



Universidad de Navarra Escuela Superior de Ingenieros
Nafarroako Unibertsitatea Ingeniarien Goi Mailako Eskola

Proyecto Fin de Grado

INGENIERO BIOMÉDICO

**ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE DOS POLÍMEROS
BIOCOMPATIBLES Y BIODEGRADABLES PARA LA APLICACIÓN
DEL AUMENTO DE TENDÓN DEL MANGUITO ROTADOR Y
CARACTERIZACIÓN DE SU REFUERZO MEDIANTE NANOFIBRAS
DE PLA**

El alumno: Sergi Rey Viñolas

Tutor: Dr. Sergio Arana

San Sebastián, septiembre de 2015

tecnun

AGRADECIMIENTOS:

“Al Dr. Miguel Ángel Mateos y al Dr. Riccardo Levato por su esfuerzo y dedicación recibidos durante mi experiencia en el IBEC, y al Dr. Sergio Arana por su ayuda recibida en la elaboración del trabajo”

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
1 INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	7
1.2 ANATOMÍA DEL MANGUITO ROTADOR	8
1.3 ESTADO DEL ARTE DEL AUMENTO DE TENDÓN EN LA FRACTURA DEL MANGUITO ROTADOR.....	9
1.3.1 Estructuras no degradables.....	10
1.3.2 Matriz Extra Celular (ECM), andamios biológicos	11
1.3.3 Andamios sintéticos degradables	13
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1 POLÍMEROS A CARACTERIZAR Y DISOLVENTE EMPLEADO	15
2.2 PROCESO DE DISOLUCIÓN DE LOS POLÍMEROS.....	16
2.3 ENSAYO DE DEGRADACIÓN	18
2.4 ESTUDIO DEL pH DURANTE LA DEGRADACIÓN.....	20
2.5 ELABORACIÓN DE NANOFIBRAS DE PLA	22
2.6 ENSAYO DE CALORIMETRÍA CON DSC PARA LAS FIBRAS OBTENIDAS....	23
2.7 ENSAYO DE TRACCIÓN CON FIBRAS.....	25
2.8 ENSAYO DE SUTURA	26
2.9 VISUALIZACIÓN DE MUESTRAS CON SEM	27
3 RESULTADOS	29
3.1 ENSAYO DE DEGRADACIÓN	29
3.2 ESTUDIO DEL pH DURANTE LA DEGRADACIÓN.....	33

3.3	ENSAYO DE CALORIMETRÍA CON DSC PARA LAS FIBRAS OBTENIDAS....	34
3.4	ENSAYO DE TRACCIÓN CON FIBRAS.....	34
3.5	ENSAYO DE SUTURA	38
3.6	ESTUDIO SUPERFICIAL DE LAS MUESTRAS CON SEM.....	39
3.6.1	Estudio superficial de las muestras del ensayo de degradación	39
3.6.2	Estudio superficial de las muestras del ensayo de tracción con fibras	39
4	DISCUSIÓN.....	42
5	CONCLUSIONES.....	47
5.1	ACCIONES FUTURAS	47
6	BIBLIOGRAFÍA.....	48
	ANEXO: RESULTADOS EXPERIMENTALES	50
	Ensayo de degradación.....	50
	Estudio del pH durante Degradación.....	53
	Ensayo de calorimetría con DSC para las fibras obtenidas	53
	Ensayo de tracción con fibras	54
	Ensayo de sutura	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Anatomía de los músculos que forman el manguito rotador. Imagen modificada de “ https://www.clinicadam.com/imagenes-de-salud/19622.html ”.....	8
Figura 2: Estructura anatómica del tendón (1 fascículo fibroso cuaternario 15mm, 2 fascículo fibroso terciario 50-300µm, 3 fascículo fibroso secundario, 4 fascículo fibroso primario, 5 fibra de colágeno 1-20µm, 6 fibrilla de colágeno 1’5nm, 7 microfibrilla de colágeno 10nm, 8 triple hélice de colágeno 1’5nm). Imagen obtenida de [3].	9
Figura 3: Gráfica de la fuerza máxima registrada en ensayo de tracción en distintos productos comerciales, normalizada para área de sección de la probeta de 10mm ² . Gráfica adaptada a partir de la referencia [8].	12
Figura 4: Gráfica de la fuerza máxima registrada en ensayo de tracción en distintos productos comerciales (en azul), junto con los resultados obtenidos en los ensayos de tracción realizados a las concentraciones de los polímeros A y B (en verde, ensayos realizados durante el periodo de prácticas), normalizada para área de sección de la probeta de 10mm ² . Gráfica propia elaborada a partir de los resultados publicados en [8] para el caso de los productos comerciales.	14
Figura 5: Proceso de disolución de dos concentraciones de los polímeros A y B al baño María con agitación magnética.	17
Figura 6: Proceso de disolución en el cual se puede apreciar dos fases, en la parte inferior del frasco una fase del polímero completamente disuelta, mientras que en la parte superior, aún se encuentra el polímero en forma de grana.	18
Figura 7: Curva tensión/deformación correspondiente a las 8 semanas con 3 probetas de concentración 0/100 disueltas al 15% en el ensayo de tracción.....	20
Figura 8: Equipo de medición Crison GLP21 ⁺ con el montaje realizado para la medición de uno de los frascos que contienen probetas.	21
Figura 9: Montaje para la realización de electrospinning, donde se puede observar la jeringuilla con la micro punta conectada a uno de los bornes de la fuente de alimentación. En la imagen se puede apreciar el segmento recto antes del cono. En el otro extremo se encuentra el colector recubierto de papel aluminio donde se depositan las nanofibras (en blanco).....	23
Figura 10: Platillo de aluminio con la tapa en el cual se introducen las muestras para realizar los ensayos de calorimetría diferencial de barrido.	24

Figura 11: Gráfica resultado del ensayo de calorimetría diferencial de barrido en forma de curva flujo calorífico (exotérmico positivo) – temperatura de nanofibras de PLA.....	24
Figura 12: Placa de Petri con la disolución del polímero B y una capa de fibras de PLA preparada para enfriar en el proceso de gelificación, se puede apreciar el rectángulo correspondiente a la capa de fibras.	26
Figura 13: Montaje de la probeta a ensayar con el hilo de sutura fijándola por uno de sus extremos para la realización del ensayo de sutura.	27
Figura 14: Equipo de SEM empleado (izquierda). Cuadro de control del equipo de SEM durante su uso (centro). Conjunto de cinco portaobjetos con las muestras montadas y pulverizadas con oro (derecha).....	28
Figura 15: Gráfico de la deformación en el límite elástico del ensayo de degradación, a distintos tiempos y distintas concentraciones.....	29
Figura 16: Gráfico de la deformación en el momento de máxima fuerza del ensayo de degradación, a distintos tiempos y distintas concentraciones.	30
Figura 17: Gráfico del valor del módulo de Young del ensayo de degradación, a distintos tiempos y distintas concentraciones.....	31
Figura 18: Gráfico de la tensión en el límite elástico del ensayo de degradación, a distintos tiempos y distintas concentraciones.....	31
Figura 19: Gráfico de la tensión máxima del ensayo de degradación, a distintos tiempos y distintas concentraciones.....	32
Figura 20: Gráfico de la fuerza en el límite elástico del ensayo de degradación, a distintos tiempos y distintas concentraciones.....	32
Figura 21: Gráfica correspondiente a la medición del pH del medio donde se encontraban las probetas para el ensayo de degradación según concentración y semanas.	33
Figura 22: Gráfico de la deformación en el límite elástico en el ensayo de tracción según número de capas de fibras de PLA.	35
Figura 23: Gráfico de la deformación máxima en el ensayo de tracción según número de capas de fibras de PLA.....	35
Figura 24: Gráfico del módulo de Young en el ensayo de tracción según número de capas de fibras de PLA.	36
Figura 25: Gráfico de la fuerza en el límite elástico en el ensayo de tracción según número de capas de fibras de PLA.	36
Figura 26: Gráfico de la tensión en el límite elástico en el ensayo de tracción según número de capas de fibras de PLA.	37

Figura 27: Gráfico de la tensión máxima en el ensayo de tracción según número de capas de fibras de PLA.37

Figura 28: Imagen de SEM para la concentración 100/0 a las 4 semanas (izquierda) e imagen de SEM para la concentración 100/0 a las 8 semanas (derecha).39

Figura 29: Imagen de SEM de una probeta (0/100) de 6 capas de fibras después del ensayo de tracción (izquierda). Imagen de SEM de una probeta (0/100) de 8 capas de fibras después del ensayo de tracción (derecha).40

Figura 30: Imagen de SEM de la sección de una probeta (0/100) de 8 capas después del ensayo de tracción.41

Figura 31: Imagen de SEM de nanofibras de PLA con orientación aleatoria.44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparativa de los dispositivos comerciales a base de ECM, con el tipo de material y su procedencia [1].	11
Tabla 2: Porcentajes de cristalinidad y desviaciones estándares obtenidas en el ensayo de calorimetría diferencial de barrido.	34
Tabla 3: Resultados de los parámetros estudiados en el ensayo de sutura.	38
Tabla 4: Resultados correspondientes al ensayo de degradación para la concentración 0/100.	50
Tabla 5: Resultados correspondientes al ensayo de degradación para la concentración 25/75.	51
Tabla 6: Resultados correspondientes al ensayo de degradación para la concentración 50/50.	51
Tabla 7: Resultados correspondientes al ensayo de degradación para la concentración 75/25.	52
Tabla 8: Resultados correspondientes al ensayo de degradación para la concentración 100/0.	52
Tabla 9: Resultados obtenidos en el estudio semanal del pH del medio que contenían las probetas del ensayo de degradación.	53
Tabla 10: Resultados obtenidos en el ensayo de calorimetría por DSC realizados a las nanofibras de PLA obtenidas para la realización del ensayo de tracción con fibras.	53
Tabla 11: Resultados del ensayo de tracción con fibras realizado a las probetas control, únicamente polímero B.	54
Tabla 12: Resultados del ensayo de tracción con fibras realizado a las probetas con 2 capas de fibras de PLA.	54
Tabla 13: Resultados del ensayo de tracción con fibras realizado a las probetas con 4 capas de fibras de PLA.	55
Tabla 14: Resultados del ensayo de tracción con fibras realizado a las probetas con 6 capas de fibras de PLA.	55
Tabla 15: Resultados del ensayo de tracción con fibras realizado a las probetas con 8 capas de fibras de PLA.	56
Tabla 16: Resultados del ensayo de tracción con fibras realizado a las probetas con 10 capas de fibras de PLA.	56

Tabla 17: Resultados correspondiente al ensayo de tracción realizado a probetas con 10 capas de fibras con sujeción por un extremo con hilo de sutura.57

1 INTRODUCCIÓN

En este informe se recoge el trabajo realizado en el periodo de Proyecto Fin de Grado durante el mes de Agosto del 2014 en el “Institut d’Ingenyeria Biomèdica de Catalunya” (IBEC), en el grupo de Biomateriales para terapias regenerativas, liderado por la Dra. Elisabeth Engel. Estas prácticas han sido dirigidas por el investigador del departamento Dr. Miguel Ángel Mateos y supervisadas por el Dr. Riccardo Levato. Por parte de Tecnun, Facultad de Ingeniería de la Universidad de Navarra, han sido supervisadas por el Dr. Sergio Arana, director del departamento de Ingeniería Biomédica de la Universidad.

1.1 OBJETIVOS DEL PROYECTO

Uno de los principales objetivos de este proyecto, como continuación del trabajo realizado en el periodo de prácticas, ha consistido en la caracterización general de las propiedades físicas de dos polímeros biocompatibles y biodegradables. Desde un punto de vista macroscópico, estudiando sus propiedades mecánicas y, desde un punto de vista microscópico, estudiando sus propiedades estructurales. De forma más concreta, parte de la caracterización se realiza en vistas de la aplicación de estos materiales a un dispositivo biomédico avanzado para el aumento del tendón del manguito rotador en caso de fractura, repartiendo así las fuerzas que recibe el tendón durante su regeneración, con el fin de evitar la recurrencia de la fractura a causa de su debilidad en el proceso de regeneración y de la acumulación de tensiones en el hilo de sutura una vez intervenido, evitando el desgarro del tendón por parte de la sutura.

Como se concluyó en el anterior informe del periodo de prácticas, se seleccionó la concentración formada únicamente por polímero B (0/100), viendo necesario el refuerzo de este material. Es por ello que otro objetivo del Proyecto Fin de Grado consiste en la caracterización del uso de láminas de nanofibras del polímero ácido poliláctico (PLA) formando un composite entre el polímero B y las fibras de PLA.

1.2 ANATOMÍA DEL MANGUITO ROTADOR

La fractura del tendón del manguito rotador es una de las lesiones de espalda más comunes, solo en Estados Unidos se realizan unas 300.000 intervenciones al año [1]. De todas estas lesiones, el porcentaje de recurrencia está entre el 20% y el 70% [2]. Estos elevados índices de recurrencia en la fractura del tendón están relacionados con varios factores como las elevadas tensiones que soportan las suturas realizadas en el tendón para la nueva unión, el grado de rotura del tendón, la poca vascularización propia del tendón que dificulta su regeneración y el grado de atrofia muscular.

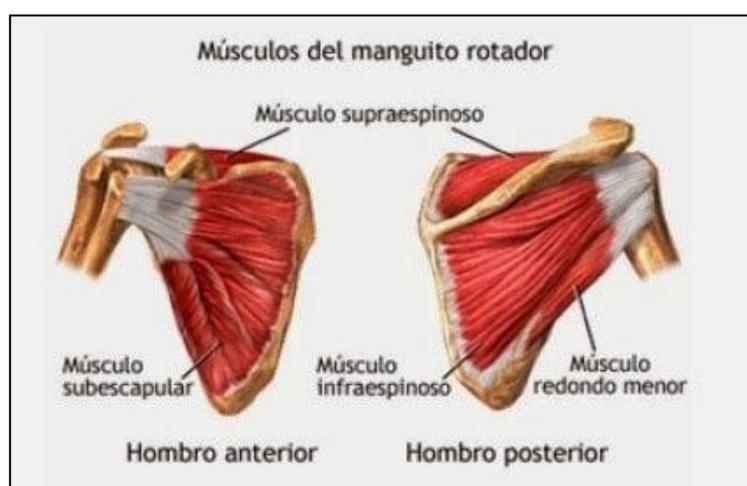


Figura 1: Anatomía de los músculos que forman el manguito rotador. Imagen modificada de "<https://www.clinicadam.com/imagenes-de-salud/19622.html>".

Como se puede apreciar en la Figura 1, el manguito rotador es un conjunto de cuatro músculos, el supraespinoso con inserción tendinosa en el tubérculo mayor del húmero, el músculo subescapular con inserción tendinosa en el tubérculo menor del húmero, el músculo infraespinoso con inserción tendinosa en el tubérculo mayor del húmero, y por último el músculo redondo menor, con inserción tendinosa también en el tubérculo mayor del húmero. Este conjunto de músculos son los responsables de la articulación del hombro, encargándose de la estabilización de la articulación glenohumeral. La lesión de uno o más tendones de los músculos nombrados da lugar a la lesión del manguito rotador.

El tendón sirve de unión entre el músculo y el hueso, a diferencia de los músculos, no tiene capacidad de contractilidad ni excitabilidad. Está formado por empaquetamientos de fascículos fibrosos y fibras de colágeno, como se puede observar en el esquema de la Figura 2. En cuanto al metabolismo del tendón, al igual que su vascularización, es escaso, es por ello que la regeneración del tendón en caso de lesión es lenta [3], hecho

que propicia la nueva rotura del tendón intervenido, razón por cual se investiga en la técnica del aumento del tendón para conseguir una completa regeneración de la fractura y evitar la recurrencia.

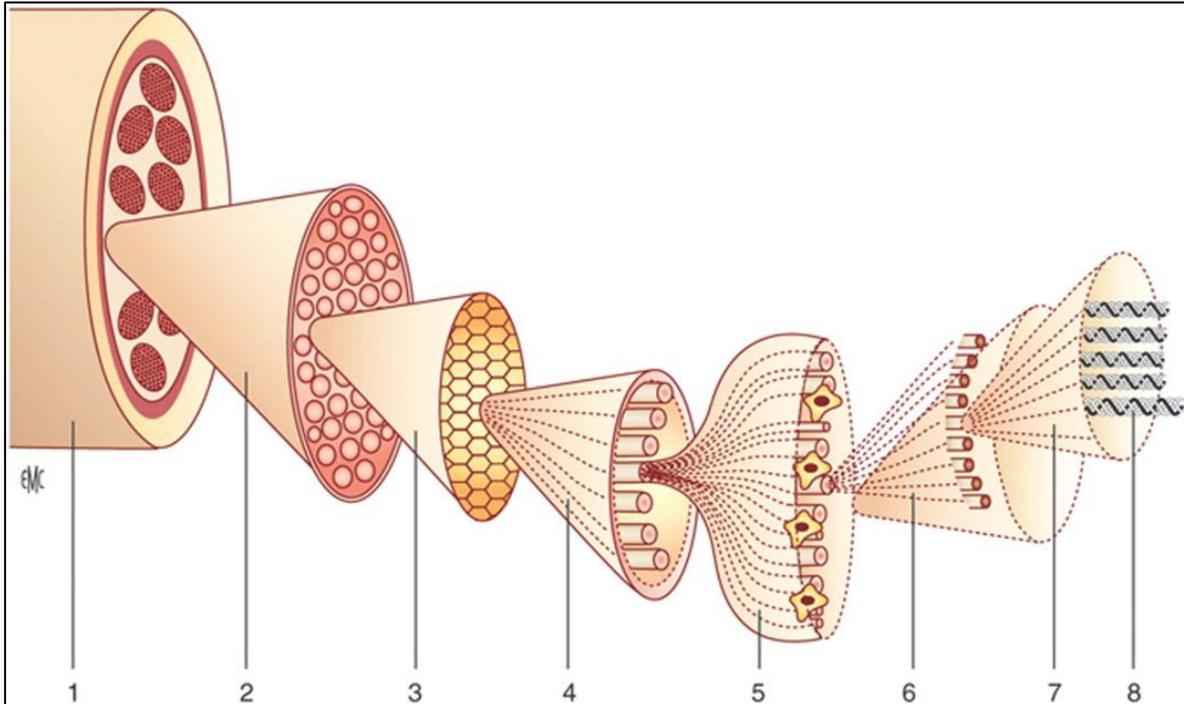


Figura 2: Estructura anatómica del tendón (1 fascículo fibroso cuaternario 15mm, 2 fascículo fibroso terciario 50-300μm, 3 fascículo fibroso secundario, 4 fascículo fibroso primario, 5 fibra de colágeno 1-20μm, 6 fibrilla de colágeno 1'5nm, 7 microfibrilla de colágeno 10nm, 8 triple hélice de colágeno 1'5nm). Imagen obtenida de [3].

En cuanto a la biomecánica del tendón, genéricamente un tendón normal puede deformarse hasta un 4% antes de apreciarse las primeras roturas microscópicas, mientras que las macroscópicas se empiezan apreciar al 14%, alrededor del cual se produce la fractura del tendón. El rango fisiológico de trabajo del tendón se encuentra entre el 0% y el 3% de su deformación, siendo capaz de almacenar energía procedente del músculo y transmitirla al hueso.

1.3 ESTADO DEL ARTE DEL AUMENTO DE TENDÓN EN LA FRACTURA DEL MANGUITO ROTADOR

La técnica del aumento de tendón se lleva investigando y aplicando desde hace casi treinta años en la cirugía del manguito rotador, con el fin de evitar nuevas roturas y disminuir el tiempo de regeneración del tendón. La técnica del aumento de tendón en el manguito rotador, desde sus orígenes hasta hoy en día, ha sufrido importantes avances

en las características y los materiales que conforman el dispositivo biomédico. Se puede encontrar, en función de las características del material empleado, una clasificación en tres grupos [4]:

- Estructuras no degradables
- Matriz Extra Celular (ECM)
- Andamios sintéticos degradables

1.3.1 Estructuras no degradables

Como su nombre indica, este grupo engloba todos aquellos andamios que se suturan de forma permanente al tendón, muy similar al procedimiento quirúrgico de sujeción de hernias. Esta técnica corresponde a la primera generación de los dispositivos biomédicos para el aumento de tendón del manguito rotador. Para ello se emplean materiales tales como la fibra de carbono y poliésteres no degradables como el teflón [5].

El principal problema de estos dispositivos recae en su permanente estancia en el cuerpo. Esto puede reportar problemas a largo plazo, al producirse una degradación del material debido al paso del tiempo en las condiciones características de encontrarse el dispositivo dentro del cuerpo, habiendo una actividad enzimática. Además al formar parte del tendón, el parche está solicitado al esfuerzo mecánico del tendón contribuyendo a su degradación a largo plazo. Esta degradación puede provocar una inflamación crónica en otras partes del cuerpo cercanas a la lesión donde se encuentra el dispositivo debido al desplazamiento de partículas del propio dispositivo, como se observó en el caso del uso de fibra de carbono [4].

Por otro lado existen lesiones del manguito rotador, las cuales presentan una atrofia del tendón y degeneración muscular, en las cuales es necesaria la implantación de un dispositivo de sujeción permanente como es el caso de las estructuras no degradables [5], asumiendo las posibles complicaciones descritas anteriormente.

1.3.2 Matriz Extra Celular (ECM), andamios biológicos

Debido a los problemas que conlleva mantener el dispositivo biomédico de forma indefinida en el interior del cuerpo, apareció una nueva generación de parches para el aumento del tendón, con la finalidad de proporcionar al tendón lesionado un soporte mecánico temporal en el reparto de las tensiones y por otro lado, debido a sus propiedades biomiméticas, al tratarse de matriz extracelular, proporcionar a las células del tendón un medio donde proliferar y diferenciarse ayudando a la recuperación de la lesión [1].

Los materiales más empleados son: dermis, submucosa del intestino delgado (SIS), fascia lata y pericardio. La mayoría de estos materiales biológicos son de procedencia humana, porcina, bovina y equina. En la Tabla 1 se muestran los distintos dispositivos para el aumento del tendón del manguito rotador basados en ECM que se comercializan actualmente [1]. Los productos comerciales analizados son: Restore (DePuy Orthopaedics), CuffPatch (Arthrotek), GraftJacket (Wright Medical Technology), TissueMend (Stryker), Zimmer Collagen Patch (Zimmer), OrthADAPT Bioimplant (Pegasus Biologics), AlloPatch (Musculoskeletal Trasplant Fundation), RC Allograft (Arthrex).

Tabla 1: Comparativa de los dispositivos comerciales a base de ECM, con el tipo de material y su procedencia [1].

Producto	Material	Procedencia
Restore	SIS	Porcina
CuffPatch	SIS	Porcina
GraftJacket	Dermis	Humana
TissueMend	Dermis	Bovina
Zimmer Collagen Patch	Dermis	Porcina
OrthADAPT Bioimplant	Pericardio	Equina
AlloPatch	Fascia Lata	Humana
RC Allograft	Tendón	Humana

Al tratarse de ECM que no procede del propio paciente, es necesario descelularizar la membrana y quitar las proteínas solubles al agua para reducir las posibilidades de antigenicidad. Este proceso se convierte en un problema para esta clase de andamios, ya que no se consigue un lavado celular al 100% quedando material genético en los dispositivos. Los problemas que puede generar este hecho aún no se

conocen del todo, pero se cree que al quedar células puede aumentar el riesgo de antigenicidad.

Aunque esta familia de andamios cuente con los inconvenientes descritos anteriormente, debido a que es posible su comercialización con relativa facilidad, ya que solo requieren el registro en la FDA 90 días antes de la comercialización en la categoría 510K para su correcta clasificación como dispositivo médico, sin necesidad de probar su eficacia en ensayos clínicos [6]. Es por ello que han surgido numerosas empresa que producen y comercializan andamios de este tipo, habiendo incluso publicaciones sobre nuevas estrategias de sutura para su colocación, como es el caso del producto GraftJacket [7].

Las propiedades mecánicas de estos productos se han analizado en distintas publicaciones para estudiar el comportamiento del dispositivo integrado en el cuerpo, caracterizando la fuerza máxima de trabajo, como es el caso de la Figura 3, que sirve de orientación sobre qué rango de valores se encuentra la fuerza máxima de los dispositivos comerciales a base de ECM [8]. Se han normalizado los valores para que correspondan todos a una misma área de la sección de la probeta ensayada.

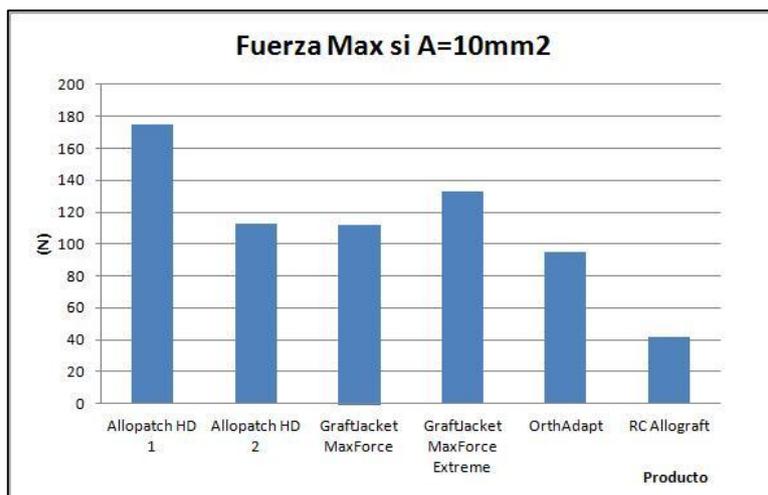


Figura 3: Gráfica de la fuerza máxima registrada en ensayo de tracción en distintos productos comerciales, normalizada para área de sección de la probeta de 10mm². Gráfica adaptada a partir de la referencia [8].

Uno de los principales problemas observados en los resultados de pruebas “*in Vivo*” tanto en modelos animales como en humanos recae sobre la rápida absorción del andamio de ECM, afectando directamente en la disminución de las propiedades mecánicas del andamio sobre todo en los casos de rotura completa del tendón del manguito rotador, demostrándose que no mejora la curación de la lesión [9]. En estudios realizados de forma controlada y aleatoria en animales con ECM de productos comerciales no se ha

apreciado una recuperación de la unión tendón-hueso. Así mismo el uso de plasma PRP (Plasma Rico en Plaquetas) con factores de crecimiento, tampoco se ha podido apreciar una mejora en los casos de recurrencia [10].

1.3.3 Andamios sintéticos degradables

Son la tercera generación de andamios para el aumento del tendón del manguito rotador. Responden a la necesidad de mejorar las propiedades y resultados de los andamios basados en ECM en ensayos “*in Vivo*” anteriormente expuestos, además de simplificar su proceso de obtención y fabricación y aumentar la seguridad al no tener el problema de la antigenicidad.

Esta tercera generación de andamios se basa en la conformación de polímeros que sean biocompatibles y biodegradables. La mayoría de los andamios empleados se elaboran por medio de la técnica de electrohilado (del inglés, electrospinning), formando parches a base de micro y nano fibras, dependiendo de la técnica empleado en el proceso de electrospinning, se pueden obtener fibras alineadas o fibras orientadas de forma aleatoria. Se han realizado estudios sobre el efecto en las células que crecen en el andamio dependiendo si se emplean dispositivos con fibras alineadas u orientadas de manera aleatoria [2], y se ha observado que en el caso las fibras alineadas, las células crecen siguiendo el sentido de las fibras, mientras que en el caso de las fibras orientadas aleatoriamente, las células proliferan igual, pero con una morfología redondeada y no se observa ninguna disposición alineada por parte de las células.

La configuración del material en fibras obtenidas por medio de electrospinning es la que se mimetiza mejor con la ECM propia de tejidos como el tendón o la piel, y las células tienen una mejor proliferación y respuesta cuanto mayor sea el parecido del andamio a la ECM natural [11]. Es por ello que gran parte de los estudios que se están realizando en la dirección de andamios sintéticos degradables, emplean la técnica de electrospinning. Por otro lado, en el diseño de estos andamios, hay estudios que sostienen el beneficio de emplear este tipo de andamios sin células, debido al riesgo de contagio de enfermedad en la zona afectada y al largo tiempo necesario para la realización del cultivo celular en el material [12].

El trabajo realizado durante el periodo de prácticas se encuentra dentro de esta clasificación de andamios sintéticos degradables, como se puede observar en la Figura 4, los resultados obtenidos sobre la fuerza máxima resistida por las probetas en los ensayos

de tracción para las probetas de los polímeros A y B son notablemente inferiores a los dispositivos comerciales a base de ECM.

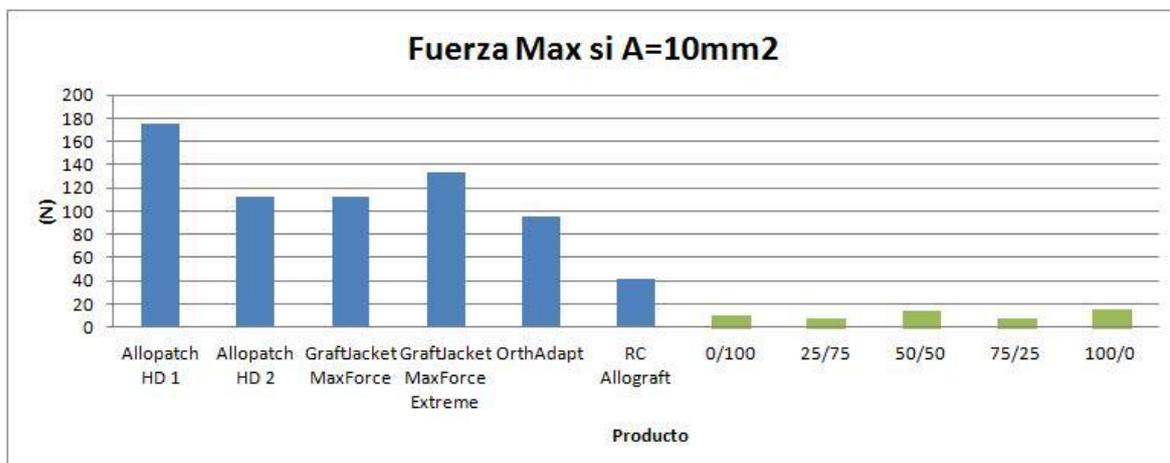


Figura 4: Gráfica de la fuerza máxima registrada en ensayo de tracción en distintos productos comerciales (en azul), junto con los resultados obtenidos en los ensayos de tracción realizados a las concentraciones de los polímeros A y B (en verde, ensayos realizados durante el periodo de prácticas), normalizada para área de sección de la probeta de 10mm². Gráfica propia elaborada a partir de los resultados publicados en [8] para el caso de los productos comerciales.

Debido a estos resultados se decidió el estudio de la aplicación de láminas de nanofibras como refuerzo, obteniendo un composite entre polímero B y fibras de PLA con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas. Para ello se diseñaron distintos ensayos tanto para la caracterización del uso de fibras, como para la continuación de la caracterización de las cinco concentraciones de los polímeros A y B empezada en el periodo de prácticas.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se detallan los materiales y métodos seguidos para llevar a término cada procedimiento y ensayo a lo largo del proyecto. Estos se encuentran divididos por puntos según el proceso realizado. En cada punto, hay una descripción de los pasos seguidos y materiales empleados para la realización del procedimiento, asegurando la reproducibilidad de todos los protocolos y ensayos. En el caso que se haya alterado cualquier punto del protocolo, en el capítulo 4 correspondiente a la Discusión, se hará referencia.

2.1 POLÍMEROS A CARACTERIZAR Y DISOLVENTE EMPLEADO

Como continuación del trabajo realizado en el periodo de prácticas que es este Proyecto Fin de Grado los polímeros a caracterizar son los mismos que se detallan en el pasado informe, por ello a continuación se vuelve a describir sus propiedades:

Los dos polímeros caracterizados, debido a que el proyecto sigue en curso de investigación y debido al marco del acuerdo de confidencialidad se ha decidido no desvelar sus nombres y darles la notación de “polímero A” y “polímero B” a lo largo del informe. Tanto el polímero A como el B son bioplásticos cuyos monómeros se han obtenido a partir de biomasa, con una polimerización química. Ambos polímeros pertenecen al grupo de los poliésteres (al contener grupos funcionales éster). De modo cualitativo el polímero A parece más rígido que el B, el cual presenta una mayor deformabilidad, se trata de dos polímeros biocompatibles y biodegradables, abriendo un amplio abanico de posibilidades dentro del campo de la medicina regenerativa.

El disolvente empleado para la disolución de los polímeros A y B, igual que los polímeros, tampoco será desvelado y tendrá la nomenclatura de “disolvente C”. Se trata de un disolvente orgánico, con el cual, la conformación final obtenida de los polímeros estudiados, presenta una mayor flexibilidad, mayor porosidad y menor fragilidad que con otros disolventes orgánicos más comúnmente utilizados. Por otro lado, la mayoría de disolventes comunes empleados para la disolución de los polímeros A y B no son biocompatibles, presentando altos grados de toxicidad para los seres humanos, siendo necesaria su completa eliminación de los polímeros antes de su implantación. Mientras que el disolvente C es totalmente Biocompatible incluso aprobado por la FDA (siglas de la

agencia americana que ejerce el control sobre los alimentos y los medicamentos, en inglés Food and Drug Agency) en la industria alimenticia y no presenta la complejidad de tener que eliminarlo por completo.

2.2 PROCESO DE DISOLUCIÓN DE LOS POLÍMEROS

Igual que en el caso del apartado anterior (punto 2.1), a continuación se vuelve a detallar el proceso seguido para conseguir las disoluciones poliméricas para trabajar con ellos:

Se ha establecido de nuevo, el estudio a lo largo del Proyecto con cinco concentraciones distintas de los polímeros A y B, para obtener su caracterización y decidir cuál de ellas es la óptima para la aplicación biomédica de soporte del manguito rotador en caso de rotura. La nomenclatura que se seguirá a lo largo del informe para referirse a alguna de las cinco concentraciones será X/Y, siendo X el porcentaje del polímero A e Y el porcentaje del polímero B (por ejemplo, 100/0 significa que la mezcla contiene 100% del polímero A y 0% del polímero B). Todas las concentraciones han sido disueltas con el disolvente C al 15% en peso. Estas cinco concentraciones han sido:

- 0% del polímero A y 100% del polímero B (0/100)
- 25% del polímero A y 75% del polímero B (25/75)
- 50% del polímero A y 50% del polímero B (50/50)
- 75% del polímero A y 25% del polímero B (75/25)
- 100% del polímero A y 0% del polímero B (100/0)

El protocolo llevado a cabo para el proceso de disolución de las distintas concentraciones ha sido el siguiente:

1. Inicialmente los polímeros A y B se encontraban en conservación con los envases originales de fábrica en forma de granulado a una temperatura de -20°C. Fue necesario esperar un tiempo mínimo de 30 minutos desde el momento en que se retiraron del congelador para aumentar su temperatura hasta llegar a la temperatura ambiental.

2. Una vez los polímeros se encontraban a temperatura ambiente se procedió al pesado de cada uno en la balanza de precisión para la obtención de 70 ml de

disolución. El pesado se realizó tarando directamente el frasco de cristal (de 100 ml con tapón de rosca), donde se conservó la disolución, en la balanza de precisión. Por ejemplo, en el caso de la concentración 25/75, se introdujeron 2'6 gramos del polímero A y 7'9 gramos del polímero B directamente en el interior del frasco de cristal.

3. Una vez pesada la cantidad necesaria de cada polímero, se procedió a la introducción en el frasco de cristal el volumen necesario de disolvente C. Al ser un disolvente muy volátil, esta operación se debe realizar dentro de una campana de seguridad. Se retiró el volumen deseado por medio de una pipeta graduada y pipeteador, y se añadió en cada frasco de cristal donde estaban las cantidades de polímeros que se pesaron anteriormente para realizar la disolución. Es importante emplear una pipeta de cristal y no de plástico desechable, ya que el disolvente puede deshacer las marcas de la graduación de la pipeta contaminando la muestra y el frasco con el disolvente.



Figura 5: Proceso de disolución de dos concentraciones de los polímeros A y B al baño María con agitación magnética.

4. Finalmente al frasco se le añadió un imán para la agitación magnética y se cerró. El frasco se debe cerrar y sellar con film de parafina, para evitar la entrada de vapor de agua, e introducir en un vaso de precipitados con agua destilada para calentar la disolución al baño María con una placa de agitación magnética con calefactor (Figura 5), ya que al ser la disolución muy viscosa, sin la ayuda de la agitación magnética no se conseguiría una disolución total. Con un termómetro se controló la temperatura del baño María para que esté entorno a unos 70 °C. Es importante vigilar si quedan granos de material que no se disuelvan, en el caso que queden, se deben retirar de la disolución con la ayuda de una pequeña espátula, ya que éstos, al precipitar la muestra polimérica

provocan un defecto puntual alterando las propiedades mecánicas de la muestra. Para obtener una buena disolución es importante que el baño María tenga una duración de unas 12 horas y que la velocidad de la agitación magnética sea la adecuada acorde con el grado de viscosidad de cada disolución.



Figura 6: Proceso de disolución en el cual se puede apreciar dos fases, en la parte inferior del frasco una fase del polímero completamente disuelta, mientras que en la parte superior, aún se encuentra el polímero en forma de grana.

5. Una vez pasadas las 12 horas, la disolución está lista para ser empleada o para almacenarse en caso que sea requerida más adelante. Para su conservación es suficiente con mantener el frasco de cristal bien cerrado y a temperatura ambiente. Al enfriarse la disolución adquiere una apariencia de gelatina solidificada.

2.3 ENSAYO DE DEGRADACIÓN

Para caracterizar el comportamiento de la degradación de las cinco concentraciones de polímeros A y B en el interior del cuerpo con el paso del tiempo, se ha diseñado un experimento con cinco tiempos distintos a estudiar, correspondientes a las 0, 2, 4, 6 y 8 semanas. Para reproducir las condiciones fisiológicas del organismo, se mantuvieron las probetas sumergidas en una disolución tampón de PBS (pastillas 5g, Gibco), solución fosfato salina, con una osmoralidad semejante a la del líquido extracelular, además las probetas estuvieron en un ambiente de 27°C. Una vez llegados al tiempo de control, se sometieron las probetas a un ensayo de tracción, comprobando

como se veían afectadas sus propiedades mecánicas con el paso del tiempo. Una vez realizado el ensayo se guardó a -75°C una muestra de las probetas para su estudio cualitativo de su superficie por medio de microscopia electrónica (SEM).

Las características para el estudio y la realización de la caracterización de la degradación y de las propiedades mecánicas de las cinco concentraciones de polímeros A y B a lo largo de un periodo de 8 semanas son:

- Deformación en el límite elástico
- Deformación máxima
- Módulo de Young
- Tensión en el límite elástico
- Tensión máxima
- Fuerza en el límite elástico

El protocolo seguido en la realización del ensayo de degradación se detalla a continuación:

1. El primer paso fue preparar la solución tampón de PBS llenando un frasco de cristal con medio litro de agua desionizada (MilliQ) e introduciendo una pastilla de PBS. A continuación se dejó el frasco cerrado durante media hora en agitación orbital para facilitar la disolución de la pastilla de PBS.

2. Para la obtención de las probetas, se emplearon bloques de las cinco concentraciones de polímeros A y B ya precipitadas, elaborados durante el proceso de prácticas transcurridas durante el mes anterior y conservados en recipientes sumergidos en agua destilada. La geometría para estas probetas fue de $2\times 5\times 30\text{mm}$. Se empleó el sistema de obtención por corte para la geometría de las probetas, el mismo que en el caso del ensayo de tracción descrito en el Informe de la Estancia de Prácticas.

3. Una vez obtenidas las probetas se distribuyeron en frascos de plástico con rosca según las concentraciones de polímeros. A cada frasco se le añadió 10 ml de disolución tampón PBS, preparada anteriormente, quedando las probetas completamente sumergidas, y 20 μl de solución de ázida sódica para evitar la acción bacteriológica. Terminado este proceso se cerraron los frascos y se guardaron en la estufa del laboratorio a 37°C . Cada semana se cambió el medio acuoso de cada frasco y fue reemplazado por solución nueva con las mismas características.

4. Para cada tiempo de control, se retiraron tres probetas de cada concentración para ensayarlas a tracción, con una precarga de 0.1N a una velocidad de 5

mm/min y una velocidad de ensayo de 10 mm/min. Las mordazas de la celda de tracción sujetaron la probeta con una profundidad de 1 cm cada una. Todos los resultados obtenidos durante el ensayo quedaron registrados por el programa testXpert II V3.41 del banco de ensayos mecánicos Zwick-Roell, modelo Zwicki-Line Z0.5TN, dibujando una curva tensión/deformación para cada probeta ensayada como se puede observar en la Figura 7.

5. Terminado cada ensayo se guardó un corte tanto de la superficie de la probeta, como de la sección de fractura a -75°C en tubos Falcon diferenciados por tiempo de ensayo y por concentración.

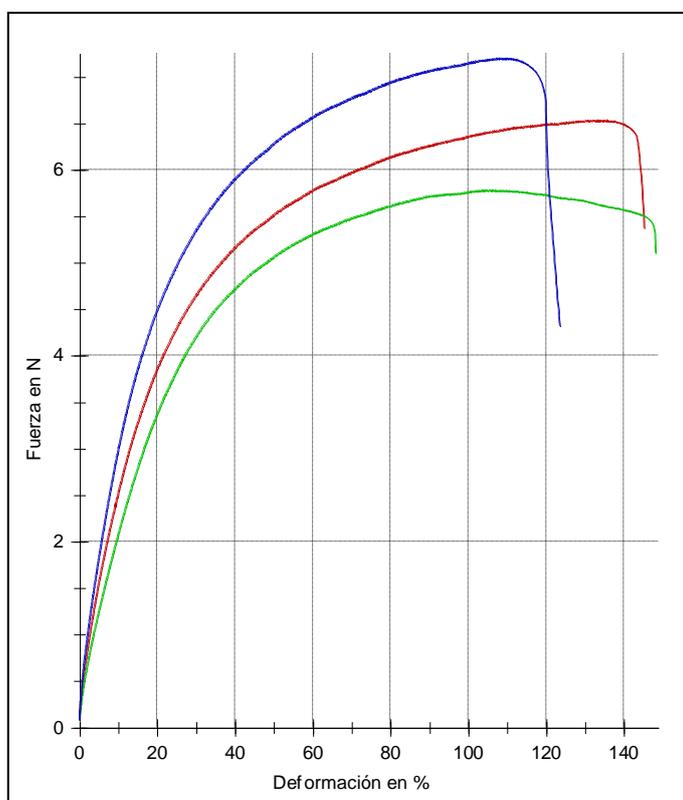


Figura 7: Curva tensión/deformación correspondiente a las 8 semanas con 3 probetas de concentración 0/100 disueltas al 15% en el ensayo de tracción.

2.4 ESTUDIO DEL pH DURANTE LA DEGRADACIÓN

Este ensayo está solidariamente relacionado con el ensayo de degradación, ya que consiste en el estudio del pH del medio acuoso de los frascos donde se encuentran sumergidas las probetas del ensayo de degradación, estos medios acuosos son

renovados cada semana. Con este estudio se pretende caracterizar si las probetas producen un cambio del pH en el medio acuoso donde se encuentran, para ello se empleó un equipo de medición de pH Crison modelo GLP21⁺, las medidas fueron tomadas en modo discreto, el equipo muestra una única medición estable.

El protocolo seguido para la realización del estudio fue el siguiente:

1. En primer lugar es necesario realizar la puesta a punto del equipo limpiando con agua desionizada (MilliQ) la sonda de medición y realizar la calibración del equipo con las tres disoluciones tampón de distintos pH proporcionados por el equipo.
2. Antes de realizar la medición de los frascos, es necesario dejarlos a temperatura ambiente durante 30 minutos como mínimo, para que las mediciones del pH sean siempre a 20°C.
3. Una vez calibrado el equipo se escoge el primer frasco y con ayuda del soporte se introduce la sonda de medición en el interior del frasco en contacto con el medio acuoso, tal y como se puede observar en la Figura 8. Una vez el equipo tenga una medida estable la muestra por pantalla y es anotada para realizar una comparativa entre las distintas disoluciones y los tiempos correspondientes a cada semana.

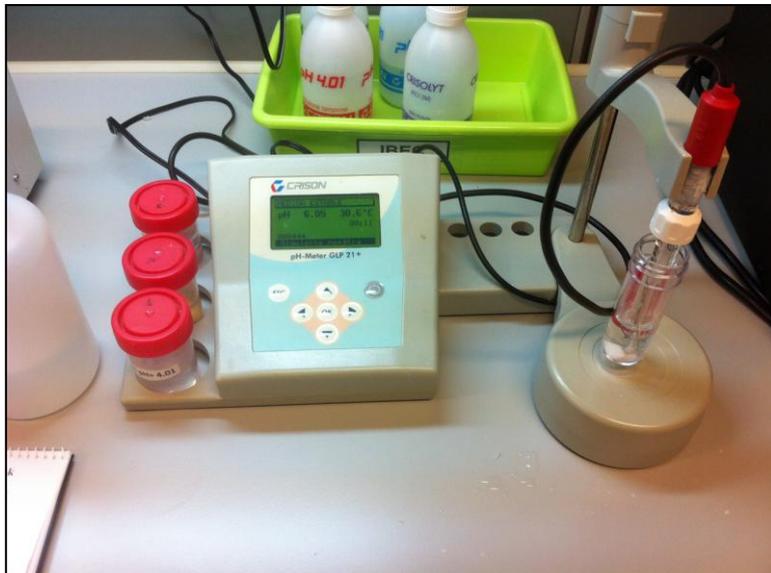


Figura 8: Equipo de medición Crison GLP21⁺ con el montaje realizado para la medición de uno de los frascos que contienen probetas.

2.5 ELABORACIÓN DE NANOFIBRAS DE PLA

Para la mejora de las propiedades mecánicas de la concentración escogida en el informe anterior, correspondiente al periodo de prácticas, para la concentración de 0/100, se decidió el uso de un refuerzo del material con nanofibras del polímero ácido poliláctico (PLA) y empleando como disolvente Trifluoroetanol, por medio de un proceso de electrospinning mediante el cual se obtuvieron las nanofibras.

El protocolo seguido para la realización del estudio fue el siguiente:

1. El primero paso consistió en la elaboración de la disolución polimérica, que en cada ciclo se prepararon 10 ml de disolución al 4% en peso/volumen, para ello se introdujeron en un frasco de cristal (15 ml), la cantidad necesaria de PLA (Purac), pesándola directamente habiendo tarado el frasco en la balanza de precisión, en este caso 0'695g de PLA y posteriormente, debido a la toxicidad del disolvente, usando una pipeta graduada se añadieron al frasco, en campana química, la cantidad de 9'5 ml de Trifluoroetanol. Por último se cerró el frasco de cristal sellado con film de parafina y se dejó una noche en agitación basculante.

2. Una vez hecha la disolución ya se pudo realizar el proceso de electrospinning. Se trasladó la disolución del frasco de cristal a una jeringuilla de 10ml, a la cual se le añadió una micro punta, este proceso también se realizó en campana química debido a los vapores que pudiera producir el disolvente. Una vez se encontró la disolución polimérica en la jeringuilla esta pudo ser instalada en la bomba de perfusión, que fue la encargada de presionar la jeringuilla aportando un flujo constante.

3. Los parámetros empleados en cada proceso de electrospinning se mantuvieron inalterables. Siendo la tensión proporcionada por la fuente de alimentación de 8 KV, la velocidad de la bomba de perfusión de 0'5 ml/hora y la distancia entre la micro punta de la jeringuilla y el colector fue de 12 cm. Se decidió emplear nanofibras con orientación aleatoria, por ello el colector era estático, conectado a tierra y recubierto de papel de aluminio en el cual se pegaban las nanofibras. En el papel de aluminio, antes de empezar con el proceso, se le aplicaba una capa de glicerol para facilitar la posterior retirada de las nanofibras.

4. Por último, una vez obtenidas las nanofibras se les realizó un ensayo de calorimetría para determinar el porcentaje de cristalinidad de la mezcla de fibras.

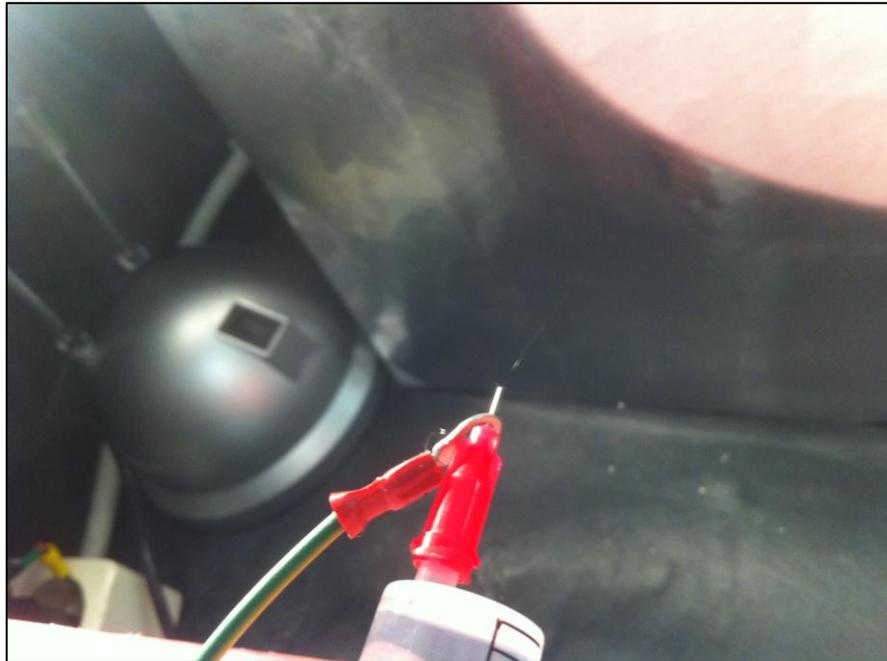


Figura 9: Montaje para la realización de electrospinning, donde se puede observar la jeringuilla con la micro punta conectada a uno de los bornes de la fuente de alimentación. En la imagen se puede apreciar el segmento recto antes del cono. En el otro extremo se encuentra el colector recubierto de papel aluminio donde se depositan las nanofibras (en blanco).

2.6 ENSAYO DE CALORIMETRÍA CON DSC PARA LAS FIBRAS OBTENIDAS

Con el objetivo de determinar el porcentaje de cristalinidad de las nanofibras producidas se les realizó a cada mezcla elaborada un ensayo de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Estos ensayos se realizaron con el equipo Q20 de la casa TA Instruments, el programa con el que se obtuvieron los resultados fue el propio del equipo, TA Universal Analysis.

A continuación se detalla el protocolo empleado:

1. Una vez obtenida una mezcla de nanofibras por electrospinning, se recortó un trozo con el fin de obtener alrededor de 10 mg. Este recorte se pesó en una báscula de precisión con el fin de obtener su peso exacto, ya que era requisito para introducir en el programa y realizar el ensayo.
2. La mezcla una vez pesada, se introdujo en un platillo de aluminio (Figura 10) y se tapó aplicándole presión una vez colocada la tapa. Se introdujo el platillo

con la muestra en el equipo y se introdujo de nuevo otro platillo con la tapa pero vacío, que actuó como referencia.



Figura 10: Platillo de aluminio con la tapa en el cual se introducen las muestras para realizar los ensayos de calorimetría diferencial de barrido.

3. El ensayo realizado consistió en dos ciclos de calentamiento y enfriamiento, tal y como se puede apreciar en la Figura 11, con una velocidad de calentamiento de 5 °C/minuto, y se empleó aire a presión a temperatura ambiente como método de enfriamiento, el calentamiento se programó hasta los 180°C, mientras que el enfriamiento, dado que solo contaba con aire a presión a temperatura ambiente, se marcó a los 25°C. A partir del mismo programa, con el cálculo de las áreas de pico se obtuvo el porcentaje de cristalinidad.

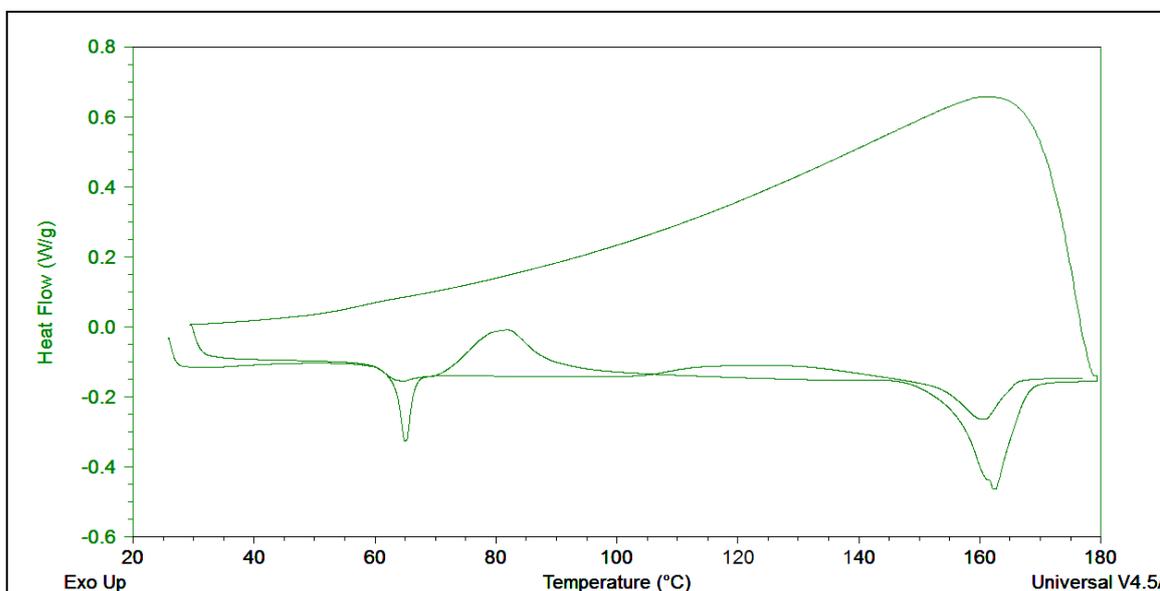


Figura 11: Gráfica resultado del ensayo de calorimetría diferencial de barrido en forma de curva flujo calorífico (exotérmico positivo) – temperatura de nanofibras de PLA.

2.7 ENSAYO DE TRACCIÓN CON FIBRAS

Con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas del polímero B para su uso en la aplicación del aumento de tendón del manguito rotador, se planteó el refuerzo del andamio sintético con nanofibras del polímero PLA, obtenidas por medio del procedimiento detallado en el punto 2.5 del presente informe. Para poder estudiar el número óptimo de capas de fibras a introducir en el dispositivo se diseñó un ensayo de tracción con probetas de polímero B y distinto número de capas de fibras, en total se ha estudiado los casos de 0, 2, 4, 6, 8, 10 capas.

Las características estudiadas de las probetas bajo un trabajo de tracción han sido:

- Deformación en el límite elástico
- Deformación máxima
- Módulo de Young
- Tensión en el límite elástico
- Tensión máxima
- Fuerza en el límite elástico

Los ensayos de tracción con fibras se han llevado a cabo con el banco de pruebas mecánicas de la casa Zwick-Roell, modelo Zwicki-Line Z0.5TN, con una celda de tracción de 200N, aunque como tensión máxima se pudo llegar a 40N debido a las características de las mordazas del banco mecánico, parámetro importante a tener en cuenta a la hora de la discusión de los resultados obtenidos. La velocidad del ensayo se estableció a 10 mm/min, con una precarga de 0'1N a una velocidad de 5 mm/min. Con esta precarga se quiere eliminar posibles defectos en el inicio de la curva tensión/deformación debido a que la probeta no se encuentra aún en tensión una vez empezado el ensayo. El programa empleado para la obtención de las curvas tensión/deformación y para la obtención de los resultados ha sido el suministrado por la casa del banco de pruebas, testXpert II V3.41.

El protocolo empleado para la realización del ensayo ha sido:

1. Inicialmente se tenían reservadas en frascos de cristal disoluciones del polímero B al 15% con disolvente C, obtenido según el procedimiento descrito en el punto 2.2 a temperatura ambiente, con lo cual es necesario el calentamiento de la disolución al baño María para que pase de un estado gelatinoso a líquido.

2. Una vez la disolución se encontraba completamente en un estado líquido y se colocó en una placa de Petri con la ayuda de una pipeta de desplazamiento positivo, la cantidad necesaria para cubrir todo el suelo de la placa.

3. Anteriormente, se habían preparado recortes rectangulares iguales de fibras de PLA, los cuales con la ayuda de unas pinzas se dispusieron encima de la disolución del polímero B dentro de la placa de Petri. Por capilaridad la capa de fibras se adhirió al polímero B y éste penetró en su totalidad en la lámina de fibras. Este proceso se repitió tantas veces como capas de fibras tenía que tener la probeta. Una vez colocada la última capa se depositó encima de ella, con la pipeta de desplazamiento positivo, 1'5 ml de disolución del polímero B, quedando las capas de fibras de PLA integradas con el polímero B formando un composite tal y como se puede apreciar en la Figura 12.

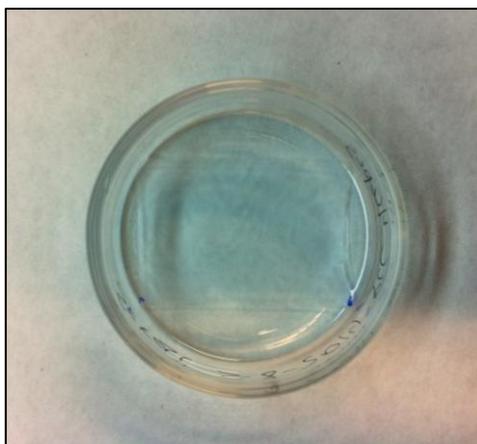


Figura 12: Placa de Petri con la disolución del polímero B y una capa de fibras de PLA preparada para enfriar en el proceso de gelificación, se puede apreciar el rectángulo correspondiente a la capa de fibras.

4. Se marcó debidamente la placa de Petri y se dejó gelificar un total de 12 horas a una temperatura de 4 °C. Pasadas las 12 horas se procedió a precipitar el disolvente C presente en el composite sumergiendo la placa de Petri en agua destilada.

5. Una vez completada la precipitación, por corte, con hoja de bisturí se definió la geometría final de las probetas para ser ensayadas de 3X0'7X0'1 cm. Llegados a este punto las probetas estaban listas para ser ensayadas.

2.8 ENSAYO DE SUTURA

Una vez se habían seleccionado un número óptimo de capas de nanofibras para el refuerzo del dispositivo de polímero B, seleccionado en el apartado anterior en base

con los resultados del ensayo de tracción con fibras, se diseñó un ensayo de sutura, para el estudio del comportamiento del andamio cuando es solicitado bajo un trabajo a tracción a través de un hilo de sutura. Los parámetros del banco de ensayos y el propio banco fueron los mismos que en el caso anterior del ensayo de tracción con fibras, detallado en el apartado anterior.

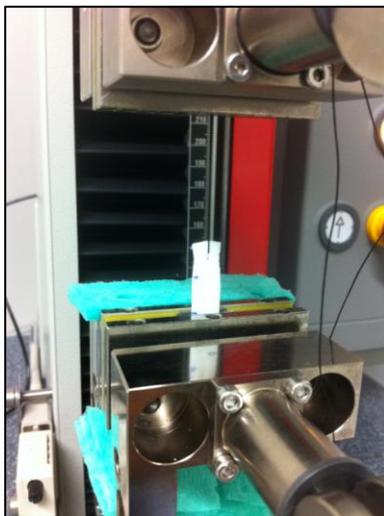


Figura 13: Montaje de la probeta a ensayar con el hilo de sutura fijándola por uno de sus extremos para la realización del ensayo de sutura.

A continuación se detalla el protocolo empleado para la realización del ensayo:

1. Las probetas fueron elaboradas con el mismo protocolo del ensayo de tracción con fibras detallado en el apartado anterior.
2. En este caso el modo de ensayo fue distinto, mientras que en el ensayo de tracción con fibras se fijaba la probeta con la mordaza del banco por los dos extremos, en este caso, tal y como se puede observar el montaje en la Figura 13, la parte inferior de la probeta se fijó en la mordaza, mientras que la parte superior, a 1 cm del borde y en el centro de la probeta se le realizó una pasada con hilo de sutura de seda N°3 (Laboratorios Aragón) y se fijó con un nudo en la mordaza superior del banco de ensayos.

2.9 VISUALIZACIÓN DE MUESTRAS CON SEM

Tanto en el ensayo de tracción con fibras como en el ensayo de degradación, de modo cualitativo para el estudio microscópico de la superficie de las probetas, se realizaron fotografías a través de microscopía electrónica de barrido (SEM). El equipo SEM empleado fue un Nova NanoSEM 230. Para poder realizar la visualización de las muestras con el equipo de SEM, ya que las muestras contenían un alto porcentaje de

agua, antes fue necesario realizar un proceso de liofilización. El equipo empleado para la liofilización fue un Christ-Alpha 1-4.

El protocolo seguido para la realización de microscopía SEM se detalla a continuación:

1. Inicialmente fue necesario reservar las muestras que se quieren observar, debidamente rotuladas en tubos de ensayo de plástico con tapón en condiciones de congelación a una temperatura de -75°C para posteriormente realizarles un proceso de liofilización.

2. Pasadas 24 horas de congelación se les realizó un agujero en el tapón de los tubos de ensayo con las muestras, y se introdujeron en un frasco liofilizador, el cual se conectó al liofilizador durante 24 horas. Por medio de las bajas temperaturas y las condiciones de vacío se logra un proceso de sublimación del agua libre presente en las muestras sin alterar su estructura.

3. Una vez terminado el proceso de liofilización las muestras se montaron en los portaobjetos y fueron llevados a los servicios de la plataforma de nanotecnología del IBEC dónde fueron recubiertas de oro por medio del proceso de pulverización catódica (Figura 14).

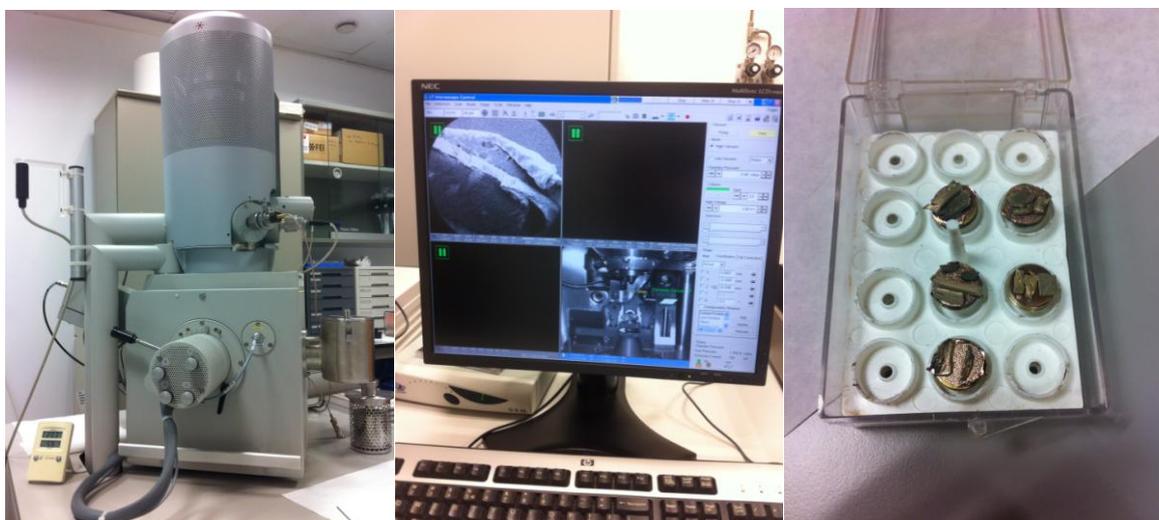


Figura 14: Equipo de SEM empleado (izquierda). Cuadro de control del equipo de SEM durante su uso (centro). Conjunto de cinco portaobjetos con las muestras montadas y pulverizadas con oro (derecha).

4. Completados los procesos de liofilización y pulverización catódica las muestras estaban listas para ser visualizadas a través del equipo de SEM. Con el programa controlador del equipo de SEM (Figura 14), se realizaron las fotografías de las muestras deseadas.

3 RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en cada ensayo. Los resultados se encuentran expresados en forma de gráficas y figuras para ofrecer una lectura más visual, acompañados de una descripción objetiva de los mismos. Por otra parte, los resultados numéricos se encuentran en el Anexo en forma de tablas para cada ensayo.

La interpretación de los resultados obtenidos se encuentra en el capítulo 4, correspondiente a la discusión, junto con las explicaciones desarrolladas en la realización e interpretación de los ensayos aportando respuestas a las hipótesis planteadas en el inicio del proyecto.

3.1 ENSAYO DE DEGRADACIÓN

Los resultados del ensayo de degradación se muestran a continuación en forma de gráficas, cada una de ellas corresponde a uno de los parámetros estudiados en el ensayo y cada barra de color corresponde a una de las cinco concentraciones poliméricas estudiadas. Las concentraciones se encuentran agrupadas por semanas.

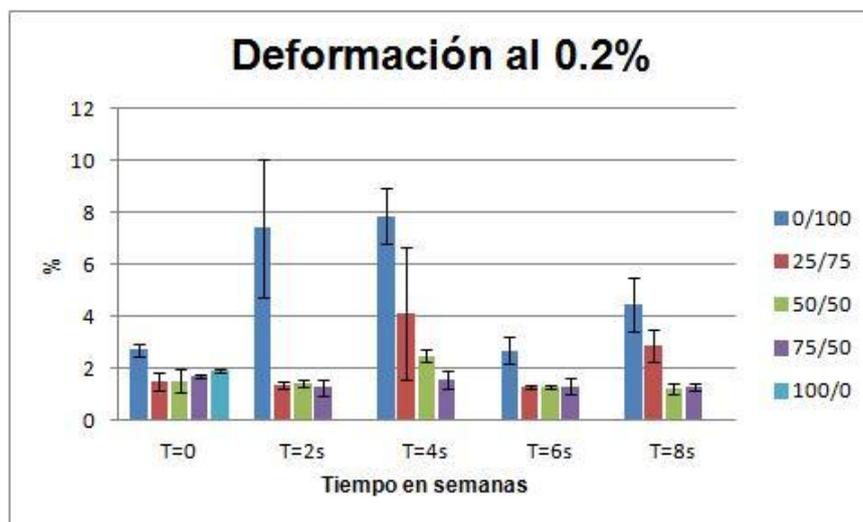


Figura 15: Gráfico de la deformación en el límite elástico del ensayo de degradación, a distintos tiempos y distintas concentraciones.

En los resultados observados de la deformación en el límite elástico (Figura 15) no se aprecia ningún patrón de comportamiento de las concentraciones. Destacan las altas

deformaciones de la concentración 0/100 de las semanas 2 y 4, mientras que en la semana 0 su deformación es menor. Por otro lado se puede apreciar que la concentración 100/0 desaparece a partir de la segunda semana, debido a su alta fragilidad que imposibilitó su ensayo.

En el caso de la deformación máxima registrada (Figura 16) se puede apreciar como los valores de deformación decrecen para cada concentración con el paso del tiempo, además para cada semana se observa como la deformación disminuye con el aumento del porcentaje del polímero A, siendo los valores de deformación de éstas prácticamente imperceptibles.

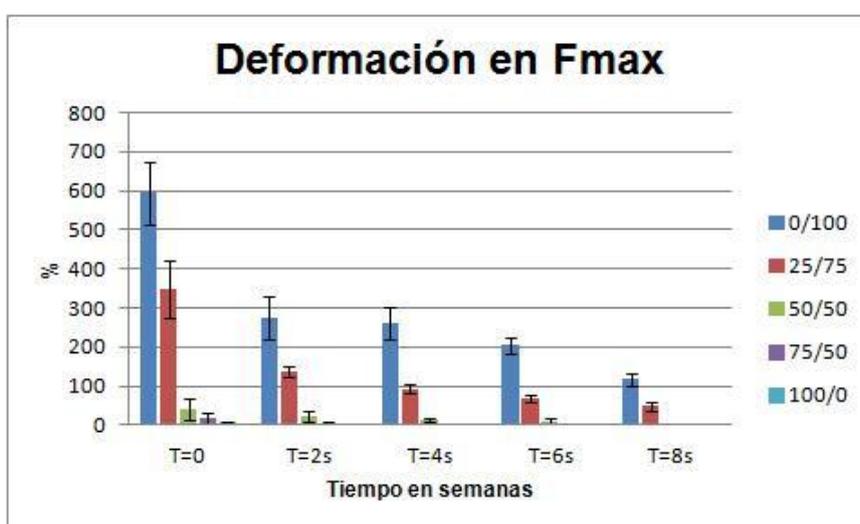


Figura 16: Gráfico de la deformación en el momento de máxima fuerza del ensayo de degradación, a distintos tiempos y distintas concentraciones.

En el estudio del módulo de Young (Figura 17) se puede apreciar que para cada semana, el valor aumenta con el incremento del porcentaje de polímero A. En cambio, en la comparativa del comportamiento del módulo entre semanas para las mismas concentraciones no se observa un patrón ni de crecimiento ni de decrecimiento. Entre la semana cero y la segunda se aprecia un aumento, sin embargo, a partir de la cuarta empiezan a decrecer los valores hasta la sexta y octava en las cuales se aprecia una ligera subida.

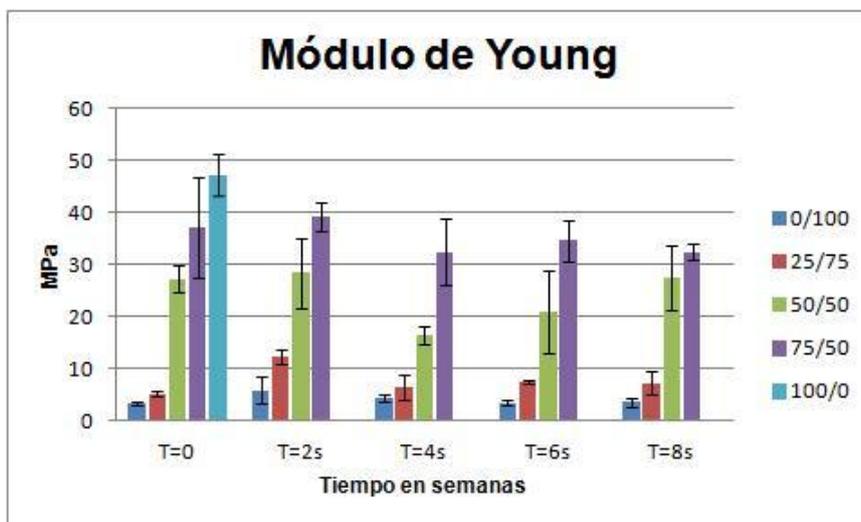


Figura 17: Gráfico del valor del módulo de Young del ensayo de degradación, a distintos tiempos y distintas concentraciones.

En el caso de las tensiones, los valores registrados en el límite elástico (Figura 18), los valores más altos corresponden a la semana cero y estos aumentan con el incremento del porcentaje de polímero A. En cambio, en las otras semanas se registran fluctuaciones para los valores de la tensión.

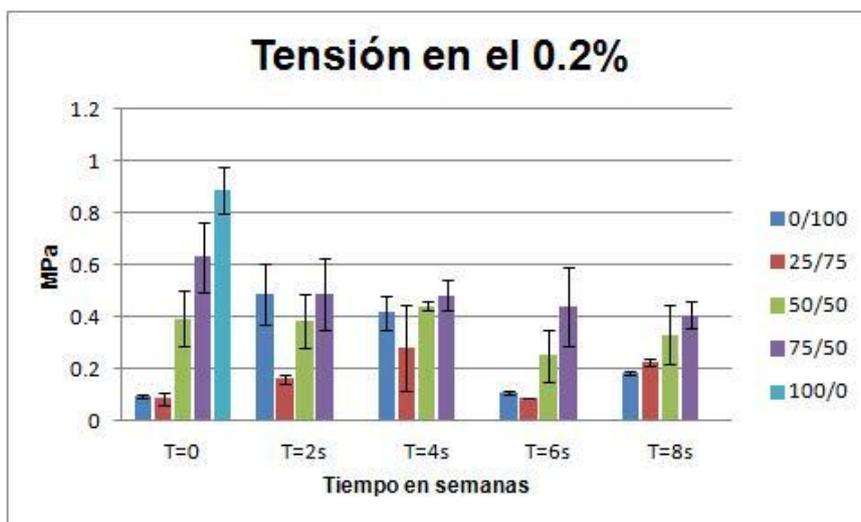


Figura 18: Gráfico de la tensión en el límite elástico del ensayo de degradación, a distintos tiempos y distintas concentraciones.

Por el contrario, en la tensión máxima registrada (Figura 19), sí se puede apreciar un patrón del comportamiento de las tensiones entre las distintas semanas en que se realizaron los ensayos. Se puede apreciar como con el paso del tiempo, los valores de la tensión máxima entre las mismas concentraciones en distintas semanas va disminuyendo. En cambio, no queda clara la influencia de las concentraciones para la

misma semana, ya que hay semanas en que los valores de la tensión aumentan con el incremento del polímero A y otras en la que la tensión disminuye con el incremento del polímero B.

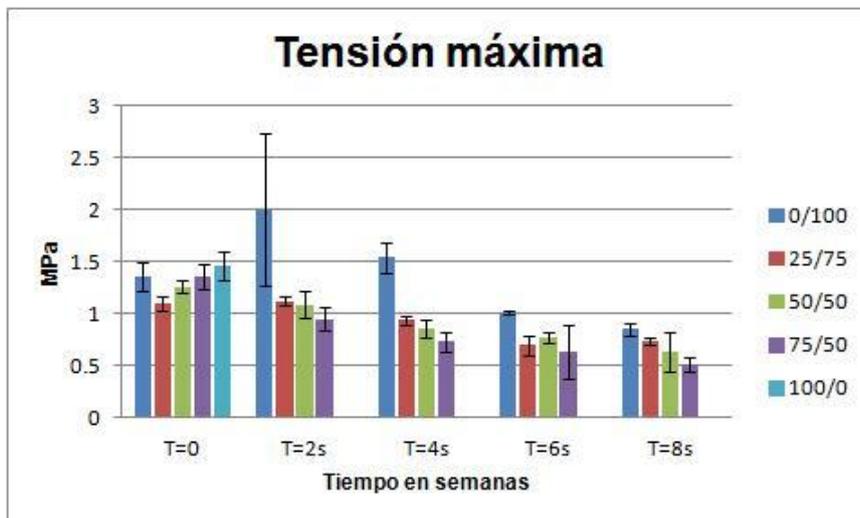


Figura 19: Gráfico de la tensión máxima del ensayo de degradación, a distintos tiempos y distintas concentraciones.

Por último, en el estudio de la fuerza registrada en el límite elástico (Figura 20), se puede apreciar como en el caso de las concentraciones correspondientes a 50/50, 75/25 y 100/0 (esta última solo se pudo ensayar en la semana 0) disminuyen su valor con el paso del tiempo. En cambio, se puede observar como para las concentraciones 0/100 y 25/75, no muestran una tendencia clara, sufriendo aumentos y descensos durante el ensayo de degradación.

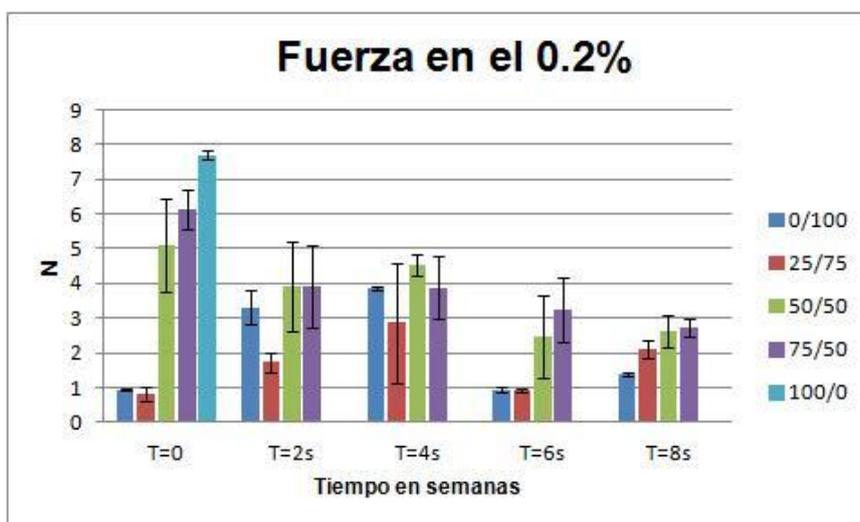


Figura 20: Gráfico de la fuerza en el límite elástico del ensayo de degradación, a distintos tiempos y distintas concentraciones.

3.2 ESTUDIO DEL pH DURANTE LA DEGRADACIÓN

Durante la realización del ensayo de degradación, se realizó semanalmente la medición del pH de los frascos que contenían las probetas de cada concentración con el medio. Los valores medidos de pH para cada concentración por semanas se pueden apreciar a continuación en la Figura 21.

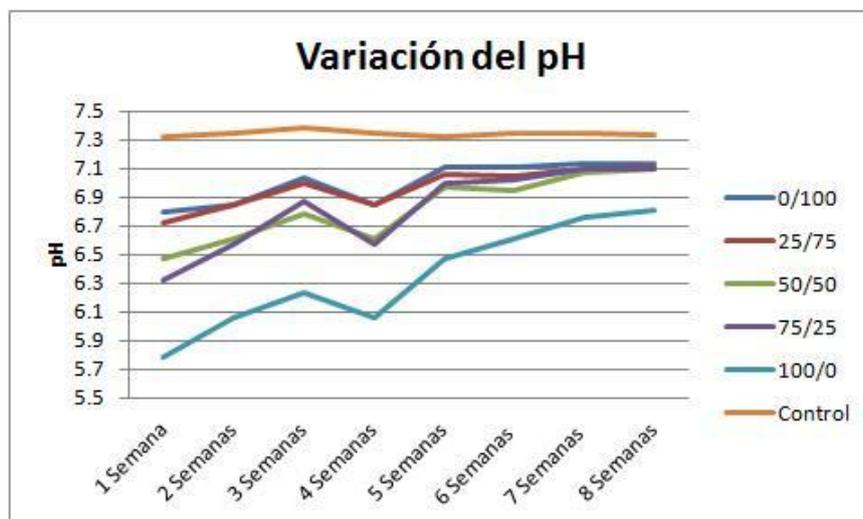


Figura 21: Gráfica correspondiente a la medición del pH del medio dónde se encontraban las probetas para el ensayo de degradación según concentración y semanas.

Se puede apreciar como en el caso del control (frasco sin ninguna probeta, solo con el medio) se mantiene constante alrededor del valor de pH de 7.3. Se puede observar como los valores más bajos de pH para las distintas concentraciones en la primera semana del ensayo corresponden a las concentraciones con mayor porcentaje de polímero A. Esta tendencia continúa a lo largo del ensayo, pero cada vez con valores de pH más próximos a 7.

Existe un punto de inflexión correspondiente a la cuarta semana que rompe con la tendencia general de aumento de los valores del pH. En este caso se produce una bajada significativa, este fenómeno solo se produjo en la cuarta semana, en todas las otras mediciones se mantiene la tendencia de aumento del pH para todas las concentraciones de polímeros A y B (excepto el control que se mantiene constante).

3.3 ENSAYO DE CALORIMETRÍA CON DSC PARA LAS FIBRAS OBTENIDAS

Se realizaron un total de 7 láminas de nanofibras de PLA para su empleo en el ensayo de tracción de fibras y de sutura. En cada una de ellas se realizó un estudio de la cristalinidad que presentaban las fibras por medio del proceso de calorimetría diferencial de barrido.

Tabla 2: Porcentajes de cristalinidad y desviaciones estándares obtenidas en el ensayo de calorimetría diferencial de barrido.

Porcentaje Cristalinidad (%)	Promedio	Desviación Estándar
Ciclo 1	14'48	6'47
Ciclo 2	4'59	3'71

En la Tabla 2 se muestra el promedio de cristalinidad medido en las láminas de las nanofibras correspondiente al primer y segundo ciclo del ensayo. Además también se muestran las desviaciones estándares de los resultados. Cabe decir, que los valores de cristalinidad en el primer ciclo van desde un 6% la que menos, hasta un 24% la que más. Los valores de cada lámina obtenidos, así como la temperatura de transición vítrea registrada entre otros valores se encuentran en la Tabla 10 del Anexo.

3.4 ENSAYO DE TRACCIÓN CON FIBRAS

Con el fin de determinar qué número de capas de fibras de PLA es el más óptimo para la aplicación en el dispositivo del aumento del tendón del manguito rotador, se realizó el ensayo de tracción con probetas que van desde el control (C, sólo polímero B sin ninguna capa de fibras), hasta las 10 capas, aumentando de 2 en 2 el número de capas.

La deformación apreciada en el límite elástico, tal y como muestra la Figura 22, se mantiene estable entorno al 4'5% de deformación, acentuándose para los casos del control y de las seis capas, subiendo un punto por encima de los demás. Además, a estos dos valores les corresponde las desviaciones estándares más elevadas.

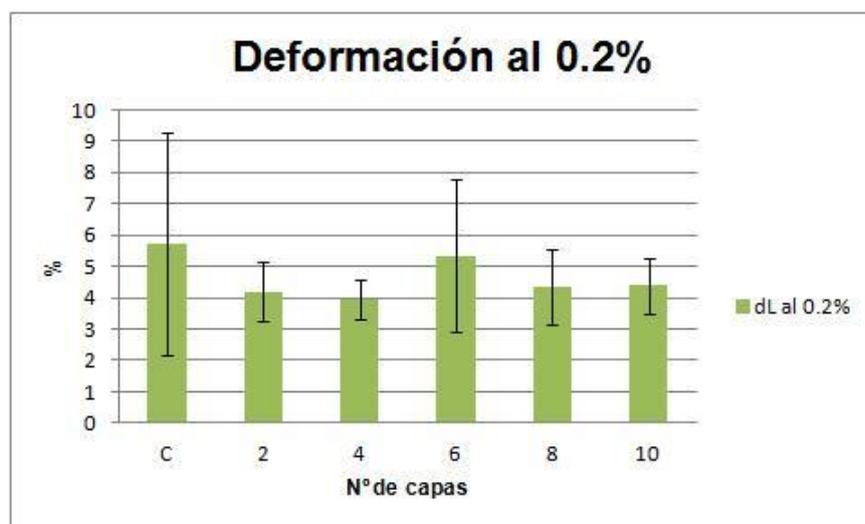


Figura 22: Gráfico de la deformación en el límite elástico en el ensayo de tracción según número de capas de fibras de PLA.

Para el caso de la deformación máxima obtenida, se puede apreciar en la Figura 23, que el control destaca frente a las probetas con capas de fibras de PLA, las cuales se mantienen constantes excepto el caso de la probeta de polímero B con 10 capas de fibras, con una deformación inferior a las demás.

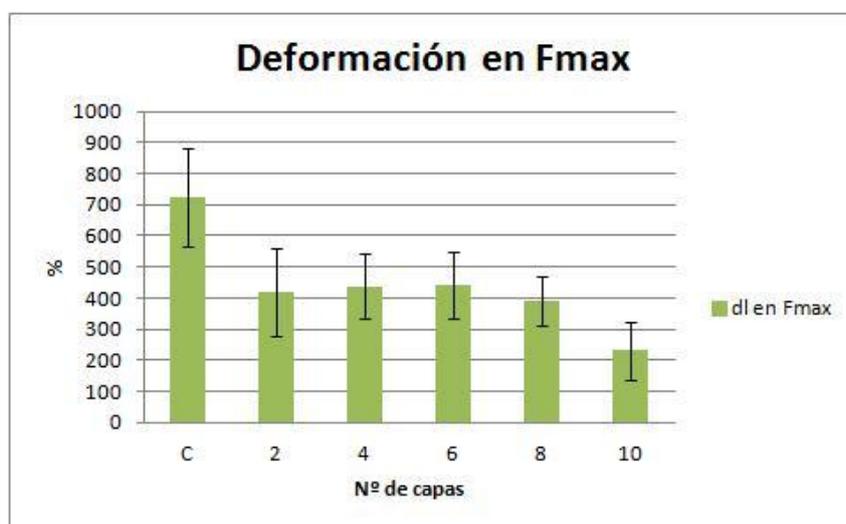


Figura 23: Gráfico de la deformación máxima en el ensayo de tracción según número de capas de fibras de PLA.

En el caso del estudio del módulo de Young, el resultado obtenido en la Figura 24 muestra como existe una progresión lineal en aumento a medida que incrementan el número de capas de fibras, efecto que se buscaba desde un principio con la introducción de las nanofibras de PLA en el dispositivo. Se puede apreciar como el control es el valor

más bajo no llegando a 5 MPa, mientras que para el composite de diez capas se obtiene un módulo siete veces mayor llegando a los 35 MPa.

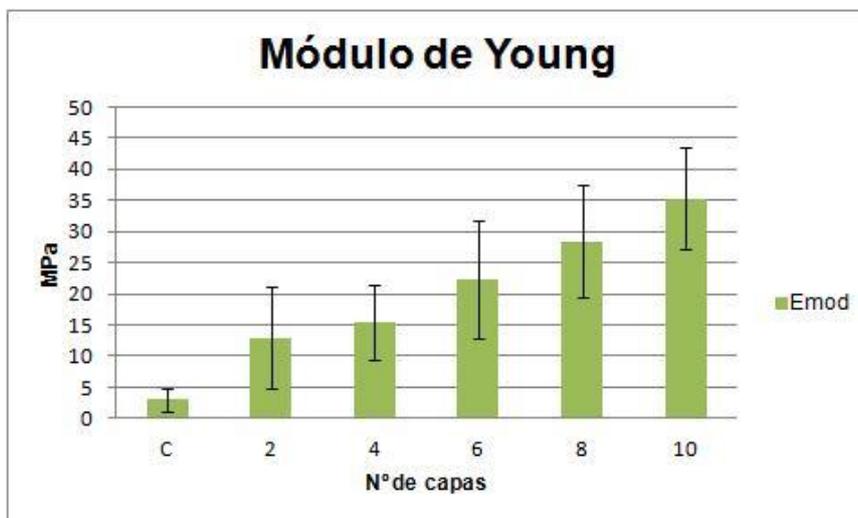


Figura 24: Gráfico del módulo de Young en el ensayo de tracción según número de capas de fibras de PLA.

En el caso de la fuerza registrada en el límite elástico (Figura 25), a diferencia de la deformación en el límite elástico, sí se puede apreciar un patrón creciente al aumentar el número de las capas de fibras, similar al caso del módulo de Young, pasando de 1 N del control hasta los 13 N para el caso de las diez capas.

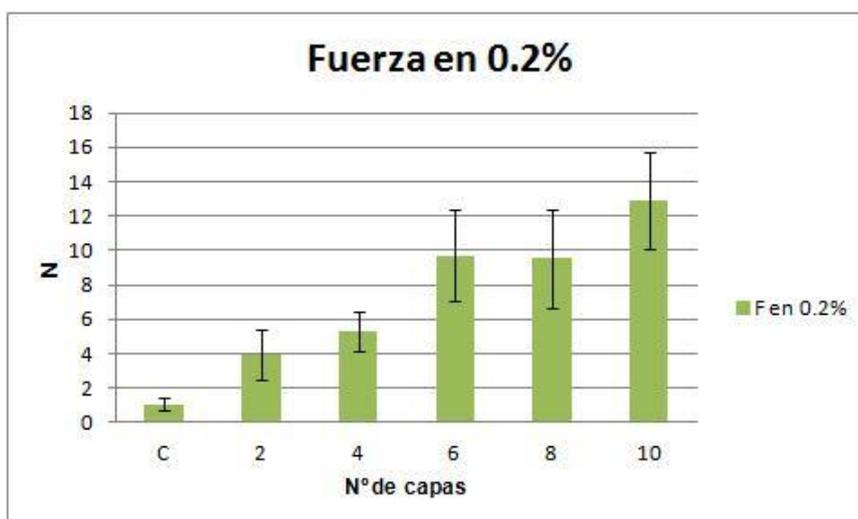


Figura 25: Gráfico de la fuerza en el límite elástico en el ensayo de tracción según número de capas de fibras de PLA.

Igual se repite en el caso de la tensión medida en el límite elástico, con el mismo patrón creciente (Figura 26). Las desviaciones estándares son más elevadas, acentuándose este incremento en las probetas de 2, 6 y 8 capas de fibras de PLA.

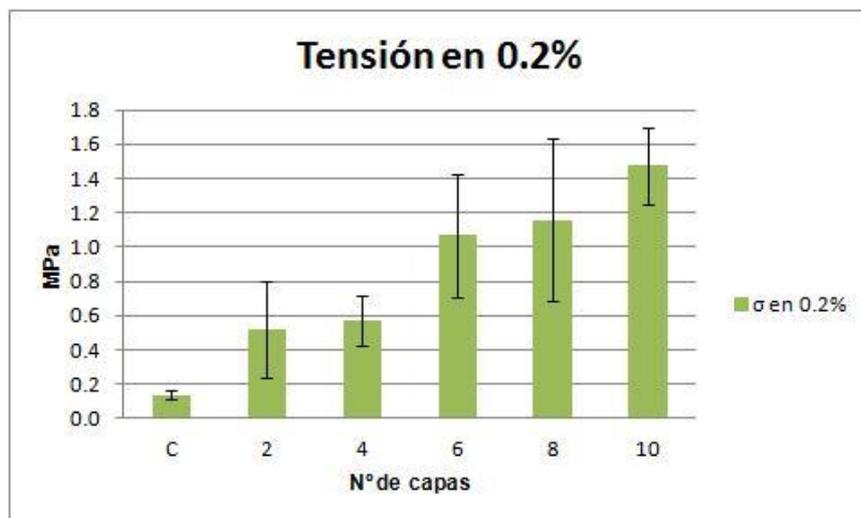


Figura 26: Gráfico de la tensión en el límite elástico en el ensayo de tracción según número de capas de fibras de PLA.

Para la tensión máxima (Figura 27) se mantiene la misma tendencia observada en el límite elástico, a diferencia de la deformación, que se observó un comportamiento distinto para el límite elástico y en el caso de la tensión máxima aplicada.

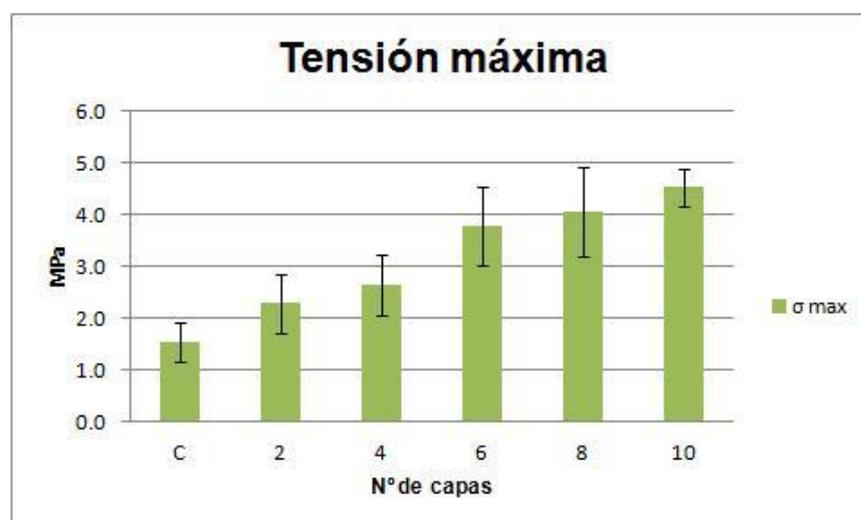


Figura 27: Gráfico de la tensión máxima en el ensayo de tracción según número de capas de fibras de PLA.

En general todos los parámetros estudiados en el ensayo de tracción de probetas de polímero B con nanofibras de PLA, al aumentar el número de capas de fibras, aumentan los valores de los parámetros estudiados.

3.5 ENSAYO DE SUTURA

A continuación se presentan los resultados del ensayo de tracción con hilo de sutura en la Tabla 3. En este caso se ensayó solo las probetas correspondientes al polímero B con 10 capas de fibras de PLA, ya que a partir del ensayo de tracción con fibras se seleccionó las diez capas como el composite más óptimo.

Tabla 3: Resultados de los parámetros estudiados en el ensayo de sutura.

	Emod (MPa)	dL al 0'2% (%)	dL en Fmax (%)	σ al 0'2% (MPa)	σ max (MPa)	F al 0'2% (N)	% de Fibras
Prom	41'900	2'782	15'915	0'983	2'262	8'652	29'402
Des. Est.	7'209	0'944	4'806	0'227	0'249	2'466	3'103

Los valores del módulo de Young son ligeramente mayores que los registrados en el ensayo de tracción con fibras en el caso de las diez capas. Mientras que los valores del porcentaje de deformación, tanto en el límite elástico como en el porcentaje de deformación para la tensión máxima aplicada, son valores significativamente más bajos, ya que en el ensayo de tracción con las diez capas de fibras, el porcentaje de deformación máxima ha sido de alrededor de 200% y en cambio en el ensayo de sutura el porcentaje de deformación máxima ha sido de aproximadamente 15%, valor significativamente más bajo.

En el estudio de la tensión sucede el mismo fenómeno, los valores de la tensión tanto en el límite elástico como la tensión máxima, también son valores más bajos en el ensayo de sutura que en el ensayo de tracción con fibras. Igual sucede con la fuerza aplicada en el límite elástico, valor que también está por debajo en el ensayo de sutura que en el ensayo de tracción con fibras.

Por último se ha medido el porcentaje de fibras que hay en el composite, obteniendo un porcentaje de fibras de prácticamente el 30% de fibras y el resto de polímero B.

3.6 ESTUDIO SUPERFICIAL DE LAS MUESTRAS CON SEM

3.6.1 Estudio superficial de las muestras del ensayo de degradación

Con el objetivo de estudiar si se producía algún cambio en la superficie de las probetas de las distintas concentraciones estudiadas en el ensayo de degradación se realizaron observaciones de las probetas ensayadas con un equipo de microscopía SEM.

Los resultados observados en todas las concentraciones poliméricas estudiadas a lo largo de 8 semanas no se apreciaron diferencias superficiales, como es el ejemplo de la Figura 28, en la cual se pueden observar dos fotografías correspondientes a probetas de la misma concentración a las 4 semanas y a las 8 semanas y como se puede apreciar no se observan diferencias superficiales cualitativas entre ambas fotografías.

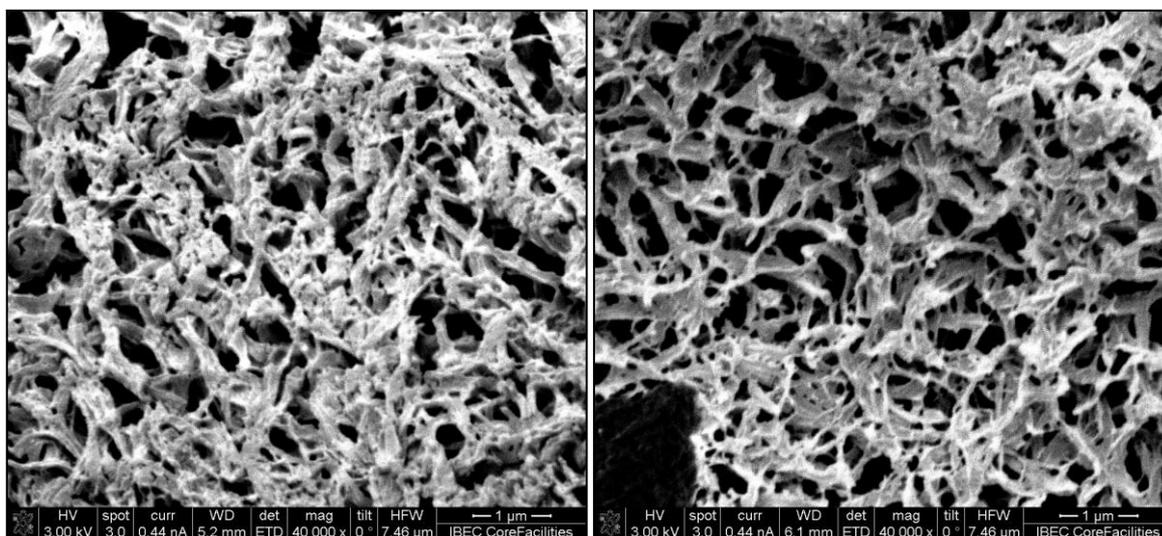


Figura 28: Imagen de SEM para la concentración 100/0 a las 4 semanas (izquierda) e imagen de SEM para la concentración 100/0 a las 8 semanas (derecha).

Este patrón se repite a lo largo de todas las concentraciones y a lo largo de todas las semanas que duró el ensayo.

3.6.2 Estudio superficial de las muestras del ensayo de tracción con fibras

Al introducir el refuerzo de fibras en la matriz del polímero B, era de vital importancia conocer la estructura microscópica de las probetas una vez ensayadas para poder observar el comportamiento de las fibras. En la Figura 29 se puede apreciar una probeta ya ensayada de 6 capas de fibras. En ella se observan las fibras entrecruzadas

de forma aleatoria, sin ningún tipo de orientación, además se puede apreciar como las fibras parecen encontrarse completamente recubiertas de polímero B mostrando una apariencia similar a la de una telaraña.

Si se observan las fibras a más aumentos, como es el caso de la Figura 29, correspondiente a una probeta ensayada de 8 capas de fibras, se ve con mayor claridad el fenómeno anteriormente explicado. Se observan las fibras entrecruzadas aleatoriamente y uniéndolas y recubriéndolas entre ellas se puede observar el polímero B actuando como matriz de unión.

Otro punto de interés en el estudio cualitativo superficial de las probetas consiste en observar la unión en conjunto de todas las capas de PLA con el polímero B y si bajo condiciones de ensayo de tracción se separan o quedan unidas formando una sola pieza.

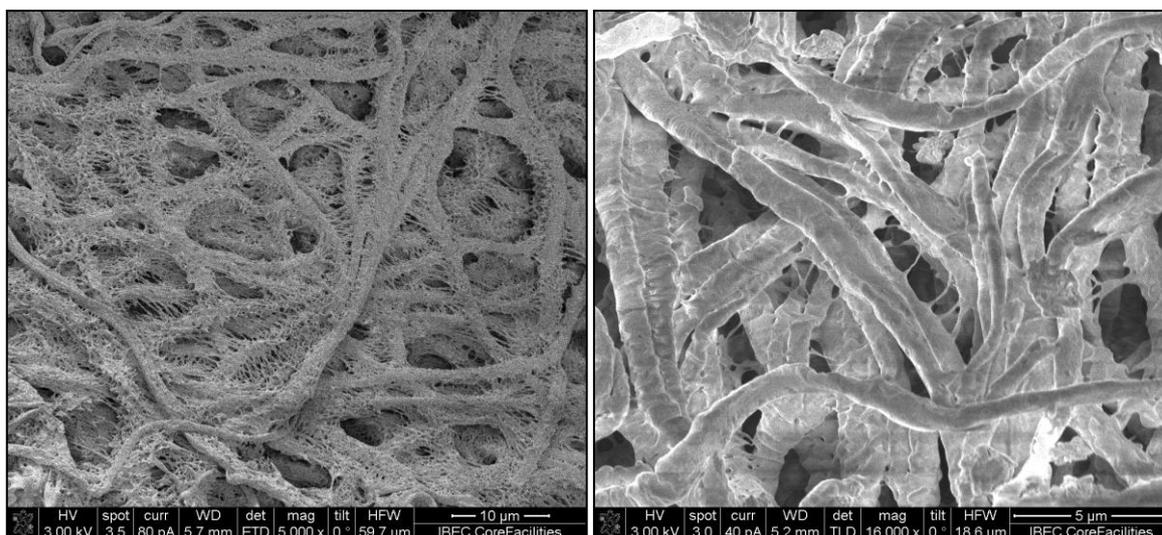


Figura 29: Imagen de SEM de una probeta (0/100) de 6 capas de fibras después del ensayo de tracción (izquierda). Imagen de SEM de una probeta (0/100) de 8 capas de fibras después del ensayo de tracción (derecha).

En la Figura 30 se puede apreciar la sección de una probeta ensayada de 8 capas. Se pueden observar grietas en el interior de la sección en la dirección del esfuerzo mecánico, pero no se observan separación entre capas de fibras, más bien tiene una apariencia homogénea sin observarse diferencias de fases entre capas.

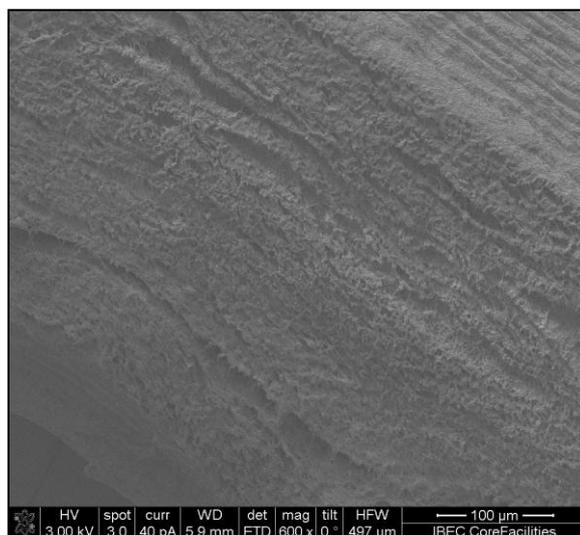


Figura 30: Imagen de SEM de la sección de una probeta (0/100) de 8 capas después del ensayo de tracción.

4 DISCUSIÓN

Continuando con la investigación de un dispositivo biomédico para el aumento del tendón del manguito rotador, iniciada en el anterior informe correspondiente al periodo de prácticas en el que se caracterizaron las propiedades mecánicas de los polímeros A y B. Se realizaron ensayos de tracción, compresión y difusión. Con los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que entre las concentraciones estudiadas de los polímeros, la más óptima corresponde al polímero B.

Las propiedades de los polímeros A y B tanto de biodegradación como de biocompatibilidad sitúan el dispositivo en la tercera generación de andamios para el manguito rotador, correspondiendo a la generación de andamios sintéticos degradables. Como se explicó en el pasado informe y en la introducción del presente, con el inicio de la investigación de la técnica del aumento del manguito rotador surgió la primera generación de andamios, estructuras no degradables, las cuales inicialmente estaban hechas de materiales no degradables como el teflón o la fibra de carbono. Con el paso del tiempo fueron apareciendo problemáticas, como la fragmentación del dispositivo por desgaste, provocando la migración de pequeñas partículas del dispositivo y éstas produciendo inflamación, infecciones o incluso impotencia funcional de la zona afectada. Esto es debido a la dificultad de mantener un dispositivo dentro del cuerpo inalterable con el paso del tiempo.

Debido a estas contrariedades surgió una segunda generación de dispositivos, andamios biológicos a base de matriz extracelular (ECM), biocompatibles y reabsorbibles por parte del cuerpo, de este modo se consigue evitar el problema de mantener inalterable con el tiempo una estructura dentro del cuerpo de manera indefinida. En contra, esta generación de andamios biológicos presenta otro tipo de problemáticas. Al tratarse de material de procedencia biológica es necesaria la completa eliminación de las células que contiene, cosa que no siempre es posible, hecho que hace aumentar el riesgo de antigenicidad. Otro problema a destacar de este tipo de andamios recae sobre sus propiedades mecánicas, en los ensayos mecánicos realizados "*In Vitro*" en condiciones de laboratorio muestra resultados muy óptimos, pero se ha visto que en condiciones "*In Vivo*" debido a su rápida reabsorción en el interior del cuerpo hace disminuir las propiedades mecánicas, siendo insuficientes para la aplicación del aumento

del tendón en el periodo de regeneración del tendón no pudiendo evitar que se produzca la recidiva de la lesión.

Por último llegó una tercera generación, andamios sintéticos degradables, motivada por la corrección de los problemas encontrados en la primera y la segunda generación. Al ser materiales sintéticos y degradables se eliminan los problemas de mantener el dispositivo inalterable indefinidamente en el cuerpo, al no contener material biológico no hay riesgo de antigenicidad y al escoger el material se puede controlar el tiempo de degradación. En esta tercera generación de andamios es en la que se encuentra el estudio de dispositivo biomédico realizado.

Con los resultados del pasado informe se observó como las propiedades mecánicas de las cinco concentraciones estudiadas de los polímeros A y B eran bastante más bajas que las de los productos comerciales a base de ECM como muestra la Figura 4, por ello se decidió estudiar un refuerzo para la concentración seleccionada (únicamente polímero B). Se decidió estudiar la aplicación de un refuerzo a base de láminas de nanofibras del polímero PLA creando un composite entre una matriz de polímero B y fibras de PLA, además de continuar con el estudio de propiedades mecánicas de las cinco concentraciones para tenerlas caracterizadas, como puede ser el ensayo de degradación.

Observando los resultados obtenidos en el ensayo de degradación, los valores de los parámetros estudiados en la semana 0 del ensayo son distintos que los del ensayo de tracción realizados en el pasado informe, dando una apariencia en general, de que las probetas de los polímeros A y B son más rígidos que las empleadas en el pasado informe. Los valores del módulo de Young en la semana 0 son ligeramente mayores que en el ensayo de tracción, igual sucede en las tensiones. Una posible explicación puede recaer en el hecho que las concentraciones poliméricas para el ensayo se encontraban reservadas ya precipitadas desde hacía dos semanas conservadas en agua destilada. Otro motivo por el cual los resultados también puedan variar ligeramente es que en el ensayo de degradación se emplearon un número menor de probetas para ensayar.

También se ha podido observar como la concentración 100/0 (únicamente polímero A) a las dos semanas ya es imposible de ensayar debido a su avanzado estado de degradación, además se observa como con el tiempo las propiedades mecánicas disminuyen de forma más pronunciada para las concentraciones con mayor porcentaje de polímero A. Este hecho reafirma la elección del polímero B como la concentración más óptima para la aplicación del aumento del tendón siendo la concentración con mejores

propiedades mecánicas a las 8 semanas, aunque el polímero A presente mejores propiedades mecánicas que el B, su rápida degradación provocan un rápido descenso de dichas propiedades siendo el polímero B la concentración más óptima con mejores propiedades.

Relacionado con el ensayo de tracción se realizó el control del pH del medio dónde se encontraban las probetas para ensayar de forma semanal. Se puede apreciar como en la semana 0, las concentraciones con mayor porcentaje de polímero A son las que menor pH presentan (siendo 100/0 la que menor pH se ha observado), esta tendencia disminuye con el paso del tiempo. Esta progresión puede ser debida a que cada dos semanas se extraían las probetas necesarias para ensayar en el estudio de degradación, disminuyendo en la concentración polimérica en el medio. Aunque el polímero A en condiciones fisiológicas provoque una acidificación del medio donde se encuentre, no es un hecho muy preocupante ya que en interior del cuerpo hay una circulación continua del medio que permitiría la compensación del pH.

Volviendo al refuerzo con fibras del polímero B, en el proceso de producción de las fibras por electrospinning, no hubo ninguna incidencia destacable, a modo de mejora, en una futura elaboración de nanofibras de PLA por electrospinning, creo que sería adecuado el control de los parámetros de humedad y temperatura de la sala dónde se realiza el proceso, ya que según la variación de estos parámetros se producía la obstrucción de la micro punta por acumulación de material.

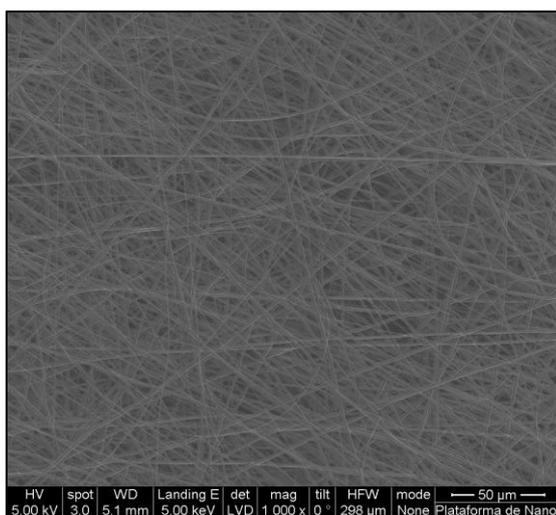


Figura 31: Imagen de SEM de nanofibras de PLA con orientación aleatoria.

Una vez elaboradas las láminas de nanofibras, se estudió el porcentaje de cristalinidad que presentaban ya que no nos interesaba un valor muy elevado de éste, para que no limitara en exceso la maleabilidad de la matriz, al no contener las fibras

demasiada fase amorfa. Los resultados obtenidos fueron de alrededor de un 15% de cristalinidad, óptimo para nuestro objetivo. También fue necesario estudiar distintos métodos para la integración de las capas de fibras con el polímero B. Inicialmente entre lámina y lámina de fibras se añadía polímero B, pero tras ensayar las probetas producidas de este modo se observó que bajo el esfuerzo de tracción se separaban las láminas de fibras del polímero B, que no formaban una unión completa. Por ello se decidió emplear el método explicado en el capítulo 2.5, consiguiendo una completa unión entre las fibras y la matriz de polímero B.

Con el método de obtención de las probetas con fibras optimizado se realizó el ensayo de tracción con fibras con el fin de estudiar el comportamiento del polímero B reforzado con distintos números de láminas de fibras de PLA. A la hora de la interpretación de los resultados es importante tener en cuenta que las mordazas empleadas en el banco de ensayos mecánicos limitan el ensayo a un máximo de 40 N y en el caso de las probetas de 8 y 10 capas de fibras, hubieron una parte de estas que llegaron a los 40 N, forzando la detención del ensayo. Este hecho puede haber limitado los valores de los parámetros estudiados para las probetas con 8 y 10 capas. Sería interesante poder repetir el ensayo con una mordaza que no tuviera esa limitación. Observando los resultados obtenidos en el ensayo frente la muestra control se puede apreciar como la mejora es notable al introducir tan solo 2 capas de fibras. En el caso del módulo de Young, este aumenta progresivamente al aumentar el número de capas en la matriz de polímero B. Además, de forma cualitativa con el manejo de las probetas, podemos apreciar como el hecho de introducir las fibras no ha limitado excesivamente la maleabilidad del polímero, factor clave para la aplicación del aumento del tendón al ser necesario que se pueda introducir por el método quirúrgico de artroscopia.

Estudiando las propiedades mecánicas que presenta la probeta correspondiente a la matriz de polímero B con 10 capas de fibras, se ha obtenido un módulo de Young 12 veces superior que el control y sin comprometer prácticamente a las propiedades de flexibilidad y maleabilidad. Por todo ello se decidió seleccionar la muestra de 10 capas de fibras para continuar con el estudio realizando un ensayo de sutura, para estudiar el comportamiento de un ensayo de tracción con la probeta fijada por un lado con la mordaza y por el otro por un hilo de sutura.

Los resultados obtenidos son los esperados, con unas propiedades mecánicas notablemente más bajas que en el ensayo de tracción, ya que en este caso, en vez de

sujetar uniformemente un lado completo de la probeta, se le ha provocado un defecto al agujerar la probeta para pasar el hilo de sutura.

En cuanto al estudio de la superficie con SEM del ensayo de degradación, como se ha explicado en el apartado de resultados, no se han observado diferencias apreciables entre las observaciones realizadas entre las distintas concentraciones estudiadas a lo largo del tiempo de duración del ensayo.

Por último, en el estudio superficial de las muestras empleadas en el ensayo de tracción con fibras, los resultados han sido muy optimistas, debido a que las capas de fibras observadas a través del equipo de SEM se aprecian completamente integradas con la matriz del polímero B formando perfectamente un composite, además se aprecian como las nanofibras de PLA quedaron impregnadas completamente del polímero B actuando como fijación entre fibras.

Con todos los resultados obtenidos a lo largo de la investigación realizada tanto en el anterior informe (correspondiente al periodo de prácticas) como en el presente (correspondiente al Proyecto Fin de Grado) llegamos a la conclusión que la concentración más óptima para la aplicación del aumento del tendón del manguito rotador corresponde a la de 0/100 formada íntegramente por polímero B con un refuerzo de 10 láminas de nanofibras del polímero PLA. Adicionalmente se ha obtenido una amplia caracterización de las propiedades mecánicas de las cinco concentraciones estudiadas de los polímeros A y B que puede ser empleada para futuros proyectos con dichos polímeros.

5 CONCLUSIONES

Con los ensayos realizados y los resultados obtenidos, podemos concluir con la obtención de una completa caracterización de las propiedades mecánicas de las cinco concentraciones estudiadas de los polímeros A y B para futuras aplicaciones.

Además, siguiendo la investigación en la elaboración de un dispositivo biomédico para la aplicación del aumento de tendón del manguito rotador, se ha logrado la elaboración de un refuerzo para la matriz de polímero B (seleccionada en el pasado informe), elaborando un protocolo de trabajo y obteniendo resultados óptimos para su uso, con unas propiedades mecánicas, que se han visto incrementadas favorablemente sin comprometer las condiciones de una buena flexibilidad y maleabilidad para su uso en cirugías de artroscopia, además de su caracterización mecánica de tracción en condiciones de sutura.

Por todo ello se concluye que el composite realizado por la matriz de polímero B junto con las 10 capas de nanofibras de PLA es la solución más óptima para su empleo como andamio sintético degradable para el aumento del tendón del manguito rotador.

5.1 ACCIONES FUTURAS

Llegados a este punto de la investigación creemos que la caracterización mecánica del dispositivo ha quedado cubierta ampliamente. Sin embargo ha llegado el momento de empezar una caracterización del dispositivo desde el punto de vista biológico. Sabemos que tanto el polímero B como las nanofibras de PLA son completamente biocompatibles, pero sería necesario el estudio del comportamiento celular en el dispositivo además de empezar con ensayos "*In Vivo*" para el estudio del comportamiento del dispositivo en condiciones de trabajo habitual.

6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Aurora, J. McCarron, J. P. Iannotti, and K. Derwin, "Commercially available extracellular matrix materials for rotator cuff repairs: state of the art and future trends.," *J. Shoulder Elbow Surg.*, vol. 16, no. 2007, pp. S171–8, 2007.
- [2] X. Zhang, D. Bogdanowicz, C. Erisken, N. M. Lee, and H. H. Lu, "Biomimetic scaffold design for functional and integrative tendon repair," *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 21. pp. 266–277, 2012.
- [3] G. Wavreille and C. Fontaine, "Tendón normal: anatomía y fisiología," *EMC - Aparato Locomotor*, vol. 42, no. 1. Elsevier, pp. 1–12, 2009.
- [4] O. Hakimi, P. A. Mouthuy, and A. Carr, "Synthetic and degradable patches: An emerging solution for rotator cuff repair," *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 94, pp. 287–292, 2013.
- [5] R. Russo, L. Vernaglia Lombardi, V. Visconti, and G. Della Rotonda, "Massive rotator cuff tear treated with a synthetic patch: A case report 16 years after surgery," *Musculoskelet. Surg.*, vol. 95, pp. 83–87, 2011.
- [6] "FDA 510K." [Online]. Available: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/510kClearances/>.
- [7] I. Wong, J. Burns, and S. Snyder, "Arthroscopic GraftJacket repair of rotator cuff tears," *J. Shoulder Elb. Surg.*, vol. 19, no. 2, pp. 104–109, 2010.
- [8] F. A. Barber and J. Aziz-Jacobo, "Biomechanical Testing of Commercially Available Soft-Tissue Augmentation Materials," *Arthrosc. - J. Arthrosc. Relat. Surg.*, vol. 25, no. 11, pp. 1233–1239, 2009.
- [9] J. P. Iannotti, M. J. Codsí, Y. W. Kwon, K. Derwin, J. Ciccone, and J. J. Brems, "Porcine small intestine submucosa augmentation of surgical repair of chronic two-tendon rotator cuff tears. A randomized, controlled trial.," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 88, no. 6, pp. 1238–44, Jun. 2006.
- [10] G. Yang, B. B. Rothrauff, and R. S. Tuan, "Tendon and ligament regeneration and repair: Clinical relevance and developmental paradigm," *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.*, vol. 99, no. 3, pp. 203–222, 2013.
- [11] Y. Xu, J. Wu, H. Wang, H. Li, N. Di, L. Song, S. Li, D. Li, Y. Xiang, W. Liu, X. Mo, and Q. Zhou, "Fabrication of Electrospun Poly(L-Lactide-co-epsilon-Caprolactone)/Collagen Nanoyarn Network as a Novel, Three-Dimensional, Macroporous, Aligned Scaffold for Tendon Tissue Engineering," *Tissue Eng. Part C. Methods*, vol. 19, pp. 925–36, 2013.

- [12] A. Inui, T. Kokubu, Y. Mifune, R. Sakata, H. Nishimoto, K. Nishida, T. Akisue, R. Kuroda, M. Satake, H. Kaneko, and H. Fujioka, "Regeneration of rotator cuff tear using electrospun poly(d,l-Lactide-Co-Glycolide) scaffolds in a rabbit model.," *Arthroscopy*, vol. 28, no. 12, Dec. 2012.
- [13] E. I. Materials, P. Matrix, and C. Materials, "Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics," *ASTM*, vol. 08, 2003.
- [14] ASTM, "D 882: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting," 2002.
- [15] A. American and N. Standard, "Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics 1," *ASTM*, vol. D 695–95, pp. 1–7, 1996.
- [16] U. Rasband, W.S (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, "ImageJ." 2014.

ANEXO: RESULTADOS EXPERIMENTALES

Ensayo de degradación

Tabla 4: Resultados correspondientes al ensayo de degradación para la concentración 0/100.

0/100	Emod(MPa)					dL at 0.2%					σ at 0.2%				
	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s
Muestra 1	3.15	2.57	4.45	3.83	3.76	2.63	11.79	6.65	2.2	4.31	0.09	0.34	0.37	0.1	0.19
Muestra 2	3.06	6.35	4.85	3.76	2.77	2.96	5.52	8.2	2.64	5.6	0.1	0.46	0.49	0.11	0.18
Muestra 3	3.65	6.21	3.66	2.98	4.26	2.55	6.87	8.73	3.24	3.54	0.1	0.55	0.39	0.12	0.18
Muestra 4		4.67					7.55					0.45			
Muestra 5		9.81					5.23					0.65			
Promedio	3.287	5.922	4.320	3.523	3.597	2.713	7.392	7.860	2.693	4.483	0.097	0.490	0.417	0.110	0.183
SD	0.318	2.655	0.606	0.472	0.758	0.217	2.637	1.081	0.522	1.041	0.006	0.116	0.064	0.010	0.006

dL at Fmax (%)					σ Max (MPa)					F at 0.2% (N)				
T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s
647.7	315.5	285.5	209.2	135.6	1.42	1.3	1.38	1.02	0.88	0.908	3.06	3.81	0.891	1.4
499.3	180.9	286.5	222.3	105.6	1.19	1.62	1.68	1.03	0.78	0.927	3.32	3.84	1.02	1.35
632.5	280.2	212.9	181.5	107.6	1.44	2.01	1.56	0.99	0.89	0.965	3.83	3.9	0.875	1.43
	305.2					1.83					3.75			
	285.6					3.21					2.61			
593.167	273.480	261.633	204.333	116.267	1.350	1.994	1.540	1.013	0.850	0.933	3.314	3.850	0.929	1.393
81.645	53.700	42.207	20.831	16.773	0.139	0.729	0.151	0.021	0.061	0.029	0.504	0.046	0.080	0.040

Tabla 5: Resultados correspondientes al ensayo de degradación para la concentración 25/75.

25/75	E _{mod} (MPa)					dL at 0.2%					σ at 0.2%				
	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s
Muestra 1	5.82	12.1	9.13	7.38	9.09	1.6	1.5	1.2	1.31	2.29	0.1	0.18	0.1	0.09	0.23
Muestra 2	5.08	12.1	4.52	7.8	4.77	1.78	1.32	5.63	1.2	3.56	0.1	0.15	0.33	0.09	0.21
Muestra 3	4.89	10.4	5.97	7.14	7.79	1.14	1.49	5.56	1.31	2.76	0.06	0.15	0.42	0.09	0.24
Muestra 4		13.7					1.2					0.15			
Muestra 5		13.5					1.38					0.18			
Promedio	5.263	12.36	6.540	7.440	7.217	1.507	1.378	4.130	1.273	2.870	0.087	0.162	0.283	0.090	0.227
SD	0.491	1.330	2.357	0.334	2.216	0.330	0.125	2.538	0.064	0.642	0.023	0.016	0.165	0.000	0.015

dL at F _{max} (%)					σ Max (MPa)					F at 0.2% (N)				
T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s
424.3	128.9	98.5	76.3	43.1	1.16	1.12	0.91	0.74	0.73	0.965	1.58	0.871	0.969	2.31
345.7	146.2	99.5	59.3	61.8	1.11	1.07	0.92	0.76	0.77	0.942	2.1	3.86	0.893	1.84
273.1	129.2	80.7	66	39.1	1.03	1.11	0.99	0.59	0.7	0.579	1.43	3.89	0.914	2.2
	157.8					1.12					1.98			
	122.1					1.18					1.58			
347.700	136.840	92.900	67.200	48.000	1.100	1.120	0.940	0.697	0.733	0.829	1.734	2.874	0.925	2.117
75.620	14.711	10.577	8.563	12.117	0.066	0.039	0.044	0.093	0.035	0.217	0.289	1.734	0.039	0.246

Tabla 6: Resultados correspondientes al ensayo de degradación para la concentración 50/50.

50/50	E _{mod} (MPa)					dL at 0.2%					σ at 0.2%				
	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s
Muestra 1	28.4	34.4	17.5	25.2	30.4	1.64	1.23	2.43	1.36	1.33	0.45	0.39	0.46	0.29	0.39
Muestra 2	29.2	34	14.4	11.7	31.5	1.03	1.61	2.73	1.25	1.37	0.27	0.54	0.44	0.14	0.41
Muestra 3	24.2	27.4	17.3	26	20.5	1.9	1.44	2.33	1.32	1.01	0.46	0.38	0.43	0.33	0.2
Muestra 4		17.9					1.46					0.25			
Muestra 5		28.4					1.39					0.37			
Promedio	27.26	28.42	16.40	20.96	27.46	1.523	1.426	2.497	1.310	1.237	0.393	0.386	0.443	0.253	0.333
SD	2.686	6.682	1.735	8.035	6.058	0.447	0.137	0.208	0.056	0.197	0.107	0.103	0.015	0.100	0.116

dL at F _{max} (%)					σ Max (MPa)					F at 0.2% (N)				
T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s
23.7	6	18	5.8	4.3	1.2	0.96	0.95	0.72	0.74	5.76	4.15	4.53	2.89	2.89
71.7	17.7	9.5	17.1	4.4	1.32	1.29	0.77	0.83	0.76	3.54	5.92	4.25	1.15	2.87
27.2	31.8	16.6	6.9	4	1.24	1.09	0.84	0.76	0.42	5.97	3.66	4.83	3.38	2.06
	37.5					1.1					2.49			
	11.3					1					3.37			
40.867	20.860	14.700	9.933	4.233	1.253	1.088	0.853	0.770	0.640	5.090	3.918	4.537	2.473	2.607
26.760	13.405	4.557	6.231	0.208	0.061	0.128	0.091	0.056	0.191	1.346	1.272	0.290	1.172	0.474

Tabla 7: Resultados correspondientes al ensayo de degradación para la concentración 75/25.

75/25	Emod(MPa)					dL at 0.2%					σ at 0.2%				
	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s
Muestra 1	46.3	42.5	26.4	29.9	34.2	1.65	1.44	1.94	0.97	1.27	0.74	0.59	0.53	0.27	0.42
Muestra 2	27.2	39.3	39	37.1	31.9	1.76	1.17	1.35	1.4	1.14	0.48	0.44	0.5	0.5	0.35
Muestra 3	37.9	38.6	31.9	36.6	31.2	1.79	1.6	1.36	1.56	1.45	0.67	0.6	0.42	0.55	0.45
Muestra 4		36					0.91					0.31			
Muestra 5															
Promedio	37.13	39.10	32.43	34.53	32.43	1.733	1.280	1.550	1.310	1.287	0.630	0.485	0.483	0.440	0.407
SD	9.573	2.675	6.317	4.020	1.570	0.074	0.304	0.338	0.305	0.156	0.135	0.138	0.057	0.149	0.051

dL at Fmax (%)					σ Max (MPa)					F at 0.2% (N)				
T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s
12	5.9	3	1.6	1.4	1.49	1.09	0.66	0.33	0.44	6.56	4.7	4.12	2.18	2.9
30.7	4.1	3.3	3.3	2.6	1.29	0.81	0.83	0.74	0.56	5.51	3.16	4.64	3.72	2.42
9.4	4.1	3.4	3.7	2.1	1.27	0.95	0.7	0.82	0.54	6.35	5.14	2.86	3.86	2.87
	6.6					0.94					2.64			
17.367	5.175	3.233	2.867	2.033	1.350	0.948	0.730	0.630	0.513	6.140	3.910	3.873	3.253	2.730
11.620	1.274	0.208	1.115	0.603	0.122	0.114	0.089	0.263	0.064	0.556	1.199	0.915	0.932	0.269

Tabla 8: Resultados correspondientes al ensayo de degradación para la concentración 100/0.

100/0	Emod(MPa)					dL at 0.2%					σ at 0.2%				
	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s
Muestra 1	42.7					1.9					0.8				
Muestra 2	50					2.01					0.98				
Muestra 3	49					1.87					0.89				
Muestra 4															
Muestra 5															
Promedio	47.23					1.927					0.890				
SD	3.958					0.074					0.090				

dL at Fmax (%)					σ Max (MPa)					F at 0.2% (N)				
T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s	T=0	T=2s	T=4s	T=6s	T=8s
6.1					1.31					7.65				
6.7					1.52					7.83				
5.6					1.57					7.57				
6.133					1.467					7.683				
0.551					0.138					0.133				

Estudio del pH durante Degradación

Tabla 9: Resultados obtenidos en el estudio semanal del pH del medio que contenían las probetas del ensayo de degradación.

pH	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8
0/100	6.8	6.84	7.03	6.84	7.11	7.11	7.13	7.13	6.8
25/75	6.72	6.84	6.99	6.84	7.06	7.04	7.1	7.11	6.72
50/50	6.47	6.61	6.78	6.61	6.97	6.95	7.07	7.1	6.47
75/25	6.32	6.57	6.87	6.57	6.99	7.02	7.09	7.09	6.32
100/0	5.78	6.06	6.238	6.06	6.47	6.61	6.76	6.81	5.78
Control	7.32	7.35	7.38	7.35	7.32	7.34	7.34	7.33	7.32

Ensayo de calorimetría con DSC para las fibras obtenidas

Tabla 10: Resultados obtenidos en el ensayo de calorimetría por DSC realizados a las nanofibras de PLA obtenidas para la realización del ensayo de tracción con fibras.

		Tg(C°)	Tc(C°)	Tf(C°)	ΔH_c (J/g)	ΔH_m (J/g)	$\Delta H M^\circ$ (J/g)	% Cristalización
Lámina 1	Ciclo 1	-	71.61	155.31	22.53	31.28	93	9.409
	Ciclo 2	61.53	103.46	153.88	17.27	8.96	93	-0.089
Lámina 2	Ciclo 1	56.2	63.08	151.28	25.63	31.81	93	6.645
	Ciclo 2	58.22	90.15	152.11	20.24	22.3	93	2.215
Lámina 3	Ciclo 1	55.39	65.3	150.34	17.69	35.01	93	18.624
	Ciclo 2	58.22	90.15	152.11	20.24	22.3	93	2.215
Lámina 4	Ciclo 1	59.69	68.04	155.64	8.22	31.36	93	24.882
	Ciclo 2	57.53	91.01	153.5	16.89	25.29	93	9.032
Lámina 5	Ciclo 1	57.61	68	154.63	14.64	34.14	93	20.968
	Ciclo 2	61.21	87.56	152.84	5.83	15.05	93	9.914
Lámina 6	Ciclo 1	57.51	67.48	155.13	15.63	29	93	14.376
	Ciclo 2	60.13	91.03	151.33	11.55	16.45	93	5.269
Lámina 7	Ciclo 1	64.04	71.73	157.88	16.87	28.9	93	12.935
	Ciclo 2	61.6	101.61	151.08	14.82	18.17	93	3.602

Ensayo de tracción con fibras

Tabla 11: Resultados del ensayo de tracción con fibras realizado a las probetas control, únicamente polímero B.

Control	Emod(MPa)	dL at 0.2%	σ at 0.2%	dL at Fmax (%)	σ Max (MPa)	F at 0.2% (N)
Muestra 1	1.77	7.62	0.16	902.4	1.61	1.16
Muestra 2	1.19	9.03	0.13	630.7	1.22	1.14
Muestra 3	1.68	9.92	0.18	510.4	1.03	1.66
Muestra 2	4.46	2.7	0.13	619	1.48	1.05
Muestra 1	5.93	1.87	0.12	833.7	1.97	0.729
Muestra 3	3.13	3.09	0.11	856.5	1.9	0.656
Promedio	3.027	5.705	0.138	725.450	1.535	1.066
SD	1.858	3.551	0.026	159.223	0.370	0.360

Tabla 12: Resultados del ensayo de tracción con fibras realizado a las probetas con 2 capas de fibras de PLA.

2 Capas	Emod(MPa)	dL at 0.2%	σ at 0.2%	dL at Fmax (%)	σ Max (MPa)	F at 0.2% (N)
Muestra 1	9.88	4.55	0.43	535.7	2.27	3.81
Muestra 2	9.95	4.68	0.49	536.7	2.36	3.99
Muestra 3	9.07	3.62	0.34	705.8	2.08	2.72
Muestra 2	11.1	4.34	0.48	280.4	2.19	3.7
Muestra 1	11.4	5.26	0.49	382	2.28	3.92
Muestra 3	9	4.48	0.43	460.1	2.34	3.35
Muestra 2	24.6	4.02	0.95	371.8	3.52	6.15
Muestra 1	33.3	3.6	1.06	177.8	2.89	6.58
Muestra 3	16.1	5.62	0.83	251.5	2.78	5.3
Muestra 1	7.04	2.86	0.2	450.8	1.62	2.22
Muestra 2	8.67	2.38	0.21	435.4	1.65	1.93
Muestra 3	5.74	4.78	0.28	457.6	1.58	3.22
Promedio	12.988	4.183	0.516	420.467	2.297	3.908
SD	8.090	0.942	0.283	142.446	0.567	1.450

Tabla 13: Resultados del ensayo de tracción con fibras realizado a las probetas con 4 capas de fibras de PLA.

4 Capas	Emod(MPa)	dL at 0.2%	σ at 0.2%	dL at Fmax (%)	σ Max (MPa)	F at 0.2% (N)
Muestra 1	12.9	4	0.5	490.6	2.15	4.78
Muestra 2	14.4	3.65	0.52	355.7	2.37	4.21
Muestra 3	11	4.21	0.47	594.8	2.46	3.82
Muestra 2	12.4	4.15	0.5	542.2	2.83	4.38
Muestra 1	14.6	3.52	0.51	538.5	2.89	4.3
Muestra 3	11.1	4.52	0.49	358.8	2.24	5.36
Muestra 2	26.4	2.9	0.76	535.4	3.75	6.73
Muestra 1	15	4.07	0.6	309.2	2.3	6.87
Muestra 3	29.1	3.38	0.95	497.8	3.84	6.98
Muestra 1	9.75	4.62	0.45	413.9	2	4.86
Muestra 2	15.7	3.38	0.54	310.9	2.46	4.77
Muestra 3	12.1	5.14	0.61	317.2	2.39	6.13
Promedio	15.371	3.962	0.575	438.750	2.640	5.266
SD	6.079	0.628	0.145	105.456	0.595	1.127

Tabla 14: Resultados del ensayo de tracción con fibras realizado a las probetas con 6 capas de fibras de PLA.

6 Capas	Emod(MPa)	dL at 0.2%	σ at 0.2%	dL at Fmax (%)	σ Max (MPa)	F at 0.2% (N)
Muestra 1	14.4	4.39	0.63	636.6	3.14	7.74
Muestra 2	14.9	3.87	0.59	545.9	3.07	5.57
Muestra 3	19.6	3.72	0.74	498.8	3.69	6.57
Muestra 2	26.8	4.93	1.24	406.4	4.16	11.6
Muestra 1	21.2	5.83	1.21	552.8	4.75	9.43
Muestra 3	21.7	3.86	0.83	410.4	3.74	8.84
Muestra 2	33.2	5.23	1.67	431.3	4.72	13.9
Muestra 1	43.8	3.7	1.57	450	4.93	11.9
Muestra 3	28.4	5	1.39	427.7	4.25	12.4
Muestra 1	18.2	4.8	0.86	331	3.16	8.18
Muestra 2	10	12.74	1.18	247.1	2.74	12.5
Muestra 3	15.7	6.1	0.91	372.7	3.09	7.99
Promedio	22.325	5.348	1.068	442.558	3.787	9.718
SD	9.420	2.463	0.361	105.280	0.761	2.662

Tabla 15: Resultados del ensayo de tracción con fibras realizado a las probetas con 8 capas de fibras de PLA.

8 Capas	Emod(MPa)	dL at 0.2%	σ at 0.2%	dL at Fmax (%)	σ Max (MPa)	F at 0.2% (N)
Muestra 1	25	5	1.17	475.6	3.95	9.93
Muestra 2	18.2	4.51	0.77	512.3	3.33	6.22
Muestra 3	23.4	4.33	0.96	502.6	3.77	8.45
Muestra 2	20.3	3.49	0.68	437.4	3.46	6.26
Muestra 1	28.2	3.11	0.84	324.8	3.53	6.9
Muestra 3	21.3	3.82	0.79	383.5	3.39	7.01
Muestra 2	47.3	3.55	1.6	362.2	5.08	11.7
Muestra 1	38.1	4.17	1.5	268.1	4.98	8.71
Muestra 3	37.8	6.47	2.32	319.7	6.04	13.8
Muestra 1	30.8	2.8	0.85	379.1	3.83	8.83
Muestra 2	32.2	4.17	1.3	412.1	3.93	13
Muestra 3	19	6.71	1.13	320.4	3.29	13.5
Promedio	28.467	4.344	1.159	391.483	4.048	9.526
SD	9.070	1.213	0.470	78.337	0.863	2.831

Tabla 16: Resultados del ensayo de tracción con fibras realizado a las probetas con 10 capas de fibras de PLA

10 Capas	Emod(MPa)	dL at 0.2%	σ at 0.2%	dL at Fmax (%)	σ Max (MPa)	F at 0.2% (N)
Muestra 1	35.1	4.52	1.5	224.3	4.52	13.1
Muestra 2	30.1	4.35	1.3	244	4.2	12.7
Muestra 3	27.1	4.03	1.07	360.2	4.14	9.94
Muestra 2	39.6	3.89	1.46	229.4	4.77	12.3
Muestra 1	51.6	2.92	1.51	207.7	5.17	12
Muestra 3	37.1	3.66	1.33	282.1	4.57	11.8
Muestra 2	28.7	4.96	1.35	306	4.73	9.56
Muestra 1	33.7	4.59	1.53	211.6	4.83	11
Muestra 3	21.9	6.18	1.32	380	4.65	10.9
Muestra 1	32.9	5.67	1.84	168.1	4.62	16
Muestra 2	44.8	3.8	1.71	64.8	3.8	18.7
Muestra 3	41.5	4.24	1.79	100.8	4.34	16.9
Promedio	35.342	4.401	1.476	231.583	4.528	12.908
SD	8.212	0.888	0.223	93.805	0.363	2.848

Ensayo de sutura

Tabla 17: Resultados correspondiente al ensayo de tracción realizado a probetas con 10 capas de fibras con sujeción por un extremo con hilo de sutura.

10 Capas	Emod(MPa)	dL at 0.2%	σ at 0.2%	dL at Fmax (%)	σ Max (MPa)	F at 0.2% (N)	% Fibras
Muestra 2	43.1	3.63	1.4	12.5	2.59	13.5	26.606
Muestra 3	33.3	5.25	1.44	11.4	2.12	14.2	26.364
Muestra 1	34.8	2.45	0.75	15.2	1.9	7.14	26.923
Muestra 2	44.1	2	0.74	18.1	2.53	6.74	28.000
Muestra 3	51.7	2.07	0.96	11.2	2.15	8.71	28.571
Muestra 1	34.9	2.66	0.84	26.4	2.38	6.5	29.167
Muestra 2	31.7	3.79	1.04	23.6	2.53	8.44	29.787
Muestra 3	50.2	2.33	1	19.7	2.64	7.79	32.184
Muestra 1	37.7	2.65	0.85	15.6	1.99	7.14	29.000
Muestra 2	53.5	2.37	1.06	11.1	2.23	8.15	32.222
Muestra 3	46.1	2.19	0.88	13.9	2.18	7.35	29.897
Muestra 1	43.4	2.92	1.07	14.5	2.19	9.62	26.168
Muestra 2	40.2	1.85	0.75	13.7	1.97	7.19	37.333
Promedio	41.900	2.782	0.983	15.915	2.262	8.652	29.402
SD	7.209	0.944	0.227	4.806	0.249	2.466	3.103