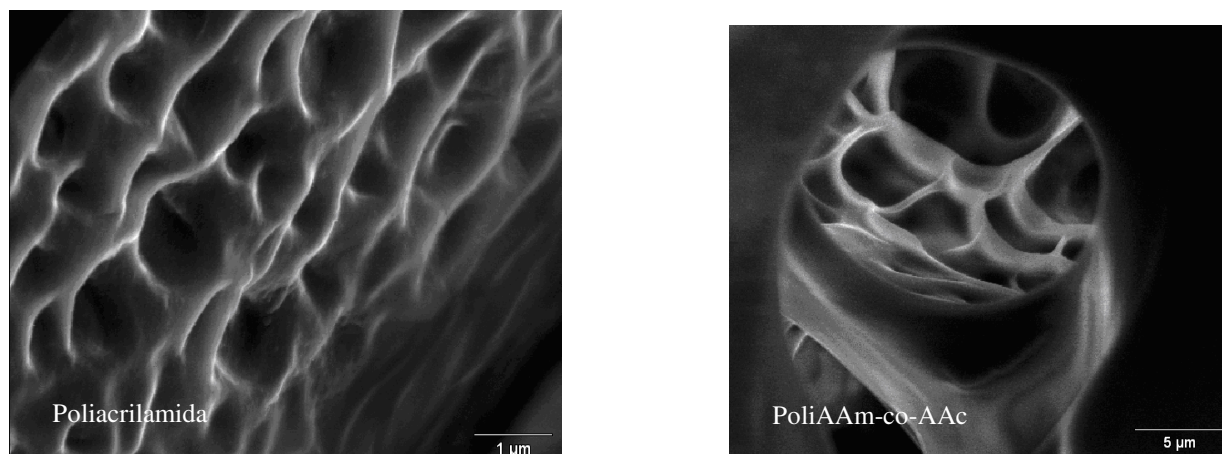


Figura 2. Micrografías MEB de los hidrogeles de poliAAm (izquierda) y poli(AAm-coAAc) (derecha)

Los resultados obtenidos han reflejado la efectividad del SPC para la preparación de los geles previamente hidratados, no obstante hay que resaltar que el tratamiento de liofilizado previo de los geles también ha demostrado ser un tratamiento adecuado para mantener la malla del gel sin deformarse ni colapsar [11-13].

4. REFERENCIAS

- [1]. Katime I, Katime O, Katime D. Los materiales inteligentes de este milenio: Los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco, Bilbao España, 2004.
- [2]. Cortés R, Licea S. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 1999; 41 (3): 157-166
- [3]. Ojeda Sahagún J.L. “Métodos de Microscopía Electrónica de Barrido en Biología”. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cantabria, Santander España, 1997
- [4]. http://www.ua.es/es/investigacion/sti/servicios/analisis_instrumental/microscopia/sem.html
- [5]. Zhao Y, Kang J, Tan T. Polymer. 2006; 47: 7702-7710
- [6]. Serrano Aroca A, Campillo Fernández AJ, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas, Gallego Ferrer G, Pissis P. Polymer. 2004; 45: 8949-8955.
- [7]. Rojas de Gáscue B, Ramírez M, Prin JL, Torres C, Bejarano L, Villarroel H, Rojas L, Murillo M, Katime I. Rev. LatinAm. Metal. Mat. 2010; 30 (1): 28-39.
- [8]. González N, Prin JL, Benítez JL, Ramírez A, García A, Ramírez M, Sabino M, Rojas de Gáscue B. Rev. LatinAm. Metal. Mat. 2012; 32 (1): 136-144.
- [9]. Quignard F, Valentin R, Di Renzo F. New J. Chem. 2008; 32: 1300-1310
- [10]. Jagur-Grodzinski J. Polym. Adv. Technol. 2010; 21: 27-47
- [11]. Barbucci R, Magnani A, Leone G. Polymer. 2002; 43: 3541- 3548
- [12]. Bolívar G, Mas M, Ramírez M, Tortolero M, Cañizales E. Rev. LatinAm. Metal. Mat. 2011; 31 (2): 150-160.
- [13]. Urbina de Navarro C, Bolívar G, Ramírez M, Prin JL, Rodríguez R, Rojas de Gáscue B. Resultados no publicados.