UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Telecomunicación

**Caracterización mecánica de materiales de base
colágeno para aplicaciones cardiovasculares**

TESIS DOCTORAL

María de la Almudena Tobaruela Arnedo

Ingeniero Agrónomo

2016

Departamento de Ciencia de Materiales

Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Caracterización mecánica de materiales de base colágeno para aplicaciones cardiovasculares

TESIS DOCTORAL

Autor:

María de la Almudena Tobaruela Arnedo

Ingeniero Agrónomo

Directores de la tesis:

Francisco Javier Rojo Pérez

Dr. Ingeniero de Caminos, Canales y Puertos
Profesor Titular de Universidad

Gustavo Víctor Guinea Tortuero

Dr. Ingeniero de Caminos, Canales y Puertos
Catedrático de Universidad

2016

Laboratorio de Biomateriales e Ingeniería de Tejidos

Centro de Tecnología Biomédica

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Caracterización mecánica de materiales de base colágeno para aplicaciones cardiovasculares

TESIS DOCTORAL

Autor:

María de la Almudena Tobaruela Arnedo

Ingeniero Agrónomo

Directores de la tesis:

Francisco Javier Rojo Pérez

Dr. Ingeniero de Caminos, Canales y Puertos

Profesor Titular de Universidad

Gustavo Víctor Guinea Tortuero

Dr. Ingeniero de Caminos, Canales y Puertos

Catedrático de Universidad

2016

Caracterización mecánica de materiales de base colágeno para aplicaciones cardiovasculares

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte en el mundo. Este hecho ha propiciado que numerosas investigaciones se hayan centrado en la mejora de las prótesis cardiovasculares ya existentes así como en la búsqueda de nuevos materiales más resistentes, duraderos y biocompatibles.

Actualmente, existen dos tipos principales de prótesis valvulares: las mecánicas y las biológicas. En muchos países cada vez es más frecuente el uso de estas últimas. Las válvulas biológicas presentan ciertas ventajas frente a las mecánicas como, por ejemplo, que no precisan de tratamientos anticoagulantes o que su morfología es muy similar a la de las válvulas naturales. Sin embargo, su durabilidad es una limitación importante.

Las investigaciones realizadas en torno a las prótesis valvulares indican que la solución óptima radicaría en el hallazgo de un material biocompatible, que no produjese problemas de calcificación, con el que se pudiesen fabricar prótesis morfológicamente similares a una válvula natural y además, que se pudiese producir de manera controlada. En esta línea, algunos investigadores ya han realizado intentos de fabricación, a partir de polímeros, de velos valvulares morfológicamente idénticos a los de las válvulas naturales. Están compuestos por fibras cortas dentro de una matriz. Se ha comprobado que las fibras cortas mejoran el comportamiento mecánico del material reduciendo los picos de tensiones. Sin embargo, los polímeros, al igual que los materiales que no son de origen biológico, además de precisar de tratamiento anticoagulante, no son estables en el organismo.

Por el momento, la solución óptima son las válvulas de origen porcino y aquellas cuyos velos están fabricados a partir de pericardio bovino debidamente tratado.

En esta tesis, se aborda el estudio mecánico de dos tipos de membranas de base colágeno, con vistas a su aplicación en válvulas biológicas: el pericardio y las membranas artificiales producidas a partir de colágeno animal.

El pericardio está constituido principalmente por colágeno, proteína que, al formar haces de fibras, confiere al material gran resistencia a tracción y, a su vez, le proporciona flexibilidad. Estas características son muy importantes para conservar la integridad estructural y la función de las válvulas.

Las membranas artificiales son muy similares en composición y microestructura al pericardio, puesto que se trata de fibras de colágeno inmersas en una matriz. Este material se produce de manera industrial, y gracias a su proceso de fabricación es más homogéneo en espesor y morfología y tiene menos variabilidad que el pericardio. La diferencia más importante entre las membranas artificiales y el pericardio es que las primeras están compuestas por fibras cortas de colágeno y, el segundo, por fibras largas.

La caracterización mecánica del pericardio y de las membranas artificiales pretende aportar más información sobre sus propiedades para entender mejor su comportamiento, localizar los fallos que pudiesen aparecer durante su funcionamiento y seleccionar las zonas idóneas, desde el punto de vista mecánico, para su empleo como sustitutivo de los velos valvulares.

A pesar de que el pericardio es un material ampliamente estudiado, en esta tesis se realizan nuevos ensayos estáticos y dinámicos. Las membranas artificiales, por el contrario, se caracterizan por primera vez desde el punto de vista mecánico.

El objetivo de la presente tesis es el estudio y comparación del pericardio y de las membranas artificiales de base colágeno, para su posible aplicación en la cirugía cardiovascular, en concreto como sustitutivos de los velos valvulares en las prótesis biológicas.

Con el fin de cumplir dicho objetivo, se han realizado tanto ensayos bioquímicos como un exhaustivo estudio mecánico de ambos materiales. Se han realizado ensayos *in vitro* de tracción simple hasta rotura y de rasgado en probetas control, y en otras previamente sometidas a varios ciclos de fatiga. Además se ha tenido en cuenta la anisotropía del material. Por último, se ha analizado el comportamiento frente a la fatiga y en rotura.

A lo largo de esta tesis, se demuestra que las membranas artificiales poseen unas propiedades mecánicas similares a las del pericardio de origen bovino. En concreto, tiene un buen comportamiento frente a la fatiga. Hay que tener en cuenta que las válvulas cardíacas están sometidas a una fatiga constante; a lo largo de la vida de una persona se producen más de 30 millones de ciclos de apertura y cierre. Si bien los valores de resistencia que alcanzan las membranas no son tan altos como los alcanzados por el pericardio, son considerablemente más altos que los valores de los velos naturales. Este hecho indica que, desde el punto de vista mecánico, las membranas artificiales son aptas para su uso en bioprótesis.

Mechanical characterization of collagen based materials for cardiovascular applications

Abstract

Since cardiovascular diseases are one of the most important causes of death in the world, numerous researches have been focused in improving prosthesis materials and looking for new more resistant, long-lasting and biocompatible materials.

Nowadays, there are two main types of commercially available prosthetic valves: the mechanical and bioprosthetic valves. In a lot of countries, biological are more used than mechanical prosthesis. Biological valves have some advantages comparing to mechanical prosthesis, for example, they do not require an anticoagulant therapy and its design characteristics are closer to those of human valves. Nevertheless, its durability is an important limitation together with the high variability in thickness and performance.

Researches in valvular prosthesis indicate that the optimal solution would be a biocompatible material with no calcification problems and suitable to manufacture prosthesis morphologically similar to native valves. For the moment, the most approximate solutions are porcine valves and pericardial valve leaflets properly treated.

In this thesis, pericardium and artificial collagen-based membranes for valve leaflets are studied from a mechanical point of view.

Pericardium is constituted by collagen. Collagen is a fibrous protein that provides strength and confers form while allowing flexibility and movement. It is important for maintenance of structural integrity and function of the valves.

Artificial membranes are similar in composition and microstructure to pericardium: collagen fibers embedded in a matrix. This material is industrially processed and, due to its manufacture process, it is more homogenous in thickness and morphology, and it has less variability. The main difference is that it is composed by short collagen fibers instead of long ones.

Mechanical characterization tries to provide more information about pericardium and artificial membranes to better understand their behavior, to detect fails in its normal functioning and to select the best areas from the mechanical point of view, to use it as valve leaflets.

To date, in spite of being pericardium a widely studied material, this PhD thesis reports the result of tear tests have been done for the first time. Artificial membranes are also mechanically characterized for the first time.

The main objective of this thesis is the study and comparison of these two materials for its application in cardiovascular surgery, in particular, to be used as substitute of native leaflets.

With that objective, an exhaustive study of those two materials has been done. Biochemical analysis, uniaxial tensile tests, fatigue and tear tests were performed *in vitro* over a large number of samples of both materials and in each principal material direction. Rupture and fatigue parameters have been also analyzed.

Cardiac valves are subjected to a constant fatigue: throughout the life, valves open and close around 31.5 million times. This thesis demonstrates that artificial membranes have similar mechanical properties than bovine pericardial membranes, in particular, in fatigue. Despite the values of rupture parameters in artificial membranes are not as greater as those of pericardium, they outperform native valves. This fact indicates that artificial membranes, from the mechanical point of view, are completely suitable for its use in valvular prosthesis.

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a Gustavo Guinea y a Francisco Rojo la oportunidad que me han brindado de poder realizar la tesis doctoral en un tema tan novedoso e interesante como son los biomateriales.

Gracias a los compañeros que he tenido durante estos años, en especial con los que compartí despacho, primero en el Departamento de Ciencia de Materiales y, posteriormente, aquellos del laboratorio Biomateriales e Ingeniería de Tejidos del CTB. Hemos pasado muy buenos momentos y nos hemos servido de apoyo en no pocas ocasiones.

Gracias a mis amigos, tanto aquellos que también se enfrentaban a una tesis doctoral con los que he compartido penas y alegrías, como aquellos que no, pero de una manera u otra me han acompañado en esta etapa. Gracias en especial a Jesús y también a Lola que con tanto cariño cuidó a los niños.

Gracias a mi familia, a todos aquellos que de una manera u otra me habéis acompañado durante estos años. Pero gracias en especial a Gonzalo por su ejemplo como doctorando y más adelante como doctor; a Paco y a Ana por su gran ayuda, en todos los sentidos y en tantos momentos a lo largo de la tesis; a Lala con la que empecé viviendo esta etapa; a mis padres por todo lo que me han dado y los medios que me han facilitado desde siempre: si culmino esta etapa es porque antes he culminado otras tantas y esto es gracias, en buena parte, a su esfuerzo y dedicación. Además, no puedo dejar de dar las gracias a mis hijos: los tres, desde la inocencia y el no saber, me han acompañado desde el inicio de sus vidas, ellos también han vivido la tesis, en ocasiones sentados en mi regazo mientras yo trabajaba, en otras a mi lado, jugando a que ellos también hacían su tesis. Y, por supuesto, gracias a Manuel, mi marido, por absolutamente todo: sin él todo esto no habría tenido ni tendría sentido.

¡Gracias de corazón!

*“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara una gota”*

Santa Teresa de Calcuta

Índice general

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Objetivos	4
1.3. Estructura y contenidos	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Introducción.....	5
2.2. Colágeno	5
2.3. Membranas naturales de base colágeno	6
2.4. Membranas artificiales de base colágeno	8
2.5. Mecánica de las membranas de base colágeno	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Introducción.....	19
3.2. Materiales	20
3.2.1. Pericardio	20
3.2.2. Membranas artificiales de colágeno.....	21
3.2.3. Tratamiento con glutaraldehído.....	22
3.3. Observación de la microestructura de las membranas por microscopía	23
3.3.1. Microscopios utilizados.....	23
3.3.2. Imágenes obtenidas	25
3.4. Análisis bioquímicos.....	28
3.4.1. Test de ninhidrina.....	28
3.4.2. Análisis de aminoácidos	29
3.5. Hinchamiento.....	29
3.6. Ensayos mecánicos	31
3.6.1. Selección del material y corte de las probetas	31
3.6.2. Descripción de los dispositivos de ensayo.....	35
3.6.3. Ensayos de tracción uniaxial.....	39
3.6.4. Ensayos de rasgado.....	43
3.6.5. Ensayos de tracción con fisura interior.....	46
3.6.6. Ensayos dinamomecánicos	47
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	49
4.1. Introducción.....	49
4.2. Análisis bioquímicos.....	49
4.2.1. Test de ninhidrina.....	49
4.2.2. Análisis de aminoácidos	49

4.3.	Hinchamiento	51
4.4.	Ensayos mecánicos	54
4.4.1.	Ensayos de tracción uniaxial	54
4.4.1.1.	Análisis de la fatiga en pericardio	54
4.4.1.2.	Análisis de la fatiga en membranas artificiales	56
4.4.1.3.	Resumen y comparación de ambos materiales en fatiga	60
4.4.1.4.	Análisis de la rotura por tracción en pericardio	61
4.4.1.5.	Análisis de la rotura por tracción en membranas artificiales.....	63
4.4.1.6.	Resumen y comparación de ambos materiales en rotura	66
4.4.2.	Ensayos de rasgado.....	69
4.4.2.1.	Descripción del mecanismo de rasgado.....	69
4.4.2.2.	Curvas fuerza – desplazamiento de rasgado	73
4.4.2.3.	Trabajo de rotura	75
4.4.2.4.	Resumen y comparación de ambos materiales en rasgado.....	79
4.4.3.	Ensayos de tracción con fisura interior de membranas artificiales	80
4.4.4.	Ensayos dinamomecánicos de membranas artificiales.....	82
4.4.5.	Resumen	83
5.	CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO	85
5.1.	Conclusiones	85
5.2.	Líneas futuras	86
	Bibliografía.....	87

Índice de anejos

Anejo A. Imágenes de microscopia

Anejo B. Protocolo para la realización del test de ninhidrina

Anejo C. Informes de los análisis de aminoácidos

Anejo D. Curvas de los ensayos de fatiga

Anejo E. Curvas de los ensayos de tracción hasta rotura

Anejo F. Curvas de los ensayos de rasgado

Anejo G. Curvas de los ensayos de tracción con fisura interior en membranas artificiales

Índice de figuras

Figura 1. Prótesis biológica porcina [1]	2
Figura 2. Prótesis valvular biológica de pericardio bovino [6]	2
Figura 3. Estructura del colágeno. (a) Estructura secundaria helicoidal levógira con tres residuos por vuelta. Secuencia repetitiva Gly-Pro-Hyp; (b y c) Tres hélices se enrollan entre sí de forma dextrógira; (d y e) Separación entre las moléculas de colágeno; (f) Fibrillas [26]	6
Figura 4. Direcciones anatómicas en el pericardio [35]	7
Figura 5. Curva típica de materiales blandos de base colágeno (Adaptación de Tower [55])	9
Figura 6. Geometría del velo valvular. A la izquierda, un velo valvular extendido. A la derecha, los tres velos que conforman la válvula [59]	10
Figura 7. Resultados de ciclos de carga y descarga en membrana de base colágeno [50]	17
Figura 8. Saco pericárdico abierto	20
Figura 9. Material de base colágeno. Imagen superior: vista superior. Imagen inferior: vista lateral	21
Figura 10. SEM bajo vacío	23
Figura 11. SEM-JEOL	24
Figura 12. Sputter coater (Emitech)	24
Figura 13. AFM	25
Figura 14. Estructura mallada del pericardio vista en el SEM bajo vacío	25
Figura 15. Fibras de colágeno en pericardio observadas en un SEM-JEOL	26
Figura 16. Espesor de la muestra captado con un SEM – JEOL (tiempo de metalización = 15 s)	26
Figura 17. A la izquierda, superficie de rotura de las membranas artificiales vista con SEM-JEOL (tiempo metalización = 60 s). A la derecha, superficie de rotura de las membranas artificiales con SEM bajo vacío	27
Figura 18. Fibrillas de colágeno en membranas artificiales de colágeno captadas con un AFM	27
Figura 19. Fórmula química de la Ninhidrina [98]	28
Figura 20. Fuerza aplicada por el calibre Mitutoyo 7301 en los materiales	30
Figura 21. Malla sobre la membrana artificial de colágeno. A la derecha, posición del medidor para cubrir la superficie	30
Figura 22. Medida del espesor mediante el calibre Mitutoyo 7301	31
Figura 23. Áreas de probetas en pericardio	32
Figura 24. Áreas de probetas en membranas artificiales	32
Figura 25. Probetas para rasgado en pericardio. Éstas se distribuyeron por todo el pericardio en ambas direcciones	33
Figura 26. Probetas para ensayos de tracción uniaxial con fisura interior y de ensayos dinamomecánicos. Éstas se hicieron en varias membranas artificiales en ambas direcciones	33
Figura 27. Máquina cortadora láser	34
Figura 28. Daño producido en el corte de las membranas artificiales de colágeno (SEM-JEOL)	34
Figura 29. Daño producido en el corte de pericardio (microscopio óptico)	35
Figura 30. Detalle de la sujeción de la probeta	36
Figura 31. Dispositivo de ensayo Instron 5543A	36
Figura 32. Baño termostático	37
Figura 33. Detalle de la sujeción de la probeta	38
Figura 34. Dispositivo de ensayo Nanobionix	38
Figura 35. Esquema de corte de probetas en pericardio para las dos direcciones de ensayo (ápico-caudal y circunferencial)	39
Figura 36. Esquema de corte de probetas de membranas artificiales en dirección transversal (C: control; 1: 100 ciclos; 2: 500 ciclos; 3: 1000 ciclos; 4: 2000 ciclos, 5: 4000 ciclos)	39

Figura 37. Esquema de corte de probetas de membranas artificiales en dirección longitudinal (C: control; 1: 100 ciclos; 2: 500 ciclos; 3: 1000 ciclos; 4: 2000 ciclos, 5: 4000 ciclos)	40
Figura 38. Corte de 36 probetas de pericardio (izquierda) y de membranas artificiales (derecha)	40
Figura 39. Corte de las probetas de pericardio para ensayar a 24000 ciclos	41
Figura 40. Montaje de una probeta de membranas artificiales en el bastidor	41
Figura 41. Superficie interior de las mordazas.....	41
Figura 42. Esquema de la sollicitación en los ensayos de fatiga (Tensión: 0.2 MPa a 3 MPa) ..	42
Figura 43. Ensayo de fatiga de una probeta de pericardio	42
Figura 44. Rotura de una probeta de pericardio	43
Figura 45. Morfología y dimensiones de las probetas ensayadas.....	44
Figura 46. Ensayos de fatiga previa.....	45
Figura 47. Vista lateral y frontal de la colocación de una probeta de membranas artificiales para rasgado en el bastidor	45
Figura 48. Esquema del ensayo de rasgado	46
Figura 49. Probeta de membranas artificiales con fisura interior.....	46
Figura 50. Representación esquemática del módulo de pérdidas (E'') y módulo de almacenamiento (E')	48
Figura 51. Mapa del espesor de una membrana pericárdica en glicerol.....	51
Figura 52. Mapa del espesor de una membrana pericárdica en suero	52
Figura 53. Mapa del espesor de una membrana artificial en glicerol	52
Figura 54. Mapa del espesor de una membrana artificial en suero.....	53
Figura 55. Comparación de los valores de la diferencia entre suero y glicerol entre su espesor para membranas artificiales y pericardio	53
Figura 56. Energía disipada en función del número de ciclos de pericardio en las dos direcciones de ensayo.....	55
Figura 57. Rigidez del pericardio a lo largo de los ciclos en las dos direcciones de ensayo	56
Figura 58. Energía disipada en el primer ciclo de fatiga en membranas artificiales.....	58
Figura 59. Energía disipada durante la fatiga de las membranas artificiales en las dos direcciones de ensayo.....	59
Figura 60. Rigidez en membranas artificiales en las dos direcciones de ensayo	60
Figura 61. Tensión de rotura en pericardio en las dos direcciones de ensayo	62
Figura 62. Alargamiento de rotura en pericardio en las dos direcciones de ensayo	62
Figura 63. Rigidez en pericardio en las dos direcciones de ensayo.....	63
Figura 64. Comparación de la tensión de rotura entre las dos direcciones de ensayo en membranas artificiales	64
Figura 65. Comparación del alargamiento de rotura entre las dos direcciones de ensayo en membranas artificiales	65
Figura 66. Comparación de la rigidez entre las dos direcciones en membranas artificiales.....	65
Figura 67. Tensión de rotura para los dos materiales y las dos direcciones estudiados	66
Figura 68. Alargamiento de rotura para los dos materiales y las dos direcciones estudiados...	67
Figura 69. Rigidez para los dos materiales y las dos direcciones estudiados.....	67
Figura 70. Ruptura, deformación y delaminación durante el ensayo de rasgado	69
Figura 71. Estado de una probeta de membranas artificiales una vez finalizado el ensayo de rasgado.....	69
Figura 72. Área delaminada de una probeta.....	70
Figura 73. Definición de los ángulos de rasgado (Θ_1 y Θ_2) en probetas de rasgado.....	70
Figura 74. Media de los ángulos de rotura medidos respecto a la dirección ápico-caudal del material, para todos los tipos de probetas en pericardio	71
Figura 75. Media de los ángulos de rotura medidos respecto a la dirección longitudinal del material, para todos los tipos de probetas en membranas artificiales	71
Figura 76. Diferencia entre ángulos ($\Theta_1 - \Theta_2$) en pericardio	72
Figura 77. Diferencia entre ángulos ($\Theta_1 - \Theta_2$) en membranas artificiales	72

Figura 78. Esquema del rasgado y delaminación. Vista lateral	73
Figura 79. Curva carga-desplazamiento representativa. Se señalan dos puntos característicos: carga máxima $(F/e)_{max}$ y carga umbral $(F/e)_y$	74
Figura 80. Media de los valores $(F/e)_{max}$ y $(F/e)_y$ en pericardio	74
Figura 81. Media de los valores $(F/e)_{max}$ y $(F/e)_y$ en membranas artificiales	75
Figura 82. Trabajo consumido frente al área delaminada en pericardio, ambos valores normalizados con el espesor.....	76
Figura 83. Trabajo consumido frente al área delaminada en membranas artificiales, ambos valores normalizados con el espesor.....	76
Figura 84. Esquema del rasgado y la delaminación	77
Figura 85. Trabajo de rotura frente al área de delaminación (los valores están referenciados al espesor total de la membrana).....	78
Figura 86. Tensión de rotura en probetas con fisura interior de 1 mm, 2 mm y 4 mm	80
Figura 87. Alargamiento de rotura en probetas con fisura interior de 1 mm, 2 mm y 4 mm.....	81
Figura 88. Rigidez en probetas con fisura interior de 1 mm, 2 mm y 4 mm	81
Figura 89. Curvas tensión -deformación ingenieril en ensayos realizados en dirección transversal (izquierda) y en dirección longitudinal (derecha).....	82
Figura 90. Módulo de almacenamiento (E') en función del nivel de tensión al que se ha evaluado su valor para ensayos en dirección transversal (izquierda) y en dirección longitudinal (derecha)	83
Figura 91. Módulo de pérdidas (E'') en función del nivel de tensión al que se ha evaluado su valor para ensayos en dirección transversal (izquierda) y en dirección longitudinal (derecha) .	83

Índice de tablas

Tabla 1. Resultados de los ensayos mecánicos en velos valvulares aórticos humanos [58]	11
Tabla 2. Resultados de los ensayos mecánicos en velos de porcino naturales y tratados para bioprótesis [63]	11
Tabla 3. Resultados de los ensayos mecánicos de las membranas Kureha [47]	16
Tabla 4. Resultados de los ensayos mecánicos de las membranas Cotex Viscofan [48].....	16
Tabla 5. Parámetros de rotura material 6. A: membrana sumergida en agua; B: membrana conservada al 62% de humedad y 24 °C.....	17
Tabla 6. Resultados del parámetro de rasgado en membranas de celulosa	18
Tabla 7. Procedencia del pericardio bovino empleado	20
Tabla 8. Resumen de los ensayos mecánicos.....	31
Tabla 9. Parámetros de corte nominales de los materiales.....	34
Tabla 10. Campaña de ensayos de tracción y fatiga en membranas artificiales y pericardio....	40
Tabla 11. Direcciones en las probetas de rasgado.....	44
Tabla 12. Campaña experimental de ensayos de rasgados en pericardio.....	44
Tabla 13. Campaña experimental de ensayos de rasgados en membranas artificiales	44
Tabla 14. Campaña experimental ensayos de tracción con fisura interior en membranas artificiales.....	47
Tabla 15. Dimensiones de las probetas para ensayos dinamomecánicos	47
Tabla 16. Valores del test de ninhidrina para pericardio y membranas artificiales.....	49
Tabla 17. Resultados del análisis de aminoácidos para pericardio	50
Tabla 18. Resultados del análisis de aminoácidos para membranas artificiales.....	50
Tabla 19. Resumen del porcentaje de entrecruzamiento	51
Tabla 20. Tensiones de fatiga en pericardio en las dos direcciones de ensayo	54
Tabla 21. Energía disipada durante la fatiga en pericardio en las dos direcciones de ensayo..	55
Tabla 22. Rigidez del pericardio en las dos direcciones de ensayo	56

Tabla 23. Resumen de las roturas por fatiga de membranas artificiales en dirección transversal	57
Tabla 24. Resumen de las roturas por fatiga de membranas artificiales en dirección longitudinal	57
Tabla 25. Tensiones de rotura en membranas artificiales en ambas direcciones	57
Tabla 26. Energía disipada en el primer ciclo de fatiga en membranas artificiales	58
Tabla 27. Energía disipada durante la fatiga en las dos direcciones de ensayo en membranas artificiales.....	59
Tabla 28. Rigidez de las membranas artificiales en las dos direcciones de ensayo	59
Tabla 29. Tensión de rotura, alargamiento de rotura y rigidez en dirección ápico-caudal de pericardio.....	61
Tabla 30. Tensión de rotura, alargamiento de rotura y rigidez en dirección circunferencial de pericardio.....	61
Tabla 31. Número de probetas ensayadas a tracción en las dos direcciones de ensayo y correspondientes a distinto número de ciclos	64
Tabla 32. Tensión de rotura, alargamiento de rotura y rigidez, en membranas artificiales, en dirección transversal	64
Tabla 33. Tensión de rotura, alargamiento de rotura y rigidez en membranas artificiales, en dirección longitudinal.....	64
Tabla 34. Resumen de los parámetros de rotura.....	66
Tabla 35. Media del área delaminada y espesor de la probeta en pericardio. El error estándar se presenta entre paréntesis.....	73
Tabla 36. Media del área delaminada y espesor de la probeta en membranas artificiales. El error estándar se presenta entre paréntesis	73
Tabla 37. Resistencia al rasgado y delaminación en pericardio.....	79
Tabla 38. Resistencia al rasgado y a la delaminación en membranas artificiales.....	79
Tabla 39. Resumen de los parámetros de rotura en probetas de membranas artificiales con fisura interior (L: longitudinal; T: transversal)	80

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

El tratamiento de algunas enfermedades cardiovasculares requiere el uso de ciertos dispositivos denominados prótesis valvulares. Una prótesis valvular es un dispositivo médico que regula el flujo de sangre entre dos cavidades cardíacas impidiendo su retroceso. Se compone de un orificio a través del cual transcurre la sangre y de un mecanismo ocluidor que abre y cierra dicho orificio [1].

Fue en 1952 cuando, por primera vez, Charles Hufnagel, implantó en un corazón humano una válvula consistente en un tubo de polimetilmetacrilato y una bola de nylon. Esta operación no tuvo éxito, pero los expertos en cirugía cardíaca comenzaron a plantearse la posibilidad de utilizar prótesis valvulares. En 1960, el cirujano Albert Starr sustituyó una válvula dañada por una prótesis compuesta por una bola de silicona y una "jaula" de polimetilmetacrilato, que fue inventada por el ingeniero Lowell Edwards. Los objetivos de aquella época se centraban en que no se produjese trombosis y en que la prótesis fuese duradera. Años más tarde, en 1969, Warren Hancock empezó a desarrollar un tejido que sustituyese a los velos valvulares. Estaba compuesto por válvulas de ganado porcino tratadas con glutaraldehído [2].

Actualmente, las prótesis valvulares se clasifican en dos grandes grupos: las válvulas mecánicas y las válvulas biológicas.

Válvulas mecánicas

Las válvulas mecánicas son estructuras rígidas que no poseen velos valvulares. Están fabricadas a partir de materiales metálicos, cerámicos y poliméricos y, en cuanto a su tipología, pueden ser de bola, de disco basculante o bivalvas [3].

Estos dispositivos son seguros y resistentes. Sin embargo, llevan asociados algunos inconvenientes como la necesidad de tratamiento anticoagulante de por vida o que no favorecen la hemodinámica, pues su morfología difiere mucho de la de las válvulas naturales.

Válvulas biológicas

Las válvulas biológicas son morfológicamente similares a las válvulas naturales. Actualmente, se pueden diferenciar dos tipos: las naturales, que son las válvulas aórticas porcinas [4] y las artificiales, que son válvulas cuyos velos están fabricados a partir de pericardio bovino [5] u otros materiales.

Las primeras conservan toda la válvula animal recortada en su perímetro para facilitar la implantación (Figura 1). Las segundas constan de un anillo sobre el cual se sitúan los velos valvulares (Figura 2).

Figura 1. Prótesis biológica porcina [1]

Figura 2. Prótesis valvular biológica de pericardio bovino [6]

Algunos estudios han demostrado que las válvulas fabricadas a partir de pericardio bovino presentan una mejor hemodinámica y una mayor durabilidad que las porcinas [7][8]. El pericardio bovino posee una textura más rugosa que el tejido valvular porcino y es estructuralmente más homogéneo en cuanto a su composición en colágeno y fibras elásticas. En la válvula aórtica porcina la disposición de fibras elásticas y colágeno es más desordenada [9].

Estos materiales normalmente se tratan químicamente con glutaraldehído para fijar y estabilizar el tejido, proporcionándole resistencia contra la degradación enzimática [10].

Los parches de pericardio bovino [11][12] son membranas de colágeno fabricadas a partir de dicho material debidamente tratado. Su uso más frecuente es como andamiaje [13] y para la reparación de velos valvulares.

Otra opción que se lleva investigando desde los años 90 es la construcción de los velos valvulares a partir de materiales poliméricos. Dentro de este grupo se han desarrollado válvulas producidas mediante ingeniería de tejidos (tissue engineered heart valves: TEHV) con

andamiajes poliméricos [14], o prótesis aórticas que consisten en un tejido de poliéster recubierto con colágeno entrecruzado de origen bovino [15]. En el año 2000, Cacciola *et al.*, desarrollaron una válvula fabricada a partir del monómero etileno-propileno-dieno (EPDM) reforzado con fibras de polietileno de gran rendimiento (HP-PE) [16]. Según señalan los autores, las membranas poliméricas reforzadas con fibras cortas mejoran el comportamiento de los materiales al someterlos a fatiga, puesto que el refuerzo con fibras cortas reduce los picos de tensiones en determinadas zonas de la matriz [16][17]. Este sistema se ha llegado incluso a patentar para la fabricación de velos valvulares [17][18], sin embargo, aún no existe ninguna empresa que las comercialice. Existe cierta polémica en cuanto al uso en cirugía cardiovascular de los materiales poliméricos, en concreto de los poliuretanos, que son los que mejores propiedades mecánicas presentan. La razón de dicha polémica es que, a pesar del buen comportamiento mecánico, se degradan con cierta rapidez dentro del organismo y además ocasionan problemas de calcificación [19]. Los polímeros, por el momento, en cirugía cardiovascular tan solo tienen aplicación en los dispositivos de asistencia ventricular que, al emplearse para mantener con vida al paciente hasta que se le realiza un trasplante de corazón, permanecen poco tiempo en el interior del organismo [20].

Las prótesis biológicas presentan algunas ventajas como, por ejemplo, que sus propiedades fluidomecánicas son mejores [21] y que no requieren tratamiento anticoagulante [22]. Por el contrario, su durabilidad es menor que las mecánicas y éste es, precisamente, el reto que se asume actualmente con respecto a estas prótesis. La durabilidad de las prótesis valvulares depende especialmente de dos factores. Por una parte, de su capacidad para resistir el proceso de calcificación y, por otra, del daño mecánico que produce la fatiga constante a la que se ven sometidas las válvulas [23]. A los 13 años de su implantación, los pacientes con válvulas biológicas tienen mayor riesgo de que la prótesis falle y haya que reemplazarla [24].

Por tanto, la investigación en las prótesis de velos valvulares se ha centrado principalmente en mejorar la durabilidad de los mismos procurando minimizar tanto el proceso de calcificación al que se ven sometidas, como el deterioro del material a causa de la fatiga [4].

Resumen

Actualmente, existen dos grandes grupos de prótesis valvulares: mecánicas y biológicas. Dentro de las válvulas biológicas, se pueden distinguir las naturales y las artificiales. Entre estas últimas se encuentran aquellas con velos de pericardio y las poliméricas. Los velos fabricados a partir de poliuretanos, a pesar de poseer muy buenas propiedades mecánicas, tienen como desventaja su corta vida dentro del organismo y la necesidad de tratamiento anticoagulante.

Aunque las válvulas biológicas presentan grandes ventajas frente a las válvulas mecánicas, como, por ejemplo, que presentan mejor hemodinámica y no necesitan tratamiento anticoagulante, su limitada durabilidad debida principalmente a la calcificación y a la fatiga constante a la que están sometidas, hacen que no sean una solución óptima en muchos casos. Por esta razón, las investigaciones actuales se centran principalmente en mejorar la durabilidad de los velos de las bioprótesis.

1.2. Objetivos

El objetivo de la presente tesis es el estudio y la comparación, desde el punto de vista mecánico, de dos materiales de base colágeno –el pericardio y las membranas artificiales– para su posible aplicación en la cirugía cardiovascular, en concreto, en los velos valvulares de las bioprótesis.

La caracterización mecánica pretende aportar más información sobre las propiedades mecánicas del pericardio y de las membranas artificiales para entender mejor su funcionamiento, localizar los fallos que pueden tener durante el mismo y seleccionar las zonas idóneas desde el punto de vista mecánico para su empleo en las bioprótesis.

Con el fin de desarrollar el objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Obtención de membranas de colágeno naturales (pericardio) y artificiales tratadas químicamente y entrecruzadas de forma similar a las utilizadas comercialmente.
- Realización de ensayos mecánicos *in vitro*, tanto estáticos como dinámicos, en condiciones fisiológicas de carga y temperatura.

Se han realizado, de esta manera, ensayos bioquímicos y mecánicos. Dentro de estos últimos, ensayos de tracción simple hasta rotura y de rasgado, sobre probetas novales y otras previamente sometidas a un número determinado de ciclos de fatiga, y ensayos dinamomecánicos.

En esta tesis, por primera vez, se llevan a cabo y se analizan cuantitativamente ensayos de rasgado en pericardio. Además se caracterizan por vez primera membranas artificiales obtenidas a partir de fibras cortas de colágeno.

1.3. Estructura y contenidos

En el presente Capítulo, el 1, se realiza una breve introducción, una exposición de los objetivos perseguidos y, por último, una descripción de la estructura del trabajo.

En el Capítulo 2 se recoge el estado del arte del tema estudiado. Se recopila información sobre la composición y la estructura del pericardio y los ensayos mecánicos que se han realizado anteriormente. También se describen los trabajos existentes sobre materiales alternativos de base colágeno.

Se continúa en el Capítulo 3 con una descripción detallada de los materiales empleados y los métodos seguidos. Se describen los ensayos realizados: ensayos bioquímicos y mecánicos de tracción simple hasta rotura, de rasgado, con y sin fatiga, y dinamomecánicos.

En el Capítulo 4 se analizan y discuten los resultados de los ensayos bioquímicos y mecánicos.

Por último, en el Capítulo 5 se exponen las conclusiones de la tesis así como posibles líneas de trabajo futuro.

2. ANTECEDENTES

2.1. Introducción

En el presente capítulo se hace una descripción de las membranas naturales de colágeno y concretamente se detalla el pericardio en cuanto a su composición, estructura y propiedades, desde el plano microscópico hasta llegar a su estructura macroscópica. También se describen algunas membranas artificiales de base colágeno, tanto las ensayadas en la presente tesis como otras de características similares. Finalmente, se recogen los ensayos mecánicos más destacados que se han realizado en velos valvulares naturales, en pericardio bovino y de otras especies, y en membranas artificiales de base colágeno.

2.2. Colágeno

El colágeno es la más abundante de todas las proteínas en vertebrados superiores. Supone alrededor de un tercio de la proteína total del cuerpo [25] y constituye el mayor componente estructural de los tejidos.

Aunque los colágenos de las distintas especies difieren algo en la secuencia de aminoácidos, la mayor parte contienen alrededor de un 35% de glicina (Gly), un 11% de alanina (Ala), un 21% de prolina (Pro) y un 9% de hidroxiprolina (Hyp).

La hélice de colágeno es levógira y consta de tres residuos por vuelta (Figura 3.a). Esta hélice se estabiliza al unirse a otros dos, formando una molécula de tropocolágeno (Figura 3.b, c). El enrollamiento superhelicoidal es dextrógiro, en sentido opuesto a la hélice levógira de la cadena simple.

Las fibrillas de colágeno se forman a partir de moléculas de tropocolágeno alineadas de manera escalonada y entrecruzadas. El tropocolágeno es soluble en medios ácidos, salinos y agua, por el contrario, las fibrillas de colágeno son insolubles en estos medios [27]. Las cadenas de las moléculas de colágeno y las moléculas de colágeno de las fibrillas están entrecruzadas por enlaces covalentes que implican residuos de lisina e hidroxilisina. La rigidez y la fragilidad de los tejidos más ricos en colágeno en las personas de mayor edad se deben a la acumulación de estos entrecruzamientos covalentes.

Figura 3. Estructura del colágeno. (a) Estructura secundaria helicoidal levógira con tres residuos por vuelta. Secuencia repetitiva Gly-Pro-Hyp; (b y c) Tres hélices se enrollan entre sí de forma dextrógira; (d y e) Separación entre las moléculas de colágeno; (f) Fibrillas [26]

Cualquiera que sea la ordenación de las fibrillas, el escalonamiento de las moléculas de tropocolágeno hace que aparezca un estriamiento transversal característico, cuando se observan al microscopio electrónico. La distancia repetida es de unos 60 - 70 nm dependiendo del tipo de colágeno y de la especie del organismo. (Figura 3.d, e y f)

El colágeno forma fibras largas que, siendo muy resistentes a tracción, proporcionan resistencia a los tejidos al tiempo que los hace flexibles [25][27]. Se trata de una proteína físicamente resistente e insoluble en agua. Su ebullición en agua la desnaturaliza, separando las cadenas de tropocolágeno, y la convierte en gelatina.

Las fibras de colágeno se encuentran dispuestas de modos diferentes dependiendo de la función biológica del tipo de tejido que constituyen. El colágeno se encuentra especialmente en el llamado tejido conjuntivo no especializado. Este tejido se caracteriza por contener células inmersas en la matriz extracelular. La matriz extracelular es una red organizada, formada por sustancia fundamental (polisacáridos y proteínas) y por tres tipos de fibras: colágenas, elásticas y microfibrillas. Los fibroblastos son los responsables de la síntesis de las fibras del tejido conjuntivo.

2.3. Membranas naturales de base colágeno

Actualmente, el material a partir del cual se obtienen los velos para las prótesis valvulares es el pericardio bovino. Sin embargo, años atrás se han investigado otros materiales como la *duramadre* o la *fascia lata*.

La *duramadre* es una meninge que protege al sistema nervioso central. En la década de los 70 comenzó a investigarse este material, debidamente tratado con glutaraldehído, para su aplicación en las bioprótesis. Se demostró que su durabilidad era mayor que la del pericardio [28][29][30]. Sin embargo, al tener su origen en el cerebro y debido a los problemas asociados a los priones que producen enfermedades neurológicas degenerativas transmisibles, es un material que presenta grandes riesgos, por lo que no se continuó investigando con él.

La *fascia lata* es la capa de tejido conectivo que rodea algunos músculos presentes en el muslo. También en la década de los 70 se comenzó a investigar con este material para la

fabricación de prótesis valvulares [31][32]. Los resultados que se obtuvieron no fueron buenos, especialmente porque el tejido rápidamente se rigidizaba y rompía.

Pericardio

El pericardio es la membrana externa que envuelve y protege al corazón. Se trata de un material anisótropo [33] compuesto fundamentalmente por fibras de colágeno y elastina inmersas en una matriz de glicoproteínas y glicosaminoglicanos. Su riqueza en colágeno es similar a la de los velos valvulares naturales.

Las fibras de colágeno se disponen en distintas capas con diferente alineamiento. Gracias a esta característica, el pericardio presenta buenas propiedades mecánicas y previene la excesiva dilatación de las cámaras cardíacas limitando la hipertrofia del corazón en condiciones de máxima actividad. Durante el desempeño de su función biológica, el pericardio presenta una gran capacidad de deformación [34].

El pericardio presenta dos capas: el pericardio fibroso y el pericardio seroso.

- El pericardio fibroso es una capa externa de tejido formado por fibras de colágeno dispuestas en distintas direcciones dentro de una matriz de tejido conectivo que contiene fibras de elastina. Está fijado a las estructuras próximas mediante ligamentos.
- El pericardio seroso es fino y está formado por dos capas: la parietal y la visceral. La primera, recubre la superficie interna de la capa fibrosa y la segunda se adhiere al corazón formando su cubierta externa. Entre ambas se encuentra la cavidad pericárdica que contiene una pequeña cantidad de líquido para evitar el roce cuando late el corazón.

El saco pericárdico, que tiene forma de cono, presenta dos direcciones anatómicas preferentes (Figura 4). Una de ellas es la ápico-caudal que va desde la parte superior del corazón hasta el ápex y que en la bibliografía también se denomina radial. La segunda, la circunferencial, es la dirección perpendicular a la ápico-caudal.

Figura 4. Direcciones anatómicas en el pericardio [35]

Una vez que el pericardio es extraído del animal comienza un proceso de degradación. Por esta razón, se hace necesario preservar su estructura originaria y su integridad mecánica así como eliminar, o al menos neutralizar, sus propiedades antigénicas. Los métodos para el tratamiento de tejidos biológicos se basan principalmente en la creación de enlaces entre las moléculas de colágeno, en concreto entre los grupos funcionales de los aminoácidos [36].

Actualmente, se emplean tratamientos físicos y químicos. Los métodos físicos son la aplicación de calor, el secado y la radiación con rayos ultravioleta. Entre los tratamientos químicos se encuentran el tratamiento con glutaraldehído, formaldehído [36], diimidoésteres, acilazida [37], componentes epoxy y cianamida. Comparando los distintos métodos de entrecruzamiento, se ha observado que todos tienen sus ventajas e inconvenientes. No existe un tratamiento único y común para las diferentes aplicaciones. La eficiencia de las reacciones químicas depende del espesor de las membranas a tratar. El espesor define la magnitud de penetración que también es función de parámetros como el tiempo y la temperatura de exposición al agente así como de la concentración del mismo [36].

El glutaraldehído se aplicó con éxito por primera vez a finales de los años 60 en pericardio empleándose concentraciones elevadas [38]. Desde entonces, se han modificado condiciones y parámetros para mejorar su eficiencia. Actualmente, las concentraciones son menores, siendo la más utilizada la de 0.625%.

En cuanto a las propiedades mecánicas, el entrecruzamiento químico con glutaraldehído proporciona una mayor tensión de rotura en comparación con el resto de tratamientos químicos [37][39]. Además, presenta ciertas ventajas frente a otros agentes entrecruzantes ya que es soluble en agua, es un agente bifuncional (es decir, presenta dos grupos activos en su cadena que permiten que se establezcan enlaces) y su precio no es muy elevado [22]. Por estos motivos, por el momento, éste es el tratamiento más utilizado en tejidos biológicos.

El tratamiento con glutaraldehído también presenta algunos inconvenientes como, por ejemplo, la calcificación o la citotoxicidad. La calcificación es un proceso que consiste en la formación de depósitos de calcio que provoca fallos en las prótesis valvulares. Su origen no se conoce exactamente [40] y se encuentra presente también en válvulas naturales [41]. En cuanto a la citotoxicidad, se ha detectado que los aldehídos poliméricos del glutaraldehído son nocivos para las células [42].

2.4. Membranas artificiales de base colágeno

Existen distintas membranas artificiales producidas a partir de colágeno y destinadas a uso alimentario. Este tipo de membranas comenzaron a producirse a principios del siglo XX y tienen como denominador común su procedencia - piel de ganado bovino [43] - y su proceso de fabricación que se realiza en tres etapas: homogeneización del tejido rico en colágeno, extrusión y endurecimiento del material para formar la membrana [44]. En algunos casos, se somete el colágeno a procesos de entrecruzamiento para mejorar sus propiedades mecánicas [45]. Casi todas incluyen también celulosa en su composición.

La membrana manufacturada por *Viscofan S.A.*, ensayada en esta tesis, está compuesta fundamentalmente por fibras cortas de colágeno procedentes de la piel de ganado bovino. Ésta, al llegar a la fábrica se trata con ácido clorhídrico y se mezcla con una dispersión de celulosa [46]. Este material se encuentra ampliamente descrito en el apartado 3.2.2.

La membrana producida por *Kureha* está compuesta fundamentalmente por quitina desacetilada (quitosano) y colágeno. Se obtiene retirando mecánica o químicamente todos los componentes excepto el colágeno de la piel y los tendones de ganado bovino [47]. El colágeno se entrecruza con glutaraldehído o formaldehído. Este material se prepara poniendo en contacto ambos componentes en un medio ácido para posteriormente desacidificarlo hasta obtener la membrana.

La membrana manufacturada por *Cotex Viscofan* (Novi Sad, Serbia) [48] tiene el mismo proceso de fabricación y composición que la membrana de *Viscofan S.A.* pero se le ha agregado quitosano, aceite esencial de orégano y ácido acético.

La membrana “Belkozín” [49][50] está compuesta principalmente por fibras de colágeno y polietileno. Las fibras de colágeno provienen de la piel de ganado bovino. No aparece detallado en la bibliografía el proceso de fabricación de este material.

Las membranas de colágeno tintadas [51], “MCT”, también tienen como base el colágeno que proviene de piel de ganado. En la bibliografía no aparece detallada ni su composición ni su proceso de fabricación.

Otro tipo de membrana es la producida por *Devro* [52]. En su patente se detalla el proceso de fabricación y sus propiedades mecánicas. Está fabricada a partir de piel de ganado bovino. El material está compuesto por colágeno y por ciertos aditivos como glicerol, sorbitol, celulosa y polisacáridos. Una vez formada la membrana por extrusión se entrecruza con algún agente como el glutaraldehído o el dialdehído. Finalmente, se trata con sal para eliminar toda el agua presente y reducir el espesor.

El colágeno que contiene la membrana *Tee-Pak* [53] se extrae de la piel de ganado bovino. En su proceso de fabricación se forma una mezcla de colágeno que se extruye para formar un tubo que, posteriormente, se pone en contacto con bisulfito, empleado como agente entrecruzante.

Por último, existe otra membrana que está compuesta principalmente por celulosa y producida por *Viskase* [54]. Se incluye en este apartado para comparar sus propiedades mecánicas con las de las membranas de base colágeno.

2.5. Mecánica de las membranas de base colágeno

Las membranas de colágeno son materiales anisótropos, puesto que sus fibras tienden a disponerse en direcciones preferenciales. La respuesta mecánica de estos materiales no es lineal. Su rigidez y tensión dependen de la deformación en cada instante. Las curvas tensión – deformación de los tejidos de base colágeno, presentan típicamente una forma de “J” (Figura 5) [55].

Figura 5. Curva típica de materiales blandos de base colágeno (Adaptación de Tower [55])

En una primera fase (I), bajo pequeñas cargas, las fibras de colágeno están onduladas y la relación tensión – deformación es prácticamente lineal. En una segunda fase (II), a medida que aumenta la carga, las fibras comienzan a estirarse y alinearse en la dirección de carga produciendo una rigidez creciente. En la tercera fase del ensayo (III), las fibras están totalmente alineadas, la relación tensión – deformación vuelve a ser lineal y la rigidez aumenta

considerablemente. A partir de este momento, se pasa a la última fase (IV) en la que las fibras comienzan a romperse y por tanto, el material pierde rigidez y falla [56].

Velos valvulares naturales

Los velos valvulares son estructuras no vascularizadas, flexibles y muy finas, puesto que tienen un espesor menor de 1mm [57]. Están formadas por tres capas: la ventricular, la esponjosa y la fibrosa. Cada una difiere de las otras en la cantidad y orientación del colágeno. La ventricular y la esponjosa son las más ricas en esta proteína [34]. Las fibras de colágeno, que se disponen en largos haces, están preferentemente orientadas en dirección circunferencial (Figura 6). Nacen de la zona de la comisura y se extienden hasta el extremo libre del velo [58]. Las presiones que soportan los velos valvulares son del orden de 0.05 MPa en sístole y de 0.5 MPa en diástole [57].

Figura 6. Geometría del velo valvular. A la izquierda, un velo valvular extendido. A la derecha, los tres velos que conforman la válvula [59]

Sahasakul *et al.*, [60] midieron, a finales de los años 80, el espesor de los velos valvulares aórticos y mitrales en 200 corazones humanos sanos. En el caso de los velos valvulares aórticos, se midió el espesor en tres puntos: el nódulo, el extremo libre y la parte central del velo (Figura 6). Los resultados no muestran variación del espesor en función del sexo pero sí se aprecia un aumento significativo del mismo con la edad. El espesor medio en el nódulo fue de 0.67 mm (en menores de 20 años), 0.87 mm (entre 20 y 59 años) y 1.42 mm (en mayores de 60 años). El nódulo es cerca de dos veces más grueso que el extremo conectado a la aorta y éste es, al menos, un 25% más grueso que la parte central.

El espesor de las capas de los velos valvulares porcinos fue medido por Khan *et al.* [61] en 2007, mediante ultrasonidos de alta frecuencia. El espesor total resultó ser de 0.81 ± 0.13 mm, el de la capa fibrosa de 0.3 ± 0.07 mm, el de la esponjosa de 0.23 ± 0.05 mm y el de la ventricular de 0.32 ± 0.08 mm.

Vesely *et al.* [62] realizaron, en 1992, ensayos uniaxiales en condiciones cuasi-estáticas en velos valvulares humanos y porcinos. El comportamiento mecánico que presentan es como el que se muestra en la Figura 5. El módulo elástico en la fase inicial de carga (zona I en Figura 5) varía desde los 0.002 a los 0.01 MPa en dirección radial y de 0.02 a 0.1 MPa en dirección circunferencial. Después del codo, (zona III en Figura 5) el módulo aumenta a 1 – 2 MPa en la dirección radial y de 8 - 12 MPa en la circunferencial.

Más adelante, en 2004, se realizó una comparación de las propiedades biomecánicas y estructurales de las válvulas pulmonares y aórticas humanas. Stradins *et al.*, [58] realizaron ensayos de tracción uniaxiales en dirección circunferencial y radial. El espesor medio de los velos valvulares aórticos fue de 0.6 ± 0.2 mm. Los resultados para las válvulas aórticas se recogen en la Tabla 1. En dirección circunferencial tanto el módulo de elasticidad como la tensión de rotura toman valores significativamente mayores. En cuanto a la deformación de rotura, los valores son similares aunque en dirección radial es algo mayor.

Módulo de elasticidad (MPa) a 1 MPa		Tensión de rotura (MPa)		Deformación de rotura (%)	
Circunf.	Radial	Circunf.	Radial	Circunf.	Radial
15.3 ± 3.8	2.0 ± 0.2	1.7 ± 0.3	0.32 ± 0.04	18 ± 8	24 ± 4

Tabla 1. Resultados de los ensayos mecánicos en velos valvulares aórticos humanos [58]

En 2009, Kalejs *et al.*, [63] ensayaron velos valvulares porcinos naturales y otros tratados para ser implantados en una bioprótesis. Se realizaron ensayos de tracción uniaxial hasta rotura en dirección circunferencial y en dirección radial. Las dimensiones de las probetas fueron de 3.5 mm de ancho y 20 mm de largo. El espesor de los velos de las bioprótesis fue de 0.6 ± 0.2 mm y los de las válvulas porcinas de 0.9 ± 0.2 mm. En la Tabla 2, se muestran los resultados de estos ensayos. Los que mayor módulo de elasticidad y tensión de rotura presentan son los velos de las bioprótesis. La dirección circunferencial presenta siempre mayores valores del módulo de elasticidad y de la tensión de rotura que la radial. En dirección radial los valores de deformación fueron ligeramente superiores.

	Módulo de elasticidad (MPa) a 1 MPa		Tensión de rotura (MPa)		Deformación de rotura (%)	
	Circunf.	Radial	Circunf.	Radial	Circunf.	Radial
Bioprótesis	102 ± 58	9.2 ± 1.8	5.8 ± 1.9	0.7 ± 0.2	6 ± 1.5	7.9 ± 1.7
Naturales porcinos	42.3 ± 5	5.3 ± 0.6	1.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1	7.3 ± 0.3	8.6 ± 0.8

Tabla 2. Resultados de los ensayos mecánicos en velos de porcino naturales y tratados para bioprótesis [63]

Beck *et al.* [64] realizaron, en 2001 un modelo de elementos finitos con el objetivo de comprobar la tensión que soportarían los velos en una válvula con o sin senos de Valsalva, que son cada una de las dilataciones entre la pared de la aorta y los velos valvulares. Las dimensiones del modelo fueron las siguientes: radio de la aorta: 13 mm; altura de la válvula: 18 mm; espesor del velo: 0.5 mm y espesor de la pared de la aorta y del seno: 1.3 mm. La presión interna que se aplicó al modelo fue de 0.01 MPa. En la válvula sin senos, la tensión que soportaban los velos era de 0.65 MPa mientras que en las válvulas con senos el valor descendía a 0.3 MPa. Concluyeron que los senos de Valsalva juegan un papel importante minimizando las tensiones soportadas por los velos.

En un estudio realizado en el año 2000 por Neethling *et al.*, [65] se compararon los velos valvulares de canguro y los de ganado porcino (ambos fijados con glutaraldehído) en cuanto a su geometría, morfología y elasticidad. En primer lugar, hicieron un análisis *in vitro* determinando que los velos de la válvula aórtica de canguro presentan menor espesor y mayor elasticidad que los de porcino. A continuación, implantaron los velos en ratas durante ocho semanas y observaron que la calcificación producida en las de canguro era menor que la producida en las de porcino.

Con el objetivo de comprobar si la arquitectura de fibras de colágeno era estable a largo plazo, en 2005, Wells *et al.*, [66] realizaron ensayos en válvulas porcinas fijadas químicamente variando los valores de presión (0 y 4 mmHg de presión transvalvular) y el número de ciclos de

fatiga (0 , 10^6 , 50×10^6 y 200×10^6). Mediante dispersión de luz de bajo ángulo (SALS), se midieron los cambios en la arquitectura de las fibras de colágeno, observando que entre 10^6 y 50×10^6 ciclos, las fibras sólo se alinean para la presión de fijación de 0 mmHg y que a partir de 50×10^6 ciclos, se comienza a perder la estructura nativa del colágeno independientemente de la presión transvalvular.

Ensayos de pericardio de avestruz y canguro

En 2001, García Páez *et al.* [67], realizaron ensayos mecánicos en otros materiales de base colágeno como el pericardio de avestruz. Los ensayos mostraron que el pericardio tratado con glutaraldehído al 0.625% w/v en un tampón fosfato sódico $0.1M$, pH 7.4 , tiene una gran resistencia a la rotura al someterse a ensayos biaxiales, llegando a tensiones de rotura de entre 30 MPa y 100 MPa.

Años más tarde, en 2006, Maestro *et al.* [68] compararon la composición del pericardio de avestruz con el pericardio bovino y los resultados de los ensayos de tracción uniaxial realizados sobre dichos materiales. Entre el pericardio bovino y el de avestruz, tratados ambos con glutaraldehído al 0.625% w/v en un tampón fosfato sódico $0.1M$, pH 7.4 , existen ciertas diferencias en cuanto al contenido de agua, de elastina y la cantidad de colágeno en referencia al contenido total de proteína. El pericardio de avestruz muestra mejores propiedades mecánicas puesto que alcanza tensiones de rotura mayores (32.4 MPa) que las de pericardio bovino (11.5 MPa). Sin embargo, la calcificación que se produce en el tejido pericárdico de avestruz es demasiado alta como para concluir que este material sea mejor que el procedente de ganado bovino.

Neethling *et al.*, en 2002 [69], realizaron ensayos biaxiales en pericardio de canguro tratado con glutaraldehído al 0.625% y observaron que el pericardio de canguro, además de ser más flexible, tiene una matriz de colágeno más densa que el de bovino y que, con el tiempo, produce menor calcificación.

En un trabajo realizado por Claramunt *et al.* 10 años más tarde [70], se estudió la tolerancia a la fatiga del pericardio de avestruz tratado con glutaraldehído al 0.625% w/v en un tampón fosfato sódico $0.1M$, pH 7.4 , y se compararon los resultados con los de pericardio bovino. Se realizaron ensayos biaxiales entre una presión de 1 y 6 atm, a una frecuencia de $1Hz$ y a una temperatura de entre 20 y $22^\circ C$. En este estudio se concluye que el pericardio de avestruz, comparado con el pericardio bovino, presenta peor comportamiento mecánico. El espesor no parece tener relación con el buen comportamiento mecánico de las probetas, sin embargo, sí se ha visto una correlación directa con la energía disipada en los primeros ciclos de fatiga.

Ensayos en pericardio bovino

Trowbridge *et al.*, [71] en 1989, llevaron a cabo ensayos en pericardio tratado con glutaraldehído y sin tratar. Los ensayos de tracción uniaxial se realizaron en probetas de 18 mm de ancho y 80 mm de largo hasta alcanzar una tensión de 0.6 MPa (tensión asociada a la presión fisiológica de 100 mmHg) y después se realizaron ensayos hasta rotura. Los resultados mostraron que el tratamiento incrementaba considerablemente el alargamiento de rotura (hasta un 11%).

En 2010, Sánchez-Arévalo *et al.*, [72] ensayaron a tracción probetas de pericardio bovino de dimensiones de 15 mm de ancho y 70 mm de largo, sometidas a tratamiento con glutaraldehído al 0.5% y después liofilizadas. Las probetas se ensayaron a 0° , a 45° y a 90° con respecto a la orientación de las fibras de colágeno. Los valores de rigidez final que se obtuvieron a distintas orientaciones son los siguientes: 0° : 105 MPa; 45° : 70 MPa; 90° : 63 MPa.

En ensayos realizados a flexión en pericardio tratado con glutaraldehído (0.625%) y sin tratar, Mirnajafi *et al.*, [73] en 2005, observaron que el pericardio bovino, independientemente del tratamiento, es más rígido en la dirección perpendicular a la orientación de las fibras de colágeno (0.39 MPa en pericardio sin tratar y 1.2 MPa en pericardio fijado) que en la dirección paralela (0.12 MPa en pericardio sin tratar y 0.72 MPa en pericardio fijado). Además, se comprobó que el tratamiento con glutaraldehído incrementa la rigidez del material.

Comparando el pericardio bovino, fijado con glutaraldehído, de reses de 4 a 7 días de vida con el pericardio de aquellas de 18 a 24 meses de edad, Sizeland *et al.*, en 2014, [74] observaron que el pericardio proveniente de ganado más joven tiene menor espesor que el pericardio de adultos. El pericardio de las reses más jóvenes tiene una rigidez final de 3.7 MPa, considerablemente mayor que el del adulto, 33.5 MPa. Con respecto a los resultados obtenidos en ensayos de tracción uniaxial, el pericardio joven tiene una tensión de rotura de 32.9 MPa y el pericardio adulto de 19.1 MPa.

Sacks *et al.* [75] demostraron cuantitativamente en 2003, mediante un dispositivo de dispersión de luz bajo ángulo (SALS), que la dirección y el grado de anisotropía mecánica son dictados por la arquitectura de las fibras de colágeno locales.

Carrera *et al.*, en el año 2001 [76], ensayaron probetas tratadas con glutaraldehído al 0.625% de 20 mm de ancho y 120 mm de largo en dirección ápico-caudal. Las probetas fueron sometidas a una prueba de tracción uniaxial en escalones de carga de 2 MPa, 3 MPa, y 8 MPa. Los valores de tensión de rotura se situaron entre 26.6 MPa y 32.6 MPa.

En 2004, Sun *et al.*, [77] realizaron ensayos de fatiga uniaxial de pericardio bovino tratado con glutaraldehído a una frecuencia de 30 Hz, con un desplazamiento máximo del 16%, y a una tensión máxima de 1 MPa con la dirección de carga paralela a la dirección preferencial de las fibras de colágeno. Después de 30×10^6 ciclos, las probetas se sometieron a fatiga biaxial a 1 MPa hasta 65×10^6 ciclos. Se comprobó que la fatiga cambia la orientación de las fibras de forma permanente.

Años antes, en 1998, se habían comparado mediante fatiga biaxial muestras de pericardio bovino, de 25 mm x 25 mm, pretensadas durante el tratamiento con glutaraldehído con otras fijadas libremente. Sacks *et al.*, [78] observaron cómo las primeras muestran un gran aumento en rigidez (0.4 MPa) con respecto a las segundas (0.17 MPa) y un ligero aumento respecto a las control (0.32 MPa) que no se fijaron con glutaraldehído.

En 2007, Sellaro *et al.*, [79] ensayaron pericardio bovino tratado con glutaraldehído al 0.625%. Las probetas (20 mm x 20 mm) se sometieron a fatiga biaxial a 0, 20×10^6 y 50×10^6 ciclos. Después de cada ciclado se retiraba la probeta y se observaba mediante dispersión de luz de bajo ángulo (SALS). La tensión máxima de fatiga fue de 0.5 MPa. Se ensayaron probetas en la dirección paralela a las fibras y en su perpendicular a una frecuencia de 22 Hz. El ciclado se realizó en suero fisiológico a una temperatura de 25°C. Concluyeron que el primer ciclo de fatiga es diferente de los demás al producir el alineamiento de las fibras de colágeno según las direcciones de carga. Este fenómeno juega un papel crítico en la respuesta mecánica del material.

García Páez *et al.* [80], dos años después, ensayaron a fatiga probetas de pericardio de toro. Se comprobó que el área contenida bajo la curva tensión – deformación en los primeros ciclos de fatiga es un buen indicador de la durabilidad de la probeta.

Utilizando como parámetro el gasto de energía del material sometido a fatiga, en 2010, Rojo *et al.*, [81] realizaron ensayos biaxiales en muestras circulares de 20 mm de diámetro tratadas con glutaraldehído al 0.625% w/v en un tampón fosfato sódico 0.1M, pH 7.4. Cada probeta se

sometió a bloques de 100 ciclos de fatiga biaxial oscilando la presión entre 0 MPa y 1 MPa, a una velocidad de 150 mbar/s. Concluyeron que la energía disipada por unidad de volumen en el primer ciclo de carga permite predecir la durabilidad de la probeta.

En esta línea un año más tarde, Claramunt *et al.* [82] realizaron ensayos biaxiales de fatiga (5000 ciclos) en pericardio bovino a una frecuencia de 1 Hz. Los resultados demostraron que se puede predecir el comportamiento a medio plazo del tejido analizando los primeros ciclos de fatiga del material.

Por último, Martin y Sun, en 2014 [83], modelizaron el comportamiento en fatiga uniaxial y biaxial del pericardio bovino basándose en los resultados de los ensayos realizados por Sun *et al.* [77]. El objetivo era predecir la respuesta a la fatiga a largo plazo. Concluyeron que se producía una alteración de la geometría de la probeta y de las propiedades mecánicas del material debido a deformaciones permanentes que se iban produciendo a medida que avanzaba la fatiga.

Ensayos de fractura

Trowbridge *et al.* en 1989, [84] observaron por primera vez la delaminación que se producía al someter a tracción uniaxial probetas de pericardio bovino en las que se había realizado una incisión en un lateral en forma de triángulo. Según los resultados, la tensión de rotura era significativamente mayor en muestras sin incisión y ésta no afectaba a la deformación de rotura. La tensión de rotura en dirección ápico - caudal fue de 17 MPa en probetas sin incisión y 12 MPa en probetas con incisión. En dirección circunferencial, 19 MPa para las primeras y 16 MPa para las segundas. Los valores de deformación de rotura fueron en ápico - caudal 47% en probetas sin incisión y 45% en probetas con incisión y, en circunferencial, 59% para las primeras y 55% para las segundas.

García Páez *et al.* en 2004 [85], ensayaron probetas de pericardio bovino y de avestruz, tratadas con glutaraldehído al 0.625%, con sutura y sin sutura. Las probetas, con forma de pantalón, tenían unas dimensiones de 20 mm de ancho y 120 mm de largo. El ensayo se realizó mediante una máquina electromecánica y a una velocidad de 1.6 mm/s. Se observó que al romper la probeta se producía delaminación. En dirección ápico - caudal, la resistencia a rasgado del pericardio bovino fue de 24.5 N/mm y en circunferencial de 32.2 N/mm.

En un estudio realizado por Carrera *et al.* [86] de probetas de pericardio de avestruz, se ensayaron probetas con forma de pantalón con y sin suturas. Se realizaron los ensayos con un péndulo Elmendorf y la resistencia al rasgado del tejido en las probetas sin suturas fue de 85.7 N/mm.

Un año después, García Páez *et al.* [87], determinaron la fuerza necesaria para la propagación de grietas en pericardio bovino y de avestruz. El pericardio se trató con glutaraldehído al 0.625% y se ensayó con un péndulo Elmendorf. Las probetas, en forma de pantalón, se fueron realizadas con diferentes dimensiones. Las probetas de pericardio bovino de menores dimensiones (4 cm de ancho y 2.25 cm de largo) presentaron una resistencia a rasgado de 23.1 N/mm y las probetas de mayores dimensiones (4 cm de ancho y 4.5 cm de largo), 267 N/mm.

En esta línea, en otro nuevo estudio de García Páez *et al.* [88], se ensayaron probetas de pericardio de toro, en forma de pantalón, tratadas con glutaraldehído al 0.625%, con suturas y sin suturas. El ensayo se realizó mediante un péndulo Elmendorf y el resultado para probetas sin sutura, en dirección ápico - caudal, fue de 42.6 N/mm.

Por último, en un estudio llevado a cabo por Walraevens *et al.* [89] realizado en el año 2008, se ensayaron probetas de tejidos, sanos y calcificados, aórticos de ganado porcino. Los ensayos a los que se sometieron fueron de compresión uniaxial, tracción uniaxial y rasgado. La velocidad de ensayo para tracción uniaxial y rasgado fue de 0.083 mm/s. La dirección del ensayo de rasgado fue axial, es decir, paralela al eje del vaso sanguíneo. Las dimensiones de las probetas de los ensayos de tracción uniaxial fueron de 4 mm de ancho y 20 mm de largo. El resultado de tensión de rotura para tejidos sanos fue de 1.6 MPa y para enfermos de 1.3 MPa. El resultado de deformación de rotura para tejidos sanos fue de 0.54% y para tejidos enfermos, de 0.55%. Las dimensiones de las probetas empleadas en los ensayos de rasgado fueron de 15 mm de ancho y 20 mm de largo. Los resultados de la resistencia al rasgado fueron de 2.16 N/mm para tejidos sanos y 1.78 N/mm para tejidos enfermos.

Resumen de los ensayos mecánicos en membranas naturales de colágeno

Las membranas naturales, tanto velos valvulares como membranas de pericardio, tienen unos espesores algo inferiores a 1 mm y son altamente anisótropas. Está ampliamente demostrado que las propiedades mecánicas mejoran cuando el material es tratado con glutaraldehído a una concentración del 0.625%, provocando mayor rigidez y resistencia.

Los ensayos sobre velos valvulares han demostrado que se trata de un material anisótropo que posee mejores propiedades mecánicas (tensión de rotura y rigidez) en dirección circunferencial (tensión de rotura de 1.7 MPa y deformación de rotura del 18%) que en dirección radial (tensión de rotura de 0.32 MPa y deformación de rotura del 24%). Los velos naturales humanos son menos rígidos que los porcinos.

Se han realizado ensayos mecánicos con pericardio de avestruz, de canguro y de ganado bovino. Comparando los resultados con los de los velos valvulares, los pericardios de las distintas especies son más rígidos y resistentes en la dirección de la orientación de las fibras de colágeno, que se disponen preferentemente en el sentido circunferencial.

Los ensayos de tracción en pericardio bovino presentan unos valores de tensión de rotura de entre 19 MPa y 33 MPa y de rigidez final de entre 33 MPa y 83 MPa.

A través de ensayos de fatiga uniaxial y biaxial, a diferentes frecuencias (desde 1 Hz hasta 30 Hz) y hasta unas tensiones máximas de 0.5 MPa y 1 MPa, se ha comprobado que la fatiga aumenta la tensión de rotura del material y además, que el primer ciclo de fatiga es diferente al resto puesto que en él se produce un alineamiento de las fibras en la dirección de la carga, jugando un papel crítico en la respuesta mecánica del material. La información proporcionada por el primer ciclo de fatiga es un indicador de daño en el material que puede ser utilizado para estimar su durabilidad y resistencia.

Las deformaciones permanentes que se producen debido a la fatiga, pueden alterar significativamente tanto la geometría de la probeta como las propiedades mecánicas del pericardio.

Además, mediante los ensayos de rasgado, se ha observado que en el pericardio se produce delaminación y que la resistencia al rasgado es mayor en dirección circunferencial. Los valores de esta última para pericardio bovino toman valores de entre 23 N/mm y 267 N/mm y son muy superiores a los que presentan los tejidos aórticos, de alrededor de 2 N/mm.

Ensayos mecánicos en membranas artificiales de base colágeno

A continuación, se describen los resultados de los ensayos hallados en la bibliografía sobre las membranas de base colágeno para uso alimentario similares a las utilizadas en esta tesis.

Con la membrana artificial empleada en los ensayos de esta tesis, los fabricantes realizaron ensayos de tracción uniaxial, tanto en seco como en húmedo, sobre probetas con forma de bolsa. También se evaluó la permeabilidad al agua de la sutura (rellenando primero la bolsa con agua y, después, con una dispersión acuosa de fibras de colágeno con un 15% de sólidos) y su resistencia y estabilidad (rellenando la bolsa con sal). Los resultados de estos ensayos mostraron que la mayor parte de las muestras resultaron ser “permeables”. En cuanto a su resistencia, en medio húmedo la bolsa rompe y en seco, no. Por último, en cuanto a su estabilidad, en medio húmedo es mala y en seco es buena [90]. No hay publicados resultados numéricos de sus parámetros mecánicos.

En las membranas producidas por *Kureha* se han realizado ensayos mecánicos para determinar la tensión de rotura de las membranas [47]. Se ensayaron en medio húmedo dos tipos de membranas, unas fabricadas únicamente a partir de fibras de colágeno entrecruzadas con glutaraldehído (B) y otras a las que se les añadió quitina desacetilada (A). Se cuantificó mediante un ensayo de tracción uniaxial la tensión de rotura y la elongación de rotura y por otra parte, se hizo un ensayo de rasgado. El ensayo de rasgado se lleva a cabo mediante un péndulo según JIS P-8116.

Membrana	Espesor (mm)	Tensión de rotura (MPa)	Elongación de rotura (%)	Resistencia a rasgado (N/mm)
A	0.010	45.1	32	3.5
B	0.015	24.5	25	2.4

Tabla 3. Resultados de los ensayos mecánicos de las membranas *Kureha* [47]

La composición de las membranas del material “B” es muy similar a aquellas ensayadas en la presente tesis.

Las membranas manufacturadas por *Cotex Viscofan* [48], tanto las que están recubiertas con quitosano (A) como las que no lo están (B), se sometieron a ensayos de tracción con el fin de determinar la tensión de rotura y la elongación de rotura. Las probetas se acondicionaron durante los dos días previos a su ensayo a una temperatura de 8 °C y a una humedad relativa del 65%. Se observa que las propiedades mecánicas no difieren mucho entre ambas membranas (Tabla 4).

Membrana	Espesor (mm)	Tensión de rotura (MPa)	Elongación de rotura (%)
A	0.103	36.3	22.4
B	0.072	54	18.4

Tabla 4. Resultados de los ensayos mecánicos de las membranas *Cotex Viscofan* [48]

En las membranas *Belkozín* [49][50], se ensayaron a tracción uniaxial probetas de 10 mm de ancho y 100 mm de largo en las dos direcciones del material: longitudinal, que se corresponde con el eje del tubo y la transversal, perpendicular a la primera. Se realizaron ciclos de carga y descarga. La carga, el 75% de la carga de rotura, se aplicó a una velocidad de 0.5 mm/s. Después de que transcurriesen de 2 a 6 ciclos, la carga se incrementó hasta la carga de rotura (55 N). Según la patente en la que se basa la producción de este material [91], el espesor máximo de estas membranas ha de ser de 0.1 mm.

Figura 7. Resultados de ciclos de carga y descarga en membrana de base colágeno [50]

Los resultados (Figura 7) muestran un progresivo aumento en la rigidez. Se establece un valor óptimo de carga que corresponde con un 58-62% de la tensión de rotura y tras cuatro ciclos de fatiga a un máximo del 10-11% de incremento en la elongación de rotura.

Las probetas que no fueron sometidas a fatiga, presentaron valores en los parámetros de rotura menores que aquellas sometidas a fatiga. Se observó una diferencia del 15-20%.

En las membranas “MCT” que son membranas de colágeno tintadas [51], el espesor medio varía de 0.034 a 0.04 mm. Los resultados corresponden a membranas sin tintar. La resistencia a rasgado es de 997.3 N/mm en medio seco y 232.4 N/mm en húmedo. La presión de rotura, determinada de acuerdo con IS 3/87 es de 4.4 MPa.

Las membranas *Devro* [52] fueron tratadas con glutaraldehído. Se realizaron tres tipos de ensayos sobre ellas: aquellos para comprobar la presión que resisten cerradas formando una bolsa, otros de inflado y, por último, ensayos mecánicos de tracción uniaxial hasta rotura. Las probetas para este último tipo de ensayos, se cortaron en forma de hueso y se pulverizaron con agua antes de su ensayo. La velocidad de ensayo fue de 8.3 mm/s. La tensión de rotura en membranas de espesor que oscila entre 0.125 a 0.150 mm tratadas con glutaraldehído es de 0.68 a 0.78 MPa.

En las membranas *Tee-Pak* [53] se realizaron ensayos de tracción. En la Tabla 5, se presentan los valores de tensión de rotura, rigidez y elongación.

Membrana	Tensión de rotura (MPa)		Rigidez final (MPa)		Elongación de rotura (%)	
	Longitudinal	Transversal	Longitudinal	Transversal	Longitudinal	Transversal
A	6.7	7.7	20.3	17.2	34	45
B	29.6	29.1	77.7	54.8	38	53

Tabla 5. Parámetros de rotura material 6. A: membrana sumergida en agua; B: membrana conservada al 62% de humedad y 24 °C

Por último, en las membranas exclusivamente de celulosa [54], se midió la fuerza de rasgado, que se calculó después de someter a la probeta a un ensayo con péndulo. La tensión de rotura de las membranas de celulosa con aditivos fue de 1 MPa (espesor = 0.21 mm) y de 2.5 MPa para las que no contienen aditivos (espesor = 0.125 mm).

	Resistencia a rasgado (N/mm)
Celulosa sin aditivos longitudinal	1.28
Celulosa sin aditivos transversal	1.52
Celulosa con aditivos longitudinal	2.76
Celulosa con aditivos transversal	3.23

Tabla 6. Resultados del parámetro de rasgado en membranas de celulosa

Resumen de los ensayos mecánicos en membranas artificiales de colágeno

Las membranas artificiales que se han descrito anteriormente, tienen espesores que varían desde 10 μm hasta 1 mm y son anisótropas debido a su proceso de fabricación (extrusión). Algunas membranas se trataron con glutaraldehído para mejorar sus propiedades mecánicas.

Al realizar ensayos mecánicos, tanto de tracción uniaxial como de rasgado, en las dos direcciones del material, se ha demostrado que en una dirección, la denominada transversal que coincide con la dirección perpendicular al eje del tubo, las propiedades mecánicas de las membranas son mejores. La tensión de rotura varía entre 0.7 MPa y 54 MPa, la elongación de rotura entre el 18% y el 32% y la rigidez final entre 17 MPa y 55 MPa, dependiendo la dirección de ensayo, del tipo de membrana y del tratamiento al que se le haya sometido.

En una de las membranas, se realizaron ensayos de fatiga y se compararon con otros ensayos de probetas del mismo material que no fueron sometidas a fatiga. Se observó que las probetas sometidas a fatiga presentan de un 15% a un 20% de mejora en los parámetros de rotura con respecto a las que no fueron fatigadas.

Comparación del pericardio y las membranas artificiales

Comparando las membranas naturales con las artificiales, se puede observar en primer lugar, que su procedencia es diferente: una es natural y la otra está procesada. Este hecho lleva a que la composición de ambas no sea idéntica. Sin embargo, su elemento fundamental son las fibras de colágeno, puesto que las dos provienen de tejidos ricos en colágeno.

En cuanto a su espesor, las membranas naturales, en concreto el pericardio, tienen, en general, mayor espesor que las membranas artificiales.

En referencia al comportamiento mecánico, los resultados de los ensayos de ambos materiales han demostrado que se trata de materiales anisótropos. Atendiendo a los parámetros de rotura, el comportamiento es diferente entre las distintas membranas naturales y las artificiales. Tanto los valores de tensión de rotura en las membranas naturales tratadas con glutaraldehído (19 MPa a 33 MPa) como los de rigidez final (33 MPa a 83 MPa) son en general superiores que en las artificiales. Éstas presentan un amplio rango de tensiones de rotura que oscila entre 0.7 MPa y 54 MPa y una rigidez final de entre 17 MPa y 55 MPa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Introducción

Tal y como quedó reflejado en el capítulo anterior, actualmente apenas existe información sobre las propiedades mecánicas y microestructurales de las membranas artificiales de base colágeno y aún quedan aspectos mecánicos por estudiar en pericardio. Para poder seguir completando la información en ambos tipos de membranas, así como para entender mejor su comportamiento, se han realizado ensayos bioquímicos y mecánicos en ambos materiales.

Los ensayos que se han llevado a cabo en este trabajo son *in vitro*. Bajo esta condición, se han ensayado probetas de pericardio y membranas artificiales de forma estática y dinámica.

Los ensayos *in vitro* se llevan a cabo fuera del organismo en un ambiente controlado. El objetivo no es otro que el de reproducir en el laboratorio, lo más fielmente posible, las condiciones fisiológicas que se dan dentro del organismo. En este caso, se persigue reproducir condiciones de temperatura (aproximadamente, 37°C) y medio físico (suero fisiológico).

En los ensayos estáticos, también denominados ensayos cuasiestáticos, la carga se aplica a una velocidad tan baja que los efectos dinámicos pueden considerarse despreciables. Al contrario que los estáticos, los ensayos dinámicos permiten caracterizar la respuesta del material en función del tiempo.

El presente capítulo comienza describiendo los dos materiales ensayados: pericardio y membranas artificiales de colágeno. Más adelante, se describen los análisis bioquímicos que se han realizado sobre ambos materiales con el fin de determinar el contenido en colágeno y el grado de entrecruzamiento entre las fibras de colágeno. Posteriormente, se detalla el ensayo de medida del hinchamiento, y se finaliza con la descripción de los ensayos mecánicos realizados (tracción uniaxial, rasgado, tracción con fisura interior y dinamomecánicos). Previo a su ensayo de tracción hasta rotura, gran parte de las probetas se sometieron a diferentes ciclos de fatiga para evaluar el efecto de la alineación y el daño de las fibras.

3.2. Materiales

En este apartado se hace una descripción de los dos materiales de base colágeno utilizados en esta tesis: membranas artificiales de colágeno y pericardio bovino.

3.2.1. Pericardio

Este material se encuentra descrito de manera genérica en el capítulo 2. Por tanto, este apartado se centrará en detallar el pericardio concreto empleado en los ensayos bioquímicos y mecánicos.

El pericardio bovino se obtuvo en un matadero local, procedente de reses de 6 a 12 meses de edad, sanas y recién sacrificadas (Tabla 7). Para que todos los pericardios que se utilizan en esta tesis fueran lo más homogéneos posibles en cuanto a su morfología, se procuró que las reses tuviesen la misma edad en el momento del sacrificio, alrededor de 9 meses.

Las membranas de pericardio se transportaron sumergidas en suero salino (NaCl 0.9%) a 4°C hasta el laboratorio. En un plazo de 24 horas, se limpiaron retirando manualmente la grasa adherida a las mismas. Las láminas se lavaron con suero salino frío durante 24 horas, haciendo varios cambios de suero. Posteriormente, se procedió a su tratamiento con glutaraldehído.

Pericardio	Raza	Sexo	Tipo de ensayos
1	Conjunto mestizo	Macho	Tracción uniaxial
2	Fleckviech	Hembra	Rasgado
3	Conjunto mestizo	Macho	Rasgado

Tabla 7. Procedencia del pericardio bovino empleado

Como se puede observar en la Figura 8, los sacos pericárdicos, que miden aproximadamente 15 cm en dirección ápico-caudal y 40 cm en circunferencial, se abren de tal forma que se deja el ligamento del diafragma en el centro y los ligamentos esterno-pericárdicos en la circunferencia [92].

Figura 8. Saco pericárdico abierto

3.2.2. Membranas artificiales de colágeno

En esta tesis, además del pericardio, se estudia un material de base colágeno elaborado de forma artificial. Estas membranas artificiales tienen uso en la industria de la alimentación como envoltorio de embutidos. Está compuesto fundamentalmente por fibras cortas de colágeno y celulosa. Además es muy homogéneo en espesor y morfología.

Debido a su proceso de fabricación, la forma de presentación del material es un largo tubo plegado de 15 cm de anchura y 0.11 mm de espesor. Se ha identificado como dirección longitudinal la que se corresponde con el eje del tubo y como dirección transversal, la perpendicular a aquella. En la Figura 9 se puede ver el tubo plegado y enrollado desde dos perspectivas.

Figura 9. Material de base colágeno. Imagen superior: vista superior. Imagen inferior: vista lateral.

La materia prima para la fabricación de este material procede de la piel de ganado bovino que, después de mezclarse con agua, ácido clorhídrico y una dispersión de celulosa, se extruye incorporando amoníaco que coagula la masa para dar un gel. El gel pasa a una cuba de lavado con agua y, a continuación, a otra cuba que contiene carboximetilcelulosa (CMC) y glicerina donde se lleva a cabo la deshidratación y plastificado del gel. Éste se seca y después de humidifica y, finalmente, se procede a su enrollado alrededor de núcleos de cartón. A la masa se le añaden diferentes aditivos (mezclas de glicerina-agua, aceites minerales y vegetales). Dependiendo del tipo de membrana, ésta puede ser sometida a diferentes tratamientos posteriores. Una vez plisada, se coloca en cajas y éstas en carros, que se envían a cámaras de secado o humidificación, según las necesidades de la membrana, mediante corrientes de aire seco o húmedo. Después del empaquetado, el producto se almacena a una temperatura constante [46].

El estudio de este material permite comprobar la repetitividad de los métodos de ensayo, gracias a que es muy homogéneo en comparación con el pericardio bovino. Por tanto, estas membranas de base colágeno se utilizan para contrastar las propiedades mecánicas del pericardio y también para evaluar sus propiedades mecánicas con el fin de comprobar si, desde un punto de vista mecánico, podría ser usado como sustituto de los velos valvulares en las bioprótesis.

3.2.3. Tratamiento con glutaraldehído

Para dotar a los materiales de resistencia y durabilidad, tal y como se ha descrito en el capítulo 2, fueron sometidos a un proceso de entrecruzamiento químico. Este procedimiento persigue evitar la biodegradación a la que se vería sometida la membrana de colágeno y mejorar sus propiedades mecánicas.

Después de su entrecruzamiento con glutaraldehído (1,5-pentanodial), las membranas se conservaron en glicerol. El glicerol (1,2,3-propanotriol) es una molécula pequeña con tres carbonos y tres grupos funcionales hidroxilos que no contribuye al entrecruzamiento. Constituye el medio óptimo para preservar el tejido puesto que, a altas concentraciones, el glicerol desplaza el agua que se encuentra en las células [34].

El tratamiento de las membranas de pericardio y de las artificiales, se realizó mediante el procedimiento estándar que se utiliza en láminas de pericardio para la fabricación de válvulas cardíacas [22][93][94] y que se describe a continuación.

Preparación del glutaraldehído:

Se preparó glutaraldehído a una concentración de 0.625%. Para ello, se añadieron 25 ml de glutaraldehído al 25%, en volumen, a 975 ml de tampón fosfato sódico (PBS). Se ajustó el pH a 7.4 mediante ácido clorhídrico (ClH) o hidróxido de sodio (NaOH).

Tratamiento del pericardio:

Las membranas se sumergieron en glutaraldehído al 0.625% durante 24 horas. Después, se hicieron tres lavados por inmersión con suero salino (NaCl 0.9%) muy abundante para eliminar los restos de glutaraldehído. Por último, las membranas se conservaron en glicerol 87-89% a temperatura ambiente hasta su ensayo.

Tratamiento de las membranas artificiales:

Para facilitar su tratamiento químico, se cortaron fragmentos de unos 27 cm de longitud. Esta medida se eligió porque proporcionaba un fácil manejo y conservación de las membranas en recipientes cerrados. A su vez, al ser manufacturadas como un cilindro plegado, se cortó dicho cilindro por sus pliegues, dando lugar a dos fragmentos. Las membranas a tratar, tenían unas dimensiones aproximadas de 15 cm de ancho y 27 cm de largo.

Las láminas se hidrataron con suero salino durante 1 hora. Después, se trataron con glutaraldehído al 0.625% durante 24 horas. Pasado este tiempo, se realizaron sucesivos lavados con suero salino muy abundante. Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. Por último, se conservaron en glicerol a una concentración del 87-89% a temperatura ambiente hasta su ensayo.

En los tratamientos con glutaraldehído y glicerol, las láminas se cubrieron con gasas con objeto de que no se pegasen entre sí y para facilitar el contacto con los productos químicos.

3.3. Observación de la microestructura de las membranas por microscopía

3.3.1. Microscopios utilizados

A continuación se describen los equipos que se han utilizado para observar la estructura microscópica de los materiales:

- Microscopio óptico

Se empleó un microscopio óptico Optech Biostar con una cámara digital unida ProgResC5 Jenoptik, mediante la cual se captaron las imágenes con aumentos de 5X, 10X y 20X.

- Microscopio electrónico de barrido FEI QUANTA 200

Este equipo (Figura 10) pertenece al Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC). Opera en tres modos (alto vacío, bajo vacío y modo ambiental) con detectores de electrones secundarios y retrodispersados para todos los modos de operación. En esta tesis, se empleó en modo de bajo vacío a una presión de 40 Pa (SEM bajo vacío) y las muestras no fueron previamente metalizadas.

El objetivo de observar las muestras con este microscopio no era otro que intentar llegar a la microestructura sin necesidad de alterar la probeta con la metalización. Aunque se observaron estructuras, no se llegó a una resolución suficiente para poder observar las fibras de colágeno.

Figura 10. SEM bajo vacío

- Microscopio electrónico de barrido (SEM-JEOL)

El microscopio electrónico JEOL JSM-6300 puede observarse en la Figura 11. Las muestras se examinaron con una intensidad y un voltaje de 6×10^{-11} A y 10 kV, respectivamente.

Figura 11. SEM-JEOL

Para la correcta observación de las muestras, éstas se recubrieron mediante pulverización, de una fina capa de oro de entre 1 y 20 nm. El grosor de la capa depende del tiempo de metalización. Esto se hizo gracias a un metalizador que se compone de un “Sputter coater” SC7620 (Emitech) (Figura 12).

Figura 12. Sputter coater (Emitech)

Para el proceso de metalización, las muestras se extrajeron del glicerol donde estaban conservadas después de su ensayo, se rehidrataron en suero fisiológico para retirar todo el glicerol y a continuación se colocaron entre dos hojas de papel secante para eliminar el agua.

El tiempo de metalización de algunas muestras fue de 60 segundos y de otras fue de 15 segundos. Se redujo el tiempo de metalizado de 60s a 15s porque la capa de oro era demasiado gruesa y, en algunos casos, no se podían observar correctamente las estructuras.

- Microscopio de fuerza atómica (AFM)

Se ha empleado un microscopio de fuerza atómica modelo Cervantes (Nanotec) operando en modo dinámico con control de amplitud. Las puntas empleadas fueron Olympus OMCL-RC800 PSA cuyas características dinámicas son 69 kHz de frecuencia de resonancia y 0.05 N/m de constante elástica y sus dimensiones geométricas son 100 μm de longitud y 40 μm de ancho. Están provistas de una punta, cuyo extremo tiene forma piramidal, de 2.9 μm de altura. Las imágenes se analizaron mediante el software WSxM limitándose el tratamiento de las mismas al ajuste del brillo y el contraste. El equipo al completo se puede observar en la Figura 13.

Figura 13. AFM

3.3.2. Imágenes obtenidas

Pericardio:

En la Figura 14 se observa una imagen de SEM a bajo vacío de pericardio donde se puede comprobar que existe una estructura en forma de malla. Los haces de fibras se disponen en una dirección preferencial. Cada cierta distancia se observan otros haces que se disponen de manera perpendicular a los primeros.

Figura 14. Estructura mallada del pericardio vista en el SEM bajo vacío

En la Figura 15, se observa la superficie de rotura de una probeta y, en ella, las fibras de colágeno del tejido pericárdico.

Figura 15. Fibras de colágeno en pericardio observadas en un SEM-JEOL (Tiempo de metalización = 60 s)

Membranas artificiales:

En la Figura 16 se observa el borde de una muestra de membranas artificiales en la que se puede apreciar el espesor de la misma. Se trata de una probeta ensayada y después secada y metalizada. Por esta razón, el espesor (aproximadamente 70 μm) es menor que el espesor de la membrana en seco (110 μm).

Figura 16. Espesor de la muestra captado con un SEM – JEOL (tiempo de metalización = 15 s)

En la Figura 17 a la izquierda, se aprecia con mayor detalle, la superficie de rotura de las membranas artificiales con el SEM-JEOL. En la Figura 17 a la derecha, se observa la superficie de rotura de una de las probetas de membranas artificiales en un SEM de bajo vacío. En ambas fotografías, se pueden apreciar las distintas capas unidas entre sí que componen el material.

Figura 17. A la izquierda, superficie de rotura de las membranas artificiales vista con SEM-JEOL (tiempo metalización = 60 s). A la derecha, superficie de rotura de las membranas artificiales con SEM bajo vacío

En el Anejo A se recogen todas las fotografías captadas por el SEM-JEOL y por el SEM de bajo vacío.

Observando el material a través de un microscopio de fuerzas atómicas, se ha confirmado que en su estructura existen fibras cortas de colágeno. En la Figura 18 se observa una fibra corta con las típicas bandas del colágeno que se han descrito en el capítulo 2. La distancia entre bandas en la fotografía es de unos 70 nm, coherente con la distancia conocida entre bandas de colágeno (~ 64 nm) [26].

Figura 18. Fibrillas de colágeno en membranas artificiales de colágeno captadas con un AFM

3.4. Análisis bioquímicos

Los análisis bioquímicos que se describen a continuación tienen como objeto determinar el contenido de colágeno de los materiales ensayados y el porcentaje de entrecruzamiento del mismo.

3.4.1. Test de ninhidrina

Mediante el test de ninhidrina, se ha determinado el grado de entrecruzamiento de las regiones ensayadas mecánicamente y de sus zonas adyacentes, tanto en las membranas artificiales de colágeno como en el pericardio. El entrecruzamiento con glutaraldehído provoca que se establezcan enlaces covalentes entre diferentes puntos de las fibras de colágeno que existen en el material, en concreto, que se produzcan enlaces entre los grupos amino libres de lisina o hidroxilisina [95].

La ninhidrina (2,2-dihidroxyindane-1,3-dione, Figura 19) es un agente que revela la presencia de aminoácidos libres [96]. Se trata de una molécula orgánica de color amarillo ($\lambda_{\text{abs}} = 490\text{nm}$) que cambia su color a azul intenso – violeta ($\lambda_{\text{abs}} = 567\text{nm}$) cuando reacciona con los grupos amino libres ($-\text{NH}_2$). El cambio de color se puede cuantificar mediante espectrofotometría. Cada aminoácido en su forma libre puede reaccionar con la ninhidrina y, por tanto, ser detectado.

Figura 19. Fórmula química de la Ninhidrina [97]

Cuando los aminoácidos conforman las proteínas, su grupo α -amino se transforma en amida. Sólo los aminoácidos con grupo amino en su cadena lateral, pueden reaccionar con la ninhidrina. En general, la lisina es el único aminoácido que cumple esta condición y que se encuentra abundantemente en la mayoría de las proteínas.

El colágeno, aparte de lisina, también contiene otro aminoácido característico llamado hidroxilisina. La cadena lateral de ambos aminoácidos interviene en el entrecruzamiento del colágeno puesto que el glutaraldehído forma enlaces covalentes con la hidroxilisina. Sólo aquellas cadenas laterales con un grupo amino libre pueden reaccionar con la ninhidrina.

Por tanto, para determinar el grado de entrecruzamiento de una muestra, se establece una relación entre el valor de la concentración de $-\text{NH}_2$ proporcionado por el test de ninhidrina para el material sin entrecruzar (valor de referencia) y el material entrecruzado.

Los grupos amino pueden ser cuantificados mediante la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 567 nm y aplicando la ley de Beer-Lambert. Ésta es una relación empírica que relaciona la absorción de luz con las propiedades del material que se atraviesa [98].

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Siendo:

Abs (adimensional): absorbancia.

$\epsilon = 1.640 \text{ l/mol.cm}$: coeficiente de extinción molar para la ninhidrina

$l = 1 \text{ cm}$: anchura de la muestra

c (mol/l): concentración molar de los grupos amino que han reaccionado

La absorbancia de la muestra se midió mediante el espectrofotómetro Halo RB-10 de la marca Dynamica. La precisión en la medida de la longitud de onda es de ± 0.5 nm, el nivel de ruido de 0.0005 Abs a 500 nm y la desviación de la luz $\leq 0.05\%$.

El protocolo seguido para la realización del test de ninhidrina está descrito en el anejo B.

3.4.2. Análisis de aminoácidos

El análisis de aminoácidos es un procedimiento que proporciona información detallada sobre el contenido y la proporción de los aminoácidos en una muestra. Este análisis se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Las probetas fueron sometidas a una hidrólisis ácida estándar [99] (HCl 5.7 M, 21 h, 110 °C, fase gaseosa en atmósfera de N₂). Se utilizó un equipo Biochrom 30 series Amino Acid Analyzer, donde se produjo una separación por cromatografía en una columna de intercambio de iones y una reacción con la ninhidrina. A continuación se detectaron los imino y aminoácidos a 440 nm y 570 nm respectivamente.

Las muestras contienen colágeno, otras proteínas y diferentes tipos de compuestos. El objetivo de estos análisis es calcular el porcentaje de colágeno de la muestra, identificando y cuantificando la hidroxiprolina y la hidroxilisina, aminoácidos que solo están presentes en la molécula de colágeno, y otros aminoácidos como la prolina y la lisina.

La presencia de prolina e hidroxiprolina, permiten realizar una estimación del porcentaje de colágeno que contiene la muestra. Mediante la lisina y la hidroxilisina, se estima el porcentaje de colágeno entrecruzado.

Para determinar el contenido de colágeno de las muestras, se emplea un método que supone que el contenido de hidroxiprolina (ProOH) en el colágeno tipo I representa el 13% de la masa de la proteína [101].

Para determinar el grado de entrecruzamiento, se calcula la cantidad de lisina e hidroxilisina que contiene una muestra del material sin entrecruzar y este valor se toma como referencia para calcular el porcentaje de entrecruzamiento en una muestra entrecruzada.

3.5. Hinchamiento

La homogeneidad en espesor es un criterio ampliamente empleado en la selección de materiales biológicos para su uso en prótesis valvulares [67].

Una vez recogido el pericardio en el matadero, se comienza el tratamiento que finaliza con la conservación de la lámina en glicerol. Se ha observado que su conservación en este medio genera un hinchamiento de la membrana que, tras su rehidratación en suero fisiológico, desaparece.

El objetivo del ensayo de hinchamiento es cuantificar la diferencia de espesor de cada material cuando se encuentra en glicerol (medio físico de conservación) y cuando se encuentra hidratado en suero fisiológico (medio físico de ensayo).

Para medir el espesor, se utilizó un calibre Mitutoyo 7301 con una precisión mejor que $10\ \mu\text{m}$. La superficie de contacto es un círculo de 1 cm de diámetro. Este aparato consta de un muelle interno que aprieta la cabeza de contacto contra la muestra.

La fuerza que ejerce el medidor de espesores sobre el material se midió por medio de la máquina electromecánica Instron que se describe en el apartado 3.5.2. Mediante un hilo de acero, varios órdenes de magnitud más rígido que el muelle del medidor de espesores, se conectó mecánicamente éste con la célula de carga y se realizó un ensayo desplazando la cabeza del medidor en el rango de espesores del pericardio y de las membranas artificiales.

En la Figura 20 se muestra la variación de la fuerza en función del espesor de la lámina. El calibre aplica una fuerza promedio de 0.64 N para el pericardio hidratado en suero y de 0.61 N para membranas artificiales.

Figura 20. Fuerza aplicada por el calibre Mitutoyo 7301 en los materiales

Considerando una fuerza media de 0.63 N, la presión media aplicada por el calibre Mitutoyo al medir el espesor sobre un área de contacto de 10 mm de diámetro es de 8 kPa.

Se realizó un análisis del espesor en una membrana pericárdica y en otra artificial. En primer lugar, con un rotulador de violeta de genciana, se dibujó una malla sobre la superficie de la membrana dejando una distancia entre cada punto de 10 mm para poder situar el calibre en el mismo lugar con la membrana en glicerol e hidratada (Figura 21).

Figura 21. Malla sobre la membrana artificial de colágeno. A la derecha, posición del medidor para cubrir la superficie

Se extrajeron las láminas del glicerol, se retiró con papel secante el exceso del mismo y se midió el espesor de toda su superficie. En cada medida, se dejó el calibre un tiempo aproximado de 30 s para permitir que la medida se estabilizase (Figura 22). A continuación, se hidrataron las láminas sumergiéndolas en suero fisiológico a temperatura ambiente durante 2 horas.

El tiempo de rehidratación de las probetas es de 60 minutos. A partir de este tiempo, la medida del espesor es constante y, por lo tanto, el material se encuentra completamente rehidratado. Tras la rehidratación, se volvió a medir el espesor en toda la superficie.

Figura 22. Medida del espesor mediante el calibre Mitutoyo 7301

3.6. Ensayos mecánicos

Los ensayos mecánicos que se describen a continuación son ensayos de tracción uniaxial, de rasgado, de tracción con fisura y dinamomecánicos. En el caso de los ensayos de tracción uniaxial y de rasgado, todas las probetas se sometieron a unos ciclos de fatiga previa salvo las que fueron empleadas como control, que se sometieron directamente a los correspondientes ensayos. En el caso de los ensayos de tracción con fisura y dinamomecánicos, no se realizó fatiga previa y además sólo se realizaron en las membranas artificiales. En la Tabla 8, se recogen el número de probetas realizadas para cada tipo de ensayo.

	Pericardio	Membranas artificiales
Tracción uniaxial *	72 probetas	90 probetas
Rasgado *	77 probetas	91 probetas
Tracción con fisura	-	37 probetas
Dinamomecánicos	-	6 probetas

Tabla 8. Resumen de los ensayos mecánicos.

* Algunas de las probetas sometidas a fatiga previa

3.6.1. Selección del material y corte de las probetas

Selección del material

La selección del pericardio fue muy cuidadosa debido a la variabilidad que presenta el material. Dentro de un mismo saco pericárdico se seleccionaron zonas de espesor homogéneo que, como se ha explicado anteriormente, es uno de los principales criterios de calidad normalmente utilizados [67]. Este criterio consiste en la exclusión de las probetas cuya diferencia absoluta entre su espesor medio y mínimo, supere el valor de la desviación estándar de la serie a la que pertenece la probeta. La membrana artificial es un material muy homogéneo tanto en

morfología como en espesor. Para extraer las probetas se seleccionaron diferentes zonas de láminas tratadas químicamente con glutaraldehído al mismo tiempo.

Probetas para ensayos de tracción uniaxial

En el caso del pericardio, las probetas se obtuvieron de un mismo saco pericárdico. Para las probetas control y sometidas a fatiga previa entre 100 y 4000 ciclos, se seleccionaron dos zonas de 40 mm x 40 mm (una de ellas para las probetas en dirección ápico-caudal y otra para las probetas en dirección circunferencial), de la misma región del saco, homogéneas en espesor y cercanas entre sí. Para las probetas sometidas a una fatiga previa de 24000 ciclos, se seleccionaron dos zonas contiguas entre sí de 20 mm x 10 mm cada una.

Figura 23. Áreas de probetas en pericardio

En las membranas artificiales se seleccionó una zona de 80 mm x 40 mm para las probetas ensayadas en dirección transversal y una zona de 40 mm x 40 mm para aquellas ensayadas en longitudinal. Ambas zonas pertenecientes a la misma lámina.

Figura 24. Áreas de probetas en membranas artificiales

Probetas para ensayos de rasgado

Para los ensayos de rasgado en pericardio se escogieron zonas de dos sacos pericárdicos siguiendo el criterio de mayor homogeneidad en cuanto a espesor. Las probetas se realizaron en la dirección ápico-caudal y circunferencial, definidas anteriormente.

En los ensayos de las membranas artificiales se seleccionaron varias láminas pertenecientes a un mismo tubo de material, fueron cortadas de manera consecutiva y tratadas al mismo tiempo.

Figura 25. Probetas para rasgado en pericardio. Éstas se distribuyeron por todo el pericardio en ambas direcciones

Probetas para ensayos de tracción uniaxial con fisura interior y de ensayos dinámomecánicos

Estos ensayos se realizaron únicamente en las membranas artificiales. Para ello se seleccionaron varias membranas pertenecientes a un mismo tubo de material que fueron cortadas de manera consecutiva y tratadas al mismo tiempo.

Figura 26. Probetas para ensayos de tracción uniaxial con fisura interior y de ensayos dinámomecánicos. Éstas se hicieron en varias membranas artificiales en ambas direcciones

Corte de las probetas

La geometría y dimensiones de las probetas dependen del tipo de ensayos y fueron iguales para los dos tipos de membranas.

Las probetas se cortaron mediante una cortadora láser Speedy 100R Trotec (Figura 27) que tiene una potencia de 12 W. Gracias a este método de corte, el contorno de la probeta es regular y la geometría exacta. La geometría y dimensiones de las probetas se dibujaron mediante el programa de diseño AutoCAD y se enviaron a la máquina cortadora. Otros métodos de corte mecánicos, como por ejemplo el bisturí, no permitirían realizar con exactitud probetas como las que se utilizan en esta tesis.

Figura 27. Máquina cortadora láser

Para cortar las probetas, las membranas de ambos materiales, se extrajeron del glicerol. Mediante gasas se retiró el exceso del mismo y se colocaron sobre una placa de aluminio para facilitar la disipación del calor generado por el láser.

Los parámetros de corte de la máquina se ajustaron con el fin de minimizar el daño producido en los bordes de las probetas (Tabla 9). De esta forma, el daño producido por el láser en los bordes fue menor de 100 μm . Este daño fue observado y cuantificado mediante microscopía óptica y electrónica (SEM). Los parámetros que se presentan en la Tabla 9 son nominales. En cada caso, en la zona adyacente al área seleccionada para el corte, se realizó una prueba de corte y en función del resultado, se ajustó el valor de los parámetros.

Material	Potencia	Velocidad	Nº pasadas
Pericardio	3 W	2 cm/s	5
Membranas artificiales	25 W	8 cm/s	40

Tabla 9. Parámetros de corte nominales de los materiales

En la Figura 28 se muestra el daño producido en una probeta de membrana artificial, observado mediante microscopía electrónica. La Figura 29 corresponde a una imagen tomada con el microscopio óptico en pericardio. En esta imagen se observa la parte más oscura en el extremo de la probeta que corresponde con el daño producido por el láser.

Figura 28. Daño producido en el corte de las membranas artificiales de colágeno (SEM-JEOL)

Figura 29. Daño producido en el corte de pericardio (microscopio óptico)

3.6.2.Descripción de los dispositivos de ensayo

Sistema electromecánico de ensayos mecánicos

Todo el dispositivo se encontraba situado en vertical sobre una máquina electromecánica de un solo eje Instron 5543A como se puede ver en la Figura 31.

La máquina electromecánica Instron 5543A posee un cabezal móvil al que va unido la célula de carga de 100 N con una precisión mejor que 5 mN. La barra a la que va unida la mordaza superior que sujeta la probeta está unida a la célula de carga. De la parte inferior de la máquina parte una barra fija a la que va unida la mordaza inferior (Figura 30 y Figura 31).

Las probetas se ensayaron sumergidas en suero fisiológico (NaCl 0.9%) cuya temperatura se mantuvo estable a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. El ensayo se realizó en el interior de una cubeta de polimetilmetacrilato (PMMA) transparente.

El suero salino se hizo circular a través de un baño termostático (Figura 32) que se encontraba por debajo del nivel de la máquina. El calentador de agua se programó a una temperatura de 39°C con un depósito en el que se introdujo el suero fisiológico. El suero se enfría unos 2°C desde que abandona el depósito hasta que llega a la cubeta de ensayo. Gracias a una pequeña bomba (Eheim compact 1000, rendimiento: 150 l/h a 1000 l/h; altura máxima de bombeo: 2 m) y a través de un tubo de pvc, el suero llegaba hasta la cubeta entrando en ella por la parte inferior de la misma. Mediante otro tubo, el suero retorna por gravedad al depósito donde es nuevamente calentado. De esta forma, el suero se mantuvo en la cubeta de ensayos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, temperatura medida con un termopar tipo K.

En el caso de los ensayos de tracción simple, la extensión y la carga fueron medidas directamente por el software de la máquina de ensayos mecánicos (precisión mejor que $1\mu\text{m}$ y de 0.01N). Por el contrario, en los ensayos de fatiga la extensión se midió mediante un sensor de desplazamiento (LVDT) externo a la máquina con un recorrido de $\pm 20\text{ mm}$ y una precisión mejor que $1\mu\text{m}$, que se encuentra en contacto directo con el cabezal de la máquina. Este sensor externo a la máquina electromecánica se utiliza puesto que el software de la máquina no es capaz de registrar correctamente el desplazamiento en los ensayos de fatiga.

Figura 30. Detalle de la sujeción de la probeta

Figura 31. Dispositivo de ensayo Instron 5543A

Figura 32. Baño termostático

Equipo de ensayos dinamomecánicos

El equipo para los ensayos dinamomecánicos (Nanobionix) es una máquina electromecánica de un solo eje que se adaptó, al igual que la Instron anteriormente descrita, para el ensayo de materiales biológicos. A tal efecto, cuenta con una cámara dentro de la cual se ensayan las probetas inmersas en suero salino a temperatura controlada.

La fuerza se mide por medio de una célula de carga de 0.5 N, con una precisión mejor que 50 nN. La barra a la que va unida la mordaza superior que sujeta la probeta, está unida a la célula de carga. Del bastidor móvil, en la parte inferior de la máquina, parte una barra fija a la que va unida la mordaza inferior. Las mordazas, con la probeta situada entre ellas, durante el ensayo están inmersas en suero salino gracias a una cubeta de polimetilmetacrilato (PMMA) transparente que permite la visualización del mismo.

En este caso no hay recirculación de suero debido a que afectaría la medida de la célula de carga puesto que ésta es muy sensible. La cubeta se llena por gravedad. Mediante una resistencia y un termopar, se reguló la temperatura en su interior.

Figura 33. Detalle de la sujeción de la probeta

Figura 34. Dispositivo de ensayo Nanobionix

3.6.3. Ensayos de tracción uniaxial

Probetas para ensayos de tracción uniaxial

Las probetas que estuvieron sometidas a un mismo número de ciclos de fatiga previa (100, 500, 1000, 2000 o 4000) no se ensayaron consecutivamente. Por el contrario, se distribuyeron de forma uniforme por el área seleccionada como se muestra en la Figura 35 y la Figura 36.

En pericardio, se cortaron 72 probetas rectangulares de 18 mm x 2 mm, 36 en dirección ápico-caudal y 36 en circunferencial (Figura 35 y Figura 38). En cada dirección 6 fueron probetas control y el resto se ensayaron a fatiga entre 100 y 4000 ciclos (Tabla 10). Además de las 72 probetas, se cortaron 3 probetas en cada dirección, en total 6, para los ensayos de fatiga a 24000 ciclos (Figura 39 y Tabla 10).

Figura 35. Esquema de corte de probetas en pericardio para las dos direcciones de ensayo (ápico-caudal y circunferencial)

(C: control; 1: 100 ciclos; 2: 500 ciclos; 3: 1000 ciclos; 4: 2000 ciclos, 5: 4000 ciclos)

En membranas artificiales, se cortaron en total 90 probetas rectangulares de 18 mm x 2 mm. 54 de ellas en dirección transversal (Figura 36) y 36 en longitudinal (Figura 37). En dirección transversal, 9 fueron probetas control y en dirección longitudinal, 6. El resto se ensayaron a fatiga entre 100 y 4000 ciclos (Tabla 10).

Figura 36. Esquema de corte de probetas de membranas artificiales en dirección transversal (C: control; 1: 100 ciclos; 2: 500 ciclos; 3: 1000 ciclos; 4: 2000 ciclos, 5: 4000 ciclos)

Figura 37. Esquema de corte de probetas de membranas artificiales en dirección longitudinal (C: control; 1: 100 ciclos; 2: 500 ciclos; 3: 1000 ciclos; 4: 2000 ciclos, 5: 4000 ciclos)

Nº ciclos	Pericardio		Membranas artificiales	
	Dirección ensayo	Nº de probetas	Dirección ensayo	Nº de probetas
Control	Ápico-caudal	6	Transversal	9
100		6		9
500		6		9
1000		6		9
2000		6		9
4000		6		9
24000		3		-
Control	Circunferencial	6	Longitudinal	6
100		6		6
500		6		6
1000		6		6
2000		6		6
4000		6		6
24000		3		-

Tabla 10. Campaña de ensayos de tracción y fatiga en membranas artificiales y pericardio

Figura 38. Corte de 36 probetas de pericardio (izquierda) y de membranas artificiales (derecha)

Figura 39. Corte de las probetas de pericardio para ensayar a 24000 ciclos

Sujeción de las probetas

Las probetas, una vez hidratadas y medido su espesor, se montaron en el bastidor de acero inoxidable que se muestra en la Figura 40.

Figura 40. Montaje de una probeta de membranas artificiales en el bastidor

La mordaza tiene una superficie rugosa en su interior para favorecer la sujeción de las probetas tal y como se puede ver en la Figura 41. Sin embargo, en probetas de dimensiones reducidas esta superficie y el mismo canto de la mordaza, pueden dañar la probeta. Para evitar este daño, se pegaron mediante cianocrilato en la parte interior de cada mordaza unos fragmentos de polipropileno. Después se fijaron mecánicamente con los tornillos de la mordaza.

Figura 41. Superficie interior de las mordazas

Ensayos previos de fatiga

La fatiga previa a los ensayos de tracción (Figura 42 y Figura 43) consistió en un número determinado de ciclos de carga y descarga: desde 100 ciclos hasta 24000, dependiendo de la probeta. La tensión osciló entre un mínimo de 0.2 MPa y un máximo de 3 MPa. Con estos valores no se trata de reproducir la carga real que soportan las bioprótesis, simplemente se intenta favorecer la reorientación de las fibras de colágeno en cada dirección de carga. La frecuencia de ensayo fue de $1 \text{ Hz} \pm 0.1 \text{ Hz}$ (Figura 42) para lo que la velocidad de desplazamiento del bastidor de la máquina fue de 2.5 mm/s. Si después del bloque de ciclos la probeta no había roto, se realizaba un ensayo de tracción simple hasta su rotura.

Figura 42. Esquema de la sollicitación en los ensayos de fatiga (Tensión: 0.2 MPa a 3 MPa)

Figura 43. Ensayo de fatiga de una probeta de pericardio

Ensayos de tracción hasta rotura

Las probetas se ensayaron aplicando en las mordazas una velocidad de deformación constante de 0.03 mm/s. Se trata de un valor de velocidad lo suficientemente baja como para considerarse condiciones de ensayo cuasiestáticas [100][102].

En materiales flexibles, como es este caso, se puede considerar que el desplazamiento del cabezal es igual al aumento de longitud de la probeta ya que el resto de los elementos son mucho más rígidos que la probeta.

En la Figura 44 se puede observar el final de un ensayo de tracción de una probeta de pericardio.

Figura 44. Rotura de una probeta de pericardio

Después de su ensayo, cada probeta fue almacenada individualmente en glicerol y fue debidamente identificada para análisis posteriores.

3.6.4. Ensayos de rasgado

Probetas para ensayos de rasgado

El ensayo de rasgado se divide en dos partes. Para la primera parte del ensayo, que corresponde a la fatiga previa, se realizaron probetas rectangulares de 20 mm de ancho y 50 mm de largo en ambas direcciones (circunferencial yápico-caudal) (Figura 45.a). Se midió el espesor de cada probeta en 6 puntos uniformemente distribuidos por toda la probeta

Las probetas se cortaron en las dos direcciones del material y cada una se fatigó (1000 ciclos) en la misma dirección de corte. De cada probeta fatigada se realizaron dos de rasgado, una en cada dirección (Figura 45.b). En la Tabla 11 se recogen las direcciones de las probetas.

La forma de las probetas para rasgado es tal y como marca la norma ASTM D1922-03 [103]. Las dimensiones de las probetas fueron proporcionales a las dimensiones marcadas en dicha norma [103][104]: radio de rasgado: 12 mm; longitud de entalla: 8 mm; anchura de la probeta: 20 mm (Figura 45.c).

Figura 45. Morfología y dimensiones de las probetas ensayadas

Material	Dirección de corte y fatiga	Dirección de rasgado
Pericardio	Ápico – caudal	Ápico – caudal
	Ápico – caudal	Circunferencial
	Circunferencial	Ápico – caudal
	Circunferencial	Circunferencial
Membranas artificiales	Transversal	Transversal
	Transversal	Longitudinal
	Longitudinal	Transversal
	Longitudinal	Longitudinal

Tabla 11. Direcciones en las probetas de rasgado

En pericardio, se prepararon un total de 77 probetas que se ensayaron según se indica en la Tabla 12:

Rasgado sin fatiga previa		Rasgado con fatiga previa			
Dirección rasgado	Nº probetas	Dirección fatiga	Nº probetas	Dirección rasgado	Nº probetas
Ápico-caudal	13	Ápico-caudal	25	Ápico-caudal	13
				Circunferencial	12
Circunferencial	13	Circunferencial	26	Ápico-caudal	13
				Circunferencial	13

Tabla 12. Campaña experimental de ensayos de rasgados en pericardio

En membranas artificiales se prepararon un total de 91 probetas (Tabla 13).

Velocidad (mm/s)	Rasgado sin fatiga previa		Rasgado con fatiga previa			
	Dirección rasgado	Nº probetas	Dirección fatiga	Nº probetas	Dirección rasgado	Nº probetas
0.4	Transversal	14	Transversal	24	Transversal	12
					Longitudinal	12
	Longitudinal	19	Longitudinal	24	Transversal	12
					Longitudinal	12
0.005	Transversal	3				
	Longitudinal	3				
25	Transversal	3				
	Longitudinal	1				

Tabla 13. Campaña experimental de ensayos de rasgados en membranas artificiales

Ensayos previos de fatiga

Se llevó a cabo la fatiga a 1000 ciclos de carga y descarga (Figura 46), a una frecuencia de $1 \text{ Hz} \pm 0.1 \text{ Hz}$ y a una tensión máxima de 3 MPa y mínima de 0.2 MPa. La velocidad de desplazamiento del bastidor de la máquina fue de 15 mm/s.

Figura 46. Ensayos de fatiga previa

Ensayos de rasgado

Cada segmento libre de la probeta se fijó a una de las mordazas (Figura 47). La longitud de probeta que queda dentro de las mordazas es de 5 mm. En membranas artificiales, estos ensayos se llevaron a cabo con tres velocidades de desplazamiento del cabezal de la máquina diferentes: 0.005 mm/s, 0.4 mm/s y 25 mm/s con objeto de observar el comportamiento de las probetas a distintas velocidades. Al comprobar que el comportamiento era repetitivo y similar, se realizó el resto de ensayos de membranas artificiales y todos los ensayos de pericardio a 0.4 mm/s, velocidad lo suficientemente baja como para que el ensayo se realice en un tiempo razonable. A medida que el ensayo es ejecutado, la mordaza superior se aleja de la inferior rasgando el material por la entalla. Los valores de fuerza y de desplazamiento quedaron registrados para su posterior análisis.

Figura 47. Vista lateral y frontal de la colocación de una probeta de membranas artificiales para rasgado en el bastidor

Figura 48. Esquema del ensayo de rasgado

3.6.5. Ensayos de tracción con fisura interior

Estos ensayos solo se realizaron en membranas artificiales. El objetivo es contrastar los ensayos de rasgado y calcular sus parámetros de rotura mediante otro ensayo alternativo.

Probetas para ensayos de tracción uniaxial con fisura interior:

Se cortaron probetas de 50 mm x 16 mm con una fisura centrada perpendicular al lado de mayor longitud del rectángulo tal y como se puede ver indicada en la Figura 49. La longitud libre entre mordazas es de 40 mm. Se realizaron probetas con tres longitudes de fisura: 1 mm, 2 mm y 4 mm.

Figura 49. Probeta de membranas artificiales con fisura interior
(Anchura de la probeta: 16 mm y fisura de 2 mm)

Longitud fisura	Dirección ensayo	Nº probetas
1 mm	Transversal	7
	Longitudinal	7
2 mm	Transversal	7
	Longitudinal	4
4 mm	Transversal	4
	Longitudinal	8

Tabla 14. Campaña experimental ensayos de tracción con fisura interior en membranas artificiales

Ensayos de tracción uniaxial con fisura interior

Las probetas, tras su rehidratación y medida del espesor, se fijaron mecánicamente mediante tornillos al bastidor de acero inoxidable.

Las probetas, con sus diferentes longitudes de fisura, se sometieron a un ensayo de tracción hasta rotura a una velocidad constante de 0.4 mm/s. Se registraron los valores de fuerza y desplazamiento de cada probeta.

Después de su ensayo, cada probeta fue almacenada individualmente en glicerol y fue debidamente identificada para posibles análisis posteriores.

3.6.6. Ensayos dinamomecánicos

Probetas para ensayos dinamomecánicos

Con el fin de caracterizar el comportamiento viscoelástico del material se realizaron ensayos dinamomecánicos, que consisten en superponer una carga oscilatoria armónica de pequeña amplitud a un ensayo de tracción uniaxial.

Se realizaron tres probetas en cada dirección del material de 30 mm de longitud por 1 mm de ancho (Tabla 15). Como en los anteriores ensayos, tras cortar las probetas con láser se hidrataron en suero fisiológico durante al menos una hora. Posteriormente se midió su espesor mediante el calibre descrito en el apartado 3.5, y a continuación se midió la anchura real de cada probeta mediante un perfilómetro de 1 μm de resolución (Nikon Profile Projector, V12BDC).

Dirección ensayo	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Espesor (μm)
Transversal	30	$0.925 \pm 0.001(3)$	$260 \pm 0.015(3)$
Longitudinal	30	$0.952 \pm 0.004(3)$	$255 \pm 0.007(3)$

Tabla 15. Dimensiones de las probetas para ensayos dinamomecánicos

En cada probeta se realizaron tres ciclos de carga y descarga en tracción uniaxial con control en desplazamiento a una velocidad de 0.03 mm/s, y hasta una carga máxima de 0.5 N que corresponde nominalmente a 1.5 MPa (el valor exacto depende de las dimensiones – espesor y anchura – de cada probeta).

El equipo empleado, Nanobionix (MTS-Nano) (resolución de $\pm 1\mu\text{N}$ en carga y $\pm 1\mu\text{m}$ en desplazamientos) permite superponer una carga oscilatoria armónica de pequeña amplitud.

Mediante la relación entre las amplitudes de las señales de carga y desplazamiento se obtiene el módulo de almacenamiento (E') que se corresponde con la parte elástica del

comportamiento de la probeta, y a partir del desfase entre ambas señales sinusoidales se obtiene el módulo de pérdidas (E'') que caracteriza la parte viscosa (Figura 50).

Figura 50. Representación esquemática del módulo de pérdidas (E'') y módulo de almacenamiento (E')

Se realizaron ensayos de prueba a diferentes frecuencias de oscilación, entre 20 y 90 Hz, comprobando que los resultados obtenidos no variaban significativamente. Por lo tanto, se fijó la frecuencia de oscilación en 20 Hz, garantizando así la estabilidad del ensayo al ser el valor por defecto que aplica el equipo de ensayo. Para frecuencias más bajas se acoplan las señales de la carga armónica y del ensayo de tracción simple. La amplitud de la carga oscilatoria fue de 4.5 mN.

Los cálculos para la obtención del módulo complejo son realizados por el software de manejo del equipo (Testworks 4, MTS®). Después de su ensayo, cada probeta fue almacenada individualmente en glicerol y debidamente identificada.

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. Introducción

En el capítulo 3 ha quedado reflejada la descripción de los materiales empleados en la tesis así como los análisis y los ensayos que se han realizado y los equipos empleados para ello. En el presente capítulo, se realiza un análisis detallado de los resultados obtenidos para pericardio y membranas artificiales en sus dos direcciones de ensayo. Se describen y discuten los resultados de los análisis bioquímicos, del hinchamiento y de los ensayos mecánicos.

4.2. Análisis bioquímicos

4.2.1. Test de ninhidrina

Se realizó el test de ninhidrina en muestras de membranas artificiales de colágeno y pericardio, ambos materiales tratados con glutaraldehído al 0.625% y sin tratar.

En la Tabla 16, se presentan los valores del test de ninhidrina para pericardio y membranas artificiales. Se muestra, por una parte, la concentración de grupos $-NH_2$ (expresados por masa total de tejido seco) que se encuentran libres y que, por tanto, no participan en el entrecruzamiento y, por otra, el porcentaje de entrecruzamiento de las muestras analizadas. Para el cálculo de este entrecruzamiento, se ha tomado como valor de referencia la concentración de grupos $-NH_2$ de material no entrecruzado. Los resultados se representan como: *Valor $\pm$ Error estándar (n° de muestras)*.

	$[-NH_2](\text{mmol/g}_{\text{seco}})$	% entrecruzamiento	$[-NH_2](\text{mmol/g}_{\text{seco}})$ de referencia
Pericardio	32.30 ± 2.20 (5)	77.00 ± 1.56 (5)	140.20 ± 24.2 (4)
Membranas artificiales	19.85 ± 0.27 (3)	86.52 ± 0.18 (3)	147.27 ± 5.71 (3)

Tabla 16. Valores del test de ninhidrina para pericardio y membranas artificiales

4.2.2. Análisis de aminoácidos

Con este tipo de análisis se determina, por una parte, el contenido en colágeno a través de la prolina (Pro) y la hidroxiprolina (ProOH) y, por otra, el grado de entrecruzamiento a través de la lisina (Lys) e hidroxilisina (LysOH). A partir de los datos proporcionados por el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), que se encuentran en el Anejo C, se realizan los

cálculos descritos en el apartado 3.4.2. para determinar el contenido en colágeno de las muestras y su grado de entrecruzamiento.

Se han analizado 6 muestras sin entrecruzar y otras 6 entrecruzadas tanto en pericardio como en membranas artificiales. El valor de referencia que se toma para calcular el entrecruzamiento de las muestras tratadas, es de 0.34 nmol/ μ g para pericardio y de 0.3 nmol/ μ g para membranas artificiales. Estos valores corresponden con la concentración de grupos de hidroxilisina y lisina libres que se encuentran en las membranas sin entrecruzar.

Para ambos casos (tejido entrecruzado y sin entrecruzar), se ha calculado en primer lugar, la masa de proteína presente en el tejido (μ g proteína/ μ g tejido). Después, siguiendo el método descrito en el apartado 3.4.2, el contenido en colágeno de la muestra. Finalmente, se ha calculado la cantidad de lisina e hidroxilisina presente en la muestra para, hallar el porcentaje de entrecruzamiento de la muestra.

Pericardio:

	Sin entrecruzar	Entrecruzado
μg proteína/ μg tejido	0.90 $\pm$ 0.03 (6)	0.68 $\pm$ 0.03 (6)
% colágeno	77.5 $\pm$ 2.25 (6)	63.0 $\pm$ 2.87 (6)
[LysOH+Lys] (nmol/μg)	0.34 $\pm$ 0.01 (6)	0.08 $\pm$ 0.01 (6)
% Entrecruzamiento	-	75.8 $\pm$ 1.75 (6)

Tabla 17. Resultados del análisis de aminoácidos para pericardio

Membranas artificiales:

	Sin entrecruzar	Entrecruzado
μg proteína/ μg tejido	0.76 $\pm$ 0.02 (6)	0.73 $\pm$ 0.01 (6)
% colágeno	69.08 $\pm$ 2.76 (6)	71.06 $\pm$ 2.59 (6)
[LysOH+Lys] (nmol/μg)	0.30 $\pm$ 0.01 (6)	0.07 $\pm$ 0.01 (6)
% Entrecruzamiento	-	76.08 $\pm$ 1.57 (6)

Tabla 18. Resultados del análisis de aminoácidos para membranas artificiales

Comparación del contenido en colágeno y entrecruzamiento entre los dos materiales:

- Contenido de colágeno:

El contenido de colágeno es algo menor en membranas artificiales. Éstas se fabrican a partir de piel de bovino, y otros componentes tal y como se ha detallado en el capítulo 3. Las membranas naturales se obtienen 100% de pericardio bovino, con alto contenido en colágeno.

- Entrecruzamiento:

El porcentaje de entrecruzamiento de pericardio tratado con glutaraldehído al 0.625% (Tabla 19) es muy similar en los dos materiales y está en torno al 76%. En membranas artificiales, hay una gran diferencia, aproximadamente de un 10%, entre el valor calculado mediante el test de ninhidrina y el calculado mediante el análisis de aminoácidos. Probablemente estas diferencias se deban a interferencias de otros componentes de la membrana en el análisis. Además, también es aproximadamente un 10% mayor que en pericardio, independientemente del método utilizado para su determinación.

	Pericardio	Membranas artificiales
Test de ninhidrina	77 ± 1.56 (5) %	86.52 ± 0.18 (3) %
Análisis de aminoácidos	75.8 ± 1.75 (6)%	76.08 ± 1.57 (6) %

Tabla 19. Resumen del porcentaje de entrecruzamiento

Los valores de referencia que se utilizan para calcular el porcentaje de entrecruzamiento son muy similares en ambos materiales. En el análisis de aminoácidos, [LysOH+Lys] toma un valor de 0.34 nmol/ μ g para pericardio y 0.3 nmol/ μ g para membranas artificiales. En el test de ninhidrina, la concentración de grupos amino en pericardio es de $140.2 \pm 24.2(4)$ mmol/ $_{\text{gseco}}$ y en membranas artificiales de $147.27 \pm 5.71 (3)$ mmol/ $_{\text{gseco}}$.

En general, los valores obtenidos son muy similares. Estos resultados son lógicos ya que los materiales son de base colágeno y se han tratado ambos siguiendo el mismo procedimiento con glutaraldehído al 0.625%.

4.3. Hinchamiento

Se han realizado medidas del espesor en las zonas más homogéneas de las membranas de pericardio en donde se obtuvieron las probetas y en toda una membrana artificial. A continuación, se muestran los resultados con ayuda de un mapa de colores para facilitar la visualización de los espesores. Todas las medidas están expresadas en μ m.

Pericardio:

Figura 51. Mapa del espesor de una membrana pericárdica en glicerol

Membranas artificiales:

Figura 54. Mapa del espesor de una membrana artificial en suero

El resultado de la diferencia entre el espesor en glicerol y el espesor en suero es $e_{\text{glicerol}} - e_{\text{suero}} = 65.7 \mu\text{m} \pm 0.15$ (288).

En la Figura 55, se muestra la reducción en el espesor con referencia al medido en glicerol. Al rehidratar ambos materiales en suero antes de su ensayo, los espesores disminuyen.

Figura 55. Comparación de los valores de la diferencia entre suero y glicerol entre su espesor para membranas artificiales y pericardio

Se observa la diferencia entre ambos materiales. En membranas artificiales la diferencia entre el espesor en suero y el glicerol es mayor que en pericardio, es decir, experimentan mayores cambios de volumen al ser deshidratados y rehidratados.

4.4. Ensayos mecánicos

4.4.1. Ensayos de tracción uniaxial

En primer lugar, se va a evaluar el efecto de la fatiga uniaxial sobre la deformación y rigidez del pericardio y las membranas artificiales en las direcciones de estudio. Los resultados se representan como: *Valor $\pm$ Error estándar (n° de muestras)*. Las curvas de los ensayos de fatiga de pericardio y membranas artificiales se encuentran recogidas en el Anejo D.

4.4.1.1. Análisis de la fatiga en pericardio

Se ensayaron a fatiga 33 probetas en cada dirección. Todas las probetas sobrevivieron a los ciclos de fatiga establecidos.

El espesor medio de las probetas ensayadas fue de 0.52 ± 0.007 (78) mm.

La tensión máxima de fatiga fue de 3 MPa y la mínima de 0.2 MPa. En la Tabla 20, se muestran las tensiones máximas de fatiga y su relación respecto de la tensión de rotura media en probetas sin fatigar (probetas control). En dirección ápico-caudal, se ha fatigado la probeta al 48% de la tensión de rotura y en dirección circunferencial, a un 12% de su resistencia.

	Dirección ápico-caudal	Dirección circunferencial
Tensión ingenieril máxima fatiga (MPa)	3.43 ± 0.02 (33)	3.43 ± 0.050 (33)
Tensión rotura ingenieril (MPa) (Control)	8.01 ± 0.48 (33)	30.27 ± 0.810 (33)
Tensión máxima fatiga/ Tensión de rotura	0.48 ± 0.03 (33)	0.12 ± 0.004 (33)

Tabla 20. Tensiones de fatiga en pericardio en las dos direcciones de ensayo

Energía disipada

Se ha calculado la energía disipada por el material durante los ciclos de fatiga, que es el área encerrada bajo la curva tensión – alargamiento en un proceso de carga descarga. Dicho parámetro ha sido propuesto como método de selección del pericardio, puesto que su valor está relacionado con la durabilidad del material [80][81].

En la Tabla 21, se muestran los valores promedio de la energía disipada en las probetas de pericardio en el último ciclo de cada bloque (1, 100, 500, 1000, 2000, 4000 y 24000). En la Figura 56 estos valores se representan gráficamente.

Nº ciclos	Energía disipada (J/m ³) dirección ápico-caudal	Energía disipada (J/m ³) dirección circunferencial
1	47000 ± 2700 (30)	95000 ± 5700 (30)
100	9000 ± 400 (33)	17000 ± 1500 (26)
500	8000 ± 500 (27)	13000 ± 1000 (26)
1000	8000 ± 400 (19)	12000 ± 1200 (20)
2000	7000 ± 500 (15)	11000 ± 1500 (14)
4000	7000 ± 800 (9)	11000 ± 1600 (9)
24000	5000 ± 100 (3)	6000 ± 100 (3)

Tabla 21. Energía disipada durante la fatiga en pericardio en las dos direcciones de ensayo

Figura 56. Energía disipada en función del número de ciclos de pericardio en las dos direcciones de ensayo

Se observa que la energía disipada es mayor en dirección circunferencial que en dirección ápico-caudal. La energía disipada es muy elevada en los primeros ciclos y tiende a estabilizarse a partir del ciclo 100 en un valor similar para las dos direcciones de ensayo. En el caso del primer ciclo, la energía disipada en dirección circunferencial es aproximadamente el doble que en ápico-caudal.

Rigidez

Se ha medido la evolución de la rigidez de la probeta según se desarrolla el proceso de fatiga calculando la pendiente de la última parte de la curva tensión – alargamiento al final de cada bloque de fatiga. La rigidez mide la capacidad del material para soportar esfuerzos sin presentar grandes deformaciones y proporciona información sobre la organización interna del material.

Su valor se ha calculado en las dos direcciones de ensayo. En la Tabla 22, se muestran los valores y en la Figura 57, se representan gráficamente.

Nº ciclos	Rigidez (MPa) dirección ápico-caudal	Rigidez (MPa) dirección circunferencial
1	29.38 ± 1.057 (30)	17.315 ± 0.73779 (33)
100	29.67 ± 1.001 (30)	24.73 ± 1.10135 (33)
500	30.72 ± 1.139 (24)	26.32 ± 1.32831 (27)
1000	31.12 ± 1.233 (19)	26.75 ± 1.41681 (21)
2000	31.87 ± 1.577 (14)	27.40 ± 1.71745 (15)
4000	31.36 ± 2.001 (8)	27.59 ± 2.04236 (9)
24000	32.87 ± 0.657 (3)	32.90 ± 0.66583 (3)

Tabla 22. Rigidez del pericardio en las dos direcciones de ensayo

Figura 57. Rigidez del pericardio a lo largo de los ciclos en las dos direcciones de ensayo

Se observa, que el pericardio es más rígido en dirección ápico-caudal que en dirección circunferencial y que –al igual que en la energía disipada– se produce un salto significativo del primer ciclo a los siguientes. En ambas direcciones, el pericardio tiende a rigidizarse con el paso de los ciclos, tendiendo a estabilizar su valor tras varios centenares de ciclos.

4.4.1.2. Análisis de la fatiga en membranas artificiales

Al contrario que en pericardio, durante la fatiga de las membranas artificiales un número considerable de probetas se rompieron en los primeros ciclos.

En la Tabla 23 y en la Tabla 24 se resumen las roturas producidas.

De las 45 probetas ensayadas en dirección transversal, 4 rompieron con menos de 10 ciclos y otras 2 rompieron más allá de los 10 ciclos.

Ciclos	No rotas	Rotas después de los 10 primeros ciclos	Rotas antes de los 10 primeros ciclos	Total
100	9	-	-	9
500	8	1 (ciclo 32)	-	9
1000	8	-	1	9
2000	6	1 (ciclos 352)	2	9
4000	8	-	1	9
Total	39	2	4	45

Tabla 23. Resumen de las roturas por fatiga de membranas artificiales en dirección transversal

En dirección longitudinal, se prepararon en total 29 probetas, 7 de ellas rompieron antes de alcanzar los 10 ciclos de fatiga y 9 más allá de este número de ciclos. Cabe destacar que la proporción de probetas rotas durante el ensayo en esta dirección es muy grande.

Ciclos	No rotas	Rotas después de los 10 primeros ciclos	Rotas antes de los 10 primeros ciclos	Total
100	3	-	3	6
500	3	2 (ciclos 91 y 72)	-	5
1000	2	2 (ciclos 25 y 31)	2	6
2000	1	3 (ciclo 131)	2	6
4000	4	2 (ciclos 585 y 2470)	-	6
Total	13	9	7	29

Tabla 24. Resumen de las roturas por fatiga de membranas artificiales en dirección longitudinal

El espesor medio de las probetas ensayadas, incluyendo las probetas control no sometidas a fatiga que se analizarán en el siguiente apartado, fue de 0.27 ± 0.0014 (90) mm.

La tensión máxima de fatiga fue de 3 MPa y la mínima de 0.2 MPa. En la Tabla 25, se muestran las tensiones máximas de fatiga y su relación respecto de la tensión de rotura medida en probetas sin fatigar (control). En dirección transversal, las probetas se ensayan a aproximadamente un 40% de su tensión de rotura y en dirección longitudinal a un 60%. Estos valores, netamente superiores a los utilizados con las membranas de pericardio justifican el número de roturas producidas durante el proceso de fatiga.

	Dirección transversal	Dirección longitudinal
Tensión ingenieril máxima de fatiga (MPa)	2.97 ± 0.02 (43)	3.06 ± 0.02 (13)
Tensión rotura ingenieril (MPa) (control)	7.92 ± 0.29 (48)	4.90 ± 0.37 (19)
Tensión máxima fatiga/ Tensión rotura	0.38 ± 0.01 (39)	0.62 ± 0.06 (13)

Tabla 25. Tensiones de rotura en membranas artificiales en ambas direcciones

Energía disipada

Como se ha explicado en el apartado 4.4.1.1, se ha calculado el área contenida bajo la curva tensión – alargamiento de cada ciclo de fatiga para evaluar la energía disipada por el material durante el ensayo.

La Tabla 26 y la Figura 58 muestran los valores de la energía disipada en el primer ciclo de fatiga en probetas no rotas, en probetas rotas antes del ciclo 10 y en probetas rotas más allá del ciclo 10.

	Energía disipada (J/m ³) dirección transversal	Energía disipada (J/m ³) dirección longitudinal
No rotas	28440.3 ± 4517.3 (39)	18052.38 ± 1779.9 (13)
Rotas > ciclo 10	53490.5 ± 8614.5 (2)	35510.4 ± 10784.9 (9)
Rotas < ciclo 10	82667.1 ± 17142 (2)	61998.4 ± 16092.8 (5)

Tabla 26. Energía disipada en el primer ciclo de fatiga en membranas artificiales

Figura 58. Energía disipada en el primer ciclo de fatiga en membranas artificiales

Como se puede observar, las probetas que rompen antes disipan mayor energía en el primer ciclo, lo que reafirma la utilidad de este parámetro como indicador de durabilidad del material [80][81].

En las probetas no rotas existe diferencia significativa en la energía disipada en el primer ciclo en las dos direcciones de ensayo, siendo la dirección transversal la que presenta mayores valores. En las probetas rotas durante el ciclado se constata una tendencia similar, si bien, las diferencias no son significativas.

En la Tabla 27 y en la Figura 59, se representa la energía disipada en el último ciclo de cada bloque de fatiga para las probetas que han sobrevivido al proceso de fatiga.

De los resultados se concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la energía disipada hasta los 500 ciclos de fatiga en probetas que han roto antes de finalizar la fatiga y aquellas que han sobrevivido al ciclado. Además, entre ambas direcciones tampoco existe diferencia.

En la Tabla 27 y en la Figura 59, se representa la energía disipada en ambas direcciones desde el primer ciclo hasta el final. Los valores que se han tomado para realizar estos cálculos son los de las probetas que han sobrevivido.

Nº ciclos	Energía disipada (J/m ³) Dirección transversal	Energía disipada (J/m ³) Dirección longitudinal
1	28440 ± 4517.3 (39)	18052 ± 1779.8 (13)
100	4929.7 ± 204.01 (37)	2946.1 ± 204.00 (13)
500	4510.7 ± 234.14 (28)	2990.0 ± 282.23 (10)
1000	3937.5 ± 435.45 (8)	2814.3 ± 283.20 (7)
2000	3816.7 ± 391.93 (6)	2480.0 ± 305.61 (5)
4000	3612.5 ± 187.50 (8)	2250.0 ± 347.61 (4)

Tabla 27. Energía disipada durante la fatiga en las dos direcciones de ensayo en membranas artificiales

Figura 59. Energía disipada durante la fatiga de las membranas artificiales en las dos direcciones de ensayo

Los valores de energía disipada van disminuyendo a medida que transcurren los ciclos hasta estabilizarse a partir de los primeros centenares de ciclos. La energía disipada es mayor en dirección transversal que en longitudinal.

Rigidez

Se ha realizado el cálculo de la rigidez del último ciclo de cada bloque de fatiga en ambas direcciones de ensayo. Al igual que con el pericardio, la rigidez se ha evaluado como la pendiente de la última parte de la curva tensión – alargamiento. Los valores se presentan en la Tabla 28 y en la Figura 60. Los valores que se han tomado para realizar estos cálculos son los de las probetas que han sobrevivido a cada bloque de ciclos.

Nº ciclos	Rigidez (MPa) dirección transversal	Rigidez (MPa) dirección longitudinal
1	27.65 ± 0.55 (39)	41.88 ± 0.99 (13)
100	31.69 ± 0.50 (36)	48.56 ± 1.72 (12)
500	32.03 ± 0.59 (27)	48.59 ± 2.25 (9)
1000	32.59 ± 1.11 (7)	47.85 ± 3.00 (6)
2000	32.27 ± 1.16 (6)	49.00 ± 4.62 (4)
4000	33.05 ± 1.05 (8)	49.23 ± 4.67 (4)

Tabla 28. Rigidez de las membranas artificiales en las dos direcciones de ensayo

Figura 60. Rigidez en membranas artificiales en las dos direcciones de ensayo

Los datos muestran que la rigidez en ambas direcciones aumenta con el proceso de fatiga y tiende a estabilizarse tras un centenar de ciclos. La rigidez en dirección longitudinal es mayor que en dirección transversal.

4.4.1.3. Resumen y comparación de ambos materiales en fatiga

En primer lugar, cabe destacar, la gran proporción de probetas rotas durante la fatiga de las membranas artificiales. En dirección longitudinal, el 55% de las probetas se rompieron al fatigarlas al 62% de la tensión del rotura, frente al 13% que se rompieron en dirección transversal cuando se sometieron a tensiones máximas del 38%. En muestras de pericardio no se rompió ninguna probeta en ninguna de las direcciones, pese a fatigarse al 12% (dirección circunferencial) o al 48% (dirección ápico-caudal) de la tensión de rotura. Estos resultados muestran una mayor sensibilidad a la fatiga de las membranas artificiales frente al pericardio, probablemente debida a la menor longitud de sus fibras.

La energía disipada en fatiga del pericardio es superior a la de las membranas artificiales, tanto en el primer ciclo, como al final del proceso de fatiga. En ambos materiales se disipa más energía en las direcciones de mayor resistencia (circunferencial para el pericardio y transversal para las membranas artificiales).

Finalmente, la rigidez de membranas artificiales y pericardio es similar, si bien en las primeras es algo mayor. En ambos casos tiende a incrementarse ligeramente con los ciclos de fatiga situándose en torno a 30 MPa para ambas direcciones del pericardio y entre 30 y 50 MPa para las membranas artificiales.

4.4.1.4. Análisis de la rotura por tracción en pericardio

En este análisis se comparan las probetas control sometidas a tracción hasta rotura y las probetas que han sobrevivido a los ciclos de fatiga y que posteriormente se sometieron a un ensayo de tracción. Sólo se consideran las probetas cuya rotura se produce en una zona alejada de las mordazas para así poder asegurar que no influye en la rotura la sujeción de la probeta.

Las curvas de rotura por tracción se muestran en el Anejo E.

En la Tabla 29 y la Tabla 30, se muestra un resumen de los tres parámetros evaluados para las dos direcciones de ensayo. En la Figura 61, Figura 62 y Figura 63 se muestran dichos resultados en diagramas de barras comparando ambas direcciones.

Nº ciclos	Tensión rotura (MPa)	Alargamiento rotura	Rigidez (MPa)
Control	12.37 ± 1.315 (6)	1.48 ± 0.028 (6)	71.32 ± 6.456 (6)
100	12.01 ± 2.220 (6)	1.43 ± 0.028 (6)	75.30 ± 9.289 (6)
500	10.39 ± 1.932 (6)	1.36 ± 0.036 (6)	71.62 ± 8.585 (6)
1000	12.08 ± 2.125 (6)	1.37 ± 0.039 (6)	71.74 ± 5.824 (6)
2000	9.51 ± 0.744 (6)	1.33 ± 0.029 (6)	77.93 ± 3.685 (6)
4000	9.76 ± 1.878 (6)	1.32 ± 0.035 (6)	80.27 ± 7.104 (6)
24000	10.28 ± 0.663 (3)	1.28 ± 0.019 (3)	75.18 ± 1.756 (3)

Tabla 29. Tensión de rotura, alargamiento de rotura y rigidez en dirección ápico-caudal de pericardio

Nº ciclos	Tensión rotura (MPa)	Alargamiento rotura	Rigidez (MPa)
Control	30.70 ± 1.277 (6)	1.54 ± 0.028 (6)	192.11 ± 14.200 (6)
100	32.47 ± 1.799 (6)	1.50 ± 0.030 (6)	201.89 ± 13.152(6)
500	30.98 ± 1.683 (6)	1.46 ± 0.026 (6)	197.08 ± 9.581(6)
1000	30.98 ± 2.580 (6)	1.45 ± 0.014 (6)	201.71 ± 16.452 (6)
2000	29.59 ± 2.353 (6)	1.43 ± 0.027 (6)	199.55 ± 14.290 (6)
4000	27.96 ± 1.541 (6)	1.40 ± 0.023 (6)	196.63 ± 12.705 (6)
24000	29.33 ± 1.193 (3)	1.34 ± 0.020 (3)	207.21 ± 1.390(3)

Tabla 30. Tensión de rotura, alargamiento de rotura y rigidez en dirección circunferencial de pericardio.

Figura 61. Tensión de rotura en pericardio en las dos direcciones de ensayo

En las dos direcciones anatómicas, la tensión de rotura es más o menos constante independientemente del número de ciclos a los que se someta la probeta. Para el uso que se le pretende dar a estos materiales es conveniente que así sea puesto que van a estar sometidos a un gran número de ciclos al integrarse en las válvulas. Sin embargo, la tensión de rotura presenta gran diferencia entre las dos direcciones. En dirección ápico-caudal, toma unos valores en torno a 10 MPa frente a los 30 MPa para dirección circunferencial.

Figura 62. Alargamiento de rotura en pericardio en las dos direcciones de ensayo

La Figura 62 muestra que el alargamiento de rotura disminuye con el número de ciclos, lo que tiene que ver con la pérdida de la capacidad de deformarse de la probeta debido al progresivo alargamiento y orientación de las fibras de colágeno. Se observa que el alargamiento de rotura disminuye en ambas direcciones con el número de ciclos. Los valores del alargamiento en rotura en dirección circunferencial (1.45 a 1.25) también son mayores que en ápico-caudal (1.55 a 1.35), de forma similar a la tensión de rotura.

Figura 63. Rigidez en pericardio en las dos direcciones de ensayo

En dirección circunferencial (Figura 63) la rigidez se mantiene prácticamente constante y su valor se sitúa en torno a los 200 MPa frente a los 70 MPa en la dirección ápico-caudal, también constante. Este hecho sugiere que el mecanismo de rotura final por alargamiento y rotura de las fibras de colágeno no se ve afectado por la fatiga previa, que solo provocaría una mayor alineación de las fibras y no induciría daño en ellas

Se puede concluir que el pericardio se comporta de forma similar en las dos direcciones anatómicas, conservando la misma tensión de rotura y rigidez final, independientemente de la fatiga previa. El alargamiento de rotura disminuye con la fatiga debido a la orientación inducida por las fibras. La diferencia de valores en dirección ápico-caudal y circunferencial puede originarse por la diferente organización y densidad del tejido en estas dos direcciones.

4.4.1.5. Análisis de la rotura por tracción en membranas artificiales

De nuevo se comparan las probetas control sometidas a un ensayo de tracción hasta rotura y las probetas que han sobrevivido a los ciclos previos de fatiga. Sólo se han considerado las probetas cuya rotura se produce en una zona alejada de las mordazas.

Las curvas de rotura por tracción se recogen en el Anejo E.

En la Tabla 31 se recoge el número de probetas ensayadas y en la Tabla 32 y Tabla 33, los valores de los tres parámetros analizados. En la Figura 64, Figura 65 y Figura 66 se representan estos valores.

	Dirección transversal	Dirección longitudinal
Control	9	9
100	9	9
500	8	8
1000	8	8
2000	6	6
4000	8	8

Tabla 31. Número de probetas ensayadas a tracción en las dos direcciones de ensayo y correspondientes a distinto número de ciclos

	Tensión rotura (MPa)	Alargamiento rotura	Rigidez (MPa)
Control	$7.39 \pm 0.89(9)$	$1.25 \pm 0.02 (9)$	$55.26 \pm 2.73 (9)$
100	$10.23 \pm 0.71 (9)$	$1.25 \pm 0.01 (9)$	$68.91 \pm 3.64 (9)$
500	$11.17 \pm 0.76 (8)$	$1.26 \pm 0.01 (8)$	$71.47 \pm 4.14 (8)$
1000	$10.86 \pm 0.86 (8)$	$1.25 \pm 0.01 (8)$	$70.33 \pm 4.58 (8)$
2000	$9.94 \pm 1.08 (6)$	$1.24 \pm 0.01 (6)$	$68.63 \pm 4.47 (6)$
4000	$10.17 \pm 0.96 (8)$	$1.23 \pm 0.01 (8)$	$69.92 \pm 4.25 (8)$

Tabla 32. Tensión de rotura, alargamiento de rotura y rigidez, en membranas artificiales, en dirección transversal

	Tensión rotura (MPa)	Alargamiento rotura	Rigidez (MPa)
Control	$4.82 \pm 0.666 (6)$	$1.23 \pm 0.017 (6)$	$48.62 \pm 7.554 (6)$
100	$8.36 \pm 0.981 (3)$	$1.19 \pm 0.013 (3)$	$77.83 \pm 9.063 (3)$
500	$5.92 \pm 0.882 (3)$	$1.17 \pm 0.032 (3)$	$70.39 \pm 10.725 (3)$
1000	$6.44 \pm 2.435 (2)$	$1.18 \pm 0.015 (2)$	$73.06 \pm 17.260 (2)$
2000	$4.80 \pm 0.000 (1)$	$1.17 \pm 0.000 (1)$	$59.30 \pm 0.000 (1)$
4000	$5.40 \pm 0.696 (4)$	$1.16 \pm 0.012 (4)$	$74.01 \pm 9.430 (4)$

Tabla 33. Tensión de rotura, alargamiento de rotura y rigidez en membranas artificiales, en dirección longitudinal

Figura 64. Comparación de la tensión de rotura entre las dos direcciones de ensayo en membranas artificiales

La Figura 64 muestra que en las probetas control, no sometidas a fatiga, la tensión de rotura no presenta diferencias acusadas (como en pericardio) en las dos direcciones estudiadas y que tras unos primeros ciclos de fatiga (100) aumenta su valor. Posteriormente, los comportamientos en dirección transversal y longitudinal divergen ya que la tensión de rotura tiende a mantenerse sensiblemente constante para la primera, mientras que disminuye para la última, regresando a los niveles de las probetas de control. En dirección transversal, el valor de tensión de rotura en las probetas con mayor número de ciclos se sitúa en torno a los 10 MPa y en las probetas control es algo superior a 7 MPa. En dirección longitudinal, la tensión de rotura de las probetas control es de unos 5 MPa, siendo este valor también el de las probetas cicladas.

Figura 65. Comparación del alargamiento de rotura entre las dos direcciones de ensayo en membranas artificiales

En la Figura 65, se ve que mientras que en dirección transversal el alargamiento de rotura se mantiene esencialmente constante (~1.24), independientemente del número de ciclos aplicado a la probeta, en la dirección longitudinal se produce una disminución de sus valores de 1.23 a 1.15.

Figura 66. Comparación de la rigidez entre las dos direcciones en membranas artificiales

La rigidez en ambas direcciones (Figura 66) crece ligeramente con el número de ciclos de fatiga. Existe una diferencia significativa entre las probetas control (que adquieren un valor aproximado de 52 MPa en ambas direcciones) y las cicladas (con un valor en torno a los 70 MPa) a partir de unos pocos ciclos de carga y descarga (menos de 100).

4.4.1.6. Resumen y comparación de ambos materiales en rotura

La Tabla 34 recoge los datos de los parámetros de rotura para los dos materiales y direcciones estudiadas. La Figura 67, Figura 68, Figura 69

□ Pericardio, dirección circunferencial □ Pericardio, dirección áptico - caudal
 □ Membranas artificiales, dirección longitudinal □ Membranas artificiales, dirección transversal

cada una correspondiente a un parámetro de rotura, muestra gráficamente los valores.

	Tensión de rotura	Alargamiento rotura	Rigidez
Membranas artificiales transversal	Control $\approx$ 7 MPa Fatiga $\approx$ 10 MPa	Constante $\approx$ 1,25	Control $\approx$ 50 MPa Fatiga $\approx$ 70 MPa
Membranas artificiales longitudinal	Varía $\approx$ 6 MPa	Disminuye 1,25 a 1,15	Control $\approx$ 50 MPa Fatiga $\approx$ 70 MPa
Pericardio áptico-caudal	Constante $\approx$ 10 MPa	Disminuye 1,45 a 1,25	Constante $\approx$ 70 MPa
Pericardio circunferencial	Constante $\approx$ 30 MPa	Disminuye 1,55 a 1,35	Constante $\approx$ 200 MPa

Tabla 34. Resumen de los parámetros de rotura

Figura 67. Tensión de rotura para los dos materiales y las dos direcciones estudiados

Figura 68. Alargamiento de rotura para los dos materiales y las dos direcciones estudiados

Figura 69. Rigidez para los dos materiales y las dos direcciones estudiados

Según los datos recogidos en la Tabla 34, el pericardio en dirección circunferencial es el que presenta mejores propiedades mecánicas atendiendo a los valores de sus parámetros de rotura. Sin embargo, muestra una gran ortotropía, ya que los valores de la tensión de rotura y rigidez en dirección ápico-caudal son muy inferiores, presentando unas propiedades mecánicas similares a las membranas artificiales. Por el contrario, estas últimas son bastante isotropas en comparación con el pericardio.

En 1992, Vesely *et al.*, realizaron ensayos uniaxiales en condiciones cuasi-estáticas en velos valvulares humanos y porcinos. Los resultados de estos ensayos muestran que la rigidez en la zona de rotura es de 1 – 2 MPa en la dirección radial y de 8 - 12 MPa en la circunferencial [61]. Al comparar estos resultados con los obtenidos en esta tesis se constata que los valores en velos naturales son significativamente menores que los valores en pericardio y en membranas artificiales, aunque estos últimos se aproximan algo más al valor natural.

La válvula aórtica trabaja a una presión media aproximada de unos 100 mm Hg que se traduce en tensiones de tracción de alrededor de 0.2 MPa, valores muy inferiores a los que resistidos por el pericardio y las membranas artificiales estudiadas en esta tesis.

Estos datos abren la posibilidad de utilizar las membranas artificiales debidamente tratadas como sustitutos de los velos valvulares.

4.4.2. Ensayos de rasgado

4.4.2.1. Descripción del mecanismo de rasgado

Se ha observado que durante el ensayo de rasgado se produce delaminación tanto en las membranas artificiales como en el pericardio. Para este último, este fenómeno aparece ya documentado en la bibliografía [84][85]. En la Figura 70 se ilustra el mecanismo, a medida que avanza el ensayo, dos capas del material se van despegando a la vez que cada una se rasga en direcciones divergentes (Figura 71). En la Figura 72 se representa una membrana artificial después de su ensayo de rasgado, en la que se ha señalado el área despegada en ambas partes de la probeta.

Figura 70. Ruptura, deformación y delaminación durante el ensayo de rasgado

Figura 71. Estado de una probeta de membranas artificiales una vez finalizado el ensayo de rasgado

Figura 72. Área delaminada de una probeta

El área delaminada se calculó midiendo la superficie despegada en el ensayo sobre las dos partes de cada probeta (Figura 72), que en todos los casos fue muy similar, y realizando la media entre los dos valores

También se midieron los ángulos de rasgado para los dos materiales (Figura 73). La dirección de rasgado de la capa 1 se corresponde con el ángulo Θ_1 , y la de la capa 2, con el ángulo Θ_2 . El sector circular sombreado se corresponde con el área delaminada (A) al final del ensayo. Los ángulos se midieron siempre con referencia a la dirección ápico-caudal para el pericardio, y longitudinal para las membranas artificiales.

Figura 73. Definición de los ángulos de rasgado (Θ_1 y Θ_2) en probetas de rasgado

En la Figura 74 y en la Figura 75, se presentan los ángulos medidos.

Las probetas de pericardio se clasificaron en seis grupos en función de la fatiga previa y la dirección de rasgado, conforme a lo indicado en la Tabla 12.

Las probetas control (N), sin ciclos de fatiga, se sometieron a rasgado en dirección ápico – caudal (N_{AC}) y circunferencial (N_C). Las probetas sometidas a 1000 ciclos de fatiga en dirección ápico – caudal (F AC) también se sometieron a rasgado en dirección ápico – caudal (F AC_{AC}) y circunferencial (F AC_C), al igual que las prefatigadas en dirección circunferencial (F C_{AC} y F C_C).

Figura 74. Media de los ángulos de rotura medidos respecto a la dirección ápico-caudal del material, para todos los tipos de probetas en pericardio

En las membranas artificiales también se midieron los ángulos en las probetas control ensayadas en dirección transversal (N_T) y longitudinal (N_L), y en las fatigadas longitudinalmente (F_{L_T} y F_{L_L}) y transversalmente (F_{T_T} y F_{T_L}) según lo indicado en la Tabla 13.

Figura 75. Media de los ángulos de rotura medidos respecto a la dirección longitudinal del material, para todos los tipos de probetas en membranas artificiales

En la Figura 74 y en la Figura 75 no se aprecia apenas diferencia en el ángulo entre las probetas sometidas a fatiga y las probetas control, siendo la dirección del ensayo de rotura el parámetro determinante.

En la Figura 76 y en la Figura 77, se representan la diferencia entre Θ_1 y Θ_2 para ambos materiales.

Figura 76. Diferencia entre ángulos ($\Theta_1 - \Theta_2$) en pericardio

Figura 77. Diferencia entre ángulos ($\Theta_1 - \Theta_2$) en membranas artificiales

En la Tabla 35 y en la Tabla 36, se recogen los datos de área delaminada media y espesor medio de la membrana para cada uno de los grupos ensayados.

Grupo	N_{AC}	N_C	$F_{AC_{AC}}$	F_{AC_C}	$F_{C_{AC}}$	F_{C_C}
Área (mm ²)	110 (16)	100 (7)	131 (16)	91 (13)	114 (24)	93 (12)
Espesor (mm)	0.60 (0.03)	0.59 (0.03)	0.58 (0.03)	0.58 (0.03)	0.48 (0.03)	0.48 (0.03)

Tabla 35. Media del área delaminada y espesor de la probeta en pericardio. El error estándar se presenta entre paréntesis

Grupo	N_T	N_L	F_{T_T}	F_{T_L}	F_{L_T}	F_{L_L}
Área (mm ²)	101 (10)	73 (5)	116 (10)	66 (8)	103 (13)	77 (1)
Espesor (mm)	0.31 (0.01)	0.32 (0.01)	0.27 (0.01)	0.27 (0.01)	0.29 (0.01)	0.29 (0.01)

Tabla 36. Media del área delaminada y espesor de la probeta en membranas artificiales. El error estándar se presenta entre paréntesis

4.4.2.2. Curvas fuerza – desplazamiento de rasgado

Las curvas de rasgado están recogidas en el Anejo F. La carga está normalizada dividiéndola por el espesor de la probeta (F/e) y el desplazamiento ($\delta = 2u$) se corresponde con el desplazamiento relativo entre mordazas, como se muestra esquemáticamente en la Figura 78, en la que se representa en vista lateral una probeta con una grieta inicial que se ha rasgado una longitud u .

Figura 78. Esquema del rasgado y delaminación. Vista lateral

En la Figura 79, se muestra una curva carga-desplazamiento representativa donde se señalan dos puntos característicos:

- Valor máximo de la carga: $(F/e)_{\max}$
- El primer cambio significativo en la pendiente de subida: $(F/e)_y$

Figura 79. Curva carga-desplazamiento representativa. Se señalan dos puntos característicos: carga máxima $(F/e)_{max}$ y carga umbral $(F/e)_y$

La Figura 80 y la Figura 81 representan la media de los valores de $(F/e)_{max}$ y $(F/e)_y$ para los 6 grupos de ensayos realizados en ambos materiales.

Figura 80. Media de los valores $(F/e)_{max}$ y $(F/e)_y$ en pericardio

La Figura 80 muestra una clara ortotropía, tanto $(F/e)_{max}$ como $(F/e)_y$ son siempre mayores en la dirección ápico-caudal que en la circunferencial.

Para muestras ensayadas en dirección circunferencial $(F/e)_{max}$ permanece más o menos constante mientras que $(F/e)_y$ es menor en probetas sometidas a fatiga previa. En dirección ápico-caudal no hay una tendencia clara en $(F/e)_{max}$. Sin embargo, $(F/e)_y$ permanece constante para probetas novalas y para aquellas sometidas a una fatiga previa.

Figura 81. Media de los valores $(F/e)_{\max}$ y $(F/e)_y$ en membranas artificiales

En membranas artificiales, el valor de $(F/e)_{\max}$ permanece constante si se ensaya en dirección transversal. Sin embargo, en dirección longitudinal aumenta significativamente en las probetas sometidas a fatiga previa. Entre las dos direcciones, este parámetro es significativamente mayor en dirección longitudinal. El parámetro $(F/e)_y$ permanece más o menos constante en ambas direcciones, con fatiga previa o sin ella.

4.4.2.3. Trabajo de rotura

El trabajo de rotura se define como el área bajo la curva carga-desplazamiento y se utiliza tanto en rasgar la membrana como en delaminar sus capas.

En la Figura 82 se representan los valores relativos de trabajo de rotura frente al área de delaminación para probetas de pericardio. Ambos valores están normalizados con el espesor de la probeta (e). En el gráfico de la izquierda se muestran todos los ensayos (novales y con fatiga previa) realizados en dirección ápico-caudal y en el de la derecha se representan los realizados en la dirección circunferencial.

Figura 82. Trabajo consumido frente al área delaminada en pericardio, ambos valores normalizados con el espesor

Los valores del trabajo de rotura frente al área delaminada para membranas artificiales se representa en la Figura 83, como puede observarse, existe gran diferencia entre el trabajo de rotura en pericardio y membranas artificiales, siendo los valores en estas últimas casi 5 veces menores.

Figura 83. Trabajo consumido frente al área delaminada en membranas artificiales, ambos valores normalizados con el espesor

Los valores experimentales de trabajo de rotura presentan gran dispersión, fenómeno habitual en ensayos en biomateriales. A pesar de ello, se puede obtener información relacionada con el rasgado y la delaminación usando un modelo sencillo de fractura.

En la Figura 84 se representa un esquema del ensayo de rasgado y delaminación. Durante la propagación du , el trabajo dW , realizado por las fuerzas externas es:

$$dW = 2Fdu \quad (1)$$

Figura 84. Esquema del rasgado y la delaminación

Si este trabajo se gasta solamente en deformación elástica, $d\Lambda$, y en la energía consumida por rasgado de las capas, dR , y por delaminación dD , el balance de energía se puede escribir de la siguiente manera:

$$dW = d\Lambda + dR + dD \quad (2)$$

Se asume que, debido a la cinemática del ensayo (Figura 70), el frente de rotura permanece paralelo al borde de carga. Los ángulos θ_1 - θ_2 definen las trayectorias de rasgado en las dos capas en las que se rasga el material.

También se asume, con el objetivo de simplificar los cálculos, que el trabajo consumido en la deformación elástica es despreciable frente al trabajo de rotura: $d\Lambda \ll dR + dD$.

Si R_1 y R_2 es la energía específica de rasgado (es decir, el trabajo de rotura por unidad de área) de las capas 1 y 2 respectivamente, e_1 y e_2 sus correspondientes espesores, y R_D es la energía de delaminación específica (trabajo por unidad de área delaminada) entre las capas, la ecuación (2) se puede escribir de la siguiente manera:

$$dW \approx R_1 e_1 da_1 + R_2 e_2 da_2 + R_D dA \quad (3)$$

Donde $e_1 da_1$ es el área rasgada de la capa 1 y $e_2 da_2$ el área correspondiente rasgada en la capa 2, de acuerdo con la Figura 84, dA es el área delaminada en el proceso.

De las ecuaciones (1) y (3) se llega a:

$$dW = 2Fdu = R_1 e_1 da_1 + R_2 e_2 da_2 + R_D dA \quad (4)$$

El trabajo total de rotura W se obtiene de integrar la ecuación (4):

$$W = \int dW = R_1 e_1 r + R_2 e_2 r + R_D A \quad (5)$$

Pues R_1 , R_2 , R_D y e_1 , e_2 son constantes y la longitud total de rasgado al final del ensayo es r para cualquiera de las capas, que corresponde con el radio de la probeta.

El trabajo de rotura por unidad de espesor *total*, se puede escribir de la siguiente forma:

$$W/e = (R_1 e_1 + R_2 e_2) \times r/e + R_D \times A/e \quad (6)$$

Su dependencia del área delaminada se representa en la Figura 85. La media ponderada de la energía de rotura por rasgado, R_m , se define como:

$$R_m = (R_1 e_1 + R_2 e_2)/e \quad (7)$$

Figura 85. Trabajo de rotura frente al área de delaminación (los valores están referenciados al espesor total de la membrana)

Volviendo a los resultados experimentales de la Figura 82 y la Figura 83, si se ajusta una línea recta como sugiere la ecuación (6), se obtiene:

Pericardio

Para los ensayos realizados en la dirección ápico-caudal:

$$W/e = 414(N) + 0.64(N/mm) A/e$$

Para los ensayos realizados en dirección circunferencial:

$$W/e = 383(N) + 0.5(N/mm) A/e$$

Membranas artificiales

Para los ensayos realizados en la dirección transversal:

$$W/e = 60(N) + 0.02(N/mm) A/e$$

Para los ensayos realizados en dirección longitudinal:

$$W/e = 68(N) + 0.11(N/mm) A/e$$

El espesor de las capas (e_1 y e_2) es difícil de determinar, sin embargo, se puede obtener un valor representativo de la resistencia al rasgado del pericardio, R_m . Como el radio del sector circular, r , es igual a 12mm, de las ecuaciones (6) y (7), se llega a los valores de la Tabla 37 y la Tabla 38.

	Ápico-caudal	Circunferencial
Resistencia media de rasgado	35 N/mm	32 N/mm
Resistencia a la delaminación	0.6 N/mm	0.5 N/mm

Tabla 37. Resistencia al rasgado y delaminación en pericardio

	Transversal	Longitudinal
Resistencia media de rasgado	5 N/mm	6 N/mm
Resistencia a la delaminación	0.02 N/mm	0.1 N/mm

Tabla 38. Resistencia al rasgado y a la delaminación en membranas artificiales

En pericardio, los valores de resistencia al rasgado en ambas direcciones se encuentran en el rango de valores ya publicados de otras membranas naturales de base colágeno: 20-25 N/mm para piel de rata [105] y 20 N/mm para piel de conejo [106]. En membranas artificiales, por el contrario, los valores son considerablemente menores, quizás debidos a su composición que, aparte de colágeno, tiene otros elementos. Además el contenido en colágeno de las membranas artificiales es sensiblemente menor al del pericardio tal y como se comprobó en el apartado 4.2, y sus fibras son más cortas.

En pericardio, los valores resistencia media de rasgado son unas 60 veces mayores que los de resistencia a la delaminación. En membranas artificiales, por el contrario, la resistencia media de rasgado llega a ser hasta de 250 veces mayor que la resistencia a la delaminación. Si bien, dada la dispersión de los resultados, estos datos deben tomarse con mucha prudencia.

Los valores encontrados en la bibliografía en relación con la delaminación, oscilan entre los de la fuerza de adhesión entre las capas de la dermis y la epidermis de la piel de rata, que Sproule *et al.* estimaron en unos 3 N/mm [107] y la energía de adhesión de vendajes para aplicaciones médicas: 0.01 – 0.08 N/mm [108][109]. La fuerza de separación en el desprendimiento de retina está alrededor de 0.0002 N/mm [110] y la fuerza de delaminación intercelular de la capa córnea es aproximadamente 0.006 N/mm [111].

4.4.2.4. Resumen y comparación de ambos materiales en rasgado

Después del análisis de rasgado, se puede concluir que el pericardio, en cualquiera de sus dos direcciones, disipa mayor energía que las membranas artificiales (del orden de 6 veces los valores de las membranas artificiales). Estos resultados se corresponden con los obtenidos en fatiga y pueden tener su origen en la mayor longitud de las fibras.

En ambas membranas solo una pequeña porción del trabajo consumido en el ensayo se emplea en delaminación.

4.4.3. Ensayos de tracción con fisura interior de membranas artificiales

Estos ensayos se realizaron sólo en membranas artificiales. Se han analizado la tensión de rotura, el alargamiento de rotura y la rigidez. En el Anejo G, se muestra un gráfico para cada longitud de fisura ensayada y las curvas de rotura de todas las probetas ensayadas. Además, en el mismo anejo, se muestran las fotografías de las probetas una vez.

El espesor medio de las probetas empleadas en estos ensayos fue de 0.34 ± 0.004 (37) mm.

Los parámetros de rotura (tensión, alargamiento y rigidez) se muestran en la Tabla 39, en la que también se ha calculado el valor de la tenacidad de fractura calculada mediante la expresión:

$$K_{IC} = \sigma_{max} \sqrt{\pi a} \sqrt{\sec(\pi a/2b)} \quad (8) \quad [112]$$

Siendo a, la semi-longitud de la fisura y b la semi-anchura de la probeta.

Longitud fisura	Dirección ensayo	Tensión verdadera (MPa)	Alargamiento rotura	Rigidez (MPa)	K_{IC} (MPa $\sqrt{m}$)
1 mm	L	3.44 ± 0.296 (7)	1.11 ± 0.004 (7)	55.42 ± 2.769 (7)	0.137 ± 0.011 (7)
	T	4.85 ± 0.138 (7)	1.17 ± 0.003 (7)	47.77 ± 0.727 (7)	0.253 ± 0.004 (7)
2 mm	L	4.47 ± 0.070 (4)	1.11 ± 0.007 (4)	60.07 ± 1.723 (4)	0.242 ± 0.011 (4)
	T	4.83 ± 0.349 (7)	1.16 ± 0.009 (7)	43.88 ± 1.654 (7)	0.193 ± 0.005 (7)
4 mm	L	2.93 ± 0.139 (8)	1.10 ± 0.004 (8)	48.86 ± 1.604 (8)	0.273 ± 0.020 (8)
	T	2.91 ± 0.084 (4)	1.14 ± 0.006 (4)	32.06 ± 1.152 (4)	0.240 ± 0.007 (4)

Tabla 39. Resumen de los parámetros de rotura en probetas de membranas artificiales con fisura interior (L: longitudinal; T: transversal)

Figura 86. Tensión de rotura en probetas con fisura interior de 1 mm, 2 mm y 4 mm

La Figura 86 muestra que la tensión de rotura disminuye, como parece lógico, cuando aumenta la longitud de fisura y que apenas existe diferencia significativa entre las direcciones de ensayo.

Figura 87. Alargamiento de rotura en probetas con fisura interior de 1 mm, 2 mm y 4 mm

En cuanto al alargamiento de rotura (Figura 87), tampoco parece haber diferencias apreciables para una misma dirección, aunque sí las hay entre ambas direcciones de ensayo, ya que en la dirección transversal de ensayo las probetas son mucho más deformables. Entre una dirección y su perpendicular sí hay diferencia, siendo el valor del alargamiento de rotura mucho más alto en transversal que en longitudinal.

Figura 88. Rigidez en probetas con fisura interior de 1 mm, 2 mm y 4 mm

Por último, la rigidez parece disminuir con la longitud de fisura para ambas direcciones de ensayo, siendo la longitudinal más rígida.

El valor de K_{IC} calculado en torno a $0.2 \text{ MPa}\sqrt{m}$ (Tabla 39) permite estimar el valor de la energía de rotura del material en estos ensayos mediante la ecuación de Irwin [112]:

$$R = K_{Ic}^2 / E \quad (9)$$

Si se utiliza un valor promedio del módulo de elasticidad E de 50 MPa para probetas sin fatigar (Figura 66), se obtiene $R = 0.08$ N/mm, valor muy inferior al valor de rasgado (Tabla 38). Este hecho sugiere que el mecanismo predominante en este tipo de ensayo debe ser la rotura por delaminación, que es el único proceso de rotura con valores bajos de R . En consecuencia, podemos prever que, según el tipo de sollicitación de la probeta, los valores de resistencia a la rotura puedan oscilar entre la resistencia al rasgado (como límite superior) y la delaminación (como límite inferior), por lo que será importante tenerlos en cuenta a la hora del diseño y construcción de las prótesis.

4.4.4. Ensayos dinamomecánicos de membranas artificiales

Se han ensayado tres probetas en cada dirección del material a una frecuencia de 20 Hz. El espesor medio de estas probetas fue de 0.26 ± 0.007 (6) mm.

Los resultados de estos ensayos son los que se muestran en las figuras siguientes:

Figura 89. Curvas tensión -deformación ingenieril en ensayos realizados en dirección transversal (izquierda) y en dirección longitudinal (derecha)

De la comparación de ambos gráficos, se deduce que en dirección longitudinal, la rigidez es mayor que en dirección transversal. Este mismo comportamiento se observa en los ensayos mecánicos de fatiga y de tracción uniaxial hasta rotura.

Figura 90. Módulo de almacenamiento (E') en función del nivel de tensión al que se ha evaluado su valor para ensayos en dirección transversal (izquierda) y en dirección longitudinal (derecha)

La figura 90 muestra también que en dirección longitudinal el módulo de almacenamiento (E') es superior al medido en dirección transversal, sea cual sea el nivel tensional. Además su valor se incrementa más rápidamente con la tensión, indicando una rigidización mayor del material en esta dirección.

Por último, el módulo de pérdidas (E'') se muestra en la Figura 91, y está asociado con la energía disipada en el material. El módulo de pérdidas es de nuevo mayor en dirección longitudinal que en transversal.

Figura 91. Módulo de pérdidas (E'') en función del nivel de tensión al que se ha evaluado su valor para ensayos en dirección transversal (izquierda) y en dirección longitudinal (derecha)

4.4.5. Resumen

En este capítulo se han mostrado y analizado los resultados de los ensayos bioquímicos y mecánicos de membranas pericárdicas y artificiales de base colágeno.

El análisis bioquímico ha permitido cuantificar el contenido de colágeno en las muestras y su porcentaje de entrecruzamiento. Los resultados muestran que el contenido en colágeno es mayor en pericardio que en las membranas artificiales. El porcentaje de colágeno entrecruzado tras su estabilización con glutaraldehído alcanza aproximadamente un 76% en ambos materiales.

Se ha observado que ambas membranas sufren un proceso de hinchamiento por su conservación en glicerol, disminuyendo su espesor tras su rehidratación en suero. Las membranas artificiales experimentan mayores cambios de volumen al ser rehidratadas (–20%, frente a –11% en pericardio).

El comportamiento mecánico de ambos materiales es dependiente de la dirección, por lo que ambos materiales son anisótropos. Sin embargo, el efecto de la anisotropía es mucho más acusado en las membranas de pericardio, mucho más rígidas y resistentes en dirección circunferencial que ápico-caudal. Las membranas de pericardio mostraron valores de tensión de rotura entre 10 y 30 MPa frente a los 5-10 MPa de las membranas artificiales. Los ensayos dinamomecánicos confirman este comportamiento bajo situación de carga dinámica.

En cualquier caso, los valores resistentes de ambas membranas son suficientes para resistir con solvencia las tensiones mecánicas fisiológicas en velos naturales (0.2 MPa).

Durante el proceso de fatiga, la energía disipada por el pericardio es superior a la de las membranas artificiales. En ambos materiales se disipa más energía en las direcciones de mayor resistencia (circunferencial para el pericardio y transversal para las membranas artificiales). La rigidez de membranas artificiales y pericardio tiende a incrementarse ligeramente con los ciclos de fatiga situándose en valores en torno a 30 MPa para ambas membranas.

Los valores de resistencia al rasgado en pericardio (~30 N/mm) también superan con claridad a los de las membranas artificiales (~5 N/mm) y se alinean con los de otros materiales naturales de base colágeno como la piel. Sin embargo, se ha descubierto que el proceso de rasgado conlleva de forma intrínseca la delaminación de las capas de la membrana, y este mecanismo se produce con valores muy bajos de la energía de rotura (~0.5 N/m para pericardio y 0.05 N/mm para las membranas artificiales). En consecuencia se debe prever este mecanismo de rotura a la hora del diseño y construcción de prótesis valvulares para evitar la rotura prematura.

5. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

5.1. Conclusiones

Las investigaciones acerca de las prótesis valvulares sugieren que la solución óptima radicaría en encontrar un material biocompatible, que no produjese problemas de calcificación, con el que se pudiesen fabricar prótesis morfológicamente similares a una válvula natural. Por el momento, la solución más aproximada son las válvulas porcinas y las válvulas cuyos velos están fabricados a partir de pericardio bovino. Sin embargo, tanto unas como otras presentan, entre otros, el problema de la gran variabilidad intrínseca a los materiales biológicos. Estos inconvenientes se solucionarían empleando un material que fuese de origen biológico y rico en colágeno, que aporta excelentes propiedades mecánicas. Además, logrando que este material se fabricase de manera industrial se podría producir de manera controlada reduciendo así su variabilidad.

En la presente tesis doctoral se ha estudiado el comportamiento mecánico del pericardio bovino y de un tipo de membranas artificiales de base colágeno empleadas en alimentación. Esta investigación podría constituir la base de un estudio más amplio (histología, bioquímica, biocompatibilidad...) para poder determinar la idoneidad del empleo de estas membranas artificiales en velos valvulares.

Para ello se han realizado ensayos mecánicos y bioquímicos sobre ambos tipos de materiales, tras haber sido ambos sometidos al mismo tratamiento químico de entrecruzamiento con glutaraldehído, y se han comparado sus propiedades.

Las principales aportaciones y conclusiones de la campaña experimental llevada a cabo en esta tesis son las siguientes:

- Se ha realizado una primera aproximación, desde el punto de vista mecánico, de la viabilidad de usar materiales artificiales de base colágeno y fibras cortas para la sustitución de velos valvulares en las bioprótesis.
- Por primera vez se ha caracterizado el comportamiento mecánico y en rotura de unas membranas artificiales de base colágeno, fabricadas por la empresa *Viscofan S.A.* y empleadas hasta ahora para uso alimentario.
- Se ha diseñado y realizado una exhaustiva campaña experimental para caracterizar el comportamiento mecánico consistente en:
 - Ensayos de tracción uniaxial hasta rotura con y sin fatiga previa de entre 100 y 24000 ciclos.
 - Ensayos de tracción uniaxial hasta rotura con fisura interior.

- Ensayos de rasgado con y sin fatiga previa de 1000 ciclos.
- Ensayos dinamomecánicos para determinar las propiedades viscoelásticas.
- Se ha realizado el primer análisis cuantitativo del rasgado y delaminación del pericardio bovino y de las membranas artificiales estudiadas. Como consecuencia del mismo, se ha propuesto un sencillo modelo de fractura que recoge los principales pasos del proceso y proporciona valores cuantitativos de resistencia al rasgado y a la delaminación.
- Asimismo, los dos materiales se han sometido a dos análisis bioquímicos diferentes, test de ninhidrina y análisis de aminoácidos, con el fin de determinar el contenido de colágeno y el grado de entrecruzamiento de las muestras.
- Se ha comparado el comportamiento mecánico del pericardio bovino con el de las membranas artificiales, y se ha comprobado que el comportamiento de estas últimas es similar al del pericardio, material ampliamente utilizado en la elaboración de velos valvulares.
- En definitiva, los resultados experimentales muestran que, desde un punto de vista mecánico, este material podría ser empleado en la construcción de velos valvulares, por lo que la principal aportación de esta tesis es el hallazgo de un material con un buen comportamiento mecánico y de origen biológico que se podría emplear en las bioprótesis para la fabricación de los velos valvulares.

5.2. Líneas futuras

Tras el análisis mecánico del pericardio y de las membranas artificiales de base colágeno llevado a cabo en esta tesis, las líneas de desarrollo más interesantes, a nuestro juicio, para profundizar en esta investigación son:

- Completar el trabajo experimental de caracterización mecánica de las membranas artificiales ampliando el número de ciclos de fatiga con el fin de estudiar su comportamiento a largo plazo.
- Realizar ensayos mecánicos en medio calcificante para estudiar la tendencia a la formación de depósitos de calcio en las membranas artificiales.
- Modelizar analítica y numéricamente ambos materiales proponiendo ecuaciones constitutivas que reproduzcan su comportamiento mecánico.
- Estudiar la microestructura principalmente obteniendo la dirección y distribución de las fibras, para así proponer modelos de material basados en la microestructura como, por ejemplo, modelos anisótropos reforzados con fibras.
- Realizar estudios bioquímicos más profundos, así como histológicos y de biocompatibilidad de las membranas artificiales, que pudieran confirmar la viabilidad del material como sustituto vascular.

Bibliografía

- [1] A. López Farré y C. Magaya Miguel. "Capítulo 53. Prótesis valvulares cardíacas". "Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y de la Fundación BBVA", Bilbao: Fundación BBVA, 2009, 696 páginas, ISBN: 978-84-96515-92-5
- [2] B.D. Ratner, "A history of biomaterials" In: B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. Lemons "Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine", 2013, 1576 páginas, 3ª edición, Academic press. ISBN: 978-0-12-374626-9
- [3] J. Butany, M. S. Ahluwalia, C. Munroe, C. Fayet, C. Ahn, P. Blit, C. Kepron, R. J. Cusimano, R. L. Leask, "Mechanical heart valve prostheses: identification and evaluation (erratum)", *Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, vol. 12, nº 6, pp. 322–344, 2003
- [4] J.P. Fanning, D.G. Platts, D.L. Walters, and J.F. Fraser, "Transcatheter aortic valve implantation (TAVI): Valve design and evolution". *International Journal of Cardiology*, vol. 168, nº 3, pp. 1822–1831, 2013
- [5] J. Butany, C. Fayet, M. S. Ahluwalia, P. Blit, C. Ahn, C. Munroe, N. Israel, R. J. Cusimano, and R. L. Leask, "Biological replacement heart valves". *Cardiovascular Pathology*, Vol. 12, nº 3, pp. 119–139, 2003
- [6] Edwards
<www.edwards.com>
- [7] G.L. Grunkemeier, H.H. Li, D.C. Naftel, A. Starr, S.H. Rahimtoola, "Long-term performance of heart valve prostheses", *Current Problems in Cardiology*, vol. 25, pp. 73–154, 2000.
- [8] G. Gao, Y. Wu, G.L. Grunkemeier, A.P. Furnary, and A. Starr, "Durability of pericardial versus porcine aortic valves", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 44, nº 2, pp. 384–388, 2004
- [9] G. Téllez de Peralta, "Tratado de cirugía cardiovascular", Ed. Díaz de Santos, 1998, 925 páginas, ISBN:84-7978-328-1
- [10] S.L. Hilbert, M. Jones, V.J. Ferrans, "Flexible leaflet replacement heart valves". *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering. Part B: Applications*. Ed. By D.D. Wise et al., Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 111-1152, 1995.
- [11] Parche pericárdico bovino. Dive Medical

<<http://www.divemedical.com.co/focmedical1.php>>

- [12] Parche pericárdico bovino. Edwards Lifesciences Corporation
<<http://www.edwards.com/es/products/heartvalves/Pages/patch.aspx>>
- [13] L. Hockaday, K. Kang, N. Colangelo, P. Cheung, B. Duan, E. Malone, et al. "Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds", *Biofabrication*, vol. 4, no. 3, p. 035005, 2012
- [14] N. Masoumi, N. Annabi, A. Assmann, B. L. Larson, J. Hjortnaes, N. Alemdar, M. Kharaziha, K. B. Manning, J. E. Mayer, and A. Khademhosseini, "Tri-layered elastomeric scaffolds for engineering heart valve leaflets". *Biomaterials*, vol. 35, nº 27, pp. 7774–7785, 2014
- [15] Hemapatch silver ultrathin, Maquet
<<http://www.maquet.com/int/product/HEMAPATCH-Silver-Knitted-UltraThin>>
- [16] G. Cacciola, G.W.M. Peters, F.P.T. Baaijens, "A synthetic fiber-reinforced stentless heart valve," *Journal of biomechanics*, vol. 33, pp. 653–658, 2000
- [17] G. Cacciola, G.W.M. Peters, P.J.G. Schreurs, J.D. Janssen. "Development and testing of a synthetic fiber-reinforced three-leaflet heart valve". *Biomimetics*, vol. 4, pp. 83-103, 1996
- [18] ST. JUDE MEDICAL INC., *Fiber-reinforced synthetic sheets for prosthetic heart valve leaflets*. Inventores: X. Li and Y. Woo. United States, solicitud de patente. US 2010/0249922 A1.30-9-2010
- [19] H. Ghanbari, H. Viatge, A.G. Kidane, G. Burriesci, M. Tavakoli, A.M. Seifalian. "Polymeric heart valves: new materials, emerging hopes". *Trends in Biotechnology*, vol. 27, nº 6, pp. 359–367, 2009
- [20] D. Bezuidenhout, D. F. Williams, P. Zilla, "Polymeric heart valves for surgical implantation, catheter-based technologies and heart assist devices". *Biomaterials*, vol. 36, pp. 6–25, 2014
- [21] N.H.C. Hwang, X.Z. Nan, D.R. Gross. "Prosthetic heart valve replacements". *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, vol. 9, pp. 99–132, 1982.
- [22] A. Jayakrishnan, S.R. Jameela. "Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices". *Biomaterials*, vol. 17, pp. 471-484, 1996
- [23] I. Vesely, "The evolution of bioprosthetic heart valve design and its impact on durability," *Cardiovascular Pathology*, vol. 12, nº 5, pp. 277–286, 2003
- [24] P. Stassano, L. Di Tommaso, M. Monaco, F. Iorio, P. Pepino, N. Spampinato, and C. Vosa, "Aortic valve replacement: a prospective randomized evaluation of mechanical versus biological valves in patients ages 55 to 70 years." *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 54, nº 20, pp. 1862–1868, 2009
- [25] D.L. Nelson, M.M. Cox, "Lehninger Principles of Biochemistry", 1119 páginas, 4ªedición, , 2005, W. H. Freeman, ISBN: 0716743396
- [26] Benjamin/Cummings, Addison Wesley Longman, Inc.

- [27] S.C. Cowin and S.B. Doty, "Chapter 10: Collagen", *Tissue Mechanics*, Springer, 2007, 682 páginas, ISBN: 978-0-387-49985-7
- [28] L.B. Puig, G. Verginelli, G. Bellotti *et al.* "Homologous dura mater cardiac valve: preliminary study of 30 cases". *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 64, pp. 154-160, 1972
- [29] L.B. Puig, G. Verginelli, L. Kawabe *et al.* "Four years' experience with dura mater cardiac valves". *The Journal of Cardiovascular Surgery*, vol. 16, pp. 247-255, 1977
- [30] H. Hirasaki, R.J. Kiraly, GB. Jacobs, J.L. Snow, Y. Nose. "Bovine aortic and human dura mater valves". *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 79, pp. 125-137, 1980
- [31] M.I. Ionescu, D.N. Ross, R. Deac, *et al.* "Autologous fascia lata for heart valve replacement". *Thorax*. Vol. 25, nº1, pp. 46-56, 1970
- [32] W. Welch, P. Potvliege, G. Primo. "Autologous fascia lata cardiac valve replacement". *Thorax*. vol. 26, nº 3, pp. 271-276, 1971
- [33] J.M. Lee, D.W. Courtman, D.R. Boughner, "The glutaraldehyde-stabilized porcine aortic valve xenograft. I. Tensile viscoelastic properties of the fresh leaflet material". *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 18, pp. 61-77, 1984
- [34] A. Trowbridge, C. Corfts, P. Lawford, M.M. Black, "The mechanical properties of natural and chemically modified bovine pericardium for use with heart valve substitutes". *Material properties and stress analysis in biomechanics*, Manchester University Press, 1989, 282 páginas, ISBN: 0-7190-25214
- [35] Adaptación de Healthwise, incorporated.
- [36] E. Khor, "Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses", *Biomaterials*, Vol. 18, nº 2, pp. 95-105, 1997
- [37] V. Charulatha, A.Rajaram, "Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes", *Biomaterials*, vol. 24, nº 5, pp. 759-767, 2003
- [38] A Carpentier. "From valvularxenografts to valvularbioprosthesis (1965-1977)". *Medical Instrumentation*, nº11, pp. 98-101, 1977.
- [39] E. Jorge-Herrero, P. Fernández, J. Turnay, N. Olmo, P. Calero, R. García, I. Freile, and J.L. Castillo-Olivares, "Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen", *Biomaterials*, vol. 20, nº 6, pp. 539-545, 1999
- [40] R.J. Levy, *et al.*, "Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats", *American Journal of Pathology*, vol. 113, nº 2, pp.143-155, 1983.
- [41] K.M. Kim, *et al.*, "Aging changes in the human aortic valve in relation to dystrophic calcification", *Human Pathology*, vol. 7, nº 1, pp. 47-60, 1976

- [42] H.W. Sun, R.J. Feigal, H.H. Messer, "Cytotoxicity of glutaraldehyde and formaldehyde in relation to time of exposure and concentration" *The American Academy of Pediatric Dentistry*, vol. 12, n° 5, pp. 303-307, 1990
- [43] Collagen Casings Trade Association (CCTA)
<www.collagencasings.org>
- [44] G. Heinz, P. Hautzinger, *Meat processing technology for small- to medium-scale producers* Food and agricultura organization of the United Nations. Regional office for Asia and the Pacific, RAP Publication 2007/20, Bangkok, 2007. ISBN: 978-974-7946-99-4
- [45] M. Meyer, M. Schröpfer, *Collagen materials – collagen Processing. Technical freedom and scientific challenges when transforming collagen into final materials*. XXXII Congress of IULTCS, Istanbul/TURKEY, May 29th–31th 2013, pp. 1–15
- [46] Anejo I, sumario de Proyecto de la planta de VISCOFAN situada en Navarra.
<<https://www.navarra.es/NR/rdonlyres/454BE94F-2114-4831-BE6C-A617E2CA1369/90744/VISCOFAN.pdf>>
- [47] KUREHA CHEMICAL INDUSTRY Co. Ltd. *Composite material of de-N-acetylated chitin and fibrous collagen, its production and use*. Inventores: J. Kosugi, T. Kato, M. Funabashi. Solicitud de patente. 28-10-1981
- [48] N. Krkić, V. Lazić, L. Petrović, J. Gvozdenović, D. Pejić, "Properties of chitosan-laminated collagen film". *Food technology and biotechnology*, vol. 50, no. 4, pp. 483–489, 2012
- [49] L. Paulauskas, R. Kairaitis, "Deformation characteristics research of albumen belkozin membrane," *Mechanika*, vol. 69, no. 1, pp. 31–34, 2008
- [50] L. Paulauskas, R. Kairaitis, S. Paulauskas, E. Milčius, "Studies on deformation characteristics of albumen belkozin membranes using hysteresis loops technique", *Mechanika*, vol. 17, no. 6, pp. 590–593, 2011
- [51] Ć.M.D. Lü, U. Whdulqj, I. Lq, W.K.H. Uvw, Y. Duh, Y.H.U. Kljk, D.Q.G. Xqlirup, L.Q. Doo, W. Lqyhvwljdwgh, L. Froru, F. Fdxvhg, I. Ghfuhdvh, R.I. Wudqvsduhqf, "Mechanical and barrier characteristics of colored edible collagen casings," *APTEEF*, vol. 37, n. 192, pp. 59–68, 2006
- [52] DEVRO LIMITED. *High moisture collagen casings*. Inventores: G.Y. Alexander, T.F. Morgan, G. P. Fitzpatrick. Solicitud de patente. US 5554401 A. 10-9-1996
- [53] TEE – PAK, Inc. *Edible collagen casing cross-linked by bisulfite addition*. Inventor: Mauj A. Cohly. Concesión. US3885054 A. 20-5-1975
- [54] VISKASE CORPORATION. *Cellulosic food casing*. Inventor: Myron D. Nicholson. Concesión. USH1592 H. 3-9-1996
- [55] T.T. Tower, M.R. Neidert, R.T. Tranquillo. "Fiber Alignment Imaging During Mechanical Testing of Soft Tissues". *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 30, n° 10, pp. 1221-1233, 2002
- [56] G.A. Holzapfel, "Biomechanics of Soft Tissue" Computational Biomechanics, Biomech Printed Series, paper no. 7, 2000

- [57] J.T. Butcher, G.J. Mahler, and L. a Hockaday, "Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions" *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 4–5, pp. 242–68, 2011
- [58] P. Stradins, R. Lacis, I. Ozolanta, B. Purina, V. Ose, L. Feldmane, and V. Kasyanov, "Comparison of biomechanical and structural properties between human aortic and pulmonary valve," *European Journal Cardio-thoracic Surgery*, vol. 26, pp. 634–639, 2004
- [59] Adaptación Elsevier. Drake et al. Gray's anatomy for students
- [60] Y. Sahasakul, W.D. Edwards, J.M. Naessens, A.J. Tajik. "Age-related changes in aortic and mitral valve thickness: implications for two-dimensional echocardiography based on an autopsy study of 200 normal human hearts" *American Journal of Cardiology*, vol. 62, no 7, pp. 424-30, 1988
- [61] Z. Khan, D.R. Boughner, J.C. Lacefield. "Reconsidering the layer thickness distribution in aortic valve cusps using high-frequency ultrasound". *International Symposium on Biomedical Imaging*. pp. 868–871, 2007
- [62] I. Vesely, R. Noseworthy, "Micromechanics of the fibrosa and the ventricularis in aortic valve leaflets", *Journal of Biomechanics*, vol. 25, no 1, pp. 101–113, 1992
- [63] M. Kalejs, P. Stradins, R. Lacis, I. Ozolanta, J. Pavars, and V. Kasyanov, "St Jude Epic heart valve bioprotheses versus native human and porcine aortic valves - comparison of mechanical properties.," *Interactive Cardiovascular Thoracic Surgery*, vol. 8, pp. 553–556, 2009
- [64] A. Beck, M.J. Thubrikar, F. "Stress analysis of the aortic valve with and without the sinuses of Valsalva". *The Journal of Heart Valve Disease* vol. 10, no 1, pp. 1-11, 2001
- [65] W.M. Neethling, J.M. Papadimitriou, E. Swarts, A.J. Hodge, "Kangaroo versus porcine aortic valve tissue-valve geometry morphology, tensile strength and calcification potential" *Journal of Cardiovascular Surgery*, vol. 41, pp. 341–348, 2000
- [66] S.M. Wells, T. Sellaro, M.S. Sacks, "Cyclic loading response of bioprosthetic heart valves: effect of fixation stress state on the collagen fiber architecture". *Biomaterials* vol 26, pp. 2611–2619, 2005
- [67] J.M. García Páez, E. Jorge-Herrero, A. Carrera, I. Millán, A. Rocha, P. Calero, A.Cordón, N. Sainz, and J.L. Castillo-Olivares, "Ostrich pericardium, a biomaterial for the construction of valve leaflets for cardiac bioprotheses: mechanical behaviour, selection and interaction with suture materials". *Biomaterials*, vol. 22, no. 20, pp. 2731–2740, 2001
- [68] M.M. Maestro, J. Turnay, N. Olmo, P. Fernández, D. Suárez, J.M. García Páez, S. Urillo, M.A.Lizarbe, and E. Jorge-Herrero, "Biochemical and mechanical behavior of ostrich pericardium as a new biomaterial.," *Acta Biomaterialia*, vol. 2, no. 2, pp. 213–219, 2006
- [69] W.M. Neethling, S. Cooper, J.J. Van Den Heever, J. Hough, A.J. Hodge. "Evaluation of kangaroo pericardium as an alternative substitute for reconstructive cardiac surgery". *Journal of Cardiovascular Surgery*, vol. 43, 301–306, 2002
- [70] R. Claramunt, J.M. García Páez, L. Alvarez, A. Ros, and M.C. Casado, "Fatigue behaviour of young ostrich pericardium", *Material Sciences and Engineering C*, vol. 32, no. 6, pp.1415-1420, 2012.

- [71] A. Trowbridge, C. Corfts, P. Lawford, M.M. Black. "Chapter 2. The mechanical properties of natural and chemically modified bovine pericardium for use with heart valve substitutes". *Material properties and stress analysis in biomechanics*, Manchester University Press, 1989, 282 páginas, ISBN: 0-7190-25214
- [72] F.M. Sánchez-Arévalo, M. Farfán, D. Covarrubias, R. Zenit, G. Pulos, "The micromechanical behavior of lyophilized glutaraldehyde-treated bovine pericardium under uniaxial tension.," *Journal of Mechanical Behaviour of Biomedical Materials*, vol. 3, nº 8, pp. 640–646, 2010
- [73] Mirnajafi, J. Raymer, M.J. Scott, M.S. Sacks, "The effects of collagen fiber orientation on the flexural properties of pericardial heterograft biomaterials" *Biomaterials*, vol. 26, no. 7, pp. 795–804, 2005
- [74] K.H. Sizeland, H.C. Wells, J. Higgins, C. M. Cunanan, N. Kirby, A. Hawley, S. T. Mudie, R.G. Haverkamp, "Age Dependent Differences in Collagen Alignment of Glutaraldehyde Fixed Bovine Pericardium". *BioMed Research International*, vol. 2014, 1-10, 2014
- [75] M.S. Sacks. "Incorporation of experimentally-derived fiber orientation into a structural constitutive model for planar collagenous tissues". *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 125, no. 2, pp. 280–287, 2003
- [76] A. Carrera, J.M. García Páez, E. Jorge Herrero, J.V. García Sestafe, I.J. Millán, A. Cordon, M. Martín Maestro, P. Calero, G. Téllez, J.L. Castillo-Olivares. "Pretensado y comportamiento mecánico del pericardio de ternera utilizado en la construcción de bioprótesis cardíacas," *Biomecánica*, vol. 9, no. 1, pp. 3–11, 2001
- [77] W. Sun, M. Sacks, G. Fulchiero, et al., "Response of heterograft heart valve biomaterials to moderate cyclic loading". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 69A, pp. 658–669, 2004
- [78] M.S. Sacks, C.J. Chuong, "Orthotropic mechanical properties of chemically treated bovine pericardium". *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 26, no. 5, pp. 892–902, 1998
- [79] T.L. Sellaro, D. Hildebrand, Q.J. Lu, N. Vyavahare, M. Scott, M.S. Sacks, "Effects of collagen fiber orientation on the response of biologically derived soft tissue biomaterials to cyclic loading". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 80A, pp. 194–205, 2007
- [80] J.M. García Páez, R. Claramunt, E.J. Herrero, I. Millan, J.R. Tolmos, L. Alvarez, A. Cordon, S. Rocha, P. Sanz, B. Ayuso, A. Ros, "Energy consumption as a predictor test of the durability of a biological tissue employed in cardiac bioprosthesis". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 89A, pp. 336–344, 2009
- [81] F.J. Rojo, J.M. García Páez, E. Jorge-Herrero, J.M. Atienza, I. Millán, A. Rocha, A.H.F. de Córdova, G.V. Guinea. "Optimal selection of biological tissue using the energy dissipated in the first loading cycle". *Journal of Biomedical Materials Research: Part B Applied Biomaterials*, vol. 95B, no 2, pp. 414-20, 2010
- [82] R. Claramunt, J.M. García Páez, L. Alvarez, J. Spottorno, A. Ros, M.C. Casado, "Short-term fatigue testing can predict medium-term pericardium behaviour". *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 4, pp. 1929-1935, 2011

- [83] C. Martin and W. Sun, "Modeling of long-term fatigue damage of soft tissue with stress softening and permanent set effects," *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, vol. 12, no. 4, pp. 645–655, 2014
- [84] E.A. Trowbridge, C.E. Crofts, "The tearing strength of glutaraldehyde fixed bovine pericardium" *Biomaterials, artificial cells and artificial organs*. Vol. 17, no. 3, pp. 315-28, 1989
- [85] J.M. García Páez, A. Carrera, E. Jorge, I. Millán, A. Cordon, M.A. Maestro, A. Rocha, J.L. Castillo-Olivares. "Resistance to tearing of calf and ostrich pericardium: influence of the type of suture material and the direction of the suture line". *Journal of Biomedical Materials Research: Part B Applied Biomaterials*. 15;69(2):pp. 125-34, 2004
- [86] A. Carrera, A. Rocha, M.A. Maestro, S. Morales, J.L.C. Olivares, "Propagación del desgarro de tejido biológico empleado en la construcción de bioprótesis cardíacas en función de la forma y el tipo de sutura," *Biomecánica: órgano de la Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales*. Vol. 13, no. 1, pp. 40–50, 2005
- [87] J.M. García Páez, A. Carrera, E. Jorge, I. Millán, A. Cordon, M.A. Maestro, A. Rocha, S. Morales, J.L. Castillo-Olivares, "Determination of the force necessary for the propagation of tears in ostrich and calf pericardium". *Journal of Biomedical Materials Research: Part B Applied Biomaterials*. Vol. 79, no 2, pp. 229-235, 2006
- [88] J.M. García Páez, E. Jorge, R. Claramunt, I. Millán, A. Rocha, B. Martínez, A. Cordon, A. Ros. Propagation of tears in pericardium from young bulls: influence of the suture. *Artificial Organs*, vol. 34, nº 3, pp. 65-71, 2010
- [89] J. Walraevens, B. Willaert, G. De Win, A. Ranftl, J. De Schutter, J.V. Sloten. "Correlation between compression, tensile and tearing tests on healthy and calcified aortic tissues". *Medical Engineering & Physics*, Vol. 30, no. 9, pp. 1098-104, 2008
- [90] VISCOFAN, INDUSTRIA NAVARRA DE ENVOLTURAS CELULÓSICAS, S.A. *Bolsa de colágeno flexible y procedimiento de elaboración*. Inventor: V. Etayo Garraida. España, solicitud de patente. WO2000071437A1. 30-11-2000
- [91] OBSHESTVO S OGRANICHENNOI OTV. *Multilayer tubular food casing with variable outer layer thickness the outer layer having relief fibrous-netlike structure*. Inventores: Sergei Vasilievich Borodaev, Alexandr Vladimirovi Davidenko. Solicitud de patente. WO2006112753 A2. 26-10-2006
- [92] B. Purinya, V. Kasyanov, J. Volkolakov, R. Latsis, G. Tetere, "Biomechanical and structural properties of the explanted bioprosthetic valve leaflets". *Journal of Biomechanics*, vol. 27, pp. 1–11, 1994
- [93] J.M. García Páez et al., "Chemical treatment and tissues selection: factors that influence the mechanical behavior of porcine pericardium" *Biomaterials*, vol.22, pp. 2759-2767, 2001.
- [94] A. Braga-Vilela, E. Pimentel, S. Marangoni et al., "Extracellular Matrix of Porcine Pericardium: Biochemistry and Collagen Architecture". *Journal of Membrane Biology* vol. 221, no.1, pp. 15-25, 2008.

- [95] L.H.H. OldeDamink, P.J. Dijkstra, M.J.A. VanLuyn, P.B. VanWachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, "Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials," *Journal of materials science: materials in medicine*, vol. 4530, no. XIII, pp. 460-472, 1995
- [96] E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, P.I. Cook, "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides", *Analytical Biochemistry*, vol. 34, pp. 595-598, 1970
- [97] Sigma-Aldrich
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/151173?lang=es®ion=ES>>
- [98] D.A. Skoog, F.J. Holler; S.R. Crouch "Principios de análisis instrumental", Cengage, Sexta edición, 2008, 1.042 páginas, ISBN-13: 9789706868299
- [99] M. Fountoulakis, H.W. Lahm, "Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins," *Journal of chromatography A*, vol. 826, no. 2, pp. 109–134, 1998
- [100] G. Guinea, J.M. Atienza, P. Fantidis, A. Ortega, M. Torres, P. González, M.L. Elices, K. Hayashi, M. Elices, "Increases of Corporal Temperature as a Risk Factor of Atherosclerotic Plaque Instability", *Annals of Biomedical Engineering* vol. 36, no 1, pp. 66-76, 2008
- [101] R.E. Neuman, M.A. Logan. "The determination of hydroxiprolin". *The journal of Biological Chemistry*, no. 184, pp. 299-306, 1950
- [102] J.M. Atienza, G.V. Guinea, F.J. Rojo, R.J. Burgos, C. García-Montero, F.J. Goicolea, P. Aragoncillo, M. Elices, "Influencia de la presión y la temperatura en el comportamiento de la aorta y las carótidas humanas", *Revista Española de Cardiología*, vol. 60, nº 3, pp. 259-267, 2007
- [103] ASTM. *Standard Test Method for Propagation Tear Resistance of Plastic Film and Thin Sheeting by Pendulum Method*. D1922-03a. West Conshohocken, PA: ASTM International: 2003
- [104] ASTM. *Standard Test Method for Internal Tearing Resistance of Paper* (Withdrawn 2009). D689-03. West Conshohocken, PA: ASTM International: 2003
- [105] P.P. Purslow. "Measurement of the fracture toughness of extensible connective tissues", *Journal of Materials Science*. 18(12) 3591-3598, 1983
- [106] A.G. Atkins, Y.W. Mai. "Elastic and Plastic Fracture: Metals, Polymers, Ceramics, Composites, Biological Materials". *Wiley*, New York, 1985
- [107] T.J. Sproule, D.C. Roopenian, J.P. Sundberg. "A direct method to determine the strength of the dermal –epidermal junction in a mouse model for epidermolysis eullosa", *Experimental Dermatology* 21(6):453–455, 2012
- [108] E.H. Andrews, T.A. Khan, N.A. Lockington. "Adhesion to skin, Part 2. Measurement of interfacial energies for pressure sensitive adhesives". *Journal of Materials Science*, 22(8)2833-2841, 1987
- [109] A.C. Karwoski, R.H. Plaut. "Experiments on peeling adhesive tapes from human forearms". *Skin Research and Technology*, 10(4) 271–277, 2004

- [110] M. Kita, M.F. Marmor. "Retinal adhesive force in living rabbit, cat, and monkey eyes". *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 33(6) 1879-82, 1992
- [111] K.S. Wu, M.M. Stefik, K.P. Ananthapadmanabhan, R.H. Dauskardt. "Graded delamination behavior of human stratum corneum", *Biomaterials* 27, 5861–5870, 2006
- [112] M. Elices. "Mecánica de la Fractura", Publicaciones de la Escuela de Ingenieros de Caminos de Madrid, 2005, Madrid .

Anejos

Anejo A

Imágenes de microscopía

Anejo A. Imágenes de microscopía

A continuación se recogen las imágenes tomadas con un microscopio electrónico de barrido (SEM – JEOL: Departamento de Ciencia de Materiales, ETSI Caminos, Canales y Puertos). Las muestras corresponden a pericardio y membranas artificiales.

Para observar las muestras en el SEM – JEOL (JEOL JSM-6300), es necesario someterlas a un proceso de metalización. Para la correcta observación de las muestras, éstas se recubrieron mediante pulverización, de una fina capa de oro de entre 1 y 20 nm. El grosor de la capa depende del tiempo de metalización. Esto se hizo gracias a un metalizador “Sputter coater” SC7620 (Emitech).

El tiempo de metalización de algunas muestras fue de 60 segundos y de otras fue de 15 segundos. Se redujo el tiempo de metalizado de 60 s a 15 s porque la capa de oro era demasiado gruesa y, en algunos casos, no se podían observar correctamente las estructuras.

Las muestras se examinaron con una intensidad y un voltaje de 6×10^{-11} A y 10 kV, respectivamente.

Pericardio. Probeta de rasgado

Figura 1. Probeta de un ensayo de rasgado (Probeta 10AC)

Figura 2. Esquema de la probeta de rasgado

- Tiempo de metalización de la muestra: 15 s

Figura 3. Intersección de la superficie cortada por el láser y de fractura por rasgado.
Orientación de la probeta: horizontal

Figura 4. Superficie de fractura por rasgado. Orientación de la probeta: horizontal

Figura 5. Superficie de fractura por rasgado. Orientación de la probeta: vertical

Figura 6. Superficie cortada por el láser. Orientación de la probeta: vertical

Figura 7. Superficie delaminada. Orientación de la probeta: vertical

- Tiempo de metalización de la muestra: 60 s

Figura 8. Superficie de fractura por rasgado. Orientación de la probeta: vertical

Membranas artificiales. Probeta fisura interior (Probeta L2_2mm)

Figura 9. Probeta de un ensayo de tracción con fisura interior (Probeta L2_2mm)

Figura 10. Esquema de la probeta con fisura interior (Probeta L2_2mm)

- Tiempo de metalización de la muestra: 15 s

Figura 11. Intersección de la superficie cortada por el láser y de fractura por rasgado. Inicio del rasgado a la izquierda de cada imagen y superficie cortada por el láser a la derecha de cada imagen

Figura 12. Superficie de fractura por rasgado. Orientación de la probeta: horizontal

Figura 13. Superficie de fractura por rasgado. Orientación de la probeta: vertical

Figura 14. Superficie cortada por el láser. Orientación de la probeta: horizontal

Figura 15. Superficie cortada por el láser. Orientación de la probeta: vertical

Membranas artificiales. Probeta de rasgado (Probeta T13)

Figura 16. Probeta de un ensayo de rasgado (Probeta T13)

- Tiempo de metalización de la muestra: 60 s

Figura 17. Intersección de la superficie cortada por el láser y de fractura por rasgado.
Orientación de la probeta: horizontal

Figura 18. Superficie cortada por el láser. Orientación de la probeta: horizontal

Figura 19. Superficie de fractura por rasgado. Orientación de la probeta: horizontal

Figura 20. Superficie de fractura por rasgado. Orientación de la probeta: vertical

Anejo B

Protocolo para la realización del test de ninhidrina

Anejo B. Protocolo para la realización del test de ninhidrina

Se seleccionaron fragmentos de pericardio y de membranas artificiales de colágeno de un tamaño aproximado de 5 mm x 5 mm, tratado y no tratado.

En el caso del material tratado, se retiró el exceso de glicerol con papel secante.

Con el objetivo de limpiar las muestras, se introdujeron en agua destilada durante 30 minutos y se agitaron. Este paso se repitió dos veces más cambiando el agua destilada entre cada paso.

Se cogieron tantos microtubos como muestras y se pesaron uno a uno en una balanza de precisión.

Se secaron las muestras con papel absorbente y posteriormente se colocaron cada una en un microtubo, agregándose 1 ml de la solución de Ninhidrina (0.1 M) en cada uno.

Los microtubos se elevaron a una temperatura de 95°C durante 20 minutos a 700 rpm para que se produjese la reacción. Una vez producida, los microtubos se atemperaron durante 5 minutos.

Con una micropipeta se recogió la solución que había reaccionado (1 ml) y se puso en una cubeta de plástico para medir su absorbancia en el espectrofotómetro. Para ello, se empleó un espectrofotómetro Halo RB-10 de la marca Dynamica. La precisión en la medida de la longitud de onda es de ± 0.5 nm, el nivel de ruido de 0.0005 Abs a 500 nm y la desviación de la luz $\leq 0.05\%$. Previamente a las medidas se realizó la calibración del espectrofotómetro a una longitud de onda de 567 nm empleando como blanco 1 ml de solución de Ninhidrina.

Con el dato de la absorbancia (Abs) y mediante la ley de Beer-Lambert ($Abs = \epsilon \cdot l \cdot c$), se calculó la concentración de grupos $-NH_2$ (c) presentes en cada muestra.

Siendo:

Abs (adimensional): absorbancia.

$\epsilon = 1.640$ l/mol.cm: coeficiente de extinción molar para la ninhidrina

$l = 1$ cm: anchura de la muestra

c (mol/l): concentración molar de los grupos amino que han reaccionado

Se dejaron secar las muestras durante 12 horas a 65°C. Cada microtubo se pesó en la balanza de precisión con la muestra en su interior para determinar su peso en seco. Con este dato, se calculó la concentración de grupos $-NH_2$ por masa de muestra seca para, por último, calcular el entrecruzamiento de cada muestra.

Anejo C

Informes de los análisis de aminoácidos

Anejo C. Informes de los análisis de aminoácidos

En este anejo se incluyen los datos de los análisis de aminoácidos realizados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC) de Madrid.

Los informes que se adjuntan en el presente anejo pertenecen a las siguientes muestras:

	Muestra	Fecha de análisis
Pericardio sin tratar	P1A	Abril 2014
	P1B	Abril 2014
	P2A	Abril 2014
	P2B	Abril 2014
	P3A	Abril 2014
	P3B	Abril 2014
Pericardio tratado	A1	Abril 2014
	A2	Abril 2014
	B1	Abril 2014
	B2	Abril 2014
	C1	Abril 2014
	C2	Abril 2014
Membranas artificiales sin tratar	V1A	Abril 2012
	V1B	Abril 2012
	V0A	Junio 2012
	V0B	Junio 2012
	X1	Abril 2014
	X2	Abril 2014
Membranas artificiales tratadas	V1A	Abril 2014
	V1B	Abril 2014
	V2A	Abril 2014
	V2B	Abril 2014
	V3A	Abril 2014
	V4B	Abril 2014

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 27-3-2014\calibracion 201400403 (11,12,13).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140404_001.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: P1A

% inyectado:1

nmoles de norleucina esperados: 1

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.47	2496911	4.53
Thr	14.23	1009278	1.87
Ser	15.47	1782570	3.24
Glu	19.20	3843051	6.71
Gly	26.33	14972581	23.96
Ala	27.76	5274753	8.98
Cys	28.46	286109	0.91
Val	29.50	1463703	2.59
Met	31.53	326983	0.79
Ile	33.30	746863	1.48
Leu	34.30	1660876	3.09
Nleu	35.36	636954	0.98
Tyr	37.53	340861	0.67
Phe	38.63	869776	1.56
OHlys	44.30	456862	0.78
His	46.13	320138	0.57
Lys	46.96	1493444	2.44
Arg	58.16	2376016	4.46

Totals		40357729	69.58
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 27-3-2014\calibracion 201400403 (11,12,13).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140404_001.dat

Date:04/04/2014 13:18:48

Analista:Emilia Aporta

Muestra: P1A

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.499	688387	8.237
Pro	20.465	1615344	9.313

Totals		2303731	17.550
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 27-3-2014\calibracion 201400403 (11,12,13).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140404_002.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: P1B

% inyectado:1

nmoles de norleucina esperados: 1

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.33	2574377	4.67
Thr	14.10	1031772	1.91
Ser	15.30	1876251	3.41
Glu	19.00	4084370	7.13
Gly	26.13	15563437	24.90
Ala	27.53	5548950	9.44
Cys	28.43	260057	0.82
Val	29.46	1624794	2.87
Met	31.50	389091	0.94
Ile	33.23	814500	1.61
Leu	34.23	1751791	3.25
Nleu	35.33	703486	1.09
Tyr	37.53	357031	0.70
Phe	38.63	909228	1.63
OHlys	44.30	488531	0.83
His	46.10	340729	0.60
Lys	46.96	1512786	2.47
Arg	58.16	2520558	4.73

Totals		42351739	73.02
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 27-3-2014\calibracion 201400403 (11,12,13).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140404_002.dat

Date: 04/04/2014 14:41:57

Analista: Emilia Aporta

Muestra: PIB

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.399	762734	9.127
Pro	20.299	1692504	9.758

Totals		2455238	18.885
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 27-3-2014\calibracion 201400403 (11,12,13).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140404_003.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: P2A

% inyectado:0.5

nmoles de norleucina esperados:0.5

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.33	2971419	5.39
Thr	14.10	1158797	2.14
Ser	15.33	2153700	3.92
Glu	19.00	4760256	8.31
Gly	26.16	18143437	29.03
Ala	27.56	6716783	11.43
Cys	28.43	284861	0.90
Val	29.43	1733161	3.07
Met	31.46	391429	0.94
Ile	33.23	878745	1.74
Leu	34.23	1958719	3.64
Nleu	35.30	382849	0.59
Tyr	37.50	361887	0.71
Phe	38.60	1025289	1.84
OHlys	44.33	487989	0.83
His	46.06	363277	0.64
Lys	46.96	1795561	2.93
Arg	58.13	2924064	5.49

Totals		48492223	83.54
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 27-3-2014\calibracion 201400403 (11,12,13).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140404_003.dat

Date:04/04/2014 16:05:09

Analista:Emilia Aporta

Muestra: P2A

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.399	862938	10.326
Pro	20.299	1999986	11.531

Totals		2862924	21.857
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 27-3-2014\calibracion 201400403 (11,12,13).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140404_004.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: P2B

% inyectado:0.5

nmoles de norleucina esperados:0.5

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.33	2834516	5.14
Thr	14.10	1071731	1.98
Ser	15.30	2021919	3.68
Glu	18.97	4527869	7.90
Gly	26.13	17768287	28.43
Ala	27.53	6586715	11.21
Cys	28.43	262465	0.83
Val	29.43	1709297	3.02
Met	31.46	369563	0.89
Ile	33.23	883734	1.75
Leu	34.23	1915153	3.56
Nleu	35.33	404098	0.62
Tyr	37.53	366834	0.72
Phe	38.63	1004623	1.80
OHlys	44.33	479733	0.82
His	46.10	343509	0.61
Lys	46.96	1707136	2.79
Arg	58.16	2860399	5.37

Totals		47117581	81.12
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 27-3-2014\calibracion 201400403 (11,12,13).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140404_004.dat

Date:04/04/2014 17:28:14

Analista:Emilia Aporta

Muestra: P2B

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.366	821295	9.828
Pro	20.265	1988620	11.465

Totals		2809915	21.293
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 27-3-2014\calibracion 201400403 (11,12,13).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140403_006.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: P3A

% inyectado:2

nmoles de norleucina esperados:2

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.33	2322586	4.21
Thr	14.10	888147	1.64
Ser	15.30	1640571	2.98
Glu	18.97	3666648	6.40
Gly	26.10	14723034	23.56
Ala	27.53	5099051	8.68
Cys	28.46	214426	0.68
Val	29.46	1291668	2.28
Met	31.50	321085	0.77
Ile	33.26	687835	1.36
Leu	34.23	1518253	2.82
Nleu	35.33	1398173	2.16
Tyr	37.53	291550	0.58
Phe	38.63	806195	1.44
OHlys	44.33	418763	0.71
His	46.10	281248	0.50
Lys	47.00	1396011	2.28
Arg	58.16	2311993	4.34

Totals		39277237	67.40
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 27-3-2014\calibracion 201400403 (11,12,13).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140403_006.dat

Date:03/04/2014 20:10:37

Analista:Emilia Aporta

Muestra: P3A

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.366	671753	8.038
Pro	20.265	1526858	8.803

Totals		2198611	16.841
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 27-3-2014\calibracion 201400403
(11,12,13).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140404_007.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: P3B

% inyectado:1

nmoles de norleucina esperados:1

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.30	1746755	3.17
Thr	14.10	679688	1.26
Ser	15.30	1305832	2.37
Glu	18.97	2787234	4.87
Gly	26.06	11334897	18.14
Ala	27.50	3869084	6.59
Cys	28.43	151287	0.48
Val	29.43	1054158	1.86
Met	31.46	239437	0.58
Ile	33.23	538067	1.06
Leu	34.23	1149986	2.14
Nleu	35.30	754692	1.17
Tyr	37.50	226738	0.45
Phe	38.60	608821	1.09
OHlys	44.30	330516	0.56
His	46.03	226782	0.40
Lys	46.96	1003171	1.64
Arg	58.13	1792526	3.36

Totals		29799671	51.18
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 27-3-2014\calibracion 201400403 (11,12,13).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140404_007.dat

Date:04/04/2014 21:37:45

Analista:Emilia Aporta

Muestra: P3B

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.366	503529	6.025
Pro	20.265	1158856	6.681

Totals		1662385	12.707
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 11-4-2014\calibracion 20140411 (22,23,24).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140411_016.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: A1

% inyectado:2

nmoles de norleucina esperados: 2

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.27	1695996	3.05
Thr	14.07	691581	1.26
Ser	15.27	1351555	2.61
Glu	18.90	3072474	5.52
Gly	26.03	12463720	22.04
Ala	27.46	4576252	8.20
Cys	28.46	196125	0.31
Val	29.43	952550	1.62
Met	31.43	392999	0.70
Ile	33.20	399518	0.72
Leu	34.20	1161896	1.98
Nleu	35.30	1329640	2.05
Tyr	37.46	225923	0.41
Phe	38.60	727359	1.22
OHlys	44.33	90846	0.17
His	45.96	140762	0.23
Lys	46.93	332842	0.51
Arg	58.10	1518139	2.53

Totals		31320177	55.14
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 11-4-2014\calibracion 20140411 (22,23,24).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140411_016.dat

Date: 12/04/2014 12:00:00

Analista: Emilia Aporta

Muestra: A1

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.333	467434	5.928
Pro	20.199	1277897	6.848

Totals		1745331	12.776
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 11-4-2014\calibracion 20140411 (22,23,24).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140411_017.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: A2

% inyectado:2

nmoles de norleucina esperados: 2

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.30	1990467	3.58
Thr	14.07	805374	1.47
Ser	15.27	1438190	2.78
Glu	18.90	3034973	5.45
Gly	26.03	13330283	23.58
Ala	27.46	4834448	8.66
Cys	28.50	227185	0.36
Val	29.43	1354618	2.30
Met	31.46	292949	0.52
Ile	33.23	587994	1.06
Leu	34.23	1440119	2.45
Nleu	35.33	1306885	2.01
Tyr	37.53	307112	0.56
Phe	38.63	825359	1.39
OHlys	44.33	89304	0.17
His	46.03	181102	0.30
Lys	47.00	409716	0.63
Arg	58.16	1916035	3.20

Totals		34372113	60.46
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 11-4-2014\calibracion 20140411 (22,23,24).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140411_017.dat

Date: 12/04/2014 13:23:05

Analista: Emilia Aporta

Muestra: A2

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.366	558903	7.088
Pro	20.232	1531954	8.210

Totals		2090857	15.297
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 11-4-2014\calibracion 20140411 (22,23,24).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140411_018.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: B1

% inyectado:2

nmoles de norleucina esperados: 2

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.30	2066305	3.71
Thr	14.07	746167	1.36
Ser	15.30	1555666	3.00
Glu	18.90	3327425	5.98
Gly	26.06	14943762	26.43
Ala	27.50	5153251	9.24
Cys	28.46	190754	0.31
Val	29.43	866878	1.47
Met	31.46	396056	0.71
Ile	33.23	438705	0.79
Leu	34.23	1279462	2.18
Nleu	35.30	1329988	2.05
Tyr	37.50	243055	0.44
Phe	38.63	808348	1.36
OHlys	44.36	146003	0.27
His	45.96	178987	0.30
Lys	46.93	430436	0.66
Arg	58.10	2045079	3.41

Totals		36146327	63.66
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 11-4-2014\calibracion 20140411 (22,23,24).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140411_018.dat

Date: 12/04/2014 14:46:15

Analista: Emilia Aporta

Muestra: B1

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.366	650340	8.247
Pro	20.199	1650838	8.847

Totals		2301178	17.094
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 11-4-2014\calibracion 20140411 (22,23,24).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140411_068.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: B2

% inyectado:0.5

nmoles de norleucina esperados: 1

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.27	1759562	3.16
Thr	14.03	651705	1.19
Ser	15.27	1277887	2.47
Glu	18.90	2763225	4.97
Gly	26.00	11978470	21.19
Ala	27.43	4044185	7.25
Cys	28.40	176488	0.28
Val	29.40	822511	1.39
Met	31.43	254356	0.45
Ile	33.20	432816	0.78
Leu	34.20	1153935	1.96
Nleu	35.26	718427	1.11
Tyr	37.46	240379	0.44
Phe	38.60	671477	1.13
OHlys	44.26	104119	0.20
His	46.00	170200	0.28
Lys	46.93	365592	0.56
Arg	58.10	1762802	2.94

Totals		29348136	51.74
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 11-4-2014\calibracion 20140411 (22,23,24).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140411_068.dat

Date: 15/04/2014 13:48:58

Analista: Emilia Aporta

Muestra: B2

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.333	486030	6.164
Pro	20.199	1290924	6.918

Totals		1776954	13.082
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 11-4-2014\calibracion 20140411 (22,23,24).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140411_020.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: C1

% inyectado:2

nmoles de norleucina esperados: 2

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.30	2041141	3.67
Thr	14.07	715257	1.30
Ser	15.30	1552746	3.00
Glu	18.93	3285271	5.90
Gly	26.10	15017765	26.56
Ala	27.50	5281707	9.47
Cys	28.46	208576	0.33
Val	29.46	898520	1.52
Met	31.46	421341	0.75
Ile	33.23	432167	0.78
Leu	34.23	1286569	2.19
Nleu	35.33	1335518	2.05
Tyr	37.53	242062	0.44
Phe	38.63	805057	1.35
OHlys	44.33	157499	0.30
His	46.03	181038	0.30
Lys	46.96	421028	0.65
Arg	58.13	1934903	3.23

Totals		36218165	63.80
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 11-4-2014\calibracion 20140411 (22,23,24).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140411_020.dat

Date: 12/04/2014 17:32:35

Analista: Emilia Aporta

Muestra: C1

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.366	593659	7.529
Pro	20.232	1513275	8.109

Totals		2106934	15.638
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 11-4-2014\calibracion 20140411 (22,23,24).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140411_021.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: C2

% inyectado:2

nmoles de norleucina esperados: 2

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.30	2497529	4.49
Thr	14.10	917326	1.67
Ser	15.30	1925297	3.72
Glu	18.93	4062372	7.30
Gly	26.10	17586354	31.11
Ala	27.53	6319248	11.33
Cys	28.46	240971	0.39
Val	29.46	1041825	1.77
Met	31.50	475220	0.85
Ile	33.26	538956	0.97
Leu	34.23	1569559	2.67
Nleu	35.33	1326607	2.04
Tyr	37.53	310417	0.57
Phe	38.63	994412	1.67
OHlys	44.30	30296	0.06
His	46.03	222309	0.37
Lys	46.96	508991	0.78
Arg	58.13	2534193	4.23

Totals		43101882	75.96
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 11-4-2014\calibracion 20140411 (22,23,24).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140411_021.dat

Date: 12/04/2014 18:55:49

Analista: Emilia Aporta

Muestra: C2

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.366	710440	9.010
Pro	20.232	1848194	9.904

Totals		2558634	18.914
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2012\ninhidrina 26-4-2012\calibracion 20120426 (11,12,13).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2012\abril 2012\20120427_002.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: V1A

% analizado:1

nmoles de norleucina esperados:1

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.37	1234135	2.13
Thr	14.13	607537	1.08
Ser	15.33	963715	1.84
Glu	19.00	1883768	3.13
Gly	26.03	9594119	16.02
Ala	27.53	3087901	5.13
Cys			0.00 BDL
Val	30.26	804609	1.29
Met	32.40	215822	0.33
Ile	34.20	425059	0.70
Leu	35.20	773707	1.24
Nleu	36.26	623894	1.01
Tyr	38.53	151160	0.26
Phe	39.63	440699	0.73
OHLys	45.76	490021	0.88
His	47.53	146016	0.24
Lys	48.50	872383	1.32
Arg	59.86	1337884	2.27

Totals		23652429	39.61
--------	--	----------	-------

SERVICIO DE QUÍMICA DE PROTEÍNAS

INFORME DE ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS
PNA-SQP004-F03 ED.01 (Fecha: 13/12/10)

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2012\ninhidrina 26-4-2012\calibracion 20120426 (11,12,13).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2012\abril 2012\20120427_002.dat

Date: 27/04/2012 15:51:22

Analista: Emilia Aporta

Muestra: V1A

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
OHpro	11.466	438928	4.824
Pro	20.299	1158090	6.090

Totals		1597018	10.914
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2012\ninhidrina 26-4-2012\calibracion 20120426 (11,12,13).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2012\abril 2012\20120427_003.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: V1B

% analizado:1

nmoles de norleucina esperados:1

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.37	1380971	2.39
Thr	14.13	618237	1.10
Ser	15.33	1086762	2.07
Glu	19.00	2174046	3.61
Gly	26.03	10438063	17.43
Ala	27.50	3380466	5.62
Cys	29.70	62573	0.11
Val	30.26	783983	1.25
Met	32.36	269440	0.42
Ile	34.20	469808	0.78
Leu	35.20	850461	1.37
Nleu	36.30	680179	1.10
Tyr	38.50	152243	0.26
Phe	39.63	464091	0.77
OHLYs	45.76	463710	0.83
His	47.53	159598	0.26
Lys	48.50	934202	1.41
Arg	59.86	1516129	2.57

Totals		25884962	43.35
--------	--	----------	-------

SERVICIO DE QUÍMICA DE PROTEÍNAS

INFORME DE ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS
PNA-SQP004-F03 ED.01 (Fecha: 13/12/10)

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2012\ninhidrina 26-4-2012\calibracion 20120426 (11,12,13).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2012\abril 2012\20120427_003.dat

Date: 27/04/2012 17:15:19

Analista: Emilia Aporta

Muestra: V1B

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
OHpro	11.466	498889	5.483
Pro	20.332	1278290	6.723

Totals		1777179	12.206
--------	--	---------	--------

SERVICIO DE QUÍMICA DE PROTEÍNAS

INFORME DE ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS
PNA-SQP004-F03 ED.01 (Fecha: 13/12/10)

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2012\ninidrina 28-6-2012\calibracion 20120713 (18,19,20).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2012\Junio 2012\20120713_010.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: V0A

% de muestra inyectada:1

nmoles de norleucina esperados:1

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.17	1402852	2.47
Thr	13.93	523255	0.93
Ser	15.13	1059615	1.92
Glu	18.53	2328035	3.93
Gly	25.47	10779047	18.26
Ala	26.86	3651815	6.24
Cys	28.80	98836	0.16
Val	29.53	910013	1.48
Met	31.60	319442	0.53
Ile	33.50	505000	0.85
Leu	34.46	948867	1.53
Nleu	35.56	628219	1.01
Tyr	37.76	137669	0.24
Phe	38.93	475327	0.80
OHlys	45.23	222551	0.39
His	46.86	160087	0.26
Lys	48.06	1017117	1.54
Arg	59.70	1564248	2.57

Totals		26731995	45.13
--------	--	----------	-------

SERVICIO DE QUÍMICA DE PROTEÍNAS

INFORME DE ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS
PNA-SQP004-F03 ED.01 (Fecha: 13/12/10)

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2012\ninhydrina 28-6-2012\calibracion 20120713 (18,19,20).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2012\Junio 2012\20120713_010.dat

Date: 13/07/2012 23:55:15

Analista: Emilia Aporta

Muestra: V0A

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
OHpro	11.333	447553	4.991
Pro	19.932	1319670	6.682
Totals		1767223	11.673

SERVICIO DE QUÍMICA DE PROTEÍNAS

INFORME DE ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS
PNA-SQP004-F03 ED.01 (Fecha: 13/12/10)

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2012\ninidrina 28-6-2012\calibracion 20120713 (18,19,20).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2012\Junio 2012\20120713_011.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: V0B

% de muestra inyectada:1

nmoles de norleucina esperados:1

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.13	1590127	2.80
Thr	13.97	573411	1.02
Ser	15.10	1155553	2.09
Glu	18.53	2616577	4.42
Gly	25.50	12076510	20.46
Ala	26.90	4100828	7.01
Cys	28.76	103366	0.17
Val	29.53	963441	1.57
Met	31.60	334803	0.56
Ile	33.50	617810	1.04
Leu	34.46	1039467	1.68
Nleu	35.60	666753	1.07
Tyr	37.76	138590	0.25
Phe	38.93	557324	0.94
OHlys	45.23	255230	0.45
His	46.83	180241	0.29
Lys	48.03	1158744	1.75
Arg	59.70	1800431	2.96

Totals		29929206	50.53
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2012\ninhydrina 28-6-2012\calibracion 20120713 (18,19,20).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2012\Junio 2012\20120713_011.dat

Date: 14/07/2012 01:18:20

Analista: Emilia Aporta

Muestra: V0B

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
OHpro	11.333	498513	5.559
Pro	19.932	1503986	7.615

Totals		2002499	13.175
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140424_011.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: X1

% inyectado:2

nmoles de norleucina esperados: 2

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.17	2668461	4.65
Thr	13.83	961812	1.72
Ser	15.03	1942874	3.66
Glu	18.57	4401191	7.47
Gly	25.60	18126629	30.71
Ala	26.96	6561568	10.90
Cys	28.73	83600	0.15
Val	29.50	1295861	2.17
Met	31.56	386642	0.70
Ile	33.33	696428	1.24
Leu	34.40	1557913	2.62
Nleu	35.50	1258772	1.96
Tyr	37.90	177765	0.32
Phe	39.06	843928	1.41
OHlys	44.83	350298	0.61
His	46.46	209321	0.34
Lys	47.53	1609522	2.40
Arg	58.86	2899933	4.77

Totals		46032518	77.80
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140424_011.dat

Date: 25/04/2014 02:26:07

Analista: Emilia Aporta

Muestra: X1

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.233	878399	9.876
Pro	19.832	2296965	12.109

Totals		3175364	21.985
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140424_012.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: X2

% inyectado:2

nmoles de norleucina esperados: 2

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.17	2805483	4.89
Thr	13.83	1001881	1.79
Ser	15.03	2008825	3.79
Glu	18.60	4564114	7.74
Gly	25.63	18771580	31.81
Ala	26.96	6834819	11.35
Cys	28.70	24600	0.04
Val	29.50	1233669	2.07
Met	31.60	436341	0.79
Ile	33.36	717701	1.28
Leu	34.40	1605442	2.70
Nleu	35.53	1239784	1.93
Tyr	37.90	178644	0.32
Phe	39.10	890791	1.49
OHlys	44.83	345676	0.60
His	46.43	214225	0.35
Lys	47.53	1663781	2.48
Arg	58.86	2906496	4.78

Totals		47443852	80.19
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140424_012.dat

Date: 25/04/2014 03:50:11

Analista: Emilia Aporta

Muestra: X2

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.233	916685	10.306
Pro	19.832	2415309	12.733

Totals		3331994	23.040
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140424_013.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: V1A

% inyectado:2

nmoles de norleucina esperados: 2

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.13	2759745	4.81
Thr	13.83	1077633	1.93
Ser	15.00	2066521	3.90
Glu	18.57	4461848	7.57
Gly	25.63	18630648	31.57
Ala	26.96	6682806	11.10
Cys	28.70	59941	0.11
Val	29.53	1392897	2.34
Met	31.63	374857	0.68
Ile	33.40	716873	1.28
Leu	34.43	1600768	2.69
Nleu	35.53	1358566	2.12
Tyr	37.86	213766	0.38
Phe	39.10	852715	1.43
OHlys	44.83	193473	0.33
His	46.50	105941	0.17
Lys	47.56	228170	0.34
Arg	58.90	2825949	4.65

Totals		45603117	77.38
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140424_013.dat

Date: 25/04/2014 05:14:15

Analista: Emilia Aporta

Muestra: V1A

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.233	915643	10.295
Pro	19.832	2341611	12.345

Totals		3257254	22.639
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140424_014.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: V1B

% inyectado:2

nmoles de norleucina esperados: 2

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.13	2485887	4.33
Thr	13.83	937385	1.68
Ser	15.00	1837381	3.46
Glu	18.57	3988132	6.76
Gly	25.60	17543860	29.73
Ala	26.96	6173934	10.26
Cys	28.73	69435	0.13
Val	29.56	1306302	2.19
Met	31.66	329919	0.60
Ile	33.43	655521	1.17
Leu	34.46	1449582	2.44
Nleu	35.56	1314020	2.05
Tyr	37.96	170078	0.30
Phe	39.13	824512	1.38
OHlys	44.86	205665	0.36
His	46.50	107140	0.17
Lys	47.56	220760	0.33
Arg	58.90	2585190	4.25

Totals		42204703	71.58
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140424_014.dat

Date: 25/04/2014 06:38:20

Analista: Emilia Aporta

Muestra: V1B

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.233	840474	9.450
Pro	19.832	2124795	11.202

Totals		2965269	20.651
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140424_015.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: V2A

% inyectado:2

nmoles de norleucina esperados: 2

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.13	2667225	4.65
Thr	13.83	981861	1.75
Ser	15.00	1937831	3.65
Glu	18.57	4376505	7.42
Gly	25.63	18274863	30.96
Ala	27.00	6550450	10.88
Cys	28.76	105745	0.19
Val	29.56	1282412	2.15
Met	31.63	339688	0.62
Ile	33.43	671083	1.20
Leu	34.46	1514202	2.55
Nleu	35.56	1266930	1.98
Tyr	37.93	191829	0.34
Phe	39.13	845664	1.41
OHlys	44.90	216281	0.37
His	46.53	232550	0.38
Lys	47.60	586477	0.87
Arg	58.93	2760445	4.54

Totals		44802041	75.92
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140424_015.dat

Date: 25/04/2014 08:02:26

Analista: Emilia Aporta

Muestra: V2A

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.233	892782	10.038
Pro	19.832	2269033	11.962

Totals		3161815	22.000
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140428_003.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: V2B 1/2

% inyectado:1

nmoles de norleucina esperados: 1

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.17	1640479	2.86
Thr	13.87	595675	1.06
Ser	15.07	1211628	2.28
Glu	18.67	2756000	4.67
Gly	25.63	12764203	21.63
Ala	27.06	4280058	7.11
Cys	28.86	124355	0.23
Val	29.66	934895	1.57
Met	31.76	237079	0.43
Ile	33.56	474686	0.85
Leu	34.60	990984	1.67
Nleu	35.66	640575	1.00
Tyr	38.06	105238	0.19
Phe	39.20	538232	0.90
OHlys	45.06	60329	0.10
His	46.83	133478	0.22
Lys	47.73	327459	0.49
Arg	59.06	1703827	2.80

Totals		29519180	50.05
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140428_003.dat

Date: 28/04/2014 16:51:03

Analista: Emilia Aporta

Muestra: V2B 1/2

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.266	553865	6.227
Pro	19.899	1464445	7.720

Totals		2018310	13.948
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140424_017.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: V3A

% inyectado:2

nmoles de norleucina esperados: 2

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.17	2659126	4.63
Thr	13.83	966217	1.73
Ser	15.03	1892418	3.57
Glu	18.63	4286921	7.27
Gly	25.63	18504739	31.35
Ala	27.00	6567728	10.91
Cys	28.73	23384	0.04
Val	29.53	1152712	1.93
Met	31.66	345876	0.63
Ile	33.43	674549	1.20
Leu	34.46	1524037	2.56
Nleu	35.60	1327998	2.07
Tyr	38.03	212047	0.38
Phe	39.10	879018	1.47
OHlys	44.86	234615	0.41
His	46.53	184317	0.30
Lys	47.56	240653	0.36
Arg	58.96	2772323	4.56

Totals		44448678	75.37
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140424_017.dat

Date:25/04/2014 10:50:27

Analista:Emilia Aporta

Muestra: V3A

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.233	892461	10.034
Pro	19.865	2281743	12.029

Totals		3174204	22.063
--------	--	---------	--------

Biochrom 30

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140428_004.dat

Analista : Emilia Aporta

Muestra: V4B 1/2

% inyectado:1

nmoles de norleucina esperados: 1

570nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Asp	12.17	1420022	2.47
Thr	13.90	524746	0.94
Ser	15.07	1037648	1.96
Glu	18.67	2374397	4.03
Gly	25.63	10844859	18.37
Ala	27.03	3563324	5.92
Cys	28.86	48721	0.09
Val	29.66	754973	1.27
Met	31.76	187271	0.34
Ile	33.56	355355	0.63
Leu	34.56	765661	1.29
Nleu	35.70	645979	1.01
Tyr	38.06	94069	0.17
Phe	39.16	456524	0.76
OHlys	45.00	83223	0.14
His	46.80	91418	0.15
Lys	47.70	164380	0.24
Arg	59.03	1476301	2.43

Totals		24888871	42.21
--------	--	----------	-------

Biochrom 30

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Calibraciones\2014\ninhidrina 24-4-2014\calibracion 20140424 (19,20,21).met

Filename: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\2014\abril 2014\20140428_004.dat

Date: 28/04/2014 18:15:06

Analista: Emilia Aporta

Muestra: V4B 1/2

440nm Results

Aminoacido	Tiempo de retencion	Area	Cantidad (nmoles)
Ohpro	11.233	492654	5.539
Pro	19.899	1245807	6.568

Totals		1738461	12.107
--------	--	---------	--------

Anejo D

Curvas de los ensayos de fatiga

Anejo D. Curvas de los ensayos de fatiga

Pericardio. Dirección ápico – caudal

100 ciclos

Figura 1. Probeta P6. Fatiga 100 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 2. Probeta P12. Fatiga 100 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 3. Probeta P18. Fatiga 100 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 4. Probeta P19. Fatiga 100 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 5. Probeta P25. Fatiga 100 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 6. Probeta P31. Fatiga 100 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

500 ciclos

Figura 7. Probeta P11. Fatiga 500 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 8. Probeta P17. Fatiga 500 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 9. Probeta P20. Fatiga 500 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 10. Probeta P26. Fatiga 500 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 11. Probeta P32. Fatiga 500 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

1000 ciclos

Figura 12. Probeta P10. Fatiga 1000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 13. Probeta P16. Fatiga 1000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 14. Probeta P21. Fatiga 1000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 15. Probeta P27. Fatiga 1000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 16. Probeta P34. Fatiga 1000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

2000 ciclos

Figura 17. Probeta P8. Fatiga 2000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 18. Probeta P15. Fatiga 2000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 19. Probeta P22. Fatiga 2000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 20. Probeta P29. Fatiga 2000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 21. Probeta P35. Fatiga 2000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

4000 ciclos

Figura 22. Probeta P1. Fatiga 4000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 23. Probeta P7. Fatiga 4000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 24. Probeta P24. Fatiga 4000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 25. Probeta P30. Fatiga 4000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 26. Probeta P36. Fatiga 4000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

24000 ciclos

Figura 27. Probeta P1. Fatiga 24000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 28. Probeta P2. Fatiga 24000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 29. Probeta P3. Fatiga 24000 ciclos.
Pericardio. Dirección ápico-caudal

Pericardio. Dirección circunferencial

100 ciclos

Figura 30. Probeta P6. Fatiga 100 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 31. Probeta P12. Fatiga 100 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 32. Probeta P18. Fatiga 100 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 33. Probeta P19. Fatiga 100 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 34. Probeta P24. Fatiga 100 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 35. Probeta P31. Fatiga 100 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

500 ciclos

Figura 36. Probeta P5. Fatiga 500 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 37. Probeta P11. Fatiga 500 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 38. Probeta P17. Fatiga 500 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 39. Probeta P20. Fatiga 500 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 40. Probeta P26. Fatiga 500 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 41. Probeta P5. Fatiga 500 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

1000 ciclos

Figura 42. Probeta P3. Fatiga 1000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 43. Probeta P10. Fatiga 1000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 44. Probeta P16. Fatiga 1000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 45. Probeta P21. Fatiga 1000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 46. Probeta P27. Fatiga 1000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 47. Probeta P34. Fatiga 1000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

2000 ciclos

Figura 48. Probeta P2. Fatiga 2000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 49. Probeta P8. Fatiga 2000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 50. Probeta P22. Fatiga 2000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 51. Probeta P29. Fatiga 2000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 52. Probeta P35. Fatiga 2000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

4000 ciclos

Figura 53. Probeta P1. Fatiga 4000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 54. Probeta P7. Fatiga 4000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 55. Probeta P13. Fatiga 4000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 56. Probeta P25. Fatiga 4000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 57. Probeta P30. Fatiga 4000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 58. Probeta P36. Fatiga 4000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

24000 ciclos

Figura 59. Probeta P1. Fatiga 24000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 60. Probeta P2. Fatiga 24000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 61. Probeta P3. Fatiga 24000 ciclos.
Pericardio. Dirección circunferencial

Membranas artificiales. Dirección longitudinal

100 ciclos

Figura 62. Probeta P6. Fatiga 100 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 63. Probeta P12. Fatiga 100 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Figura 64. Probeta P18. Fatiga 100 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Figura 65. Probeta P19. Fatiga 100 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 66. Probeta P25. Fatiga 100 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 67. Probeta P31. Fatiga 100 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

500 ciclos

Figura 68. Probeta P11. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 69. Probeta P17. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Figura 70. Probeta P20. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Figura 71. Probeta P26. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 72. Probeta P32. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

1000 ciclos

Figura 73. Probeta P3. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 74. Probeta P10. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 75. Probeta P16. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 76. Probeta P21. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Figura 77. Probeta P27. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 78. Probeta P34. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

2000 ciclos

Figura 79. Probeta P2. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 80. Probeta P8. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 81. Probeta P15. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Figura 82. Probeta P22. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 83. Probeta P29. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

Figura 84. Probeta P35. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal. Rotura prematura

4000 ciclos

Figura 85. Probeta P1. Fatiga 4000 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección
longitudinal

Figura 86. Probeta P7. Fatiga 4000 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección
longitudinal. Rotura prematura

Figura 87. Probeta P13. Fatiga 4000 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección
longitudinal

Figura 88. Probeta P24. Fatiga 4000 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección
longitudinal. Rotura prematura

Figura 89. Probeta P30. Fatiga 4000 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección
longitudinal

Figura 90. Probeta P36. Fatiga 4000 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección
longitudinal

Membranas artificiales. Dirección transversal

100 ciclos

*Figura 91. Probeta P6. Fatiga 100 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección
transversal*

*Figura 92. Probeta P12. Fatiga 100 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección
transversal*

*Figura 93. Probeta P18. Fatiga 100 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección
transversal*

*Figura 94. Probeta P19. Fatiga 100 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección
transversal*

*Figura 95. Probeta P25. Fatiga 100 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección
transversal*

*Figura 96. Probeta P31. Fatiga 100 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección
transversal*

Figura 97. Probeta P38. Fatiga 100 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 98. Probeta P44. Fatiga 100 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 99. Probeta P50. Fatiga 100 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección transversal

500 ciclos

Figura 100. Probeta P5. Fatiga 500 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 101. Probeta P11. Fatiga 500 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 102. Probeta P17. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal. Rotura prematura

Figura 103. Probeta P20. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 104. Probeta P26. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 105. Probeta P32. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 106. Probeta P39. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 107. Probeta P45. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 108. Probeta P49. Fatiga 500 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección transversal

1000 ciclos

Figura 109. Probeta P3. Fatiga 1000 ciclos.
Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 110. Probeta P10. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 111. Probeta P16. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 112. Probeta P21. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 113. Probeta P27. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 114. Probeta P34. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal. Rotura prematura

Figura 115. Probeta P40. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 116. Probeta P51. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 117. Probeta P54. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

2000 ciclos

Figura 118. Probeta P22. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 119. Probeta P29. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 120. Probeta P35. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal. Rotura prematura

Figura 121. Probeta P41. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 122. Probeta P53. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

4000 ciclos

Figura 123. Probeta P11. Fatiga 4000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 124. Probeta P7. Fatiga 4000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal. Rotura prematura

Figura 125. Probeta P13. Fatiga 4000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 126. Probeta P24. Fatiga 4000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 127. Probeta P30. Fatiga 4000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 128. Probeta P36. Fatiga 4000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 129. Probeta P42. Fatiga 4000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 130. Probeta P46. Fatiga 4000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 131. Probeta P52. Fatiga 4000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Anejo E

Curvas de los ensayos de tracción hasta rotura

Anejo E. Curvas de los ensayos de tracción hasta rotura

Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 1. Control (sin fatiga). Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 2. Fatiga 100 ciclos. Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 3. Fatiga 500 ciclos. Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 4. Fatiga 1000 ciclos. Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 5. Fatiga 2000 ciclos. Pericardio. Dirección ápico-caudal

Figura 6. Fatiga 4000 ciclos. Pericardio. Dirección ápico-caudal

Pericardio. Dirección circunferencial

Figura 7. Control (sin fatiga). Pericardio.
Dirección circunferencial

Figura 8. Fatiga 100 ciclos. Pericardio.
Dirección circunferencial

Figura 9. Fatiga 500 ciclos. Pericardio.
Dirección circunferencial

Figura 10. Fatiga 1000 ciclos. Pericardio.
Dirección circunferencial

Figura 11. Fatiga 2000 ciclos. Pericardio.
Dirección circunferencial

Figura 12. Fatiga 4000 ciclos. Pericardio.
Dirección circunferencial

Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Figura 13. Control (sin fatiga). Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Figura 14. Fatiga 100 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Figura 15. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Figura 16. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Figura 17. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Figura 18. Fatiga 4000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección longitudinal

Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 19. Control (sin fatiga). Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 20. Fatiga 100 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 21. Fatiga 500 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 22. Fatiga 1000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 23. Fatiga 2000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Figura 24. Fatiga 4000 ciclos. Membranas artificiales. Dirección transversal

Anejo F

Curvas de los ensayos de rasgado

Anejo F. Curvas de los ensayos de rasgado

- F/e : Carga soportada por la probeta dividida por el espesor de la misma.
- V : Velocidad del ensayo de rasgado

Pericardio. $V = 0.4 \text{ mm/s}$

Figura 1. $V = 0.4 \text{ mm/s}$. Pericardio.
Control (sin fatiga) - rasgado áptico-caudal

Figura 2. $V = 0.4 \text{ mm/s}$. Pericardio.
Control (sin fatiga) - rasgado circunferencial

Figura 3. $V = 0.4 \text{ mm/s}$. Pericardio.
Fatiga áptico-caudal - rasgado
áptico-caudal

Figura 4. $V = 0.4 \text{ mm/s}$. Pericardio.
Fatiga áptico-caudal - rasgado
circunferencial

Figura 5. $V = 0.4 \text{ mm/s}$. Pericardio.
Fatiga circunferencial - rasgado
ápico-caudal

Figura 6. $V = 0.4 \text{ mm/s}$. Pericardio.
Fatiga circunferencial - rasgado
circunferencial

Membranas artificiales. $V = 0.4 \text{ mm/s}$

Figura 7. $V = 0.4 \text{ mm/s}$.
Membranas artificiales.
Control (sin fatiga) - rasgado transversal

Figura 8. $V = 0.4 \text{ mm/s}$.
Membranas artificiales.
Control (sin fatiga) - rasgado longitudinal

Figura 9. $V = 0.4 \text{ mm/s}$.
Membranas artificiales.
Fatiga transversal - rasgado transversal

Figura 10. $V = 0.4 \text{ mm/s}$.
Membranas artificiales.
Fatiga transversal - rasgado longitudinal

Figura 11. $V = 0.4 \text{ mm/s}$.
Membranas artificiales.
Fatiga longitudinal - rasgado transversal

Figura 12. $V = 0.4 \text{ mm/s}$.
Membranas artificiales.
Fatiga longitudinal - rasgado longitudinal

Membranas artificiales. $V = 0.005$ mm/s

Figura 13. $V = 0.005$ mm/s.
Membranas artificiales.
Control (sin fatiga) - rasgado transversal

Figura 14. $V = 0.005$ mm/s.
Membranas artificiales.
Control (sin fatiga) - rasgado longitudinal

Membranas artificiales. $V = 25$ mm/s

Figura 15. $V = 25$ mm/s.
Membranas artificiales.
Control (sin fatiga) - rasgado transversal

Figura 16. $V = 25$ mm/s.
Membranas artificiales.
Control (sin fatiga) - rasgado longitudinal

Anejo G

Curvas de los ensayos de tracción con fisura
interior en membranas artificiales

Anejo G. Curvas de los ensayos de tracción con fisura interior en membranas artificiales

Figura 1. Fisura interior de 1 mm

Figura 2. Fisura interior de 2 mm

Figura 3. Fisura interior de 4 mm

A continuación, se muestran las fotografías de las probetas después de la rotura.

Figura 4. Probetas rotas después del ensayo de tracción.
Entalla interior 1 mm (L: longitudinal; T: transversal)

Figura 5. Probetas rotas después del ensayo de tracción.
Entalla interior 2 mm (L: longitudinal; T: transversal)

*Figura 6. Probetas rotas después del ensayo de tracción.
Entalla interior 4 mm (L: longitudinal; T: transversal)*