



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE INGENIERÍA.

División de Ingeniería Mecánica e Industrial.

“Comportamiento micro y macromecánico de andamios electrohilados de poli(ácido láctico)/hidroxiapatita”.

T E S I S.

Que para obtener el título de:

INGENIERO MECATRÓNICO.

PRESENTA:

Lauro Daniel Muñoz Ramírez.



Director: Dr. Francisco Manuel Sánchez Arévalo

C. Universitaria, México D.F. Octubre 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Resumen

En las últimas décadas ha crecido la necesidad de desarrollar materiales para la regeneración de tejido duro. Se sabe que la mezcla de biomateriales tales como poli(ácido láctico), o PLA por sus siglas en inglés, es un polímero biodegradable; al combinarlo con biocerámicas como la hidroxiapatita (HA) formarán un biocompuesto que combina lo mejor de las propiedades mecánicas y biológicas de ambos componentes para formar un andamio celular de tercera generación.

En la actualidad se han usado diferentes técnicas para la fabricación de andamios celulares compuestos de nanofibras poliméricas; particularmente, el electrohilado permite obtener fibras de manera económica y sencilla. Las estructuras compuestas de fibras finas fabricadas por electrohilado muestran una reconocida eficiencia para la creación de andamios celulares de acuerdo con las aplicaciones reportadas en la literatura.

En este trabajo se desarrolló un andamio celular compuesto por PLA e hidroxiapatita. Se realizó la caracterización estructural por microscopía electrónica de barrido y por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier para evaluar la interacción del PLA y la HA. Se realizó el análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido para evidenciar la tendencia de cristalización del material; de tal manera que se logró correlacionar estructura con comportamiento macro y micromecánico del material.

La caracterización macro y micromecánica se realizó mediante ensayos de tracción acoplados a la medición de deformación mediante una técnica óptica no intrusiva basada en la correlación de imágenes digitales (CID). Se obtuvieron módulos de elasticidad a escala macro y micromecánica de distintos andamios en los cuales se modificó el porcentaje de hidroxiapatita mezclada físicamente.

Uno de los aspectos más importantes de este trabajo fue validar el uso de CID en andamios electrohilados, ya que hasta donde tenemos conocimiento nadie ha utilizado esta técnica para evaluar el comportamiento micromecánico de andamios electrohilados PLA-HA. El uso de CID involucra la preparación de la superficie de las muestras. Dicha preparación consiste en poner un fondo blanco con puntos negros muy finos colocados de manera aleatoria. Para lograr este patrón generalmente se utilizan pinturas vinílicas con acabado mate. Uno de los objetivos de este trabajo, para validar la técnica de CID en la caracterización microcomecánica de andamios electrohilados, fue estudiar los posibles mecanismos de reacción entre la pintura vinílica y el PLA y su respectiva influencia en sus propiedades mecánicas. En este estudio se encontró que la pintura vinílica y el andamio de PLA-HA no forman enlaces químicos; por lo tanto, el uso de la pintura vinílica, para pintar el patrón de puntos aleatorios en la muestra, es adecuado; ya que la unión de ambos elementos representa únicamente una adhesión mecánica.

De la caracterización mecánica se obtuvieron los módulos de elasticidad a nivel micro y macromecánico. Se obtuvieron valores más altos para los andamios fabricados con poli(ácido

láctico) puro; mientras que para la mezcla de PLA con 2% de hidroxiapatita se obtuvo el valor más bajo de módulo de elasticidad; sin embargo, al ir aumentando la cantidad de hidroxiapatita al 4 y 6% de HA se recuperó la resistencia mecánica de estos andamios. En el caso del PLA 2% HA, la disminución de la resistencia mecánica se atribuye a que las partículas de HA actúan como concentradores de esfuerzo; mientras que a mayores concentraciones la distribución de los agregados de HA actúan como refuerzo dentro del material. Con ayuda de CID se consiguieron determinar los módulos de elasticidad a escala micrométrica. Se observó la misma tendencia en los resultados de los módulos elásticos macro y micromecánicos; obteniendo módulos elásticos micromecánicos superiores en un 30, 16, 46 y 38% para el PLA puro, PLA 2% HA, PLA 4% HA y PLA 6% HA respectivamente.

DEDICATORIA

A mis padres tan queridos Sabina y Lauro quienes han dedicado todo su amor a darme la vida, cariño, formación, valores y educación. Sin duda alguna les estoy eternamente agradecido por todos y cada uno de los sacrificios hechos en pos de darme lo necesario para una realización como ser humano. A ustedes que con su inagotable apoyo me enseñaron a superar cualquier obstáculo, además de haberme dado incondicionalmente fortaleza aun en las noches más oscuras. Doy gracias a la vida por haberme dado unos padres tan ejemplares y maravillosos como lo son ustedes.

A mi hermano Noé por ser mi compañero incondicional, mi confidente, mi guía y mi mejor amigo durante toda mi vida. Con tu cariño, apoyo y tus consejos has llenado de luz mi vida. Por todos los momentos que hemos vivido juntos y los momentos que nos faltan por compartir. Siempre estaré orgulloso de tenerte como hermano mayor.

A mis abuelos Adelfo (Q.E.D) y Asunción por todo su amor y apoyo. A ustedes mi completa gratitud por su incesante lucha y trabajo para que sus descendientes tengamos una mejor calidad de vida. Gracias a usted abuelita y a su amor que nunca se acaba puedo disfrutar del cariño de una segunda madre.

A mi familia Gilberto, Azucena, Isaac, Moy, Diego, Victoria, Esteban, Juan, Luis, Jaqueline, Mónica, Job, Silvia, Jorge, Guadalupe por su cariño y apoyo a lo largo de mi vida. Les agradezco por compartir del cariño rebosante de nuestra unión familiar.

A mis amigos Daffne Martínez, Laura González, Jorge Peralta, Alejandro Acosta, Ulises Espinoza, Verónica Cano, Federico Guillen, Cesar Espinoza y Julio Mendoza por compartir excelentes momentos, los cuales atesoro. Por su ayuda y apoyo a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de estudiar con el excelente personal con el que cuenta en sus instalaciones, también agradezco a la Facultad de Ingeniería y al Instituto de Investigaciones en Materiales por su contribución en mi formación profesional, humana y técnica; permitiéndome así incrementar mis conocimientos en el área de investigación en la cual me desarrollé. Además de darme la oportunidad de conocer grandes catedráticos, compañeros y personal administrativo.

Un pilar importante, en mi formación en estos años de estudio de mi maestría, es el Dr. Francisco Manuel Sánchez Arévalo. Le agradezco por guiarme en el camino de término de mis estudios, transmitiéndome sus conocimientos para lograr el objetivo de terminar mi tesis de licenciatura.

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me apoyaron con la obtención de diversos resultados utilizados en la tesis: a Dra. Michelín Álvarez Camacho del INR por su tiempo y conocimiento compartido para llevar a cabo las mediciones de DIC, Dr. Ricardo Vera Graziano por las facilidades para llevar el presente trabajo, al Dr. Alfredo Maciel Cerda por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo, al Dr. Omar Novelo por el apoyo en el análisis de imágenes mediante el microscopio electrónico de barrido, a la Dr. Miguel Ángel Canseco Martínez por su colaboración para obtener las mediciones en infrarrojo, a la QFB Damaris Cabrero Palomino por su colaboración para la medición de la calorimetría diferencial de barrido; a la Lic. Tere Vázquez y la Lic. Oralia L. Jiménez por su apoyo en la búsqueda bibliográfica, al Dr. Filiberto Torres Rivera por su ayuda en el estudio de infrarrojo, al Dr. Raúl Montiel Campos.

A los miembros del jurado gracias por sus observaciones las cuales me ayudaron a considerar puntos importantes en la tesis: mis sinceros agradecimientos al Dr. Ricardo Vera Graziano, Dr. Alfredo Maciel Cerda, Dr. Arturo Barba Pingarrón y al Ing. Gabriel Alejandro Jaramillo Morales.

Al proyecto Conacyt salud-2010-1-141036 “Sistema para la alineación estática y dinámica de ortoprótesis para prevenir la reamputación en pacientes con amputación parcial de pie” a través del convenio con la UNAM INR/UNAM-IIM/GOB-15/2014 con el cual fue posible realizar la compra del equipo ARAMIS utilizado en las mediciones por CID. Dichos proyecto contribuyó en el financiamiento parcial para la realización de estos estudios.

Al IIM por la beca otorgada para concluir mis estudios de licenciatura.

Se agradece el apoyo económico brindado a través de la DGAPA-UNAM Proyecto PAPIIT No. IN10893 y a Conacyt Proyecto CNPQ 117373.

A mis amigos y compañeros Ulises Espinoza, Alida Ospina, Rodolfo Aragón, Edwin Gómez, Vanessa Vera R et al., Selene Alcántara, Víctor Álvarez y el resto del grupo de investigación por su apoyo, ayuda y amistad durante mi estadía en el laboratorio.

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	5
Resumen.....	2
Contenido.....	6
Lista de tablas y figuras	8
Justificación	10
Objetivos	11
Objetivo general.....	11
Objetivos particulares	11
Hipótesis.....	11
CAPÍTULO 1 Fundamento teórico	12
1.1 Ingeniería de tejidos.....	12
1.1.1 Andamios para la regeneración ósea.....	12
1.2 Técnicas para la fabricación de andamios.....	13
1.3 Biomateriales para regeneración de tejido óseo	15
1.4 Caracterización mecánica de andamios de fibras electrohilados.....	18
CAPÍTULO 2	23
Metodología experimental.....	23
2.1 Material	23
2.1.1 Preparación de la solución polimérica de PLA	23
2.1.2 Preparación de la mezcla física de PLA con hidroxiapatita	23
2.2 Proceso de electrohilado.....	24
2.3 Caracterización de los andamios electrohilados.....	26
2.3.1 Espectroscopia de infrarrojo.....	26
2.3.2 Calorimetría diferencial de barrido	27
2.3.3 Microscopía electrónica de barrido	27
2.4 Caracterización macro y micromecánica.....	29
2.4.2 Medición de deformación sin contacto	31
2.4.2.1 Calibración del sistema ARAMIS.....	33
2.4.2.2 Preparación de la muestra	36

2.4.3 Parámetros usados en las pruebas mecánicas.....	37
2.5 Procesamiento de datos.....	38
2.5.1 Procesamiento de datos del ensayo de tracción.	38
2.5.2 Procesamiento de datos con el sistema ARAMIS.....	39
2.5.3. Procesamiento de datos para el cálculo de módulos micromecánicos	41
CAPÍTULO 3 Resultados y discusión.	45
3.1 Andamios electrohilados.....	45
3.2 Morfología de los andamios electrohilados de PLA con HA	46
3.3 Morfología de los andamios electrohilados PLA y PLA/HA con patrón aleatorio empleando pintura vinílica.....	48
3.3.1 Determinación de la porosidad y diámetro promedio de las fibras electrohiladas.....	50
3.4 Caracterización de mezcla física PLA HA por espectroscopia de infrarrojo	50
3.5 Caracterización de pintura vinílica en andamios PLA/HA por espectroscopia de infrarrojo	52
3.6 Estabilidad térmica por calorimetría diferencial de barrido.	53
3.7 Comportamiento macro y micromecánico de los andamios de PLA-HA electrohilados	55
3.8 Análisis micromecánico de una sección longitudinal.....	59
3.9 Módulos de elasticidad y macromecánico micromecánico	61
3.9.1 Evaluación de la porosidad en el comportamiento mecánico de los andamios	63
Conclusiones	69
Bibliografía	71

Lista de tablas y figuras

Fig. 1.1 Elementos del proceso de electrohilado	15
Fig. 1.2 Diagrama de facetas para la CID 1.2	21
Fig. 2.1 Equipo de electrohilado 2.2	25
Fig. 2.2 Colector	25
Fig. 2.3. Inyector	26
Fig. 2.4 Medición de diámetros	28
Fig. 2.5 Medición de porosidad	29
Fig. 2.6 Maquina de ensayos universales	29
Fig. 2.6 Procesamiento de probetas	31
Fig. 2.7 Parámetros del sistema ARAMIS	32
Fig. 2.8 Eje óptico del equipo ARAMIS	33
Fig. 2.9 Proceso de calibración	34
Fig. 2.10 Pasos de calibración	35
Fig. 2.11 Probeta con patrón de puntos	37
Fig. 2.12 Pincel utilizado	37
Fig. 2.13 Cálculo de esfuerzo/deformación	39
Fig. 2.14 Apertura de archivos	40
Fig. 2.15 Enmascarado	40
Fig. 2.16 Fijación punto inicial	41
Fig. 2.17 Visualización de la deformación	42
Fig. 2.18 Gráfica del esfuerzo en función del tiempo	44
Fig. 3.1 Andamio	45
Tabla 1 Relación Humedad relativa y temperatura durante el procesos de electrohilado para cada concentración de HA	46
Fig. 3.2 SEM PLA HA	48
Fig. 3.3 SEM PLA HA con pintura vinílica	49
Fig. 3.4 Mecanismo de reacción	52
Fig. 3.5 Caracterización física y química	54
Fig. 3.6 Caso sólido, gráfica de esfuerzo deformación macromecánica	56
Fig. 3.7 Comportamiento macro y micromecánico de PLA y PLA-HA	57
Fig. 3.8 Esfuerzo de cedencia caso sólido	58
Tabla 2. Resumen de valores promedios de módulo elástico micromecánico y su desviación estándar para todas las concentraciones de HA	59
Fig.3.9 Niveles de deformación	61
Fig. 3.10 Módulos elásticos micro y macromecánicos	63
Fig. 3.11 Gráficas esfuerzo deformación caso sólido poroso	64
Fig. 3.12 Módulos elásticos macromecánicos caso solido poroso	65
Fig. 3.13 Módulo elástico micromecánico caso solido poroso	66

Tabla 3. Valores del módulo elástico micromecánico y macromecánico en el análisis donde se considera al andamio como un sólido y el caso donde se toma en cuenta la porosidad del andamio.	67
Fig. 3.14 Esfuerzo de cedencia caso sólido poroso	68

Justificación

En un año se registran aproximadamente 1 millón de casos de defectos del esqueleto humano a nivel mundial; éstos requieren procedimientos de injerto óseo para lograr la unión [1]. Los tratamientos actuales se basan en injertos óseos autólogos y autógenos o como una alternativa a éstos, metal y cerámica. Se sabe que estos tratamientos están limitados, ya sea por la limitada cantidad de autoinjerto o por la posibilidad de rechazo inmunológico e infecciones en el caso del aloinjerto [2]. Por lo anterior, una regeneración ósea adecuada aún no se ha encontrado. Una posible solución para estos problemas puede estar en la ingeniería de tejidos [2,3].

Una cuestión clave en la ingeniería tisular involucra la generación de andamios tridimensionales capaces de brindar soporte para la regeneración y proliferación de las células. En la actualidad se desarrollan andamios celulares de poli(ácido láctico) (PLA) y PLA mezclado físicamente con hidroxiapatita (HA) fabricados por medio de electrohilado [4]. Estos andamios celulares se emplean en la regeneración de tejidos en distintas áreas del cuerpo humano [5-7]; por lo tanto, es indispensable la caracterización mecánica de los mismos a niveles macro y micromecánico.

Un andamio ideal en ingeniería de tejidos debe ser mecánicamente estable. A escala microscópica, el andamio debe ser suficientemente rígido para soportar la adhesión celular, propagación y la deposición normal de la matriz extracelular. Al mismo tiempo, en la escala macroscópica el andamio debe tener propiedades mecánicas que se aproximen a las del tejido nato que será sustituido [8].

Los estudios realizados sobre propiedades macromecánicas del PLA no son concluyentes hasta hoy en día, de acuerdo con la literatura [9,10]. Lo anterior se debe a que existen complicaciones en el análisis mecánico de estos materiales debido a su morfología, porosidad y nivel de traslape de las fibras que forman el andamio. Los estudios actuales no contemplan del todo los factores arriba mencionados es por eso que se requieren estudios de micromecánica en este tipo de materiales; de tal forma, que se brinde mayor confiabilidad para uso biomédico. Para realizar este tipo de estudios se requiere de la combinación de técnicas experimentales de no contacto (Correlación de Imágenes Digitales, DIC por sus siglas en inglés) y la prueba de tracción uniaxial; como se ha reportado en trabajos previos [11].

Objetivos

Objetivo general

Determinar la influencia de las partículas de HA en el comportamiento estructural, macro y micromecánico de los andamios electrohilados de PLA bajo tensión uniaxial utilizando una técnica óptica no intrusiva.

Objetivos particulares

1. Monitorear y optimizar los parámetros del proceso de electrohilado con la finalidad de obtener andamios homogéneos.
2. Desarrollar andamios electrohilados de poli(ácido láctico) con hidroxiapatita mezclada físicamente a diferentes concentraciones peso-volumen.
3. Establecer la técnica apropiada para la aplicación de un patrón de puntos aleatorios para su aplicación en las probetas electrohiladas. Seleccionar el colorante adecuado para el patrón de puntos aleatorios.
4. Caracterizar física y químicamente la mezcla de poli(ácido láctico) con hidroxiapatita, además de la interacción del colorante con el andamio.
5. Caracterizar mecánicamente los andamios en su región elástica de la curva esfuerzo en función de la deformación, lo anterior mediante ensayos de tracción y adquisición de imágenes digitales durante dicho ensayo.

Hipótesis

Se logrará correlacionar de manera adecuada los parámetros de composición, estructura, respuesta macro/micromecánica de los andamios electrohilados de PLA-HA y permitirá un mejor entendimiento del comportamiento de estos materiales para manipular de manera adecuada sus propiedades de acuerdo con el tipo de aplicación en la que van a ser usados.

CAPÍTULO 1 Fundamento teórico

1.1 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función del tejido [12]. Desde finales de 1980 la ingeniería de tejidos ha avanzado rápidamente [13]. La ingeniería de tejidos se ha desarrollado como un intento de resolver la escasez en tejidos y órganos para la terapia de trasplante; lo anterior gracias al desarrollo de herramientas para sustitutos biológicos que pueden reparar y reemplazar los tejidos dañados y órganos en el cuerpo [14].

Algunos de los desarrollos en la ingeniería de tejidos incluyen el uso de células aisladas que se inyectan en un tejido deseable, tal como lo reporta los trabajos de Chui et al. [15] y Hubbell et al. [16]. En esos trabajos publican el uso de biomateriales inyectados o implantados quirúrgicamente donde utilizan una combinación de células y biomateriales reportados por Shin et al. [17].

A pesar de varios avances importantes que se han introducido en el campo de la medicina regenerativa del hueso durante los últimos años, las terapias actuales como los injertos óseos aún tienen muchas limitaciones. Por otra parte, a pesar del hecho de que la tecnología de la ciencia de materiales ha dado lugar a una clara mejora en el campo de la medicina regenerativa y particularmente en la sustitución ósea, no se ha desarrollado un sustituto óseo adecuado y por lo tanto grandes defectos/lesiones óseas aún representan un gran desafío para los cirujanos ortopédicos y reconstructivos. Es en este contexto es que la ingeniería de tejidos ha surgido como un enfoque válido para las terapias actuales para la medicina regenerativa. Actualmente se reconoce que una de las cuestiones clave en la ingeniería de tejidos es el desarrollo de materiales y andamios biodegradables adecuados para el cultivo de las células para sustituir tejidos biológicos [18].

1.1.1 Andamios para la regeneración ósea.

Un andamio celular es una plantilla que actúa como una matriz temporal para la proliferación celular; el andamio proporciona soporte mecánico mientras que las células huéspedes apropiados para poblar la estructura depositan los componentes de la matriz extracelular específicos para el órgano o estructura celular a reemplazar. El desarrollo de

andamios con geometrías adaptadas biomiméticamente deben servir como reservorio de agua, nutrientes, citocinas y elementos de crecimiento celular [19,20].

Los andamios para regeneración de tejido óseo idealmente deben satisfacer las siguientes propiedades esenciales:

- (1) Biocompatibilidad. El andamio debe integrarse en el tejido huésped sin provocar una respuesta de rechazo [20].
- (2) Porosidad y tamaño de poro. El andamio o estructura debe ser altamente poroso de tal manera que permita el flujo de nutrientes y el crecimiento celular en el interior del andamio además de una correcta distribución de la red celular a través de la estructura porosa [21].
- (3) Propiedades superficiales. Estas propiedades deben controlar la adhesión, migración y proliferación celular.
- (4) Bioactividad. Referida a la osteoconductividad definida como el proceso por el cual las células osteogénicas migran a la superficie del andamio y la osteoinductividad el cual es el proceso por el cual células mesenquimales y células osteoprogenitoras son reclutadas al sitio de la curación del hueso [22].
- (5) Degradación. La tasa de degradación debe igualar a la tasa de regeneración del neot Tejido [14].
- (6) Propiedades mecánicas. El andamio debe ser mecánicamente estable. A escala microscópica, el andamio debe ser suficientemente resistente para soportar la adhesión celular, propagación y la deposición normal de la matriz extracelular. Al mismo tiempo, en la escala macroscópica el andamio debe tener propiedades mecánicas que se aproximen a las del tejido nato a sustituir [23].

1.2 Técnicas para la fabricación de andamios

Desde hace varios años se han usado diferentes técnicas para la fabricación de andamios celulares, dentro los cuales se encuentra el moldeo con disolvente (“solvent casting” en inglés); método que consiste en la dispersión calibrada de minerales o de partículas orgánicas en una solución polimérica para su posterior procesamiento por liofilización y cuyo fin es el de producir andamios porosos [24].

Otra técnica de procesamiento es la llamada unión de fibra (“fiber bonding” en inglés) es una técnica de procesamiento de andamios que se compone de fibras individuales tejidas o de puntos en patrones tridimensionales de tamaño de poro variable. Su principal ventaja es la gran área de superficie, para la fijación celular y la rápida difusión de los nutrientes [25].

La inversión de fase (“phase inversión” en inglés) es un método muy parecido al moldeo con disolvente, la principal diferencia es que, en lugar de permitir que se evapore el disolvente para la fase de la solución polimérica, este se invierte cuando se coloca en agua. La principal ventaja en comparación con el moldeo con disolvente estándar es que se evita la deposición de cristales y se pueden obtener muestras más gruesas de hasta 3 mm de espesor [26].

Si bien existe una amplia gama de técnicas de procesamiento de andamios, pocos tipos de andamios sintéticos muestran buena factibilidad. Las estructuras compuestas de las fibras finas generadas por electrohilado (“electrospinning” en inglés) entran en esta categoría como lo ha demostrado su amplio uso [27,28].

1.2.1 Electrohilado

El electrohilado se basa en la aplicación de una fuerza electrostática para la producción de fibras delgadas que forman mallas no tejidas. Los diámetros de las fibras se encuentran en el rango de decimas de micras a decenas de nanómetros.

Los elementos básicos requeridos para el proceso de electrohilado incluyen una solución polimérica, una fuente de alto voltaje y un colector [19]. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre el contenedor de la solución polimérica y el colector, la carga eléctrica se acumula y se obliga a la superficie de una gota pequeña de polímero a emerger del extremo de una aguja de metal; esta orientación de los dipolos a un voltaje crítico tiene un menisco en una forma equilibrada de cono; a éste se le conoce como cono de Taylor [19] el cual se puede observar en la parte superior de la figura 1.1. En este proceso la fuerza del campo eléctrico supera la tensión superficial de la solución y un chorro o haz eléctricamente cargado de solución polimérica surge. Mientras el chorro se mueve de la aguja al colector, éste es elongado por las interacciones electrostáticas entre las cargas produciendo así una fibra con diámetro reducido. Mientras tanto el solvente se evapora y finalmente se solidifica el chorro produciendo fibras [30].

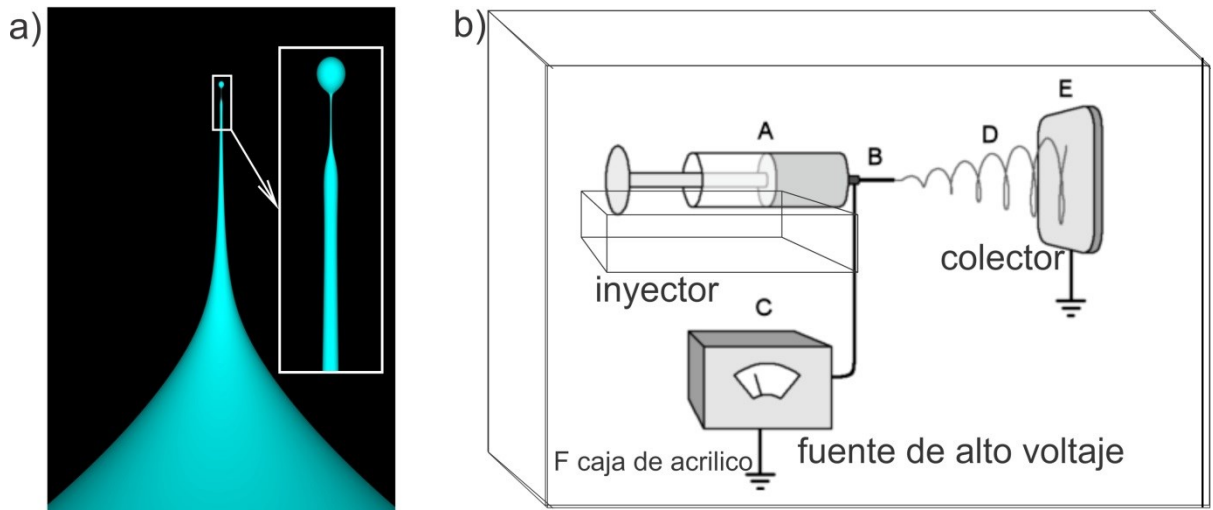


Fig. 1.1 Elementos del proceso de electrohilado. a) Cono de Taylor. b) Equipo de electrohilado básico. A corresponde a la jeringa que funciona como contenedor de la solución, B a la aguja metálica donde se conecta la fuente de alto voltaje D Haz de solución polimérica o chorro en dirección al colector y F corresponde a la caja de acrílico donde se monitorean la humedad relativa y la temperatura ambiental

El proceso y equipo de electrohilado fue patentado en 1934 por Anton Fromhals [28]. Aunque este proceso se conoce desde hace más de 80 años, el concepto de andamios electrohilados para aplicaciones biomédicas tuvo su primera aparición en 1978.

Las estructuras compuestas de fibras finas fabricadas por electrohilado muestran una reconocida eficiencia para la creación de andamios ideales demostrado por el amplio uso de dicha técnica.

Diferentes parámetros pueden influir en la transformación de soluciones poliméricas en microfibras a través del electrohilado. Estos parámetros incluyen (1) las propiedades de la solución polimérica como la viscosidad, conductividad y tensión superficial. (2) Parámetros del electrohilado como voltaje aplicado, distancia emisor-colector entre otros. (3) Parámetros ambientales como la temperatura de solución, temperatura ambiental y humedad relativa; esta última se conoce que afecta en el diámetro de las fibras y de manera considerable la porosidad de los andamios [30].

1.3 Biomateriales para regeneración de tejido óseo

La selección de los materiales más apropiados en aplicaciones de ingeniería de tejido óseo es sumamente importante en los pasos hacia la regeneración del tejido a sustituir. El desarrollo en la ciencia de materiales ha experimentado avances importantes en el

desarrollo de metales, cerámicos y polímeros en aplicaciones biomédicas permanentes o temporales.

Los metales con aplicaciones biomédicas son limitados en relación con el total de metales existentes. A pesar de que este grupo de materiales tienen mejores propiedades mecánicas en comparación con otros materiales, estos materiales deben ser biocompatibles además tener una buena resistencia a la corrosión. Actualmente se utilizan en prótesis articulares, tornillos de fijación, implantes dentales entre otros. Los metales más utilizados son el acero inoxidable así como aleaciones como el cobalto-cromo y titanio por mencionar algunos de los más importantes [31].

Los materiales cerámicos están constituidos por compuestos inorgánicos no metálicos tales como vidrios y cementos. Estos han sido ampliamente usados en la ingeniería biomédica y en el campo de la sustitución/regeneración ósea como implantes dentales y en el sistema locomotor, estas son denominadas biocerámicas [2]. Estas pueden ser de origen natural como la hidroxiapatita o sintético como β -tricalcio (β -TCP). Las biocerámicas pueden ser clasificadas en bionertes, bioactivas, biodegradables, porosas y densas. Las biocerámicas bionertes son aquellas que no reaccionan al ser implantadas *in situ* como la alúmnia, la zirconia entre otras. Las bioactivas se caracterizan por unirse directamente al hueso sin la formación de tejido fibroso, el único ejemplo es la hidroxiapatita (HA). Las biocerámicas biodegradables se disuelven con el tiempo reemplazándose por neotejido, como ejemplo tenemos el β -tricalcio. Las biocerámicas densas, tienen nula porosidad y la unión con el hueso es morfológica; en contraste con las biocerámicas porosas donde presenta una unión mecánica y la fijación es biológica.

Los polímeros son materiales altamente usados en la ingeniería de tejidos, estos son clínicamente usados en forma de fibras, tejidos, películas y bloques. Actualmente existen una gran cantidad de polímeros empleados en el campo biomédico. Los polímeros biodegradables son especialmente valorados para la ingeniería de tejido óseo.

Los polímeros biodegradables naturales pueden provenir de fuentes vegetales o animales. Dentro de estos se encuentra el colágeno, quitasano, almidón, polihidroxiburano, entre otros. Estos polímeros se caracterizan por un bajo potencial inmunogénico y un comportamiento bioactivo.

Por otra parte los polímeros biodegradables sintéticos son usados más comúnmente en el campo biomédico. Los polímeros más ampliamente usados son poli(α -hidroxi ácido), poli(ξ -caprolactona), poli(carbonatos) entre otros; en estos polímeros su versatilidad química y su procesamiento varía acorde con la estructura y naturaleza [32].

1.3.1 Poli(ácido láctico)

El poli(ácido láctico) (PLA) pertenece al grupo de los poliésteres alifáticos biodegradables, comúnmente hecho de α -hidroxi ácido. Se ha demostrado que es biocompatible y se degrada en componentes no tóxicos con una tasa de degradación controlada *in situ*.

El PLA es un polímero termoplástico de alta resistencia; el cual se procesa fácilmente en equipos estándar de plásticos para producir piezas moldeadas, películas y fibras [26].

Este es uno de los pocos polímeros en el que se puede modificar su estructura estereoquímica por la polimerización de una mezcla controlada de isómeros L-D para producir un polímero amorfo con alto peso molecular o uno cristalino.

Debido a las características de biocompatibilidad, baja toxicidad además de su aceptación por la FDA este polímero tiene especial interés para la aplicación en ingeniería de tejidos. Sin embargo dicho polímero tiene baja hidrofiliidad; lo anterior impide el uso directo sobre el polímero para la reconstrucción de tejido. El PLA se ha empleado en la fabricación de dispositivos de fijación tales como tornillos, placas y barras. En fibras se ha empleado en suturas, implantes y andamios para regeneración de tejidos.

1.3.2 Hidroxiapatita.

La hidroxiapatita (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es una de las biocerámicas más ampliamente usadas clínicamente. Esto se atribuye principalmente al hecho de que la estructura y composición de la HA es muy parecida al mineral óseo, además de presentar una buena biocompatibilidad en el tejido humano [26]. Este biocerámico ya ha demostrado su excelente biocompatibilidad con los huesos y los dientes, debido a su bioactividad, osteointegración además de no haber evidencia de carcinogénesis. Esta puede provenir de fuentes naturales o sintéticas.

Se han encontrado numerosas aplicaciones para la HA como sustitutos de hueso, relleno de cavidades en odontología, recubrimiento de superficies metálicas para implantes y en andamios para ingeniería de tejidos [25, 26, 27].

La hidroxiapatita policristalina tiene un módulo elástico entre 40-170 GPa. La relación de Poisson para la hidroxiapatita sintética es 0.27, el cual es menor al del hueso 0.3 [27].

Sin embargo, la HA sintética es un material frágil, por lo que sus aplicaciones se han limitado sólo para piezas sin carga mecánica en forma de polvos o gránulos de pequeño tamaño, o se utiliza como una capa de revestimiento depositada en sustratos metálicos.

Dicho lo anterior, estudios recientes demuestran el uso de biocerámicas usadas en andamios compuestos para lograr osteoconductividad y resistencia mecánica adecuada [9].

1.3.3 PLA HA

En la actualidad el desarrollo de materiales compuestos ha sido ampliamente estudiado. La mezcla de biomateriales, tales como polímeros biodegradables como lo es la polilactida (PLA) y biocerámicas como lo es la hidroxiapatita (HA) ha permitido obtener biocompuestos con propiedades similares al hueso [8,9].

El resultado de estos estudios muestran que la combinación PLA/HA pueden adoptar la osteoconductividad y biocompatibilidad mostrada por la cerámica HA y el PLA respectivamente [41].

Wang et al. [42] agregó partículas de hidroxiapatita rociadas por plasma, la cual produce una bioactividad mayor a la cristalina incorporándolas a andamios de poli(L-lactida) (PLLA).

Hong et al. [4] modificó la superficie de nano-partículas de HA injertando (PLLA) en la superficie. Xu et al. [7] caracterizó física y mecánicamente andamios electrohilados de PLLA injertados con hidroxiapatita y mezclados físicamente con HA.

1.4 Caracterización mecánica de andamios de fibras electrohilados.

Un andamio ideal en ingeniería de tejido debe ser mecánicamente estable. A escala microscópica, el andamio debe ser suficientemente rígido para soportar la adhesión celular, propagación, y la deposición normal de la matriz extracelular. Al mismo tiempo, en la escala macroscópica el andamio debe tener propiedades mecánicas que se aproximen a las del tejido nato a reemplazar [21].

Debido a la importancia de las propiedades mecánicas para el uso eficiente de los andamios se han hecho un gran número de estudios utilizando diversas técnicas por ejemplo, Xu et al. [7] caracterizó mecánicamente laminillas de PLLA injertado con HA por medio de ensayos de tracción, Lim et al. [8] obtuvo la caracterización de un volumen de nanofibras de PLLA a partir de modelo matemático de tres puntos comparando los resultados con ensayos de compresión. Liu et al. [29] obtuvo el módulo de Young de una fibra electrohilada de poliacrilonitrilo por medio de un microscopio de fuerza atómica. Stylianopoulos et al. [23] utilizó un modelo multiescala así como ensayos mecánicos para

su comparación para determinar el efecto del diámetro de las fibras en el comportamiento del andamio.

Desde hace unas décadas se han desarrollado sistemas de medición ópticos sin contacto para propiedades elásticas. Estas técnicas ópticas son particularmente apropiadas para materiales poliméricos suaves donde el anclaje de un extensómetro mecánico adjunto se evita completamente. La técnica de correlación de imágenes digitales (DIC por sus siglas en inglés) está basada en el principio de comparación de estructuras con patrones superficiales de una muestra deformada y otra más sin deformar o entre dos estados de deformación. La aplicación en materiales poliméricos ha probado ser una herramienta poderosa para la medición de deformación sin contacto. [33]

1.4.1 Correlación de imágenes digitales.

Desde hace varios años se han desarrollado técnicas de correlación de imágenes digitales que permiten la medición de la deformación correlacionando la posición de píxeles en imágenes en diferentes estados de deformación.

La superficie plana de un objeto a ensayar se observa por lo general por una cámara CCD con una lente. A continuación, se registran las imágenes de la superficie del objeto medir, una antes y otra después de la deformación, digitalizadas y almacenadas en una computadora como imágenes digitales.

Estas imágenes se comparan para detectar desplazamientos al buscar un punto coincidente de una imagen a otra. Aquí, debido a que es casi imposible encontrar el punto emparejado con un solo píxel, una zona con múltiples píxeles tales como 20×20 píxeles se utiliza para realizar el proceso de correlación. Esta área, normalmente llamada región de interés (ROI por su acrónimo en inglés), tiene una intensidad de luz única (nivel de gris). Se supone que esta distribución de intensidad de la luz no cambia durante la deformación.

Una vez definida la zona de interés en la imagen antes de la deformación, es seleccionada y es buscada en la siguiente imagen con distinto nivel de deformación. En otras palabras se realiza una búsqueda por región donde la distribución de intensidades de la zona de interés antes de la deformación coincida con una zona en la configuración deformada.

Una vez que se encuentra la ubicación de este subconjunto en la imagen deformada, el desplazamiento de este subconjunto puede ser determinado. Con el fin de realizar este proceso, la superficie del objeto debe tener una característica que permita evaluar el grado de coincidencia del subconjunto. Si ninguna característica se observa en la superficie del objeto, digamos un patrón aleatorio artificial de puntos con alto contraste,

evaluar el grado de coincidencia entre ambas regiones es prácticamente imposible. Típicamente se agregan puntos negros aleatorios en un fondo blanco; esto ayuda a distinguir zonas de interés únicas y así se optimiza el proceso de evaluación del grado de coincidencia entre zonas de interés [33]. Véase la figura 1.2.

Existen diversas funciones matemáticas para evaluar el grado de coincidencia de las zonas de interés en las imágenes después de la deformación; una de ellas se le conoce como la función de correlación cruzada y se encuentra definida por la expresión:

Correlación cruzada

$$C(x, y, x^*, y^*) = \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M [F(x, y)G(x^*, y^*)]$$

Correlación cruzada normalizada

$$C(x, y, x^*, y^*) = \frac{\sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M [F(x, y)G(x^*, y^*)]}{\sqrt{\sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M [(x, y)^2] \sum_{i=-M}^M \sum_{j=-M}^M [(x^*, y^*)^2]}}$$

Donde $F(x, y)$ $G(x^*, y^*)$ corresponden al cálculo del valor en escala de grises en la zona de interés de las imágenes deformada y no deformada, (x, y) y (x^*, y^*) son las coordenadas de un punto en la zona de interés antes y después de la deformación; respectivamente. El símbolo de la sumatoria representa la suma de los valores dentro del subconjunto o zona de interés cuadrada de lado M , evaluándolo para cada píxel en la fila i y en la columna j . La coordenada (x^*, y^*) después de la deformación se refiere a la coordenada (x, y) antes de la deformación, como se muestra en la figura 1.2. Por lo tanto, son componentes de desplazamiento obtenidas mediante la búsqueda en el mejor conjunto de las coordenadas después de la deformación (x^*, y^*) maximizando el valor de la correlación $C(x, y, x^*, y^*)$ Si toma el valor de 1 indica máxima coincidencia y si toma el valor de 0 significa que no hubo coincidencia entre zonas de interés.

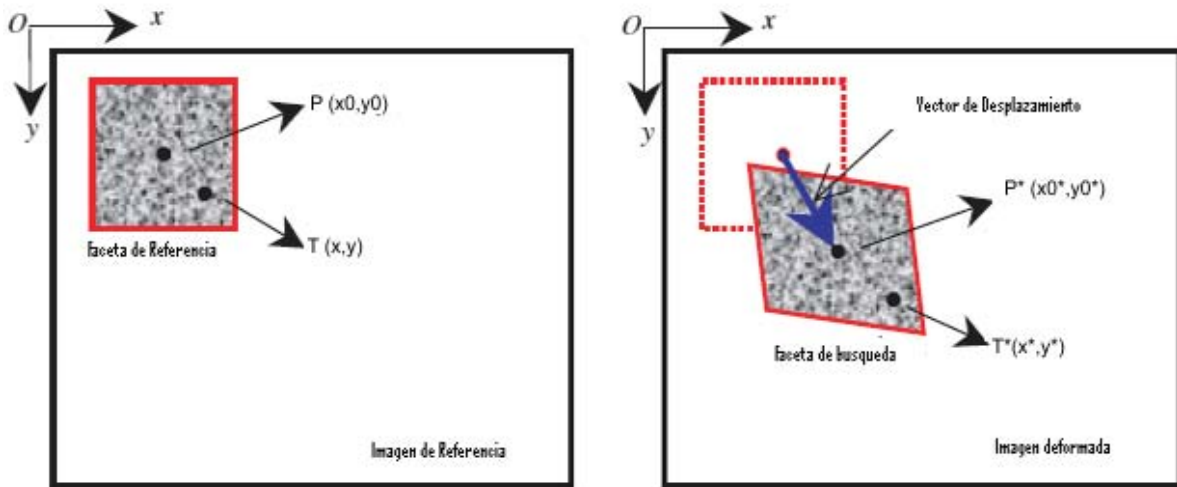


Fig. 1.2 Diagrama de facetas para la CID. Diagrama de faceta de referencia a la izquierda, a la derecha se puede observar la imagen después de la deformación. En color azul se observa la representación del vector de desplazamiento [40].

Para el caso de la correlación de imágenes digitales en 3D, se encuentra basada en el principio en la técnica en 2D. Los sistemas de coordenadas para la deformación local deben ser tangencial a la superficie local y para el cálculo de la tensión de los datos 3D se debe transformar en el espacio 2D [34].

Debido a los avances en el uso y aplicación de la técnica de correlación de imágenes digitales es posible encontrar hoy en día equipos comerciales sofisticados en el mercado. Existe hardware y software que permite la explotación de la medición de deformación sin contacto. Algunos ejemplos de software son VIC 3D™, CORRELI™ y ARAMIS™ por mencionar algunos.

Durante los últimos años la correlación de imágenes digitales se ha empleado en el análisis de muchas soluciones en el área de mecánica experimental, se han probado diversos materiales en el área automotriz, aeronáutica y de la medicina. Sánchez-Arévalo et al. [35] estudió el pericardio bovino calculando su módulo elástico micromecánico aplicando la correlación de imágenes digitales; además de la aplicación del algoritmo Willert y Gharib con la correlación de imágenes digitales en CuAlBe, un material con memoria de forma y pericardio bovino [11]. Jerabek et al. [37] realizó la medición de dos clases de polipropileno usando el sistema ARAMIS 3D identificando los efectos de los

parámetros de la prueba para compararlos con las técnicas convencionales de extensometría. Godara et al. [38] estudió la influencia de la orientación de las fibras en una resina epóxica reforzada con fibras de vidrio de borosilicato por medio de un ensayo de tracción y la correlación digital de imágenes.

Como se puede observar la correlación de imágenes digitales se ha convertido en una herramienta bastante útil y confiable en la caracterización mecánica de materiales. Realizando modificaciones en elementos ópticos del sistema de adquisición de imágenes es posible observar mecanismos de microdeformación que contribuyen de gran manera a la respuesta mecánica del material a nivel macroscópico.

Es por eso que el principal objetivo de esta tesis es determinar la influencia de las partículas de HA en el comportamiento estructural, macro y micromecánico de los andamios electrohilados de PLA bajo tensión uniaxial utilizando una técnica óptica no intrusiva.

Al correlacionar de manera adecuada los parámetros de composición, estructura, respuesta macro/micromecánica de los andamios electrohilados de PLA-HA permitirá un mejor entendimiento del comportamiento de estos materiales. Con lo anterior será posible manipular de manera adecuada sus propiedades de acuerdo con el tipo de aplicación en la que van a ser usados.



CAPÍTULO 2

Metodología experimental.

2.1 Material

Se utilizaron gránulos de PLA (Mw 230000 g/mol, NatureWorks 2002D LLC, MN, Estados Unidos). También se usó hidroxiapatita en polvo (nanopowder, <200nm, >=97%. Sigma-Aldrich, USA).

El disolvente usado para la mezcla fue trifluoroethanol (TFE) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Dicho disolvente se seleccionó ya que aumenta la conductividad de la solución en el proceso de electrohilado en comparación de otros disolventes tales como el cloroformo, cloroformo-acetona, cloroformo-etanol y diclorometano además que el parámetro de solubilidad es muy cercano al del PLA [43].

2.1.1 Preparación de la solución polimérica de PLA

Se preparó la solución polimérica al 16 % peso/ Volumen (p/V) de PLA en trifluoroethanol. Una vez pesados los 1.6 (g) gránulos de PLA y contenidos en un matraz aforado de 10 ml se agregó el disolvente hasta la marca de aforo. Con ayuda de una tina ultrasónica (Bransonic 2510RR-MT, Méxco) se disolvieron los gránulos en el TFE, una vez que la muestra no presenta sólidos se agregó más disolvente hasta la marca de aforo repitiendo el agitado por 30 minutos.

2.1.2 Preparación de la mezcla física de PLA con hidroxiapatita

Se prepararon mezclas físicas (suspensiones) de PLA HA a concentraciones de 0%, 2%, 4% y 6%. Las concentraciones anteriores se eligieron con el fin de observar el efecto que tienen en las propiedades mecánicas del material compuesto; lo anterior se definió tomando en cuenta que algunos trabajos previos reportan que al 4% de HA el andamio presenta un incremento en los módulos de elasticidad y esfuerzo máximo [44].

Como se mencionó anteriormente, la solución de PLA se preparó con una concentración del 16% peso/volumen (p/V) de PLA. La cantidad de HA utilizado está en relación con el peso del PLA para cada una de las concentraciones anteriormente descritas.

Se agregaron ambas cantidades previamente medidas de PLA y HA en un matraz aforado de 10 ml. Posteriormente, se adicionó el TFE al matraz hasta cubrir completamente la mezcla.

El proceso de mezclado se llevó a cabo en una tina ultrasónica (Branson 2510RR-MT, México) a una temperatura de solución de 40°C por aproximadamente 3 horas. Una vez disueltos los gránulos se aforó con el TFE y se agitó en la tina ultrasónica por 1 hora más. Finalmente, se dejó de agitar durante una 1 hora para favorecer la dispersión de las partículas de HA. Cabe mencionar que este proceso se realizó para todas las concentraciones previamente descritas.

2.2 Proceso de electrohilado.

Para fabricación de andamios se utilizó la técnica de electrohilado; dicha técnica está basada en el uso de fuerzas electrostáticas para la fabricación micro y nano fibras.

El proceso se realizó bajo condiciones ambientales a una temperatura promedio de 22 °C y una humedad relativa ambiental promedio del 43 %. Algunos de los parámetros se mantuvieron constantes, tales como: diferencia de potencial aplicada fue de 15 kV de corriente directa (CD) mediante una fuente de alto voltaje (Glassman High Voltage Inc Serie EH, Estados Unidos).

La distancia emisor (punta de aguja) al colector fue de 30 cm, el tipo de colector fue una placa cuadrangular de aluminio de 10 cm² con un espesor de 0.1 mm; dicho colector fue montado en una base de plástico a fin de mantenerse perpendicular al emisor.

Cabe señalar que los parámetros de electrohilado tales como la distancia emisor-colector, el voltaje aplicado y el flujo de inyección fueron estudiadas en el trabajo de Vera Graziano et al. [44] donde se optimizó la estructura morfológica de las fibras a través de las condiciones en el electrohilado; por lo que en el presente trabajo se retomaron dichos parámetros.

La configuración del equipo de electrohilado utilizado para el presente trabajo se puede observar en la figura 2.1. Véase figura 2.2 la disposición de la bomba de inyección y el colector utilizado para el electrohilado.

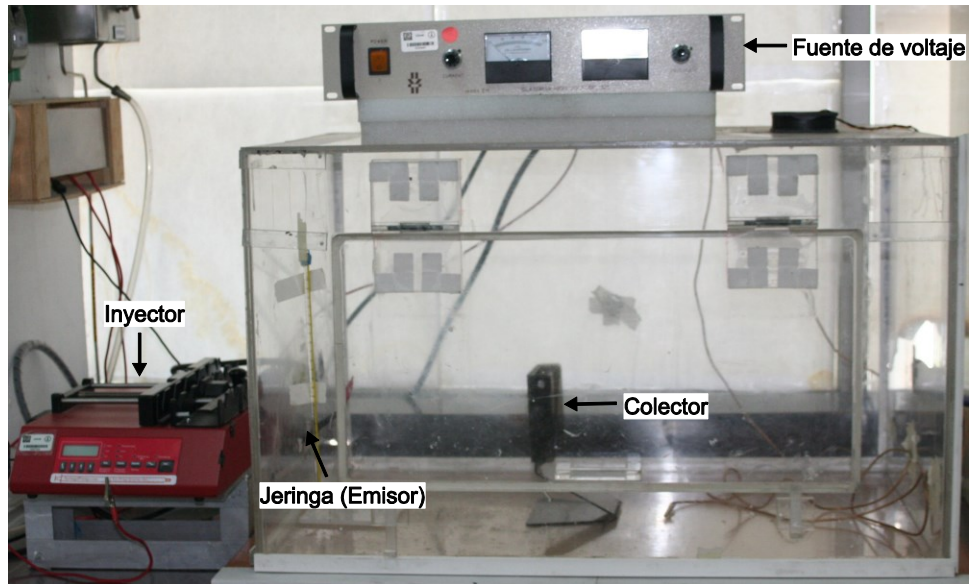


Fig. 2.1 Equipo de electrohilado. Configuración del equipo de electrohilado utilizado. Se observa la ubicación de la fuente de voltaje en la parte superior de la caja de electrohilado que a su vez se conecta en el polo negativo al colector montado en la base negra mientras el polo positivo a la aguja de la jeringa ubicada en la parte inferior izquierda. A su izquierda se observa el inyector.

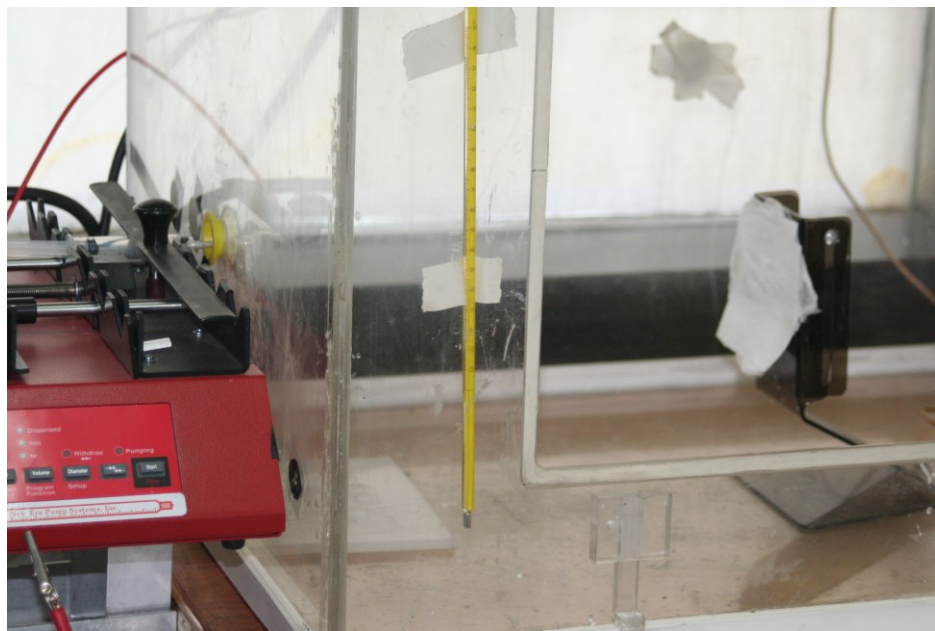


Fig. 2.2 Colector. Detalle del colector cargado de microfibras montado en la base dentro del equipo de electrohilado.

En el inyector (New Era Pump Systems Inc. Multi-phaser NE-1600, USA) se establecieron condiciones que se mantuvieron constantes para todas las mezclas: flujo de inyección de 0.6 ml/h, con un diámetro interno de la jeringa de 12.45 mm y el diámetro del capilar fue de 0.8mm. Véase Figura 2.3.

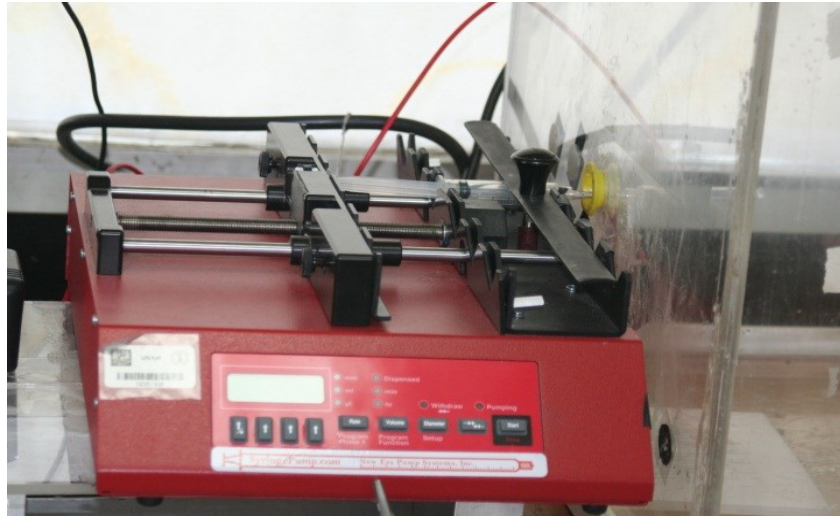


Fig. 2.3. Inyector Inyector programable usado con una jeringa montada en su parte superior, es posible observar los botones y la pantalla con la cual se programa.

Para cada andamio de dimensiones 10 x 10 cm, se inyectaron 3 ml de solución, véase figura 2.6 inciso a). Dicho proceso se efectuó en condiciones ambientales; los valores de temperatura y humedad relativa dentro de la caja de electrohilado durante todo el proceso se monitorearon. Para la medición de la humedad relativa se usó un sensor de humedad [serie HIH4030, Honeywell, USA] acoplado a un pin de salida analógica de un micro-controlador (Arduino Mega 2560) y con ayuda del instrumento virtual programado en LabVIEW se adquirieron los valores de la humedad cada medio segundo a lo largo del electrohilado.

2.3 Caracterización de los andamios electrohilados

2.3.1 Espectroscopia de infrarrojo.

Para la caracterización de grupos funcionales del PLA, PLA mezclado físicamente con HA; así como para conocer el efecto en el comportamiento mecánico en los diferentes andamios de PLA por la interacción química con la mezcla del pigmento (pintura vinílica) se empleó la técnica de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier por reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). Para tal estudio se empleó un equipo ATR-Thermo Scientific Nicolet 6700. Al absorber la radiación infrarroja las moléculas perciben los

cambios entre estados de energía vibracional lo que hace posible la caracterización de los principales grupos funcionales de la estructura molecular del compuesto [45]. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en los intervalos de 4000 a 400 cm^{-1}

2.3.2 Calorimetría diferencial de barrido

Se utilizó Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC por sus siglas en inglés) para estudiar las propiedades térmicas de las muestras; con lo anterior se obtuvieron los valores de las temperaturas de transición vítrea (T_g) y de fusión (T_m) monitoreando el cambio del flujo de calor en función de la temperatura. Así mismo fue posible obtener las entalpías de transición evaluando la estabilidad térmica del material. Para dichas pruebas se utilizó el equipo DSC Q100 ATR, de 0 a 250 $^{\circ}\text{C}$ con una velocidad de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

2.3.3 Microscopía electrónica de barrido

Por otro lado se obtuvieron imágenes por microscopía electrónica de barrido para conocer la morfología de las fibras y distribución de partículas de hidroxiapatita de las diferentes especies de microfibras de PLA estudiadas en este trabajo; esto se hizo con ayuda del Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FE SEM por sus siglas en inglés) JEOL JSM 7600F. Dicho microscopio utiliza un cañón de emisión de campo haces de alta y baja energía; el FE SEM cuenta con diferentes detectores que recogen los electrones que interactúan con la superficie de la muestra para crear una imagen que refleja las características superficiales de la misma.

El voltaje de operación para el haz de electrones fue 15 kV Las muestras se prepararon previamente con un recubrimiento de una película de oro mediante la pulverización catódica asistida por plasma para favorecer la conductividad de la muestra.

2.3.3.1 Determinación de área porosa del andamio y medición de diámetros

A partir de las imágenes de SEM se realizó la medición de los diámetros; para ello se utilizaron las imágenes a 10,000X. Se empleó el programa “Image J” para la medición de diámetros así como para determinar el porcentaje de área porosa.

El procedimiento para la obtención de la medida de los diámetros consta de los siguientes pasos 1) Con base en una cota dada por el microscopio, se contabilizan los píxeles por longitud conocida, esto con ayuda de la herramienta Straight en el software Image J; lo cual nos arroja una escala de medición real en el espacio de la imagen, estableciendo una relación entre micras y píxeles. 2) A través de la herramienta “Measure” se almacenan las

medidas hechas sobre la imagen, para después determinar la desviación estándar y promedio. Las mediciones se hicieron de forma perpendicular en las fibras que aparecen en primer plano de la micrografía, véase figura 2.4.

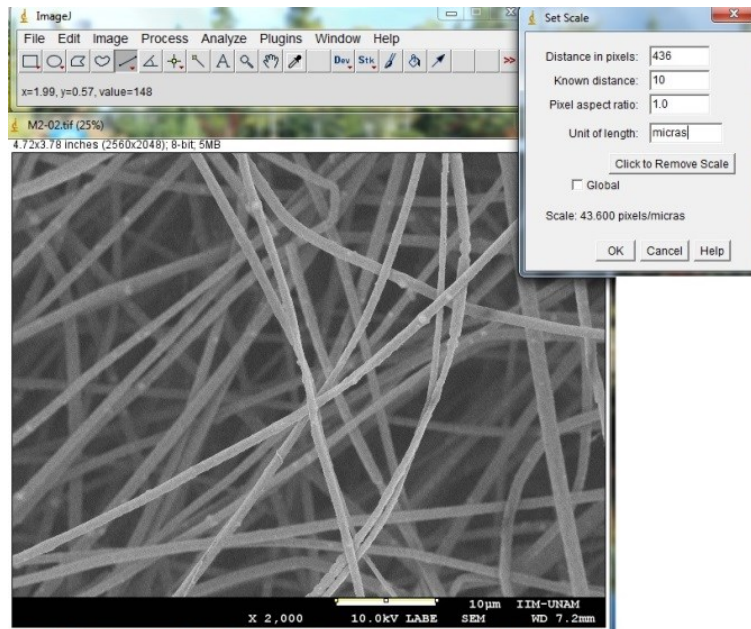


Fig. 2.4 Medición de diámetros Micrografía a 10 KX usadas para la medición de diámetros, en la parte de arriba se observa la barra de herramientas del software Image J.

Para determinar el porcentaje de área porosa se emplean imágenes a 2,000X. 1) Se establece la escala de medición tal como se hace en la medición de diámetros explicado previamente. 2) Por medio de la herramienta "Threshold" la imagen se filtró y a través del aumento del contraste por medio de cual se reconocieron poros de fibras asignando colores o un umbral en la imagen, distintos para cada caso. Véase figura 2.5. 3) Finalmente, con la herramienta "Analyze Particles", la imagen pasa de positivo a negativo y el software escanea la imagen hasta que encuentra el borde de la imagen restando el área seleccionada previamente que correspondiente a las fibras, efectuando a través de la escala previamente defina el cálculo del área porosa.

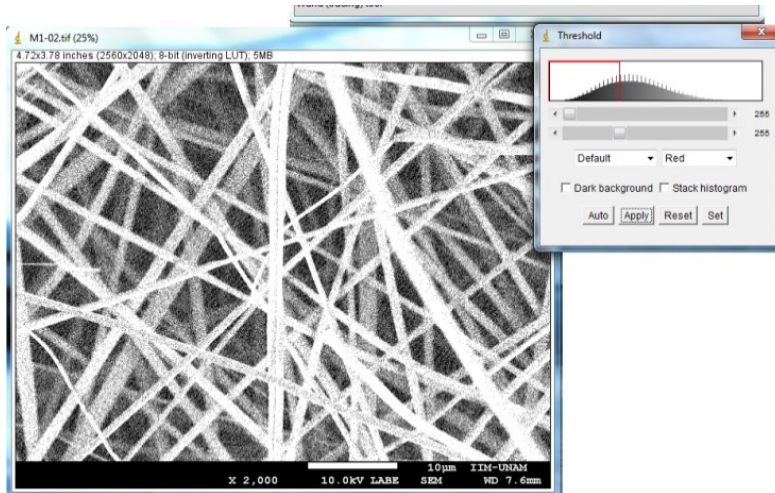


Fig. 2.5 Medición de porosidad. Ajuste de contraste realizado como parte de la medición de área porosa.

2.4 Caracterización macro y micromecánica.

Para la caracterización mecánica de los distintos de andamios celulares se realizó mediante ensayos de tracción uniaxial y al mismo tiempo se usó un sistema óptico de medición de deformación en tres dimensiones sin contacto, llamado ARAMIS™ 5M 3D (GOM, Alemania). Véase figura 2.6.

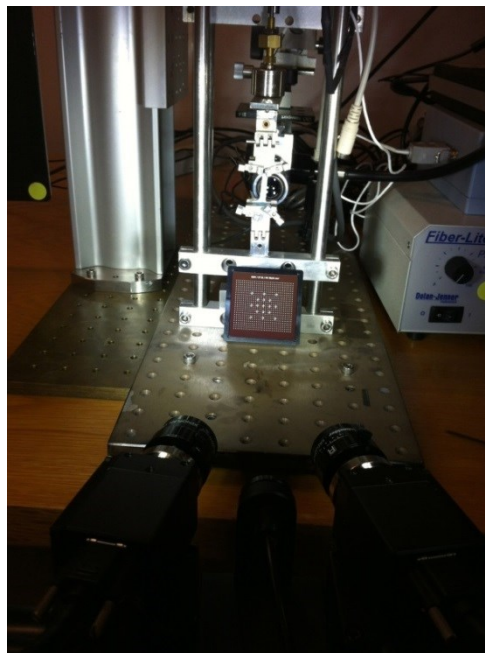


Fig. 2.6 Máquina de ensayos universales. Máquina universal de ensayos de tracción acoplada con las cámaras del sistema ARAMIS.

2.4.1 Ensayo de tracción

El ensayo de tracción uniaxial se realizó mediante la instrumentación de una máquina universal de ensayos de tracción de materiales suaves y espesores reducidos. Parámetros tales como la carga aplicada y el desplazamiento fueron registrados por sensores electrónicos incorporados y con ayuda de un instrumento virtual de LabVIEW se sincronizó la adquisición de datos.

Dicha máquina de ensayos mecánicos está compuesta por una estructura de carga, un sistema óptico y un instrumento virtual.

La estructura de carga fue conformada por un soporte hecho de barras de acero y dos cabezales horizontales donde se montaron las mordazas especialmente diseñadas para no dañar las muestras, en la mordaza superior se acopló un actuador mecánico T-LA28A (Zaber, Canadá) con una carrera total de 28 mm y una carga máxima de 15 N; el motor a pasos permite un desplazamiento lineal del orden 100 μm por intervalo, con dicho arreglo se es capaz de controlar el desplazamiento lineal. El desplazamiento lineal durante los ensayos es medido por un transformador diferencial de variación lineal (LVDT por sus siglas en inglés) MHR1000, (Lucas Schaevits), al cual se le incorporó un acondicionador de señal ATA2001 del mismo fabricante y un indicador de posición digital ID-F150HE (Mitutoyo, Japón) como referencia de posición. A este dispositivo se incorporó una celda de carga miniatura de precisión modelo 31 (Honeywell, USA) con un rango de carga de 9.81 N con 0.15%-0.25% de precisión [46].

La adquisición de datos, así como el control, se llevó a cabo por medio de una tarjeta de adquisición de datos NI-USB 6009. La sincronización de todos los sensores y actuadores fue hecha por un instrumento virtual programado en LabVIEW [46].

2.4.1.1 Geometría y preparación de la probeta

A partir de cada andamio se obtuvieron tres probetas, tomadas de la parte central del mismo. Las probetas son de la forma hueso de perro, el ensayo de tracción se hizo bajo la norma ASTM D1708-13. Las dimensiones de la probeta son 38mm, 5mm y 0.125mm de largo, ancho y espesor respectivamente además 22.2mm de largo la sección entallada.

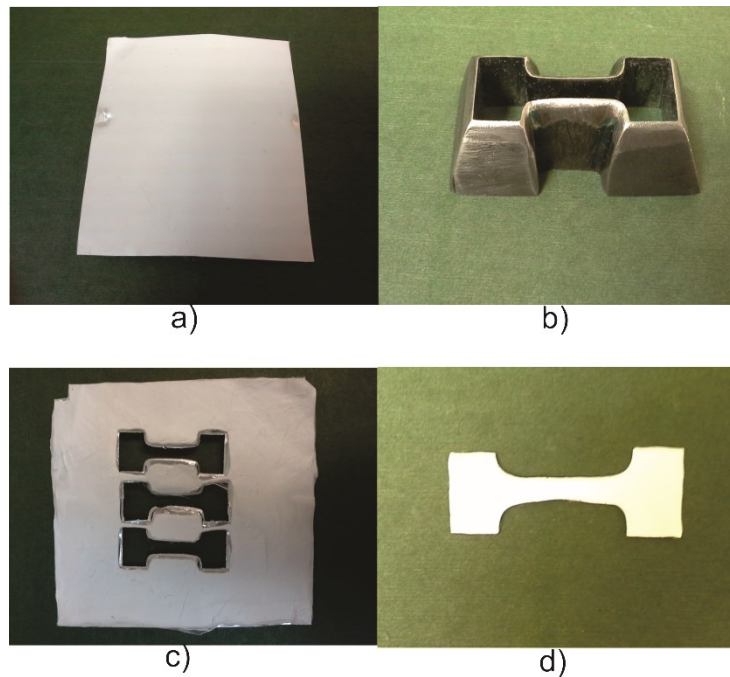


Fig. 2.6 Procesamiento de probetas. a) Andamio electrohilado b) Suaje con dimensiones que marca la norma ASTM D 1708-13 c) Andamios corados por medio del suaje c) Probeta para ensayos de tracción uniaxial bajo la norma ASTM D 1708-13

Para llevar a cabo el corte de las probetas en cada andamio para crecimiento celular, se usó un suaje a fin de mantener las medidas normalizadas constantes. Véase figura 2.6.

La medición de los espesores de cada probeta fue necesaria para la caracterización mecánica. Para la medición de espesores se utilizó un micrómetro con indicador digital Mitutoyo modelo 293-67N con un rango de 0-1 pulgada. Se tomaron dos medidas en cada probeta en los extremos de la sección entallada para no dañar la parte central de la misma.

2.4.2 Medición de deformación sin contacto

La medición de la deformación se llevó a cabo por el sistema ARAMIS capaz de medir, calcular y visualizar deformaciones en materiales con superficies planas o curvas. ARAMIS es adecuado para medir deformación tridimensional bajo carga estáticas y dinámicas (baja velocidad de deformación) con el fin de analizar las deformaciones y la tensión de las muestras ensayadas [34].

El procedimiento de medición en 3D con el sistema ARAMIS consiste en la colocación de dos cámaras, previamente calibradas y con ayuda del software (ARAMIS v6.1, GOM,

Alemania). Ambas capturan la secuencia de imágenes (“stages” en inglés) que registran diversas etapas del ensayo de tracción. Es posible variar parámetros tales como la velocidad de adquisición de imágenes, el tiempo total de adquisición de imágenes y número de imágenes a tomar con el fin de conseguir la velocidad adecuada para el experimento, tales como la tasa de muestreo (“frame rate” en inglés), el número de imágenes a capturar y la cantidad de píxeles contenidos en cada zona de interés o faceta (“facet size” en inglés).

Las lentes para la adquisición de imágenes fueron seleccionadas con el fin de ajustar el máximo volumen de medición a la zona entallada de la probeta Véase figura 2.7 y 2.8. Los parámetros en la configuración del equipo ARAMIS fueron constantes durante todos los experimentos y se muestran a continuación.

- Lentes 35 mm familia B
- Cubo de calibración: CP 20, 20 x 34 mm² (identificado en el software por ID 390)
- Volumen de medición: 35 x 29 x 20 mm
- Distancia al borde del panel de calibración a partir de la base de las cámaras (distancia media): 215 mm
- Distancia entre las cámaras: tope mecánico
- Angulo entre cámaras: 25°

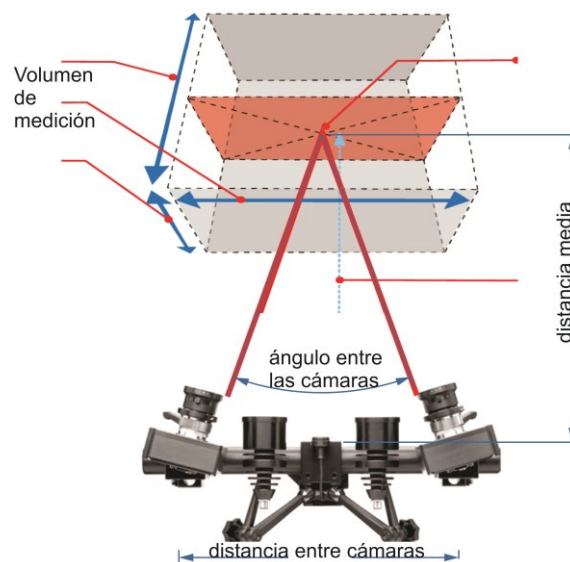


Fig. 2.7 Parámetros del sistema ARAMIS. Parámetros de configuración del sistema ARAMIS respecto al objeto de análisis [34].

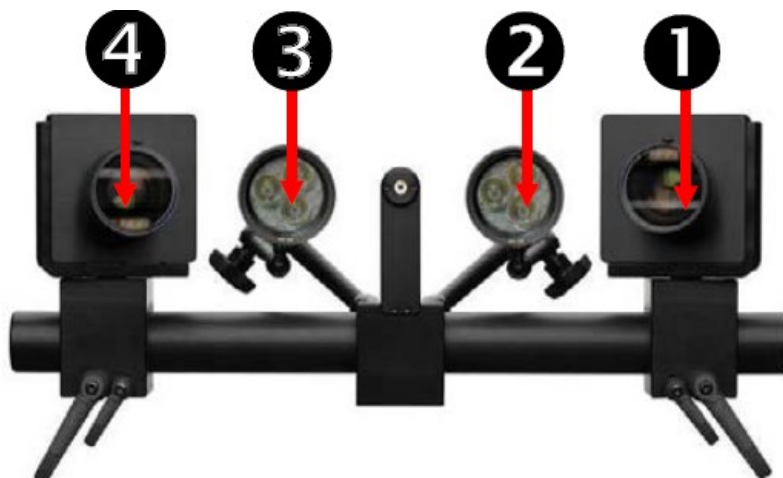


Fig. 2.8 Eje óptico del equipo ARAMIS. Se muestran en los números 1 y 4 las cámaras derecha e izquierda así como las lámparas señaladas con los números 3 y 2 [34]

2.4.2.1 Calibración del sistema ARAMIS.

Durante la calibración se configura el sensor y se ajustan las características de las lentes; en la configuración del sensor se determina la distancia entre las cámaras, ángulo entre las mismas y la distancia media entre los sensores y la superficie de la muestra. En lo que respecta a las características de las lentes se determina el enfoque, las distorsiones de lente y apertura de los mismos. Con base en los ajustes anteriores el software calcula a partir de los puntos de referencia del cubo de calibración las coordenadas 3D de las imágenes tomadas por la cámara en 2D. El proceso de medición que involucra la calibración garantiza la consistencia dimensional del sistema de medición.

Como parte de la preparación del hardware se ajustó el sensor en las condiciones de operación y volumen de medición apropiado; teniendo en cuenta que se usaron los parámetros de la cámara izquierda como referencia (tal como lo indica el manual del equipo). Los pasos y parámetros para tal calibración del sensor son los siguientes:

1. Ajuste y alineación del punto láser con los ejes coordenados en la imagen desplegada en el software tomada por las cámaras. Véase figura 2.9
2. Enfoque de las lentes
 - i. Con el cubo de calibración se debe sobre-exponer la imagen ("shutter time") enfocando solo un punto de dicho cubo, hasta que el área roja ocupe la mayor parte del centro
 - ii. Mediante el acercamiento hacia una imagen y su correcto enfoque

3. Apertura de la lente

- i. Con el uso de la opción <False color> dentro de software del equipo ARAMIS se igualarán las imágenes ajustando la apertura de las lentes o bien moviendo las lámparas, posicionando las lámparas en dirección paralela a las cámaras. Véase figura 2.9

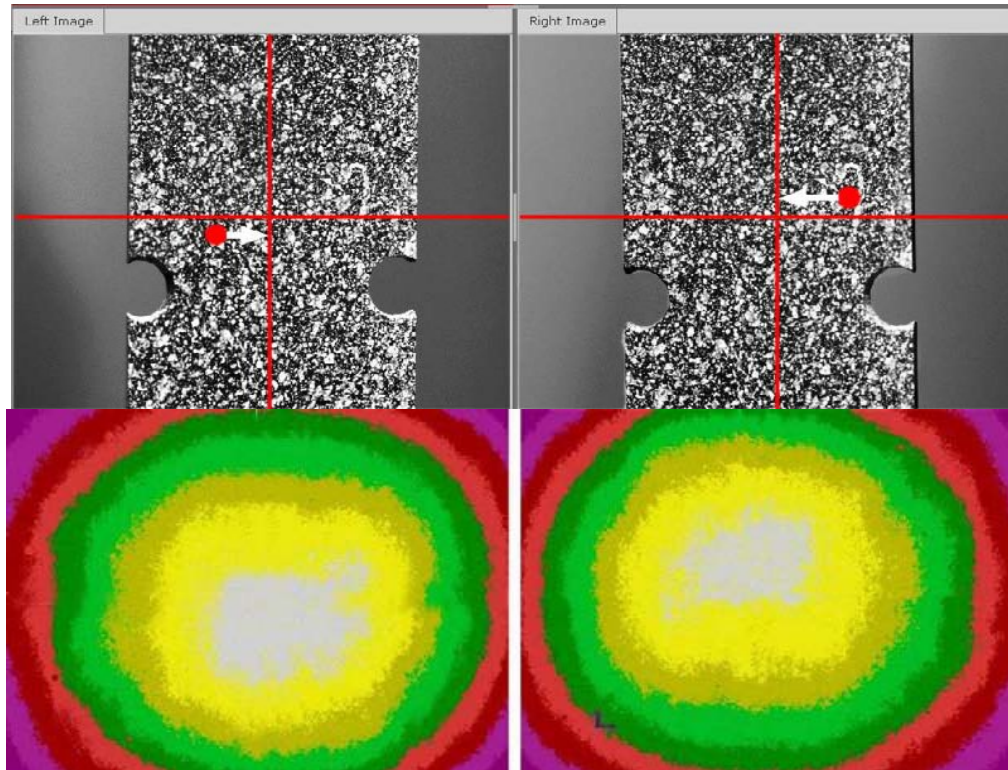


Fig. 2.9 Proceso de calibración. Superior: alineación del láser con el eje centro del eje óptico. Inferior: calibración de la apertura de la lente por medio de color falso [34].

Cabe señalar que la iluminación utilizada fue provista únicamente por las lámparas del equipo, esto a fin de tener mayor control en la exposición de luz recibida durante el ensayo de tracción.

Para reducir el error de las mediciones al mínimo se utilizó el siguiente procedimiento después de ajustar las cámaras y la iluminación; los pasos indicados en el manual del equipo ARAMIS son los siguientes pasos. Véase figura 2.10

1. Abrir el menú de calibración en el software
2. Capturar una imagen a la distancia media.
3. Acercar a un tercio de la distancia y capturar imagen nuevamente.
4. Alejar un tercio de la distancia media para tomar otra imagen.

5. Inclinarse 40° respecto a la vertical a la distancia media.
6. Girar 180° e inclinarse a 40° respecto de la vertical a la distancia media.
7. Con la cámara izquierda perpendicular al cubo de calibración y a la distancia media tomar una imagen, así como tras el giro de 90° , 270° y 180° .
8. Finalmente con la cámara derecha perpendicular al cubo de calibración y a la distancia media tomar una imagen, así como tras el giro de 90° , 270° y 180° .

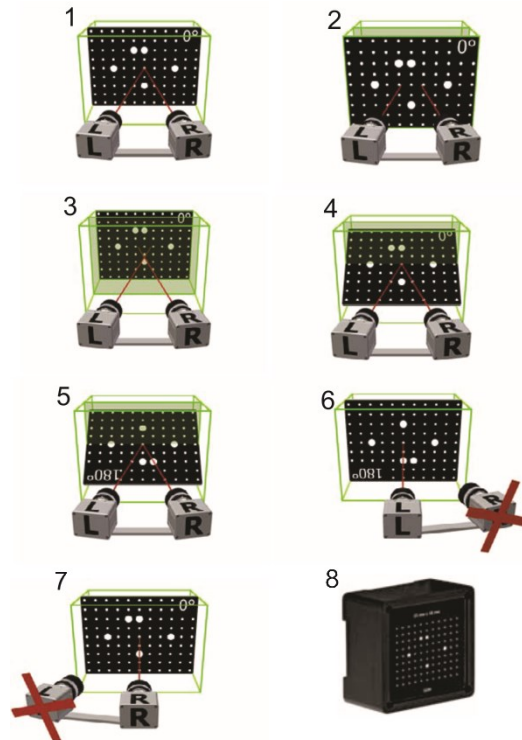


Fig. 2.10 Pasos de calibración. 1-7 Pasos de calibración del sistema ARAMIS. 8 Cubo de calibración. [34]

La desviación estándar o error de calibración se calcula a partir de la desviación del punto de referencia promedio de todos los puntos registrados durante el proceso de calibración. Tal como lo aconseja el fabricante se procuró realizar las mediciones después de obtener una desviación de calibración menor al 0.04 píxeles. Si este error es mayor a 0.04 no se puede proceder a efectuar las mediciones; lo anterior indica, generalmente, una mala preparación de las muestras (puntos aleatorios negros sobre un fondo blanco) o una mala iluminación.

Una vez calibrado el equipo ARAMIS se realizaron capturas con la probeta estática a fin de verificar la correcta disposición de todas las variables de los sistemas de medición.

2.4.2.2 Preparación de la muestra

Para la medición óptica se requirió que la superficie de la probeta tubiera un patrón de puntos aleatorios con el fin aumentar la eficiencia en la correlación de imágenes digitales. Esto se logra al tener un patrón aleatorio más fino que es detectado en cada faceta.

Se entiende por faceta como la región de interés sobre la cual se realizará el análisis; con lo que un área de píxeles en la imagen de referencia puede ser asignada al área correspondiente de la imagen en otro estado de deformación.

La definición del tamaño de faceta debe definirse en una relación entre exactitud y rapidez en el cómputo tomando en cuenta el tamaño de la sección de interés en la probeta.

Este patrón tiene que seguir la deformación en la superficie, debe tener un alto contraste evitando reflejos además de ser lo suficientemente pequeño para permitir una trama fina de las facetas.

Dado que la aplicación de esta técnica de medición sin contacto no se ha aplicado hasta el momento en micro-fibras poliméricas electrohiladas, fue necesario probar distintas maneras de conseguir el rociado del patrón adecuado; sumado a esto, fue indispensable experimentar con distintos tintes y colorantes que no modificasen la estructura del andamio y con esto su comportamiento mecánico a la vez que brindasen los niveles de contraste y brillo adecuado.

Tras el desarrollo de las pruebas y estudios, los mejores resultados sobre el colorante fue la pintura vinílica negra (Politec, México) compuesta, principalmente, de poli(acetato de vinilo) (PVA), 2-2-Azobisisobutironitrilo (AIBN) como catalizador y carbono (C); la aplicación adecuada de dicho patrón fue conseguido con un pincel artístico de cerdas cortas a través de la aspersion de las cerdas húmedas previamente sumergidas en la pintura vinílica, véase figura 2.11.

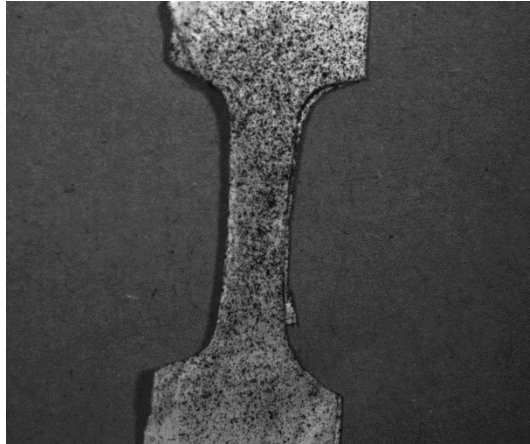


Fig. 2.11 Probeta con patrón de puntos. Probeta con patrón aleatorio tomada por ARAMIS.

2.4.3 Parámetros usados en las pruebas mecánicas

Durante la medición se establecieron los siguientes parámetros:

- Tasa de muestreo “frame rate”: 2 imágenes por segundo
- Tomas “stages”: 150 imágenes
- Tamaño de faceta “facet size”: 19 píxeles cuadrados
- Paso de faceta “facet step”: 15 píxeles

Los parámetros utilizados para el ensayo de tensión son: tiempo de prueba: 60 (s) y un desplazamiento de 8.5 (mm), capturando 2 imágenes por segundo y con una velocidad de deformación de 8.5 (mm/min).

Tras la prueba de diversos colorantes y técnicas para aplicarlos, los mejores resultados sobre el colorante fue la pintura vinílica negra (Politec, México) y la aplicación adecuada de dicho patrón fue conseguido con un pincel artístico de cerdas cortas véase figura 2.12.



Fig. 2.12 Pincel utilizado para obtener el patrón aleatorio sobre las probetas.

2.5 Procesamiento de datos.

A partir de los ensayos de tracción y la adquisición de imágenes con ARAMIS de manera simultánea se obtuvieron los datos de cada prueba, respectivamente.

Fue necesario un procesamiento de los datos obtenidos a fin de obtener los valores y gráficas deseadas. Por parte de la prueba de tracción se estudiaron los registros de tiempo, desplazamiento, fuerza y número de toma. Con los datos anteriores se obtuvieron los esfuerzos en función de la deformación así como su gráfica y los módulos elásticos macromecánicos.

Por otra parte con la adquisición de imágenes con el equipo ARAMIS durante el ensayo de tracción se realizó el cómputo con el cual se obtuvieron las deformaciones principales a lo largo de una sección de estudio de cada probeta.

Utilizando los resultados de los procesamientos anteriores se obtuvieron los módulos elásticos micromecánicos así como gráficas donde se asocian las deformaciones principales a lo largo de la probeta con diferentes niveles de esfuerzo.

2.5.1 Procesamiento de datos del ensayo de tracción.

Con los ensayos de tracción realizados con la máquina universal de ensayos de tracción se registraron los valores de desplazamiento, fuerza, tiempo y número de toma; lo anterior previamente se programó en el instrumento virtual para registrarse en un archivo con la extensión dat (.dat); esta extensión facilitó su pos-procesamiento en Mathematica 8.0[®]. En los archivos conseguidos para cada probeta se tiene un ordenamiento en columnas para cada tipo de dato y filas para cada registro de medición; en las columnas se registró el tiempo en segundos, desplazamiento en milímetros, fuerza en newtons y número de toma respectivamente.

Los datos anteriores fueron utilizados para el pos-procesamiento a fin de conseguir la curva esfuerzo en función de la deformación; para lo anterior se hizo uso del software Wolfram Mathematica 8.0 (Wolfram Research). Mediante el código previamente programado se importaron los archivos con extensión .dat de cada ensayo de tracción. Véase figura 2.13.

Para el cálculo de la deformación nominal (ϵ) definida por la expresión $\epsilon = \frac{l_1 - l_0}{l_0}$; para ello se programó una función en Mathematica 8.0[™] capaz de restar del valor del desplazamiento

en milímetros (l_1) menos el valor inicial del desplazamiento (l_0); es decir el cálculo de los incrementos de desplazamientos registrados durante el ensayo de tracción; finalmente se dividió entre la sección longitudinal inicial (l_0).

En lo que respecta al cálculo de esfuerzo (σ) que se define por la expresión $\sigma = \frac{F}{A}$ donde F es la fuerza aplicada y A es el área transversal de la probeta. Se empleó una función programada en Mathematica 8.0™, en la cual se utilizaron los valores de los registros de la tercera columna que corresponden a los datos de la fuerza y se dividió por el área transversal de cada probeta.

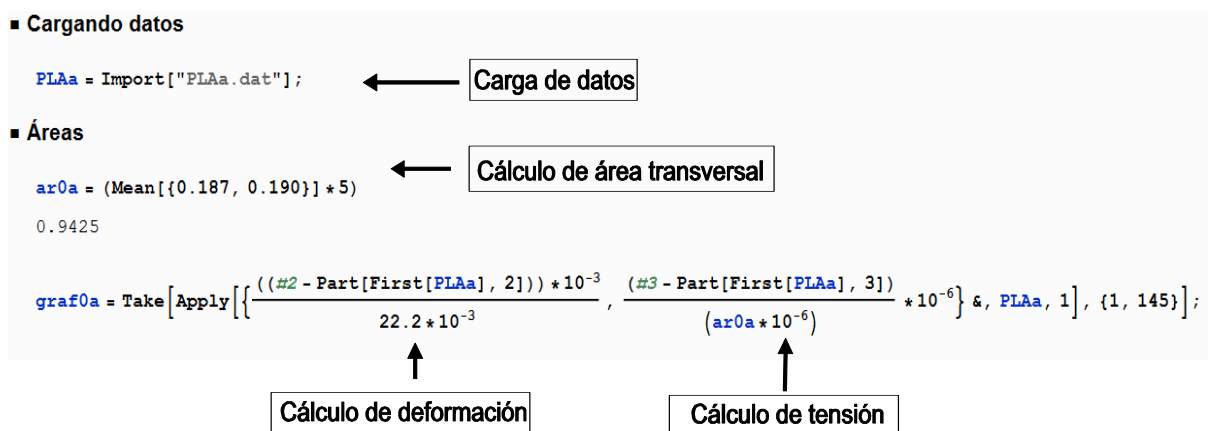


Fig. 2.13 Cálculo de esfuerzo y deformación. Estructura del programa utilizado en Mathematica 8.0, en la parte superior se encuentra la carga de datos, en la parte media se encuentra el promedio del espesor para así efectuar cálculo del área transversal de la probeta y en la parte inferior se observa la función para el cálculo de la deformación y esfuerzo.

2.5.2 Procesamiento de datos con el sistema ARAMIS

Durante el ensayo de tracción se llevó a cabo la adquisición de imágenes por parte del sistema de medición óptico de deformación sin contacto ARAMIS; a partir de dicha serie de fotografías se realizó un procesamiento de estas imágenes a fin de estudiar el comportamiento micromecánico.

A continuación se describen los pasos para procesamiento en el software ARAMIS V6.1, este procedimiento fue realizado para cada probeta ensayada.

Una vez ejecutado el software ARAMIS V6.1 se selecciona para abrir el archivo generado durante el ensayo de tracción realizado; dicho archivo tiene una extensión .dap. Véase figura 2.14.

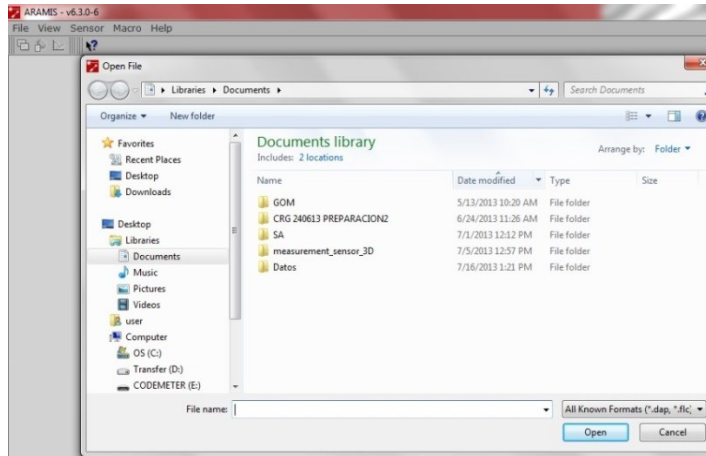


Fig. 2.14 Apertura de archivos. Selección de archivo a abrir con extensión .dap dentro del software ARAMIS V6.1.

Una vez ejecutado el archivo a analizar fue necesario seleccionar la zona de interés de la probeta. El procedimiento para el enmascarado se comenzó con la visualización dentro del software de la primera imagen capturada, y con el uso de un puntero libre dentro de la barra de herramientas para la selección el contorno a lo largo de la probeta. Una vez seleccionada el área de interés, esta se colorea en verde y el resto continua en azul; en la región discriminada internamente el software asignó la trama de facetas. El proceso de enmascarado se puede observar la figura 2.15.

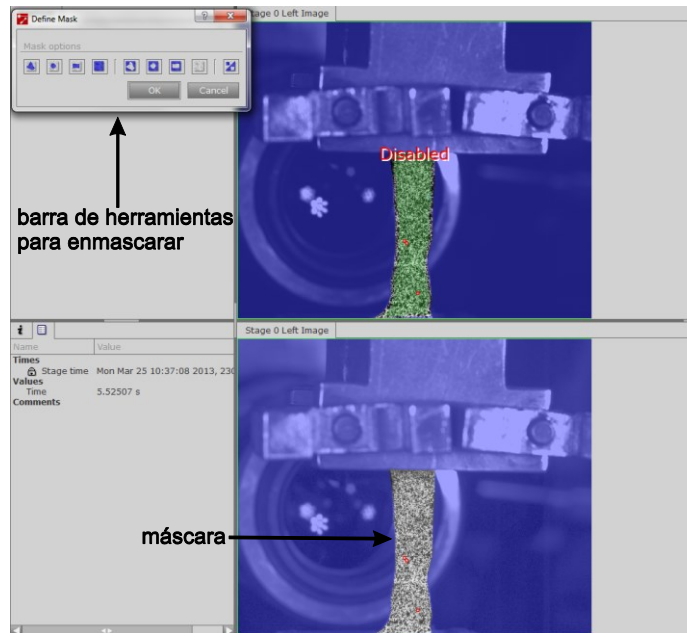


Fig. 2.15 Proceso de enmascarado. En la esquina superior derecha se encuentra la barra de herramientas de enmascarado, en verde se muestra la sección seleccionada.

Una vez delimitada la sección de interés, el análisis requirió de la selección de un punto de inicio, este punto es una faceta calculada y es fundamental para que el algoritmo de correlación de imágenes digitales funcione correctamente, el análisis a lo largo de la serie de imágenes está basado en el punto de inicio como referencia. Véase figura 2.16.

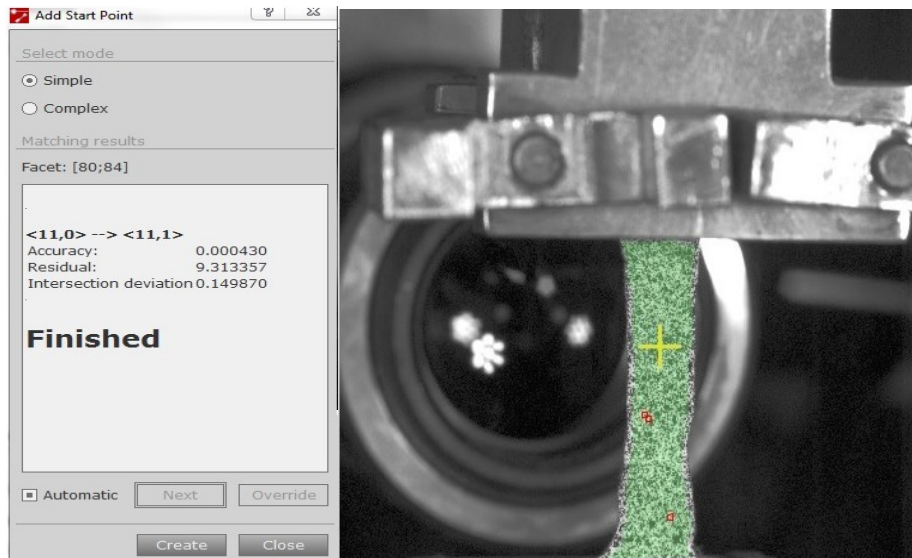


Fig. 2.16 Fijación punto inicial. En la parte izquierda se encuentran señaladas las coordenadas del punto de inicio, en la parte derecha se observa el punto de inicio localizado en la probeta

Una vez que se obtuvo un punto de inicio válido para el análisis, se comenzó el cómputo del proyecto, es decir el análisis de la secuencia de imágenes capturadas para el cálculo de la deformación con base en la técnica de correlación de imágenes digitales; para lo anterior se hizo con la herramienta del software llamada “Compute Project”.

2.5.3. Procesamiento de datos para el cálculo de módulos micromecánicos

A partir los resultados de los dos procesamientos descritos en las secciones 2.6.1 y 2.6.2 se utilizaron los resultados para el cálculo de los módulos elásticos micromecánicos. A continuación se describirá el método empleado.

En el análisis realizado con el equipo ARAMIS y el software ARAMIS V6.1 se exportaron las tablas que contienen los datos numéricos de las deformaciones principales registradas a lo largo de las secciones de interés dispuestas longitudinalmente a lo largo de la probeta ensayadas; lo anterior se hizo seleccionando el reporte multi-sección previamente y con ayuda de la herramienta “Exportar datos de diagrama” ubicado en el submenú Exportar, tal como se muestra en la figura 2.17a.

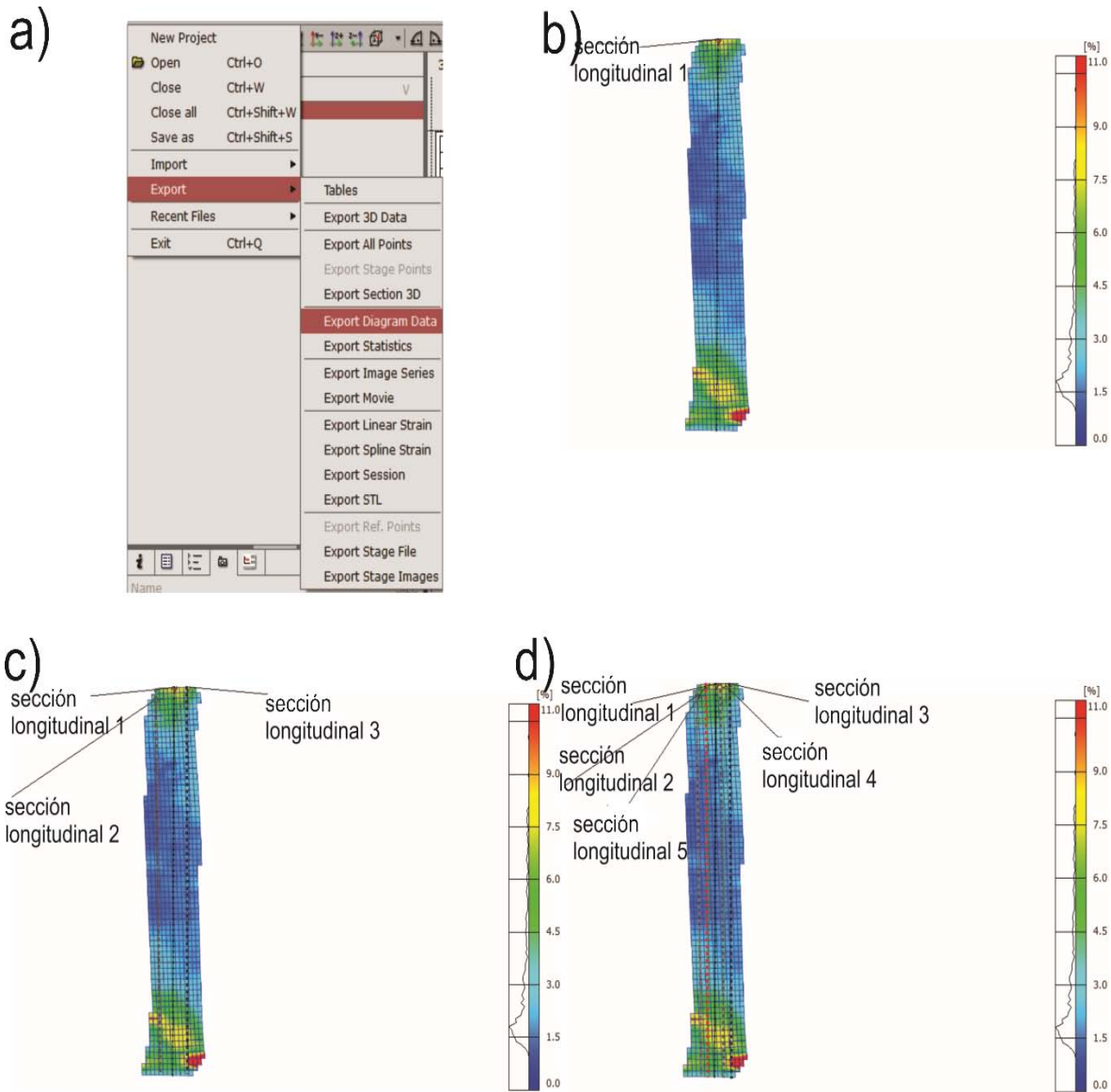


Fig. 2.17 Visualización de la deformación. En la el inciso a se muestra la ubicación de la herramienta Exportar datos de diagrama, esto en el entorno del software ARAMIS V6.1. Los incisos b, c y d corresponden a las probetas con 1, 3 y 5 secciones longitudinales respectivamente evaluadas para definir el criterio de evaluación.

Cabe señalar que se estudiaron y probaron diferentes criterios para evaluar la deformación principal a lo largo de la probeta medida a través de la técnica de correlación de imágenes digitales con el equipo ARAMIS; lo anterior con el fin de obtener un valor con el cual calcular módulo elástico micromecánico.

Se realizó el estudio colocando 5, 3 y 1 secciones longitudinales por probeta realizando un promedio de los valores de la deformación principal registrados a lo largo de dichas secciones longitudinales.

Se analizaron las deformaciones principales a lo largo de las secciones longitudinales de estudio a través de una probeta de cada concentración de hidroxiapatita, es decir se analizó una probeta del PLA 0% HA, una de PLA 2% HA, otra más de PLA 4% HA así como una probeta de PLA 6% HA. Se evaluó el módulo elástico micromecánico con una sección longitudinal, comparándose con el promedio del módulo elástico considerando las deformaciones principales en 3 secciones longitudinales y con 5 secciones longitudinales a lo largo de la probeta y se obtuvo el módulo de Young promedio a nivel micromecánico para cada caso.

Debido a que los resultados de los diferentes análisis fueron muy cercanos uno del otro se concluyó utilizar 1 sección para el resto de las tres probetas ensayadas por cada concentración de HA; con lo cual se reduce el tiempo de procesamiento considerablemente.

El esfuerzo asociado a la deformación fue obtenido a través de la gráfica esfuerzo en función de tiempo asociado; esta curva se calculó con los datos adquiridos en la prueba de tracción, tal como se muestra en la parte superior de la figura 2.18. En dicha curva se localizó el valor en el eje de las ordenadas a un tiempo conocido por el registro en la prueba con el equipo ARAMIS. Tal como se puede observar en la figura 2.18 donde se muestra la región elástica de la curva esfuerzo en función del tiempo se obtuvo el valor del esfuerzo en mega pascales (MPa) para un lapso conocido dado en segundos.

```
curva0atimeData = Take[Apply[{{(#1),  $\frac{(\#3 - \text{Part}[\text{First}[\text{PLAa}], 3])}{(\text{ar0a} * 10^{-6})} * 10^{-6}$  } &, PLAa, 1], {1, 15}];
```

```
curva0atiempo = ListPlot[Take[curva0atimeData, {1, 15}], PlotRange -> All, AxesOrigin -> {0, 0}, PlotStyle -> Hue[0.1], Frame -> True,
  FrameLabel -> {StyleForm["Time (s)", FontSize -> 12], StyleForm["Stress (MPa)", FontSize -> 12]}, Joined -> True, ImageSize -> 72 x 6]
```

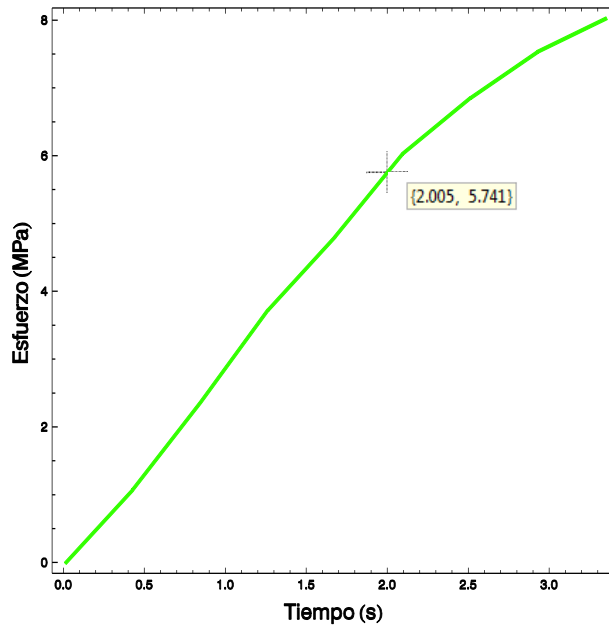


Fig. 2.18 Gráfica del esfuerzo en función del tiempo. Gráfica del esfuerzo en función del tiempo para el PLA 0% HA, donde se muestra en la parte superior el código en Mathematica para dibujar la gráfica de los valores obtenidos.

CAPÍTULO 3 Resultados y discusión.

3.1 Andamios electrohilados

A partir del proceso de electrohilado, previamente descrito en la sección 2.2, se obtuvieron andamios de 10 x 10 cm; dadas las características de la técnica de electrohilado, se concentró el mayor espesor en la parte central del mismo.

En la figura 3.1 se puede observar una fotografía de la orilla del andamio; en la parte superior es posible observar una parte de la lámina de aluminio sobre el cual se colectó, inmediato a ella es posible distinguir algunos cúmulos de microfibras que conforman el andamio colectado.

Cabe señalar que la imagen que se muestra es de un andamio con 4% de HA, aunque a simple vista todos los andamios de las demás concentraciones lucen muy parecidos a la mostrada a la figura 3.1.

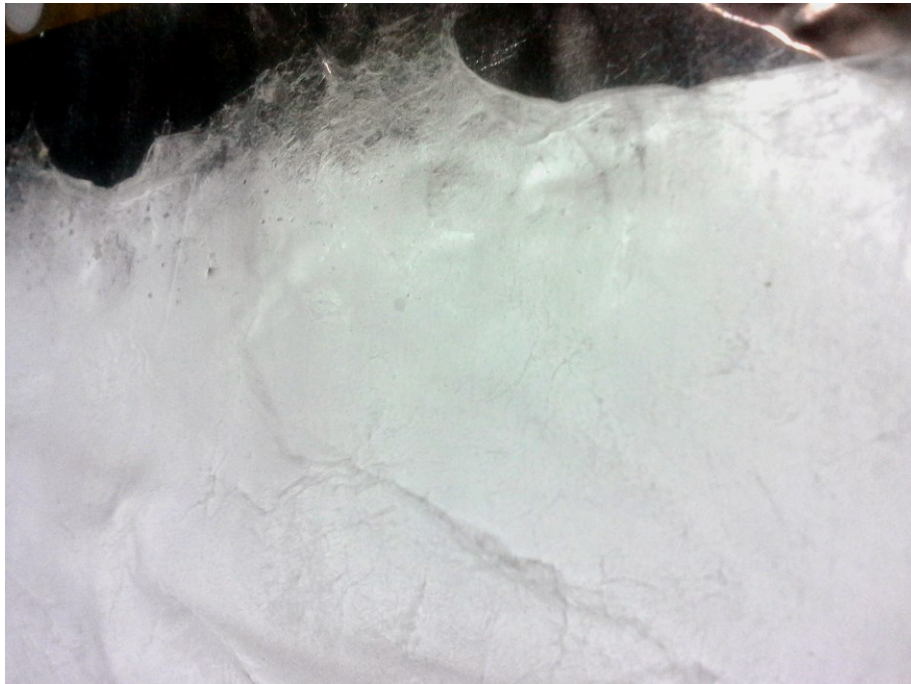


Fig. 3.1 Andamio. Fotografía de la parte extrema del andamio de PLA con 4% de HA.

Durante el proceso de electrohilado de todos los andamios se monitorearon y se registraron los valores de temperatura y humedad relativa con los sistemas previamente descritos. La humedad relativa registrada estuvo en un rango de 14 % a 67 % y una temperatura entre 20 y 25° C; los valores se describen en la tabla 1.

Se sabe que las variables ambientales de la temperatura y humedad afectan directamente en la morfología de las fibras. Ambas variables provocan cambios en espesor de la fibra y a su vez afecta el promedio de los diámetros de las fibras [49].

Tabla 1 Relación Humedad relativa y temperatura durante el procesos de electrohilado para cada concentración de HA

Muestra	Humedad relativa (%)	Temperatura (°C)
PLA 0% HA	44	20
PLA 2% HA	51	25
PLA 4% HA	14	24
PLA 6% HA	63	22

3.2 Morfología de los andamios electrohilados de PLA con HA

En la figura 3.2 se aprecia las micrografías obtenidas a través del microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés) con los parámetros de operación establecidos en la sección 2.3.3.1.

En dichas micrografías es posible apreciar y comparar las diferencias morfológicas entre la constitución de las microfibras de PLA y las mismas fibras después de agregarse hidroxiapatita en concentraciones de 2%, 4% y 6% respectivamente, así como la disposición de los agregados de HA. Los resultados se pueden observar en la figura 3.2.

Es necesario señalar que en el estudio por microscopía electrónica de barrido se usó un detector de electrones retrodispersados para una comparación apropiada entre las micrografías obtenidas; por lo cual los puntos blanquizcos observados en dichas imágenes corresponden a los agregados de HA.

En la figura 3.2a se observa el PLA puro con una disposición aleatoria de las fibras colectadas, generando con ello un traslape entre las fibras que a su vez dan lugar a una porosidad en todo el andamio, este fenómeno es propio del uso de la técnica de electrohilado. También es posible observar una morfología considerablemente

homogénea, con fibras continuas y lisas, sin la presencia de bulbos; también es posible observar diámetros de las fibras homogéneos.

Las figuras 3.2b, 3.2c y 3.2d que corresponden a las micrografías del PLA 2% HA, PLA 4% HA y PLA 6% HA, respectivamente. Los agregados de HA aumentan en función de la concentración de HA, como es de esperar y su disposición es aleatoria sobre las fibras. En la figura 3.2b se observa el PLA 2% HA en donde se observan algunas irregularidades en las fibras que son causadas por esa concentración las partículas de HA se encuentran completamente embebidas.

Para los casos de las figuras 3.2c y 3.2d que corresponden al PLA 4% HA y PLA 6% HA respectivamente pueden observarse que son un poco más homogéneos en diámetro y forma de las fibras, además los agregados de HA aparecen en la superficie de las fibras; lo anterior causado por la saturación al interior de las fibras, y otros menos embebidos dentro de las fibras.

Dados los cambios observados en la morfología de las fibras de PLA debido a la presencia de la HA es necesario conocer el efecto en la resistencia del andamio que causa la presencia de HA. Es necesario conocer si los agregados de HA actúan como refuerzo del andamio o si lo vuelven menos resistente. Dada la escala métrica de fibras y las partículas de HA así como a la complejidad misma del material, es necesario estudios de micromécanica por medio de técnicas no invasivas en los andamios.

Dentro de las técnicas de caracterización micromécanica, la medición óptica sin contacto basada en la correlación digital de imágenes resulta muy adecuada para los andamios. Como se mencionó previamente, esta técnica requiere de un patrón de puntos sobre la superficie del material a ensayar; así que, es indispensable conocer el efecto que provocan los puntos de pintura sobre el comportamiento mecánico de los andamios. Para ello se requirieron estudios de espectroscopia por infrarrojo así como microscopia en los diferentes andamios con estos puntos de pintura.

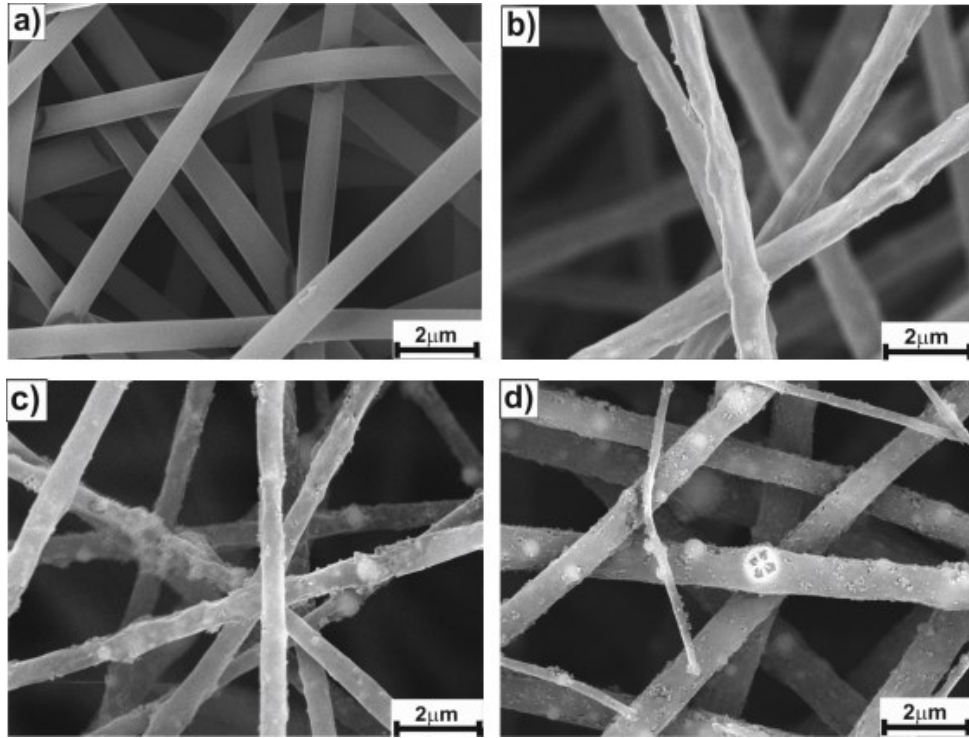


Fig. 3.2 SEM PLA HA. Micrografías tomadas de los andamios electrohilados a 10 kX a 15kV y una distancia emisor-colector de 30 cm, a) PLA 0% HA, b) PLA 2% HA, c) PLA 4% HA, d) PLA 6% HA.

3.3 Morfología de los andamios electrohilados PLA y PLA/HA con patrón aleatorio empleando pintura vinílica

Como parte del análisis del efecto en el comportamiento mecánico de los andamios causado por la presencia de pintura vinílica se estudió su morfología por medio del SEM. La pintura vinílica utilizada es una mezcla compuesta principalmente por poli(acetato de vinilo) (PVA), carbono (C), agua y 2-2-Azobisisobutironitrilo (AIBN) como catalizador; para su aplicación se mezcló con agua y fue agregada en forma de pequeñas gotas sobre la superficie de los andamios a ensayar. Se utilizó un sistema de dispersión de gotas descrito en la sección 2.4.3.

En la figura 3.3 es posible observar los puntos de pintura vinílica en las fibras a diferentes concentraciones de HA en cada andamio electrohilados, es posible observar en las figuras 3.3a, 3.3b, 3.3c y 3.3d la presencia de pintura vinílica en andamios con PLA 0% HA, PLA 2% HA, PLA 4% HA y PLA 6% HA respectivamente. Es posible observar puntos de pintura de un tono de gris más claro, dichos agregados de pintura se encuentran adheridos a las fibras.

En la figura 3.3a se observa una gota de pintura seca de alrededor de 2 μm de diámetro, se observa un ángulo de contacto mayor a 90°. La persistencia de este ángulo después de

secarse sugiere que no existe afinidad química entre la composición de las fibras de PLA con los componentes de la pintura vinílica.

En la figura 3.3b se observa una gota de pintura en la parte central de la micrografía; esta gota se puede apreciar con un tono más oscuro de gris y puede atribuirse a la presencia no homogénea del pigmento en el PVA. Es posible observar una textura claramente arrugada en la gota; este efecto es provocado por la contracción que sufre la gota tras la evaporación del solvente y del agua que contiene la pintura vinílica; lo anterior sugiere que sólo se puede presentar el fenómeno de adhesión mecánica.

La figura 3.3c y 3.3d corresponden a PLA 4% HA y PLA 6% HA respectivamente. En estas micrografías se pueden observar una parte de la gota de pintura vinílica agregada; estas gotas se encuentran en la parte inferior de la imagen. Las gotas de pintura agregadas sobre el andamio deben ser visibles a simple vista para la correcta medición sin contacto de la deformación; por tal motivo, las gotas en la figura 3.3c y 3.3d son considerablemente más grandes que en las figuras 3.3a y 3.3b.

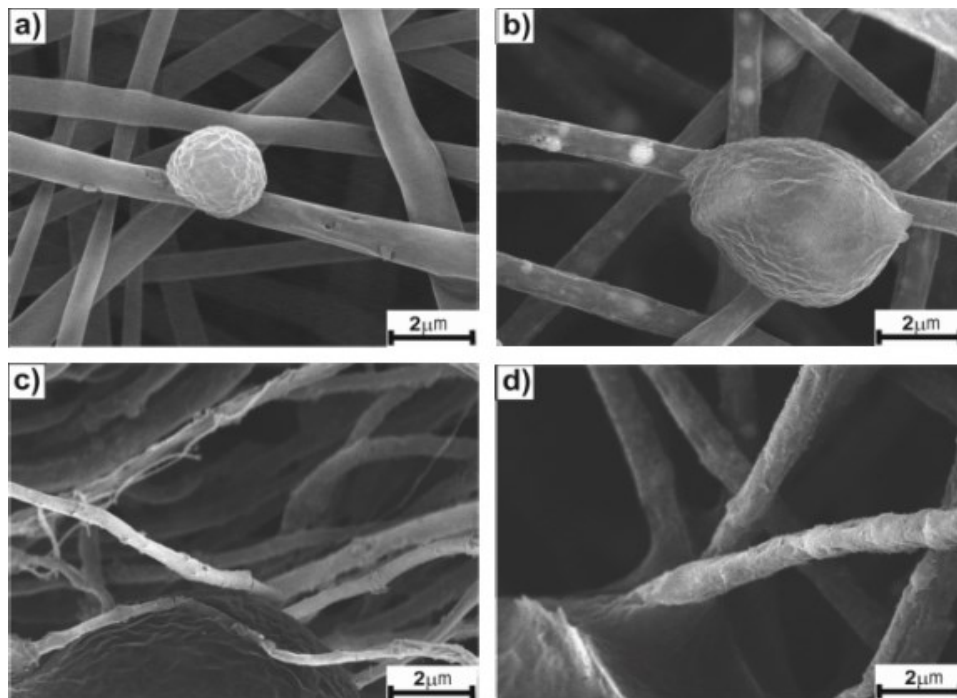


Fig. 3.3 SEM PLA HA con pintura vinílica . Micrografías fibras de PLA con pintura vinílica a) PLA 0% HA, b) PLA 2% HA, c) PLA 4% HA, d) PLA 6% HA.

3.3.1 Determinación de la porosidad y diámetro promedio de las fibras electrohiladas

A partir de estas imágenes de SEM se midió el área porosa y los diámetros de las fibras mediante el uso del software ImageJ® tal como se detalló en la sección 2.3.3.1. Los resultados de las mediciones del área porosa en los andamios así como el diámetro de las fibras se muestran en la figura 3.5a.

A través del análisis de imágenes y tras el procesamiento previamente descrito se obtuvo el porcentaje de área porosa aparente, el cual está en un rango entre 16 a 47% en las diferentes concentraciones de HA; el cambio de valor en porosidad se puede atribuir a las variaciones registradas en las condiciones ambientales durante el proceso de electrohilado. Se registró un promedio de porcentaje de área porosa para el PLA 0% HA de $26.4\% \pm 13.17$, mientras que para el PLA 2% HA se promedió $16.68\% \pm 3.37$, para el PLA 4% HA se registró un área porosa de $46.15\% \pm 11.41$ y finalmente el PLA 6% HA se registró un promedio de $37.85\% \pm 7.49$ de área porosa.

Los distintos niveles de porosidad pueden evidenciar el traslape de fibras que forman el andamio además de la colección de las fibras de manera aleatoria. Los niveles de porosidad y traslape de las fibras dependen de manera directa de las condiciones en que fueron electrohiladas además de las condiciones ambientales tales como la temperatura y humedad que estuvieron presentes durante dicho proceso. También es importante señalar que el porcentaje de porosidad obtenido favorece al crecimiento y migración celular como se reporta en la literatura [32].

En la figura 3.5a en color rojo se puede observar la gráfica comparativa de los diámetros promedios en las diferentes concentraciones de HA; se registró un rango de diámetro entre 0.6 a 0.89 μm y el diámetro promedio de las fibras es de $0.76 \pm 0.38 \mu\text{m}$, observando una desviación estándar considerable entre las mediciones realizadas, lo cual nos habla de variación entre el tamaño de fibra que componen los andamios, este comportamiento en los diámetros de las fibras es propio del proceso de electrohilado. De la misma manera que el área porosa, los parámetros de electrohilado determinan los diámetros de las fibras y sus variaciones en cada andamio.

3.4 Caracterización de mezcla física PLA HA por espectroscopia de infrarrojo

En los análisis realizados con ATR-FTIR se identificaron cada uno de los grupos funcionales que componen los espectros infrarrojos del PLA y HA; con base en lo anterior

se determinó la interacción de ambos componentes en los grupos funcionales de la mezcla física de PLA HA.

En la figura 3.5c se muestra una gráfica comparativa de los diferentes andamios estudiados, es decir PLA y HA así como de las mezclas físicas en las distintas concentraciones. En dicho gráfico se observa en la parte inferior el espectro infrarrojo del PLA, mientras que en la parte superior del gráfico se encuentra el espectro infrarrojo de la HA y en la parte media se encuentran los tres espectros de la mezcla física PLA 2% HA, PLA 4% HA, PLA 6% HA de manera ascendente en el gráfico.

Respecto al espectro infrarrojo del PLA mostrado en color rojo en la figura 3.5c es importante notar la banda a los 1750 cm^{-1} se encuentra el grupo estructural carbonilo (C=O), además se observan tres bandas en el rango de $1300\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ atribuido a los grupos funcionales C-H y CH_3 ; las bandas anteriores son representaciones de PLA y son concordantes con estudios previos [45] además del estudio de Vera-Graziano et al. [44].

En la figura 3.5c se puede observar en la parte superior el espectro infrarrojo de la HA en color gris. El espectro infrarrojo de la HA es coincidente con trabajos previos [47] y dado el parecido se asignó las bandas por grupo funcional se basó en el estudio de Martínez-Valencia [47]. En el espectro se identificaron bandas correspondientes al grupo fosfato (PO_4^{3-}) y el grupo funcional hidroxilo (OH) que son grupos característicos de la HA estequiométrica. Este último a través del oxígeno es posible unir este compuesto de naturaleza inorgánica al polímero orgánico de PLA.

Las vibraciones más representativas para el análisis de la mezcla física de PLA con HA son a los 563 y 602 cm^{-1} se observan al grupo funcional O-P-O en dos distintos modos vibracionales. Por otra parte a los 630 cm^{-1} se localiza el grupo hidroxilo. Estos resultados son coincidentes con estudios previos [49], en la banda 3500 cm^{-1} donde se encuentra el grupo hidroxilo (OH), que evidencia la presencia de HA en el espectro base del PLA; la unión del compuesto hidroxilo con la naturaleza inorgánica del polímero se muestra en el espectro de infrarrojo del PLA mezclado físicamente con 2%, 4%, 6% de HA. Por otro lado en la banda de 1800 cm^{-1} se observa un cambio significativo en el pico correspondiente al grupo funcional C-O de los tres espectros que corresponden a las mezclas de PLA y HA.

Con base en esta caracterización se puede observar los espectros de las mezclas físicas de PLA a las distintas concentraciones de HA con un perfil muy parecido al del polímero base que es PLA; esto se explica dado que el PLA es el elemento base de la mezcla y las concentraciones de HA son considerablemente inferiores en relación peso volumen. En los espectros infrarrojos de las mezclas de PLA y HA se observa en 3500 cm^{-1} la presencia del grupo OH característico de la hidroxiapatita, así como el cambio en el pico a los 1800 cm^{-1}

que corresponde al grupo C-O. Se observa que las características del pico en los 3500 cm^{-1} así como en los 1800 cm^{-1} no varía en los espectros de PLA 2% HA, PLA 4% HA, PLA 6% HA; lo anterior se puede atribuir a que los cambios de las concentración de HA son tan pequeños que se ven reflejados en los espectros. Tras el estudio por electroscopía de infrarrojo para conocer la naturaleza de la interacción entre la partículas de hidroxiapatita y PLA se concluye que no se muestran señales que evidencien una reacción química entre ambos compuestos, presentándose una mezcla física ente el PLA y la HA.

3.5 Caracterización de pintura vinílica en andamios PLA/HA por espectroscopia de infrarrojo

Como parte de la medición de deformación mediante una técnica óptica de no contacto en los andamios de PLA HA se utilizó un patrón de puntos aleatorios hechos con pintura vinílica tal como se ha explicado previamente en la sección 2.4.4. Dada la aplicación de un pigmento al andamio fue necesaria la caracterización por espectroscopia de infrarrojo para conocer el tipo de unión química que pudieran modificar el comportamiento mecánico de los andamios una vez agregado el patrón de puntos aleatorios de pintura vinílica.

Para la caracterización se analizaron muestras de andamios de PLA así como de PLA 2% HA, la pintura vinílica descrita previamente y una muestra de PLA cargada de pintura vinílica.

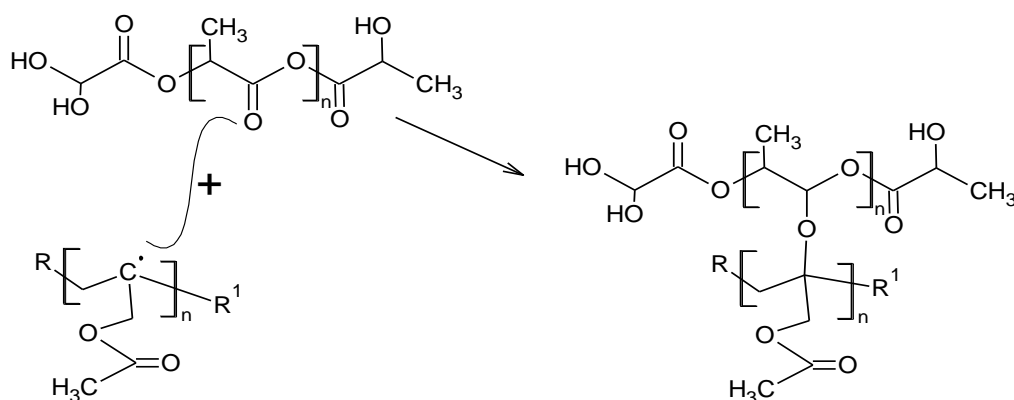


Fig. 3.4 Mecanismo de reacción A la izquierda superior se muestra la representación extendida de la cadena de PLA, en la parte inferior se muestra la molécula de PVA tras la reacción de polimerización y a la derecha se representa la posible reacción química entre el PLA + PVA.

La pintura está formada por una mezcla de acetato de vinilo (VA) más un iniciador (AIBN), un colorante (carbón, el cual puede estar mezclado con carbonato de calcio) y agua.

El VA polimeriza cuando incide sobre ella energía luminosa (luz blanca) suficiente para romper los enlaces del AIBN, cuando este proceso se activa sucede la evaporación de agua dando lugar a la formación del poli(acetato de vinilo) (PVA), el mecanismo de polimerización es a través de radicales libres.

Previamente se estudiaron los posibles mecanismos de reacción entre las diferentes moléculas que componen los andamios con la pintura vinílica. Las reacciones pueden suceder por la presencia del PLA, HA y Poli(acetato de vinilo) (PVA). Dada la disposición de la pintura sobre el andamio, es posible que hayan ocurrido reacciones entre la HA y el PLA, entre el PVA y el PLA, entre el PVA y la HA.

Ante la posible reacción entre el PVA y el PLA a través del mecanismo mostrado en la figura 3.4, se puede observar que en la figura 3.5d, no hay una señal que corresponda a las vibraciones C-O-C, por lo que se puede decir que dicha reacción no existe. En la figura 3.5d se pueden comparar los espectros de infrarrojo del PLA, pintura vinílica y PLA con pintura vinílica.

El mecanismo de reacción entre el PLA y la polimerización de la pintura vinílica (PVA) sugiere que exista una unión química, mientras que los espectros infrarrojos de los mismos materiales no evidencian los grupos funcionales resultantes en el mecanismo de reacción o estos son tan pequeños que no son percibidos mediante la técnica de ATR-FTIR. Dicho lo anterior la unión entre las partículas de pintura y los andamios se puede considerar como un fenómeno de adhesión mecánica que no tendrá una influencia relevante en la medición de propiedades mecánicas.

3.6 Estabilidad térmica por calorimetría diferencial de barrido.

El resultado del análisis térmico se puede observar en la figura 3.5b, donde se señalan las temperaturas de transición vítrea en un rango de 61 a 64 (°C) y una temperatura de fusión de entre 142 a 148 °C; los resultados anteriores son aproximadamente iguales a los reportados previamente [48]. Se observa un ligero corrimiento de ambos parámetros, el cual se puede atribuir a la interacción física del PLA con la hidroxiapatita.

En todas las muestras se observan picos endotérmicos en el rango de los 64 °C; dicho fenómeno se pueden atribuir al rápido proceso de solidificación que sufre el material en el proceso de electrohilado. Por otro lado en la misma figura se pueden observar la presencia de picos exotérmicos en el rango de los 81 a 91 °C en las curvas. Con base a

estos picos se realizó el cálculo de la entalpía (H_{Tc}) y se registró el valor más alto para el PLA puro con 17.3 J/g, para el PLA 2% HA se registró 10.7 J/g, a su vez el PLA 4% HA registró 7.4 J/g y finalmente para el PLA 6% HA se obtuvo un valor para la entalpía de 12.2% HA, lo anterior demuestra que se liberó más energía para PLA en comparación a la energía liberada para el PLA mezclada con HA.

Debido a que los andamios del presente trabajo están diseñados para utilizarse a la temperatura corporal de 37°C no habrá modificaciones estructurales de los andamios en su aplicación de acuerdo con los termogramas presentados en la figura 3.5 b.

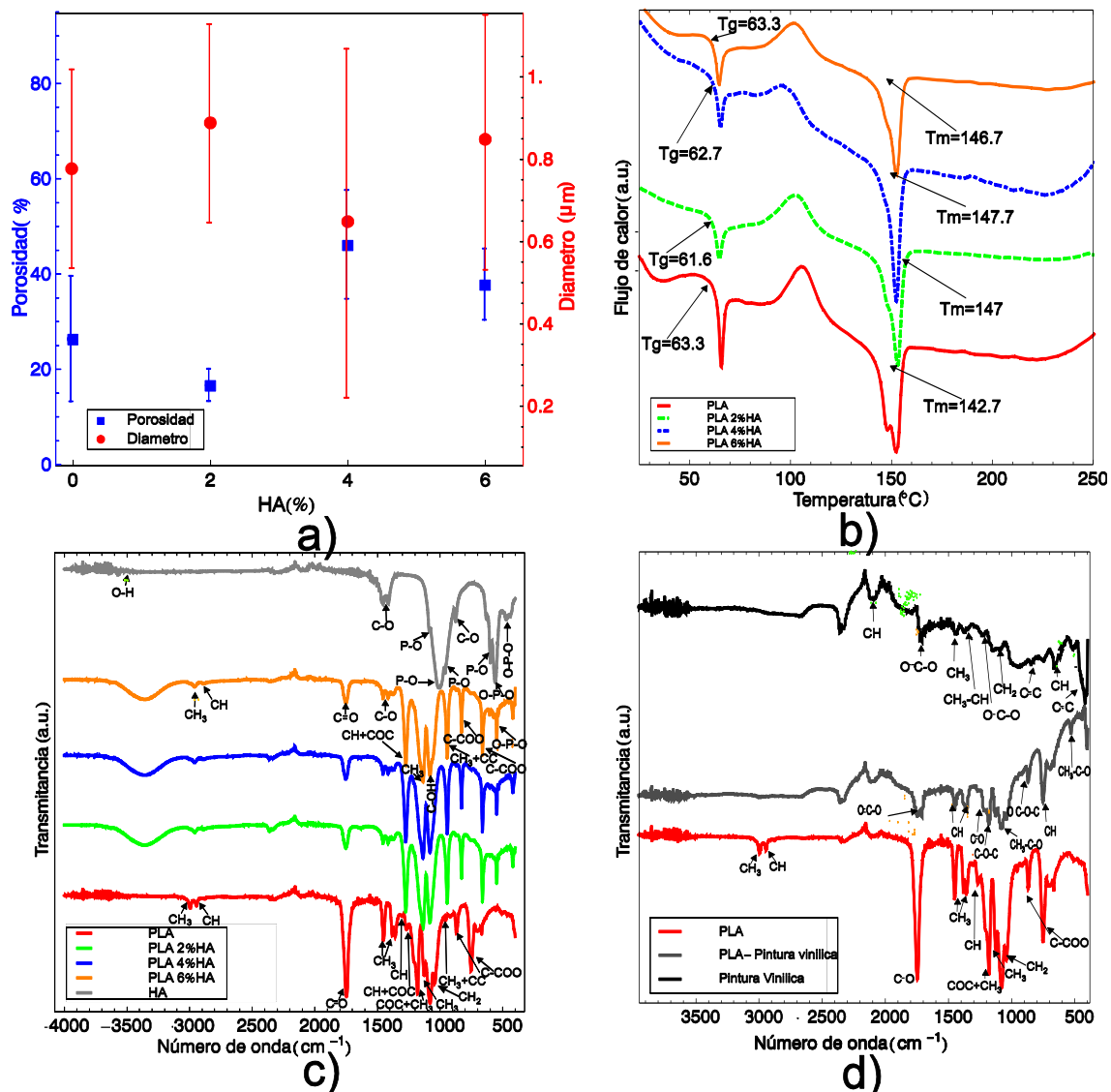


Fig. 3.5 Caracterización física y química Caracterización estructural y térmica del PLA y PLA-HA a) Gráfica de área porosa en los andamios y diámetros promedios de las fibras b) DSC de los diferentes andamios electrohilados c) FTIR de PLA, mezcla física con HA e HA d) FTIR PLA, pintura vinílica y PLA con pintura vinílica.

3.7 Comportamiento macro y micromecánico de los andamios de PLA-HA electrohilados

En la figura 3.6 podemos ver las curvas esfuerzo como función de la deformación para los andamios electrohilados del PLA puro, así como de los andamios de PLA con 2%, 4% y 6% de HA respectivamente. En cada figura se observan tres gráficas que corresponden al ensayo de tracción de tres probetas obtenidas del mismo andamio; es decir, cada concentración de PLA HA se ensayó por triplicado. Esta medición se obtuvo con la máquina universal de ensayos mecánicos de materiales suaves y espesor reducido previamente descrito en la sección 2.4.1, además de un método de procesamiento de los datos explicado en la sección 2.6.1. En todas las concentraciones estudiadas se observa la existencia de una región elástica lineal, lo cual coincide con trabajos previos [3-5]

La figura 3.6a se observan las tres curvas esfuerzo como función de la deformación del PLA con 0% de HA, donde se observan comportamientos desiguales entre el grupo de gráficas pudiéndose explicar debido a las propiedades anisotrópicas de las fibras electrohiladas. Los valores de esfuerzo máximos están comprendidos entre los 9 y 12 MPa. El módulo de elasticidad promedio calculado para el PLA con 0% de HA es de 322.9 ± 36.9 MPa.

En la figura 3.6b puede observarse las curvas esfuerzo en función de la deformación del PLA con 2% de HA. La diferencia entre el comportamiento elástico de las tres curvas se puede atribuir a la presencia no uniforme de las partículas de HA agregadas, este fenómeno está presente también en las concentraciones de 4 y 6% de HA.. Los valores de esfuerzo máximos están comprendidos entre los 3.5 y 8 MPa; mientras que el valor de deformación alcanza el 0.38. El módulo de elasticidad promedio calculado para el PLA con 2% de HA es de 158.7 ± 70.7 MPa.

Por parte de la figura 3.6c, se tiene el diagrama esfuerzo-deformación del PLA con 4% de HA, el módulo de elasticidad promedio es de 208.6 ± 52.8 MPa, la magnitud del esfuerzo máximo se encuentra entre 6 y 8 MPa.

Finalmente en la figura 3.6d se muestran las curvas esfuerzo en función de la deformación del PLA con 6% de HA, para las cuales se registran los valores del esfuerzo máximo entre 6 y 10 MPa y la deformación alcanza el 0.38.

En esta medición a escala macrométrica se obtuvieron los valores del módulo elástico que son más altos para el PLA con 0% HA; lo anterior nos indica que las partículas de HA mezcladas físicamente en las fibras de PLA no mejoran comportamiento mecánico del andamio, a pesar de ser bien conocidos los beneficios en las mismas, las propiedades biológicas del andamio.

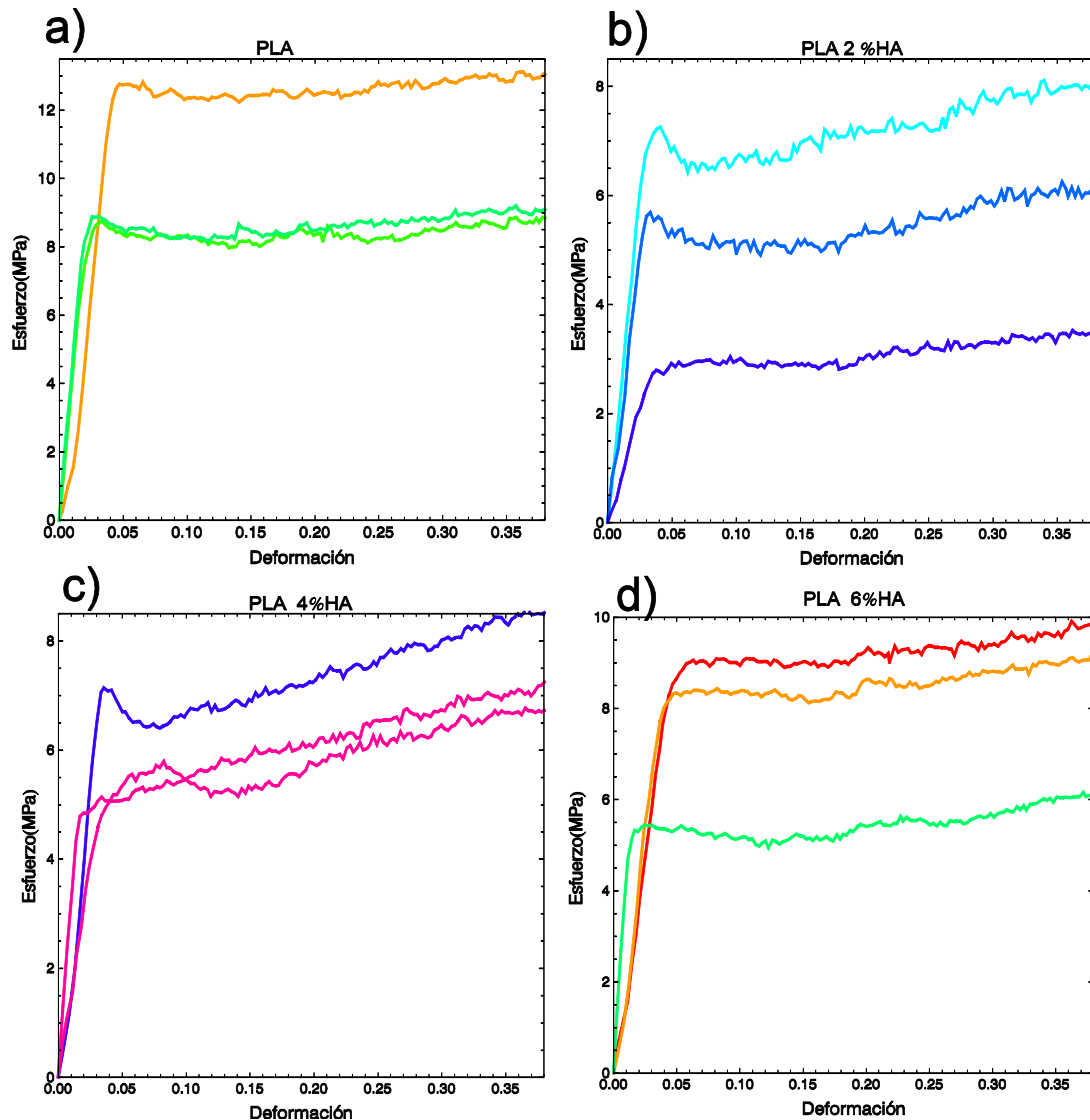
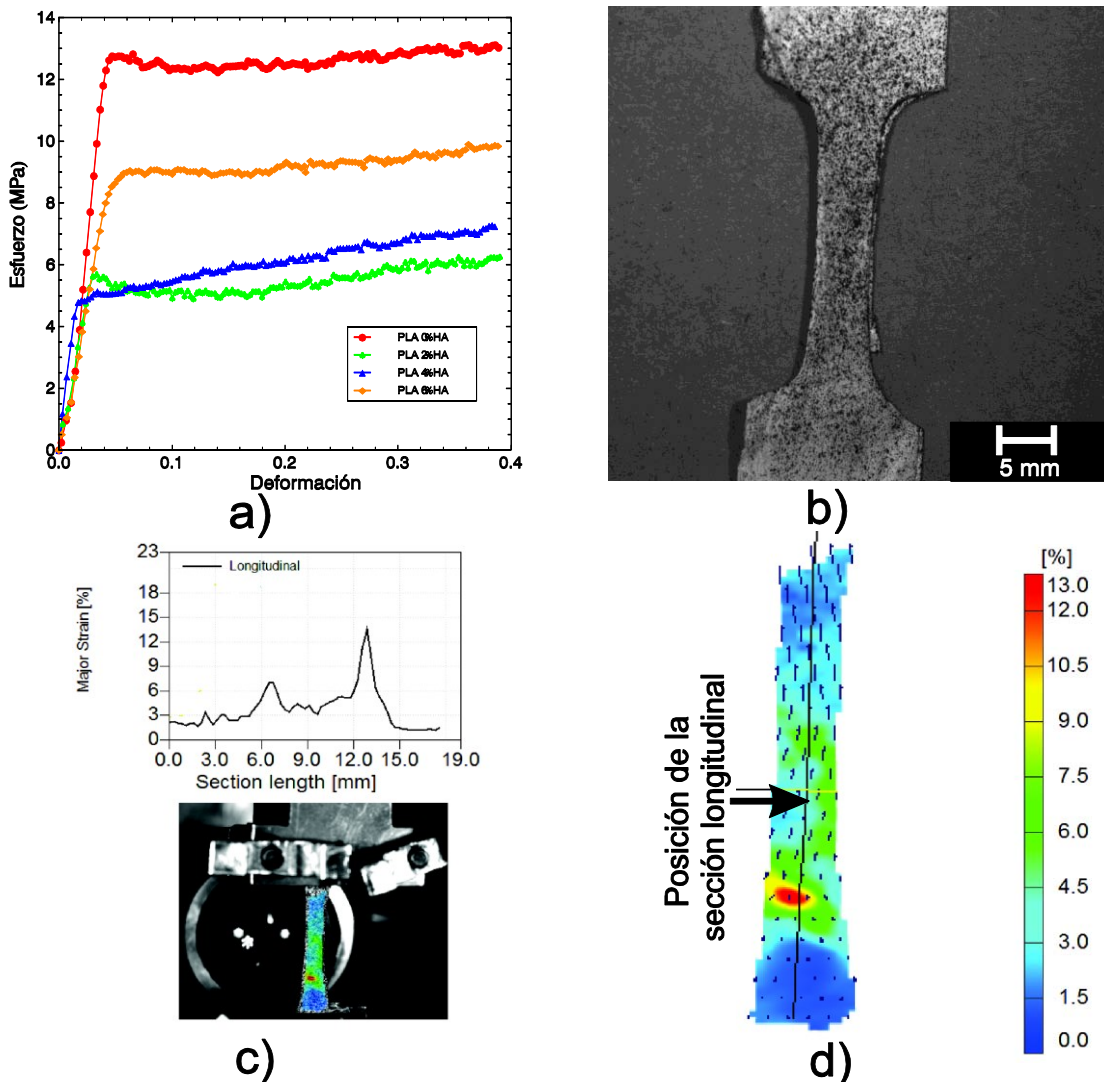


Fig. 3.6 Caso sólido, gráfica de esfuerzo deformación macromecánica. Caso sólido, gráfica de esfuerzo en función de la deformación de a) PLA 0% HA b) PLA 2% HA c) PLA 4% HA d) PLA 6% HA.

Como parte de la caracterización macromecánica, en la figura 3.7a se pueden observar los cuatro casos estudiados, es decir, de andamios de PLA puro, PLA 2% HA, PLA 4% HA y PLA 6% HA y sus respectivas curvas esfuerzo-deformación por triplicado.

La figura 3.7b muestra la fotografía de la probeta preparada con el patrón de puntos aleatorios adecuado para la correlación de imágenes digitales; esta imagen fue tomada con el equipo ARAMIS en prueba estática previa a la realización del ensayo de tracción.

La figura 3.7c muestra un reporte que ofrece el software ARAMIS donde se visualiza una gráfica de deformación contra la sección longitudinal analizada, dicha sección está referida una medición local en una línea de análisis convenientemente elegida a lo largo de la probeta. En la parte inferior de la figura 3.7d se observa una imagen del ensayo de tracción con el reconocimiento del patrón de puntos aleatorios tras la correlación de imágenes digitales.



7 Comportamiento macro y micromecánico de PLA y PLA-HA. a) Gráficas esfuerzo deformación b) Probeta preparada con patrón c) Gráfica de deformación en la sección longitudinal en probeta d) Medición de deformación en probeta.

Debido a la aplicación de crecimiento celular y regeneración de tejido duro que se tiene contemplado para el andamio, solo deberá ocurrir deformación elástica en el mismo cuando sea sometido a tensión. Por lo cual se obtuvieron los esfuerzos de cedencia para cada probeta ensayada; esto a fin de conocer el nivel de esfuerzo para el cual empieza la deformación plástica. En la figura 3.8 se muestran los valores promedio de los esfuerzos de cedencia por cada concentración de andamios probados.

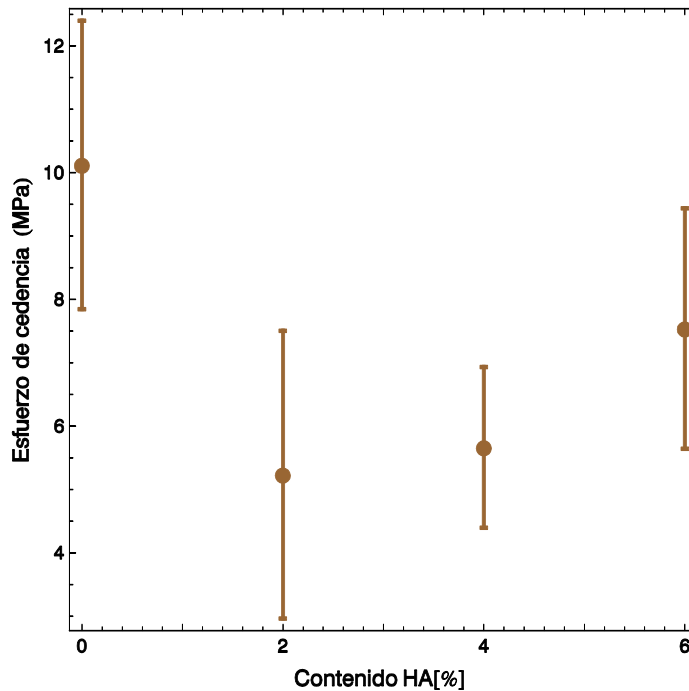


Fig. 3.8 Esfuerzo de cedencia caso sólido. Caso sólido, esfuerzo de cedencia en función de la concentración de HA en los andamios electrohilados de PLA, PLA 2%HA, PLA 4 %HA y PLA 6%HA con sus respectivas barras de desviación estándar.

Se observa que para los andamios de PLA se registró un esfuerzo de cedencia promedio de 10.1 MPa. Mientras que para la mezcla de PLA 2% HA se registró un valor promedio de 5.2 MPa esto es casi de la mitad del PLA sin HA. Para los andamios fabricados con PLA 4% HA se registró el esfuerzo de cedencia promedio de 5.6 MPa, esto es un ligero aumento sobre el promedio del PLA 2% HA. Finalmente para el PLA con 6% HA se registró un esfuerzo de cedencia promedio de 7.54 MPa siendo el valor más elevado para los andamios con HA adicionada.

Es posible comparar los valores de esfuerzo de cedencia obtenidos en el presente con los reportados en el trabajo de Vera Graziano et al. [44]; en dicho trabajo se reporta para el PLA puro un valor de esfuerzo de cedencia de 1.7 ± 0.58 MPa y para el PLA 4 % HA se reporta un valor de 1.54 ± 0.53 MPa.

Existe una diferencia considerable entre ambos valores obtenidos en los ambos trabajos; dicha diferencia se puede atribuir a las variaciones en el proceso de mezcla del PLA y la HA, además de las variaciones entre las condiciones de electrohilado como la velocidad de inyección además de las condiciones ambientales en las cuales se llevó a cabo el proceso de fabricación. Los factores antes mencionados resultan en una variación en las características físicas como la morfología y distribución de fibras que a su vez influye directamente en el comportamiento mecánico.

Los resultados del esfuerzo de cedencia fueron consistentes con la tendencia observada en el módulo elástico de otros obtenidos para en las diferentes mezclas de PLA HA.

3.8 Análisis micromecánico de una sección longitudinal

Para la medición sin contacto de la deformación se utilizó el sistema óptico ARAMIS, previamente descrito. Dado que este tipo de medición no se había llevado a cabo en andamios celulares fue necesario adoptar un criterio para el cálculo del módulo elástico micromecánico. Tal como se explicó en la sección 2.5.3, se evaluaron los resultados obtenidos del módulo de elasticidad micromecánico considerando 1, 3 y 5 secciones. Los resultados se pueden observar en la tabla 2.

Con base a resultados de la tabla 2 se estableció el criterio de utilizar una línea central longitudinal para el análisis del módulo micromecánico.

Tabla 2. Resumen de valores promedios de módulo elástico micromecánico y su desviación estándar para todas las concentraciones de HA

<i>Valor promedio del módulo elástico micromecánico</i>	<i>1 sección MPa</i>	<i>3 secciones MPa</i>	<i>5 secciones MPa</i>
PLA 0% HA	501.87 ± 297.4	508.87 ± 317.5	475.14 ± 325.7
PLA 2% HA	396.9 ± 201.2	356.2 ± 214.3	367.9 ± 214.3
PLA 4% HA	343.1 ± 191.7	357.5 ± 183.8	357.4 ± 200.7
PLA 6% HA	309.2 ± 166.7	321.9 ± 173.5	313.9 ± 170.8

La deformación fue medida con el sistema óptico ARAMIS, una muestra de los resultados obtenidos se encuentra en la figura 3.7d en esta imagen se puede observar la representación de los distintos niveles de deformación en escala de colores que representa un rango de 0-13% de deformación probeta ensayada. La zona color rojo de la probeta representa la concentración en la deformación y según la figura 3.7c esto ocurre a los 13 mm medidos de arriba abajo. Además se encuentra señalada la posición de la sección longitudinal a lo largo de la muestra en la cual se estudió la deformación para todas las probetas ensayadas.

Con la medición en la sección longitudinal de la deformación durante el ensayo de tracción, es decir, la medición de la deformación a distintas magnitudes de carga, se encontró que el comportamiento de la deformación no es homogénea a lo largo de la sección longitudinal como se puede apreciar en la figura 3.6; por otra parte se puede observar que las concentraciones de deformación no son homogéneas, es decir se concentra la deformación principal en distintos lugares a lo largo de la probeta. Cabe señalar que esta deformación tampoco se mantiene constante durante el ensayo de tracción para una misma probeta. Lo anterior se puede apreciar en la figura 3.9, donde se dibuja la gráfica la longitud de la sección longitudinal en milímetros, en el eje vertical se gráfica la deformación y se muestran diferentes niveles de carga. En la figura 3.9a se observa el PLA con 0% de HA, la figura 3.9b corresponde al PLA con 2% de HA así como la figura 3.9c se muestra el PLA con 4% de HA y finalmente se observa la figura 3.9d correspondiente al PLA con 6% de HA.

Este fenómeno se puede explicar por la naturaleza del material ya durante los distintos estados de carga las micro fibras que reciben la tensión son distintas; las primeras fibras donde se concentra la deformación llegan al punto de la deformación plástica y comienzan a recibir la carga otras fibras distintas y así sucesivamente hasta la descarga.

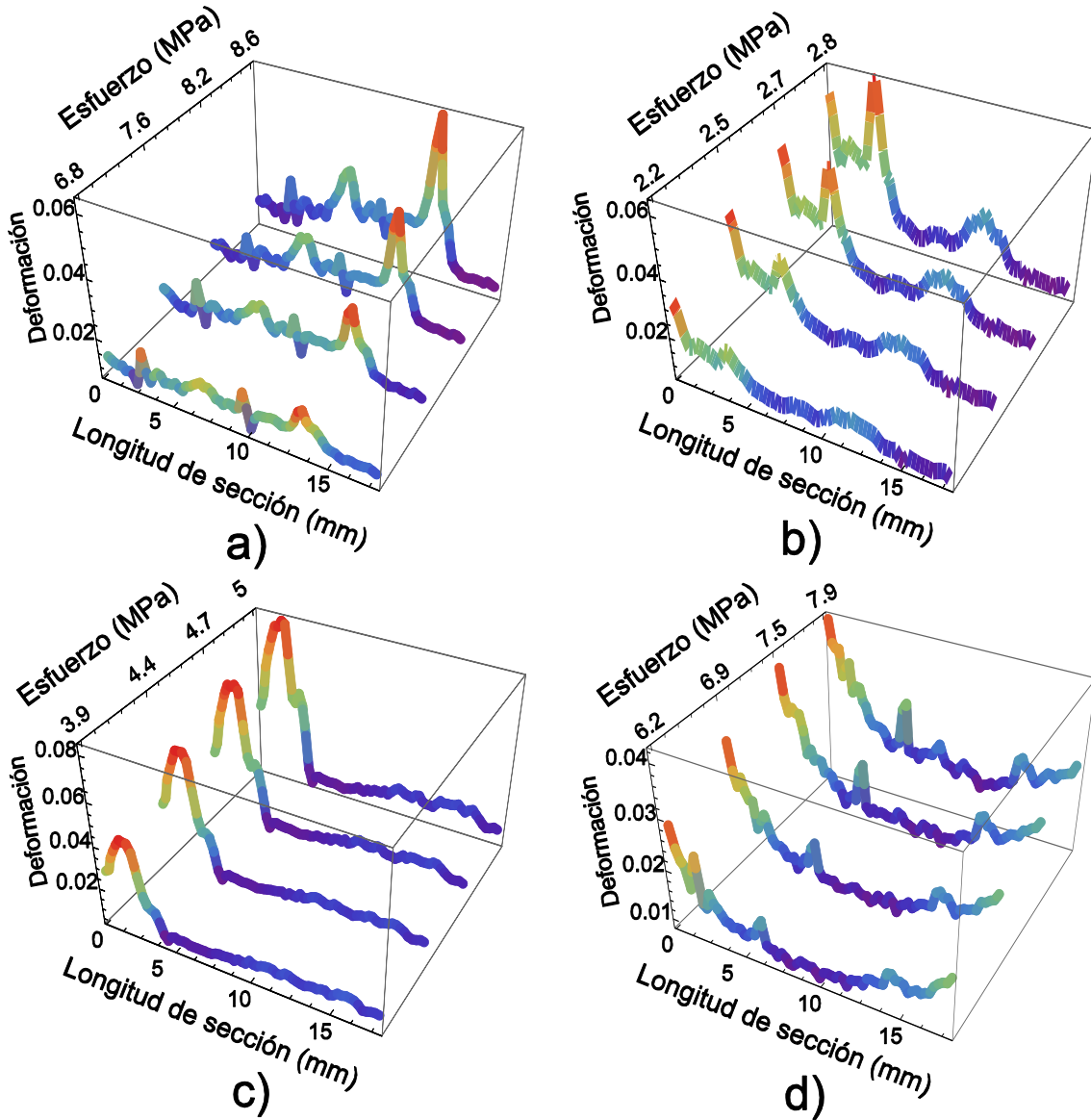


Fig.3.9 Niveles de deformación. Deformación a diferentes niveles de esfuerzo en una sección longitudinal en probeta de a) PLA b) PLA 2% HA c) PLA 4% HA d) PLA 6% HA

3.9 Módulos de elasticidad macromecánico y micromecánico

En la figura 3.10 podemos observar el gráfico comparativo de los módulos elásticos en escala macrométrica y a escala micrométrica en función del aumento en la concentración de HA en el andamio.

Es posible observar el comportamiento de los valores del módulo de Young en ambas escalas, en donde los valores promedios del módulo de elasticidad medidos a escala micrométrica resultan más elevados en una escala de 283 a 419 MPa; mientras que los

promedios de los módulos elásticos a macroescala son menores en un rango de 158 a 322 MPa.

Cabe señalar que se observa una misma tendencia de los módulos elásticos en función de la cantidad de HA presente en ambas mediciones. Esta tendencia tiene como punto máximo el 0% de HA, cae drásticamente al 2% de HA y tiende a incrementarse el valor del módulo elástico al aumentar la concentración de HA, hasta el 6% de HA donde se encuentra el valor máximo para los andamios celulares de PLA HA; este comportamiento puede ser atribuido a que los agregados de hidroxapatita presentes en las fibras actúan como concentradores de esfuerzos y que la distribución de HA no es uniforme encontrándose superficialmente en la fibras de PLA.

Para el presente análisis se reporta la desviación estándar entre los módulos de elasticidad, en la figura 3.10 la desviación estándar está representada por barras. Estas barras no son de tamaño uniforme entre si; este fenómeno se puede atribuir al comportamiento anisotrópico del andamio, además del nivel de traslape entre las fibras y la distribución aleatoria de las partículas de HA. Por otro lado se puede observar que las barras de desviación estándar se juntan entre la escala micro y macromecánica, esto representa que estadísticamente cuando sucede lo anterior no existe una diferencia significativa entre ambas escalas de medición de acuerdo con las desviaciones estándar de cada caso. Aunque siempre es ligeramente mayor el promedio del módulo micromecánico .

Al comparar los resultados del módulo elástico macromecánico con la literatura existente, se encuentran diferencias en los resultados. Xu et al. [7] reporta una tendencia en las propiedades mecánicas distinta a la encontrada en el presente trabajo. Esta diferencia se podría deber al uso de un PLA de características distintas, el uso de disolventes distintos y el uso de diferentes parámetros de electrohilado.

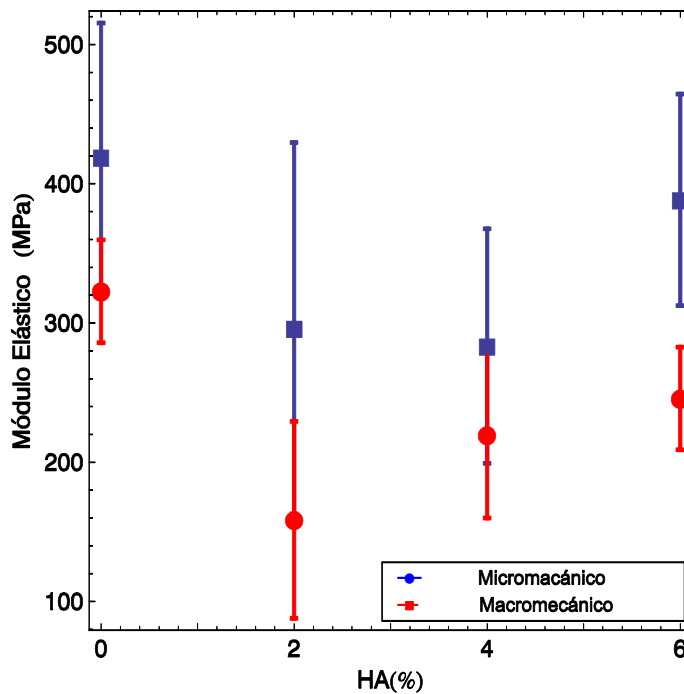


Fig. 3.10 Módulos elásticos micro y macromecánicos. Efecto de la concentración de HA en el módulo elástico en la medición (roja) macromecánica y micromecánica (azul); estos valores se obtuvieron considerando el andamio como un sólido poroso.

3.9.1 Evaluación de la porosidad en el comportamiento mecánico de los andamios

Es bien conocido que los andamios celulares son altamente porosos, por lo que fue indispensable conocer el rango de porosidad en cada mezcla de PLA con HA; la cual se determinó a través de las micrografías tal como se describió previamente en la sección 2.3.3.1. A través del valor promedio de la porosidad obtenido previamente se calcularon los módulos de elasticidad y el esfuerzo de cedencia a fin de conocer la variación de los resultados entre el caso que se considere un material sólido y el caso poroso.

Para el caso del módulo elástico macromecánico considerando la porosidad, se empleó el mismo algoritmo previamente descrito en la sección 2.5.1 con la diferencia de que la sección transversal de la probeta ($I-I_0$) fue calculada considerando el valor promedio de porosidad obtenido para el andamio en cuestión. Es decir se restó el porcentaje del área ocupada por aire.

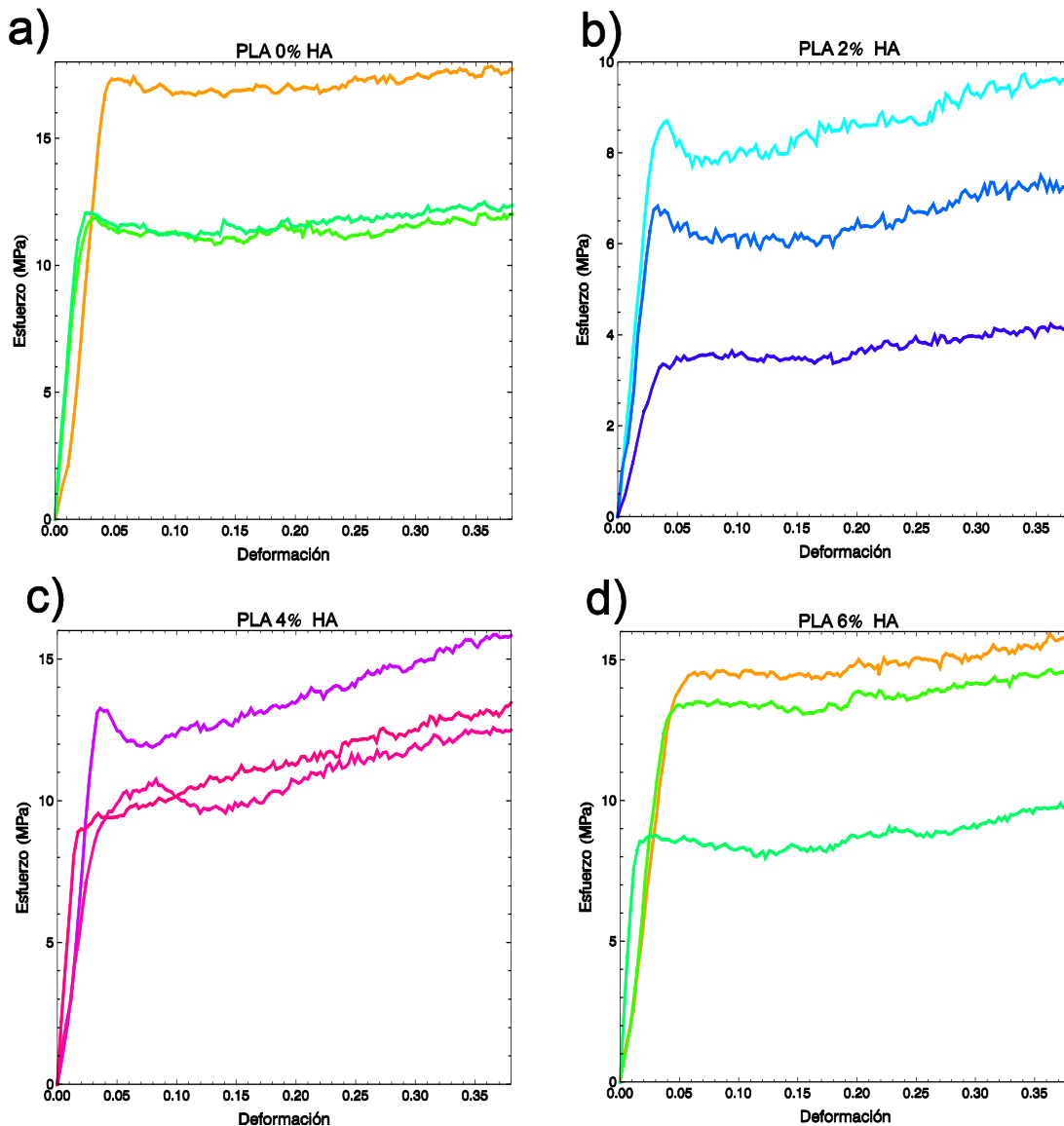


Fig. 3.11 Gráficas esfuerzo deformación caso sólido poroso. Caso sólido poroso, gráficas esfuerzo en función de la deformación considerando la porosidad del andamio celular a) PLA puro, b) PLA 2 % HA, c) PLA 4% HA y PLA 6% HA.

Las curvas de las gráficas esfuerzo en función de la deformación para los diferentes tipos de andamios se pueden observar en la figura 3.11. Se pueden observar en cada inciso, las curvas por triplicado de un mismo tipo de andamio; el PLA puro se encuentra en la figura 3.11a, en la figura 3.11b se muestran las gráficas para el PLA 2% HA, de igual manera la figura 3.11c corresponde al PLA 4% HA y finalmente se pueden observar las gráficas para el PLA 6% HA en la figura 3.11d.

Las gráficas muestran una desviación estándar considerable entre el mismo tipo de andamio ensayado, lo cual se atribuye a la anisotropía del material. Si se comparan con las gráficas de esfuerzo en función de la deformación cuando se considera un material sólido, se observa que las curvas siguen la misma tendencia; la diferencia radica en un aumento en el esfuerzo calculado. Lo anterior afecta directamente en los cálculos para módulo de elasticidad y esfuerzo de cedencia

Los valores promedio de los módulos elásticos así como su desviación estándar para las diferentes mezclas de PLA HA se pueden observar en la figura 3.12. El valor resultante para el módulo de elasticidad del PLA 0% HA fue de 473.9 ± 55.1 MPa, para el PLA 2% HA 190.2 ± 84.9 MPa, en el caso del PLA 4% HA se obtuvo un valor de 384.5 ± 103.26 MPa y finalmente para el PLA 6% HA fue de 395.5 ± 115.3 MPa. Se puede observar un incremento considerable en los valores de los módulos de elasticidad; lo anterior se atribuye a la reducción considerable del área transversal de las probetas utilizadas en el cálculo.

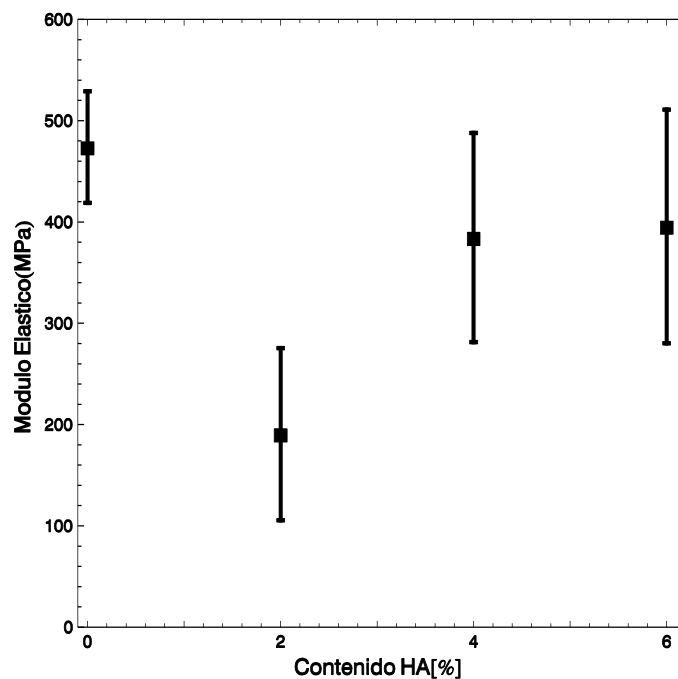


Fig. 3.12 Módulos elásticos macromecánicos caso solido poroso. Gráfica comparativa entre los valores promedio de los módulos elásticos, a nivel macromecánico, para cada tipo de andamio estudiado; aquí se considera la porosidad del andamio celular.

Por otro lado se calculó el valor del módulo elástico micromecánico considerando la porosidad del área transversal del andamio. Para ello se realizó el mismo cálculo descrito previamente con la excepción que se restó el valor del área porosa al área transversal para el valor de esfuerzo.

Los resultados muestran la misma tendencia observada en el módulo elástico macromecánico, aunque los valores del módulo elástico micromecánico resulta más elevado en comparación a la consideración del caso sólido. En la figura 3.13 se pueden observar los valores promedios del módulo de Young micromecánico considerándose la fracción porosa del andamio celular.

En los resultados se puede apreciar nuevamente que el valor máximo lo tiene el PLA 6% puro de 625 ± 122 MPa, seguido por el PLA puro con 581 ± 150 MPa; al aumentar la concentración de HA se observa una caída drástica para el PLA 2% HA que registró un valor de 355 ± 104 MPa; con la tendencia de aumento de la HA se observa una mejora en el módulo elástico ya que para el PLA 4% HA se registró un valor de 526 ± 156 MPa.

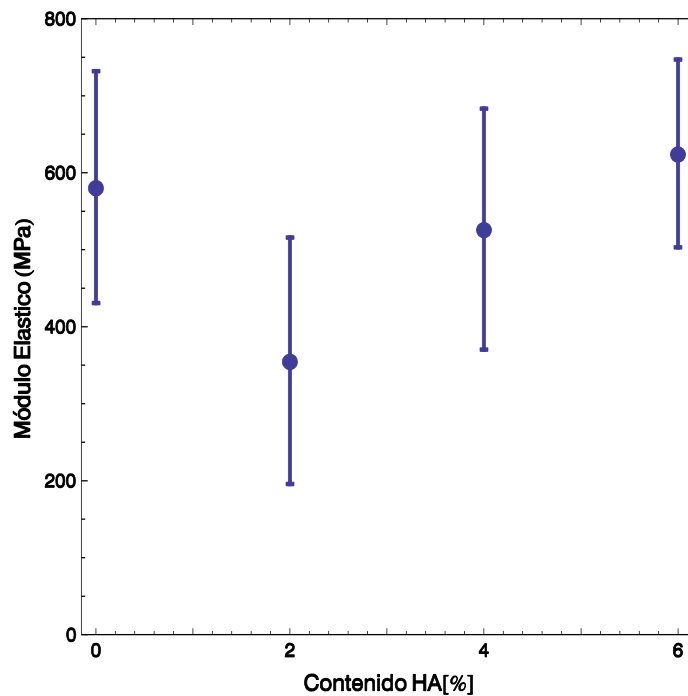


Fig. 3.13 Módulo elástico micromecánico caso solido poroso. Caso poroso, valores promedio para el módulo elástico micromecánico considerando la porosidad de los andamios en función al aumento de concentración de HA.

En la tabla 3 se pueden observar la influencia de la porosidad en el módulo elástico para cada andamio celular; se puede observar el módulo de elasticidad micromecánico a la izquierda así como los cálculos obtenidos del módulo elástico macromecánico a la derecha; en ambos casos se puede observar que la consideración de la porosidad en el área transversal de la probeta eleva los valores en ambos casos.

Tabla 3. Valores del módulo elástico micromecánico y macromecánico en el análisis donde se considera al andamio como un sólido y el caso donde se toma en cuenta la porosidad del andamio.

Andamio	E_{MICRO} caso sólido	E_{MICRO} caso poroso	E_{MACRO} caso sólido	E_{MACRO} caso poroso
PLA 0% HA	419.3 ± 96 MPa	581 ± 150 MPa	322.9 ± 36.9 MPa	473.9 ± 55.1 MPa
PLA 2% HA	296.3±133.4 MPa	355 ± 104 MPa	158.7 ± 70.7 MPa	190.2 ± 84.9 MPa
PLA 4% HA	283.6 ± 84.2 MPa	526 ± 156 MPa	208.6 ± 52.8 MPa	384.5±103.3 MPa
PLA 6% HA	388.6 ± 75.9 MPa	625 ± 122 MPa	245.9±71.53 MPa	395.5±115.3 MPa

Como complemento para el análisis se estudió el efecto de la porosidad para el cálculo del esfuerzo de cedencia; como se dijo anteriormente, dicho valor cobra relevancia al considerar que en la aplicación del andamio no se llevará al punto donde fallaría por cedencia.

A continuación en la figura 3.14 se observan los valores resultantes en el esfuerzo de cedencia considerándose como material poroso. En la figura se muestran el valor promedio así como la desviación estándar de las tres probetas de la misma especie que fueron medidas. Se observa que para el PLA puro se tiene registra un valor promedio en esfuerzo de cedencia de 13.7 ± 3.07 MPa, mientras que para el PLA 2% HA se muestra un valor 6.3 ± 2.7 MPa, por parte del PLA 4% HA podemos observar un valor de esfuerzo de cedencia de 10.5 ± 2.3 MPa y finalmente para el PLA 6% HA se registró 11.09 ± 4.8 MPa. Tal como sucede con en el cálculo anterior en los módulos elásticos también se ve muestra un incremento de manera considerable que se atribuye a la reducción del área transversal de la probeta.

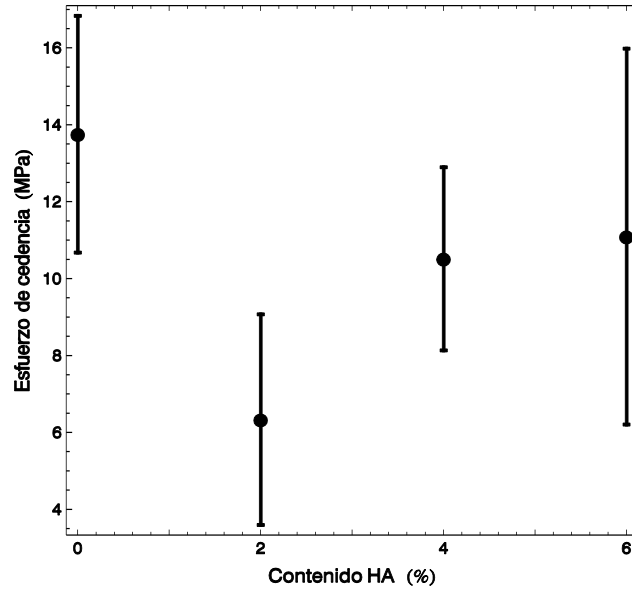


Fig. 3.14 Esfuerzo de cedencia caso solido poroso. Esfuerzo de cedencia para las diferentes mezclas de PLA HA considerada la porosidad del andamio celular, se muestra el valor promedio y las barras de desviación estándar.

La técnica de medición indirecta del área porosa de los andamios utilizada en el presente trabajo se considera una aproximación para la contabilidad del área porosa y limitada para efecto de la repetitividad y reproducibilidad. Los factores de la técnica utilizada que afectan directamente la medición son el uso de un solo plano focal en las imágenes obtenidas del microscopio, la variación del resultado según las características de la micrografía (contraste, nitidez, etcétera).

Debido al uso de una técnica de medición indirecta de la porosidad, la aproximación obtenida de esta no se considera lo bastante sólida para considerar certeros los cálculos de módulo de elasticidad y esfuerzo de cedencia en el caso de un material solido poroso.

La consideración del área porosa del material afecta críticamente los resultados de las pruebas mecánicas, por lo que se debe tener especial cuidado en la técnica para la determinación de la porosidad en el andamio.

Conclusiones

En este estudio fueron desarrollados exitosamente andamios de PLA mezclados físicamente con 0%, 2%, 4% y 6% de hidroxiapatita (HA) mediante la técnica de electrohilado. Se obtuvieron las características de morfología, porosidad y resistencia mecánica adecuadas para que los andamios elaborados tengan uso potencial en ingeniería de tejidos. Los parámetros seleccionados para el electrohilado permitieron obtener andamios adecuados.

La presencia de la mezcla física de la hidroxiapatita en las fibras de PLA se evidenció por los estudios de infrarrojo y calorimetría, además de los estudios por microscopía electrónica de barrido. Los agregados de HA no modificaron considerablemente las propiedades térmicas del andamios aunque sí se modificó la morfología de las fibras; se registraron más irregulares en el diámetro de las mismas.

Se logró establecer el proceso idóneo para aplicar el patrón de puntos aleatorios adecuado para la medición de deformación sin contacto; esto mediante un pincel de cerdas finas y cortas. Además se comprobó que no se hallaron evidencia de un enlace químico entre los andamios electrohilados y la incorporación de la pintura vinílica (patrón aleatorio de puntos). Este resultado validó el uso de la técnica de correlación de imágenes digitales (CID) en este tipo de materiales; ya que hasta donde se sabe es la primera vez que se realizan este tipo de mediciones en andamios electrohilados de PLA. El tamaño, distribución y contraste de los puntos en el patrón aleatorio influyeron directamente en la precisión de la medición y fueron indispensables para una buena medición de la deformación en los andamios electrohilados.

Mediante la medición sin contacto de la deformación, se encontró que la deformación no es uniforme a lo largo de la probeta existen zonas de mayor deformación. Estos puntos de concentración de la deformación varían a diferentes estados de carga. Lo anterior se atribuye a la naturaleza anisotrópica del material y a las contribuciones de las inclusiones de HA.

Los andamios de PLA puro o 0% de HA presentaron módulos elásticos más elevados en comparación con los andamios que se mezclaron físicamente con HA; lo anterior puede deberse al efecto de las partículas de HA, las cuales se incrustaron en las fibras. Lo anterior afectó la morfología de las nanofibras, haciéndolas irregulares; logrando así, que los agregados de hidroxiapatita actuaran como concentradores de esfuerzo. Con ayuda del microscopio electrónico de barrido se constató que las partículas de HA se depositaron en la superficie de las nanofibras además que los andamios con 2% de HA resultaron particularmente más irregulares que el resto; lo anterior lleva a pensar que a concentraciones bajas de HA se obtienen fibras más irregulares y al aumentar la concentración se consigue una saturación ideal. Una variable importante a considerar dentro del proceso de electrohilado es la humedad relativa, la cual probablemente modifica el comportamiento mecánico del andamio.

Los módulos elásticos micromecánicos resultaron en un rango, para el caso sólido, entre 283 a 419 MPa y para el caso poroso 355 y 621 MPa, los cuales resultan más elevados que los módulos de elasticidad macromecánicos con valores para el caso sólido entre 158 MPa a 322 MPa y para el caso poroso 190 y 473 MPa. Esta diferencia se puede atribuir a las condiciones de medición para cada escala, para la medida macromecánica se consideraron esfuerzos y deformaciones ingenieriles mientras que para la medición micromecánica se consideraron deformaciones locales en cada faceta de 19 píxeles cuadrados.

El traslape de las nanofibras generó un área porosa en cada andamio celular que fue considerada en este estudio. Esta medida resulta importante para el cálculo certero del área transversal de la probeta en relación con la determinación de módulos elásticos. Dadas las limitaciones técnicas, la medición se realizó de manera indirecta a través de micrografías y se obtuvieron valores comparativos de la fracción del área porosa del andamio. Por lo que se recomienda el uso de tecnologías avanzadas capaces de realizar mediciones exactas y precisas del área porosa existente en cada andamio celular.

La técnica de correlación digital de imágenes constituye una de las técnicas ópticas de mayor potencial para su uso en biomateriales, poniendo de manifiesto la viabilidad de la aplicación en andamios electrohilados de la técnica de correlación digital de imágenes.

Bibliografía

- [1] Yaszemski, M. J., Oldham, J. B., Lu, L., Currier, B. L., —Bone Engineering, 1st Ed, Em squared, Toronto, 2000.
- [2] Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., Guillemain, G., —Tissue-engineered bone regeneration, Nat. Biotech., 18:9 959-963, 2000.
- [3] Williams D.F., —Bone Engineering, 1st Ed, Em squared, Toronto, 2000.
- [4] Hong Z, Qiu Xu, Deng M, Chen X, Jing X. Grafting polymerization of L-lactide on the surface of hydroxyapatite nano-crystals. Polymer 45 pp 6699-6706. 2004
- [5] Catherine P. Barnes. (2007) “Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds” Department of Biomedical Engineering, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23284-3067, USA.
- [6] Ryuji, I., Masaya, K., Seeram R. (2005). Structure and properties of electrospun PLLA single nanofibras. Nanotechnology 16 p.p 208–213.
- [7] Xu X. Xuesi C, Aixue L, Zhongkui H, Xiabin J. Electrospun poly(L-lactide)-grafted hydroxyapatite/poly(L-lactide) nanocomposite fibers. European Polymer Journal 43 (2007) 3187–3196.
- [8] Lim, C.T., Tan, E., Characterization of bulk properties of nanofibrous scaffolds from nanomechanical properties of single nanofibers. Wiley InterScience (2006)
- [9] Baji A, Mai W. Y, Wong C. S, Abtahi M, Chen P. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. Composites science and technology; 2010;
- [10] Lim, C.T., Tan, E., Ng, S. Y., (2008). Effects of crystalline morphology on the tensile properties of electrospun polymer nanofibers. Applied physics letters 92, pp 1- 3. doi: 10.1063/1.2857478
- [11] Sánchez-Arévalo, F.M., García-Fernández, T., Pulos, G., Villagrán- Muniz, M., 2009. Use of digital speckle patten correlation for strain measurement in a CuAlBe shape memory alloy. Mater. Characteriazation. 60, 775782.
- [12] Skalak R, Fox F. C., Eds., Tissue Engineering (Liss, New York, 1988); R. M. Nerem, Ann. Biomed. Eng. 19, 529 (1991).
- [13] Vacanti JP, Vacanti CA The history and scope of tissue engineering. Principles of tissue engineering, Academic Press, San Diego.
- [14] Langer, R., and Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. Science 260, 920–926.

- [15] Chiu, R. C. (2003). Bone-marrow stem cells as a source for cell therapy. *Heart Fail. Rev.* 8, 247–251.
- [16] Hubbell, J. A. (1995). Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology (N. Y.)* 13, 565–576.
- [17] Shin, H., Jo, S., and Mikos, A. G. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 24, 4353–4364.
- [18] Wang M. Composite scaffolds for bone tissue engineering. *American journal of biochemistry and biotechnology* 2(2) 80-84 2006.
- [19] Lannutti J. et al Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials Science and engineering* 504-509 2009.
- [20] Yang S., Leong, K.F., Du, Z., Chua, C.K., —The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors, *Tissue Eng.* 7:6, 679-689, 2001.
- [21] Salgado A.J. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular bioscience.* 743-765, 2004.
- [22] Davies, J.E., —Mechanisms of endosseous integration, *Int. J. Prosthodont.*, 11:5, 391-401, 1998.
- [23] Stylianopoulos T, Bashur C, Goldstein A, Guelcher S, Barocas V. Computational predictions of the tensile properties of electrospun fibre meshes: Effect of fibre diameter and fibre orientation. *The journal of the mechanical behavior of biomedical materials I*; 2008; 326-335.
- [24] Mikos, A.G., Thorsen, A.J., Czerwonka, L.A., Bao, Y., Langer, R., Winslow, D.N., Vacanti, J.P., "Preparation and Characterization of Poly(L-Lactic Acid) Foams Polymer", 35:5, 1068-1077, 1994.
- [25] Kim, B.S., Mooney, D.J., "Engineering smooth muscle tissue with a predefined structure", *J. Biomed. Mat. Res.*,41:2, 322-332, 1998.
- [26] Holly, C.E., Schoichet, M.S., Davies, J.E., —Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: Investigating initial cell-seeding density and culture period, *J. Biomed. Mat. Res.*, 51:3 376-382, 2000
- [27] Fong H, Reneker DH. Electrospinning and formation of nanofibers. In: Salem DR, editor. *Structure formation in polymeric fibers.* Munich: Hanser; 2001. p. 225–46..
- [28] Formhals A. Process and apparatus for preparing artificial treads. U.S. Patent 1,975,504. October 1934.
- [29] Liu GJ, Ding JF, Qiao LJ, Guo A, Dymov BP, Gleeson JT, et al. Polystyrene-block-poly (2-cinnamoyl ethyl methacrylate) nanofibers-Preparation, characterization, and liquid crystalline properties. *Chem-A European J* 1999;5:2740–9

- [30] Thompson C.J Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer* 48 (2007) 6913-6922
- [31] Vallet Regí María. Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos,
- [32] Salgado A.J, Coutinho O.P, Reis R.L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromolecular Bioscience*, volume 4, pages: 743-765, in 2004.
- [33] Yoneyama S. et al. Digital Image Correlation. *Experimental mechanics*
- [34] ARAMIS User Manual- Software. GOM, 2007.
- [35] Sánchez-Arévalo F.M Pulos G. The micromechanical behavior of lyophilized glutaraldehydetreated bovine pericardium under uniaxial tension. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. (2010),.
- [37] Jerabek M. Major Z. Lang R.W. Strain determaintaion of polmeric materials using digital image correlation. *Polymer Testing*. 2010. 407-4016.
- [38] Godara A, Raabe D. Influence of fiber orientation on global mechanical behavior and mesoscale strain localization in a short glass-fiber-reinforced epoxy polymer composite during tensile deformation investigated using digital image correlation. *Composites Science and Technology* 67 (2007) 2417–2427
- [39] Collins R.T, Jones J, Harris M, Osman A. Basaran. Electrohydrodynamic tip streaming and emission of charged drops from liquid cones. *Purdue News Service*. (2008)
- [40] López-Alba E., Díaz F. A., Dorado R, López-García R. Análisis de deformaciones en probetas planas mediante correlación digital de imágenes. XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Mecánica Ciudad Real, España (2010) 139-148.
- [41] Zheng-Ming H, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites” *Tongji University, Shangai China* (2008).
- [42] Wang M. et al. Manufacture and evaluation of bioactive and biodegradable materials and scaffolds for tissue engineering. *J Mater Sci:Mater Med*, 12:855-860.
- [43] Barton A. *Handbook of solubility parameters and other cohesion parameters*. CRC Press. Boca Raton, 1991
- [44] Vera-Graziano R, Maciel-Cerda A, Vera R et al. E. V, Ospina A, Gomez-Pachon E.Y. Modified polylactide microfiber scaffolds for tissue engineering. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 1376 Materials Research Society* (2012)
- [45] Pamula E., et al. FTIR study of degradation products of aliphatic polyesters-carbon fibres composites. *Journal of Molecular Structure* 596. (2001) 69-75

- [46] Briones-Herrera J. C., Cuando-Espitia N., Sánchez-Arévalo F. M., Hernández-Cordero J. Evaluation of mechanical behavior of soft tissue by means of random laser emission. *Review of Scientific Instrument.* 84, 104301 (2013).
- [47] Martínez-Valencia A.B., et al. Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada: estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis. *Superficies y Vacío.* 2008, 21, 18-21
- [48] Gomez-Pachón E. Y, Sánchez-Arévalo M. F, Sabina J. F, Maciel-Cerda A., Montiel Campos R, Batina N, Morales Reyes I, Vera-Graziano R. Characterisation and modelling of the elastic properties of poly(lactic acid) nanofibre scaffolds. *Journal of Mater Science* (2013)
- [49] C. Guo, X. Guo, N. Cai, Y. Dong, Novel fabrication method of porous poly(lactic acid) scaffold with hydroxyapatite coating, *Materials Letters* 74 (2012) 197 -199.
- [49] Vrieze De S, Van Camp T, Nelvig A, Hangstrom B, Westbrook P, De Clerck K, The effect of temperature and humidity on electrospinning. *J Mater Sci* (2009) 44:1357–1362