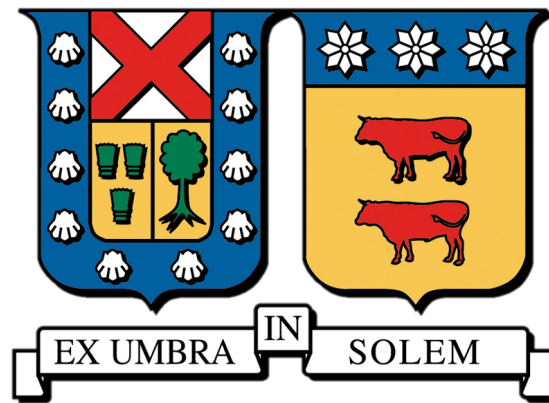


Higromecánica de Nanofibras Electrohiladas de Poli Vinil Alcohol

Sebastián Véliz Rojas

Tesis de grado de Licenciatura en Ciencias Mención Física

Abril, 2023



Profesor Guía:
Comité Evaluador:

Dr. Tomás P. Corrales
Dra. Valeria Del Campo
Dr. Carlos García

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por su constante soporte desde siempre, y por supuesto durante este proceso, es gracias a su apoyo que he empezado y terminado esta licenciatura.

Quiero agradecer a mi profesor guía, el Dr. Tomás P. Corrales, quien ha sido una influencia fundamental en mi formación como científico y como persona. Su motivación y pasión por la física son contagiosas, y su capacidad para enseñar desde la práctica y el experimento ha sido gravitante en mi desarrollo como estudiante e investigador. Agradezco especialmente que siempre me haya brindado una oportunidad y me haya invitado a formar parte de su grupo de investigación, donde he tenido la oportunidad de aprender y crecer como científico. La realización de esta tesis es un reflejo de la orientación y el apoyo de su mentoría, y espero seguir contando con su guía y mentoría en el futuro.

Asimismo, deseo expresar mi gratitud a mis compañeros de aula y de laboratorio, Benjamin Schleyer y Diego Jaramillo, con quienes hemos formado un grato y amigable ambiente en el laboratorio; A Nicole Orellana por su ayuda y paciencia al preparar las muestras de nanofibras, además de enseñarme a usar los equipos necesarios para esto, su apoyo fue fundamental para realizar los experimentos de esta investigación.

A mi profesor de física del colegio, Pablo Pino, quien me mostró y enseñó la física mucho antes de que pensara en estudiar la licenciatura.

A mis amig@s, quienes siempre me han dado palabras de apoyo y ánimo, especialmente en los momentos más difíciles, mención honrosa a Tomás K., Carla D., Gabriel D., a Sergio G. y a Felipe C.. A mi compañera del amor, Melinka, que ha sido una gran inspiración y soporte en esta etapa de mi vida.

Quiero agradecer especialmente a Alexandra Elbakyan por abrir las puertas del conocimiento y acercar la literatura científica a todo aquel que le interese y necesite.

Por último, se agradece el apoyo de ANID a través del proyecto Fondecyt Regular 1211901 "*Multiscale Mechanical Properties of Hygroscopic Nanofibers*", y al Núcleo Milenio NanoBioFísica NNBP NCN2021 021.

Dedicatoria

*Este trabajo no esta dedicado a otra que a la **Duquesa Keyra**.*



Duquecita

Resumen

En el presente trabajo se exponen los principales resultados de los experimentos de análisis higromecánicos de nanofibras de Poli Vinil Alcohol (PVA). Para esto se implementó una cámara de humedad acoplada a un Microscopio de Fuerza Atómica (e-AFM). Con este montaje se determinó experimentalmente el módulo de Young radial y las propiedades mecánicas de las nanofibras en condiciones de humedad variable. Las nanofibras se fabricaron utilizando la técnica de electrohilado. La investigación demuestra que es factible realizar mediciones de fuerzas a humedad variable en nuestro e-AFM. Los resultados preliminares indican que el módulo de Young incrementa de 90 (MPa) a 200 (MPa) al variar la humedad relativa de la cámara de 70 % a 3 %. Sin embargo, quedan muchas cosas por mejorar del diseño experimental que podrían aumentar la relevancia de los resultados obtenidos.

Abstract

In this work, the main results of hygromechanical analysis experiments on Polyvinyl Alcohol (PVA) nanofibers are presented. For this purpose, a humidity chamber coupled to an Atomic Force Microscope (AFM) was implemented. With this setup, the radial Young's modulus and mechanical properties of the nanofibers under variable humidity conditions was experimentally determined. The nanofibers were fabricated using the electrospinning technique. The research demonstrates that it is feasible to measure forces under variable humidity in our e-AFM. The preliminary results indicate that the Young's modulus increases from 90 (MPa) to 200 (MPa) as the relative humidity of the chamber varies from 70 % to 3 %. However, there is still much room for improvement in the experimental design that could enhance the relevance of the obtained results.

Índice

1. Introducción	2
1.1. Ciencia de Materiales	3
1.2. Propiedades de los Materiales	7
1.3. Antecedentes Experimentales	9
1.3.1. Electrospinning	9
1.3.2. Microscopio de Fuerza Atómica	10
1.4. Antecedentes Teóricos	12
1.5. Avances Recientes en Nanofibras de PVA	14
1.6. Objetivos y Resultados Esperados	16
2. Metodología	17
2.1. Preparación de muestras	18
2.2. Caracterización AFM	20
2.3. Cámara de Humedad	22
3. Resultados y Análisis	23
3.1. Análisis Mecánicos AFM	25
3.1.1. Curvas de Fuerza	26
3.1.2. Mapas de Fuerza	29
3.1.3. Mapas de Adhesión	31
3.1.4. Análisis de Densidades	32
4. Conclusión y Proyecciones	35
5. Referencias	36

Página dejada en blanco intencionalmente.

1. Introducción

Una condición para el desarrollo de nuevas tecnologías es la búsqueda de materiales óptimos con requerimientos y aplicaciones cada vez más específicos. La ciencia de materiales tiene un rol importante en lo que respecta a la tecnología en general, porque es la disciplina científica dedicada al estudio de la estructura, propiedades y procesamiento de los materiales, entre los que destacan las categorías de los metales, los cerámicos, los polímeros, materiales compuesto o materiales biológicos, entre ellos, madera y tejidos. Esta disciplina tiene por objeto la producción de materiales más sofisticados y especializados, para ello se requiere conocer, predecir y modificar las propiedades -mecánicas, magnéticas, eléctricas, higroscópicas- de los materiales.

De entre los materiales estudiados por la ciencia de materiales, los polímeros son de especial interés por características como su ligereza y resistencia. Estas propiedades le otorgan una amplia popularidad a estos materiales, al nivel de que, en la actualidad, su extenso uso ha provocado problemas medioambientales [1]. Químicamente, los polímeros son macromoléculas que tienen una estructura repetitiva donde la unidad que se repite se denomina monómero. En la naturaleza es común encontrar polímeros de origen biológico, por ejemplo las proteínas presentes en todos los seres vivos. Por otra parte están los polímeros sintéticos, macromoléculas artificiales que dan origen a diversos materiales con muchas aplicaciones. Los polímeros sintéticos se caracterizan por su durabilidad, flexibilidad, dureza y resistencia (mecánica y química). Además, estos materiales se pueden diseñar específicamente para cumplir con un propósito determinado. Las aplicaciones de los polímeros sintéticos son muy amplias, desde su masificación, han reemplazado a otros materiales en diversos usos, como el metal, la madera, textiles, entre otros. La larga durabilidad de algunos polímeros sintéticos se debe a que, al no estar presentes en la naturaleza, no existen los mecanismos metabólicos para poder degradar estos materiales, convirtiéndolos en prácticamente eternos.

Un polímero sintético que si es biodegradable es el **Alcohol Polivinílico** (PVA, por sus siglas en inglés). El PVA es soluble en agua pero insoluble en solventes inorgánicos, con una baja toxicidad y es ampliamente utilizado, lo que lo hace un interesante objeto de estudio [2]. Dentro de lo que se estudia en un material de este tipo son sus características estructurales y cómo se comporta bajo diferentes situaciones. También es importante la escala de tamaño en la que se analiza el material, la cual puede abarcar la macro, meso, micro y nano escala. Cambios estructurales en alguna de estas escalas que pueden tener efectos considerables en cómo se comporta el material.

Las propiedades de interés en un material, son las propiedades mecánicas y químicas. Desde la física se estudian las primeras, que están relacionadas a cómo se comporta el material ante la acción de fuerzas, ya sea de compresión, de corte o de estiramiento. Una propiedad mecánica central en este estudio es el **módulo de Young**, o módulo de elasticidad. El módulo de Young es una medida de la rigidez del material y se define como la relación entre el cambio de longitud y el estrés al que es sometida una muestra de material.

En esta investigación se han estudiado nanofibras individuales de PVA, específicamente, se ha medido experimentalmente el módulo de Young de las nanofibras y cómo varía al cambiar las condiciones de humedad relativa.

Para fabricar las nanofibras se utilizó la técnica **electrospinning**, esta técnica consiste en disparar un delgado chorro de solución polimérica utilizando una jeringa y una alta diferencia de potencial eléctrico. En el proceso de electrohilado se evapora el solvente, quedando una nanofibra de polímero que se deposita en una placa colectora.

Para medir experimentalmente el módulo de Young de nanofibras individuales se ha utilizado un **Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)**, un equipo de la familia de los microscopios de escaneo por sonda (SPM) que consiste en una pequeña aguja (nanométrica) que interactúa con la muestra y la escanea generando una imagen 3D de la superficie. Y para poder efectuar mediciones a distintas condiciones de humedad se ha implementado un sistema con una cámara de humedad.

1.1. Ciencia de Materiales

En la historia de la ciencia y del desarrollo del pensamiento científico, se han consolidado tres grandes ramas de las ciencias naturales: la biología, la química y la física. A medida que se estudia y se profundiza más en los fenómenos se hace necesario seguir seccionando en ramas cada vez más específicas. Sin embargo, para generar aplicaciones prácticas con estos conocimientos tan específicos, muchas veces hay que trabajar en conjunto con otras áreas, entonces surgen áreas investigativas que son interdisciplinarias.

La ciencia de materiales es una de estas ramas multidisciplinarias que integra química y física, pero también, ingeniería. Dentro de los materiales estudiados están los metales, aleaciones, polímeros, materiales biológicos y biomateriales. En los dos últimos casos también se integran áreas como la biología y la bioquímica. El objetivo de la ciencia de materiales es comprender la relación entre la estructura y las propiedades de los materiales, para luego optimizar, diseñar y crear materiales nuevos para las aplicaciones requeridas. Para estudiar la estructura y las propiedades de los materiales a nivel atómico y molecular se utilizan diversas técnicas experimentales, como microscopía (óptica y de barrido), difracción de rayos X, espectroscopia y simulación computacional.

Ingeniería de Tejidos

Una rama multidisciplinaria que se relaciona estrechamente con la ciencia de materiales es la ingeniería de tejidos, que es el área de investigación científica que busca cultivar tejido y órganos funcionales artificiales principalmente para la medicina regenerativa. Dentro del área, hay investigaciones que proponen que la producción de carne *in vitro* tiene ventajas como ser más nutritiva, causar menos impacto ambiental y por supuesto, no producir sufrimiento animal [3].

La ingeniería de tejidos toma elementos de biología celular, bioquímica y ciencia de materiales. Una de las grandes técnicas de la ingeniería de tejidos es la utilización de andamios, llamados "*Scaffolds*", como matrices físicas donde cultivar las células bajo los estímulos correctos para que se diferencien y formen el tejido deseado. Los andamios deben tener una morfología que permita la transferencia de nutrientes y que las células se asienten, una forma de conseguir estas morfologías es mediante la utilización de nanofibras [4].

Los biomateriales que componen estos "*Scaffolds*" deben ser biocompatibles, no tóxicos para las células correspondientes, y poseer propiedades mecánicas similares a las del tejido deseado. Además, deben permitir la eliminación del scaffold sin dañar el tejido ya desarrollado. Existen polímeros sintéticos que cumplen con estas condiciones y se usan como base para fabricar andamios [5].

Polímeros

Los polímeros son macromoléculas largas con una estructura química repetitiva cuya unidad base se denomina monómero. Los monómeros son moléculas medianas o pequeñas que forman enlaces covalentes entre sí, las cuales van formando moléculas más grandes y complejas. Si polímero esta constituido únicamente por un tipo de monómero se denomina "monopolímero", mientras que cuando esta hecho de dos o más tipos de monómeros se conoce como "copolímero". La principal característica de las cadenas de polímero es que forman enlaces covalentes, fuertes, en la dirección de la cadena, mientras que hacia los lados pueden formar enlaces débiles tipo Van der Waals o de hidrógeno, estos enlaces, aunque no son estructurales, pueden darle más rigidez a un material. El proceso químico por el que se producen comúnmente estas moléculas se conoce como polimerización, y se pueden formar cadenas o redes tridimensionales de polímero, así, se pueden clasificar por su forma estructural como se muestra en la figura 1. Otra forma de clasificar los polímeros es por sus propiedades en tres categorías; *termoestables*, *gomosos* y *termoplásticos*. Estos últimos (termoplásticos) estando separados en otras dos categorías, cristalinos y amorfos (no cristalinos).

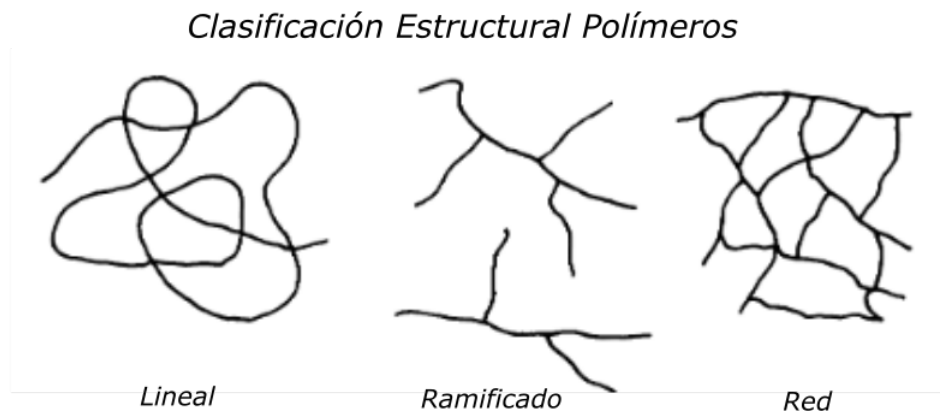


Figura 1: Principales clasificaciones de estructuras poliméricas.
Figura adaptada de [6].

Los polímeros termoestables suelen ser los más rígidos, insolubles y se degradan ante el efecto del calor, no se funden. Esto se debe a que su estructura es densa y principalmente de tipo red tridimensional, lo que significa que hay enlaces covalentes en todas las direcciones (enlaces cruzados).

Los polímeros gomosos pueden ser deformados o estirados ante la aplicación de una fuerza, pero recuperan su forma rápidamente al soltar la fuerza, esta propiedad elástica es muy importante y se explica en que existe una densidad media de enlaces cruzados, que permiten que las moléculas se deslicen entre ellas ante la presencia de una fuerza externa, pero no de manera permanente. Estos materiales también se conocen como elastómeros.

Los polímeros termoplásticos, comúnmente conocidos sólo como plásticos, son materiales moldeables y deformables que se funden ante la aplicación de calor ya que su estructura es lineal y/o ramificada. Además, los materiales termoplásticos se pueden clasificar entre aquellos que cristalizan al enfriar y aquellos que no. La cristalización de los polímeros depende de varios factores, pero destacan el grado de ramificación estructural y la regularidad de las moléculas. Sin embargo, los polímeros cristalinos no son 100 % cristalinos, todos tienen algún grado de amorfismo y son semicristalinos. Los polímeros termoplásticos son los más usados en la actualidad [6].

Poli(Vinil Alcohol)

El material de interés de este estudio es el Alcohol PoliVinílico (PVA, por sus siglas en inglés). Es un polímero sintético con propiedades útiles, como la solubilidad en agua y su toxicidad prácticamente nula, biocompatibilidad, además del hecho de ser un material biodegradable [2][7]. Por estas características este polímero es ampliamente utilizado en diversos rubros como el textil, el alimentario, la industria del papel, de adhesivos, la industria farmacéutica y la biomédica, entre otros. El PVA fue sintetizado por primera vez en 1924 por Willy O. Hermann y Wolfram Haehnel.

El PVA es un polímero termoplástico semi cristalino que se puede presentar en diferentes morfologías microscópicas que resultan en distintas propiedades macroscópicas. En adición, el PVA se puede mezclar con otros polímeros en la búsqueda del material óptimo para distintas aplicaciones. Algunos de los materiales con los que normalmente se mezcla el PVA son quitosano, almidón, ácido poliláctico (PLA) y óxido de polietileno (PEO) [8].

Membranas compuestas de nanofibras de PVA ofrecen una gran alternativa para el diseño de biomateriales ya que maximizan considerablemente la superficie por volumen de material y permiten modular la porosidad. Estas características morfológicas, sumadas a las características químicas mencionadas anteriormente convierten a las membranas de nanofibras de PVA en excelentes matrices de crecimiento celular ("scaffolds"), en ingeniería de tejidos [9].

Químicamente, la estructura del monómero Alcohol de vinilo es $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]$ (FIG. 2) y las propiedades fisicoquímicas del PVA dependen del número de grupos hidroxilos presentes en el polímero. El PVA no se produce vía polimerización de los monómeros ya que el alcohol de vinilo es inestable por naturaleza, su producción para fines comerciales se utiliza acetato de vinilo como materia prima y sintetiza el PVA mediante un proceso llamado saponificación, donde el grupo ester del acetato de vinilo es reemplazado parcialmente por grupos hidroxilos en un ambiente acuoso de hidróxido de sodio [10].

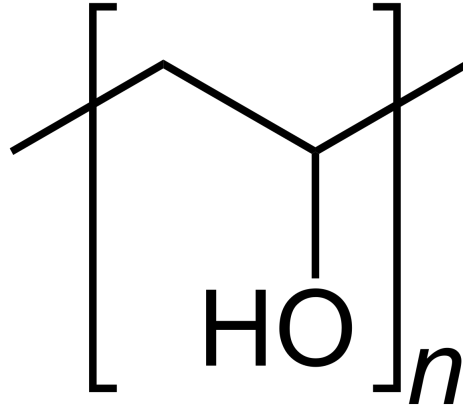


Figura 2: *Diagrama de la formula química de un monómero de PVA. Esquema tomado de Wikipedia.*

Las propiedades físicas del PVA como la densidad, cristalinidad, solubilidad, flexibilidad y dureza dependen del grado de hidrólisis, la masa molecular y la humedad. La cristalización y las propiedades elásticas del PVA se deben a los enlaces hidrógeno entre las moléculas de polímero. La temperatura de transición vítrea del PVA está entre los 75 y 85 °C. [11].

1.2. Propiedades de los Materiales

Se pueden encontrar varias categorías de propiedades que pueden caracterizar y estudiar los materiales, como propiedades eléctricas, magnéticas, térmicas, aislantes. Dependiendo del enfoque, se pueden definir categorías específicas, en esta investigación se han estudiado las propiedades mecánicas e higroscópicas.

Higroscopía

La higroscopia es la propiedad física que tiene un material de tomar humedad del medio hasta alcanzar un equilibrio, esto ocurre entre sustancias en distinta fase. Este trabajo se centra en la interacción entre las moléculas de agua del aire (gas) y un material sólido (nanofibras individuales). Este proceso ocurre principalmente mediante enlaces de hidrógeno y puede afectar las propiedades de superficie y de volumen del material. A pesar de que no existe una definición cuantitativa universal de higroscopía, en general, Un material es más higroscópico cuanto más capacidad de retener la moléculas de agua, tanto dentro del material (absorción) como en su superficie (adsorción). Sin embargo, existe un intento por establecer criterios cuantitativos para clasificar los materiales de acuerdo a su higroscopia. Callahan et al. (1982) proponen cuatro categorías, basándose en el contenido de humedad en equilibrio de un material tras una semana a un determinado valor de RH [12].

Clase I - No higroscópico: Prácticamente no se registra aumento de humedad que ocurra en humedades relativas inferiores al 90 %. Además, el contenido de humedad es inferior al 20 % después de una semana por encima del 90 % de RH.

Clase II - Ligeramente higroscópico: Prácticamente, no hay aumento de humedad que ocurra en humedades relativas inferiores al 80 %. El contenido de humedad es inferior al 40 % después de una semana por encima del 80 % de RH.

Clase III - Moderadamente higroscópico: El contenido de humedad no sobrepasa el 5 % en humedades relativas inferiores al 60 %. El contenido de humedad es inferior al 50 % tras una semana por encima del 80 % de RH.

Clase IV - Muy higroscópico: Puede ocurrir aumento de humedad en humedades relativas tan bajas como 40 a 50 %. El contenido de humedad puede superar el 30 % después de una semana por encima del 90 % de RH.

La sorción de vapor de agua por sólidos ocurre principalmente a través de enlaces de hidrógeno, mediante una variedad de modos dependiendo de la forma termodinámica y dinámica del sólido. Los diferentes modos de sorción de agua se pueden dividir en tres categorías: adsorción, licuefacción y absorción.

La adsorción es la humedad que un material sólido puede retener en su superficie. La adsorción depende principalmente de la polaridad de los grupos químicos superficiales y del área superficial disponible. El agua puede acumularse en la superficie a través de enlaces de hidrógeno hasta un máximo de unas pocas capas moleculares. Aunque las propiedades generales no se ven afectadas cuando ocurre la adsorción, las propiedades superficiales del sólido pueden ser significativamente alteradas.

La licuefacción de agua en la superficie del material sólido puede ocurrir por dos mecanismos, deliquescencia y condensación capilar. La deliquescencia ocurre con materiales solubles en agua, cuando la humedad relativa supera la RH de una solución saturada del material, ocurre una licuefacción espontánea con la subsiguiente disolución del sólido. Sin embargo, el agua adsorbida por debajo de la RH de la solución saturada no causa disolución del sólido, pero puede afectar las propiedades superficiales. La condensación capilar puede ocurrir a humedades relativas inferiores al 100 % en sólidos con poros de dimensiones nanométricas, donde la curvatura del espacio confinado, la presión capilar y una presión de vapor relativa reducida, provocan una fuerza motriz en las moléculas de agua. Este comportamiento se ha reportado en sólidos porosos como el carbono y sílice, así como en los puntos de contacto entre partículas granulares.

La absorción es forma más importante de sorción de vapor de agua en materiales farmacéuticos de moléculas pequeñas, el agua penetra en el interior del sólido. En cristales, la absorción puede resultar en la formación de hidratos estequiométricos o no estequiométricos. En sólidos amorfos, la absorción ocurre de manera continua con cambios en la humedad relativa, los efectos más significativos son un aumento en el volumen libre, la disminución en la temperatura de transición vítrea y un aumento en la movilidad molecular, lo que puede llevar a una disminución en la estabilidad física y química del sólido. En ambos casos (cristalino y amorfo), la absorción puede afectar significativamente las propiedades termodinámicas y mecánicas del sólido [13].

Propiedades Mecánicas

Las propiedades mecánicas son las características de los materiales que describen su comportamiento en respuesta a fuerzas y deformaciones. Estas propiedades incluyen la dureza, la elasticidad, la viscosidad, entre otras. La dureza se refiere a la resistencia a la raya, la elasticidad es la capacidad de un material para recuperar su forma original después de ser deformado, la viscosidad es una propiedad física característica de todos los fluidos y es una medida de la resistencia a las deformaciones.

Módulo de Young

También conocido como módulo de elasticidad, es una propiedad mecánica que sirve para medir la resistencia a la deformación de un material. Se define como la razón entre el estrés (fuerza por unidad de área) y la deformación resultante (cambio de longitud dividido por la longitud original). Los materiales más rígidos y resistentes a las deformaciones tienen un mayor valor para su módulo de Young que un material más elástico, o más propenso a deformarse. El módulo de Young es una cantidad escalar y en el sistema internacional de unidades se mide en Pascales (Pa).

Para medir experimentalmente el Módulo de elasticidad se realizan experimentos de compresión, estiramiento y de fuerzas cortantes. Dependiendo del material y el tamaño de la muestra, esto puede ser complejo. En general, lo que se hace son curvas de fuerza, es decir, registrar y graficar la fuerza en función de la deformación de un material elástico. La gráfica resultante se ajusta a una recta, de este modo el módulo de Young es proporcional a la pendiente de esa recta.

Para realizar curvas de fuerza a una nanofibra de 100 nanómetros es necesario tener un equipo muy preciso, el microscopio capaz de esto es el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM).

1.3. Antecedentes Experimentales

1.3.1. Electrospinning

Electrospinning es una técnica para fabricar micro y nanofibras a partir de soluciones poliméricas. La técnica consiste en bombear un caudal constante de solución de polímero por la aguja de una jeringa, la cual está conectada a una fuente de alto voltaje y a una placa colectora (FIG. 3). El alto voltaje genera un campo eléctrico e ioniza la solución, provocándose una fuerza sobre esta hacia la placa colectora. Cuando el campo eléctrico alcanza un valor crítico, las fuerzas eléctricas superan a las fuerzas de tensión superficial y se eyecta un chorro de solución en la dirección del campo eléctrico, depositándose en la placa colectora conectada a tierra. En el proceso el solvente se evapora dejando fibras sólidas de polímero.

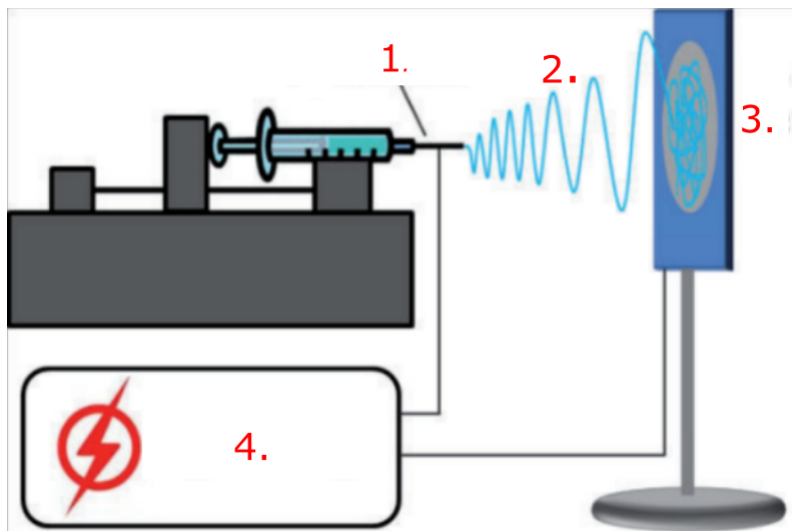


Figura 3: Esquema de las piezas fundamentales de un AFM.

(a) 1.-Aguja de jeringa. 2.-Chorro de solución de polímero ionizado. 3.-Placa colectora. 4.-Fuente de alto voltaje. Figura adaptada de [14].

La técnica del electrohilado sirve para producir fibras desde unos pocos nanómetros de grosor hasta micrómetros. Las variables de las que depende la morfología de las fibras son el voltaje, la concentración de la solución, la distancia jeringa-colector y el grosor de la aguja. Dependiendo del tiempo de exposición, se pueden obtener pocas nanofibras aisladas o membranas nanoestructuradas con algunas propiedades muy útiles como lo son una porosidad modulable y un altísimo radio superficie-volumen. Estas propiedades son utilizadas en el desarrollo de filtros, la ingeniería de tejidos, biomateriales, industria textil y incluso aplicaciones en energía como baterías de polímeros y celdas fotovoltaicas. Otras aplicaciones de las nanofibras electrohiladas se muestran en la figura 4 [15][16].

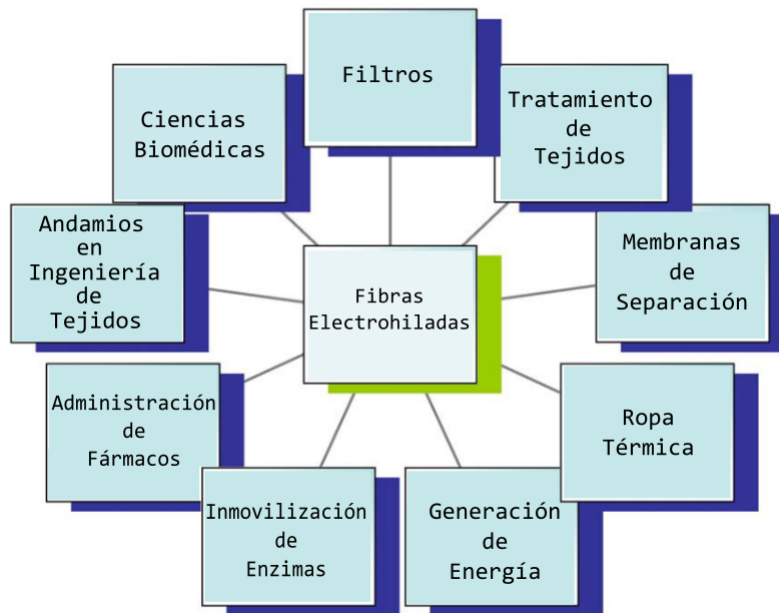


Figura 4: Usos y aplicaciones de fibras electrohiladas. Figura adaptada de [16].

1.3.2. Microscopio de Fuerza Atómica

El microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) es un microscopio de barrido que escanea la superficie de la muestra entregando imágenes topográficas a escalas nanométricas. De la familia de los microscopios de escaneo por sonda (SPM, por sus siglas en inglés), como su antecesor, el microscopio de efecto túnel (STM), estos microscopios se diferencian de los microscopios ópticos principalmente en que no utilizan fotones para "ver" la muestra. Estos microscopios miden y escanean la muestra mediante la interacción entre una sonda y la superficie de la muestra que se quiere analizar. Esto permite alcanzar resoluciones atómicas [17], muy inferiores a la longitud de onda de los fotones.

Los elementos básicos de un AFM, como se muestran en la figura 5, son un juego de cristales piezoeléctricos en las direcciones cartesianas, un cantilever, una punta AFM, un láser finamente calibrado apuntando al lomo del cantilever y un detector de cuatro cuadrantes donde llega el reflejo del láser.

El funcionamiento del AFM se basa en medir la deflexión del cantilever producida por la interacción con la superficie de la muestra, mediante el láser y el detector de cuatro cuadrantes. También se mide la posición del cantilever en el eje z , que se controla con los piezoeléctricos. A medida que se escanea la superficie con los piezoeléctricos x - y , se mapea la altura de la muestra y se obtienen imágenes topográficas, el AFM es ampliamente utilizado por estas precisas imágenes. Sin embargo, los usos y aplicaciones del AFM no se limitan a las imágenes topográficas, este equipo también realiza espectroscopias fuerzas, litografía y diversas técnicas de nanomanipulación que permiten hacer análisis mecánicos de nanomateriales y moléculas únicas [18].

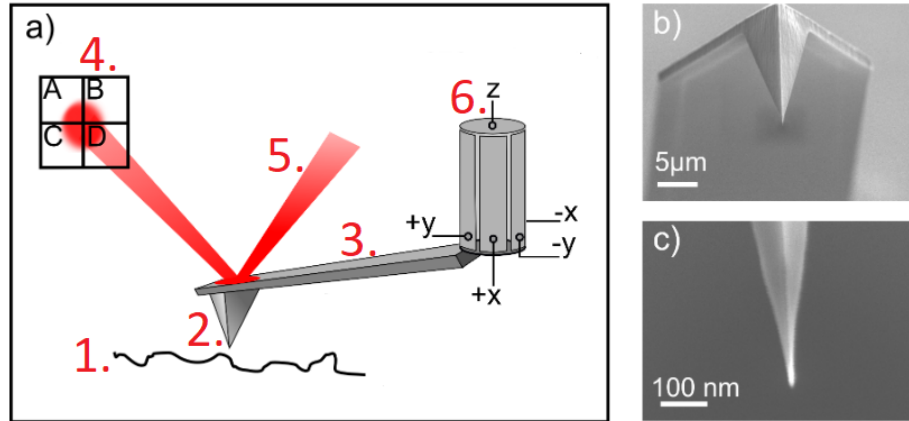


Figura 5: Esquema de las piezas fundamentales de un AFM.

(a) 1.-Superficie de la muestra. 2.-Punta del AFM, también conocida como "AFM tip". 3.-Cantilever. 4.-Detector de cuatro cuadrantes de intensidad lumínica. 5.-Láser. 6.-Cristales Piezoeléctricos

(b) y (c) Imágenes de microscopio de electrones a puntas comerciales de AFM. Figura adaptada de [19].

La punta del AFM es la piedra angular de este tipo de microscopios, ya que es gracias a la interacción directa con ésta que se puede medir con resolución atómica. El cantilever es una viga que sostiene la punta, por lo tanto también es muy importante que sea una pieza de precisión, donde sus dimensiones y sus propiedades físicas como la constante elástica (k) y la frecuencia de resonancia vienen nominadas de fábrica. Normalmente los cantilever (y las puntas) son de silicio o de nitrato de silicio y tienen una constante elástica que puede ir desde los $0.01 [Nm^{-1}]$ hasta los $100 [Nm^{-1}]$, lo que permite una sensibilidad de fuerza de hasta $10 [pN]$ [20].

Para tomar imágenes topográficas, el AFM tiene tres principales modos de operación, contacto, contacto intermitente y no-contacto. En el primer modo de operación, la punta toca la superficie y ejecuta el barrido arrastrándose sin separarse de la superficie, midiendo sólo fuerzas repulsivas. Este modo es útil cuando se miden muestras duras, como minerales y metales.

Los otros dos modos se basan en hacer oscilar el cantilever y detectar cambios en la amplitud de la oscilación para medir la interacción punta-superficie. En el modo de

contacto intermitente, se miden fuerzas atractivas y repulsivas (FIG. 6). En el modo de no-contacto, la punta no toca la muestra en ningún momento, sólo se acerca lo suficiente para interactuar con las fuerzas atractivas de mayor rango. Estos dos últimos modos de operación son útiles para analizar materiales blandos como el tejido orgánico. Esto posiciona al AFM como una potente herramienta en áreas ligadas a la biología como la ingeniería de tejidos, ciencias biomédicas, biofísica, etc.

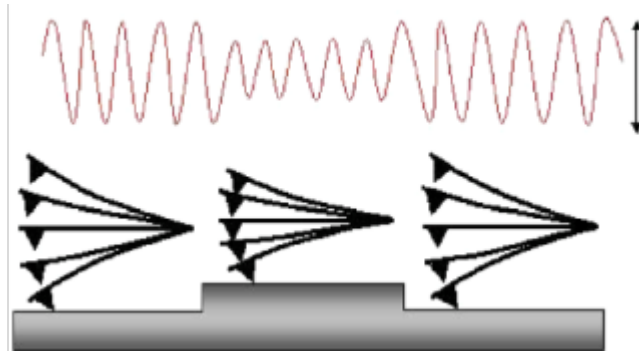


Figura 6: *Esquema del modo de contacto intermitente de imagen AFM. Figura adaptada de [18]*

Para realizar una espectroscopia de fuerza, la punta del cantilever se presiona contra un punto de la muestra y se mide la posición en z del cantilever y su deflexión, con estos datos se obtiene la fuerza respecto a la deformación (curva de fuerza). Al repetir este proceso sobre un área se mapean las propiedades mecánicas de la muestra y determinar su módulo de Young. En la siguiente subsección se describirá la espectroscopia de fuerzas en detalle.

1.4. Antecedentes Teóricos

Para determinar el módulo de elasticidad (E) de una muestra a partir de los datos de fuerza versus indentación se utilizan modelos como el de Hertz, JRK y DMT. Sin embargo, el AFM no mide directamente ni la fuerza ni la indentación, se calibra a partir de la posición en z del cantilever y su deflexión.

Curvas de Fuerza

Algunas de las técnicas más interesantes para la biofísica y el estudio de materiales blandos que se pueden hacer en el AFM se basan en su capacidad de medir fuerzas con una precisión de nanoNewtons.

Una curva de fuerza consiste en un ciclo en el que el cantilever se aproxima a la muestra más allá del punto de contacto, y luego se retrae, registrándose la deflexión del cantilever en función de su posición en z . En la figura 7 se muestra una típica curva de fuerza.

El proceso de acercamiento y alejamiento del cantilever se puede dividir en cuatro regiones. Partiendo de derecha a izquierda (FIG. 7) la punta del AFM está lejos de la muestra y no se registra interacción, i.e., zona de cero fuerza (primera región). Al

acercarse al punto de contacto (segunda región) se registran fuerzas atractivas débiles que tienden a juntar la punta con la superficie de la muestra, estas son principalmente interacciones de Van der Waals. En los experimentos realizados en aire se forma una delgada capa de agua en las superficies, cuando la punta alcanza la superficie de la capa de agua, la tensión superficial la atrae abruptamente por capilaridad, provocando un "salto al contacto". De aquí hasta que se termine el acercamiento, el sistema se encontrará en equilibrio mecánico en cada punto de la curva, porque el cantilever se deflecta hasta que la fuerza de interacción es igualada. Después del punto de contacto (tercera región) se registran fuerzas repulsivas. En esta región se pueden medir las propiedades elásticas de la muestra. Finalmente, el cantilever se retrae (cuarta región), al principio su comportamiento es similar al de la región de contacto, hasta que el cantilever comienza a deflectarse negativamente debido a las fuerzas de adhesión. El contacto con la muestra se rompe cuando la fuerza de restauración del cantilever supera la fuerza de adhesión.

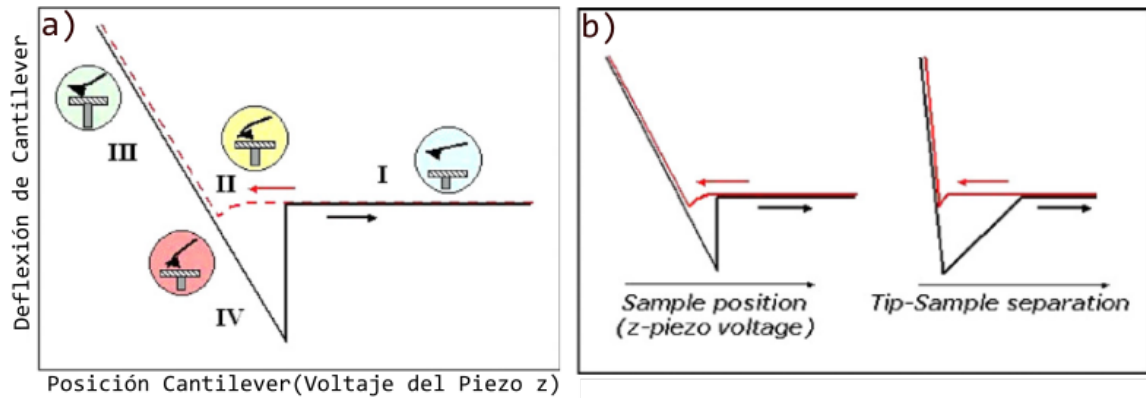


Figura 7: a) Típica forma de una curva de deflexión/posición "z". b) Típica forma de una curva de fuerza, tras calibrar la curva de deflexión/posición. Adaptada de [18].

En un ciclo de curva de fuerza, se mide la deflexión del cantilever y el voltaje aplicado al piezo "z" (posición del cantilever). Para convertir la medición de deflexión a fuerza se utiliza la ley de Hooke: $F = -kd$. Donde F es la fuerza, k es la constante de resorte del cantilever y d es la deflexión del cantilever. Para corregir la medición de posición del cantilever a indentación de la muestra, se calibra realizando una curva de fuerza sobre un sustrato, que debe ser muy duro en comparación con el material del cantilever y la punta. Asumiendo incompresibilidad del sustrato, toda la deflexión medida corresponde a la deformación cantilever. Al sustraer la deflexión del cantilever sobre un sustrato duro a la curva sobre una superficie más blanda, se obtiene la indentación de la muestra.

Modelo de Hertz

El modelo de Hertz es el punto de partida en el estudio de la mecánica de contacto, el cual describe la deformación de materiales puramente lineal elásticos en función de la fuerza, la indentación y el módulo de Young (E). Ajustando el modelo a la curva de fuerza se obtiene el módulo de Young como un parámetro del ajuste.

En este estudio, se ha utilizado el modelo de Hertz para una punta de geometría cónica, como aproximación a las puntas piramidales de las puntas de AFM usadas:

$$F = \frac{4}{3} \frac{\sqrt{R_{eff}}}{1 - \nu^2} E_T \delta^{2/3} \quad (1)$$

Donde F es la fuerza, R_{eff} el radio de contacto efectivo, ν es el radio de Poisson, E_T es el módulo de elasticidad transversal y δ es la indentación de la muestra. Para efectos de este estudio se ha asumido un radio de Poisson de 0.5 [21].

1.5. Avances Recientes en Nanofibras de PVA

Las nanofibras electrohiladas de PVA han sido estudiadas a nivel de membranas de nanofibras y también a nivel de fibras individuales.

Peresin et al. (2010) analizaron membranas de nanofibras de PVA y PVA con nanocristales de celulosa, realizando análisis mecánico de estiramiento bajo ciclos de humedad. Encontrando que las propiedades mecánicas se ven notoriamente afectadas por la absorción de agua. Además, en su estudio se reporta que el módulo de corte de membranas electrohiladas de PVA está entre 100 (MPa) y 400 (MPa), a humedades de 80 % y 0 % de RH (FIG. 8), respectivamente, [22].

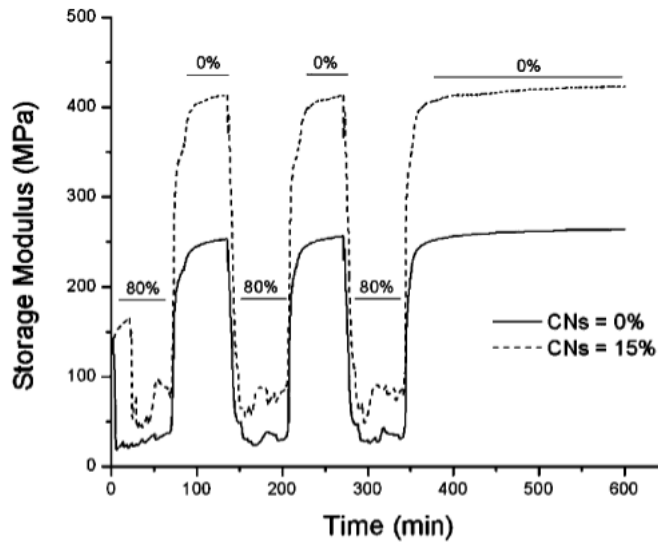


Figura 8: Variación del módulo de almacenamiento bajo ciclos de humedad de 0% a 80% de membranas de nanofibras de PVA con y sin nanocristales de celulosa. Figura de [22].

También se han realizado análisis mecánicos a nanofibras compuestas de PVA con nanopartículas de silicio. Friedemann et al. (2011) midieron en AFM las propiedades mecánicas de nanofibras de 450 nanómetros de diámetro, reportando que el módulo de elasticidad estaba entre 485 y 690 (MPa) [23]

Dolan et al. (2016) estudiaron la interacción entre nanofibras, usando AFM para arrastrar fibras individuales y medir las fuerzas laterales, midiendo la adhesión entre las fibras, determinaron que las fuerzas entre las nanofibras corresponden a interacciones de van der Waals [24].

Neugirg et al. (2016) realizaron un estudio sobre propiedades mecánicas de nanofibras electrohiladas individuales de PVA, donde complementaron análisis de estiramiento y análisis de tensión de tres puntos. Además, buscaron la relación entre el radio de la nanofibra y sus propiedades elásticas, encontrando una relación exponencial decreciente entre el módulo de elasticidad y el diámetro (FIG. 9) [25].

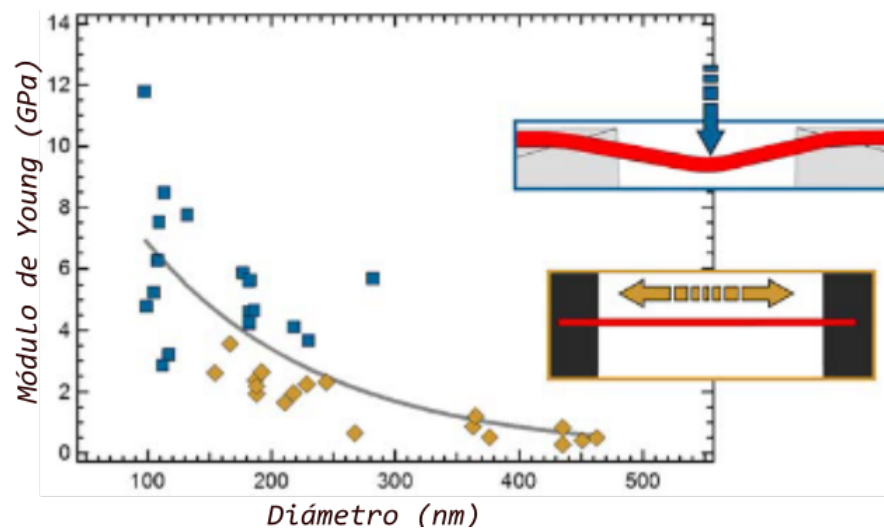


Figura 9: Módulo de Young de nanofibras de PVA respecto a su diámetro, medidos por análisis de deformación de tres puntos (azul) y por análisis de estiramiento (amarillo). En gris una curva exponencial. Figura de [25].

Ademas, Neugirg et al. (2016) realizaron otro robusto estudio sobre análisis mecánicos basados en AFM, que incluyó análisis de deformación de tres puntos, nanoindentación, y estiramiento de una fibra individual sujeta al cantilever. Probando la completitud y versatilidad del AFM para realizar análisis mecánicos a nanofibras individuales [21].

Catalan (2020) estudió cómo afecta la humedad, y la absorción de agua, en en la morfología de nanofibras individuales de PVA, para lo que se midió la altura de las fibras a diferentes valores de RH usando e-AFM. En este estudio se concluyó que el tamaño de las nanofibras aumenta al absorber humedad, tanto en altura como en ancho (FIG. 10) [26].

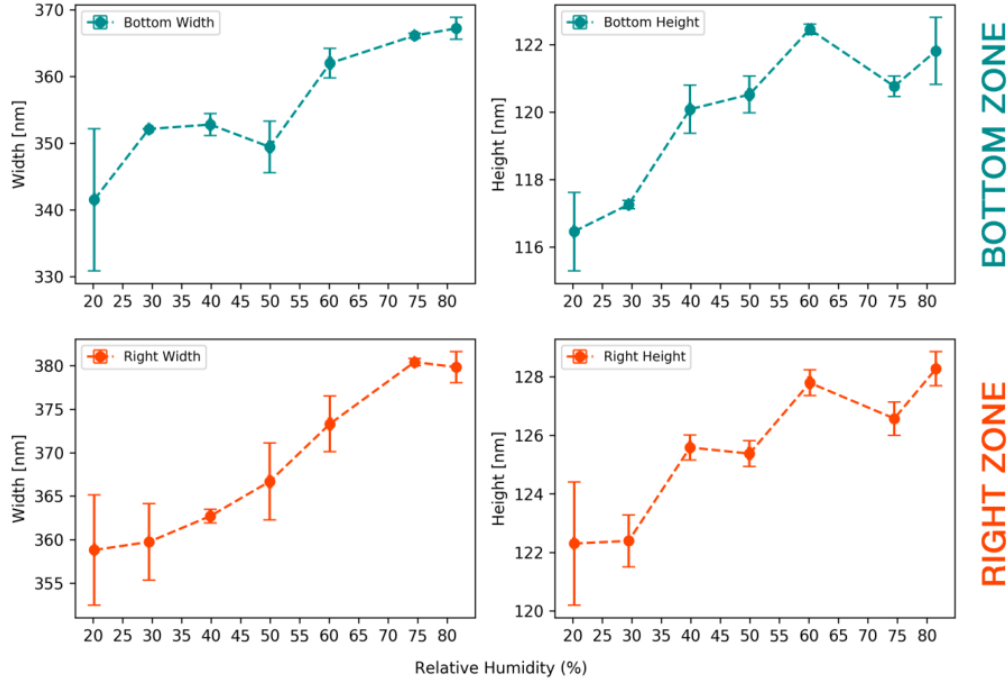


Figura 10: Altura y ancho de 4 nanofibras distintas de PVA en un rango de entre 20 y 80% de RH, los resultados muestran el aumento de las dimensiones físicas con el incremento en la humedad, evidenciando cómo las nanofibras absorben agua, [26].

1.6. Objetivos y Resultados Esperados

El objetivo principal de este estudio es comprender cómo afecta la humedad a las propiedades mecánicas de nanofibras individuales de PVA. Para alcanzar este objetivo fue necesario plantear tres objetivos específicos: elaborar las muestras utilizando la técnica de electrohilado e implementar un módulo de humedad acoplado al AFM para utilizarlo como e-AFM (entorno AFM), para luego realizar análisis mecánicos de nanoindentación en AFM.

Existen diversos estudios sobre nanofibras electrohiladas de PVA y en general sus propiedades están bien descritas. Los análisis mecánicos más frecuentes son los de estiramiento de membranas de nanofibras, estiramiento de fibras individuales y de deformación por tres puntos de nanofibras individuales. En menor medida pero también se ha reportado la técnica de nanoindentación contra un sustrato duro e incompresible, que es la técnica utilizada en este estudio. De acuerdo a lo revisado en la literatura, se espera medir un menor módulo de Young cuando la humedad es más alta, así como también se espera observar un endurecimiento del material cuando el ambiente se seca.

Este estudio viene a complementar lo que se sabe sobre las propiedades elásticas de nanofibras de PVA y a conectar los estudios sobre efectos de la humedad y sobre las propiedades mecánicas, cuya relación no ha sido completamente entendida.

2. Metodología

Para comprender cómo se ven afectadas las propiedades mecánicas de nanofibras de PVA bajo diferentes condiciones de RH se ha medido el módulo de Young radial "E" de nanofibras de PVA individuales bajo diferentes condiciones de humedad. Para este estudio se utilizó la técnica espectroscopia de fuerzas en un AFM con cámara ambiental (e-AFM).

Las muestras de nanofibras, de entre 100 y 250 nanómetros de altura, fueron preparadas utilizando la técnica de electrohilado. Estas, posteriormente, fueron expuestas al análisis mecánico en distintos niveles de humedad relativa con e-AFM. Fue necesario implementar un módulo de control de humedad en el AFM para habilitarlo como e-AFM, alcanzando desde 2 % hasta 70 % de RH.

Las muestras se han preparado de acuerdo a un protocolo electrospinning de formulaciones PVA/GS/QUI, con el que se hacen andamios ("scaffolds") de nanofibras compuestas de PVA, gel de salmón y quitosano en el equipo de electrospinning hecho en el laboratorio (Fig. 11). Al protocolo se le hicieron algunas modificaciones ya que el interés de este estudio son nanofibras de PVA aisladas, sólo se utilizó PVA.



Figura 11: Sistema de electrospinning del laboratorio de ingeniería de tejidos

Para controlar y mantener las condiciones de humedad dentro de la zona de escaneo, se implementó una "Cámara de humedad". La cámara consta de una entrada y salida de gases para regular la humedad por medio de la inyección de nitrógeno seco o hidratado. La humedad se mide con un sensor conectado a un arduino que envía los datos al computador, donde se almacenan para su posterior análisis.

Para medir el módulo E de Young, se han realizado espectroscopías de fuerzas en un

Flex AFM de Nanosurf (Fig. 12). Para esto, se escanean topográficamente las nanofibras y se elige un lugar óptimo donde hacer las curvas de fuerza. El paso consecutivo consiste en acondicionar el sistema y propiciar la humedad requerida. se espera un tiempo para que se alcance el equilibrio higroscópico entre las nanofibras y la humedad relativa seleccionada, entonces se realiza la espectroscopia.

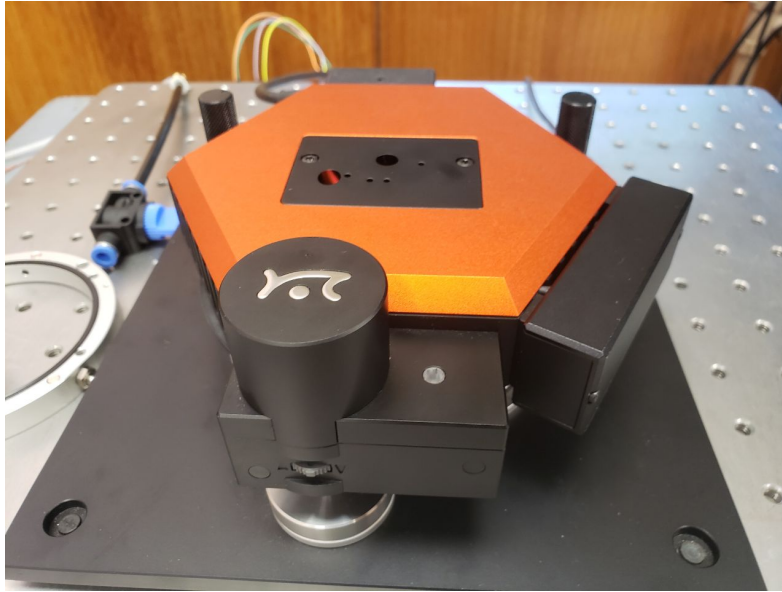


Figura 12: *AFM modelo FlexAFM de Nanosurf*

2.1. Preparación de muestras

La preparación de las muestras de nanofibras de PVA consistió en dos pasos, primero se preparó la solución y segundo se electrohiló por pocos segundos en el equipo de electrospinning "Home-made UTFSM" a 7 kV.

Primero, se elaboraron 50 g de solución de PVA a 10% p/p (peso/peso). Para esto se masaron 5.01g de PVA (Poly(vinyl alcohol) Mw 89.000-98.000 99 % Hydrolyzed Sigma Aldrich) en polvo en una balanza gramataria, luego se masaron 45.02g de agua estéril H₂O Mili-Q. Para disolver, se calentó a 80°C y se mezcló el polvo con el agua en un vaso precipitado con un agitador magnético a 300 (*stir*) en una placa termo reguladora (imagen A en FIG. 13). A este punto se produjo un error en la placa y no alcanzó los 80°C. Se dejó la solución a 30°C con agitación constante de 300 (*stir*) por una noche (15 horas), lo que no fue suficiente para que el PVA se diluyera totalmente. Luego se cambió de placa termo reguladora y se dejó una hora a 80°C, obteniendo una solución viscosa totalmente transparente y homogénea.

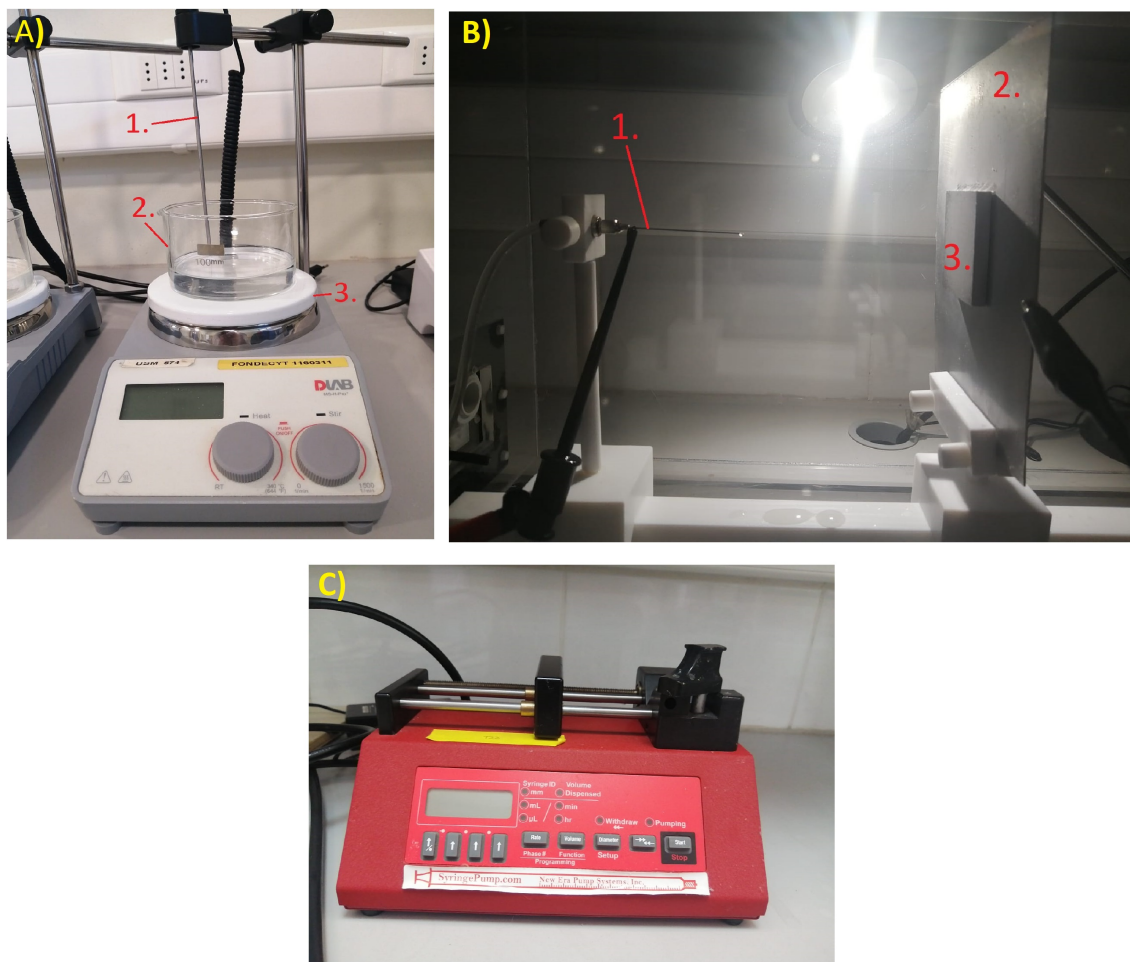


Figura 13: A) Placa termo reguladora con agitación magnética (3) marca Dlab, con su sonda térmica (1) y un vaso precipitado (2). B) Componentes principales del electrospinning: aguja de jeringa (se usa como ánodo) (1), colector conectado a tierra (2) y sustrato (3). C) Bomba usada para presionar el pistón de la jeringa de manera lenta y constante.

Luego de preparar la solución, se tomaron 10 mL de solución a 70°C en una jeringa que se montó en el electrospinning "Home-made UTFSM" (imagen B en FIG. 13) y se electrohiló por 10 minutos a un flujo constante de 0.1 mL/Hora para estabilizar la bomba y flujo del jet. El voltaje usado fue de 7 kV, lo que es relativamente poco respecto a los voltajes usados generalmente según la literatura. La distancia entre la punta de la aguja y la placa colectora fue de 10 centímetros. Una vez que el flujo del jet de polímero se estableció, se procedió a colocar un fragmento de silicio limpio delante de la placa colectora, interrumpiendo el flujo e impregnándose de nanofibras. Esto último se repitió 4 veces obteniendo 4 muestras de silicio con distinta densidad de nanofibras de PVA.

Las muestras fueron rotuladas como m_0 , m_1 , m_2 y m_3 , como se muestra en la figura (14). El tiempo de exposición de las muestras fue de 10 minutos, 1 minuto y dos de 1

segundo, respectivamente.

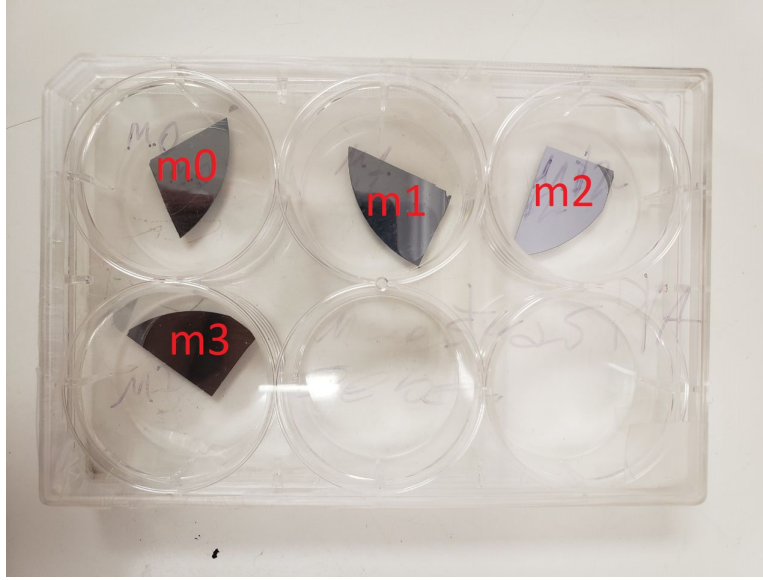


Figura 14: *Muestras de nanofibras electrohiladas de PVA sobre silicio.*

A simple vista la muestra m_0 estaba densamente poblada de nanofibras, casi como un recubrimiento. La muestra m_1 también se notaba densamente poblada de nanofibras, pero no se llegaba a formar un recubrimiento. En cuanto a las muestras m_2 y m_3 , a simple vista se veía prácticamente el silicio limpio. Estas últimas dos muestras son las de interés para analizar en AFM.

2.2. Caracterización AFM

Se utilizó un Microscopio de Fuerza Atómica FlexAFM (Fig. 15) para estudiar la morfología y las propiedades mecánicas de las nanofibras de las muestras ya que es lo más óptimo para las dimensiones nanométricas de la muestra.

En este trabajo se han utilizado puntas PPP-FMR 10 y SSS-FMR, de Nanosensors. Las puntas y cantilever son de silicio altamente dopado (para evitar las descargas estáticas) con recubrimiento de aluminio de 30 nm en el lado del detector (para mejorar la reflectividad con el láser). La constante elástica nominal de los cantilevers es 2.8 Nm⁻¹ y 48 Nm⁻¹, los radios de curvatura punta típicos 7 y 2 nm, y garantizados de menos de 10 y 5 nm, respectivamente (valores nominales de fábrica).

El AFM tiene una precisión nanométrica, sin embargo esto se vuelve una limitante cuando la muestra tiene porosidades de mas de 200 nanómetros o se quiere analizar áreas muy grandes. Por esta razón, las las muestras m_0 y m_1 se descartaron del análisis AFM, ya que presentaban una densidad de nanofibras excesivas para un buen análisis con esta herramienta.

La caracterización AFM consistió en tres etapas: Tomar imágenes topográficas, acondicionar la cámara de humedad y realizar el análisis mecánico. En la primera se

estudia la morfología de las nanofibras de PVA y se busca una zona apropiada donde realizar la espectroscopia y la segunda es un tiempo de espera.

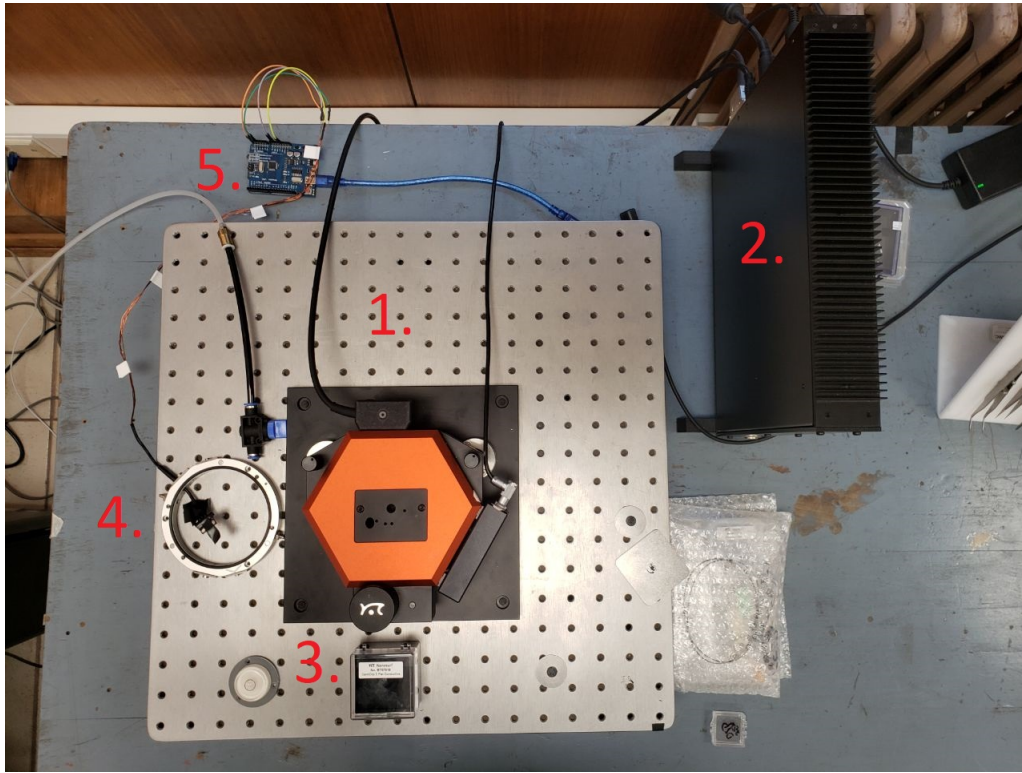


Figura 15: Configuración experimental del FlexAFM en el laboratorio. 1) FlexAFM. 2) Controlador del AFM C300i. 3) Cabezal sujetador del cantilever ("tip holder"). 4) Cámara de humedad. 5) Arduino controlador del sensor de humedad.

Primero, se tomaron imágenes topográficas en modo contacto intermitente, ya que las muestras son muy blandas en comparación con la punta y de otra forma podrían dañarse. Con estas imágenes se midió la altura de nanofibras individuales y la altura promedio de cúmulos de éstas. También se identificó las zonas y nanofibras específicas sobre las cuales se realizaron los estudios nanomecánicos.

Luego se procedió a humedecer o secar la cámara de humedad, dejando reposar 2 horas para que la muestra alcance el equilibrio higroscópico con el ambiente.

Finalmente, una vez alcanzado el equilibrio higroscópico se han realizado las espectroscopias de fuerzas, seleccionando una grilla que es una malla cuadrada con líneas horizontales y verticales, donde en cada intersección se realiza una curva de fuerza.

2.3. Cámara de Humedad

Para generar y mantener las condiciones de humedad relativa deseada se ha optado por usar un sistema de inyección de gases en una cámara de humedad aislante . Este sistema existía en el laboratorio para otro equipo, por lo que fue necesario adaptarlo para usar en la FlexAFM. Para esto se utilizó el anillo de acero Nanosurf (elemento 4 de la Fig. 15) y un sensor BME280 (Fig. 16). El sensor mide presión, humedad. altitud y temperatura. Para controlar el sensor se utilizó un Arduino UNO, que transmite los datos al computador del laboratorio para que se almacenen.

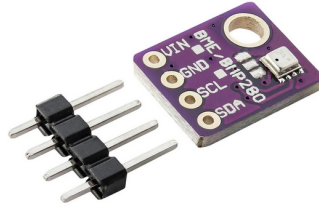


Figura 16: *Sensor BME280*

Se implementó un programa en lenguaje "Processing", que grafica en "tiempo real" la humedad, la presión y la temperatura medidas por el sensor. Este programa se basó en el trabajo de cosminp12 (2016 Jun), el cual se modificó para que registre y guarde los datos en archivos de texto en el computador.

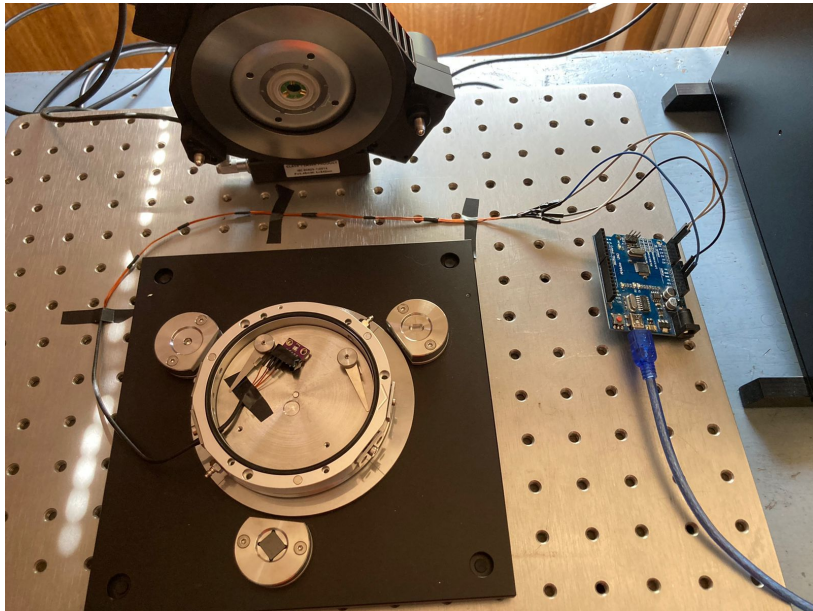


Figura 17: *Cámara de humedad*

3. Resultados y Análisis

Para este estudio se han buscado nanofibras de entre 180 y 80 nanómetros, estas fibras eran abundantes en la muestra *m3* sin saturar el substrato, por otra parte, la muestra *m0* estaba demasiado saturada para un análisis AFM. Finalmente, las muestras *m1* y *m2* tenían muy poca densidad de fibras, por lo que se descartan. Sólo se analizaron fibras de la muestra *m3*. Cúmulos de nanofibras representativos se muestran en la figura (18).

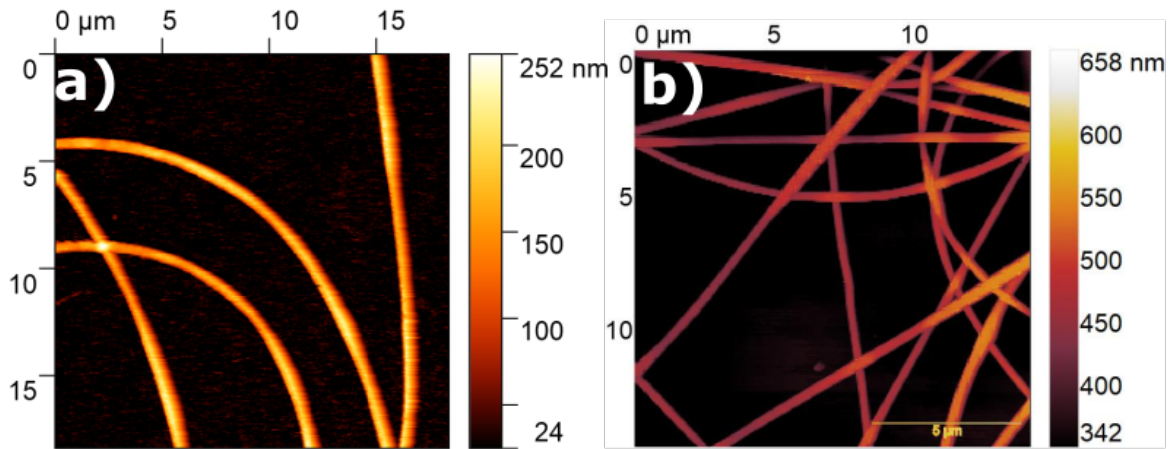


Figura 18: *Topografías AFM de cúmulos de nanofibras de PVA. a) Fibras de 150 nanómetros de altura. b) Fibras de 100 nanómetros de altura.*

Se observaron distintas formaciones y tamaños de nanofibras en una misma zona, como se muestra en la figura (19). Donde se observa una nanofibra de 300 nanómetros junto a una de 70 nanómetros.

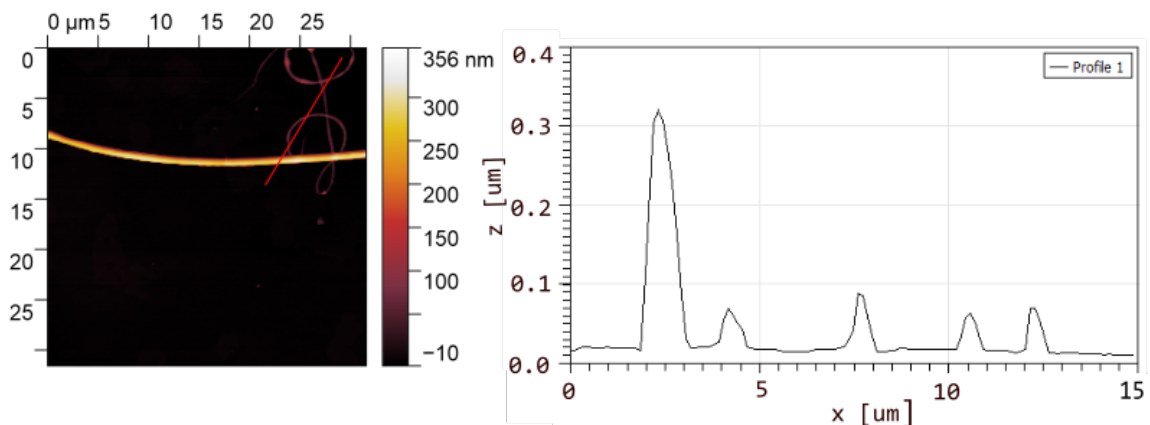


Figura 19: *a) Imagen topográfica de nanofibras de PVA de diferentes tamaños, tomada en AFM. b) Perfil de corte transversal de la imagen a) (línea roja de la imagen).*

Las nanofibras de PVA producidas por electrospinning mostraron, en general, estar entre los 100 y 300 nanómetros, que es justamente el rango de interés de este estudio. Sin embargo, se observaron nanofibras de tamaños muy inferiores a ese rango, nanofibras de menos de 10 nanómetros de altura (Fig. 20). También se encontraron fibras sobre los 300 nanómetros de altura, que no fueron analizadas en este estudio.

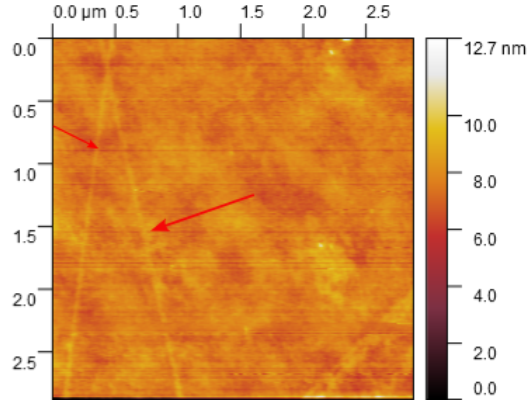


Figura 20: Nanofibras de PVA de menos de 10 nanómetros de diámetro (flechas rojas). Si bien el tamaño promedio de las nanofibras depende de las condiciones del electrohilado, fibras extremadamente pequeñas como estas pueden producirse en un fenómeno llamado "Branching"[27]

Las imágenes topográficas de las 4 nanofibras a las que se les realizó espectroscopia de fuerzas se muestran en la figura (21), donde se han enumerado de acuerdo a la humedad.

El primer experimento realizado (análisis mecánico a la nanofibra de la imagen 2, de la FIG. 21) fue antes de habilitar la cámara de humedad y registrar la humedad en el laboratorio, con una fuerza máxima de 500 nN . Después de implementar la e-AFM se midió la humedad relativa en el laboratorio, la cual oscila entre 40 y 60 % de RH. Los otros 3 experimentos fueron realizados con una fuerza máxima de 140 nN , a humedades de 3 % (1) y 70 % (3 y 4) de RH. Todos los experimentos fueron realizados a la temperatura ambiente del laboratorio, entre 20 y 25 $^{\circ}C$.

A partir de las imágenes topográficas, se ha medido la altura de las nanofibras. Obteniendo alturas de $90.20 \pm 7.39 \text{ nm}$ en la primera imagen, $93.85 \pm 8.09 \text{ nm}$ en la segunda imagen. En la tercera imagen, la grilla sobre la que se hizo la espectroscopia de fuerzas abarcó las dos nanofibras que se ven, que tienen alturas de $120.40 \pm 5.55 \text{ nm}$ y $88.60 \pm 9.69 \text{ nm}$. Por último, se midió una altura de $151.29 \pm 32.26 \text{ nm}$ para la nanofibra del centro de la cuarta imagen, que es a la que se le realizó el análisis mecánico.

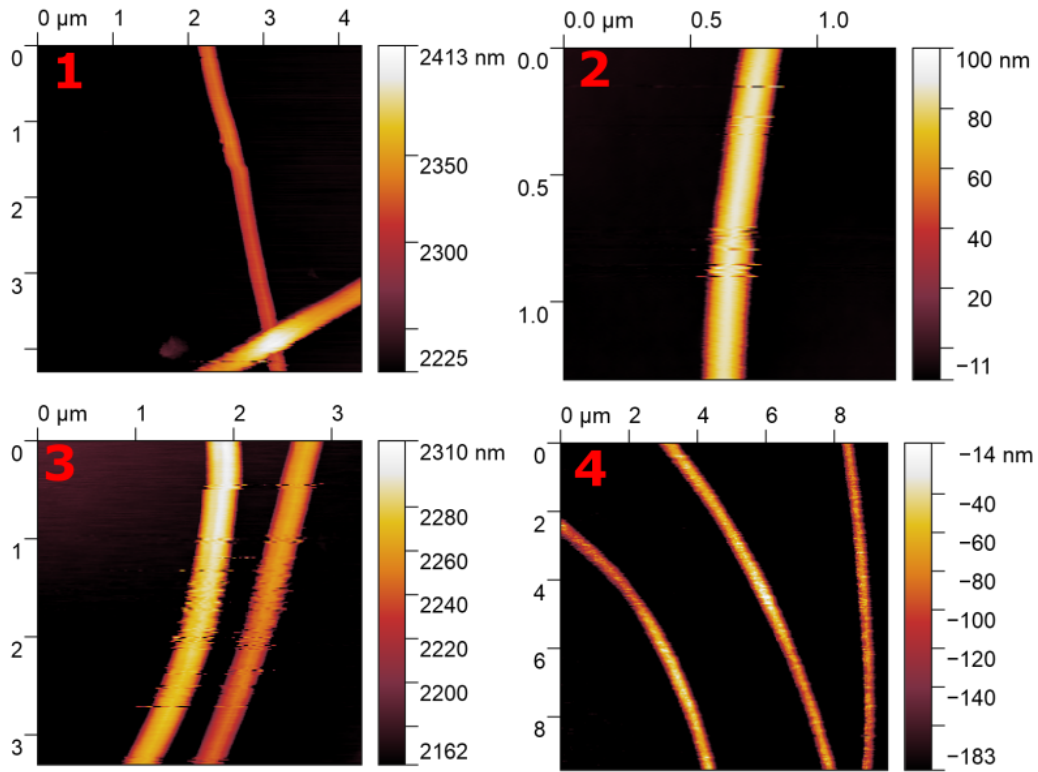


Figura 21: Imágenes AFM de las nanofibras de PVA sometidas a Espectroscopia de Fuerzas. 1.- Experimento a 3% de RH. 2.- Experimento entre 40 y 60% de RH. 3.- Experimento a 70% de RH. 4.- Experimento a 70% de RH.

3.1. Análisis Mecánicos AFM

Para estudiar las propiedades mecánicas de las nanofibras de PVA, se ha realizado espectroscopia de fuerzas. La técnica de la espectroscopia de fuerzas nos permite obtener múltiples datos de una única nanofibra, permitiendo generar un pequeño análisis estadístico de cada medición, en particular, queremos extraer el módulo de elasticidad radial, o módulo de Young (E).

Los parámetros de una espectroscopia de fuerza son la cantidad de curvas y la fuerza máxima con que se aprieta la muestra, así como también el área de la zona escaneada. Los parámetros utilizados en cada uno de nuestros experimentos se resume en el Cuadro (1).

Exp.\	n° de Curvas	Área Grilla (μm^2)	F Max. (nN)	RH (%)
1.-	20x20	1.01x1.08	138.39	3
2.-	16x16	0.7x0.7	500	40-60
3.-	20x20	2.16x1.51	147.23	70
4.-	64x64	3.51x4.26	127	70

Cuadro 1: *Parámetros de las espectroscopias de fuerzas de cada experimento. En todos los casos se usó la misma cantidad de puntos por curva: 1024.*

Para el análisis de los datos se ha utilizado el programa Ana de Nanosurf para leer los archivos en formato NID del AFM. A partir de las curvas de fuerza se ha determinado el módulo de Young de las nanofibras de PVA, de acuerdo con el modelo de Hertz (Ec. 1). La información fue extraída en archivos CSV y PNG, mapas de colores de módulo de Young (FIG. 24) y de adhesión. Datos que se continúan analizando en el programa Gwyddion las imágenes, y en Jupyter, utilizando el lenguaje python se han graficado y analizados los archivos CSV.

3.1.1. Curvas de Fuerza

La espectroscopia de fuerzas consiste en la realización de múltiples curvas de fuerza para mapear un área, a partir de cada una de esas curvas de fuerza se obtuvo un ajuste del modelo de Hertz, y con ello un valor para el módulo de Young.

Los datos de las curvas de fuerza realizadas en el FlexAFM vienen calibrados en fuerza-indentación. De cada espectroscopia se seleccionó una curva de fuerza representativa, mostradas en la figura (22), donde los valores del módulo de Young de cada una de las curvas, enumeradas de acuerdo a los experimentos del 1 al 4, es: 190.25 (MPa), 354.20 (MPa), 101.63 (MPa) y 227.49 (MPa), respectivamente.

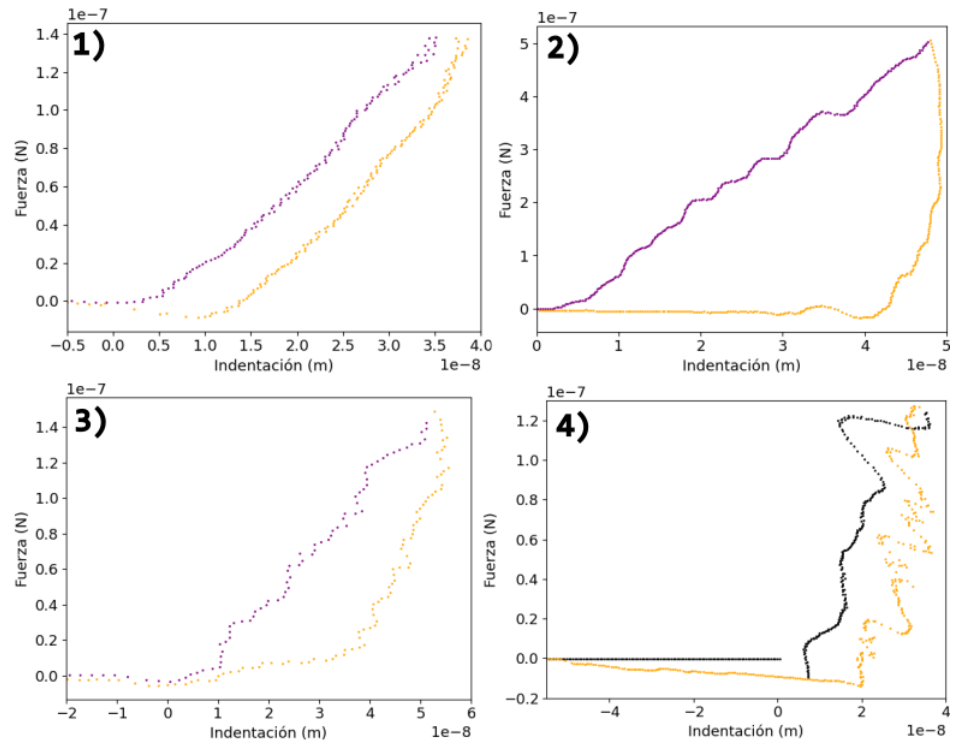


Figura 22: Curva de fuerza representativa de cada experimento. En color morado (negro en la imagen 4) la curva de aproximación, en amarillo la curva de retracción.

Estas curvas muestran que las nanofibras electrohiladas de PVA son compresibles, "blandas". El módulo de Young es proporcional a la pendiente de la recta que se les puede ajustar a las curvas de aproximación. Por lo que un material duro e incompresible (como el silicio) mostrará una curva prácticamente sin deflexión, una recta vertical, como se muestra en la figura (23).

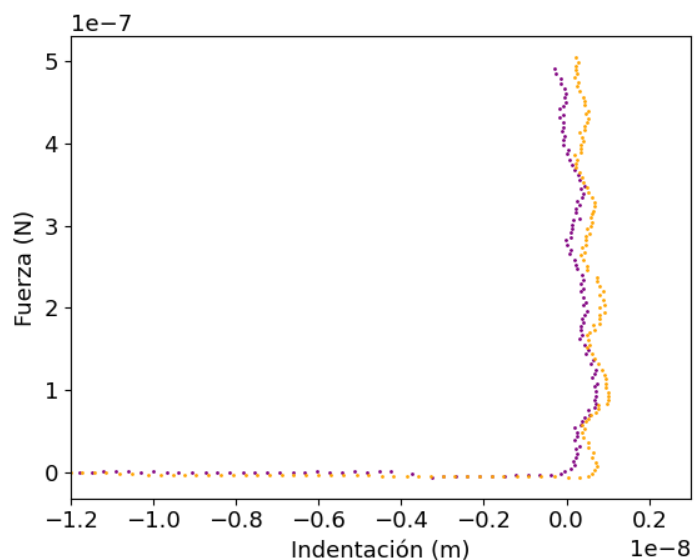


Figura 23: *Curva de fuerza sobre silicio.*

3.1.2. Mapas de Fuerza

Cada curva de fuerza está asociada a una posición, al ajustar determinar el módulo de Young (a partir cada curva) se ordena de acuerdo a su posición y se le asigna el color de acuerdo a su valor, el resultado son mapas de colores de módulo "E" como los de la figura (24).

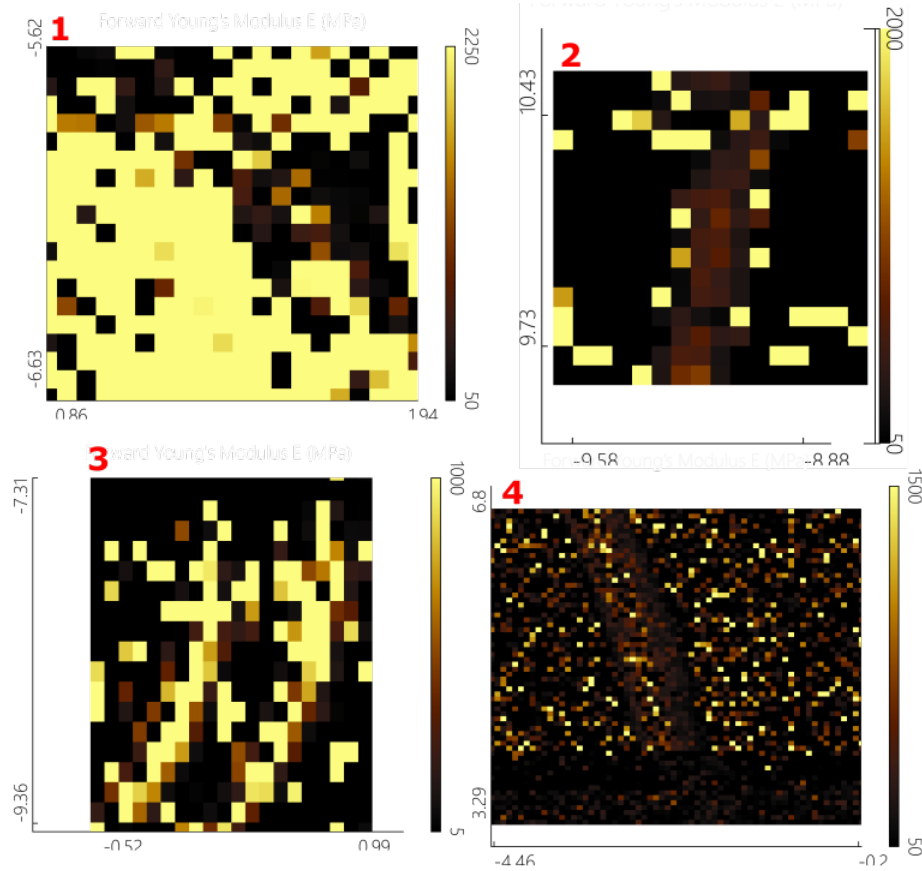


Figura 24: Mapas de Colores del Módulo de Young de los experimentos del 1 al 4.

Estos mapas se analizaron en Gwyddion, donde se extrajo la información y se analizó bajo dos consideraciones. La primera fue analizar las "campanas" en las distribuciones de módulo "E" y centrarse sólo en las que están entre 0.05 y 2 GPa , ya que de acuerdo a la literatura, el módulo de elasticidad de nanofibras de PVA no supera ese límite. Mientras tanto el silicio presenta una dureza y una incompresibilidad que con el cantilever usado no se puede medir con precisión, por lo que esas curvas o no fueron ajustadas o sus ajustes no indican el valor real reportado del silicio, el cual se sitúa entre 130 y 170 GPa dependiendo de la dirección de cristalización [28]. La segunda consideración fue filtrar el sustrato por ubicación espacial, aplicando una "máscara" a la imagen. De esta manera se consideran sólo los puntos que quedan fuera de la máscara, como se muestra en la figura (25).

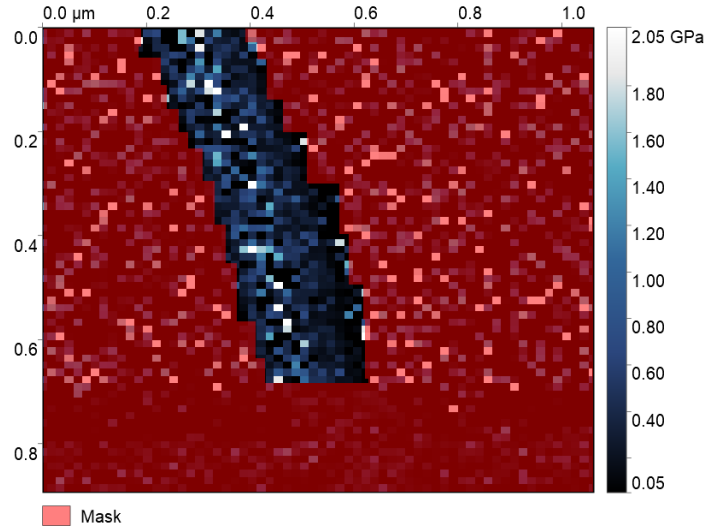


Figura 25: Mapa de módulo E del experimento 4 con la máscara (zona roja) sobre el silicio y la zona inferior donde ocurrió un corrimiento durante la espectroscopia. El color del gradiente se cambió para evitar confusiones con la máscara.

Otro factor que reduce la cantidad de datos útiles es un fenómeno que puede ocurrir en los bordes de la nanofibra, en el que al aproximarse la punta del cantilever se desliza y termina apretando en el sustrato, como se muestra en la figura (26), marcando una medición inválida.

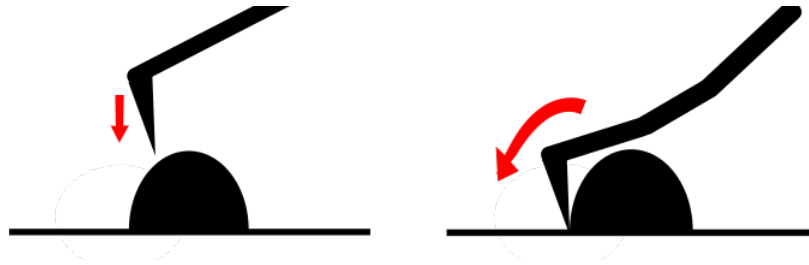


Figura 26: Se muestra el deslizamiento de la punta al presionar el borde de la nanofibra terminando en el sustrato.

Cuando ocurre deslizamiento de la punta del cantilever se registra una curva de fuerza que en un principio es ligeramente inclinada, como la de un material blando, pero que abruptamente se va vertical, como la de un material incompresible. Una curva de fuerza de un caso de deslizamiento se muestra en la figura (27).

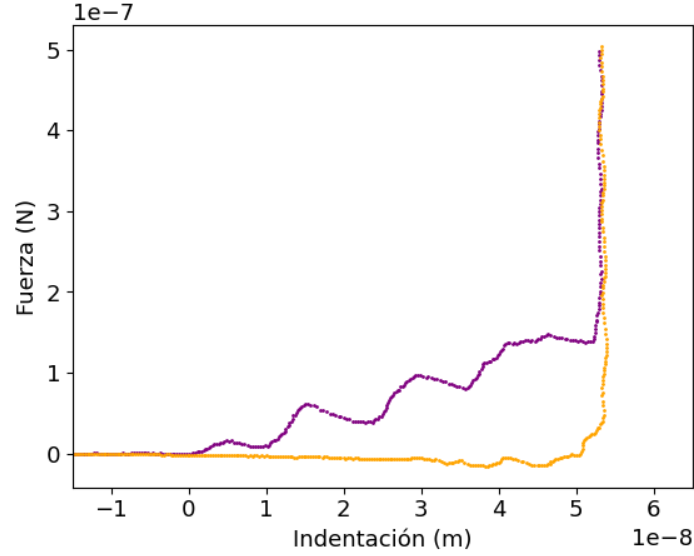


Figura 27: *Curva de fuerza sobre borde de una nanofibra, donde hubo deslizamiento.*

3.1.3. Mapas de Adhesión

Para facilitar la visualización de los datos, se exportaron los mapas de adhesión, o de fuerza mínima de las curvas "backward", que son las curvas de fuerza registradas cuando el cantilever se retracta tras haberse aproximado y presionado a la muestra. En estos mapas se ven nítidamente las nanofibras (FIG. 28), aunque para este estudio no aportan información cuantitativa.

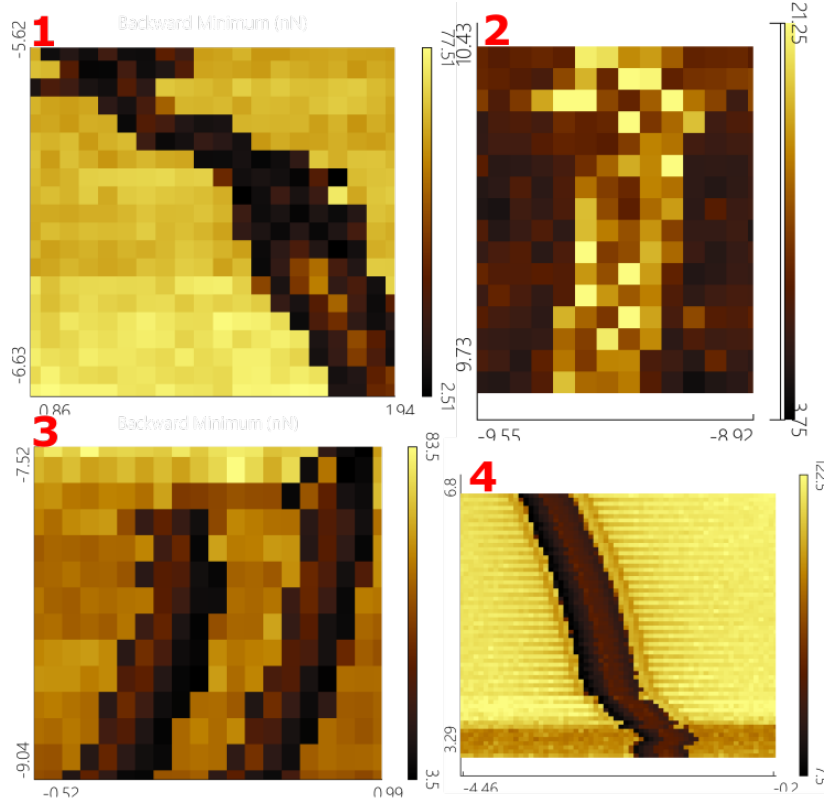


Figura 28: Mapas de fuerza mínima. Nótese que en (3) se ve cómo una nanofibra se ha cortado, daño atribuible a la nanoindentación del AFM.

En la primera imagen se nota una parte más delgada, en la tercera se ve cómo una de las fibras está costada, en estos casos puede interpretarse como un daño en la nanofibra producto de las nanoindentaciones a las que fueron sometidas. En la cuarta imagen la deformación que se ve en la parte inferior es un corrimiento de la muestra ocurrido durante la medición, puede haber sido provocado por un cambio de temperatura que contrajo o dilató algún componente del sistema (corrimiento térmico) ó por alguna desafortunada vibración en el laboratorio. En cuanto a la tercera imagen, se ve la nanofibra normalmente como se esperaría ver.

3.1.4. Análisis de Densidades

Para determinar el módulo de Young radial de las nanofibras de PVA se usó el programa Gwyddion. Se analizó la información contenida en los mapas de módulo E , se filtraron los datos correspondientes al sustrato y los valores extremos. También se graficaron los datos del módulo de Young en histogramas de densidad de frecuencias y se ajustó una curva de distribución Gaussiana (Ec. 2). Para determinar un valor para el módulo de elasticidad del PVA en cada humedad seleccionada de acuerdo a los parámetros de ajuste.

$$f(x) = y_0 + ae^{-\frac{(x-x_0)^2}{b^2}} \quad (2)$$

Donde x_0 representa el valor reportable del módulo E, en Mega Pascales (MPa) y b^2 se relaciona con la desviación estándar de la forma: $b^2 = 2\sigma^2$. Los otros parámetros no tienen relevancia para este estudio.

En la figura (29), se muestran los Histogramas de Frecuencias de cada experimento con sus respectivos ajustes.

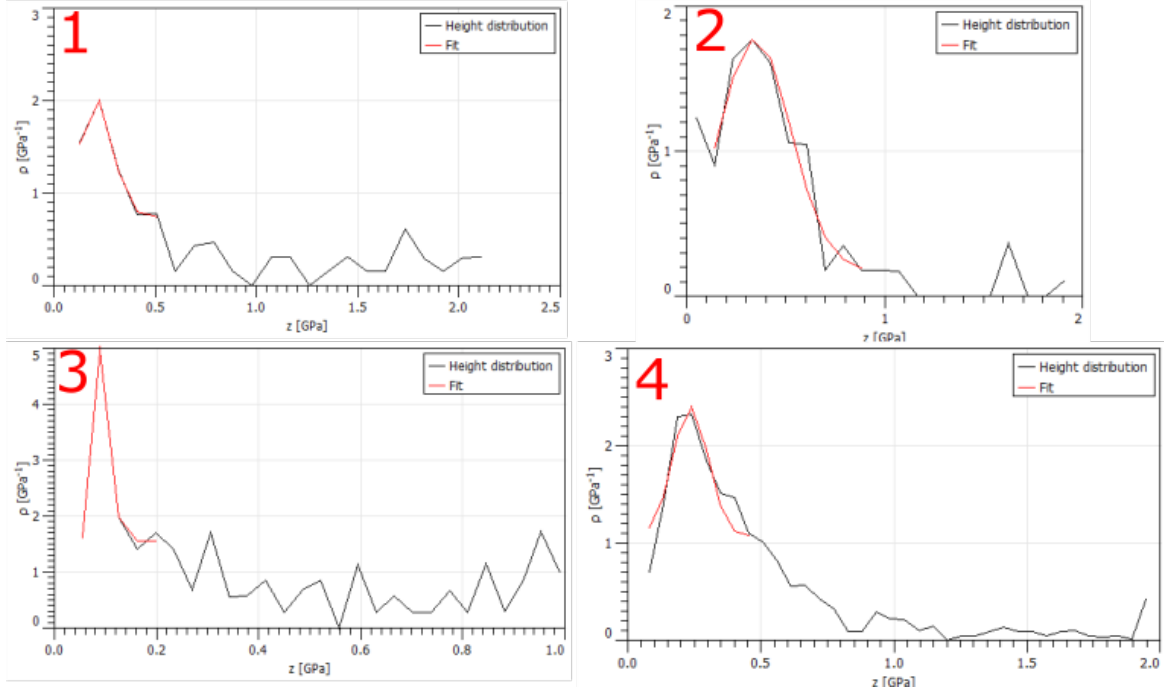


Figura 29: Distribución de densidad frecuencias de cada experimento con su ajuste correspondiente.

De los ajustes, usando $\sigma = \frac{b}{\sqrt{2}}$, se reporta el módulo de Young para cada experimento de la forma $x_0 \pm \sigma$, junto a la altura, la fuerza máxima y la humedad, en la siguiente tabla (Cuadro 2):

\	E (MPa)	F máx(nN)	altura(nm)	RH(%)
1.-	$206,70 \pm 79,47$	138.39	90.20 ± 7.39	3
2.-	$345,17 \pm 180,35$	500	93.35 ± 8.09	40-60
3.-	$95,9 \pm 14,28$	147.23	120.40 ± 5.55 y 88.60 ± 9.69	70
4.-	$235,02 \pm 65,37$	127	151.29 ± 32.26	70

Cuadro 2: Módulo de Young de distintas nanofibras de PVA.

De acuerdo a estos datos, el módulo de elasticidad respecto a la humedad relativa se muestra a continuación (FIG. 30).

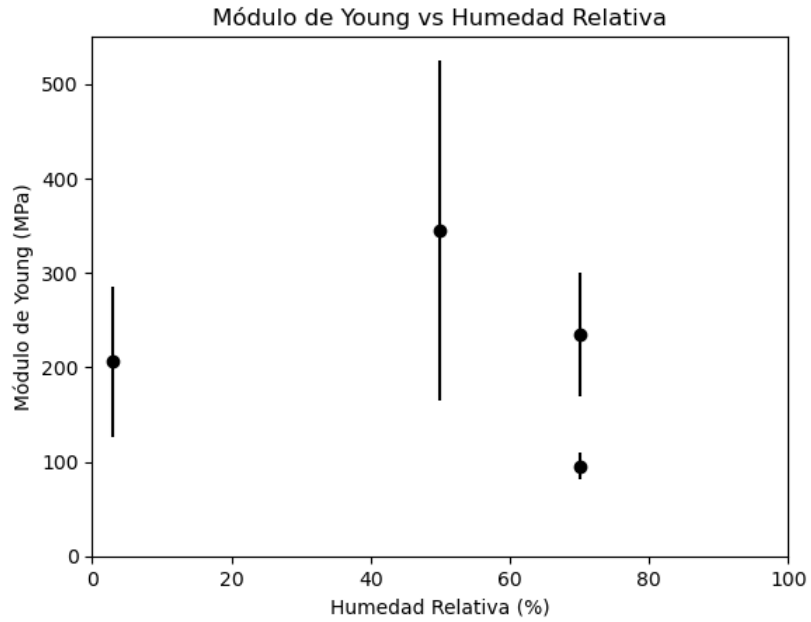


Figura 30: *Módulo de Young de los experimentos respecto a la humedad relativa.*

A primera vista, no se ve mayor correlación entre los datos, esto es explicable en que fueron pocos experimentos y que se utilizaron fuerzas distintas. Pero si consideramos sólo los experimentos 1 y 3, que fueron realizados en las condiciones similares obtenemos el gráfico de la figura (31). Donde se obtiene una disminución del módulo de Young al aumentar la humedad relativa, que es el resultado que se habría esperado en este estudio.

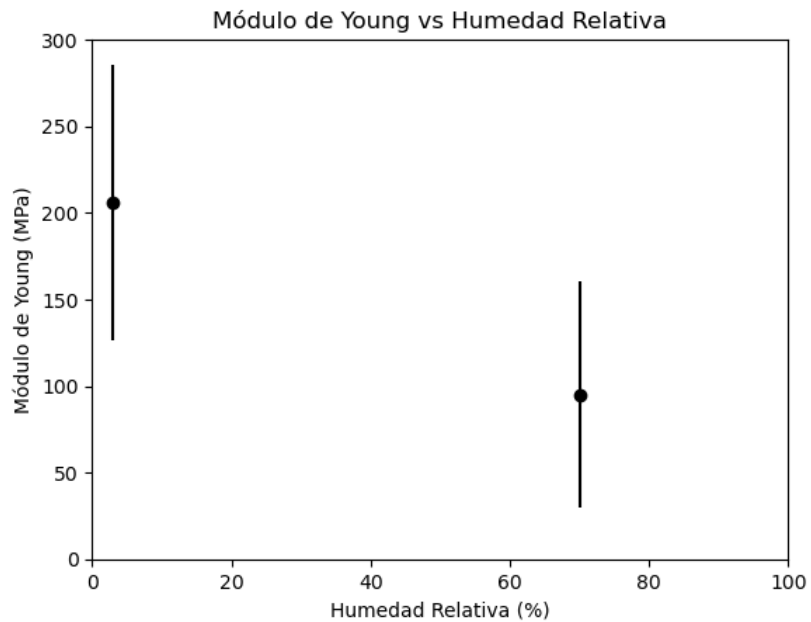


Figura 31: *Módulo de Young de las nanofibras de los experimentos 2 y 3.*

4. Conclusión y Proyecciones

En este trabajo se ha medido experimentalmente el módulo de Young de nanofibras de PVA, con diámetros entre 80 y 150 nanómetros en equilibrio bajo distintos niveles de humedad relativa. Se encontraron valores entre 90 y 340 MPa, concordando con los valores previamente reportados por la literatura. Se implementó una cámara de humedad, temperatura y presión, habilitando una e-AFM en el laboratorio, con la que se consiguieron humedades estables desde un 3% de RH hasta el 70% de RH. Esto fue para determinar cómo se ven afectadas las propiedades mecánicas en situaciones higroscópicas.

Por un error en el diseño experimental, se tomaron pocos datos y bajo condiciones distintas, por lo que no permiten dar resultados concluyentes. Las distintas condiciones refieren a la altura de las nanofibras, la fuerza máxima de las nanoindentaciones, la cantidad de curvas y la punta de cantilever usada. Sin embargo, cuando se analizaron los datos de los experimentos que fueron tomados en condiciones comparables -cantidad de curvas de fuerza, fuerza máxima y misma punta del AFM- a 3 y a 70% de RH, se observó que cuando la humedad es menor, el módulo de Young es mayor. Esta tendencia, que apunta en la dirección de nuestra hipótesis e indica que este material se vuelve más rígido al secarse.

Para obtener resultados con mayor relevancia, que permitan encontrar la relación entre las condiciones de humedad y las propiedades mecánicas, será necesario un diseño experimental más robusto. De partida, realizar secuencias de mediciones en una misma nanofibra desde un ambiente seco hasta un ambiente húmedo. Esto es para evitar que el diámetro de las nanofibra afecte en las mediciones de las propiedades mecánicas, como se ha demostrado sucede [25]. También usar la misma fuerza máxima y punta de AFM para todos los análisis mecánicos.

Se hace necesario implementar una jaula acústica para aislar el sistema de las vibraciones del laboratorio, y así mejorar la precisión de las mediciones. Adicionalmente, para obtener una medición del módulo de Young radial de una nanofibra de PVA puro, es decir, con 0% de agua. Se pueden secar las muestras al vacío a una temperatura ligeramente superior a la temperatura de transición vítrea.

En una futura investigación más profunda en este tema, se deberían analizar múltiples nanofibras, de distintos diámetros, distintas concentraciones de la solución a electrohilar, y hasta se podría estudiar el efecto de otros compuestos, electrohilando mezclas como PVA con quitosano. En cada caso, realizando secuencias de mediciones a distinta humedad relativa, como se mencionó anteriormente.

Finalmente, la técnica de análisis mecánico con AFM ha mostrado tener gran potencial para estudiar nanomateriales con aplicaciones biológicas.

Referencias

1. Hale, R. C., Seeley, M. E., La Guardia, M. J., Mai, L. y Zeng, E. Y. A Global Perspective on Microplastics. *Journal of Geophysical Research: Oceans* **125**. <https://doi.org/10.1029/2018JC014719> (ene. de 2020).
2. DeMerlis, C. C. y Schoneker, D. R. Review of the Oral Toxicity of Polyvinyl Alcohol (PVA). *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **41**, 319-26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504164/> (2003).
3. Arshad, M. S. *et al.* Tissue engineering approaches to develop cultured meat from cells: A mini review. *Cogent Food Agriculture* **3** (ed. Yildiz, F.) <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23311932.2017.1320814> (mayo de 2017).
4. Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T. y Kumar, D. S. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: a Review. *International Journal of Polymer Science* **2011**, 1-19. <https://www.hindawi.com/journals/ijps/2011/290602/> (2011).
5. O'Brien, F. J. Biomaterials Scaffolds for Tissue Engineering. *Materials Today* **14**, 88-95. [https://10.1016/s1369-7021\(11\)70058-x](https://10.1016/s1369-7021(11)70058-x) (mar. de 2011).
6. Young, R. D. *Introduction to polymers*. Chapter 1 (Chapman, 1981).
7. Ben Halima, N. Poly(vinyl alcohol): Review of Its Promising Applications and Insights into Biodegradation. *RSC Advances* **6**, 39823-39832. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ra/c6ra05742j#cit1> (2016).
8. Abdullah, Z. W., Dong, Y., Davies, I. J. y Barbhuiya, S. PVA, PVA Blends, and Their Nanocomposites for Biodegradable Packaging Application. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* **56**, 1307-1344 (ene. de 2017).
9. Alberti, T. B., Coelho, D. S., de Prá, M., Maraschin, M. y Veleirinho, B. Electrospun PVA Nanoscaffolds Associated with Propolis Nanoparticles with Wound Healing Activity. *Journal of Materials Science* **55**, 9712-9727. (2022) (mar. de 2020).
10. Aslam, M., Kalyar, M. A. y Raza, Z. A. Polyvinyl alcohol: a Review of Research Status and Use of Polyvinyl Alcohol Based Nanocomposites. *Polymer Engineering Science* **58**, 2119-2132 (abr. de 2018).
11. Li, H., Zhang, W., Xu, W. y Zhang, X. Hydrogen Bonding Governs the Elastic Properties of Poly(vinyl alcohol) in Water: Single-Molecule Force Spectroscopic Studies of PVA by AFM. *Macromolecules* **33**, 465-469 (ene. de 2000).
12. Callahan, J. C. *et al.* Equilibrium Moisture Content of Pharmaceutical Excipients. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **8**, 355-369. (2023) (ene. de 1982).
13. Newman, A. W., Reutzel-Edens, S. M. y Zografi, G. Characterization of the “hygroscopic” properties of active pharmaceutical ingredients. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **97**, 1047-1059. (2019) (mar. de 2008).
14. Huang, J. y You, T. Electrospun Nanofibers: from Rational Design, Fabrication to Electrochemical Sensing Applications. *Advances in Nanofibers*. (2023) (dic. de 2013).

15. Ramakrishna, S. *et al.* Electrospun Nanofibers: Solving Global Issues. *Materials Today* **9**, 40-50. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136970210671389X> (2019) (mar. de 2006).
16. Bhardwaj, N. y Kundu, S. C. Electrospinning: a Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnology Advances* **28**, 325-347 (mayo de 2010).
17. Binnig, G., Quate, C. F. y Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* **56**, 930-933 (mar. de 1986).
18. Alessandrini, A. y Facci, P. AFM: a versatile tool in biophysics. *Measurement Science and Technology* **16**, R65-R92. (2020) (abr. de 2005).
19. Corrales, T. P. *Local Dynamics and Bending Mechanics of Mesostructured Materials* Tesis doct. (2013).
20. Trache, A. y Meininger, G. A. Atomic Force Microscopy (AFM). *Current Protocols in Microbiology* **Chapter 2**, Unit 2C.2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18770536/> (feb. de 2008).
21. Neugirg, B. R., Koebley, S. R., Schniepp, H. C. y Fery, A. AFM-based Mechanical Characterization of Single Nanofibres. *Nanoscale* **8**, 8414-8426 (2016).
22. Peresin, M. S. *et al.* Effect of Moisture on Electrospun Nanofiber Composites of Poly(vinyl alcohol) and Cellulose Nanocrystals. *Biomacromolecules* **11**, 2471-2477. (2022) (jul. de 2010).
23. Friedemann, K., Corrales, T., Kappl, M., Landfester, K. y Crespy, D. Facile and Large-Scale Fabrication of Anisometric Particles from Fibers Synthesized by Colloid-Electrospinning. *Small* **8**, 144-153. (2022) (nov. de 2011).
24. Dolan, G. K. *et al.* Dip-and-Drag Lateral Force Spectroscopy for Measuring Adhesive Forces between Nanofibers. *Langmuir* **32**, 13340-13348. (2023) (dic. de 2016).
25. Neugirg, B. R., Burgard, M., Greiner, A. y Fery, A. Tensile versus AFM Testing of Electrospun PVA nanofibers: Bridging the Gap from Microscale to Nanoscale. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **54**, 2418-2424. (2023) (sep. de 2016).
26. Catalan, K. *Inhomogeneous Nanofiber Swelling measured with Environmental AFM* Tesis doct. (dic. de 2020).
27. Yarin, A. L., Kataphinan, W. y Reneker, D. H. Branching in Electrospinning of Nanofibers. *Journal of Applied Physics* **98**, 064501. (2021) (sep. de 2005).
28. Hopcroft, M. A., Nix, W. D. y Kenny, T. W. What Is the Young's Modulus of Silicon? *Journal of Microelectromechanical Systems* **19**, 229-238. <https://sites.engineering.ucsb.edu/~sumita/courses/Courses/ME141B/HopcroftJMEMS.pdf> (abr. de 2010).