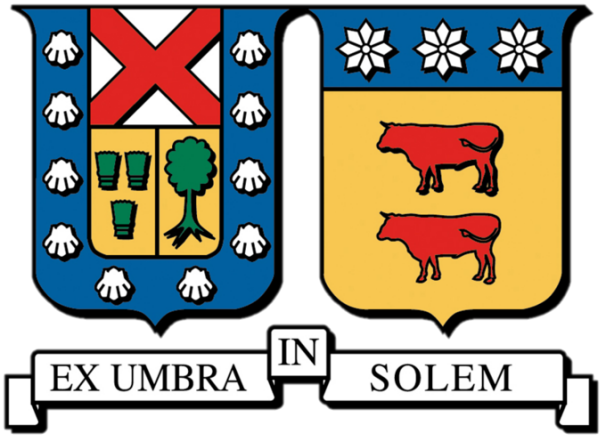
Implementación de tambor rotante: Fabricación de scaffolds por electrohilado a base de PVA y sus propiedades mecánicas

Tesis de pregrado para el grado de
Licenciado en Ciencias, mención Física
Departamento de Física, Universidad Técnica
Federico Santa María, Chile.
Valparaíso, 2023



Tesina escrita por:
Benjamín Schleyer Thiers
nacido en Temuco, Chile.

Advisor : Dr. Tomas P. Corrales
Committee : Dr. Cristian Acevedo
Dra. Valeria del Campo

Esta investigación fue realizada entre Septiembre de 2022 y Marzo de 2023, bajo la guía del Prof. Dr. Tomas P. Corrales en el departamento de física de la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

Agradecimientos

Me gustaría comenzar por agradecer a mi familia, mis padres Juan y Karin, quienes me dieron todo lo que siempre necesité para formar mi propio camino, y avanzar con seguridad hacia mi futuro. No podría describir lo mucho que agradezco la paciencia con la que me educaron y el entusiasmo con el que me enseñaron todos los días de mi vida, haciendo de mí un niño feliz. A mis abuelos y abuelas quienes siempre se preocuparon por nosotros, a todos mis tíos y tías, mis primos y primas por darme los mejores recuerdos. A mi hermano, por ser mi mejor amigo toda la vida, darme infinidad de risas y peleas, y estar siempre para mí.

Debo agradecer profundamente al Profesor Dr. Tomás P. Corrales por su guía. Estoy muy agradecido de todo lo que he aprendido trabajando con usted, me siento feliz de haberme probado como físico experimental y de haberme topado con un área de estudio que me guste tanto. A pesar de que entré hace relativamente poco a su grupo de laboratorio me he sentido aceptado e incluso parte de una pequeña familia compuesta de mis compañeros de laboratorio. Diego y Sebastián, admiro mucho su forma de ser, y estoy más que agradecido por la cálida bienvenida que me dieron desde el inicio, siempre dispuestos a enseñarme de todo y apoyarme. Agradezco a Nicole Orellana y Dragica Bezjak, de biotecnología, por todo lo que me enseñaron en tan poco tiempo.

Gracias a mis amigos por confiar en mí y darme siempre todo su apoyo, cada uno de ustedes merece el cielo. Gracias a Pablo y Jorge por estar desde el comienzo de mi camino como Físico, a Matías por acompañarme a estudiar tantas horas y a "Delet this"por ser el mejor grupo de la historia.

Merecen un espacio de agradecimiento mis colegas ayudantes de FIS 120 por ser el increíble grupo que son y darme la oportunidad de conocer gente asombrosa.

Agradecer a fondecyt regular 1211901 "*Multiscale mechanical properties of hygroscopic nanofibers*"por aportar los fondos para este trabajo.

Resumen

En la ciencia de biomateriales el uso y optimización de andamios (o *scaffolds*) ha significado un gran avance en el cultivo y diferenciación celular, en específico para este caso, miocitos. Al utilizar métodos de fabricación basados en soluciones poliméricas, se facilita la mezcla de varios componentes biocompatibles, con el fin de asegurar la fijación celular, y su crecimiento sobre la superficie del andamio. Es posible mediante la técnica de electrohilado, sintetizar andamios poliméricos conformados por nanofibras mezcladas de alcohol polivinílico, quitosano y gelatina de salmón, otorgándole las características deseadas al andamio.

En este trabajo, modificamos un cilindro rotatorio como colector de nanofibras de electrohilado. Utilizando un tacómetro digital se relacionó la frecuencia del circuito que controla el tambor, con la frecuencia de giro del cilindro en revoluciones por minuto. Esta calibración es finalmente proyectada en una pantalla digital. Usando este tambor rotatorio, se obtienen andamios compuestos de nanofibras con alineamiento. Luego, se utilizó un experimento de tracción para medir las propiedades mecánicas de los andamios electrohilados con, y sin alineamiento de nanofibras. Las muestras sin alineamiento son producidas ocupando un colector estático de electrohilado. Finalmente, se compara el módulo de Young de andamios electrohilados con y sin alineamiento, para nanofibras de alcohol polivinílico puro, y también su mezcla con quitosano y gelatina de salmón.

Índice general

Agradecimientos III

1. Introducción 1
- 1.1. Polímeros . . . 2
- 1.2. Fabricación de fibras a partir de polímeros . . . 3
  - 1.2.1. Electrohilado . . . 3
- 1.3. Estrés y deformación . . . 5
  - 1.3.1. Módulo de Young . . . 6
- 1.4. Objetivos . . . 6

2. Resultados previos y marco teórico 7
- 2.1. Propiedades mecánicas PVA . . . 7
- 2.2. Electrohilado en cilindro rotatorio . . . 9

3. Montaje experimental 11
- 3.1. Calibración frecuencia de pulsos eléctricos a RPM . . . 11
- 3.2. Configuración y programación de pantalla LED . . . 12
  - 3.2.1. Código . . . 12
  - 3.2.2. Armado del arduino . . . 13
  - 3.2.3. Ensamblaje . . . 14
- 3.3. Protocolo para electrohilado . . . 16
  - 3.3.1. Elabroación mezcla PVA/GS/QUI . . . 16
  - 3.3.2. Electrohilado . . . 17
- 3.4. Metodología prueba de estrés mecánico . . . 18

4. Resultados y Análisis 23

5. Conclusiones y Perspectiva a futuro 31

Bibliografía 35

Capítulo 1

Introducción

La ciencia de biomateriales ha sido de suma importancia para avances médicos y biológicos, permitiendo la creación de tejidos desde cultivos celulares, como la piel, filtros de aire ([10], [14]), o para optimizar la reparación de estos mismos, como es el caso de cartílagos, huesos, piel, etc.([18]). Un elemento muy efectivo para estos procesos de reparación o cultivo, son los andamios (o *scaffolds*), utilizados como *canvas* o base para realizar los trabajos anteriormente mencionados, esto se debe a que generan una estructura de soporte o esqueleto para la ubicación de las células, permitiéndoles acelerar el proceso de fijación y por consecuencia una más rápida reproducción([6]). Por otro lado en los últimos años se ha buscado que los *scaffolds* presenten ciertas propiedades para asegurar una respuesta adecuada del entorno en el que se introducen. primeramente se busca biocompatibilidad, lo que refiere a la respuesta e interacción del entorno biológico con el material. Dicha respuesta dependerá de numerosos factores tanto del ambito bioquímico como del físico. Además de la biocompatibilidad se le suma la capacidad de biodegradarse ([14],[11]), y que durante este proceso, la biocompatibilidad se mantenga([3]).

Esta investigación tiene como objetivo estudiar las propiedades mecánicas de los andamios de PVA y PVA/GS/QUI. En este contexto un andamio cumpliría con el rol de sustrato, es decir, es el medio en el que se fijarán, alimentarán y reproducirán células, particularmente, células musculares. Con el fin último de replicar un tejido muscular más complejo, por ejemplo, un músculo o un trozo de carne. Para que esto ocurra los miocitos deben crecer de una manera determinada, es decir, deben tener una distribución alargada, lo que les permitiría cumplir su función de contraerse y relajarse. Por lo tanto, idealmente un scaffold compuesto de fibras, las cuales, individualmente son el sustrato de adhesión para las células, deberían estar alineadas de tal manera que el crecimiento de los miocitos permita la funcionalidad contráctil de un tejido muscular. Debido a esto, una parte importante es el trabajo de adaptación realizado en el tambor rotante, con el fin de fabricar membranas de PVA con fibras alineadas, en función de obtener andamios que permitan una correcta fijación y reproducción de las células musculares.

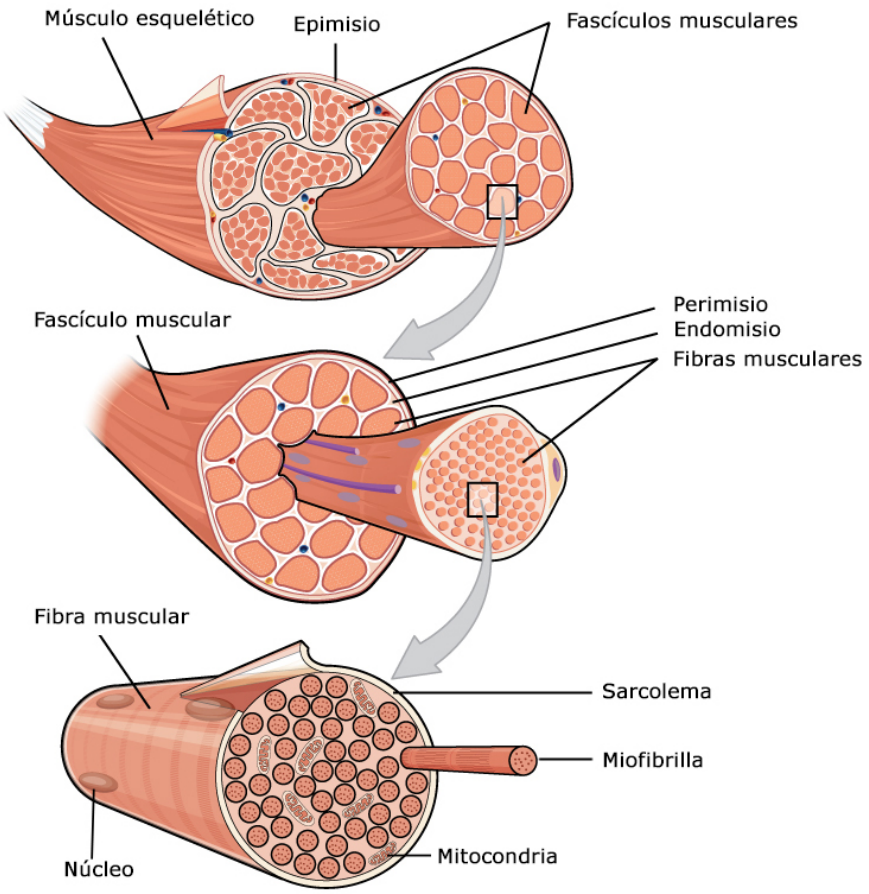


Figura 1.1: *Esquema de tejido muscular*

Por otro lado tenemos 2 tipos de solución para formar los scaffolds, la de PVA, que corresponde a una mezcla de alcohol polivinílico al 10 % en agua, y la solución nombrada como PVA/GS/QUI, esta mezcla está conformada por PVA al 10 %, Gelatina de Salmón al 0.9 % y Quitosano al 0.6 %. La mezcla de PVA tiene características de biocompatibilidad, además que permite la producción de scaffolds por medio de electrohilado. Sin embargo, esto no es suficiente para considerarlo como un andamio óptimo en este contexto, ya que requerimos una alta fijación, y un desarrollo ordenado de los miocitos, lo que se consigue, según la investigación de ([4]) con una mezcla de PVA/GS/QUI.

1.1. Polímeros

Corresponden a cadenas de moléculas generalmente compuestas de carbono (columna vertebral de la cadena) junto a elementos como hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, etc. Donde el largo de estas depende del número de moléculas N unidas

entre sí por un enlace covalente. A este número de unidades monoméricas se le conoce como grado de polimerización. Luego la nomenclatura de los polímeros suele depender de monómero del que están compuestos, un ejemplo muy simple es el del polietileno, obtenido a partir de la polimerización del etileno. Por otro lado, existen polímeros que no tienen una columna formada por carbono, sino que se componen de otros elementos como el silicio, un ejemplo para esto es el PDMS o polidimetilsiloxano.

En esta investigación nos ocuparemos de los polímeros a base de carbono, más específicamente alcohol polivinílico, cuyo monómero está representado por $[CH_2CH(OH)]$ ([5]), y que posee varias propiedades, como su biocompatibilidad, se puede hidrolizar a diferentes niveles y es soluble en agua. Gracias a esta última característica, es posible utilizarlo en diferentes concentraciones, lo que nos permite realizar variadas técnicas de sintetizado y fabricación ([15]).

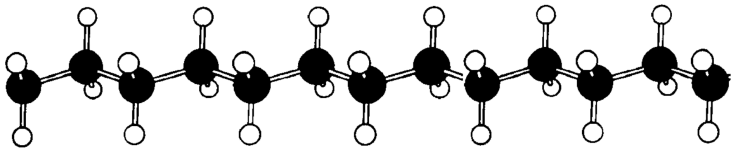


Figura 1.2: *ejemplo de polímero PE, obtenido de [15].*

1.2. Fabricación de fibras a partir de polímeros

La fabricación de polímeros es posible gracias a reacciones químicas englobadas en el concepto de polimerización. Sin embargo nosotros no buscamos sintetizar el polímero en sí, sino que fibras compuestas del mismo. Para esto utilizamos la técnica de electrohilado (también llamado *electrospinning*). Esta técnica nos permitirá crear nanofibras que después de un tiempo de exposición determinado formarán una membrana polimérica ([1]).

1.2.1. Electrohilado

Para fabricar nanofibras poliméricas mediante electrohilado, primero se debe preparar una solución con el polímero y un solvente adecuado. Luego se empuja la solución por una aguja de jeringa.Esto genera un menisco al final de la aguja, gracias a fuerzas de interacción (tensión superficial). Luego un alto potencial eléctrico es aplicado a la jeringa, la cual carga eléctricamente la mezcla. Esta interacción electrostática se mantendrá en equilibrio mientras ambas fuerzas (tensión

superficial de la solución en el menisco y las fuerzas electrostáticas internas) sean iguales, generando una estructura llamada cono de Taylor ([17]) (Figura 1.3). En el momento en que la fuerza eléctrica sea mayor a la tensión superficial de la solución se formarán pequeños "hilos"(*jets*) de la mezcla que serán elongados y eyectados al colector frente a la aguja de jeringa. El colector consiste de una placa conductora, que además cierra el circuito, al conectarse a tierra. Sobre el colector se deposita la solución polimérica ya secada durante el trayecto entre el menisco y el blanco, formando nanofibras del polímero perteneciente a la solución.

El proceso de electrohilado continuará mientras exista un caudal constante de la solución que vaya reemplazando el volumen necesario para formar el menisco según el campo eléctrico formado entre la aguja (canal contenedor de la solución) y el colector([16], [13]).

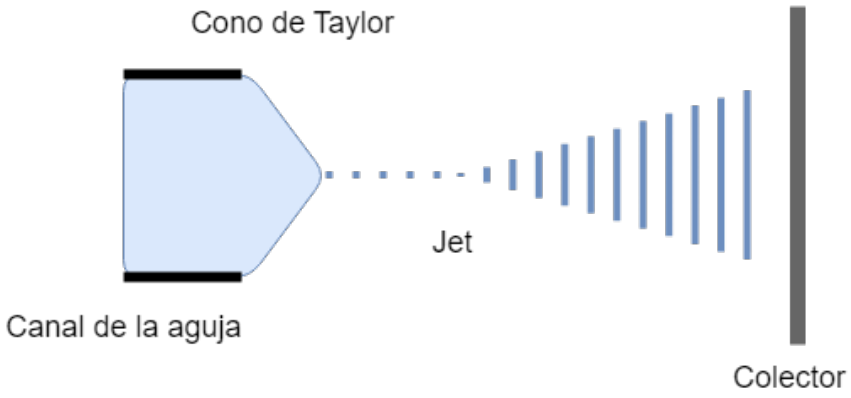


Figura 1.3: *Esquema del cono de taylor. Representación de creación propia.*

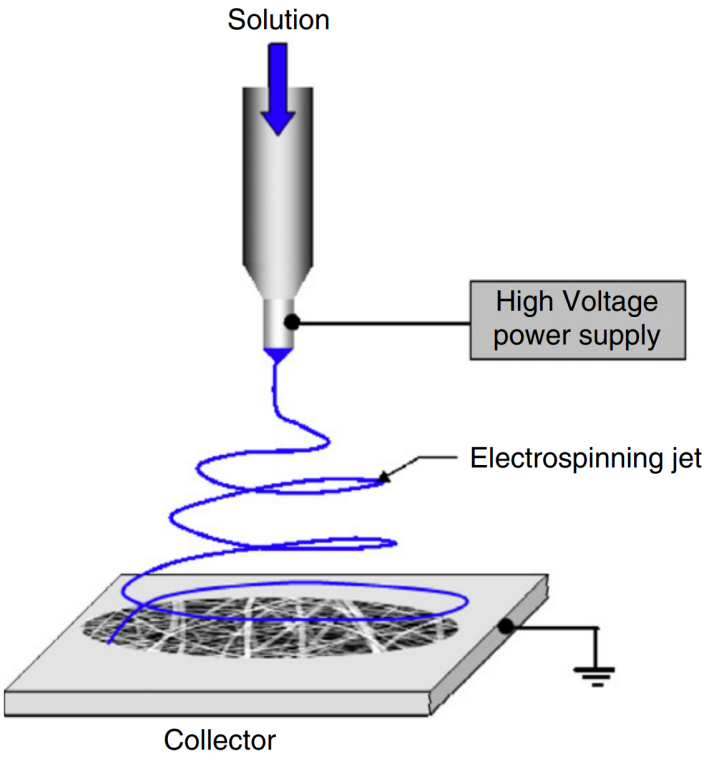


Figura 1.4: *Diagrama electrospinning mostrando las partes que conforman el proceso de electrohilado. Imagen obtenida de ([16]).*

1.3. Estrés y deformación

El estudio de las propiedades mecánicas de un material es de las más requeridas y comunes, ya que permiten la clasificación y caracterización de diversos materiales, según su fuerza y deformación. Las propiedades mecánicas nos entregan una idea de cómo se desempeña el material bajo diferentes contextos.

La tensión y deformación se derivan de medir la fuerza de tracción aplicada a un material junto a la variación del largo del material mientras se la aplica esta fuerza, considerando una deformación constante. Para cuantificar de manera adecuada la tensión y deformación del material, es necesario definir ciertos conceptos. Primeramente entendemos el estrés (σ) como la fuerza de tracción(F) aplicada a un material con un área transversal (A) perpendicular a dicha fuerza .

$$\sigma = F/A \tag{1.1}$$

Luego la deformación relativa la podemos definir como la variación de longitud (Δl) del material en tracción respecto a su longitud inicial (l_0), por lo que

simplemente la representamos por:

$$\epsilon = \Delta l / l_0 \tag{1.2}$$

1.3.1. Módulo de Young

La relación entre el estrés y la deformación relativa de un material es usualmente llamada Módulo de Young, siendo este de manera simplificada, la pendiente de un gráfico de estrés vs deformación. Considerando los conceptos previamente establecidos, podemos escribir una expresión para el Módulo de Young (E) ([19], [2]):

$$Y = \sigma / \epsilon = \frac{F}{A} \frac{l_0}{\Delta l} = \frac{F}{\Delta l} \frac{l_0}{A} \tag{1.3}$$

Con esto podemos caracterizar la deformación que sufre el material en función de la tracción aplicada longitudinalmente a este.

1.4. Objetivos

Los objetivos de esta tesina son, poder fabricar una membrana de nanofibras alineadas de PVA y PVA/GS/QUI por medio de electrohilado sobre un colector cilíndrico con una rotación constante. Luego de buscar muestras buscaremos estudiar las propiedades mecánicas de los andamios fabricados por medio de un experimento de tracción mecánica.

Capítulo 2

Resultados previos y marco teórico

2.1. Propiedades mecánicas PVA

El polímero alcohol polivinílico (PVA) es ampliamente estudiado por su potencial como material para uso en andamios: tiene características de biocompatibilidad, es no tóxico y no cancerígeno([9]). Por lo que además de su uso como andamio tiene una posición bastante favorable para uso en tejidos vivos (ya sea cultivos o aplicaciones médicas). Esto ha motivado la caracterización de este material por su cuenta, y como veremos en la siguiente sección en mezclas con otros materiales o elementos. Lo que nos convoca principalmente en esta investigación son sus propiedades mecánicas.

La investigación realizada por Ezequiel S. Costa-Júnior ([3]) sobre PVA y quitosano (Chi) nos entrega un valor para el módulo de Young cercano a los 100 [MPa] en sus pruebas de control para tracción y deformación de un hidrogel de PVA puro. Una observación interesante es que la curva de tracción vs deformación para PVA puro tiene un comportamiento ligeramente diferente a las mezclas con quitosano. Se puede ver en la Figura 2.1 como la deformación permantente ocurre mucho antes para PVA puro, sin embargo la pendiente inicial nos indicaría un módulo de Young similar en los primeros momentos de la tracción. Incluso se puede observar que la mezcla de Quitosano y PVA en proporción (1:1) tiene una pendiente menor a la esperada, o indicada por los casos previos, no siguiendo un patrón de aumento en módulo.

Un estudio realizado en el contexto de membranas de PVA hibridadas con ZrO_2 y Al_2O_3 ([7]), utiliza como experimento control el PVA sin hibridar. Este informa un resultado para el módulo mecánico del PVA puro, en forma de membrana electrohilada, de 90 ± 20 [MPa].

En otras investigaciones el módulo mecánico para PVA tiene resultados dentro del mismo orden de magnitud. Tenemos el caso de la fabricación de nanocom-

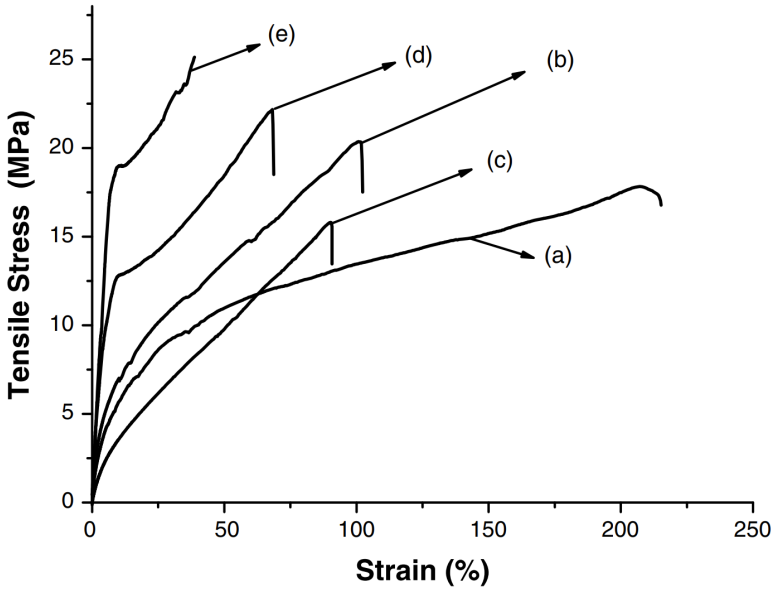


Figura 2.1: *Gráfico de Tracción contra deformación extraído de ([3]), contrastando PVA y mezclas de PVA con quitosano a diferentes concentraciones. (a) PVA puro, (b) Chi/PVA(1:3), (c) Chi/PVA (1:1), (d) Chi/PVA (3:1), (e) Quitosano puro.*

puestos plata-PVA ([8]), donde también se muestra una caracterización mecánica del grupo control de películas delgadas de PVA puro por medio de la evaporación del solvente, Para este caso muestran un gráfico (Figura 2.2) con los módulos obtenidos, y en el caso de 0 % de plata se puede ver como el rango para el PVA es cercano a los 350 ± 150 [MPa] aproximadamente.

Otro estudio muestra el efecto de la humedad relativa en nanofibras de PVA y nanocristales de celulosa ([12]). En este caso es más difícil establecer una comparación, ya que la humedad relativa en los otros casos no fue medida. Aún así, los datos pueden ser comparables debido a que la humedad relativa en el ambiente es cercana al 70 % RH. Para este caso el módulo de Young informado es de 0.4 [MPa], lo que significaría un valor bastante menor a los otros casos estudiados, pudiendo ser producto de los repetidos ciclos de variación en la humedad relativa en las que se conservaron y probaron las membranas.

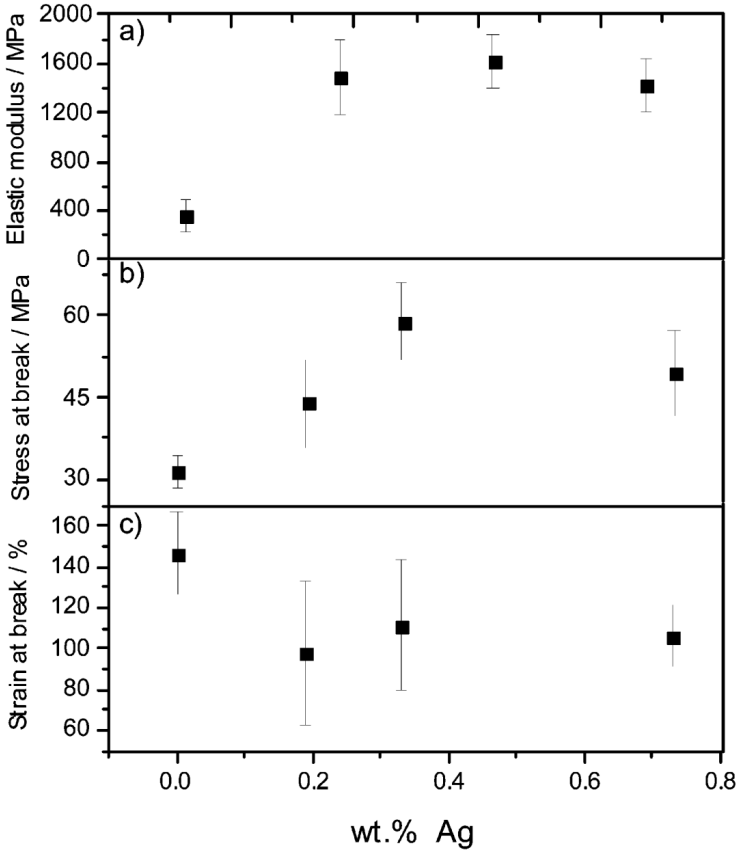


Figura 2.2: *Gráfico extraído de ([8]), mostrando en función del porcentaje de Ag: (a) Módulo mecánico, (b) Tracción al romperse, (c) deformación al romperse.*

2.2. Electrohilado en cilindro rotatorio

La técnica de electrohilado es un método para fabricar fibras de tamaños que rondan los nanómetros. Para largos tiempos de exposición se comienza a formar un capa delgada del polímero gracias a la acumulación de las fibras, como una especie de tejido aleatorio, o superficie porosa, la cual denominamos membrana. Con la finalidad de reducir este factor de aleatoriedad en la conformación del andamio, se han introducido variadas técnicas complementarias al *electrospinning* ([16]), una de ellas consiste en usar como colector un tambor rotatorio, que al recibir el *jet* de polímeros, se va depositando de manera más ordenada. Como analogía podríamos pensar en un carrete que al girar enrolla de manera relativamente ordenada el hilo ([13]).

Para esto es necesario tener una forma de monitorear las revoluciones por minuto (RPM) a las que el tambor gira, y poder controlar esta variable. Ya que es sabido que el grado de alineación de las nanofibras depende de la velocidad de

rotación del tambor.

Capítulo 3

Montaje experimental

Durante la investigación se pasó por varios procesos de modificación, construcción y experimentación, por lo que esta sección se dividirá en 4 partes principales. Primero se explicará la calibración del tacómetro digital. Después se detallará la configuración del chip arduino utilizado para mostrar los resultados en la pantalla LED. Luego se mostrarán los cuidados y el protocolo utilizado para realizar el proceso de electrohilado. Finalmente se describirá la metodología requerida para finalmente realizar las pruebas de estrés mecánico y obtener los datos para el módulo de Young de nuestras membranas electrohiladas.

3.1. Calibración frecuencia de pulsos eléctricos a RPM

En primer lugar fue necesario identificar la señal emitida por el sistema controlador del motor (Figura 3.1), de esta se obtuvo la frecuencia del pulso que se entregaba mediante un multímetro.

Luego se instaló una configuración consistente de un tacómetro digital infrarrojo, un material reflectante adherido en una de las bases del cilindro y el multímetro conectado al controlador del motor. Se fue aumentando de manera graduada la frecuencia del circuito, gracias a un potenciómetro instalado en la caja, y de esta manera se fue anotando el valor de la frecuencia entregado por el multímetro y el valor correspondiente a los RPM detectados por el tacómetro.

Cabe destacar que durante todo el proceso, la frecuencia, tanto del circuito como la medida por el tacómetro en RPM, variaban ligeramente.

Ya con los valores obtenidos, se construyó un gráfico, el que nos mostró una relación lineal entre ambas variables, y la pendiente, lo que se utilizaría como factor de conversión(Figura 3.2).

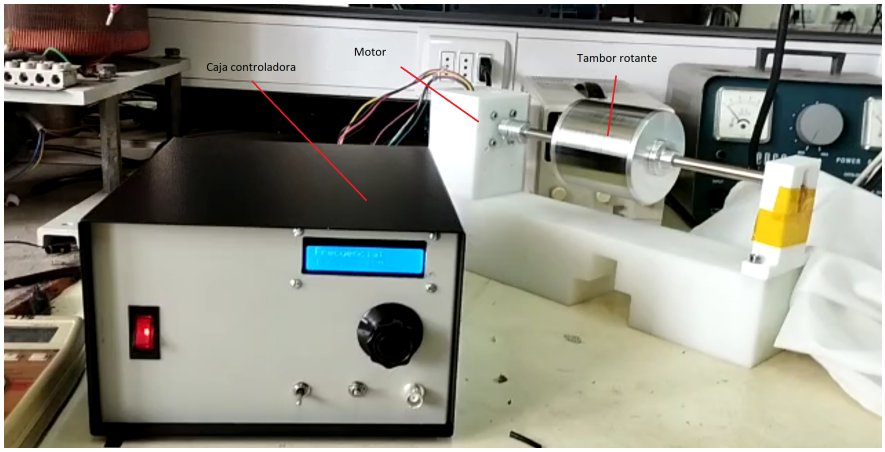


Figura 3.1: *Imagen del controlador y el tambor rotante.*

3.2. Configuración y programación de pantalla LED

Teniendo el factor de conversión de la frecuencia entregada por el multimetro a RPM del cilíndro rotatorio se comenzó a preparar un chip Arduino UNO con la capacidad de realizar esta conversión automáticamente en tiempo real y que se transmitiera directamente a una pantalla LED.

3.2.1. Código

El código debe lograr detectar los pulsos de entrada, provenientes del controlador, interpretarlos como una frecuencia, y finalmente realizar la conversión encontrada previamente.

En la primera parte del código, se definen las variables y los puertos del chip a utilizar. En la línea 4 se define la dimensión de la pantalla LED. A partir de la línea 14 se escribe la función para configurar los puertos, establecer los parámetros de la pantalla y los mensajes preliminares que se mostrarán al prenderla (Figura 3.3a).

En la segunda parte del código, se definen las variables que se refrescarán con el *loop* interno del chip y las funciones que se utilizarán en cada "*tick*"de tiempo. Estas son la función *pulseIn* que almacena el tiempo en el que el pulso está en su máximo (línea 33) y el tiempo que le tomará el mínimo (línea 36).

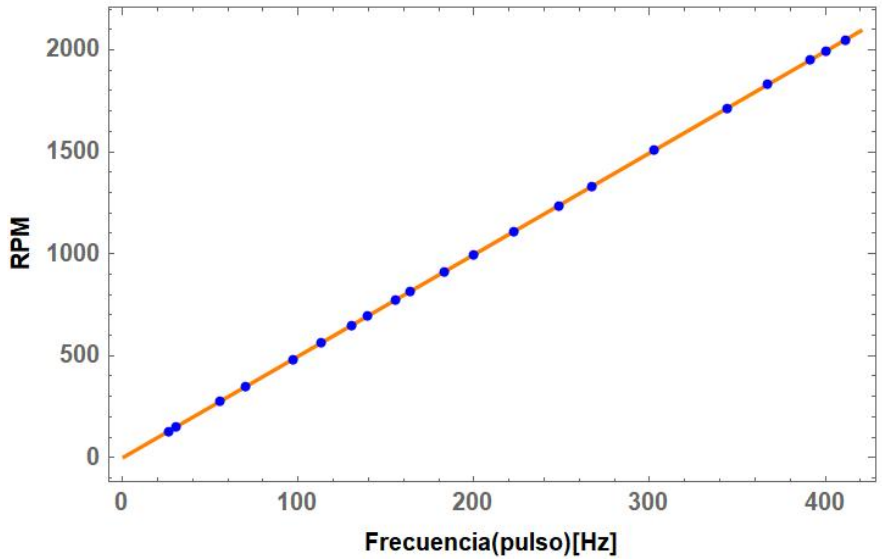


Figura 3.2: *Gráfico de la frecuencia del pulso del sistema eléctrico vs la frecuencia del tambor en RPM. Ajuste realizado en color naranjo, y datos medidos con tacómetro en azul. Ajuste obtenido en mathematica:* $f_{rpm} = -0{,}969 + 4{,}985 f_{Hz}$. *Donde* f_{rpm} *es la frecuencia del tambor en RPM y* f_{Hz} *es la frecuencia del circuito en* Hz.

Luego se define un tiempo total sumando ambos datos almacenados, teniendo este período, se divide el tiempo de un segundo (el programa cuenta el tiempo en microsegundos) por el tiempo total de un pulso completo (máximo más mínimo). Así obtenemos la frecuencia, por lo que solo restaría multiplicar por el factor de transformación obtenido anteriormente y mostrar este valor en la pantalla (Figura3.3b).

3.2.2. Armado del arduino

Debido al conector incluido en la pantalla (Interfaz I2C), se simplifica bastante el proceso de conectar el chip Arduino UNO con el monitor LED

Gracias al interfaz I2C es posible reducir la cantidad de cables, el potenciómetro para regular el brillo de la pantalla viene incluido, así como todo el circuito con las resistencias necesarias para que funcione la pantalla LED, por lo que solo restaría hacer las conexiones directamente al chip Arduino UNO como se muestra en la Figura (3.5).

Finalmente se instaló un regulador de voltaje, mostrado en la Figura (3.6) para poder extraer la energía directamente de la fuente de poder ya alojada en el controlador, permitiéndonos trabajar en los rangos óptimos de voltaje para el chip.

```ino
#include <Wire.h>
#include <LiquidCrystal_I2C.h>

LiquidCrystal_I2C lcd(0x27,16,2);

const int pulsePin = A0;
long pulseHigh;
long pulseLow;
int groupHigh;
int groupLow;
float pulseTotal;
float frequency;

void setup() {
  pinMode(pulsePin, INPUT);
  lcd.init();
  lcd.backlight();
  lcd.setCursor(0,0);
  lcd.print("Encendiendo");
  lcd.setCursor(0,1);
  lcd.print("Contador Frec");
  delay(2000);

}
```

(a) *Código de configuración*

```ino
void loop() {
  lcd.setCursor(0,0);
  lcd.print("Frecuencia:   ");
  lcd.setCursor(0,1);
  lcd.print("               ");


 if (pulseIn(pulsePin,HIGH) >= 800){
   pulseHigh = pulseIn(pulsePin, HIGH);
 }
if (pulseIn(pulsePin,LOW) >= 800){
   pulseLow = pulseIn(pulsePin, LOW);
 }
  //pulseHigh = pulseIn(pulsePin, HIGH);
  //pulseLow = pulseIn(pulsePin, LOW);


  pulseTotal = pulseHigh + pulseLow;
  frequency=4.985*(1000000/pulseTotal);

  lcd.setCursor(0,1);
  //lcd.print(pulseIn(pulsePin,HIGH));
  lcd.print(frequency);
  lcd.print(" RPM");
  delay(500);

}
```

(b) *Código del Loop*

Figura 3.3: *Imágenes del código utilizado para configurar la pantalla LED y obtener el valor de la frecuencia del cilindro rotatorio.*

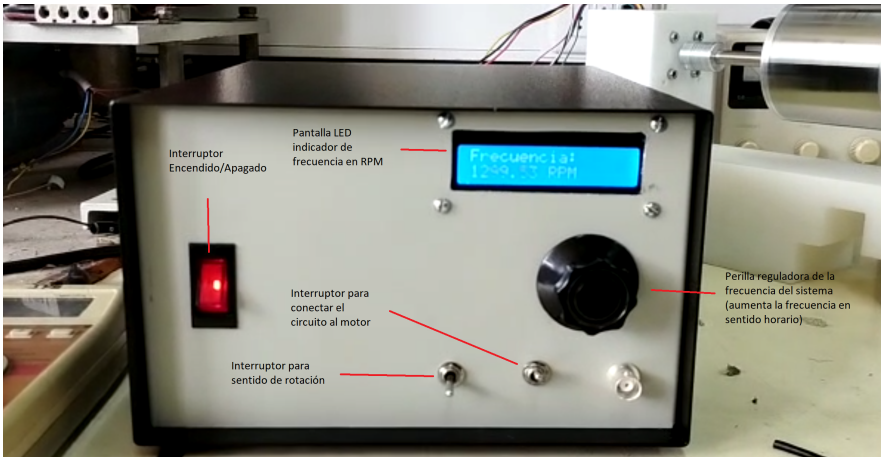


Figura 3.4: *Frontis de la caja controladora del motor para el tambor rotante.*

3.2.3. Ensamblaje

Luego de tener los 3 componentes preparados, se prosigue instalando cada uno de manera adecuada en la caja del controlador, como se muestra en la Figura (3.5). Para esto fue necesario colocar un soporte de aluminio a un costado, cortar un orificio para la disposición de la pantalla LED y realizar perforaciones en las esquinas de este para fijar la pantalla como se ve en la Figura (3.4).

De manera que el chip de Arduino, el LED y el convertidor de voltaje no

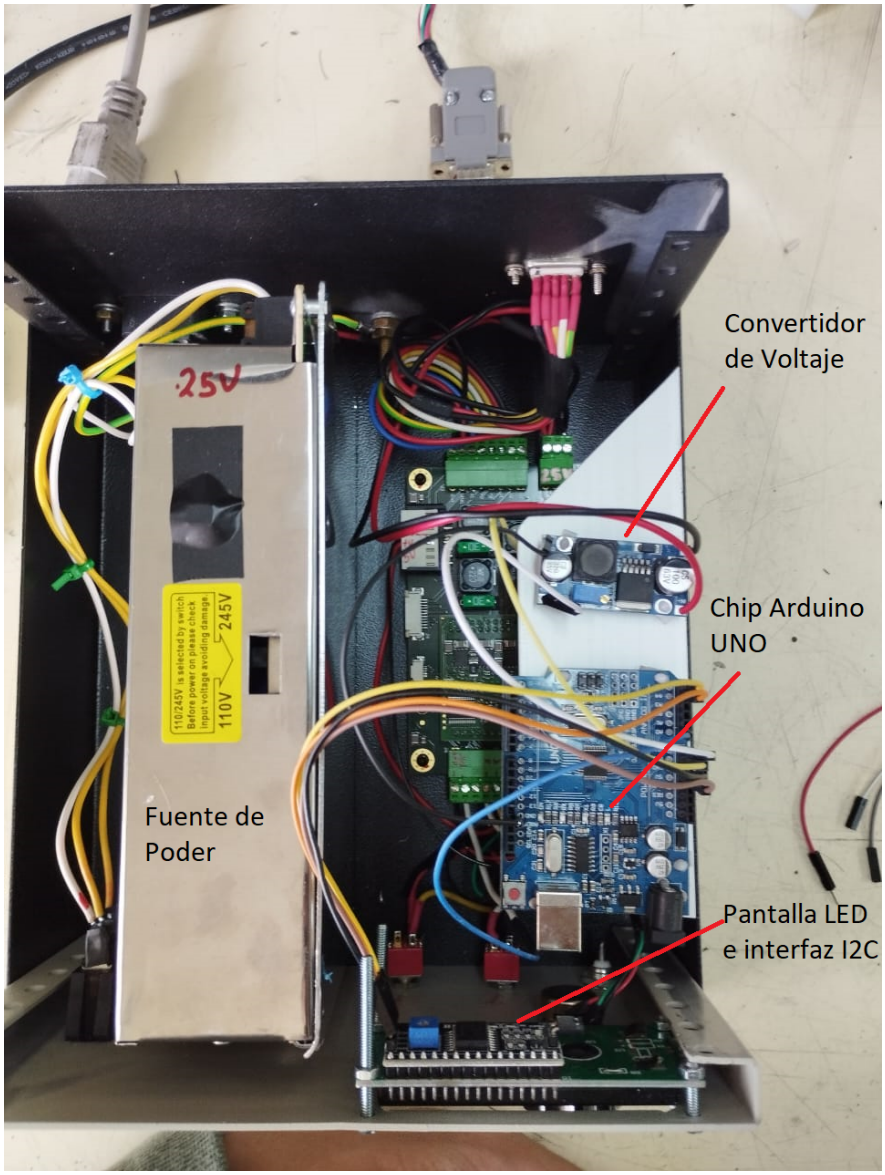


Figura 3.5: *Chip arduino UNO conectado al Interfaz LED y la fuente de poder dentro de la caja del controlador.*

entorpecieran la apertura de la caja quedaron distribuidos en la pieza inferior anterior de esta, esto nos provee de la ventaja de poder realizar chequeeos o modificaciones sin mayor complicación.

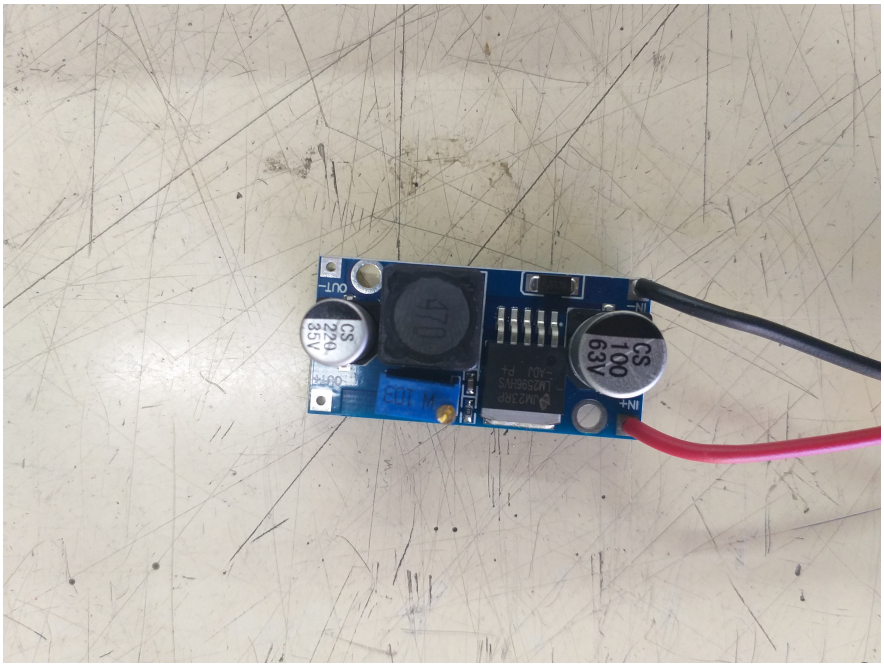


Figura 3.6: *Regulador De Voltaje Lm2596 Dc-dc Buck.*

3.3. Protocolo para electrohilado

En general el protocolo tanto de elaboración, mezcla y preparación del PVA/GS/QUI y el de electrohilado fue realizado por integrantes del centro de biotecnología, sin embargo en esta sección describiremos todos los procesos y cuidados necesarios para ambas metodologías.

3.3.1. Elabroación mezcla PVA/GS/QUI

Para le elaboración de la mezcla se siguió el protocolo ya existente ([6]), retomaremos para este caso desde la mezcla desde la elaboración de la mezcla, considerando los elementos que la componen ya preparados:

Esta solución considera un mínimo de 25 [mL] para poder ser utilizado en el electrohilado, se deben mezclar 12.5 [mL] de solución PVA (10 %), 7.5 [mL] de gelatina de salmón (0.9 %) y 5 [mL] de quitosano (0.6 %). Todo esto en frascos Duran Schott de 50 [mL], se requiere utilizar agitador magnético en las soluciones.

El orden de agregación debe ser, primero la solución de PVA 20 % p/p, usando una probeta y con la solución caliente para una mejor manipulación. En segundo lugar se debe agregar la gelatina de salmón 3 % p/v, con una pipeta estéril y una propipeta. Luego con una pipeta estéril y una propipeta agregar el quitosano 3 % p/v, para este caso la solución debe estar caliente facilitando su manipulación. Finalmente se agita la mezcla durante 1 hora a 70 °C, con agitación constante de

350 stir, hasta lograr una solución homogénea. En caso de que no se vaya usar la mezcla el mismo día, almacenar a 4 °C

3.3.2. Electrohilado

Para electrohilar se utilizará el electrospinning UTFSM "hecho en casa"junto a una bomba de jeringa (Figura 3.7). Se toman los siguientes pasos si la solución fue refrigerada:

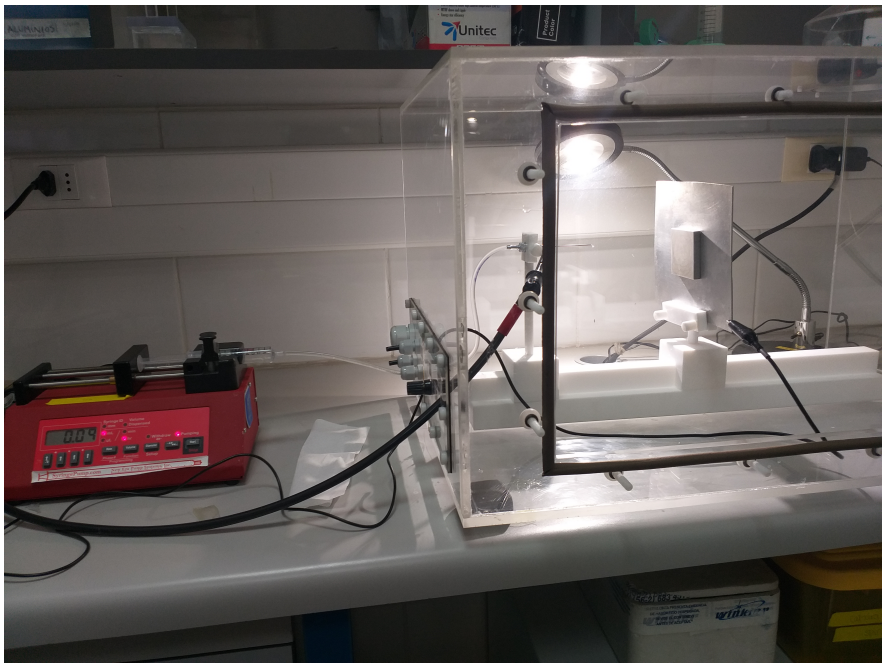


Figura 3.7: *Sistema de bombeo para la jeringa (New Era Pump Systems) a la izquierda con una jeringa de 10 [mL] Nipro, Sistema de electrohilado a la derecha conectado por medio de una manguera a la jeringa, terminando en una aguja roma de calibre 19 (G) en el soporte de teflón.*

Calentar la solución almacenada en un baño termorregulado a 70 °C. Una vez llegue a la temperatura, calentar la solución 30 minutos con agitación a 250 stir y luego 30 minutos a 500 stir (Hasta que se vea una solución homogénea).

Se debe tener la máquina de electrohilado limpia para que el electrohilado funcione de manera adecuada. El protocolo de limpieza consiste en:

Mantener limpia la cámara de electrospinning, limpiar los colectores, aguja roma de calibre 19 (G) (Ramé-hart instrument co, US), Manguera de electrospinning (Ramé-hart instrument co, US) y secarlos antes del uso. procurar que las jeringas 10mL Nipro no estén obstruidas, en caso contrario limpiar con Etanol 70 %.

Luego se debe enchufar/conectar el sistema de bombeo (New Era Pump Systems, Inc., EE. UU.), configurado con los parámetros a usar. Finalmente la fuente de voltaje debe estar conectada y preparada para usarse (procurar no encenderla hasta que esté listo todo el montaje, ya que genera potenciales de muy alto voltaje).

Para trabajar la solución en el electrohilado, debe estar a temperatura ambiente, por lo que se recomienda dejar enfriar unos 30 minutos la mezcla.

Ya con la mezcla temperada se debe armar el sistema de electrohilado: Poner la aguja roma de calibre 19 (G) en el soporte y luego poner el plato colector en el soporte asegurándose que este quede a 10cm de la punta de la aguja (distancia aguja-colector=10cm). Conectar la mangera de electrospinning a la aguja roma de calibre 19 (G), como se observa en la Figura 3.8. Colocar además el positivo (+) de la fuente en la aguja roma de calibre 19 (G), y la tierra de la funte en el plato colector (de esta manera se cierra el circuito, de lo contrario no se electrohilará el polímero).

Si la solución tiene muchas burbujas pasarla a un tubo Falcon de 50mL y centrifugrala a 1780rpm por 2min a 24^{o}C. Luego usando una jeringa de 10mL Nipro tomar 10mL de la solución a electrohilar. Colocar la jeringa que contiene la solución a electrohilar en el sistema de bombeo (New Era Pump Systems). Conectar el otro extremo de la mangera de electrospinning a la jeringa que contiene el polímero. Luego sin iniciar la fuente de voltaje, encender la bomba y dejarla estabilizando el caudal unos 10 minutos. Finalmente encender la fuente de voltaje a 7 [kV] y dejar durante 4hrs electrohilando.

Para el caso de electrohilado con el tambor rotatorio debemos instalar el cilindro dentro de la caja de electrohilado y seguir los mismos pasos que en el proceso anterior, con la excepción de que debemos conectar la tierra en el eje del cilindro como se indica en la Figura (3.9), además se debe prender el sistema del tambor rotante, configurar los RPM deseados con la perilla y esperar 2-3 minutos a que se estabilice la frecuencia, por último se recomienda cubrir la superficie del cilindro con aluminio para facilitar la extracción del andamio ya finalizado.

3.4. Metodología prueba de estrés mecánico

Las pruebas de tracción mecánica son realizadas por una configuración que consiste de un motor acoplado a un soporte donde las muestras serán colocadas, un sensor de tensión, un circuito de arduino para controlar y monitorear el proceso de tracción y una laptop que servirá como centro de almacenamiento de datos y de calibración (Figura 3.10), además mostrará los resultados en tiempo real a través de un gráfico de Fuerza vs desplazamiento.

Antes de comenzar las pruebas, es necesario medir las dimensiones de cada andamio para tener las medidas correctas a la hora de analizar el módulo mecáni-

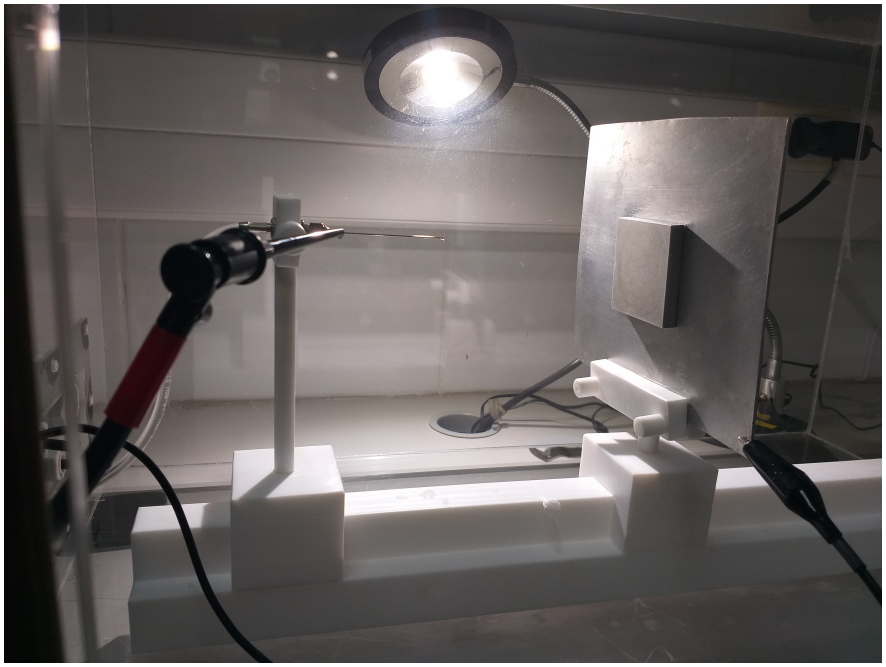


Figura 3.8: *Imagen de la aguja instalada sobre el soporte de teflón y con la manguera conectada.*

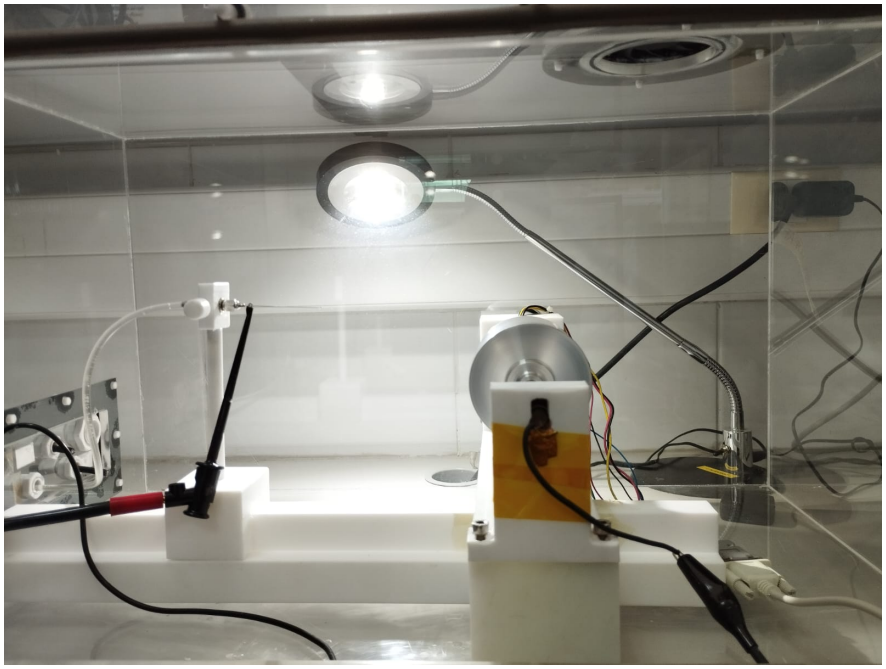


Figura 3.9: *Sistema de electrohilado con el cilindro rotatorio instalado y calzado en el soporte de la caja para electrospinning.*

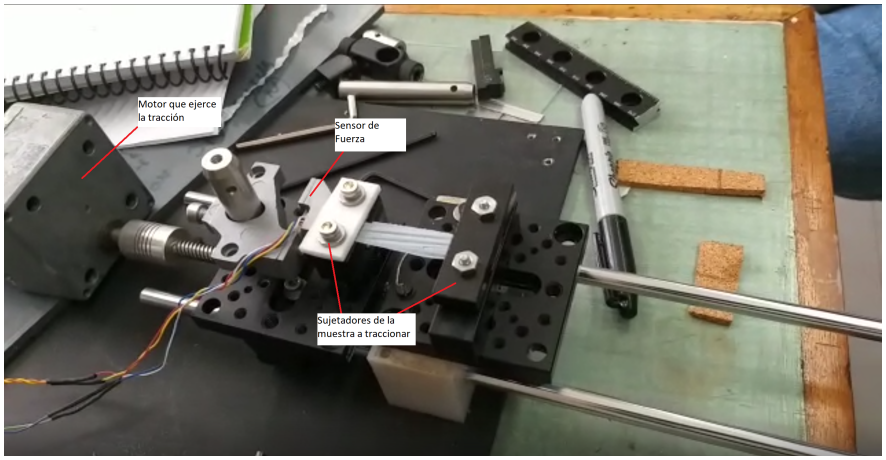


Figura 3.10: *Mecanismo de tracción con una membrana de muestra.*

co, esto fue realizado con una regla para el largo y el ancho del objeto de estudio (Figura 3.11) y con un micrómetro el espesor (Figura 3.12).

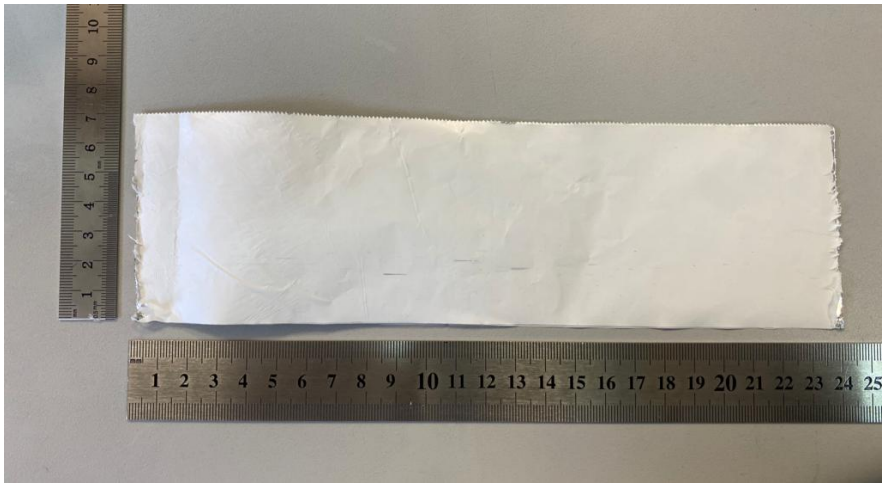


Figura 3.11: *Reglas utilizadas para medir los andamios y luego cortarlos para que cumplan las mediciones requeridas del sistema de tracción.*

La tracción realizada por el sistema se realiza a un desplazamiento constante, para poder medir correctamente el módulo de Young.

Los pasos a seguir para realizar la tracción son los siguientes:

En primer lugar es necesario conectar el arduino al PC y encenderlo, luego se debe iniciar el programa desarrollado en "LabView"para configurar la tracción, indicando la cantidad de ciclos de elongación, la distancia que se desplazará el soporte para la muestra y la calibración del sensor de fuerza. Como siguiente paso se inicia el movimiento del motor, y se almacenan los datos al finalizar el proceso.



Figura 3.12: *micrómetro utilizado para medir el espesor de los andamios.*

Finalmente para analizar los datos, se utilizó el *software Wolfram mathematica* dónde los datos fueron importados y graficados.

Para obtener el módulo de Young desde estos gráficos de fuerza vs desplazamiento, fue necesario considerar la sección de este en que la pendiente fuera relativamente lineal, es decir donde se pudiera obtener un valor correspondiente a $T/\Delta l$ sin llegar a deformar la muestra.

Finalmente utilizamos el valor obtenido para la pendiente y los datos de cada andamio de PVA para completar la ecuación (1.3) del módulo mecánico (E)

Capítulo 4

Resultados y Análisis

En este capítulo revisaremos los resultados obtenidos de las pruebas mecánicas realizadas en los andamios, presentando gráficos de Fuerza vs desplazamiento del material. Analizaremos las pendientes de sus curvas de tracción, para luego obtener el módulo de Young en cada caso. Por otro lado se compararán los módulos mecánicos obtenidos en cada ocasión, y las pendientes de cada gráfico de fuerza.

Primero haremos una tabla con las medidas geométricas representadas en la Figura 4.1 de cada andamio estudiado, ya que serán necesarias para obtener el módulo mecánico más adelante:

Solución	Largo [cm]	Ancho [cm]	Espesor [μm]
PVA 10 %	5.5	1.5	5
PVA/GS/QUI	5	1.5	2.5
PVA/GS/QUI alineado	4.4	1.3	1

Cuadro 4.1: *Dimensiones de los scaffold utilizados en la tracción mecánica*

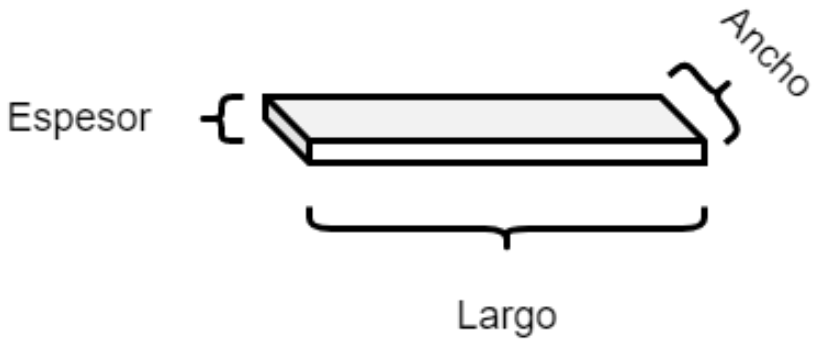


Figura 4.1: *Diagrama de las dimensiones de la membrana medida.*

Para cada andamio el motor concretó 5 ciclos de desplazamiento, es decir, se realizaron 5 elongaciones y 5 relajaciones del material. En la mayoría de los casos el material se deformó plásticamente, por lo que se considerará el primer ciclo de cada intento, mientras la pendiente sea relativamente lineal.

Para comenzar, medimos la muestra de PVA al 10 % y la utilizaremos como control, es decir, en base a estos resultados compararemos los obtenidos posteriormente. El andamio de PVA al 10 % presenta deformación luego del primer ciclo, tal como se ve en la Figura 4.2, por lo que el ajuste se realizará en base al primer ciclo. Para esto excluimos los datos que no correspondan a la fase elástica de la tracción y con la función de ajuste en *Wolfram Mathematica* obtenemos una aproximación lineal con un $R^2 > 0{,}99$ para los puntos dispuestos en la Figura 4.3. La pendiente del ajuste encontrado corresponde aproximadamente a 0.129 [N/mm].

Una observación interesante y que se repite en todos los experimentos, es que al deformarse plásticamente la muestra ocurre un proceso de histéresis en el que las características elásticas iniciales del sistema no se pueden recuperar en el tiempo.

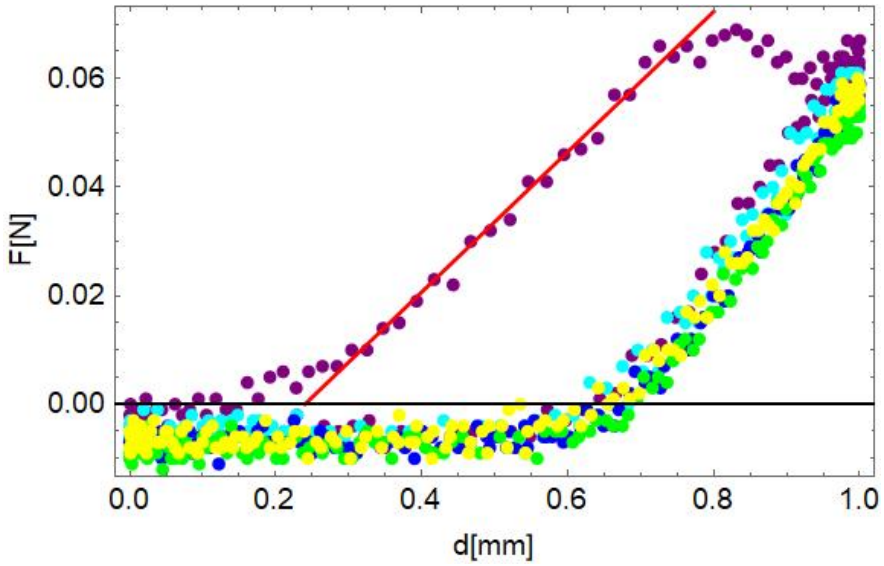


Figura 4.2: *Gráfico de Fuerza vs Desplazamiento para PVA 10 %, de los 5 ciclos realizados y el ajuste lineal (rojo).*

Posteriormente se sometió a pruebas el andamio compuesto de PVA/GS/QUI no alineado, la primera observación al momento de posicionar la muestra en el sistema de tracción, es que la manipulación es más sencilla en comparación a la muestra de solo PVA. Por otro lado la deformación no llegó al grado del caso anterior, por lo que la histéresis observada en la Figura 4.4 es menor, sin embargo hay que tener en cuenta que el desplazamiento efectivo es menor, debido a que la fuerza comienza a aplicarse a los 0.6 [mm]. Aún así la fuerza máxima alcanzada es de mayor magnitud.

La pendiente obtenida por medio del ajuste lineal observado en las Figuras 4.4 y 4.5 es de aproximadamente 0.243 [N/mm] y con un $R^2 > 0{,}99$.

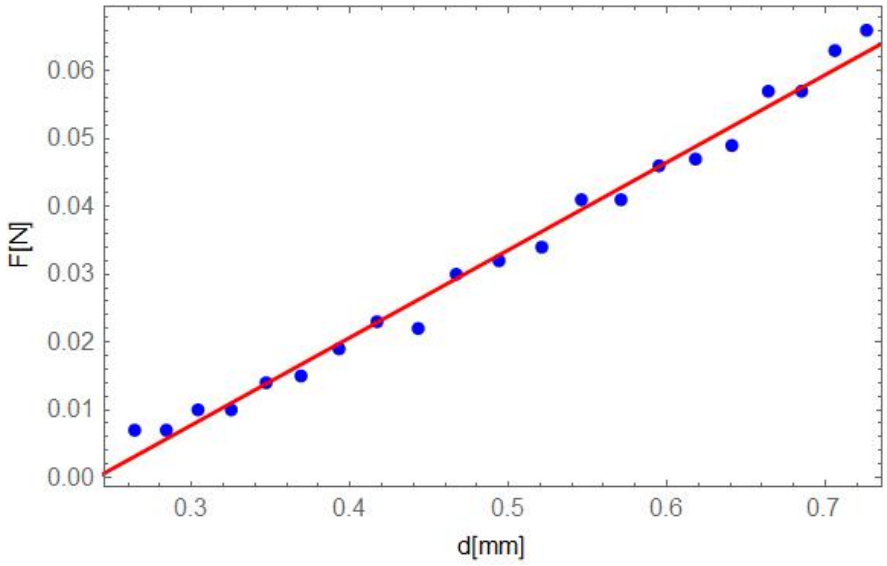


Figura 4.3: *Gráfico de Fuerza vs Desplazamiento para PVA 10 % de la sección elástica del proceso de tracción, sección en la que se realiza el ajuste (rojo).*

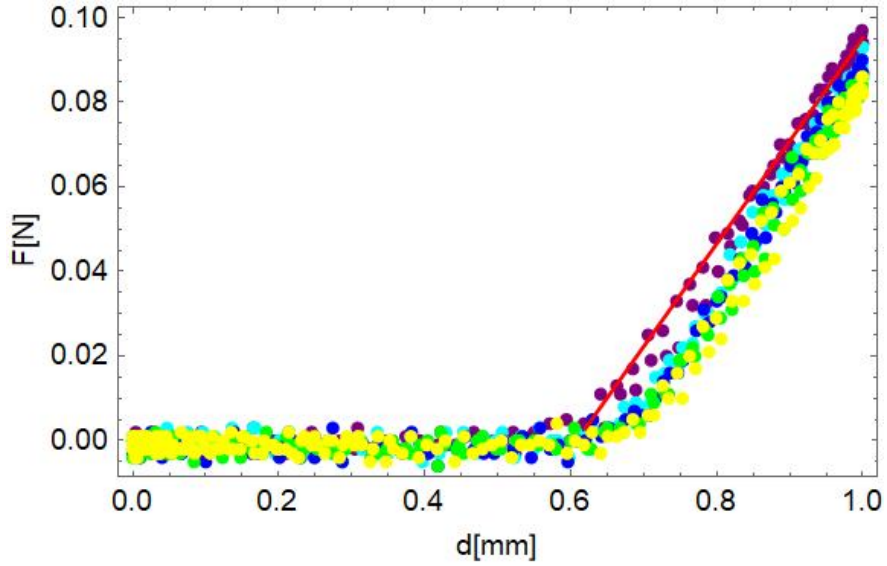


Figura 4.4: *Gráfico de Fuerza vs Desplazamiento para PVA/GS/QUI, de los 5 ciclos realizados y el ajuste lineal (rojo).*

La última medición de tracción mecánica corresponde a la mezcla de PVA/GS/QUI con las fibras alineadas por el método complementario al electrohilado de tambor rotante. Como primera observación notamos que, al igual que en el caso anterior, la histéresis es bastante menor en relación al PVA puro, sin embargo aquí puede observarse una mayor deformación luego del primer ciclo.

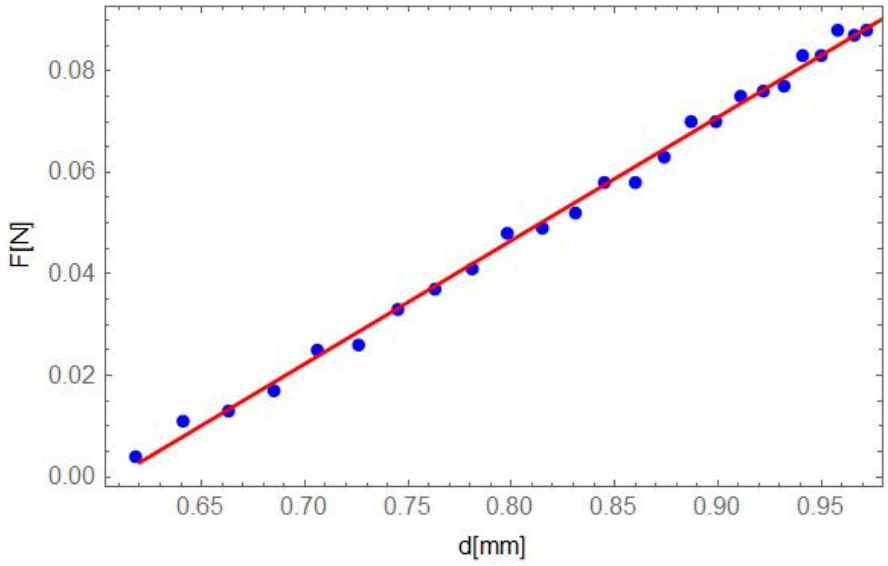


Figura 4.5: *Gráfico de Fuerza vs Desplazamiento para PVA/GS/QUI de la sección elástica del proceso de tracción, sección en la que se realiza el ajuste (rojo).*

Otro hecho que llama la atención, es que a pesar del espesor notablemente menor a los casos anteriores, la fuerza que se aplica al sistema es prácticamente la misma que la del experimento anterior, lo que nos sugiere desde ya un alto módulo mecánico. Para este caso el andamio fue posicionado con la dirección de alineación de las fibras paralelamente a la fuerza aplicada por el motor de tracción.

La pendiente ajustada en la Figura 4.7, obtenida a través del software, es de aproximadamente 0.150 [N/mm] y con un $R^2 > 0{,}99$.

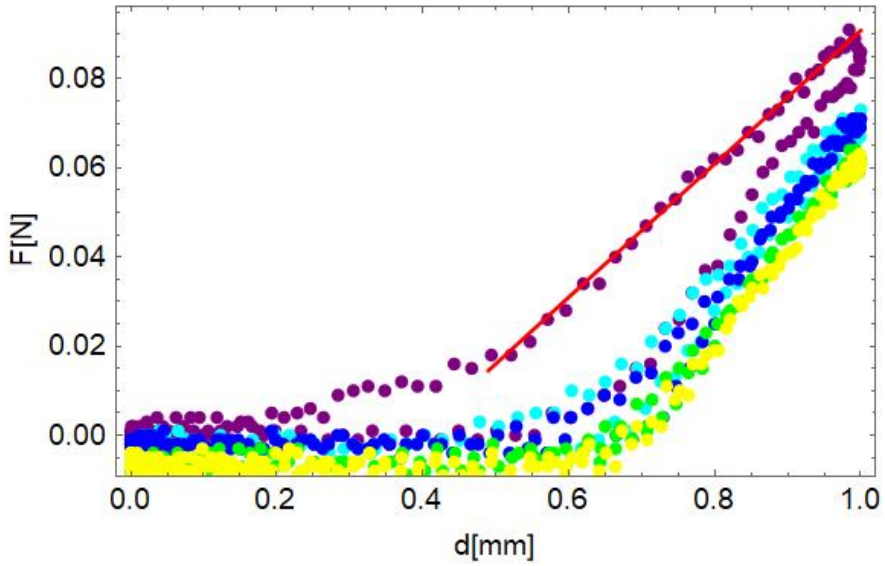


Figura 4.6: *Gráfico de Fuerza vs Desplazamiento para PVA/GS/QUI alineado, de los 5 ciclos realizados y el ajuste lineal (rojo).*

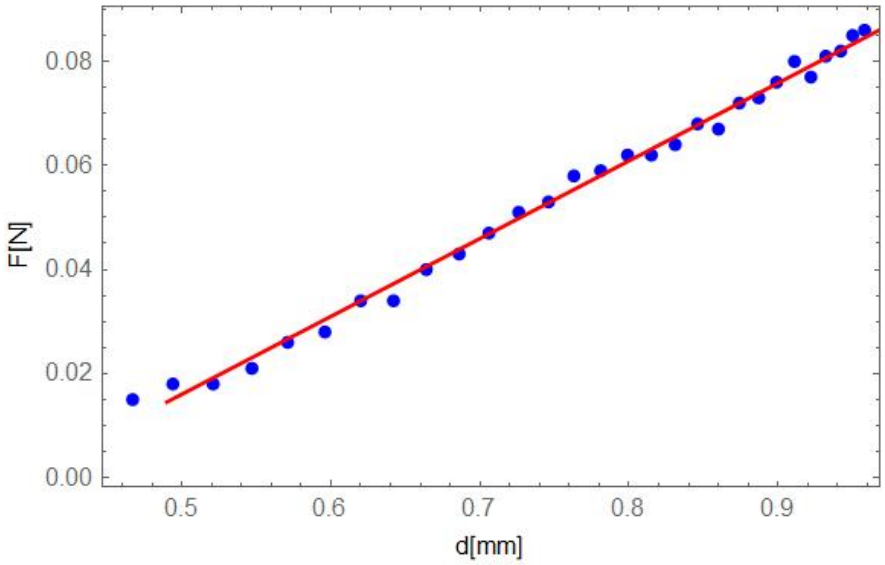


Figura 4.7: *Gráfico de Fuerza vs Desplazamiento para PVA/GS/QUI alineado, de la sección elástica del proceso de tracción, sección en la que se realiza el ajuste (rojo).*

El gráfico comparativo de la Figura 4.9 nos permite diferenciar claramente el efecto de la mezcla en el andamio, es decir, al agregar quitosano y gelatina de pescado al PVA la fuerza que soporte el material crece, y aún más al alinear las fibras. Esto solo corresponde al caso para andamios que se traccionen en dirección

de la alineación de las nanofibras.

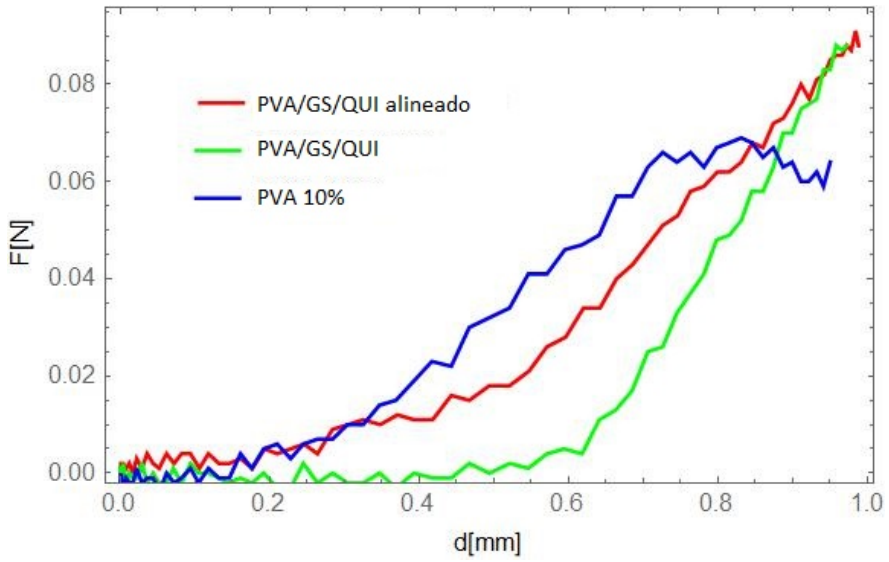


Figura 4.8: *Gráfico de Fuerza vs Desplazamiento de las tres muestras.*

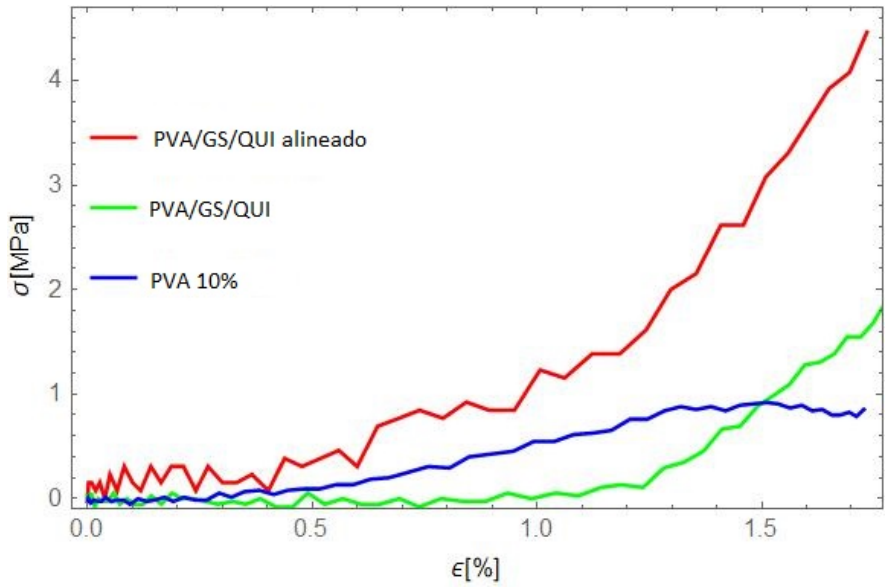


Figura 4.9: *Gráfico de Estrés vs deformación relativa comparativo entre las tres muestras.*

Finalmente por medio de la ecuación (1.3), es posible encontrar el módulo de Young para cada caso ordenados en la tabla 4.2, considerando que la pendiente de los gráficos corresponde a $F/\Delta l$ y el resto (l_0/A) fue medido de manera experimenteal y está presentado en la tabla 4.1.

Solución	K [N/m]	l_0/A [1/m]	E [MPa]
PVA 10 %	129	733333	94.6
PVA/GS/QUI	243	133333	324.0
PVA/GS/QUI alineado	150	3384615	507.7

Cuadro 4.2: *Módulo de Young calculado a través de la pendiente de los gráficos de Fuerza vs desplazamiento y las medidas de cada andamio.*

Teniendo en cuenta los resultados para los módulos mecánicos, podemos establecer distintas relaciones. En primer lugar el combinar la solución de PVA con los materiales propuestos, conlleva a un mejoramiento de la elasticidad del andamio resultante, viéndose reflejado en un aumento de aproximadamente tres veces el módulo mecánico obtenido. Además podemos notar que la técnica de alineación del tambor rotante tiene un efecto notable en el material, podríamos decir que significa un cambio en sus propiedades, por lo que podemos intuir que la alineación no solamente tuvo resultado, sino que permite que la resistencia a tracción mecánica del andamio mejore.

En segundo lugar podemos notar que en el proceso de tracción la histéresis que ocurre en el material nos entrega información de lo que ocurre con el andamio, este se deforma según la variación de la posición entre la pendiente del primer ciclo, y el ciclo en el que se deforma.

Por último para tener resultados más robustos y significativos es necesario contar con muestras de dimensiones iguales y bajo condiciones similares, es decir, si queremos comparar una muestra de solo PVA con una de PVA/GS/QUI, estas deben tener las dimensiones lo más similares posibles, además de contar con una muestra de solo PVA (10 %) electrohilada en el tambor rotante, para efectivamente notar el efecto del cilindro rotatorio en el módulo mecánico y la alineación de fibras.

Capítulo 5

Conclusiones y Perspectiva a futuro

Esta investigación indagó en el proceso de fabricación de nanofibras a base de polímeros y otros componentes agregados para manipular ciertas características, en nuestro caso el módulo mecánico. Por medio de la construcción y programación de un sistema de tambor giratorio fue posible controlar la velocidad de rotación en el experimento, la que a su vez nos permitió agregar una nueva posibilidad de estudio: El efecto de la alineación de las nanofibras en las propiedades mecánicas macroscópicas del material.

Se pudieron caracterizar los andamios según su módulo de Young, encontrando que la mezcla con quitosano y gelatina de salmón provee de una mayor elasticidad, y por ende una mayor resistencia a romperse o deformarse de manera permanente. Así mismo el proceso de alineación resulta en un módulo mecánico de valor aún más alto en la dirección longitudinal de las fibras. Por ende podemos decir que este mecanismo de fabricación por medio del tambor rotante efectivamente produce un efecto en el andamio construido.

Como trabajo futuro es necesario conocer el comportamiento de los andamios al ser traccionados de manera perpendicular a la alineación de las nanofibras, y comparar su módulo mecánico con el ya medido en esta investigación. Por otro lado es pertinente preguntarse que otras variables afectan a las propiedades de los andamios producidos bajo estas técnicas. ¿Que tanto afecta la temperatura a su módulo mecánico?, ¿Cuánto cambia bajo diferentes humedades? ¿Cómo se comparan estos valores con los medidos a micro y nano escala?.

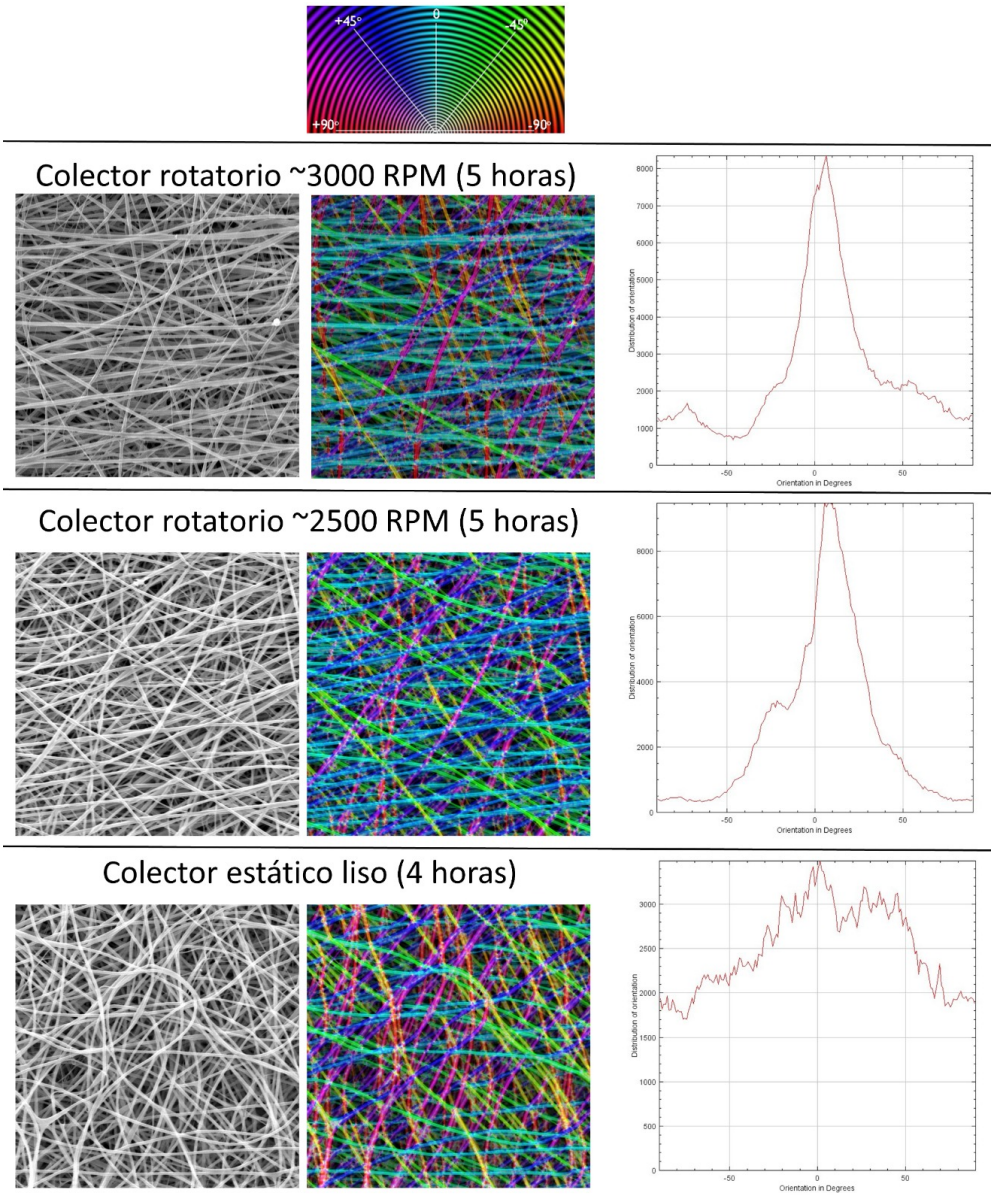


Figura 5.1: *Gráficos de alineación para andamios con diferentes velocidades de giro para el cilindro.*

Por otro lado el trabajo realizado en colaboración con el centro de biotecnología ya está dando resultados con la implementación del tambor rotante como se muestra en la Figura 5.1. Las nanofibras se alinean al utilizarlo lo que permite el avance en otros estudios como el cultivo y crecimiento de células musculares en los andamios fabricados, se puede observar como las células crecen en la Figura 5.2

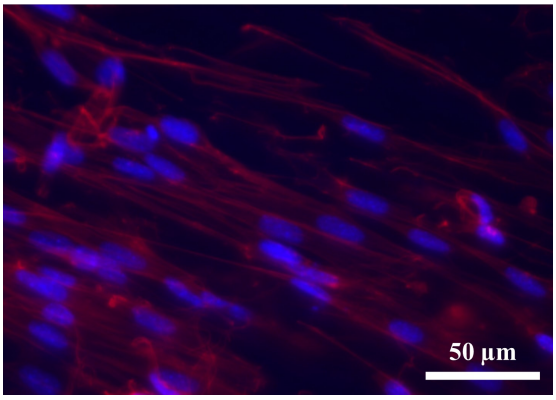


Figura 5.2: *Imagen de células musculares cultivadas en el andamio de PVA/GS/QUI alineado.*

Bibliografía

[1] B. I. P. Báez, C. A. M. Pérez, and E. S. Z. Aguilar. Fabricación de fibras poliméricas a base de pla obtenidas mediante electrohilado. *CULCyT: Cultura Científica y Tecnológica*, 17(1):2, 2020.

[2] R. Brown. *Handbook of polymer testing: physical methods*. CRC press, 1999.

[3] E. S. Costa-Júnior, E. F. Barbosa-Stancioli, A. A. Mansur, W. L. Vasconcelos, and H. S. Mansur. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 76(3):472–481, 2009.

[4] C. A. Dragica Bezjak, D. Brown. Análisis citológico comparativo del efecto scaffold microestructurado v/s sin estructura a distintas concentraciones de células de la línea celular mioblástica c2c12. 2018.

[5] T. S. Gaaz, A. B. Sulong, M. N. Akhtar, A. A. H. Kadhum, A. B. Mohamad, and A. A. Al-Amiery. Properties and applications of polyvinyl alcohol, halloysite nanotubes and their nanocomposites. *Molecules*, 20(12):22833–22847, 2015.

[6] C. A. Karina Catalán, T. Corrales. Inhomogeneous nanofiber swelling measured with environmental afm. 2020.

[7] F. Lamastra, A. Bianco, A. Meriggi, G. Montesperelli, F. Nanni, and G. Gusmano. Nanohybrid pva/zro2 and pva/al2o3 electrospun mats. *Chemical Engineering Journal*, 145(1):169–175, 2008.

[8] Z. Mbhele, M. Salemane, C. Van Sittert, J. Nedeljković, V. Djoković, and A. Luyt. Fabrication and characterization of silver- polyvinyl alcohol nanocomposites. *Chemistry of Materials*, 15(26):5019–5024, 2003.

[9] H. Molfino, A. Alcalde-Yañez, V. Valverde-Morón, and D. Villanueva-Salvatierra. Electrospinning: Avances y aplicaciones en el campo de la biomedicina. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 20(4):706–713, 2020.

[10] S. Mukherjee, S. Kumar, R. K. Sahu, and S. Nayar. Pva-graphene-hydroxyapatite electrospun fibres as air-filters. *Materials Research Express*, 6(12):125366, 2020.

[11] L. S. Nair and C. T. Laurencin. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*, 32(8-9):762–798, 2007.

[12] M. S. Peresin, Y. Habibi, A.-H. Vesterinen, O. J. Rojas, J. J. Pawlak, and J. V. Seppala. Effect of moisture on electrospun nanofiber composites of poly (vinyl alcohol) and cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules*, 11(9): 2471–2477, 2010.

[13] Â. Semitela, A. F. Girão, C. Fernandes, G. Ramalho, I. Bdikin, A. Completo, and P. A. Marques. Electrospinning of bioactive polycaprolactone-gelatin nanofibres with increased pore size for cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Applications*, 35(4-5):471–484, 2020.

[14] T. T. Stanislas, K. Bilba, R. P. de Oliveira Santos, C. Onésippe-Potiron, H. Savastano Junior, and M.-A. Arsène. Nanocellulose-based membrane as a potential material for high performance biodegradable aerosol respirators for sars-cov-2 prevention: a review. *Cellulose*, 29(15):8001–8024, 2022.

[15] G. R. Strobl and G. R. Strobl. *The physics of polymers*, volume 2. Springer, 1997.

[16] W. E. Teo and S. Ramakrishna. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, 17(14):R89, 2006.

[17] C. Wei, T.-Q. Gang, L.-J. Chen, and Y. Zhao. Critical condition for the transformation from taylor cone to cone-jet. *Chinese Physics B*, 23(6):064702, 2014.

[18] L. Yao, T. W. Haas, A. Guiseppi-Elie, G. L. Bowlin, D. G. Simpson, and G. E. Wnek. Electrospinning and stabilization of fully hydrolyzed poly (vinyl alcohol) fibers. *Chemistry of Materials*, 15(9):1860–1864, 2003.

[19] Y. Yin, Z. Pan, and J. Xiong. A tensile constitutive relationship and a finite element model of electrospun nanofibrous mats. *Nanomaterials*, 8(1): 29, 2018.