

# Tensión Superficial de Medios de Cultivo Celular

Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requisitos para obtener el título de

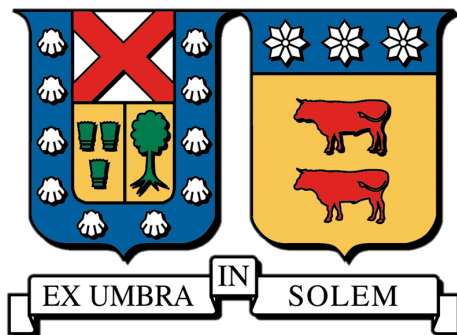
Licenciado en Ciencias  
Mención Física

por

**Felipe San Martín Castro**

Profesor Guía: **Dr. Tomás Corrales**

Comité Evaluador: **Dr. Jorge Valdés**  
**Dr. Cristian Acevedo**



Universidad Técnica  
Federico Santa María  
Valparaíso, Chile

Abril, 2024



# AGRADECIMIENTOS

A mi familia: mi mamá, mi abuela y mi hermana. No solo por su apoyo, sino que también por su amor incondicional y perenne paciencia, los pilares fundamentales de este (a ratos aparentemente interminable) viaje. Perdón por cada rabia y decepción, gracias por hacerme quien soy. Las amo.

A mi profesor guía, Dr. Tomás Corrales, cuya paciencia y disposición no tienen cota.

A mis amigxs y compañerxs de generación, por encarnar a detalle la palabra contención. Las risas, llantos y también silencios en su compañía están grabados a fuego en mi corazón.

Finalmente, agradezco el apoyo del proyecto Fondecyt Regular 1211901 'Multiscale Mechanical Properties of Hygroscopic Nanofibers' y del Núcleo Milenio en Nanobiofísica (NCN2021 021).

# ABSTRACT

Cell cultures constitute an essential technique in tissue engineering. Cells, through their metabolism, modify the environment in which they develop. The consequences to this process are a field that has not been studied enough. In this thesis, experiments are performed to quantify the changes produced by cell metabolism of Myoblasts of the C2C12 line cultured in DMEM media. Both the Surface Tension and Contact Angle were measured on supernatant samples at different culture times and with different cell densities. The results were then averaged to observe the magnitude of the variation in these variables and to analyze whether they allow conclusions to be drawn regarding the effect of the cells cultured in the medium in which they proliferate.

***Keywords:*** Surface Tension; Cell cultures; Optical Tensiometer; Goniometry; Contact Angle

# RESUMEN

El cultivo celular constituye una técnica esencial en lo que a ingeniería de tejidos refiere. Las células, a través de su metabolismo, modifican el entorno en el que se desarrollan. Las consecuencias de este proceso son un campo que no ha sido suficientemente estudiado. En esta tesis, se realizan experimentos buscando cuantificar los cambios producidos por el metabolismo celular de Mioblastos de línea C2C12 cultivados en medios DMEM. Tanto la Tensión Superficial como el Ángulo de Contacto fueron medidos para muestras de líquido sobrenadante en cultivos a distintas marcas temporales y con diferentes concentraciones celulares, para luego promediar los resultados con fin de observar la magnitud de la variación en dichas variables y analizar si estas permiten obtener conclusiones referentes al efecto de las células cultivadas en el medio en que proliferan.

***Palabras clave:*** Tensión superficial; Cultivos celulares; Tensiómetro óptico; Goniometría; Ángulo de Contacto

# Índice general

## Agradecimientos

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introducción</b>                                             | <b>3</b>  |
| 1.1. Motivación . . . . .                                          | 3         |
| 1.2. Antecedentes . . . . .                                        | 5         |
| 1.2.1. Cultivos Celulares . . . . .                                | 5         |
| 1.2.2. Medios de cultivo DMEM . . . . .                            | 6         |
| 1.2.3. Mioblastos de línea C2C12 . . . . .                         | 7         |
| 1.2.4. Tensión Superficial . . . . .                               | 8         |
| 1.2.5. Ángulo de Contacto . . . . .                                | 10        |
| 1.3. Objetivos e hipótesis . . . . .                               | 11        |
| <b>2. Metodología Experimental</b>                                 | <b>12</b> |
| 2.1. Técnicas Experimentales . . . . .                             | 12        |
| 2.1.1. Método de Gota Pendiente para Tensión Superficial . . . . . | 13        |
| 2.1.2. Método de Gota Sésil para Ángulo de Contacto . . . . .      | 14        |
| 2.2. Procedimientos y Equipos . . . . .                            | 15        |
| 2.2.1. Obtención de muestras . . . . .                             | 15        |
| 2.2.2. Tensiómetro óptico . . . . .                                | 16        |
| <b>3. Resultados y Análisis</b>                                    | <b>17</b> |
| 3.1. Tensión Superficial . . . . .                                 | 17        |
| 3.2. Ángulo de Contacto . . . . .                                  | 24        |
| <b>4. Conclusiones</b>                                             | <b>25</b> |
| <b>Referencias</b>                                                 | <b>27</b> |

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Motivación

Los cultivos celulares son la base de tecnologías incipientes, como son por ejemplo los cultivos de carne *in vitro* [1]. Esta técnica requiere de un medio acuoso que proporcione los nutrientes y las condiciones adecuadas. El desarrollo de las células modifica la composición original de su entorno, como sucede con el consumo de glucosa y posterior producción de lactatos (ver Figura 1.1). [2].

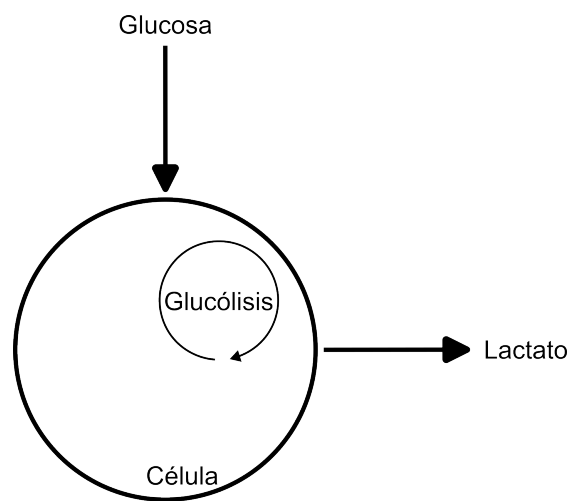


Figura 1.1: Vista esquemática simplificada del proceso de consumo de glucosa y producción de lactato

La dinámica de estos medios y sus características intrínsecas conforman un tópico poco estudiado y que es necesario observar con el fin de generar modelos que permitan hacer viable, en el caso de la carne cultivada, la producción de mayores volúmenes.

En esta investigación se estudiaron muestras de medios de cultivo celular. En particular, se realizaron mediciones de tensión superficial para extractos de sobrenadante a distintos tiempos de cultivo y concentraciones celulares diferentes, buscando observar la evolución temporal de esta magnitud en dichos medios. Las mediciones de tensión superficial fueron realizadas con un tensiómetro óptico, a través del método de gota pendiente.

## 1.2. Antecedentes

### 1.2.1. Cultivos Celulares

Los cultivos celulares consisten en aislar células de los tejidos y cultivarlas en un entorno controlado, como una placa de cultivo, con condiciones específicas para favorecer su crecimiento y supervivencia. Para obtener tipos celulares específicos pueden utilizarse técnicas como la disociación enzimática y la separación mediante anticuerpos (ver referencia [3]). Las líneas de cultivo celular pueden ser adherentes, si requieren un sustrato sólido para su proliferación, o de suspensión, si se desarrollan flotando en su medio de cultivo (ver Figura 1.2).

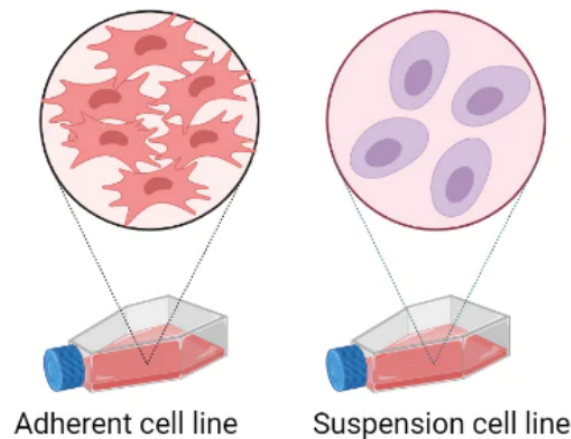


Figura 1.2: Ilustración de tipos de líneas celulares: adherentes y de suspensión. Imagen obtenida desde [4]

Los cultivos celulares se pueden establecer a partir de una variedad de fuentes, incluyendo tejidos, sangre y fluidos corporales. Las células se cultivan en un medio de cultivo que contiene nutrientes esenciales, factores de crecimiento, hormonas y otros compuestos para promover el crecimiento y la diferenciación celular. El medio de cultivo se puede suplementar con componentes adicionales según el objetivo del estudio. Las condiciones de cultivo (como son temperatura, pH y concentración de oxígeno) se pueden ajustar para optimizar el crecimiento y la función de las células. Esta técnica es fundamental para la ingeniería de tejidos y las ciencias afines, pues permiten la observación, la experimentación y el análisis bioquímico de las células y los aspectos de su biología (crecimiento, diferenciación, respuesta a estímulos, etc).

### 1.2.2. Medios de cultivo DMEM

El medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) es un medio de cultivo celular utilizado para el crecimiento de una variedad de células (Figura 1.3), incluidas células madre, mioblastos y células primarias. Fue desarrollado por Dulbecco y Freeman en la década de 1950 y se ha convertido en uno de los medios de cultivo celular más populares del mundo.



Figura 1.3: Muestras de DMEM. Imagen obtenida desde [5]

El DMEM está formulado para proporcionar un entorno óptimo para el crecimiento y la proliferación celular. Contiene una mezcla de aminoácidos, vitaminas, sales minerales y otros nutrientes esenciales para el crecimiento celular. Para este estudio, se utilizó además una variante que contiene suero bovino fetal (FBS), que proporciona factores de crecimiento y otras proteínas necesarias para el crecimiento celular [6]. La Figura 1.4 muestra una botella de la marca de medio usada en este trabajo.



Figura 1.4: Medio utilizado, obtenida desde [7]

### 1.2.3. Mioblastos de línea C2C12

Las mioblastos C2C12 son una línea celular de mioblastos adherente derivada de ratones comunes. Se utilizan ampliamente en la investigación, estando también presentes en estudios de carne *in vitro* [8]. Los mioblastos C2C12 se pueden diferenciar en miocitos maduros mediante la exposición a factores de crecimiento, como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1). Los miocitos diferenciados expresan una serie de proteínas musculares específicas, como la miosina y la actina.

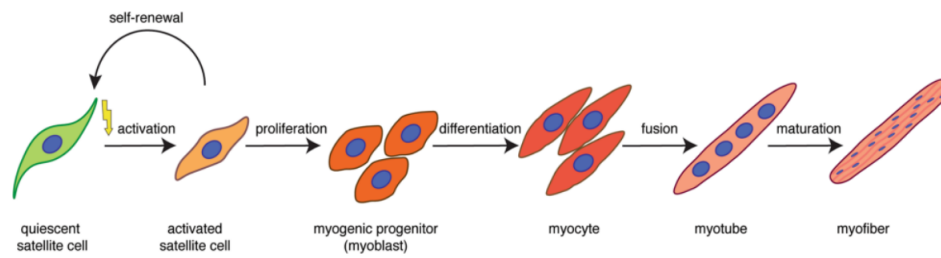


Figura 1.5: Progresión de células de linaje miogénico. Tomado de [9]

La Figura 1.5 esquematiza el proceso de miogénesis: el desarrollo y diferenciación que experimentan las células del tejido muscular.

Mioblastos C2C12 se han utilizado para estudiar una variedad de aspectos de la biología muscular, incluida la diferenciación, la función y la reparación muscular. También se han utilizado para desarrollar modelos de enfermedades musculares, como la distrofia muscular de Duchenne. [10]

### 1.2.4. Tensión Superficial

Los líquidos tienden a no dispersarse y a minimizar su superficie como consecuencia de las fuerzas que actúan entre sus moléculas. Estas fuerzas se compensan en el bulto del líquido, mas no en la superficie, donde dan lugar a una atracción neta hacia el interior de la sustancia y a un mayor nivel de energía para las moléculas de dicha superficie (ver Figura 1.6). La energía necesaria para aumentar la superficie de un líquido por unidad de superficie es lo que llamamos tensión superficial.

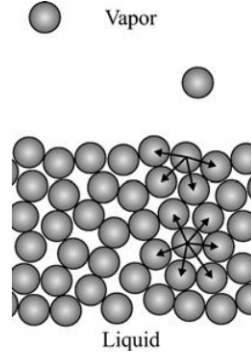


Figura 1.6: Representación esquemática de la estructura molecular en una interfaz líquido-vapor. Tomada de [11]

La tensión superficial es un concepto fundamental de la ciencia de superficies que desempeña un papel crucial en la comprensión del comportamiento de los líquidos en interfaces. Butt, Graf y Kappl [11] proporcionan un ejemplo para entender el concepto de tensión superficial. Si tomamos un tubo y cerramos uno de sus extremos con una membrana de goma, cuidando que esta se encuentre bajo cierta tensión, la membrana será plana (Figura 1.7). Se mantendrá plana siempre que el tubo esté abierto en su otro extremo y la presión tanto fuera como dentro del tubo sean iguales (Figura 1.7a). Si soplamos hacia el interior del tubo, la membrana se curvará hacia afuera dada la creciente presión al interior (Figura 1.7b). Al contrario, si succionamos el aire dentro de este la membrana se curva hacia adentro dada la caída en la presión interior (Figura 1.7c). Esto muestra cualitativamente que existe una relación entre la diferencia de presión y la curvatura de la superficie.

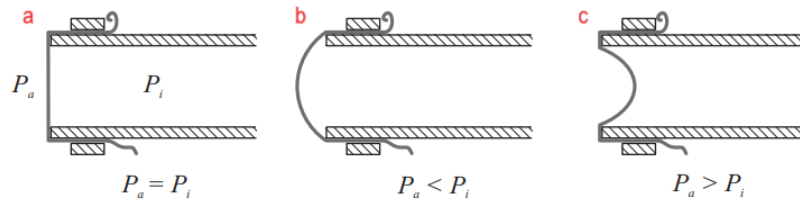


Figura 1.7: Membrana de goma en el extremo de un tubo cilíndrico. Se puede aplicar una presión interior  $P_i$ , que es diferente de la presión exterior  $P_a$ . Tomada de [11]

La ecuación de Young-Laplace proporciona una relación cuantitativa entre la diferencia de presión, la tensión superficial y la curvatura de la superficie del líquido:

$$\Delta P = \gamma \cdot \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (1.1)$$

$R_1$  y  $R_2$  son los dos principales radios de curvatura,  $\Delta P$  la diferencia de presión y  $\gamma$  es una constante propia del material, la cual se define como tensión superficial. Esta ecuación es esencial para comprender la distribución de la presión en el interior de gotas, burbujas y otras superficies líquidas curvas. En el caso de una gota, la presión en el interior es mayor que la presión en el exterior lo cual genera la curvatura la superficie.

### 1.2.5. Ángulo de Contacto

El ángulo de contacto es el ángulo en el que una interfaz líquido-vapor se encuentra con una superficie sólida (ver Figura 1.8). Se utiliza para describir la humectabilidad de una superficie sólida por un líquido. Un ángulo de contacto alto indica que el líquido no moja bien la superficie, mientras que un ángulo de contacto bajo indica una buena humectación. Para el caso específico del agua, hablamos de superficies hidrofóbicas e hidrofílicas, respectivamente. Hablamos de una superficie hidrofílico cuando el ángulo de contacto se encuentra entre  $0^\circ$  y  $90^\circ$ , mientras que con un ángulo mayor a  $90^\circ$  se trata de una superficie hidrofóbica. Este concepto se utiliza de forma amplia en diversos campos como la física, la química y la ciencia de los materiales para comprender las propiedades e interacciones de las superficies.

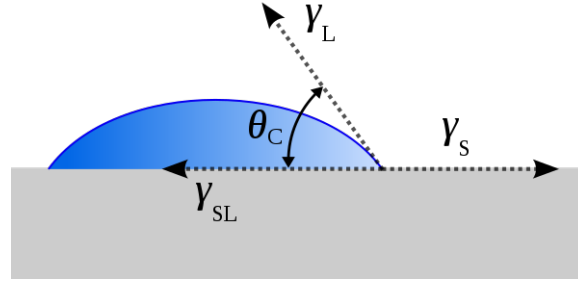


Figura 1.8: Esquema del ángulo de contacto entre 3 fases (sólida, líquida y gaseosa).

$$\gamma_L \cdot \cos \theta_C = \gamma_S - \gamma_{SL} \quad (1.2)$$

De manera similar a la que se discutió para la tensión superficial, la ecuación de Young para ángulo de contacto ( $\theta_c$ ) establece una relación entre dicho ángulo y las tensiones superficiales de las fases sólida, líquida y gaseosa. Tanto en la Figura 1.8 como en la Ecuación (1.2)  $\theta_C$  es el ángulo de contacto,  $\gamma_L$  la tensión superficial (a menudo solo  $\gamma$ ),  $\gamma_S$  y  $\gamma_{SL}$  son las energías interfaciales para sólido-gaseoso y sólido-líquido.

### 1.3. Objetivos e hipótesis

El objetivo principal de este trabajo es estudiar los cambios que generan en su medio las células cultivadas a medida que se desarrollan, y observar el efecto que su metabolismo tiene en las características físicas de dicho medio de cultivo. A través de goniometría óptica y análisis vía software, se caracterizará la tensión superficial de los medios en que se cultivan los mioblastos a distintas marcas temporales y concentraciones celulares. Utilizando medios similares, se realizarán además mediciones para el ángulo de contacto de los medios con las placas en que se llevan a cabo los cultivos.

# Capítulo 2

## Metodología Experimental

Este capítulo busca describir las distintas técnicas utilizadas en el presente trabajo. Se detallan tanto las técnicas utilizadas como los procedimientos que se aplicaron para llevar a cabo el estudio.

### 2.1. Técnicas Experimentales

La medición de tensiones superficiales y de ángulos de contacto es posible gracias a distintos métodos, cada uno con niveles de precisión que los hacen adecuados para situaciones variadas. Para este trabajo, se utilizaron dos de las técnicas más precisas y versátiles para cada tipo de medición: el método de gota pendiente para tensión superficial y de gota sésil para ángulos de contacto.

### 2.1.1. Método de Gota Pendiente para Tensión Superficial

El tensiómetro óptico de gota pendiente es un instrumento que se utiliza para medir la tensión superficial de los líquidos. Se basa en el principio de que una gota de líquido suspendida de un tubo capilar se deformará bajo la influencia de la gravedad y la tensión superficial (ver Figura 2.1). La forma de la gota se puede utilizar para calcular la tensión superficial del líquido.



Figura 2.1: Esquematzación del método de gota pendiente. Tomado de [12]

Este método es muy preciso y se puede utilizar para medir la tensión superficial de una amplia variedad de líquidos, sean estos transparentes, opacos o coloreados. También se puede utilizar para mediciones en líquidos a diferentes temperaturas y presiones. La Figura 2.2 ejemplifica la vista en cámara de una gota durante el proceso de medición.

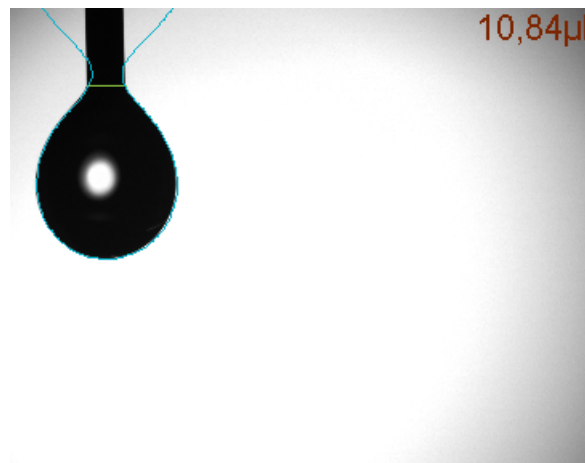


Figura 2.2: Imagen en cámara de gota pendiente.

### 2.1.2. Método de Gota Sésil para Ángulo de Contacto

El método de gota sésil es una técnica utilizada para medir el ángulo de contacto de un líquido sobre una superficie sólida. Se basa en la observación de una gota de líquido colocada sobre la superficie sólida y la medición del ángulo que forma la gota con la superficie, como se ilustra en la Figura 2.3.

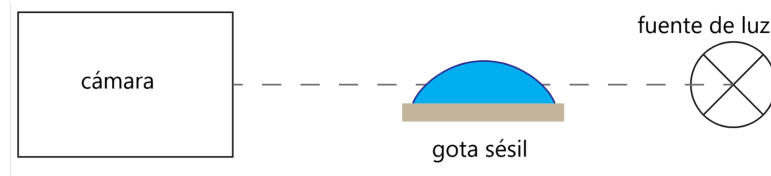


Figura 2.3: Esquema de las mediciones de ángulo de contacto por gota sésil. Tomado de [13]

Como se discutió en el capítulo anterior, el ángulo de contacto es una medida de la mojabilidad de una superficie por un líquido. Cuanto menor sea el ángulo de contacto, más mojada será la superficie. El método de gota sésil es una técnica sencilla y económica para medir el ángulo de contacto, y se utiliza ampliamente en una variedad de aplicaciones, como la fabricación de materiales, la ingeniería de superficies y la química. La Figura 2.4 ejemplifica la vista de la gota sésil a la hora de las mediciones.

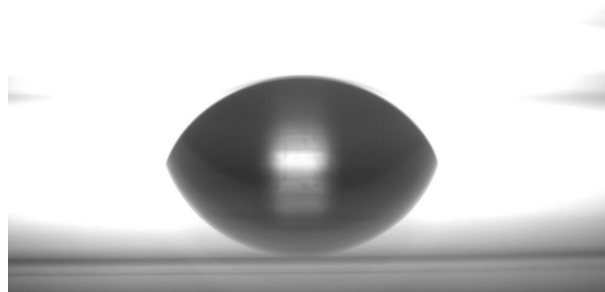


Figura 2.4: Imagen en cámara de gota depositada sobre superficie sólida.

## 2.2. Procedimientos y Equipos

### 2.2.1. Obtención de muestras

Las concentraciones celulares fueron cultivadas en condiciones estándar ( $37^{\circ}\text{C}$  y 5 %  $\text{CO}_2$  en atmósfera humidificada) en medio DMEM de alta glucosa, con 10 % de suero fetal bovino, 2 [mM] de L-glutamina y antibióticos (100 [U/mL] de penicilina y 100 [ $\mu\text{g/mL}$ ] de estreptomina).

Los cultivos se llevaron a cabo sembrando las células en placas de 96 pocillos a densidades de 2500, 5000, 7500 y 10000 células por pocillo. El proceso se realizó por triplicados, en pocillos independientes.

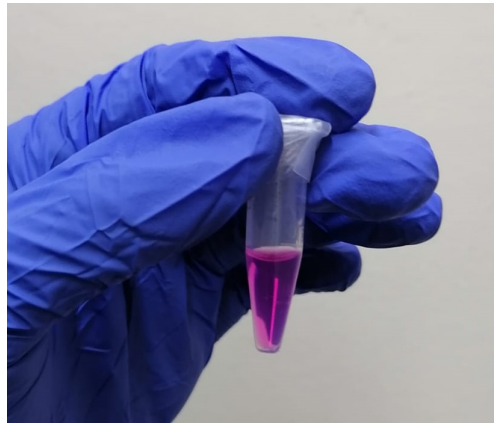


Figura 2.5: Muestra de sobrenadante

De los cultivos que resultaron viables, se recolectaron muestras de líquido sobrenadante (ver Figura 2.5) según los tiempos de cultivo deseados: 4, 24, 48 y 72 horas. Cabe destacar que el tiempo de 4 horas corresponde al mínimo necesario para que las células se adhieran al cultivo y comiencen a desarrollarse. Obtenidas las muestras, se conservaron en congelador a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Al momento de las mediciones, se dejaron descongelar hasta alcanzar temperatura ambiente.

### 2.2.2. Tensiómetro óptico

Las mediciones fueron realizadas en laboratorio utilizando un tensiómetro óptico Attension Theta (Figura 2.6), dotado de una cámara USB 3.0 con zoom y enfoque manual, además del software OneAttension incluido con el equipo, que permitió analizar las mediciones. En el equipo se montó una jeringa Hamilton con punta de radio 0,35 [mm], con el fin de formar las gotas pendientes, dados inconvenientes con los dispensadores automáticos incluidos por defecto.

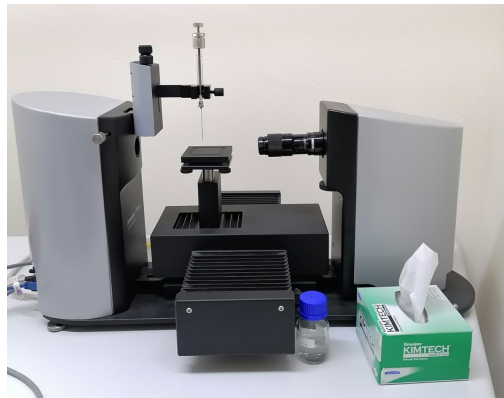


Figura 2.6: Tensiómetro óptico Attension Theta

Las mediciones fueron realizadas por triplicados (tres mediciones por cada muestra). Para revisar la correcta limpieza de la jeringa y la calibración del aparato, los triplicados son intercalados con mediciones en agua purificada a modo de control, debido al valor de  $\gamma$  conocido de  $\sim 72$  [mN/m]. Todas las mediciones se hicieron para gotas con volumen de  $\sim 11$  [ $\mu$ L]. La Figura 2.2 muestra la vista desde el tensiómetro a la hora de realizar las mediciones y la Figura 2.7 enseña la bola de tungsteno de 4 [mm] de diámetro, que se utiliza para la calibración del equipo.

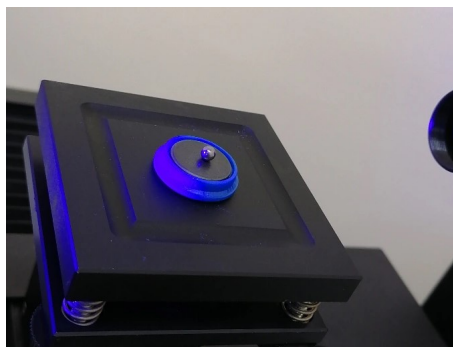


Figura 2.7: Bola de calibración para el tensiómetro

Con respecto a las mediciones de Ángulo de Contacto, se posaron gotas sésiles con el volumen antes mencionado sobre placas de cultivo de poliestireno, con tratamiento previo para cultivo de tejidos, el cual se aplica para hidrofilar la superficie de las placas y facilitar la adhesión celular [14]. La utilización de las placas complejizó las mediciones, pues fue necesario recalibrar el equipo con la bola de calibración colocada sobre la placa. Esto para compensar la distorsión de la imagen provocada por la curvatura de la placa.

# Capítulo 3

## Resultados y Análisis

En este capítulo se presentarán todos los resultados medidos a lo largo del trabajo, además de valores promedio y de desviación estándar.

### 3.1. Tensión Superficial

En primer lugar, la Figura 3.1 presenta una medición en un lapso de 10 [s] para la concentración de 2500 células por cultivo (en adelante, C1). En ella se representa por una curva verde los valores de  $\gamma$  luego de 4 horas de cultivo, mientras que la curva azul muestra  $\gamma$  tras 24 horas. Los valores de  $\gamma$  pasadas 48 horas se muestran mediante la curva roja, y la curva amarilla representa  $\gamma$  tras 72 horas de cultivo.

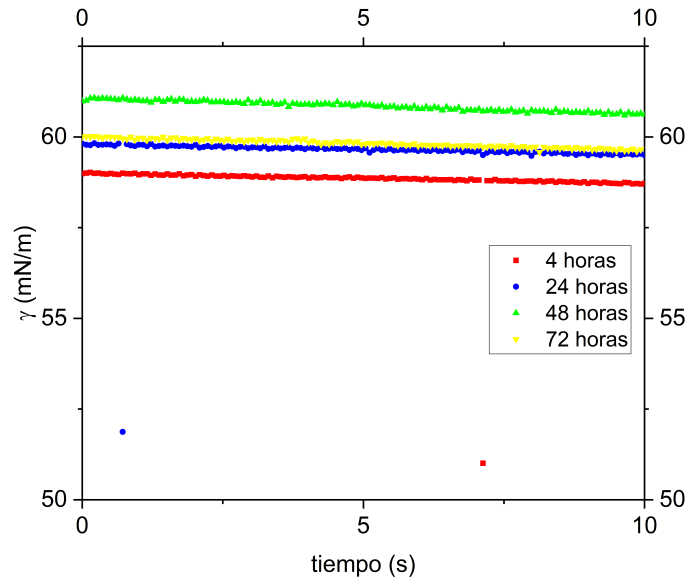


Figura 3.1: Gráfico de los resultados para C1

En la Figura se observa un muy leve aumento en  $\gamma$  a lo largo de los tres primeros días de cultivo, variación que luego parece retroceder a valores similares a los de las primeras 24 horas.

Luego, la Tabla 3.1 muestra los promedios de  $\gamma$  obtenidos según el tiempo de cultivo y la biomasa presente, junto a sus respectivas desviaciones estándar (representadas por  $\sigma$ ):

| Tiempo [h] | Biomasa [cell/well] | $\gamma$ [mN/m] |
|------------|---------------------|-----------------|
| 4          | $2877 \pm 144$      | $59.6 \pm 0.6$  |
| 24         | $7210 \pm 251$      | $59.6 \pm 0.6$  |
| 48         | $19453 \pm 691$     | $60.4 \pm 0.4$  |
| 72         | $32792 \pm 2120$    | $60.2 \pm 0.4$  |

Cuadro 3.1: Resultados promedio de Tensión Superficial para concentración inicial C1

La Figura 3.2 ilustra las mediciones para la concentración de 5000 células por cultivo (en adelante, C2). La curva roja representa los valores tras 4 horas de cultivo, y la curva azul corresponde a  $\gamma$  tras 24 horas. Los resultados tras 48 horas de cultivo se ilustran en la curva verde, y por último la curva amarilla refiere a  $\gamma$  tras 72 horas de cultivo.

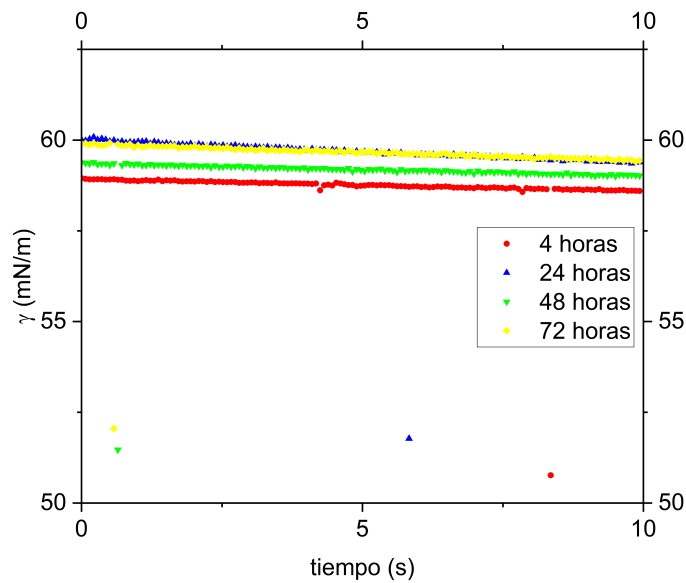


Figura 3.2: Gráfico de los resultados en C2

De las cuales se obtienen los valores promedio y valores de desviación mostrados en la Tabla 3.2. El comportamiento es a grandes rasgos similar al caso de C1, con variaciones leves y sutiles que no se distinguen claramente en magnitud de las desviaciones estándar.

| Tiempo [h] | Biomasa [cell/well] | $\gamma$ [mN/m] |
|------------|---------------------|-----------------|
| 4          | $4984 \pm 306$      | $58.7 \pm 0.1$  |
| 24         | $13793 \pm 453$     | $59.1 \pm 0.1$  |
| 48         | $38769 \pm 692$     | $59.8 \pm 0.1$  |
| 72         | $43081 \pm 778$     | $59.4 \pm 0.6$  |

Cuadro 3.2: Resultados promedio de Tensión Superficial para C2

Los resultados para  $\sim 7500$  células por cultivo (en adelante C3) se presentan en la Figura 3.3. De forma análoga a la representación de C2, la curva roja muestra los valores tras 4 horas, y la curva azul a  $\gamma$  tras 24 horas. Los resultados tras 48 horas de cultivo se grafican mediante la curva verde, y por último mediante la curva amarilla para  $\gamma$  tras 72 horas.

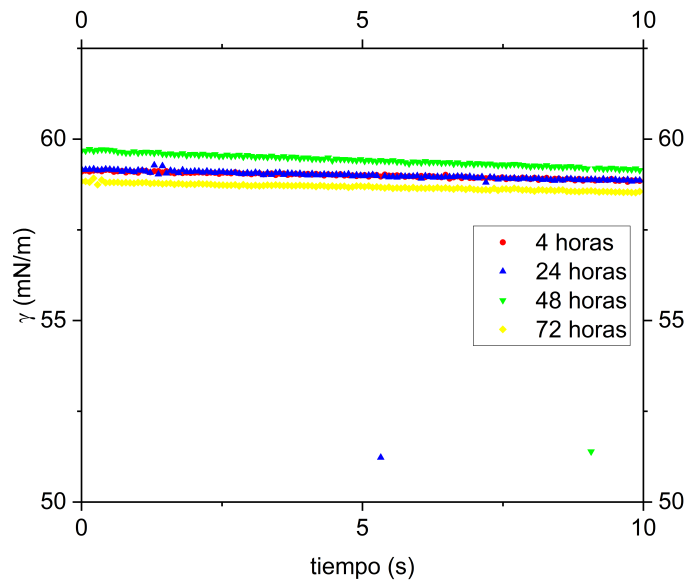


Figura 3.3: Gráfico de los resultados para C3

Con valores promedio y desviaciones estándar como se observan en la Tabla 3.3. Se reitera el comportamiento de variación mínima apreciado en los casos previos, con lo que empieza a mostrarse como una tendencia.

| Tiempo [h] | Biomasa [cell/well] | $\gamma$ [mN/m] |
|------------|---------------------|-----------------|
| 4          | $7835 \pm 264$      | $58.9 \pm 0.1$  |
| 24         | $20814 \pm 936$     | $58.9 \pm 0.4$  |
| 48         | $42167 \pm 549$     | $59.7 \pm 0.8$  |
| 72         | $43638 \pm 372$     | $58.5 \pm 0.3$  |

Cuadro 3.3: Resultados promedio de Tensión Superficial para C3

Para la última concentración ( $\sim 10000$  células por cultivo, en adelante C4), se obtienen las medidas representadas en la Figura 3.4. Al igual que se hace previamente, la curva roja muestra los valores de  $\gamma$  tras 4 horas, y la curva azul  $\gamma$  tras 24 horas. Los resultados tras 48 horas de cultivo se indican por la curva verde, y la curva amarilla para  $\gamma$  tras 72 horas.

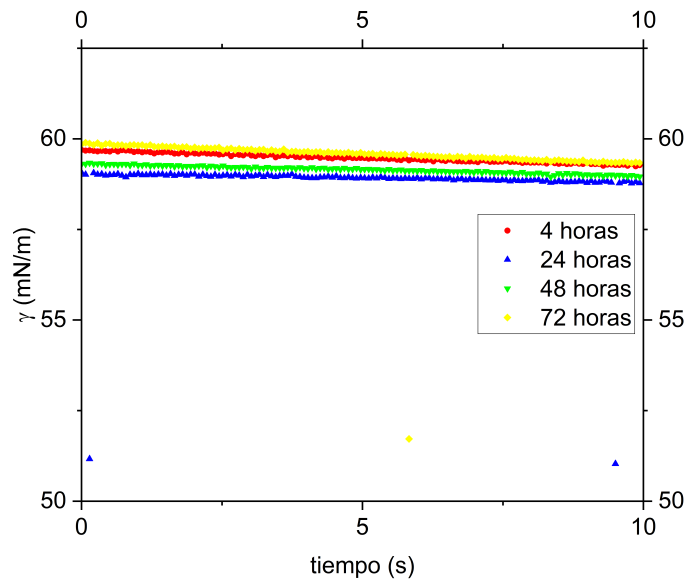


Figura 3.4: Gráfico de los resultados para C4

Sus promedios, junto a la desviación estándar de las mediciones, se muestran en la Tabla 3.4. Estas mediciones terminan de confirmar la dinámica apreciada para las concentraciones anteriores: los valores oscilan en diferencias ínfimas.

| Tiempo [h] | Biomasa [cell/well] | $\gamma$ [mN/m] |
|------------|---------------------|-----------------|
| 4          | $9623 \pm 156$      | $59.3 \pm 0.2$  |
| 24         | $26564 \pm 468$     | $58.9 \pm 0.05$ |
| 48         | $41769 \pm 417$     | $59.2 \pm 0.3$  |
| 72         | $42646 \pm 477$     | $59.2 \pm 0.3$  |

Cuadro 3.4: Resultados promedio de Tensión Superficial para C4

Finalmente, la Tabla 3.5 presenta los promedios y desviaciones estándar de la muestra control: medio sin células (en adelante C0).

| Tiempo [h] | $\gamma$ [mN/m] |
|------------|-----------------|
| 4          | $59.8 \pm 0.04$ |
| 24         | $59.3 \pm 0.1$  |
| 48         | $59.2 \pm 0.2$  |
| 72         | $59.6 \pm 0.3$  |

Cuadro 3.5: Resultados promedio de Tensión Superficial para muestras de medio de control sin cultivar

Finalmente graficamos los valores promedio para cada concentración en conjunto para tener una imagen más general del comportamiento de  $\gamma$  a lo largo del proceso de cultivo, teniendo además como comparación las muestras de control:

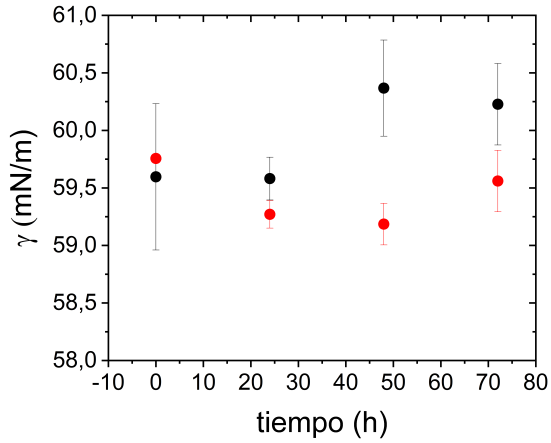


Figura 3.5: Comparación de resultados promedio entre C1 y C0

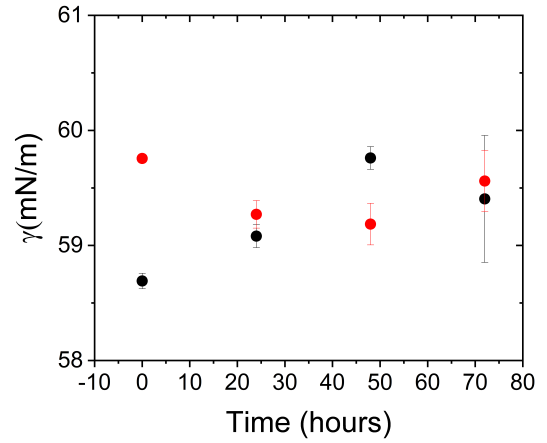


Figura 3.6: Comparación de resultados promedio entre C2 y C0

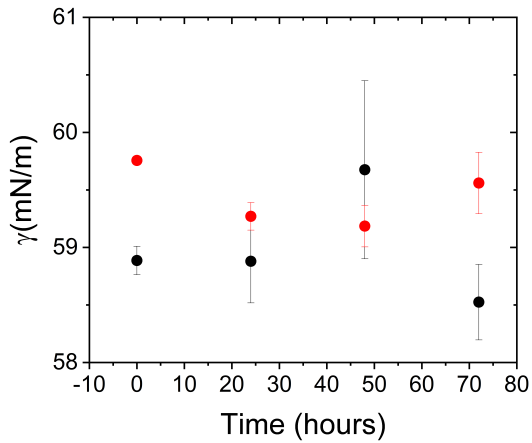


Figura 3.7: Comparación de resultados promedio entre C3 y C0

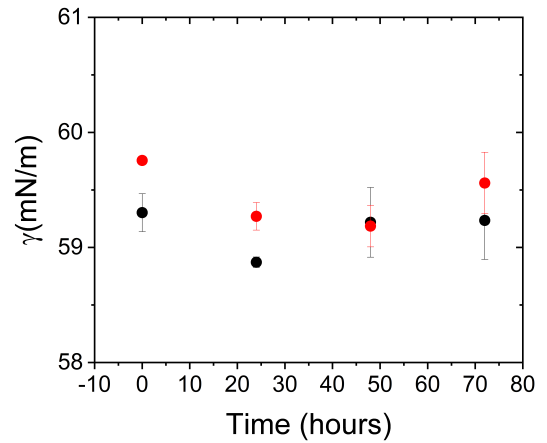


Figura 3.8: Comparación de resultados promedio entre C4 y C0

Se observa una tendencia clara, con leve un aumento de  $\gamma$  en los medios cultivados a lo largo de las primeras horas (4 – 48[h]) y una posterior disminución pasadas las 72 [h]. Si bien es posible notar el cambio en  $\gamma$ , las Figuras 3.5-3.8 ilustran de mejor manera lo sutil de la variación, encontrándose en el mismo orden de magnitud que las barras de error de los triplicados medidos.

Una vista más explícita de este fenómeno se presenta en la Figura 3.9. La curva punteada negra muestra  $\Delta\gamma$  entre C1 y C0, y la curva roja para C2 y C0. De la misma forma, la curva punteada azul representa  $\Delta\gamma$  entre C3 y C0, y por último la curva verde corresponde a la diferencia de  $\gamma$  entre C4 y C0.

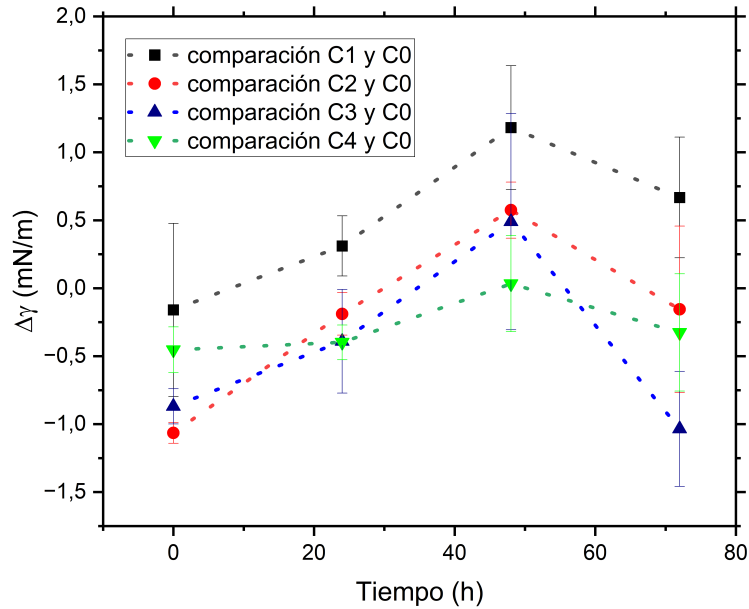


Figura 3.9:  $\Delta\gamma$  medido para cada concentración cultivada respecto a C0

Se hace evidente la existencia de un *peak* en  $\Delta\gamma$  pasadas 48 horas de cultivo. Tal comportamiento no permite llegar a conclusiones definitivas, y requiere más experimentos. Uno podría proponer que el consumo de glucosa y producción de lactatos se compensan, afectando los valores de  $\gamma$  de manera similar pero contraria y dejando los cambios así de sutiles.

## 3.2. Ángulo de Contacto

Las Figuras 3.10-3.12 presentan las mediciones de Ángulo de contacto por gota sésil, realizados por triplicado para la concentración fija C3.

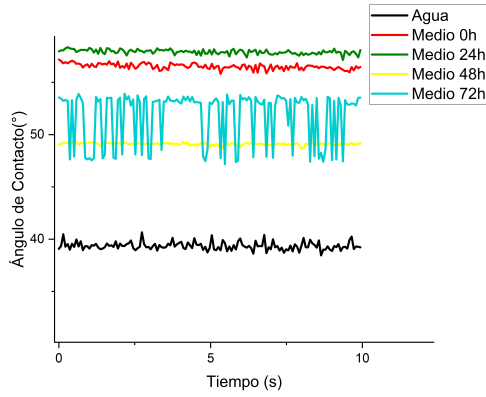


Figura 3.10: Primera iteración

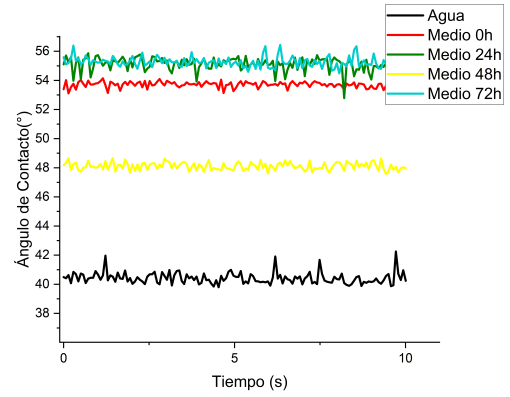


Figura 3.11: Segunda iteración

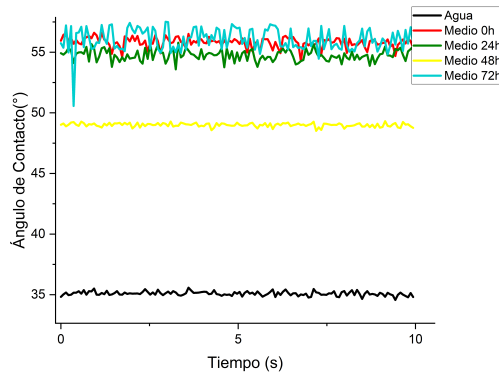


Figura 3.12: Tercera iteración

De las tres iteraciones podemos notar que algo pasa con las muestras a 48 horas de cultivo que es común a todas las mediciones:  $\theta_c$  es siempre abruptamente menor en dicha marca de tiempo.

# Capítulo 4

## Conclusiones

En este trabajo, muestras de medios DMEM cultivados fueron estudiadas para determinar la influencia con el pasar del tiempo que tiene el metabolismo celular de mioblastos C2C12 en las propiedades físicas del medio. Se midió la tensión superficial para las distintas muestras, obteniendo variaciones notablemente sutiles. Los resultados para los cambios en  $\gamma$  se mantienen dentro del margen que supone la desviación estándar en las mediciones, por lo que no son concluyentes pero muestran un pequeño efecto que hemos podido cuantificar. Posteriormente, se utilizó el método de gota sésil para intentar determinar el ángulo de contacto de las muestras de medio con las placas de cultivo. Se observa que  $\theta_c$  tras 48 horas es consistentemente más bajo. O bien los cambios en  $\gamma$  producto del consumo de glucosa se ven compensados por la producción de lactatos, o bien es necesario aplicar técnicas de mayor precisión con condiciones de laboratorio aun más controladas para poder cuantificar el real efecto. De cualquier manera, se requieren más estudios en el tema.

Como proyecciones a futuro, es llamativo comparar los resultados con técnicas alternativas para comprobar las variables medidas en este estudio con el fin de rectificar o descartar de manera definitiva la posibilidad de los efectos del metabolismo supuestos en la hipótesis que abre este trabajo.

# Referencias

- [1] Aldonza Jaques, Elizabeth Sánchez, Nicole Orellana, Javier Enrione, and Cristian A. Acevedo. Modelling the growth of in-vitro meat on microstructured edible films. *Journal of Food Engineering*, 307:110662, Oct 2021.
- [2] Minas Nalbandian, Zsolt Radak, and Masaki Takeda. Lactate metabolism and satellite cell fate. *Frontiers in Physiology*, 11, Dec 2020.
- [3] Bruce Alberts. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, 2008.
- [4] How to keep up with cell culture - Introduction to essential methods. <https://lab-label.com/sl/blogs/main/cellculture-essential-methods>.
- [5] DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium - Creative Bioarray. <https://cell.creative-bioarray.com/dmem-dulbeccos-modified-eagle-medium.html>.
- [6] R. Dulbecco and G. Freeman. Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8(3):396–397, Jul 1959.
- [7]
- [8] Javier Enrione, Jonny Blaker, Donald Brown, Caroline Weinstein-Opppenheimer, Marzena Pepczynska, Yusser Olguín, Elizabeth Sánchez, and Cristian Acevedo. Edible scaffolds based on non-mammalian biopolymers for myoblast growth. *Materials*, 10(12):1404, Dec 2017.
- [9] Manuel Schmidt, Svenja C. Schüller, Sören S. Hüttner, Björn von Eyss, and Julia von Maltzahn. Adult stem cells at work: Regenerating skeletal muscle. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(13):2559–2570, Apr 2019.
- [10] Bin Li, Michael Lin, Ying Tang, Bing Wang, and James H.-C. Wang. A novel functional assessment of the differentiation of micropatterned muscle cells. *Journal of Biomechanics*, 41(16):3349–3353, Dec 2008.
- [11] Hans-Jürgen Butt, Karlheinz Graf, and Michael Kappl. *Physics and Chemistry of Interfaces*. Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, 2003.
- [12] Pendant drop method - DataPhysics Instruments. <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/pendant-drop-method>.
- [13] Sessile drop method - DataPhysics Instruments. <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/sessile-drop-method>.

- [14] Susan L. Barker and Paul J. LaRocca. Method of production and control of a commercial tissue culture surface. *Journal of Tissue Culture Methods*, 16(3–4):151–153, Sep 1994.
- [15] Joseph D. Berry, Michael J. Neeson, Raymond R. Dagastine, Derek Y.C. Chan, and Rico F. Tabor. Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. *Journal of Colloid and Interface Science*, 454:226–237, September 2015.
- [16] A. Docoslis, R.F. Giese, and C.J. van Oss. Influence of the water–air interface on the apparent surface tension of aqueous solutions of hydrophilic solutes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 19(2):147–162, Dec 2000.
- [17] W. Alnoush, Amr Sayed, and Nayef Alyafei. Optimization of contact angle and interfacial tension measurements for fluid/rock systems at ambient conditions. *MethodsX*, 6:1706–1715, 2019.
- [18] Carel J. van Oss. *Interfacial forces in Aqueous Media*. Dekker, 1994.
- [19] KRÜSS Scientific. *Determining the surface tension of liquids by measurements on pendant drops*, 12 2010.
- [20] Arthur W. Adamson and Alice P. Gast. *Physical Chemistry of Surfaces*. Wiley-Interscience, 6 edition, 1997.
- [21] David Yaffe and Ora Saxel. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270(5639):725–727, Dec 1977.