



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

**ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE REDES
POLIMÉRICAS DE POLIGLICEROL
SEBACATO Y DEL EFECTO DE LOS
PRODUCTOS DE SU BIODEGRADACIÓN EN
EL METABOLISMO CELULAR**

AUTORA: RAQUEL SANCHO SANMARTÍN

TUTOR: GUILLERMO VILARIÑO FELTRER /ANA VALLÉS LLUCH

COTUTORES: RUBÉN MARTÍN CABEZUELO

Curso Académico: 2017-18

“Gracias a mis padres, mis hermanas, mi abuela y Dani,
a mis amigas
y en especial a mis tutores, Guillermo, Ana y Rubén
ya que sin vosotros no hubiese sido posible”

R.

RESUMEN

El poliglicerol sebacato (PGS) es un polímero sintético, elastomérico y biocompatible. Se obtiene a partir de una reacción de policondensación entre el ácido sebácico y el glicerol, y una etapa posterior de curado del material. Hay grandes diferencias entre el producto obtenido en la primera etapa (prepolímero de PGS, pPGS) y el polímero ya curado y aun así hay muy pocos estudios que relacionen los parámetros de síntesis con el tipo de macromolécula que se forma. Además, se trata de un polímero biodegradable por erosión superficial y, aunque se han realizado estudios tanto *in vivo* como *in vitro* de la degradación del PGS, no se han caracterizado hasta día de hoy los residuos obtenidos en la degradación, ni tampoco sus potenciales efectos sobre las células que puedan albergar en las distintas aplicaciones.

Partiendo de ello, el estudio realizado se basa, en primer lugar, en caracterizar la formación de las redes poliméricas del PGS. Para ello, se obtienen monómeros polimerizados a diferentes tiempos de síntesis y prepolímeros sintetizados bajo diferentes atmósferas. Con ello, se realizan los diferentes ensayos de caracterización: cromatografía de permeación en gel (GPC), análisis reométricos, calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y valoración química con el objetivo de obtener los compuestos que se están formando durante el proceso de síntesis de PGS, así como las propiedades termoquímicas del prepolímero.

A continuación, se degrada el prepolímero de PGS sintetizado bajo atmósfera de nitrógeno bajo la acción enzimática de la lipasa porcina a diferentes concentraciones, obteniendo así los residuos de degradación. Posteriormente, estos residuos junto con una serie de medios de control y de estudio son analizados mediante técnicas de viabilidad celular: MTS y Pico GreenTM con el fin de determinar cómo afectan cada uno de los factores solubles a la proliferación celular y, finalmente, estudiar el efecto que presentan los monómeros, tanto separados como mezclados, y los productos de biodegradación enzimática en la viabilidad celular.

RESUM

El políglicerol sebacat (PGS) és un polímer sintètic, elastomèric i biocompatible. S'obté a partir d'una reacció de policondensació entre l'àcid sebàcic i el glicerol, i una darrera etapa de curat del material. Hi ha grans diferències entre el producte obtingut en la primera etapa (prepolímer de PGS, pPGS) i el polímer ja curat i així i tot hi ha molts pocs estudis que relacionen els paràmetres de síntesi amb el tipus de macromolècula que es forma. A més, es tracta d'un polímer biodegradable per erosió superficial i, encara que s'han realitzat estudis tant *in vivo* com *in vitro* de la degradació del PGS, no s'han caracteritzat fins a dia de hui els residus obtinguts en la degradació, ni tampoc els seus potencials efectes sobre les cèl.lules que puguen albergar en les distintes aplicacions.

Partint d'això, l'estudi realitzat es basa, en primer lloc, en caracteritzar la formació de les xarxes polimèriques del PGS. Per a això, s'obtenen monòmers polimeritzats a diferents temps de síntesi i prepolímers sintetitzats davall diferents atmosferes. Amb això, es realitzen els diferents assajos de caracterització: cromatografia de permeació en gel (GPC), anàlisi reomètric, calorimetria diferencial de rastreig (DSC), espectroscopia infraroja per transformada de Fourier (FTIR) i valoració química amb l'objectiu d'obtindre els compostos que s'estàn formant durant el procés de síntesi de PGS, així com les propietats termoquímiques del prepolímer de PGS sintetitzat.

A continuació, es degrada el prepolímer de PGS sintetitzat baix atmosfera de nitrogen davall l'acció enzimàtica de la lipasa porcina a diferents concentracions, obtenint així els residus de degradació. Posteriorment, estos residus junt amb una sèrie de mitjans de control i d'estudi són analitzats per mitjà de tècniques de viabilitat cel.lular: MTS i *Pico Green*TM a fi de determinar com afecten cada un dels factors solubles a la proliferació cel.lular i, finalment, estudiar l'efecte que presenten els monòmers, tant separats com mesclats, i els productes de biodegradació enzimàtica en la viabilitat cel.lular.

ABSTRACT

Polyglycerol sebacate (PGS) is a synthetic and elastomeric polymer with an excellent biocompatibility. It is obtained by a two-step polycondensation reaction between sebacic acid and glycerol, and a later stage of curing. There are big differences between the first synthesis product (prepolymer of PGS, pPGS) and the cured polymer and even so there are a very few studies relating the synthesis parameters with the macromolecule that is produced. Furthermore, PGS is a biodegradable polymer by surface erosion and, even though some studies, both *in vivo* and *in vitro*, of PGS degradation have been accomplished, neither the degradation residues nor the potencial effects on the house cells in different applications have been characterized.

From it, the study is based on the characterization of PGS polymeric networks. For it, monomers polymerized at different synthesis times and prepolymers synthesized under different atmospheres were obtained. After that, the characterization experiments were performed by: Gel Permeation Chromatography (GPC), rheometric analysis, Differential Scanning Calorimetry (DSC), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and titration to obtain the components which are forming throughout the synthesis process of PGS, as well as the prepolymer thermochemical properties.

Next, the prepolymer of PGS synthesized by nitrogen atmosphere is degraded by the lipase porcine enzymatic action at different concentrations, getting thus its degradation residues. After that, these residues with a control set and study media are analyzed by MTS and Pico Green™, both are cell viability techniques with the objective of determining how every soluble factor is influencing cell proliferation and, finally, studying the effect of the monomers, by their own and mixed, and the enzymatic biodegradation products on cell viability.

GLOSARIO

DMEM HG	Medio de cultivo con alto contenido en glucosa (HG)
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DPBS	Tampón fosfato salino (<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>)
FBS	Suero fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (<i>Fourier-transform Infrared Spectroscopy</i>)
GPC	Cromatografía de permeación en gel (<i>Gel Permeation Chromatography</i>)
P96	Placa de cultivo de 96 pocillos
PGS	Poliglicerol sebacato
PLGA	Ácido poli(láctido-co-glicólico)
pPGS	Prepolímero de poliglicerol sebacato
P/S	Penicilina-estreptomicina (<i>Peniciline/Streptomisine</i>)
TE	Solución tampón Tris-EDTA
THF	Tetrahidrofurano

Índice de figuras

Figura 1: Tríada de la Ingeniería tisular	21
Figura 2: Escasez de donantes de órganos. Código: pacientes que esperan la donación de un órgano (naranja), pacientes que han sido trasplantado(verde), donantes de órganos(azul). Extraído de (OPTN, n.d.).....	22
Figura 3: Síntesis de poliglicerol sebacato. Extraído de (Yadong Wang et al., 2002)	24
Figura 4: Secciones con tinte de Hematoxilina-Eosina del tejido colindante tras la implantación de PGS y ácido poli(láctido-co-glicólico). De la (A) a la (D), tejido implantado con PGS. De la (E) a la (H), tejido implantado con ácido poli(láctido-co-glicólico). Todos ellos con sus correspondientes tiempos de implante: (A) y (E) 7 días, (B) y (F) 21 días, (C) y (G) 35 días y (D) y (H) 60 días. La interfaz de superficie está señalada con flechas. La gran parte de la interfaz de superficie en G está enmascarada por células inflamatorias. Extraído de (Sundback et al., 2005)	28
Figura 5: Montaje para la etapa de prepolimerización del PGS	32
Figura 6: Componentes del reómetro donde se puede observar el plato inferior en el cual se coloca la muestra y el plato superior y el brazo.....	34
Figura 7: Evolución de los pesos moleculares durante el proceso de síntesis de PGS para el glicerol, ácido sebácico y los monómeros polimerizados a 0,1,2,3,4,8 y 24 h. DRI: Índice de refracción diferencial. El eje de abscisas indica el tiempo de elución del GPC	42
Figura 8: Distribuciones aproximadas de peso molecular obtenidas para cada una de las mezclas monoméricas polimerizadas durante 0,1,2,3,4,8 y 24 horas.....	42
Figura 9: Viscosidad registrada durante el proceso de síntesis de PGS a diferentes temperaturas	43
Figura 10: Punto de gel obtenido a diferentes temperaturas de curado que varían de 125°C a 180°C en intervalos de 5. En el margen superior derecho se encuentra la ecuación que describe los parámetros cinéticos de la reacción, así como el ajuste del modelo	44
Figura 11: Potencia en mW obtenida por cada uno de los monómeros a diferentes tiempos de síntesis: monómeros (0h), 1h, 2h, 3h, 4h, 8h y 24h mientras se les aplica una temperatura (°C). En el margen superior derecho se encuentra el detalle de la gráfica entre -25°C y 5°C	45
Figura 12: Potencia en mW obtenida por cada uno de los prepolímeros sintetizados bajo las diferentes atmósferas al aplicar un barrido de temperatura (°C).....	46

Figura 13: Entalpía específica de fusión obtenida por cada prepolímero sintetizado bajo diferentes atmósferas	46
Figura 14: Espectro FTIR de los monómeros por separado y mezclados, así como de los prepolímeros sintetizados bajo diferentes atmósferas.....	47
Figura 15: Viscosidad inicial registrada para cada uno de los prepolímeros sintetizados bajo diferentes atmósferas: aire comprimido, aire húmedo, argón, nitrógeno y oxígeno. El punto de partida son los diferentes prepolímeros a los que posteriormente se les realiza la etapa de curado en condiciones ambientales	48
Figura 16: Grado de esterificación obtenido en cada prepolímero de PGS sintetizado bajo diferentes atmósferas: aire comprimido, aire húmedo, argón, nitrógeno y oxígeno.....	49
Figura 17: (A) Absorbancia obtenida mediante la técnica de MTS por cada uno de los medios de control y de estudio. (B) Número de células existentes transcurridos 1 día y 5 días mediante la técnica de MTS en los distintos medios de control y de estudio	50
Figura 18: (A) Valores de fluorescencia obtenidos mediante la técnica de Pico Green en cada uno de los medios de control y de estudio. (B) Número de células existentes transcurridos 1 día y a los 5 días obtenidos mediante la técnica de Pico Green en los diferentes medios de control y de estudio	51
Figura 19: Unidades de metabolismo celular transcurridos 1 día y 5 días para los diferentes medios de control y de estudio	51

Índice de tablas

Tabla 1: Tabla resumen de los resultados de caracterización termoquímica de pPGS	49
---	----

ÍNDICE

DOCUMENTO I: MEMORIA

1. INTRODUCCIÓN	20
1.1 Ingeniería tisular	20
1.2 Biomateriales	21
<i>1.2.1 Poliglicerol sebacato</i>	24
1.3 Estímulos que determinan el destino celular	26
1.4 Degradación polimérica	28
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1 Síntesis del poliglicerol sebacato	31
<i>3.1.1 Proceso de síntesis</i>	31
<i>3.1.2 Determinación de los pesos moleculares por cromatografía de permeación en gel</i>	33
<i>3.1.3 Estudio cinético de la polimerización a partir de análisis reométricos</i>	33
<i>3.1.4 Estudio térmico durante la síntesis de prepolímero mediante calorimetría diferencial de barrido</i>	34
3.2 Caracterización termoquímica de prepolímero de poliglicerol sebacato	35
<i>3.2.1 Calorimetría diferencial de barrido</i>	35
<i>3.2.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier</i>	35
<i>3.2.3 Análisis reométrico del curado bajo diferentes atmósferas</i>	35
<i>3.2.4 Determinación del grado de esterificación</i>	36
3.3 Degradación enzimática	36
<i>3.3.1 Productos de biodegradación</i>	36
<i>3.3.2 Cultivo celular en presencia de los productos de degradación</i>	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1 Evolución del peso molecular durante el proceso de síntesis	41
4.2 Estudio de las características termoquímicas	44
4.3 Efecto de los productos de biodegradación en el metabolismo celular	50
5. CONCLUSIONES	52
6. TRABAJO EN PROCESO Y FUTURO	53
7. BIBLIOGRAFÍA	54

DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

1. ALCANCE Y DESARROLLO DEL PRESUPUESTO	60
1.1 Cuadro de precios de recursos por clase	60
1.2 Cuadro de mediciones y presupuesto	63
1.3 Cuadro de presupuesto resumido	69
1.4 Cuadro de resumen de capítulos	70

DOCUMENTO I: MEMORIA

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ingeniería tisular

Existen patologías médicas que suponen la pérdida o fallo de un órgano o tejido. En muchas ocasiones, estas patologías no pueden ser resueltas mediante terapias con medicamentos, ni cirugía, ni radiación, ni tampoco mediante implantes de prótesis. Entre ellas se pueden incluir las relacionadas con quemaduras en la piel que requieren el reemplazo de la piel que ha sido dañada y, también, tejidos como el hueso, el cartílago, los tendones y los vasos sanguíneos podrían requerir ser reemplazados. Además, algunos órganos funcionales como el páncreas o el hígado podrían dejar de realizar sus funciones bioquímicas y requerir reemplazos que no sólo satisfagan las funciones mecánicas sino también su funcionalidad fisiológica. Debido a la problemática anteriormente mencionada, surge el concepto de Ingeniería tisular, el cual se entiende como un campo interdisciplinario que aplica los principios de la biología y de la ingeniería hacia el desarrollo de sustitutos funcionales biológicos que reestablezcan, mantengan o mejoren la función del tejido. El desarrollo de los reemplazos suele implicar también el uso de células, las cuales pueden ser cultivadas solas o en sustratos formados por material inerte o biológico (Langer & Vacanti, 1993; Skalak, 1993).

De este modo, el término de ingeniería tisular se asocia al uso de los biomateriales para regenerar tejidos u órganos, los cuales sirven de componente estructural. Están diseñados para poder proporcionar la estructura arquitectónica que se asemeje a la matriz extracelular original para así estimular el crecimiento de las células y con ello la regeneración tisular (Lee, Kasper, & Mikos, 2014). Dicha reconstrucción tisular es bastante compleja ya que no basta con injertar células y componentes de la matriz extracelular. Las células son un componente crucial de los tejidos, pero los tejidos y órganos también presentan una matriz extracelular organizada, factores de crecimiento, factores biofísicos, señalización mediada por interacciones célula-célula y vascularización. Por tanto, hay muchos elementos extracelulares que es importante tener en cuenta a la hora de desarrollar el constructo tisular (Sengupta, Waldman, & Li, 2014). El material poroso, es decir, el *scaffold* (andamiaje en inglés), mimetiza parte o toda la matriz extracelular durante alguna de las etapas de regeneración del tejido, y normalmente suele estar diseñado para actuar en las primeras etapas. Sus funciones, por ello, son servir de sustrato al cual se adhieren las células, permitir su migración, almacenar y liberar moléculas activas, estimular respuestas celulares específicas y contribuir a la integridad mecánica y estructural de la zona tratada.

La Ingeniería tisular, comparada con otras técnicas, presenta ventajas como son el no depender de un donante, la ausencia de rechazo inmunológico y de transmisión de enfermedades siempre que se empleen células autólogas y que idealmente puede reproducir las funciones de tejidos y órganos sustituidos en lugar de atender solo a la función principal (Moroni *et al.*, 2014). Sin embargo, trasladar la Ingeniería tisular *in vitro* a terapias clínicas presenta algunos desafíos técnicos y regulatorios, ya que se depende del diseño ingenieril, del ensayo *in vivo* en animales y en humanos, de la realidad clínica y de la participación de la industria, puesto que ésta debe permitir el desarrollo del producto y su comercialización (Ratner, Hoffman, Schoen, & Lemons, 2013).

La Ingeniería tisular combina *scaffolds*, células y moléculas bioactivas para dar lugar a tejidos funcionales, es decir, tejidos que puedan llevar a cabo las mismas funciones que ejercían antes de la lesión. Las células son la unidad más pequeña que puede vivir de manera autónoma y junto con una serie de factores extracelulares constituyen todos los tejidos del cuerpo, los cuales son la unidad básica de funcionamiento en el organismo. El *scaffold* será el encargado de mimetizar la matriz y, por ello, no sólo incorpora a las células, sino que también actúa como medio de transición para las moléculas de señalización. Entendiendo cómo las células responden a las

señales, interactúan con el medio y se organizan en tejidos y órganos, los investigadores han sido capaces de manipular esos procesos para reparar tejidos dañados e incluso crear nuevos. El proceso normalmente comienza con el diseño y fabricación del *scaffold* a partir de biomateriales, tratando de simular la matriz extracelular del tejido. Una vez el *scaffold* está fabricado, las células y los factores de crecimiento ya se pueden introducir. Si el medio es el adecuado, el tejido se desarrollará (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, n.d.). Por ello, la Ingeniería tisular se puede entender cómo una tríada tal y como se observa en la Figura 1.

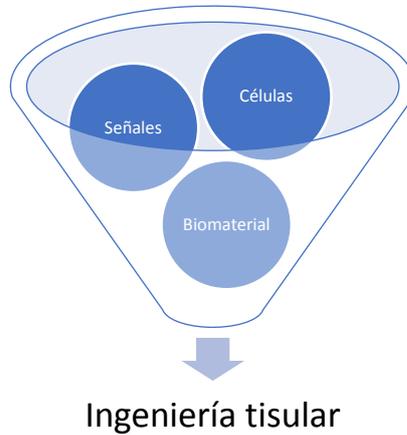


Figura 1: Tríada de la Ingeniería tisular

1.2 Biomateriales

El campo de los biomateriales tiene un efecto realmente significativo en la salud humana, la economía y diferentes campos científicos. Este campo ha crecido considerablemente desde los primeros dispositivos médicos y el crecimiento en un futuro está asegurado con el envejecimiento de la población, el aumento de la esperanza de vida en países desarrollados y la creciente capacidad de dirigirse hacia condiciones médicas previamente intratables.

Un biomaterial se puede definir como aquel material que se utiliza en un dispositivo médico y cuyo propósito es interactuar con sistemas biológicos (Ratner *et al.*, 2013). Las funciones que puede llevar a cabo un biomaterial en el organismo son reparar, sustituir o regenerar un órgano o tejido y, también, pueden realizar funciones de otro tipo como pueden ser la corrección de visión en personas con problemas ópticos mediante lentes de contacto o intraoculares, parches de hidratación cutánea o liberación controlada de fármacos, entre otras. La función de sustitución presenta algunos inconvenientes como, por ejemplo, que una prótesis sintética no pueda reproducir todas las funciones de tejidos y órganos, o la escasez de donantes en el caso de trasplante de órganos (Figura 2). Todo esto, junto con los avances biológicos de las últimas décadas, generó la aparición de la Ingeniería tisular, las terapias celulares y la medicina regenerativa con el objetivo de lograr la regeneración de un tejido u órgano (Agrawal *et al.*, 2013; Ratner *et al.*, 2013).

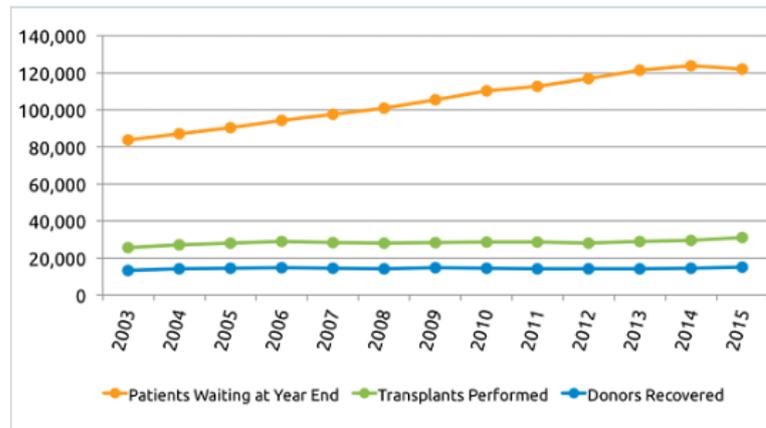


Figura 2: Escasez de donantes de órganos. Código: pacientes que esperan la donación de un órgano (naranja), pacientes que han sido trasplantado(verde), donantes de órganos(azul). Extraído de (OPTN, n.d.)

El gran abanico de materiales que se utilizan en ingeniería tisular surge de las múltiples localizaciones anatómicas, tipos de células y de las aplicaciones particulares que llevan a cabo. Sin embargo, todos los biomateriales tienen en común que deben ser procesables, esterilizables, no tóxicos, biocompatibles y, además, deben presentar una durabilidad adaptada a su función. También existen diversas propiedades de los biomateriales que se deben tener en cuenta si su uso está destinado a las aplicaciones biomédicas como son las propiedades mecánicas, las biológicas y las fisicoquímicas. Las propiedades químicas están relacionadas con la composición, los enlaces y las estructuras atómicas del material. En segundo lugar, las propiedades físicas están relacionadas con la microestructura, las fases, la densidad y los diferentes tipos de porosidad. En tercer lugar, las propiedades mecánicas están relacionadas con la fuerza, la tenacidad y la dureza del material. Y, por último, las propiedades biológicas están relacionadas con el comportamiento de los materiales en un entorno biológico. Cuanto más se puedan asemejar todas estas propiedades a los requisitos de su aplicación, el biomaterial se considerará más biocompatible y adaptado a su función (Agrawal *et al.*, 2013).

Un concepto básico en Ingeniería tisular es que el *scaffold* actúa durante un tiempo limitado como componente estructural (u otras funciones), pero, dado que no pertenece al entorno natural del cuerpo humano, sería conveniente que desapareciese una vez que haya cumplido con su función, dejando así un sistema biológico puramente viable. En consecuencia, muchos de los materiales que se utilizan en Ingeniería tisular son biodegradables. El término de biodegradable se asocia a una sustancia cuyos enlaces pueden ser hidrolizados por acción biológica en un intervalo de tiempo razonable para que puedan llevar a cabo su función (Kohane & Langer, 2008). La biodegradación es un proceso inevitable que experimentan los biomateriales tras la implantación y, por ello, es también un aspecto importante en el campo de la Ingeniería tisular.

Dentro de los biomateriales, se pueden encontrar diferentes familias como son los metales, cerámicas, composites, materiales biológicos y polímeros (Ratner *et al.*, 2013), cada una de las cuales presenta ciertas ventajas y desventajas. En cuanto a la familia de los metales se refiere, su principal ventaja es la ductilidad. A parte de su elevada resistencia y tenacidad, los materiales metálicos se pueden procesar de una forma segura debido a los miles de años de experiencia. Los metales se utilizan extensamente como reemplazo de articulaciones y en fijación de fracturas de hueso. Además, están diseñados para resistir a la corrosión producida por el entorno fisiológico. Algunos de los metales que se utilizan como biomateriales son los aceros inoxidables, las aleaciones base cobalto y las aleaciones base titanio, entre otros. En comparación con los metales, las cerámicas son generalmente duras y presentan una tasa de desgaste menor *in vivo*,

pues son resistentes contra los ataques microbianos. Algunas de las cerámicas que se utilizan como biomateriales son el óxido de aluminio, el óxido de zirconio, los fosfatos cálcicos y los *bioglasses* (vidrio cerámico bioactivo). Los dos primeros se utilizan en implantes de carga y los dos últimos se utilizan como cerámicas bioactivas y bioabsorbibles en regeneración de tejido óseo y, también, como revestimiento en implantes metálicos para mejorar su bioactividad (Agrawal *et al.*, 2013). En cuanto a los composites se refiere, son diseñados para aprovechar las propiedades de al menos dos clases de materiales. Esto se debe a que se trata de materiales sintéticos que se encuentran mezclados de manera heterogénea dando lugar a un compuesto. En esta familia, como material para la matriz dispersante, se encuentran materiales como el quitosano, la celulosa, el alginato y el ácido hialurónico (Lee *et al.*, 2014). Por otro lado, los biomateriales biológicos son materiales como el colágeno y la gelatina que se denominan biológicos ya que se pueden encontrar de forma natural en el organismo. Por último, los polímeros también se utilizan muy extensamente como biomateriales. De hecho, son los más utilizados en Ingeniería tisular, debido a su elevada versatilidad.

Un polímero es una macromolécula formada por unidades monoméricas que se repiten. De este modo, los biopolímeros (polímeros diseñados para su uso como biomateriales) pueden ser flexibles o rígidos, con baja o elevada resistencia y, también, pueden ser biodegradables (Agrawal *et al.*, 2013), dependiendo de la unidad de repetición de que está constituido. Sus aplicaciones, por tanto, en el campo de la biomedicina son bastante amplias. Se pueden utilizar, entre otros ejemplos, en regeneración de núcleo pulposo de disco intervertebral a través de un *scaffold* de nanofibras de polímero. El núcleo pulposo en el organismo absorbe las fuerzas de compresión entre las vértebras y, hasta la fecha, el reemplazo de núcleo pulposo estaba relacionado con dispositivos mecánicos (Feng *et al.*, 2012). Otro ejemplo de aplicación sería la implantación de un polímero biodegradable en el cartílago articular del menisco que se encuentra degenerado (Hannink, van Tienen, Schouten, & Buma, 2011). Incluso se han empleado polímeros biodegradables para desarrollar tejido conectivo funcional (Hannink *et al.*, 2011). Si se tiene en cuenta la organización de los polímeros, éstos se pueden clasificar según su origen como polímeros sintéticos o polímeros naturales. Los primeros pueden ser creados con diferentes monómeros, y ser procesados a través de diferentes métodos para que den lugar a distintas microestructuras. Por otro lado, los polímeros naturales son aquellos que forman parte de la matriz extracelular y otras estructuras biológicas que, por tanto, presentan una excelente biocompatibilidad. Sin embargo, su versatilidad y técnicas de fabricación están más limitadas comparadas con los sintéticos aunque pueden ser modificados químicamente para producir varios derivados (Tabata, 2009). Dentro de la familia de polímeros sintéticos se pueden encontrar distintas clases según sus grupos funcionales. Por ejemplo, los poliácridatos y polimetacrilatos, los cuales son utilizados en cementos dentales y óseos, lentes intraoculares y lentes de contacto. También, se encuentran entre ellos las poliamidas, utilizadas en tubos para catéteres intracardíacos, sondas uretrales, hilos para sutura quirúrgica y componentes para diálisis. Otra familia dentro de los polímeros sintéticos es la de los poliésteres, utilizados en prótesis vasculares, prótesis de laringe y esófago e hilos de sutura. Y, por último, la familia de las siliconas, las cuales son utilizadas en lubricación de instrumentos quirúrgicos, prótesis mamarias, moldes y tratamientos de quemaduras (Ratner *et al.*, 2013).

De todos los mencionados anteriormente, los poliésteres son de gran interés por ser sintéticos y biodegradables. Los poliésteres, formados por segmentos de repetición unidos por sucesivos enlaces éster, pueden ser sintetizados por polimerización o por policondensación. Entre los poliésteres más extendidos, se encuentra el poliácido láctico, la policaprolactona y el poliácido glicólico. El poliácido láctico se degrada hidrolíticamente en ácido láctico el cual es un subproducto metabólico: esto lo hace ideal para su uso en aplicaciones médicas entre las que cabe destacar el uso de *scaffolds* de nanofibras de poliácido láctico en diferentes tejidos como el músculo-esquelético, nervioso, cardiovascular y cutáneo (Galloway, Laimins, Division, &

Hutchinson, 2016). La policaprolactona es un poliéster resistente, flexible, biocompatible y semicristalino que deriva del petróleo crudo. Se sintetiza mediante polimerización por apertura de anillo y se degrada por hidrólisis y acción enzimática. Se ha propuesto para aplicaciones en las que el material deba presentar una larga duración ya que sus tasas de degradación son menores que en el poliácido láctico (Serrano, Chung, & Ameer, 2010). En cuanto a sus aplicaciones, se han utilizado injertos de policaprolactona junto con heparina para reemplazar arterias de pequeño diámetro (Duan *et al.*, 2015). El poliácido glicólico se degrada hidrolíticamente en ácido glicólico el cual es incorporado posteriormente en el ciclo del ácido tricarbóxico y excretado (Athanasiou, Niederauer, & Agrawal, 1996). Una de sus aplicaciones ha sido para regeneración de nervio periférico mediante el uso de un conducto nervioso artificial hecho de poliácido glicólico (Matsumoto *et al.*, 2000). En la actualidad, desde hace unas décadas, se están investigando nuevas tecnologías de desarrollo de poliésteres. Entre ellas, se encuentra la familia de los polihidroxicanoatos, poliésteres con un amplio rango de propiedades mecánicas y que, además, derivan de microorganismos. También, son biodegradables y biocompatibles (Ye, Zhang, Kai, Li, & Loh, 2018). Entre sus aplicaciones cabe destacar el uso de *scaffolds* de polihidroxicanoato para regeneración ósea debido a que puede proporcionar el soporte mecánico requerido (Lim, You, Li, & Li, 2017). Además, existe otra clase de poliésteres cuyo interés radica en que están sintetizados a partir de dos sustancias que son productos metabólicos en el cuerpo humano, como es el caso del poliglicerol sebacato. El desarrollo de la síntesis de este tipo de polímeros tiene su origen hace relativamente poco (Nagata, Machida, Sakai, & Tsutsumi, 1999).

1.2.1 Poliglicerol sebacato

El poliglicerol sebacato (PGS) es un polímero cuyas primeras menciones en el ámbito de la Ingeniería tisular se reportan al año 2002. Se trata de un poliéster biodegradable, biocompatible (*in vitro* y *in vivo*), flexible, resistente y elastomérico. Para su síntesis, se emplearon sustancias que debían cumplir unos requisitos: monómeros que no fuesen tóxicos, al menos uno de ellos tenía que ser trifuncional para formar entrecruzamientos estables y el otro debía proporcionar grupos hidroxilos para formar así los enlaces éster. Por ello, se eligió el glicerol como monómero trifuncional y el ácido sebácico como el monómero ácido, dando lugar así al PGS. La Administración de alimentos y medicamentos (FDA) aprobó el glicerol y los polímeros que contienen ácido sebácico para su uso en aplicaciones médicas. Además, ambos monómeros son asequibles, lo cual se convierte en una ventaja para sus aplicaciones (Yadong Wang, Ameer, Sheppard, & Langer, 2002).

En la investigación llevada a cabo en el año 2002, la síntesis de PGS se realizó mediante la policondensación de ambos materiales en ausencia de catalizadores. Ésta se llevó a cabo en dos etapas, una primera etapa de prepolicondensación (prepolimerización) y una segunda etapa de entrecruzamiento. Ambas tuvieron lugar a una temperatura de 120°C (Yadong Wang *et al.*, 2002) (Figura 3).

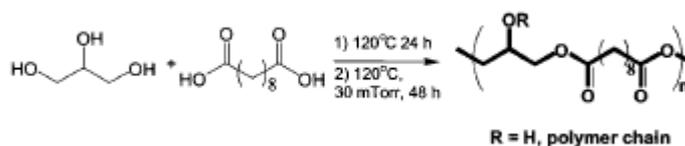


Figura 3: Síntesis de poliglicerol sebacato. Extraído de (Yadong Wang *et al.*, 2002)

En la primera etapa de prepolimerización se obtiene un prepolímero viscoso debido a la formación de cadenas preferentemente lineales o lineales ramificadas entre los monómeros que están reaccionando. Se trata de una etapa en la que se requieren largos tiempos de reacción donde se consume energía debido al calor y un gas de purga como el nitrógeno para mantener una atmósfera inerte (Aydin, Salimi, Rzayev, & Pişkin, 2013). En la etapa de curado, las cadenas se entrelazan para formar la red polimérica en un ambiente en el que se aplica vacío. La reacción que tiene lugar para que se forme el PGS es una esterificación entre el ácido dicarboxílico (ácido sebácico) y grupos alcohol (glicerol). Los grupos hidroxilos del polirol actúan como iniciadores de la reacción. Por tanto, lo que ocurre inicialmente es que un grupo hidroxilo de glicerol ataca a un grupo carboxilo del diácido para dar lugar a un monoéster que presenta un grupo carboxilo libre y libera agua como producto de la reacción. Posteriormente, el monoéster reacciona con otro grupo de glicerol para formar otro monoéster y así con todos los grupos funcionales disponibles (Maliger, Halley, & Cooper-White, 2013). El método convencional de síntesis de PGS, es decir, el que tiene lugar en dos etapas (prepolicondensación y entrecruzamiento) ha sido el utilizado principalmente en la síntesis de PGS. Este método implica tener en cuenta condiciones de temperatura y condiciones de vacío.

En cuanto a las propiedades de un biomaterial, determinarlas es el primer paso para esclarecer su potencial en posibles aplicaciones. Por tanto, es importante el análisis de las propiedades del PGS. Entre ellas se encuentran las propiedades fisicoquímicas, las propiedades mecánicas, las propiedades térmicas, la cristalinidad y la morfología, el comportamiento de degradación y la biocompatibilidad (Rai, Tallawi, Grigore, & Boccaccini, 2012). En cuanto a las propiedades fisicoquímicas, el PGS es un poliéster transparente, casi incoloro cuya estructura química se ve representada en la Figura 3. En el estudio llevado a cabo en 2002, los resultados obtenidos con la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) demostraron que el PGS presentaba los picos característicos debido a los enlaces éster de manera que se confirmaba que el polímero es un poliéster. En lo referente a las propiedades mecánicas, el PGS presenta un comportamiento no lineal de tensión-deformación el cual es típico de materiales elastoméricos. La naturaleza elastomérica del polímero se debe al entrecruzamiento covalente. Tanto el entrecruzamiento como los puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilos contribuyen a sus propiedades elastoméricas (Yadong Wang *et al.*, 2002). Sin embargo, las propiedades elásticas del PGS pueden modificarse sustancialmente si se alteran tres parámetros del proceso de síntesis: la temperatura de curado, la relación molar glicerol-ácido sebácico y el tiempo de curado (Chen *et al.*, 2008; Kemppainen & Hollister, 2010; Liu *et al.*, 2007). Se puede concluir pues que el PGS es un material elastomérico y flexible con la habilidad de experimentar deformación reversible con casi una completa recuperación (Rai *et al.*, 2012).

En lo referente a las propiedades térmicas, al ser el PGS un polímero ya curado (entrecruzado), no presenta cristalinidad ya que existen enlaces covalentes entre las cadenas. Esto provoca que éstas ya no pueden plegarse para formar cristales debido a que sus movimientos están limitados por los entrecruzamientos. Sin embargo, el prepolímero de PGS es semicristalino de manera que sus propiedades térmicas dependen de la temperatura de transición vítrea (T_g) y de la temperatura de fusión de la fase cristalina (T_m). (Yadong Wang *et al.*, 2002). Otra de las propiedades interesantes es la cristalinidad y la morfología del prepolímero. El grado de cristalización del prepolímero de PGS decrece significativamente cuando se incrementa el tiempo de curado y la temperatura (Jaafar, Ammar, Jedlicka, Pearson, & Coulter, 2010). Cabe destacar que hay grandes diferencias entre el prepolímero de PGS y el polímero ya curado y aún así hay muy pocos estudios que relacionen los parámetros de síntesis con el tipo de macromolécula que se forma. En un estudio realizado se ha demostrado utilizando la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) que a medida que el grado de esterificación incrementa, la intensidad de los enlaces carbono-oxígeno aumenta mientras que la de los enlaces oxígeno-hidrógeno disminuye, lo cual indica un incremento de la densidad de entrecruzamiento (X. Li,

Hong, Naskar, & Chung, 2015). En cuanto al comportamiento de degradación, es una característica importante para tener en cuenta ya que afecta a las aplicaciones del material, especialmente aplicaciones biomédicas. La degradación combinada con su mecanismo, su cinética y la posible toxicidad de los productos de degradación afecta también al potencial de aplicación del material (Rai *et al.*, 2012). Se sabe que el PGS presenta una degradación vía erosión superficial rompiendo así los enlaces éster. Pierde la resistencia mecánica lentamente, de manera relativa a la pérdida de masa. En estudios de degradación del PGS se ha demostrado que es difícil correlacionar la degradación *in vitro* e *in vivo* del poliéster, ya que éste presenta una tasa de degradación acelerada *in vivo* en comparación con la que sucede *in vitro* (Yadong Wang *et al.*, 2002). Sin embargo, existen otros estudios que demuestran que las tasas de degradación *in vitro* son comparables a las obtenidas *in vivo* (Liang *et al.*, 2011). Por último, en lo referente a la biocompatibilidad del PGS, ésta deriva de la biocompatibilidad que presentan los monómeros utilizados en su síntesis (Rai *et al.*, 2012). Pero, como sucede con cualquier biomaterial polimérico, la biocompatibilidad del PGS depende también de factores como la morfología del dispositivo médico, su porosidad, hidrofiliidad y energía libre de la superficie, la densidad, el ambiente donde es implantado o donde realice su función y la química concreta del material obtenido (You-xiong Wang, Robertson, Spillman, & Claus, 2004).

De este modo, el PGS es un polímero que presenta propiedades de interés para su uso en aplicaciones biomédicas las cuales se centraron inicialmente en el reemplazo y regeneración de tejido blando como puede ser el músculo cardíaco, cartílago, conductos nerviosos y retina entre otros. Sin embargo, las aplicaciones de éste se están expandiendo hacia la liberación controlada de fármacos, como adhesivo tisular y para la regeneración de tejido duro (Rai *et al.*, 2012). Un ejemplo de aplicación sería un parche de PGS para el corazón, el cual debe ser biocompatible, degradable y superelástico (Chen *et al.*, 2008). Otro ejemplo sería el uso de PGS para crear *scaffolds* que presenten valores de módulos que se encuentren en los rangos del que presenta el cartílago articular del cuerpo humano (Kempainen & Hollister, 2010). También, se ha examinado el efecto de *films* (láminas) de PGS en la actividad metabólica, fijación, proliferación y apoptosis de las células de *Schwann in vitro* (Sundback *et al.*, 2005). Y, por último, otra aplicación del PGS consiste en la creación de una membrana de éste para conseguir la eliminación selectiva de fotorreceptores, ya que algunas de estas células que se encuentran enfermas podrían obstruir el desarrollo de contactos neuronales que son necesarios para la visión (Ghosh, Neeley, Arnér, & Langer, 2011).

Para finalizar, cabe destacar que el glicerol es el componente básico de los triglicéridos y el ácido sebáico es el intermediario natural metabólico en la ω -oxidación de los ácidos grasos (Brobeck, 1981). Por tanto, se predice que los productos de degradación del PGS serán metabolizados en el cuerpo humano. Además, no se emplean catalizadores ni aditivos en el proceso de síntesis de PGS lo que evita posibles efectos tóxicos en aplicaciones biomédicas (Sun *et al.*, 2010).

1.3 Estímulos que determinan el destino celular

El ambiente complejo y dinámico en el que las células residen *in vivo* es un regulador crítico que determina el destino celular. A los elementos que componen este ambiente se les conoce como el nicho celular (Scadden, 2006). Las células vecinas las cuales proporcionan contactos directos célula-célula, los factores paracrinos secretados los cuales inducen cambios en las células cercanas alterando así su comportamiento o diferenciación celular y la matriz extracelular son los principales componentes que forman el nicho. De este modo, los factores que más influyen en el destino celular son los factores solubles, las proteínas y polisacáridos de la matriz extracelular y las interacciones célula-célula. Realmente, todo aquello que comprometa el

ambiente en el que viven las células puede realmente influir en su comportamiento y supervivencia (Carpenedo & Mcdevitt, 2013). Por ello, una respuesta celular adecuada tras un implante es imprescindible para la regeneración del tejido y su integración.

El implante de un biomaterial produce un daño en el tejido que lo aloja y provoca una reacción inflamatoria. El fundamento para estas reacciones es la incisión que hay que producir para el implante en sí y la adsorción de proteínas de adhesión a la superficie del biomaterial las cuales son reconocidas por las integrinas. Las integrinas son receptores de adhesión que están presentes en la membrana de la mayoría de las células y, además, son las principales moléculas que van a mediar en la adhesión celular. Éstas reaccionan con la matriz extracelular por la parte externa y por la parte interna con los componentes del citoesqueleto y otras señales. Por tanto, un factor importante de los citados con anterioridad para tener en cuenta a la hora de realizar implantes de biomateriales es la matriz extracelular (Horbett, 2013). Los leucocitos captan la presencia de las proteínas gracias a las integrinas y se adhieren a ellas. Éstos secretan citocinas (mensajeros fisiológicos de la respuesta inflamatoria) y atraen a los fibroblastos. La proliferación de fibroblastos y células endoteliales dan lugar al tejido granuloso. Después de un proceso de maduración, se forma una cápsula fibrosa. La formación de ésta es una indicación de que el material es biocompatible, especialmente si su tamaño está entre 20 y 200 micrómetros (Anderson, 2013). De este modo, la adsorción de proteínas al biomaterial le convierte en un material que es reconocido biológicamente. El tipo, concentración y conformación de estas proteínas dependen de las propiedades superficiales del biomaterial, dictan la adhesión y supervivencia celular y son críticos en la reacción tisular al implante (Horbett, 2013). Tras una buena adhesión de las proteínas, se puede estimular una buena respuesta celular favoreciendo así la reparación de la herida y la integración del tejido, mientras que si las proteínas no se adhiriesen a la superficie del biomaterial aparecería la reacción a cuerpo extraño: las células lo verían como una barrera o un agente exógeno patógeno e intentarían eliminarlo (Wilson *et al.*, 2005).

En determinados estudios, el poliéster biodegradable citado anteriormente, el PGS, se ha implantado *in vivo* para determinar su biocompatibilidad. En un caso el objetivo era estudiar la biocompatibilidad del poliéster en aplicaciones de reconstrucción neural. Se comparó la respuesta *in vivo* del PGS con la del ácido poli(láctido-co-glicólico) (PLGA) en el tejido del nervio ciático en conejos (Figura 4). Se pudo observar que, aunque en la respuesta inicial del tejido en PGS y PLGA eran similares, la respuesta inflamatoria del PLGA se disparó entre los 21-35 días, mientras que la respuesta inflamatoria del PGS iba decreciendo. De hecho, en este caso, se pudo observar la formación de una cápsula fibrosa fina alrededor del PGS. Esto sugiere que el PGS podría utilizarse como soporte para crear un conducto para regeneración de nervio periférico (Sundback *et al.*, 2005).

Tras desempeñar su función en el organismo, los materiales biodegradables desaparecen paulatinamente para ser sustituidos por nuevo tejido. Por ello, otro factor a tener en cuenta en implantes de biomateriales son los factores solubles producto de la biodegradación, ya que de algún modo éstos se tienen que reabsorber y/o metabolizar para su excreción.

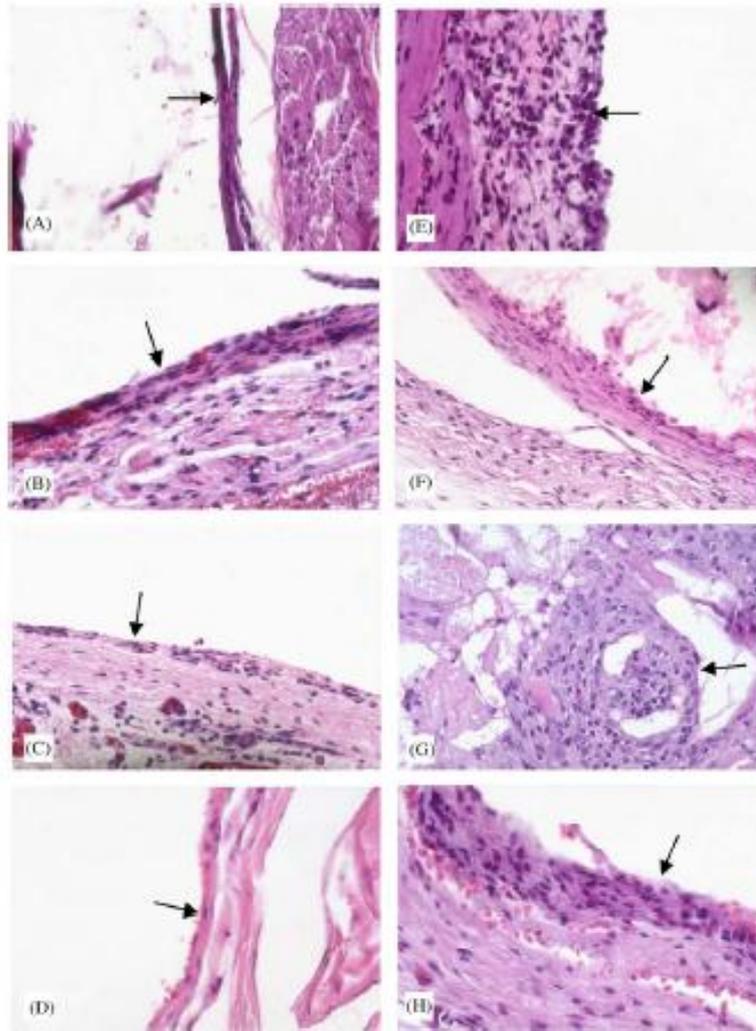


Figura 4: Secciones con tinte de Hematoxilina-Eosina del tejido colindante tras la implantación de PGS y ácido poli(láctido-co-glicólico). De la (A) a la (D), tejido implantado con PGS. De la (E) a la (H), tejido implantado con ácido poli(láctido-co-glicólico). Todos ellos con sus correspondientes tiempos de implante: (A) y (E) 7 días, (B) y (F) 21 días, (C) y (G) 35 días y (D) y (H) 60 días. La interfaz de superficie está señalada con flechas. La gran parte de la interfaz de superficie en G está enmascarada por células inflamatorias. Extraído de (Sundback et al., 2005)

1.4 Degradación polimérica

Las circunstancias clínicas a menudo requieren la aplicación de implantes que desempeñen su función temporalmente. En estos casos, los polímeros degradables son de gran interés, ya que si los implantes han sido fabricados con estos materiales no hay necesidad de intervenir quirúrgicamente para retirarlos. Además, el uso de implantes biodegradables puede a veces evitar problemas relacionados con la seguridad a largo plazo de los implantes permanentes. Sin embargo, en los implantes biodegradables hay que tener en cuenta una serie de factores como pueden ser la toxicidad de los productos de degradación y el fallo prematuro del implante. Por ello, el diseño de un implante biodegradable requiere testear la toxicidad de sus productos de degradación y tener precaución en cuanto a la integridad mecánica durante el tiempo de servicio del implante (Treiser, Abramson, Langer, & Kohn, 2013).

El término de degradación se refiere a un proceso químico cuyo resultado es la ruptura de enlaces covalentes. Cuando se habla de biodegradación, significa que un agente biológico ya sea una enzima, una célula o un microorganismo está causando la descomposición química del implante (Williams, 1987). El proceso de hidrólisis (pura o catalizada por enzimas) es el más común en cuanto a degradación polimérica se refiere, aunque también el proceso de degradación puede ocurrir por mecanismos de oxidación o fotodegradación. Por otro lado, la erosión se refiere a cambios físicos en tamaño, forma o masa del dispositivo. Esto podría ser debido a mecanismos de degradación, disolución o desgaste mecánico. Sin embargo, el término de bioerosión incluye tanto procesos físicos como procesos químicos a nivel macroscópico que ocurren bajo condiciones fisiológicas. Hay dos mecanismos de bioerosión: erosión en bloque y erosión superficial. En la erosión en bloque, la velocidad de difusión del agua es más rápida que la de degradación. Por otro lado, en la erosión superficial, la bioerosión está limitada por la superficie del material, puesto que el fluido fisiológico no es absorbido en el interior de la masa polimérica. Lo que ocurre es que el material se vuelve más fino con el tiempo pero mantiene la integridad estructural durante la mayor parte del proceso de erosión (Treiser *et al.*, 2013).

Como se ha mencionado anteriormente, el PGS se degrada vía erosión superficial. Al estudiar la degradación enzimática del PGS en presencia de la enzima esterasa, se descubrió que las tasas de degradación enzimática del PGS en medio de cultivo tisular eran comparables con las tasas de degradación *in vivo* del mismo material (Liang *et al.*, 2011). En otro estudio, se determinó cómo afectaba la densidad de entrecruzamiento a las tasas de degradación del PGS en ratas. Independientemente de la densidad de entrecruzamiento, se observó la degradación vía erosión superficial. Las dimensiones de los discos de PGS decrecían linealmente con el tiempo de implantación y las tasas de pérdida de masa eran constantes al cabo de una semana después de la implantación. La erosión superficial a menudo se correlaciona con la digestión enzimática, por ello, se realizó otro estudio paralelo *in vitro* para ver el efecto de la enzima lipasa y se demostró que ésta jugaba un papel importante en la degradación del PGS y que las tasas de pérdida de masa no dependían del tiempo de curado (Pomerantseva *et al.*, 2009).

Es importante destacar que, aunque se han realizado estudios tanto *in vivo* como *in vitro* de la degradación del PGS, no se han caracterizado hasta la fecha los residuos obtenidos en la degradación, ni tampoco sus potenciales efectos sobre las células que puedan albergar en las distintas aplicaciones.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Grado (TFG) es caracterizar la influencia de los factores que intervienen en la policondensación del poliglicerol sebacato y el efecto de los productos de degradación del polímero sobre el metabolismo celular. Por ello, se ha dividido el trabajo según tres objetivos más concretos, que se describen a continuación junto con la metodología seguida para llevarlos a cabo.

El primero de ellos consiste en evaluar el proceso de síntesis del PGS mediante tres técnicas, la cromatografía de permeación en gel (GPC), la reometría y la calorimetría diferencial de barrido (DSC). En todos los casos se parte de los monómeros, es decir, el glicerol y el ácido sebácico previamente fundidos y su mezcla homogeneizada. Con la técnica de GPC se espera conocer cómo evolucionan los pesos moleculares durante el proceso de síntesis del PGS y así poder conocer de algún modo cuales son los compuestos que se están formando. Con la técnica de reometría se puede registrar la viscosidad para diferentes temperaturas, pudiendo obtener así el punto de gel para cada una de ellas y, con ello, se podrá obtener una estimación de los parámetros cinéticos de la reacción. Y, con la técnica de DSC se pueden obtener las transformaciones termoquímicas que tienen lugar durante el proceso de síntesis de PGS.

El segundo objetivo consiste en caracterizar termoquímicamente el prepolímero de poliglicerol sebacato (pPGS). Esta caracterización se llevará a cabo mediante diversas técnicas como son la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), la reometría y la valoración química. Para estos ensayos, se sintetizarán prepolímeros de poliglicerol sebacato bajo diferentes atmósferas: aire comprimido, aire húmedo, argón, nitrógeno y oxígeno. Con la técnica de DSC, se podrá obtener la temperatura de fusión y de cristalinidad de cada prepolímero, así como de los monómeros a diferentes tiempos de síntesis. Con la técnica de FTIR se podrá analizar la naturaleza química de los diferentes enlaces formados en los prepolímeros, así como también de los monómeros. En tercer lugar, con los análisis reométricos se podrán comparar los distintos tiempos de gel obtenidos durante el curado para cada uno de los polímeros. Y, por último, con la técnica de valoración química se podrá obtener el grado de esterificación de los distintos prepolímeros y de los monómeros y, con ello, su grado de conversión. Los resultados obtenidos en estas dos secciones del trabajo permitirán, en adelante, tener un mayor control del proceso de síntesis, en relación con las propiedades de la red polimérica de PGS que se desee obtener.

Finalmente, se realizará un cultivo celular para explorar cómo afectan los productos de biodegradación al metabolismo celular. Para obtenerlos, se degradará el pPGS con atmósfera de nitrógeno mediante la acción enzimática de lipasa porcina a diferentes concentraciones. Para el cultivo, se empleará una línea celular de fibroblastos de ratón, ya que son muy proliferativas y desarrollan todas las funciones metabólicas basales de las células de mamífero. Se emplearán diferentes medios de control y de estudio para ver cómo afectan cada uno de los factores solubles a la proliferación celular y, de este modo, estudiar el efecto que presentan los monómeros, tanto mezclados como por separado, y los productos de degradación enzimática del pPGS de nitrógeno, en la viabilidad celular. Para el análisis de viabilidad celular, se emplearán dos técnicas de cuantificación. Dado que una de ellas se vale del metabolismo celular para cuantificar el número de células existentes, se pretende determinar de manera indirecta la actividad metabólica de los fibroblastos cultivados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Síntesis del poliglicerol sebacato

3.1.1 Proceso de síntesis

El proceso de síntesis del PGS se realiza en dos etapas. En la primera etapa tiene lugar la prepolimerización la cual da lugar al pPGS, un líquido viscoso o una especie de cera termoplástica, según la temperatura. En la segunda etapa tiene lugar el curado en la cual se obtiene finalmente el polímero entrecruzado, es decir, una matriz sólida que no se puede fundir ni disolver.

Para la obtención del prepolímero, se llevó a cabo la etapa de prepolimerización tal y como se detalla a continuación. Se utilizó un balón de reacción de tres vías en el cual se introdujeron cantidades equimolares de ácido sebácico (Sigma Aldrich, 99% pureza) y glicerol (VWR International, 98% pureza) (Jaafar *et al.*, 2011).

El balón de reacción presenta tres orificios: en uno de ellos se acopló la entrada de gases para lograr una atmósfera de composición controlada (Y. Li, Huang, Cook, & Chen, 2013). Otro de los orificios permitía la salida de gases y la eliminación del aire que contenía originalmente o del agua formada durante la condensación. Esto era posible gracias a un codo de vidrio con punta de goma que presentaba una aguja la cual se insertaba en el orificio del balón y también conectaba a una trampa de vacío que contenía agua, actuando como una válvula antirretorno. Si funcionaba correctamente, el gas daba lugar a la formación de burbujas en el agua y, de este modo, se podía controlar el flujo para que fuese constante en todos los experimentos. Y, por último, el tercer orificio simplemente se sellaba para evitar que no saliese nada hacia el exterior y mantener la atmósfera inerte (Figura 5).

Para llevar a cabo la reacción, se necesitaba que todo el balón de reacción presentase una temperatura superior a 110°C (130°C como valor de temperatura estándar para el proceso de síntesis) durante todo el proceso. Por ello, éste se introducía dentro de un vaso de precipitados que contenía aceite mineral precalentado a 110°C en una estufa (JP Selecta) y, de este modo, se mantenía la temperatura de forma homogénea durante todo el proceso de síntesis. Gracias al baño de aceite, se puede hasta cuadruplicar la masa inicial de los monómeros y seguir manteniendo la temperatura. Se introdujeron dos agitadores magnéticos, uno dentro del balón y otro en el vaso de precipitado para facilitar la agitación por inducción.

A continuación, todo el montaje anterior se colocó sobre una placa calefactora con agitación que presentaba un sensor de temperatura (MR Hei-Standard). Este sensor se colocó en el interior del vaso de precipitados, es decir, en contacto con el aceite térmico, lo más cerca posible de los monómeros. Se puso en marcha la agitación y se comprobó que ambos imanes se agitaban. Al termostato de la placa calefactora se le configuró una temperatura objetivo inicial de 140°C para lograr que el ácido sebácico fundiese y obtener, de este modo, una mezcla homogénea. Posteriormente, se envolvió todo el montaje con papel de aluminio para limitar las pérdidas de calor. Una vez el ácido sebácico ya había fundido (30 min), se disminuyó la temperatura a 130°C, temperatura a la cual tiene lugar la reacción y, a partir de este momento, comenzaba la etapa de prepolimerización obteniéndose tras 24 horas el prepolímero de poliglicerol sebacato.

Una vez obtenido el prepolímero se pueden realizar dos acciones, o bien se almacena a bajas temperaturas (5-8°C) para asegurar que la reacción ha sido prácticamente interrumpida y, de este modo, poderlo utilizar con posterioridad o bien continuar con la etapa de curado para obtener finalmente el polímero entrecruzado.

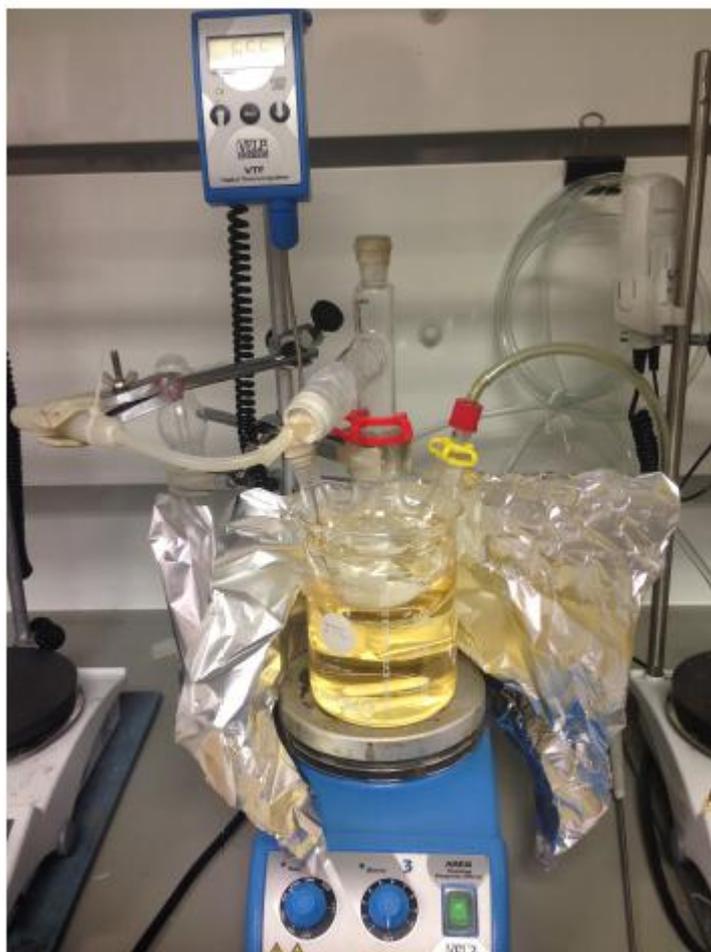


Figura 5: Montaje para la etapa de prepolimerización del PGS

En cuanto a la etapa de curado, se vertió el pPGS obtenido en un molde y se curó en un horno (JP Selecta) configurado a una temperatura de 130°C durante 48 horas. Si bien los parámetros tomados como estándar de referencia son 120-130°C para la temperatura y un tiempo de curado de 48-72 horas, se demostrará más adelante cómo estas variables están intrínsecamente relacionadas, y se puede predecir en qué punto se puede considerar que el proceso pasa desde la fase de prepolimerización a la de curado (ver punto 3.1.3 *Estudio cinético de la polimerización a partir de análisis reométricos*). Al consultar la bibliografía para la realización del proceso, varias fuentes ejecutaban este proceso a vacío pero se ha demostrado que no es necesario ya que no hay diferencias en las propiedades estudiadas entre hacerlo bajo condiciones de vacío o hacerlo en contacto con aire (Conejero-García *et al.*, 2017). Por ello, se realizó la etapa de curado sin vacío. Una vez transcurrido el tiempo necesario, se obtuvo un polímero con cadenas entrecruzadas y, por tanto, insoluble.

Análogamente, se realizó la etapa de prepolimerización variando únicamente la atmósfera y fijando 130°C como temperatura de referencia. Las atmósferas empleadas fueron aire comprimido seco, aire ambiente (húmedo), argón, nitrógeno y oxígeno.

Además, con el fin de estudiar las propiedades térmicas y moleculares de las macromoléculas formadas durante la primera etapa de síntesis, se preparó un prepolímero de poliglicerol sebacato con atmósfera de nitrógeno (como gas de referencia utilizado en la mayoría de las fuentes

bibliográficas) extrayendo muestras a diversos tiempos: 0 horas (monómeros fundidos y la mezcla homogeneizada), 1, 2, 3, 4, 8 y 24 horas (prepolímero).

3.1.2 Determinación de los pesos moleculares por cromatografía de permeación en gel

La técnica de cromatografía de permeación en gel (GPC) se emplea para la determinación de la distribución de los pesos moleculares de los polímeros. Se trata de un tipo de cromatografía líquida especial en la cual la muestra se separa según los volúmenes hidrodinámicos de cada constituyente. La separación tiene lugar cuando la muestra pasa a través de una columna que contiene un lecho poroso, normalmente un gel orgánico. De este modo, las moléculas más pequeñas pueden penetrar los poros mientras que las moléculas más grandes son excluidas. El camino de las moléculas grandes es más corto y, por tanto, son eluidas primero. Consecuentemente, las moléculas más pequeñas pueden penetrar por todos los poros y son eluidas posteriormente. A la salida de la columna, hay unos detectores que proporcionan el índice de refracción diferencial o la absorción ultravioleta y muestran la distribución de la curva. Sin embargo, para atribuir pesos moleculares actuales a la curva es necesario calibrar la columna con polímeros monodispersos de peso molecular conocido. Se ha de establecer una relación entre el peso molecular y el tiempo de elución y, ésta es únicamente válida bajo determinadas condiciones del experimento. Entre las condiciones se incluye la temperatura, el solvente, las condiciones de la cromatografía y la separación de columnas o sistema de columnas (OECD, 1996).

Para el desarrollo de este análisis, se utilizaron las siete muestras de mezcla monomérica o prepolímero a diferentes tiempos de síntesis de pPGS. El solvente (fase móvil) empleado fue el tetrahidrofurano (THF) (Sigma Aldrich, 99.9% pureza) en el cual se disolvió la muestra a una concentración entre 2 y 3 mg/ml. De este modo, se pesó la masa correspondiente de cada muestra (Balanza Mettler AX205) para obtener la concentración deseada y, posteriormente, se inyectaron en el GPC (Waters) para su análisis.

3.1.3 Estudio cinético de la polimerización a partir de análisis reométricos

El objetivo de la reometría es determinar las propiedades reológicas de los materiales, es decir, las relaciones entre las tensiones del material y las deformaciones que ha experimentado. Sin embargo, en la práctica no hay modo de saber la deformación a la que está sometida cada punto del fluido ni de medir todas las componentes espaciales del estrés. Normalmente, la reometría emplea más bien técnicas de fluido simple que son bastante sencillas y permiten asegurar que el material bajo las condiciones requeridas se puede expresar como una relación entre un número pequeño de variables y que esas variables se pueden medir directamente a nivel macroscópico, es decir, sin la necesidad de medir localmente en el interior del material (Coussot, 2014). Por ello, el instrumento empleado para llevar a cabo estos ensayos es el reómetro (AR-200ex), que opera desplazando una geometría (plato, cono o cilindro) de manera tangencial o radial sobre una plataforma que contiene el material de estudio.

Cabe destacar que, para la realización del experimento, el reómetro utilizado dispone de tres componentes: plato inferior, plato superior y el brazo (Figura 6). El plato inferior es estático y es donde se colocará la muestra. El brazo va alineado con el soporte superior del reómetro y lleva enroscado el plato superior, que se dispone paralelo al inferior.

Se realizaron doce ensayos (velocidad: 1.5 rad/s; espacio entre plato superior e inferior: 100 micrómetros) partiendo de los monómeros previamente fundidos y homogeneizados en todas las

ocasiones: simplemente se varió en cada uno de los ensayos la temperatura de curado del PGS: de 125°C en el primer experimento a 180°C en el último, en intervalos de 5°C. Se colocó la muestra de monómeros sobre el plato inferior, asegurando que ésta cubriese de manera homogénea todo el plato y empezó el proceso el cual se desarrolló durante un máximo de 72 horas bajo una atmósfera que no podía ser controlada y que, por tanto, era de aire ambiental (y, por tanto, húmedo). Entre ensayos, se debían eliminar todos los restos procedentes de la muestra anterior para evitar contaminación con las siguientes.



Figura 6: Componentes del reómetro donde se puede observar el plato inferior en el cual se coloca la muestra y el plato superior y el brazo

3.1.4 Estudio térmico durante la síntesis de prepolímero mediante calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una de las técnicas más potentes en cuanto a análisis térmico se refiere. Ésta implica que, durante una rampa lineal de temperatura, se puede obtener información sobre las transformaciones termoquímicas que sufre la muestra. En esta técnica, la temperatura, la capacidad calorífica, las temperaturas de fusión y cristalización, así como algunos parámetros térmicos de reacciones químicas pueden ser determinados mediante tasas de enfriamiento o calentamiento constante (MENCZEL, 2009).

Las muestras empleadas para la caracterización térmica del pPGS durante el proceso de síntesis fueron los monómeros a diferentes tiempos de síntesis: 0 h (monómeros fundidos y homogeneizados), 1, 2, 3, 4, 8 y 24 horas (prepolímero). A parte de éstas, se añadió una más la cual no contendría nada para actuar como línea base. El DSC (Perkin Elmer, 8000) es muy útil cuando únicamente se dispone de una cantidad limitada de la muestra, por ello, sólo unos pocos miligramos son requeridos para la medida (MENCZEL, 2009). La medida se realiza en unas cápsulas en las cuales se pesaron los miligramos requeridos para cada una de las muestras (entre 1 y 3 mg), a excepción de la línea base (0 mg). Posteriormente, se sellaron las cápsulas (Encapsulador de cápsulas para DSC, Perkin Elmer) aplicando presión. Únicamente se puede introducir una muestra en el DSC, por tanto, se llevaron a cabo ocho ensayos que siguieron el mismo procedimiento: el proceso empezaba a 50°C, subía hasta 150°C donde se mantenía durante unos minutos, bajaba a -50°C donde se volvía a mantener durante unos minutos, volvía a subir a 150°C y volvía a mantenerse y, finalmente, bajaba a 50°C. El primer proceso que tiene lugar es para eliminar la memoria térmica previa del material. Se eligieron estos intervalos de temperatura

para así poder observar las temperaturas de fusión de cristales y de transición vítrea. Se determinó como temperatura máxima para las medidas 150°C porque es de esperar que las transiciones térmicas ocurran a temperaturas bastante inferiores, y las temperaturas de ebullición del glicerol y del ácido sebácico se encuentran muy por encima de este valor.

3.2 Caracterización termoquímica de prepolímero de poliglicerol sebacato

3.2.1 Calorimetría diferencial de barrido

Análogamente al procedimiento descrito en el apartado 3.1.4 *Estudio térmico durante la síntesis de prepolímero mediante calorimetría diferencial de barrido*, se realizó este ensayo. En este caso, las muestras empleadas para la caracterización térmica del pPGS fueron los prepolímeros sintetizados bajo diferentes atmósferas: aire comprimido, aire húmedo, argón, nitrógeno y oxígeno. Además, se realizó también un ensayo sin muestra para que actuase como línea base.

3.2.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

La espectroscopía de Fourier es un término que describe el análisis de cualquier señal que varíe sus componentes frecuenciales. Las transformadas de Fourier pueden ser aplicadas a distintas espectroscopías entre las que se incluye la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Ésta incluye el espectro de la absorción, reflexión, emisión o el fotoacústico obtenidos mediante la transformada de Fourier de un interferograma óptico. La técnica de FTIR ofrece velocidad, precisión y sensibilidad las cuales eran previamente imposibles de lograr con espectrómetros de longitud de onda dispersa. Además, este método permite un análisis simultáneo de varios componentes frecuenciales en una simple operación y emplea interferómetros en los espectrómetros. Dependiendo de éstos últimos, se utilizarán diferentes interferómetros (Jaggi, Neena, Vij, 2006).

Se emplearon tanto las muestras de los monómeros mezclados y por separado, es decir, glicerol y ácido sebácico (previamente fundido) como las de los prepolímeros previamente obtenidos bajo diferentes atmósferas: aire comprimido, aire húmedo, argón, nitrógeno y oxígeno. Los ensayos se realizaron individualmente para cada una de las muestras, por ello, se llevaron a cabo siete ensayos en total. Para la ejecución de éstos, se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo FTIR (Platinum ATR) el cual permite la identificación de grupos funcionales de materiales orgánicos y determinadas estructuras de muestras sólidas y líquidas por transmisión espectroscópica de infrarrojo por transformada de Fourier. La muestra se colocó en el portamuestras asegurando que ésta lo cubriese todo para así evitar la obtención de señales erróneas. Una vez colocada la muestra, comenzó el experimento (128 *scans* a 16cm^{-1} en el rango de $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), que duró unos pocos minutos. Después de cada ensayo, se debía eliminar bien la muestra anterior con etanol para así evitar fallos en las siguientes.

3.2.3 Análisis reométrico del curado bajo diferentes atmósferas

Análogamente al procedimiento descrito en el apartado 3.1.3 *Estudio cinético de la polimerización a partir de análisis reométricos*, se llevó a cabo este ensayo. En este caso, las muestras eran los prepolímeros sintetizados bajo diferentes atmósferas: aire comprimido, aire húmedo, argón, nitrógeno y oxígeno, todos ellos a una temperatura de curado de 130°C la cual se mantuvo durante todo el ensayo en el reómetro. Éste tenía programado una duración máxima de 48 horas para cada ensayo, siendo el total de experimentos cinco. Entre un proceso y el

siguiente, se debían eliminar de manera adecuada los restos procedentes de la muestra anterior para evitar contaminaciones en el siguiente.

3.2.4 Determinación del grado de esterificación

La volumetría es un método de análisis químico cuantitativo que ha sido comúnmente empleada en los laboratorios durante más de una década. Sirve para determinar la concentración de un reactivo a partir de otro que presenta concentración conocida. Debido a ello, se han desarrollado numerosas metodologías entre las que cabe incluir los protocolos colorimétricos debido a que son rápidos, fáciles de emplear y de cuantificación segura para controlar la adición estequiométrica de manera precisa del reactivo (Barbu, Kosak, Prins, Gillmore, & Korich, 2016).

Para medir el grado de esterificación tanto del pPGS sintetizado bajo diferentes atmósferas como de los monómeros: glicerol y ácido sebácico por separado y mezclados, se empleó la técnica de volumetría para así saber los grupos carboxilos libres en cada muestra. Para ello, se preparó un litro de THF al 75% y etanol (Sigma Aldrich, 99.9% pureza) al 25% en un frasco ISO. Esta mezcla se colocó en una placa agitadora con un agitador magnético en su interior para conseguir su homogeneización y, posteriormente, se tomaron 50 ml los cuales se midieron en una probeta. Seguidamente, se pesó en un matraz de *Erlenmeyer* la muestra de estudio en cada caso (en total ocho diferentes, todas ellas a una concentración de 2 mg/ml) y se le añadieron los 50 ml medidos con anterioridad. Todo junto se colocó en una placa agitadora (MR Hei-Standard) con un agitador magnético en su interior y se agitó hasta que la muestra se disolvió. Posteriormente, se le añadieron cinco gotas de rojo fenol (colorante) (Sigma Aldrich). Además, se colocó un corte de *parafilm* en el orificio superior del matraz de *Erlenmeyer* para evitar la evaporación de la mezcla. Por otro lado, se preparó una disolución de hidróxido de potasio (Sigma Aldrich, 85% pureza) 0.01 M en un matraz aforado y se llenó con esta disolución una bureta que se encontraba justamente encima del matraz de *Erlenmeyer*. Por último, se abrió la llave de la bureta y empezaron a caer gotas de la disolución de hidróxido de potasio a la mezcla de THF y etanol junto con la muestra disuelta (en principio amarillenta), de modo que cuando ésta hacía un viraje de color y conseguía un color rojizo, se cerraba la llave y se obtenía el volumen de hidróxido de potasio necesario para la producción de este fenómeno. Para la próxima medida, se volvía a llenar la bureta de hidróxido de potasio y se limpiaba el matraz de *Erlenmeyer* para poder pesar la siguiente muestra. Además, se hizo un ensayo sin muestra para que sirviese como blanco para el resto.

3.3 Degradación enzimática

3.3.1 Productos de biodegradación

El ensayo de degradación del pPGS se realizó bajo la acción enzimática de la lipasa de páncreas porcino (Sigma Aldrich). El pPGS había sido previamente sintetizado bajo una atmósfera de nitrógeno. Con la cantidad de enzima disponible, se decidió realizar el ensayo a tres concentraciones de enzima diferentes: 20000, 2000 y 200 unidades/mililitro donde, de acuerdo al fabricante, 1 unidad corresponde a la hidrólisis de 1 microequivalente del ácido graso de un triglicérido en 1 h a pH 7.7 a 37°C usando aceite de oliva. Para la hidrólisis de todos los grupos éster formados, se necesitaban en total 1.91 mg de enzima, los cuales se pesaron. Posteriormente, se obtuvieron tres disoluciones (de tres mililitros cada una) con tampón fosfato salino (DPBS) y enzima, una para cada concentración deseada. Como se quisieron tomar tres ejemplos a diferentes horas de actuación de la enzima: (24, 48 y 96 horas para cada concentración), se necesitaron nueve muestras de pPGS (0.15 gramos cada una) las cuales se pesaron

individualmente en nueve viales diferentes. A continuación, se introdujo en cada vial 1 ml de la disolución correspondiente (DPBS más la enzima a diferentes concentraciones), de manera que se obtuvieron tres muestras para cada una de las diferentes concentraciones. Finalmente, se introdujeron todos los viales en un incubador a 37°C.

A las 24 horas, se extrajeron tres muestras (cada una correspondiente a una concentración diferente) y se guardaron los residuos de degradación (sobrenadante líquido) de cada una en tres *Eppendorf* diferentes. A continuación, se limpió cada vial dos veces con agua destilada y, posteriormente, se introdujeron los viales en un desecador a vacío (JP Selecta) para así eliminar cualquier resto que hubiese podido permanecer. Análogamente, se realizó el procedimiento a las 48 y a las 96 horas. Una vez se llevó a cabo el procedimiento para todas las muestras, se introdujeron todos los viales en la liofilizadora (Cool vacuum) 24 horas para eliminar cualquier resto de agua que pudiese quedar. Tras la liofilización, se pesaron todos los viales que contenían las muestras de pPGS para determinar la pérdida de masa mediante un posterior análisis gravimétrico, infiriendo que la masa perdida se debía a la hidrólisis de los grupos éster hasta oligómeros pequeños o moléculas solubles en la disolución tampón.

En paralelo, se realizaron tres ensayos como control para asegurar el efecto de la enzima en la degradación del pPGS. Para ello se emplearon tres viales con muestras de pPGS en su interior y un mililitro en cada uno de ellos de DPBS sin enzima. Se introdujeron todos ellos en el incubador a 37°C y se siguió el procedimiento anterior.

3.3.2 Cultivo celular en presencia de los productos de degradación

La realización del cultivo celular tenía como finalidad analizar como afectaban los productos de biodegradación al metabolismo celular. Para ello, se empleó la línea celular L929, es decir, fibroblastos de ratón los cuales se encontraban congelados para su conservación. En primer lugar, se preparó el medio donde expandir las células, el cual estaba compuesto por medio de cultivo con alto contenido en glucosa (DMEM HG) (Sigma Aldrich) con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de penicilina-estreptomicina (P/S), todo ello se puso previamente en el baño a 37°C (Digiterm 200) para su acondicionamiento. A continuación, se descongelaron las células y se introdujeron en el baño a 37°C durante unos pocos minutos. Seguidamente, en un tubo de centrifuga (*Falcon*) se introdujeron 10 ml de medio previamente preparado y 1 ml del medio celular descongelado para poder diluir el dimetil sulfóxido (DMSO) y todo junto se centrifugó a 250 G durante 5 minutos (Centrifuga Eppendorf 5804). Posteriormente, se retiró el medio existente y se añadió 1 ml de medio para la resuspensión celular. De la resuspensión se cogieron 10 microlitros y se pasaron a un tubo *eppendorf* junto con 10 microlitros de *trypan blue* (tinción de células muertas) (Gibco) los cuales se mezclaron de manera homogénea. De la mezcla, se tomaron 10 microlitros para contar células con la cámara de *Neubauer* (Marienfield) y, a partir de ahí, se calculó el número de células existentes en 1 ml mediante la siguiente fórmula:

$$[c] = \frac{N * 10^4}{D} = \frac{25 * 10^4}{1/2} = 500.000 \text{ células}$$

siendo N el número medio de células entre los cuatro cuadrantes y D el factor de dilución por la mezcla con *trypan blue*. Una vez obtenida la densidad celular, se decidió en cuántos frascos de cultivo se iban a sembrar las células para su proliferación y posterior uso. De este modo, se cultivaron las células en dos frascos de cultivo, los cuales contenían cada uno 10 ml de medio y 0,5 ml de medio con células resuspendidas para permitir que las células pudiesen proliferar. Y, finalmente, se introdujeron ambos frascos en el incubador (Hucoa-Erlöss). Debido a la alta proliferación de estas células, se hizo necesario cambiar el medio de cultivo cada dos días.

Paralelamente a la proliferación celular, se empezaron a preparar los medios de control y de estudio los cuales servirían para analizar con posterioridad cómo afectan los monómeros tanto mezclados como por separado y los productos de degradación del pPGS a la viabilidad celular. Los medios empleados fueron: control negativo (látex), contacto indirecto de pPGS (pPGS en medio para un contacto indirecto célula-material), control positivo (únicamente medio), mezcla de monómeros, ácido sebácico, glicerol, residuos de degradación y control con sales (DPBS para observar el efecto que tienen las sales en las células). El látex actuó como medio de control negativo ya que las células son incapaces de vivir en contacto con este o con sus residuos por lixiviado. Se pesaron los gramos de látex necesarios en un *Falcon* y se esterilizó el material tras un proceso que empezó llenando el *Falcon* con etanol al 70% durante 1 hora. La esterilización tuvo lugar en el interior de la cabina de cultivo celular (Tel Star AV-30/70) para asegurar que siguiese siendo estéril. Tras la hora, se vació el líquido que había y se puso una disolución con un 70% de etanol y un 30% de agua *milliQ* (Agua ultra pura Direct-Q® 3 Merck Millipore) durante 1 hora. Tras la hora, se vertió el líquido existente y se puso otra disolución con un 50% de etanol y un 50% de agua *milliQ* durante 10 minutos. Tras los 10 minutos, se retiró la disolución existente y se introdujo una nueva con un 30% de etanol y un 70% de agua *milliQ* durante otros 10 minutos. Finalmente, se eliminó el líquido y se llenó el *Falcon* con agua *milliQ*. Por otro lado, el pPGS preparado bajo atmósfera de nitrógeno se pesó en un *Falcon*, siguiendo el procedimiento anterior éste se llenó con etanol al 70% durante 1 hora, pero tras la hora, estaba la muestra disuelta, por tanto, se vertió todo a una placa Petri y se dejó en el interior de la cabina para que se evaporase el etanol. Posteriormente, se cogió el pPGS y se puso en un *Falcon* con agua *milliQ*.

A continuación, se tomaron los residuos de degradación previamente obtenidos y se colocaron todos ellos en un *Falcon*. La idea era eliminar toda el agua existente que había empleando una liofilizadora para así únicamente tener los residuos de degradación junto con sales (procedentes del DPBS) y enzima, pero hubo que descartar esta idea, ya que el glicerol existente también se habría evaporado. Por tanto, se tuvo que fabricar medio de cultivo celular en el laboratorio para poder compensar este efecto. Para su fabricación era necesario DMEM en polvo (Sigma Aldrich), agua *milliQ*, D-glucosa (Sigma Aldrich, 99.5% pureza), un 10% de FBS del volumen total y un 1% de P/S del volumen total. De este modo, se calculó para el látex y el pPGS qué cantidad de cada sustancia era necesaria y se añadió, eliminando previamente el agua *milliQ* ya existente debida al tampón DBPS presente en el medio con residuos y enzima. En el caso del medio de los residuos de degradación se inhibió la enzima a 60°C durante 30 minutos en un termobloque y, posteriormente, se añadieron las cinco sustancias necesarias para dar lugar al medio y se mezclaron junto con todos los residuos obtenidos. En cuanto a la mezcla de monómeros, ácido sebácico y glicerol, se pesaron las muestras de cada uno de ellos en tres *Falcon* diferentes y se les añadió DMEM en polvo, agua *milliQ*, D-glucosa, FBS y P/S. Para el control con sales, a parte de las cinco sustancias se tuvo que añadir DPBS. Y, por último, el control positivo se trataba únicamente del medio fabricado. A parte de los ocho medios citados anteriormente, se añadió uno más, se trataba de otro control positivo de DMEM HG comercial con rojo fenol (Gibco). El rojo fenol es un indicador químico que permite discriminar sutiles variaciones de pH (de rojo a amarillo) conforme se van liberando residuos metabólicos celulares que acidifican el medio, signo de que hay que sustituirlo por medio fresco. Este control adicional se utilizó como comparación de los medios producidos en base al DMEM en polvo, a los que no se añadió el rojo fenol.

Una vez se tuvieron todos los medios preparados, se filtraron y, posteriormente, se procedió a la siembra de células. Para ello, se cogieron los frascos que se tenían con células y medio. Todo el proceso que se va a detallar a continuación tuvo lugar en el interior de la cabina de flujo laminar. En primer lugar, se retiró el medio existente y se le añadió DPBS a cada frasco para limpiar todo aquello que pudiese quedar de medio y, posteriormente, se retiró. Se añadieron 500 microlitros de tripsina/EDTA (Sigma Aldrich) a cada frasco, volumen que depende de la línea celular y del

coating (revestimiento) entre otros. Se utiliza para levantar las células (rompe los enlaces célula-proteína y célula-célula) y en el caso de los fibroblastos con este volumen es suficiente. Para que la tripsina actúe, se colocaron los frascos con la tripsina en el incubador a 37°C durante 2 minutos. Después, para inactivar la tripsina se añadió medio (10 ml para ambos frascos), se tiraron los 10 ml al primer frasco, se aspiró y tiró varias veces el medio para recoger las células y, a continuación, se cogieron los 10 ml y se pasó al siguiente frasco repitiendo el procedimiento. Finalmente, se guardó todo en un *Falcon* y se puso en la centrifugadora durante 5 minutos a 250G. De esta manera, se consiguió que las células precipitasen y quedasen en el fondo del *Falcon*. Se retiró el medio sobrante y únicamente quedó el *pellet* de las células, las cuales se resuspendieron en 1 ml de medio y se guardaron en un tubo *Eppendorf*. A continuación, se contaron las células con la cámara de *Neubauer* para calcular las células necesarias para llevar a cabo el ensayo, así como el volumen necesario de medio para albergar esas células y en un nuevo *Falcon* se introdujo medio de cultivo preparado junto con la cantidad de células calculada ($6.4 \cdot 10^4$ células).

Para el ensayo se necesitaban dos placas de 96 pocillos (P96) ya que la viabilidad celular se iba a analizar una vez transcurridos 1 día y 5 días desde la siembra de células. Además, en cada placa se hicieron dos ensayos (con un $n=4$ para cada medio y cada ensayo) ya que se emplearon dos técnicas de estudio para el análisis de la viabilidad celular: MTS (*CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, en inglés) y Pico Green (*Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit*, en inglés). El MTS, se seleccionó puesto que requiere del metabolismo celular para cuantificar el número de células existentes, a diferencia del ensayo de Pico Green.

Se cubrieron los fondos de pocillo de las dos P96 en primer lugar con una capa de FBS para asegurar que tras 24 horas las células se adhiriesen y se introdujeron en la incubadora. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró esa capa y se realizó la siembra de las células en un primer momento con DMEM HG, las cuales también se introdujeron en la incubadora. A las 3 horas, se eliminó este medio y ya se puso en cada pocillo su medio correspondiente y se introdujeron en la incubadora. Los pocillos de la P96 se organizaron según los ensayos de modo que cada columna contenía un medio distinto y, de cada columna, las cuatro primeras filas eran para realizar el ensayo de MTS y las cuatro últimas filas eran para llevar a cabo el ensayo de Pico Green.

A las 24 horas, se sacó una placa P96 (5 días) a la cual se le cambiaron los medios y se volvió a introducir en la incubadora y sobre la otra P96 (1 día) se realizó el ensayo MTS. Para ello, en primer lugar, se vaciaron las cuatro primeras filas de la P96 (1 día) y se les añadió una mezcla formada por 5/6 del volumen total de medio de cultivo y 1/6 del volumen total de MTS. A continuación, se introdujo la P96 (1 día) en la incubadora durante 3 horas y, posteriormente, esas cuatro filas que contenían la mezcla se traspasaron a otra P96, la cual se dispuso en el espectrofotómetro de lector de masas (Victor³, Perkin Elmer) para su análisis. Además, la P96 (1 día) que aún contenía los medios en las cuatro últimas filas se congeló a -80°C para realizar con posterioridad el análisis de Pico Green. Por otro lado, a la P96 (5 días) se le fueron cambiando los medios cada 24 horas hasta que finalmente cuando llegó el quinto día se le realizó el ensayo MTS análogamente al descrito anteriormente, congelando a -80°C también la P96 (5 días) con los medios presentes en las cuatro últimas filas para su posterior análisis de Pico Green.

Por otro lado, se obtuvo la recta de calibrado de MTS para posteriormente correlacionar la absorbancia con el número de células existentes. Para ello, se hizo la siembra de células en las 12 columnas de una P96 siguiendo el procedimiento citado anteriormente, con concentraciones celulares decrecientes de izquierda a derecha, es decir, diferentes concentraciones en cada columna en las cuatro primeras filas. Se tomaron tantas concentraciones distintas para poder obtener una mejor recta de calibrado. Posteriormente, se contaron con la cámara de *Neubauer* la cantidad de células existentes obteniéndose $13.89 \cdot 10^6$ células/ml. Con esta información,

haciendo diluciones se pudo obtener la concentración deseada en cada columna de la P96. Se colocó la P96 en la incubadora 3 horas y, transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de los pocillos de la placa y se les añadió la mezcla de medio de cultivo junto con MTS (5/6 y 1/6 del volumen total), además se añadió en tres pocillos más (sin células) únicamente el medio de cultivo junto con MTS para el control, es decir, para obtener la absorbancia del medio de cultivo sin las células. A continuación, se introdujo la P96 en la incubadora durante 3 horas y, posteriormente, se pasó cada mezcla contenida en cada pocillo a otra P96 para su análisis en el espectrofotómetro de lector de masas.

Finalmente, para el análisis mediante la técnica de Pico Green se siguieron las instrucciones descritas por el fabricante. Las células debían sufrir la lisis: por ello se congelaron previamente, para que sufrieran este efecto. De todos modos, se preparó una disolución que contenía agua *milliQ* en una proporción 19/20 y una solución tampón Tris-EDTA (TE) al 20% en una proporción 1/20, consiguiendo así diluir el TE al 1%. A continuación, de esta disolución se tomaron 13 ml (volumen necesario para cubrir las dos P96) y se le añadió Tritón X-100 al 0.2%. Todo esto se añadió a cada pocillo de las dos P96 (5 días y 1 día) para asegurar que se produjese el fenómeno de lisis, donde previamente se habían retirado los medios anteriores. De ahí, se tomó la mitad del volumen de cada pocillo y se traspasó a una P96 opaca en ambos casos. Por otro lado, de la primera disolución se cogió el volumen restante y se añadió la proporción equivalente de Pico Green y, con esta nueva disolución se rellenó la otra mitad del volumen de las dos P96 opacas. Todo el proceso se llevó a cabo en un ambiente sin luz para que no afectase a la medida, pues el reactivo es fotosensible. Por último, ambas placas se introdujeron en el espectrofotómetro de lector de masas para su lectura por fluorescencia (longitud de onda de excitación: 480 nm y longitud de onda de emisión 520 nm).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado, cabe destacar en primer lugar que, todos aquellos estudios donde no se especifique que el ácido sebácico previamente se funde y que el proceso de síntesis de pPGS tiene lugar a temperaturas menores de 130°C, podrían dar lugar a materiales con propiedades considerablemente diferentes ya que la reacción no se produce en mezcla líquida (conseguida al profundir) si no que está limitada por la superficie disponible de los granos sólidos de ácido sebácico (Jaafar *et al.*, 2011). Además, se realizó un experimento a 120°C sin fundir previamente y se pudo ver que, efectivamente, en ningún punto del proceso se llegaba a tener una masa homogénea líquida. El primer resultado relevante, por tanto, permite reivindicar la importancia de la homogeneización de los monómeros para que la reacción se produzca en fase líquida.

4.1 Evolución del peso molecular durante el proceso de síntesis

En este apartado se muestran los resultados correspondientes a la evolución de los pesos moleculares durante el proceso de síntesis de PGS. En primer lugar, se muestran los equivalentes a aquellos realizados con la técnica de GPC. Se tienen varias muestras a diferentes tiempos de síntesis y, gracias a ello, se puede observar cuales son los compuestos que se están formando (Figura 7). Partiendo de los monómeros por separado, se observa como el glicerol que presenta un menor peso molecular puede penetrar más poros y, por tanto, se eluye más tardíamente que el ácido sebácico el cual presenta un mayor peso molecular. Además, conforme el tiempo de síntesis va aumentando se observa la aparición de nuevas especies que inicialmente no existían, éstas podrían tratarse de oligómeros ya que durante el proceso de síntesis se están formando enlaces entre el glicerol y el ácido sebácico (y la consecuente condensación de moléculas de agua). Por tanto, con el paso de las horas se están formando compuestos con mayor peso molecular y, consecuentemente, tiempos de elución más cortos. También, se ve cómo los picos correspondientes a los monómeros van disminuyendo conforme se va formando el prepolímero. Además, se pueden determinar los pesos moleculares obtenidos en cada uno de los casos (Figura 8) gracias a los datos de la recta de calibrado con estándares monodispersos de poliestireno. Cabe destacar que, puesto que no se dispone de parámetros de Mark-Houwink para el PGS por ser este un polímero que aún está siendo estudiado en profundidad, no se presentan valores de peso molecular (en Da) precisos, pero sí que permite la comparación entre los diferentes tiempos de síntesis. Se puede deducir, por tanto, que los pesos moleculares del pPGS son en masa (M_w) y en número (M_n) 1275 Da y 424 Da respectivamente con un índice de polidispersidad de 3.01, lo que correspondería a cadenas relativamente cortas, es decir, de 8 a 12 unidades de repetición como máximo y con una presencia abundante de oligómeros cortos, típicos de las primeras etapas de polimerización en las policondensaciones.

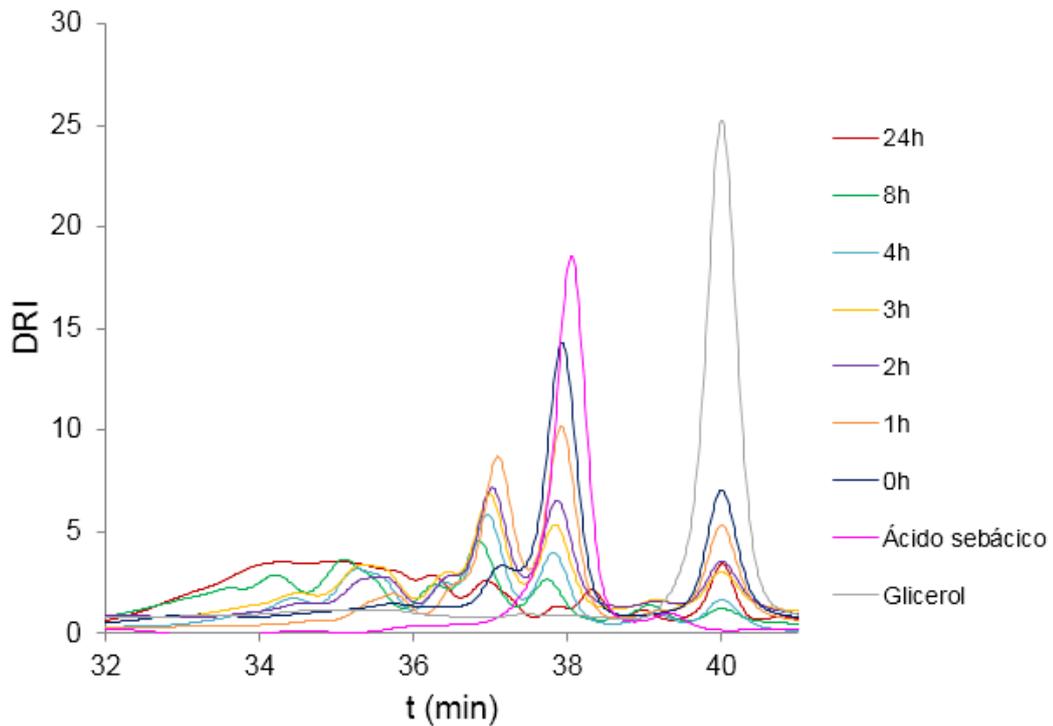


Figura 7: Evolución de los pesos moleculares durante el proceso de síntesis de PGS para el glicerol, ácido sebácico y los monómeros polimerizados a 0,1,2,3,4,8 y 24 h. DRI: Índice de refracción diferencial. El eje de abscisas indica el tiempo de elución del GPC

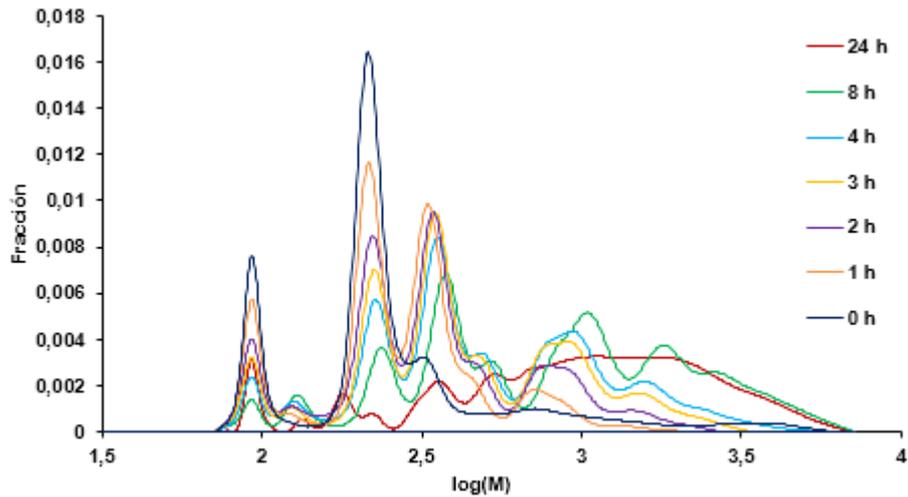


Figura 8: Distribuciones aproximadas de peso molecular obtenidas para cada una de las mezclas monoméricas polimerizadas durante 0,1,2,3,4,8 y 24 horas

En segundo lugar, con los análisis reométricos se registra la viscosidad obtenida a lo largo del tiempo para cada una de las temperaturas de síntesis del PGS que varían desde 125°C hasta 180°C en intervalos de 5°C partiendo en todos los casos de los monómeros previamente fundidos y homogeneizados (Figura 9). A partir de la viscosidad, se obtiene el punto de gel en cada una de ellas siendo éste el punto máximo de viscosidad alcanzado. Éste tiene lugar cuando se obtiene finalmente el polímero entrecruzado donde éste, sólido por haber gelificado, se fragmenta y destruye por el deslizamiento constante del disco. Una vez calculado el punto de gel, se consigue

una estimación de los parámetros cinéticos de la reacción (Figura 10). Se tiene pues que a una mayor temperatura, hay un mayor movimiento tanto de cadenas como de monómeros y, por tanto, una mayor cinética de reacción lo que provoca que exista una mayor probabilidad de que todos los grupos químicos reaccionen. Al producirse este fenómeno, se obtiene una red polimérica más densa ya que las cadenas entre nudos son más cortas y, de este modo, se requiere de una viscosidad más baja para alcanzar el punto de gel. Entonces, con pesos moleculares más bajos, se obtienen viscosidades más bajas. Se puede concluir por tanto que el PGS es un polímero muy versátil y, dependiendo del uso que se le quiera dar se le pueden aplicar distintas temperaturas de curado y obtener así distintos puntos de gel. Normalmente, es habitual hacer el curado a 130°C durante 48 horas (Conejero-García et al., 2017) pero aún no se había demostrado por qué ese tiempo era el adecuado ni tampoco cómo se vería modificado si se hace el curado a otras temperaturas.

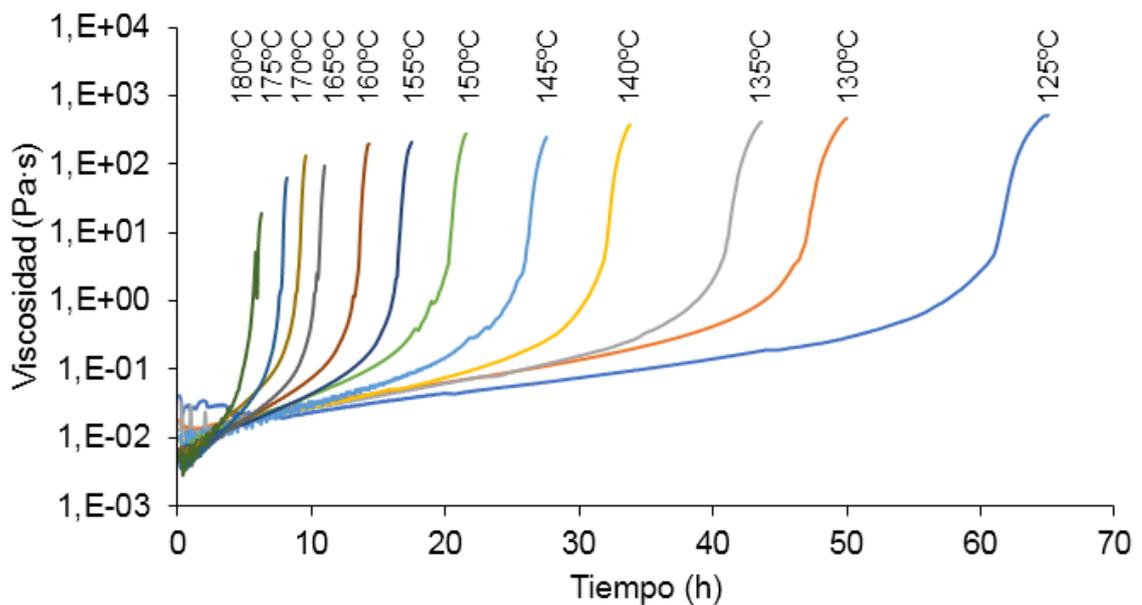


Figura 9: Viscosidad registrada durante el proceso de síntesis de PGS a diferentes temperaturas

Como se puede observar en la Figura 9, al principio hay un comportamiento lineal poco acusado, es decir, de baja pendiente que acaba derivando en un aumento pseudolineal muy pronunciado de la viscosidad el cual da lugar al entrecruzamiento. Se trata de un comportamiento característico de las policondensaciones, pero, en este caso, se ve especialmente acusado por que el glicerol puede formar más de dos enlaces y existe un OH asimétrico, de modo que, a partir de cierto punto, las cadenas se hacen más largas y, sobre todo, se forman entrecruzamiento entre ellas lo que da lugar a que aumente drásticamente su viscosidad.

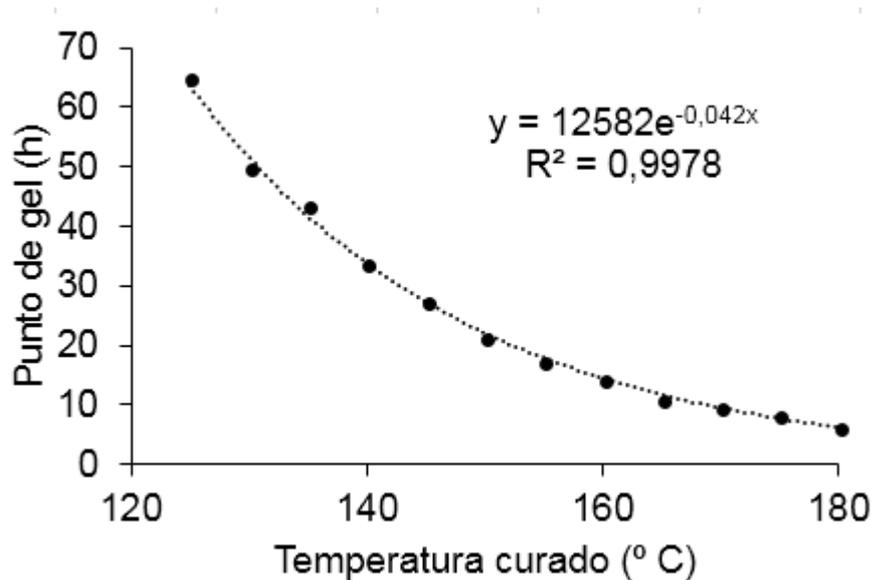


Figura 10: Punto de gel obtenido a diferentes temperaturas de curado que varían de 125°C a 180°C en intervalos de 5. En el margen superior derecho se encuentra la ecuación que describe los parámetros cinéticos de la reacción, así como el ajuste del modelo

4.2 Estudio de las características termoquímicas

La caracterización termoquímica del prepolímero se realizó mediante diversas técnicas (DSC, FTIR, reometría y valoración química) de las cuales a continuación se muestran los resultados. En primer lugar, con la técnica de DSC se determinan las transiciones térmicas del material, es decir, se obtienen las temperaturas de transición vítrea (T_g) y de fusión cristalina (T_m) en su caso, tanto para los monómeros a diferentes horas de síntesis como para los prepolímeros sintetizados bajo diferentes atmósferas. En la Figura 11, se representa el flujo de calor requerido para mantener cierta temperatura en los monómeros a diferentes tiempos de síntesis. En primer lugar, se observa en los monómeros el pico correspondiente a la fusión del ácido sebácico el cual se ve ligeramente reducido debido a que se encuentra mezclado con el glicerol ($\approx 118^\circ\text{C}$). A medida que transcurre el tiempo de síntesis, se van formando oligómeros los cuales también presentan la capacidad de fundir, aunque a menores temperaturas. Finalmente, se van produciendo pequeñas cadenas las cuales ya presentan características propias de un polímero y, por tanto, la capacidad para formar cristales de manera ordenada. En el detalle realizado entre -25°C y -5°C , se observa la T_g siendo únicamente apreciable a las 24 horas, es decir, cuando se ha formado el prepolímero propiamente dicho (se aprecia a las 24 h que la cantidad de oligómeros que funden a mayor temperatura es muy reducida).

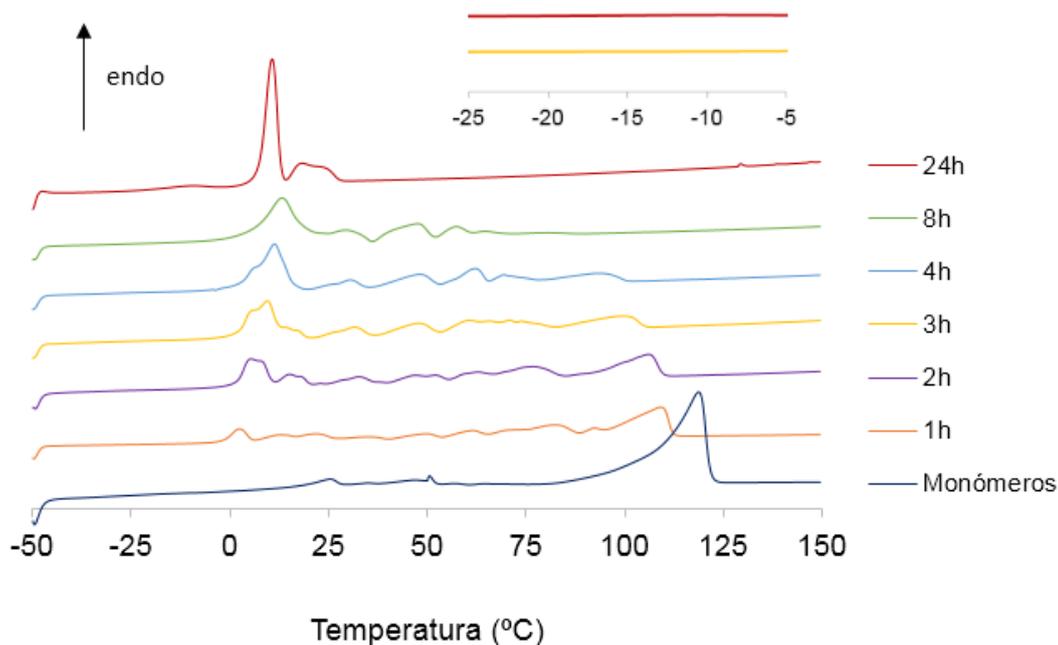


Figura 11: Potencia en mW obtenida por cada uno de los monómeros a diferentes tiempos de síntesis: monómeros (0h), 1h, 2h, 3h, 4h, 8h y 24h mientras se les aplica una temperatura (°C). En el margen superior derecho se encuentra el detalle de la gráfica entre -25°C y 5°C

Por otro lado, se muestra el flujo de calor requerido para mantener cierta temperatura de los diferentes prepolímeros sintetizados bajo diferentes atmósferas (Figura 12). Los diferentes picos observados se deben a las diferentes temperaturas de fusión cristalina que presenta cada prepolímero (recuérdese que todos habían sido polimerizados durante 24 h y, por ello, en los siguientes barridos se alcanza como temperatura máxima 60°C), apareciendo en primer lugar el de aire comprimido (AirCom), seguida del de oxígeno y aire, posteriormente el de nitrógeno y, finalmente, el de argón. Una temperatura de fusión de cristales más baja implica que se han formado cadenas más cortas o más ramificadas. Por otro lado, se puede observar que los prepolímeros sintetizados bajo atmósferas de argón y oxígeno presentan una serie de fluctuaciones a temperaturas más elevadas lo que indica la presencia de oligómeros que aún no han formado cadenas pero que funden, al igual que a tiempos inferiores a 24 h en la Figura 11. Además, calculando la entalpía de fusión, como el área bajo cada pico correspondiente a T_m , se pueden comparar los diferentes valores sabiendo que están relacionados con el porcentaje de cristalinidad (Figura 13). Una mayor entalpía implica que se han formado más cristales, es decir, que hay más cadenas poliméricas lineales equivalentes.

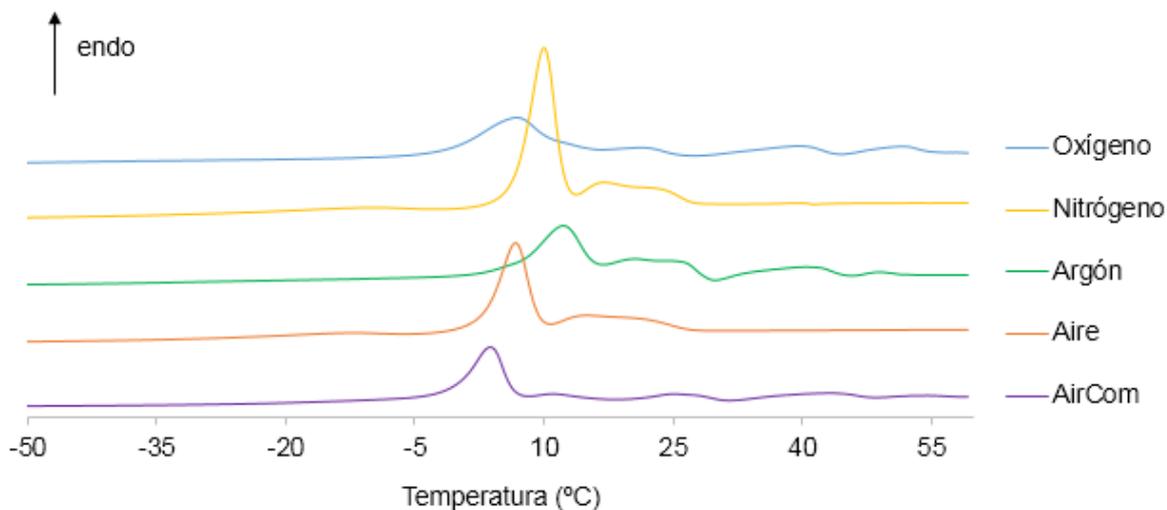


Figura 12: Potencia en mW obtenida por cada uno de los prepolímeros sintetizados bajo las diferentes atmósferas al aplicar un barrido de temperatura (°C)

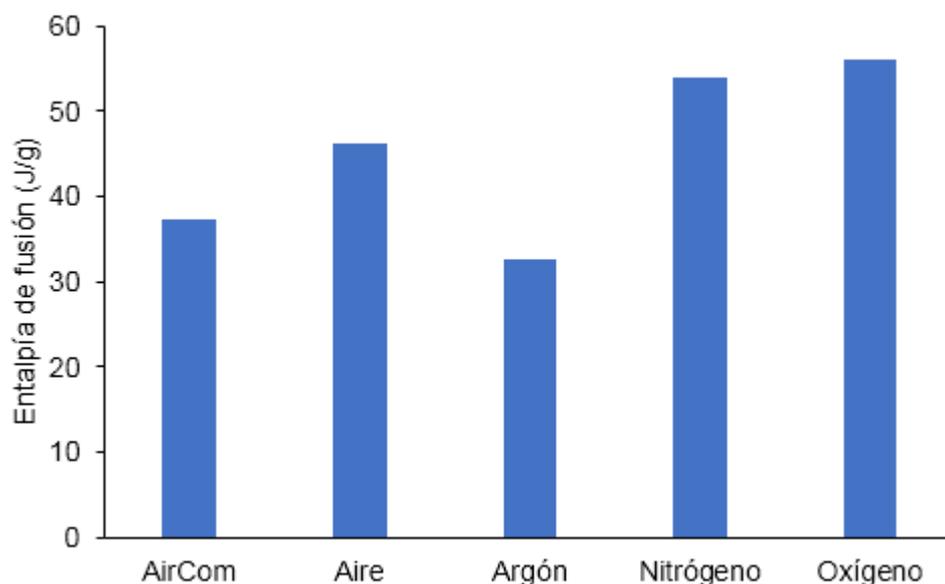


Figura 13: Entalpía específica de fusión obtenida por cada prepolímero sintetizado bajo diferentes atmósferas

En segundo lugar, con la técnica de FTIR se determina la naturaleza química de los enlaces que se han formado en los monómeros tanto mezclados como por separado y en los diferentes prepolímeros sintetizados bajo diferentes atmósferas (Figura 14). Alrededor de los 1700 cm^{-1} , se puede observar el pico correspondiente al doble enlace carbono-oxígeno que es el que presenta el ácido sebácico y el cual permanece cuando tiene lugar la esterificación entre el ácido sebácico y el glicerol. Por ello se observa en todos los prepolímeros y, también en el ácido sebácico y en los monómeros (aunque no en el glicerol). Por otro lado, entre los 2900 y los 3400 cm^{-1} se observa en el caso del glicerol y de los monómeros una fluctuación correspondiente a los enlaces -OH , grupo químico característico del glicerol. En los prepolímeros esta banda es mucho menor debido a la formación de los enlaces éster. Este pico parece desdoblarse y se desplaza hacia longitudes de onda mayores según el polímero está más esterificado lo cual coincide con lo que se ha

observado en el DSC. A continuación, el pico que se observa en torno a los 1140 cm^{-1} es debido a la existencia de enlaces simples carbono-oxígeno, por ello se observa tanto en el glicerol como en todos los prepolímeros (al formarse los enlaces éster, permanece este enlace al liberarse una molécula de agua). Y, por último, los picos que se observan alrededor de 2900 cm^{-1} se deben a la existencia de enlaces carbono-hidrógeno que como se puede ver son característicos tanto en monómeros mezclados y por separado como en los diferentes prepolímeros. Cabe destacar que, aunque esta técnica permite determinar con precisión que efectivamente los enlaces formados son de tipo éster independientemente del ambiente, o se puede con ella discriminar sobre la cantidad o tipo de enlaces de cada pPGS. Además, los enlaces éster formados por los -OH simétricos o por el -OH asimétrico del glicerol no parecen generar diferencias en la absorbancia infrarroja, o esta no es apreciable.

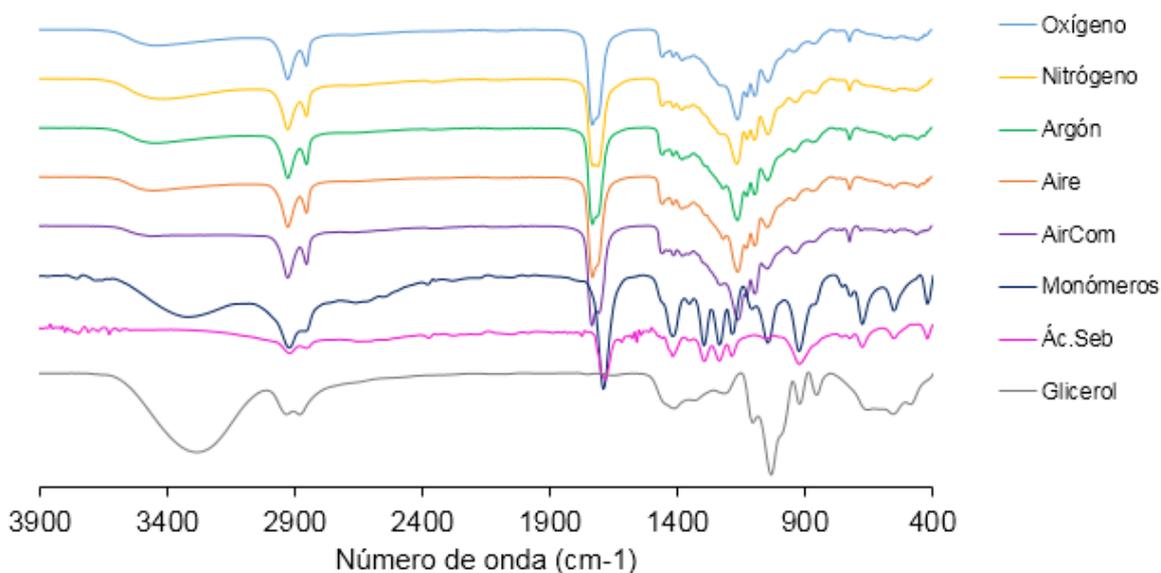


Figura 14: Espectro FTIR de los monómeros por separado y mezclados, así como de los prepolímeros sintetizados bajo diferentes atmósferas

A continuación, con los análisis reométricos se muestran las viscosidades iniciales de los diferentes prepolímeros (Figura 15). En primer lugar, se puede observar que los prepolímeros una vez sintetizados a diferentes atmósferas, se encuentran en puntos iniciales ($t=0\text{ h}$, o sea, 24 h de prepolimerización pero 0 h de curado) de la reacción distintos a pesar de haber sido prepolimerizados todos ellos a 130°C . Ordenándolos de viscosidad inicial mayor a menor, resultan: aire húmedo, aire comprimido, argón, oxígeno y nitrógeno. Aquellos de mayor viscosidad inicial significa que presentan un mayor peso molecular y, esto, puede ser debido o bien porque hay cadenas bastante ramificadas o bien porque hay cadenas más largas. Se puede deducir también que en aquellos polímeros donde la etapa de curado es más rápida es porque la primera etapa de prepolimerización también lo ha sido (viscosidad inicial mayor). Cabe destacar que la etapa de curado de todos los polímeros tiene lugar bajo un ambiente de aire húmedo. De este modo, si el entrecruzamiento se produce más rápidamente, se formarán cadenas más cortas entre nudos y, por tanto, una red más densa. Si se compara con los resultados del DSC, se tiene que con esta técnica cadenas más largas o con menos ramificaciones implican un mayor porcentaje de cristalinidad de modo que aire comprimido y argón presentan tiempos de curado menores, cadenas más cortas o más ramificadas y en consecuencia una entalpía de fusión menor mientras que el oxígeno y el nitrógeno presentan tiempos de curado mayores y, por tanto, cadenas

más largas o menos ramificadas y una entalpía mayor lo cual implica una mayor cristalinidad del prepolímero (puesto que el PGS curado no presenta cristalinidad al ser una red entrecruzada).

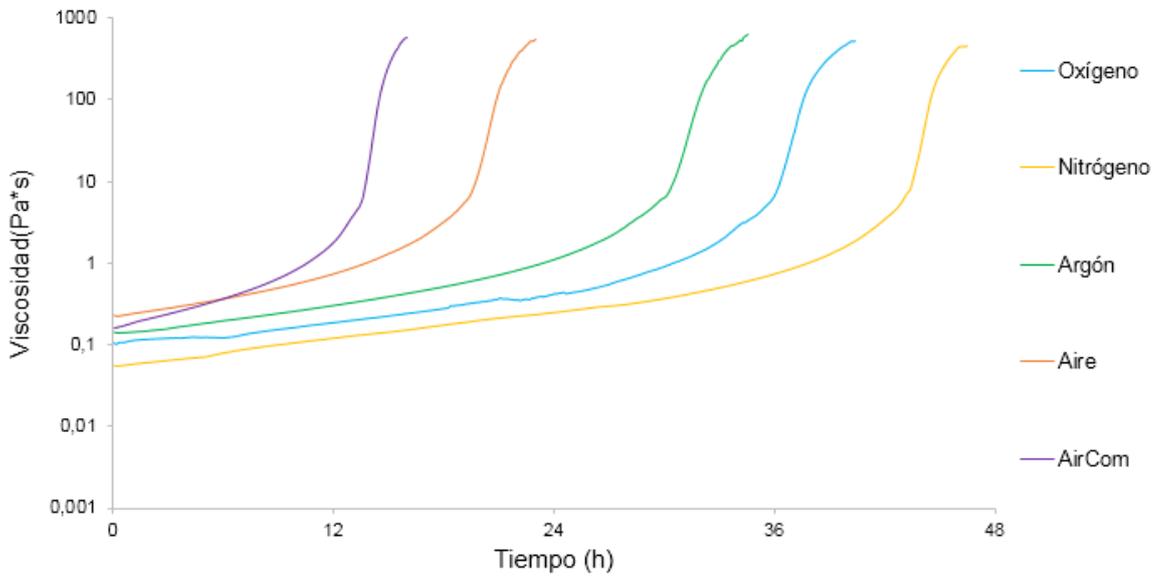


Figura 15: Viscosidad inicial registrada para cada uno de los prepolímeros sintetizados bajo diferentes atmósferas: aire comprimido, aire húmedo, argón, nitrógeno y oxígeno. El punto de partida son los diferentes prepolímeros a los que posteriormente se les realiza la etapa de curado en condiciones ambientales

Finalmente, la última técnica empleada para la caracterización termoquímica del prepolímero es la valoración química mediante la volumetría. Una menor cantidad de grupos carboxilos (presentes en el ácido dicarboxílico -COOH) implica un grado de esterificación más alto, de acuerdo a la Figura 3 del apartado 1.2.1 *Poliglicerol sebacato* (Figura 16). En el caso del prepolímero de aire comprimido y argón se tiene un menor grado de esterificación, esto quiere decir que hay un mayor número de grupos carboxilos libres que aún no han reaccionado lo que podría implicar la presencia de cadenas o bien más cortas o bien más ramificadas. Por el contrario, los prepolímeros de nitrógeno y oxígeno presentan un mayor grado de esterificación lo que implica que se ha consumido más ácido sebácico y, en consecuencia, la presencia de cadenas o bien más largas o bien menos ramificadas. Los resultados obtenidos mediante esta técnica son comparables a los obtenidos anteriormente con las técnicas de DSC y reometría.

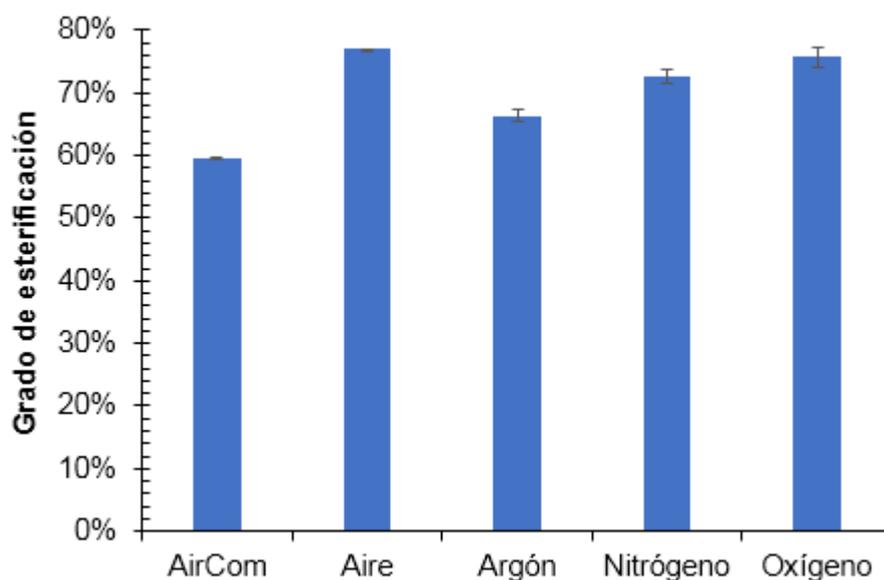


Figura 16: Grado de esterificación obtenido en cada prepolímero de PGS sintetizado bajo diferentes atmósferas: aire comprimido, aire húmedo, argón, nitrógeno y oxígeno

A continuación, se van a mostrar los resultados obtenidos en todo el apartado de forma resumida (Tabla 1). Cabe mencionar que el pPGS sintetizado bajo atmósfera de aire húmedo no proporciona ningún resultado coherente y esto podría deberse a la renovación del agua ambiental (producto de la policondensación) mientras que, en el resto de los gases, el agua satura. Además, se aprecia como el nitrógeno y el oxígeno parecen tener un efecto similar formando cadenas más largas o menos ramificadas y consecuentemente una red más laxa que se forma más tarde, al contrario de lo que sucede con el aire comprimido y el argón.

	AirCom	Aire	Argón	Nitrógeno	Oxígeno
Reometría	Tiempo de curado corto, cadenas más cortas o más ramificadas	Tiempo de curado corto, cadenas más cortas o más ramificadas	Tiempo de curado corto, cadenas más cortas o más ramificadas	Tiempo de curado largo, cadenas más largas o menos ramificadas	Tiempo de curado largo, cadenas más largas o menos ramificadas
DSC	Menor cristalinidad	Cristalinidad intermedia	Menor cristalinidad	Mayor cristalinidad	Mayor cristalinidad
Volumetría	Menor grado de esterificación → cadenas más cortas o más ramificadas	Mayor grado de esterificación → cadenas más largas o menos ramificadas	Menor grado de esterificación → cadenas más cortas o más ramificadas	Mayor grado de esterificación → cadenas más largas o menos ramificadas	Mayor grado de esterificación → cadenas más largas o menos ramificadas
FTIR	Enlaces tipo éster	Enlaces tipo éster	Enlaces tipo éster	Enlaces tipo éster	Enlaces tipo éster

Tabla 1: Tabla resumen de los resultados de caracterización termoquímica de pPGS

4.3 Efecto de los productos de biodegradación en el metabolismo celular

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en el análisis de viabilidad celular realizado con las técnicas de MTS y Pico Green. En primer lugar, con la técnica de MTS se pueden obtener los resultados de absorbancia en cada uno de los medios y, a partir de ella, obtener el número de células existentes activas metabólicamente (Figura 17). Se puede observar como una mayor absorbancia implica que existe un mayor número de células. Por otro lado, se tiene que el medio de cultivo empleado durante el ensayo se realizó a partir de DMEM en polvo que se reconstituía según las pautas del fabricante y posteriormente se le añadía el producto del que se quería estudiar su efecto sobre las células, excepto en el caso en el que a las células se les hacía un control positivo con DMEM HG (RF). Se puede observar, por tanto, que en la mayoría de los casos las células no proliferaron en este primer medio, pues ni siquiera con el control positivo tienen valores significativos o comparables con el medio RF. Por tanto, no es posible extraer resultados de cómo afectan los residuos de biodegradación a la viabilidad celular ya que el problema radica en el propio medio fabricado en el laboratorio. Sin embargo, se puede observar que las células con medio DMEM HG (RF) sí que proliferan adecuadamente pasados los 5 días.

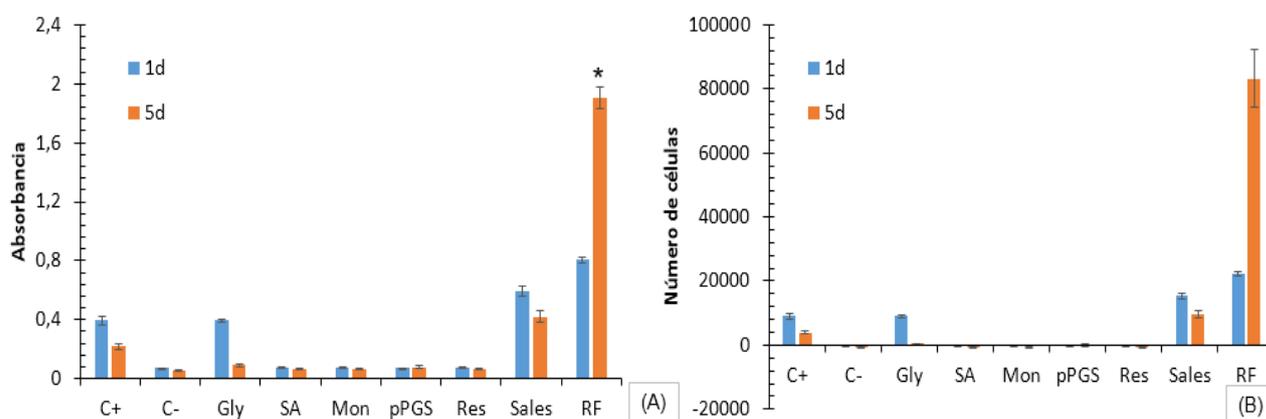


Figura 17: (A) Absorbancia obtenida mediante la técnica de MTS por cada uno de los medios de control y de estudio. (B) Número de células existentes transcurridos 1 día y 5 días mediante la técnica de MTS en los distintos medios de control y de estudio

En segundo lugar, con la técnica de Pico Green se puede analizar la fluorescencia obtenida en cada uno de los medios de control y, a partir de ella, obtener el número de células existentes sabiendo la cantidad de DNA total presente en cada medio (Figura 18). Análogamente, unos valores más elevados de fluorescencia implican una mayor cantidad de células existentes. En este caso, se puede observar como el número de células existentes es mayor que con la técnica de MTS en todos los casos. Esto es debido a que con la técnica de Pico Green se mide el número de células existentes a partir de la cantidad de DNA que hay presente, pero sin tener en cuenta si estas células presentan actividad metabólica o no, cosa que sí se puede cuantificar mediante la técnica de MTS. Por ello, aunque con la técnica de Pico Green se obtiene que hay un mayor número de células presentes no todas ellas presentan la misma actividad metabólica (Figura 19). Cabe mencionar que el medio con sales permite a las células sobrevivir más que en el resto de los medios y, da valores medibles de metabolismo celular incluso transcurridos los 5 días.

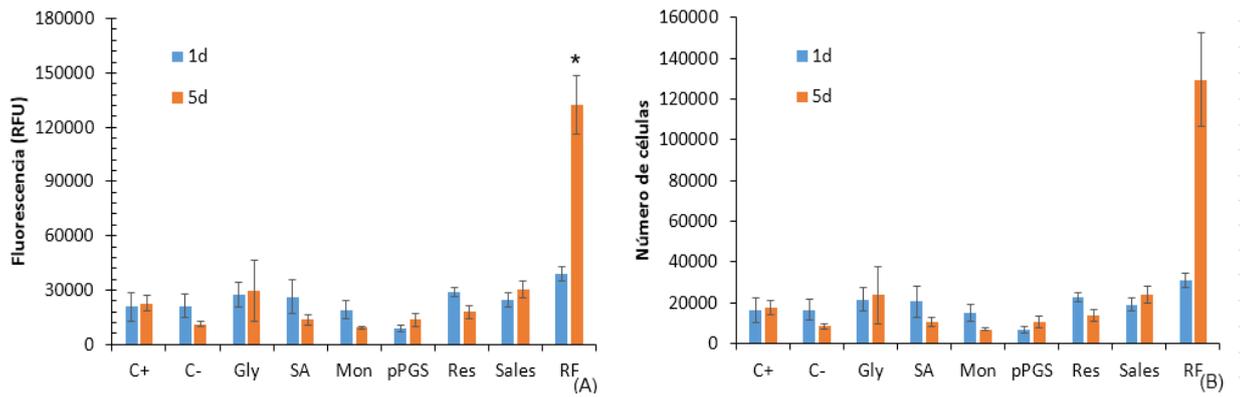


Figura 18: (A) Valores de fluorescencia obtenidos mediante la técnica de Pico Green en cada uno de los medios de control y de estudio. (B) Número de células existentes transcurridos 1 día y a los 5 días obtenidos mediante la técnica de Pico Green en los diferentes medios de control y de estudio

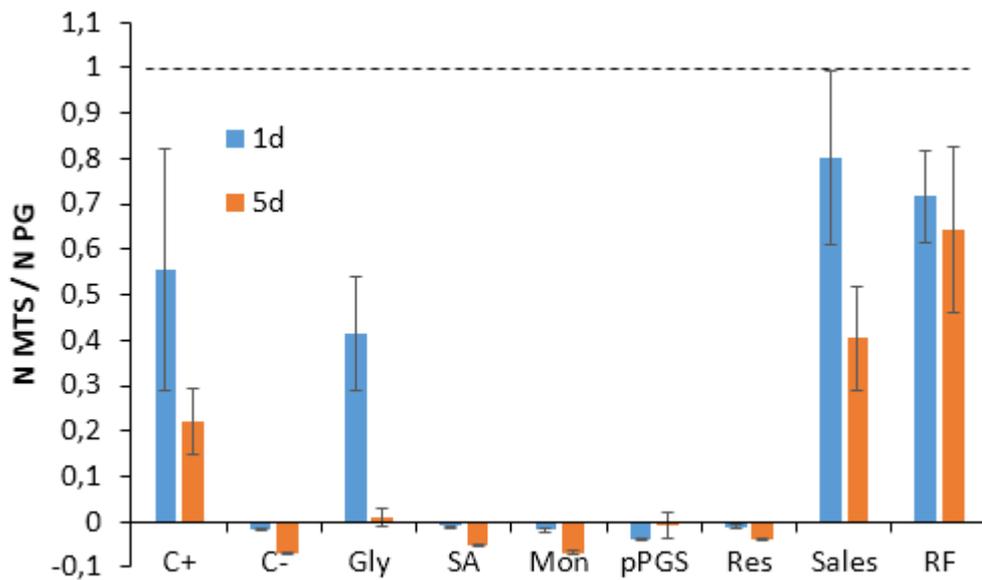


Figura 19: Unidades de metabolismo celular transcurridos 1 día y 5 días para los diferentes medios de control y de estudio

5. CONCLUSIONES

En el presente Trabajo de Fin de Grado se ha obtenido, en primer lugar, mediante la técnica de GPC una estimación de los pesos moleculares de los oligómeros de poliglicerol sebacato (PGS) obtenidos a diferentes horas de síntesis, de los cuales también se ha observado mediante calorimetría DSC que pueden dar lugar a cadenas capaces de formar cristales de forma ordenada. También, se ha podido comprobar mediante los análisis reométricos que el PGS es un polímero muy versátil de manera que aplicando distintas temperaturas de curado se puede variar el punto de gel desde unas 65 hasta 10 horas, al modificar dicha temperatura desde 125 a 180°C, lo cual le abre un gran abanico de aplicaciones. Este mismo efecto puede conseguirse variando la atmósfera en la que se prepara el prepolímero, siendo el nitrógeno u oxígeno puros los gases con los cuales el punto de gel se consigue más tarde.

En cuanto a la caracterización termoquímica se refiere, se ha obtenido que el prepolímero de PGS (pPGS) sintetizado bajo atmósfera de nitrógeno y oxígeno da lugar a cadenas o bien más largas o bien menos ramificadas, con tiempos de curado mayores y con un mayor porcentaje de cristalinidad, mientras que el pPGS sintetizado bajo atmósfera de aire comprimido y argón presenta o bien cadenas más cortas o bien cadenas más ramificadas, con tiempos de curado menores y con un porcentaje de cristalinidad menor. Cabe destacar que el pPGS sintetizado bajo atmósfera de aire ambiental (húmedo) proporciona resultados en principio incoherentes al compararlo con el resto, esto puede ser debido a que la presencia de agua en la atmósfera esté dificultando el avance de la reacción hacia la formación de productos, puesto que da lugar a la condensación de moléculas de agua. Por otro lado, los espectros de infrarrojos (-FTIR) han permitido determinar la naturaleza química de los enlaces formados tanto en los monómeros mezclados y por separado, así como en los prepolímeros sintetizados bajo las diferentes atmósferas, y los resultados se muestran en coherencia con lo anterior.

En lo referente al cultivo celular, lamentablemente se ha observado que el medio preparado en el laboratorio empleado para el cultivo celular no ha sido adecuado y no favorece la proliferación celular. Debido a ello, no se ha podido determinar cómo afectan los residuos de degradación enzimática del PGS al metabolismo celular, ya que ni siquiera el medio de control positivo muestra transcurridos los cinco días de cultivo proliferación o supervivencia celular esperada. Estos ensayos deberían, pues, repetirse, fuera ya del marco de este trabajo académico, prestando atención al medio empleado.

Tras todas estas consideraciones, se puede concluir que se ha conseguido caracterizar el proceso de formación de las redes poliméricas de PGS, y que los resultados obtenidos serán de gran utilidad en el futuro, de cara a preparar estos materiales en formatos propios del ámbito biomédico y de la ingeniería tisular (andamiajes microporosos con distintas microarquitecturas para albergar células y ser implantados o emplearse como soportes de cultivo celular, membranas electrohiladas, etc). Esto se debe a que estos resultados facilitarán la toma de decisiones en cuanto a los parámetros de prepolimerización y de curado más adecuados para hacer compatible la obtención de redes con el moldeado en las microarquitecturas de interés.

6. TRABAJO EN PROCESO Y FUTURO

El PGS es un polímero que se encuentra en investigación y, por ello, durante el desarrollo del presente trabajo académico han surgido una serie de limitaciones. Como se ha mencionado anteriormente, en lo referente a la evolución de los pesos moleculares durante el proceso de síntesis de PGS, no se han podido determinar los parámetros de Mark-Houwink del PGS para poder obtener, de este modo, el peso molecular y, por ello, se va a continuar investigando para en un futuro poderlo obtener.

Por otro lado, también se van a repetir los experimentos relacionados con el cultivo celular. Se realizarán experimentos de biodegradación con lipasas más activas y, también se repetirán los cultivos celulares sin emplear el medio en polvo ya que como se ha visto anteriormente, no favorece ni la proliferación ni la supervivencia celular. Sin embargo, se van a emplear las mismas técnicas que se han empleado en el desarrollo del trabajo ya que han demostrado ser efectivas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, C. M., Antonio, U. of T. at S., Ong, J. L., Antonio, U. of T. at S., Appleford, M. R., Antonio, U. of T. at S., ... Dakota, U. of S. (2013). *Introduction to Biomaterials. Characterization of Biomaterials*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415800-9.00001-2>
- Anderson, J. M. (2013). *Inflammation, Wound Healing, and the Foreign-Body Response. Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition* (Third Edit). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00044-9>
- Athanasίου, K. A., Niederauer, G. G., & Agrawal, C. M. (1996). Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, *17*(2), 93–102. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85754-1](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85754-1)
- Aydin, H. M., Salimi, K., Rzayev, Z. M. O., & Pişkin, E. (2013). Microwave-assisted rapid synthesis of poly(glycerol-sebacate) elastomers. *Biomaterials Science*, *1*(5), 503. <https://doi.org/10.1039/c3bm00157a>
- Barbu, B. N., Kosak, T. M., Prins, A. J., Gillmore, J. G., & Korich, A. L. (2016). Fast colorimetric titration protocol for quantification of boron tribromide. *Tetrahedron Letters*, *57*(33), 3746–3748. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.07.017>
- Brobeck, P. (1981). AN IN VIVO MEASURE OF THE RATE OF P-OXIDATION OF FATTY, *664*, 349–355.
- Carpenedo, R. L., & Mcdevitt, T. C. (2013). CONCEPTS Pluripotent Stem Cells. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine* (Third Edit, pp. 487–495). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00042-5>
- Chen, Q. Z., Bismarck, A., Hansen, U., Junaid, S., Tran, M. Q., Harding, S. E., ... Boccaccini, A. R. (2008). Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue. *Biomaterials*, *29*(1), 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.09.010>
- Conejero-García, Á., Gimeno, H. R., Sáez, Y. M., Vilariño-Feltrer, G., Ortuño-Lizarán, I., & Vallés-Lluch, A. (2017). Correlating synthesis parameters with physicochemical properties of poly(glycerol sebacate). *European Polymer Journal*, *87*, 406–419. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.001>
- Coussot, P. (2014). Rheophysics: Matter in All Its States. *Rheophysics: Matter in All Its States*, 1–332. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06148-1>
- Duan, H. Y., Ye, L., Wu, X., Guan, Q., Yang, X. F., Han, F., ... Wang, Z. G. (2015). The in vivo characterization of electrospun heparin-bonded polycaprolactone in small-diameter vascular reconstruction. *Vascular*, *23*(4), 358–365. <https://doi.org/10.1177/1708538114550737>
- Feng, G., Zhang, Z., Jin, X., Hu, J., Gupte, M. J., Holzwarth, J. M., & Ma, P. X. (2012). Regenerating Nucleus Pulposus of the Intervertebral Disc Using Biodegradable Nanofibrous Polymer Scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, *18*(21–22), 2231–2238. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0747>
- Galloway, D. A., Laimins, L. A., Division, B., & Hutchinson, F. (2016). HHS Public Access, (713), 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.001.Human>
- Ghosh, F., Neeley, W. L., Arnér, K., & Langer, R. (2011). Selective Removal of Photoreceptor Cells *In Vivo* Using the Biodegradable Elastomer Poly(Glycerol Sebacate). *Tissue Engineering Part A*, *17*(13–14), 1675–1682. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0450>
- Hannink, G., van Tienen, T. G., Schouten, A. J., & Buma, P. (2011). Changes in articular cartilage after meniscectomy and meniscus replacement using a biodegradable porous polymer implant.

Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 19(3), 441–451.
<https://doi.org/10.1007/s00167-010-1244-8>

- Horbett, T. A. (2013). ON BIOMATERIALS The Effects of Preadsorption with Purified Adhesion Proteins ADHESION PROTEINS ON CELLULAR. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine* (Third Edit, pp. 394–408). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00036-X>
- Jaafar, I. H., Ammar, M. M., Jedlicka, S. S., Pearson, R. A., & Coulter, J. P. (2010). Spectroscopic evaluation, thermal, and thermomechanical characterization of poly(glycerol-sebacate) with variations in curing temperatures and durations. *Journal of Materials Science*, 45(9), 2525–2529. <https://doi.org/10.1007/s10853-010-4259-0>
- Jaafar, I. H., Leblon, C. E., Wei, M. T., Ou-Yang, D., Coulter, J. P., & Jedlicka, S. S. (2011). Improving fluorescence imaging of biological cells on biomedical polymers. *Acta Biomaterialia*, 7(4), 1588–1598. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.007>
- Jaggi, Neena, Vij, D. R. (2006). Chapter 9. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy*, 411–451.
- Kemppainen, J. M., & Hollister, S. J. (2010). Tailoring the mechanical properties of 3D-designed poly(glycerol sebacate) scaffolds for cartilage applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 94(1), 9–18. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32653>
- Kohane, D. S., & Langer, R. (2008). Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering. *Pediatric Research*, 63(5), 487–491. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000305937.26105.e7r00006450-200805000-00006> [pii]
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). - ARTICLES Tissue Engineering. *Science*, 260(May), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Lee, E. J., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2014). Biomaterials for tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(2), 323–337. <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0859-6>
- Li, X., Hong, A. T. L., Naskar, N., & Chung, H. J. (2015). Criteria for quick and consistent synthesis of poly(glycerol sebacate) for tailored mechanical properties. *Biomacromolecules*, 16(5), 1525–1533. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00018>
- Li, Y., Huang, W., Cook, W. D., & Chen, Q. (2013). A comparative study on poly(xylitol sebacate) and poly(glycerol sebacate): Mechanical properties, biodegradation and cytocompatibility. *Biomedical Materials (Bristol)*, 8(3). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/8/3/035006>
- Liang, S. L., Yang, X. Y., Fang, X. Y., Cook, W. D., Thouas, G. A., & Chen, Q. Z. (2011). In Vitro enzymatic degradation of poly (glycerol sebacate)-based materials. *Biomaterials*, 32(33), 8486–8496. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.080>
- Lim, J., You, M., Li, J., & Li, Z. (2017). Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, 79, 917–929. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.132>
- Liu, Q., Tian, M., Shi, R., Zhang, L., Chen, D., & Tian, W. (2007). Structure and properties of thermoplastic poly(glycerol sebacate) elastomers originating from prepolymers with different molecular weights. *Journal of Applied Polymer Science*, 104(2), 1131–1137. <https://doi.org/10.1002/app.25606>
- Maliger, R., Halley, P. J., & Cooper-White, J. J. (2013). Poly(glycerol-sebacate) bioelastomers-kinetics of step-growth reactions using Fourier Transform (FT)-Raman spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, 127(5), 3980–3986. <https://doi.org/10.1002/app.37719>
- Matsumoto, K., Ohnishi, K., Kiyotani, T., Sekine, T., Ueda, H., Nakamura, T., ... Endo, K. (2000).

- Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: A histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Research*, 868(2), 315–328. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02207-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02207-1)
- MENCZEL, J. D. et al. (2009). *Differential scanning calorimetry (DSC). Thermal analysis of polymers: Fundamentals and applications*.
- Moroni, L., Schrooten, J., Truckenmüller, R., Rouwkema, J., Sohier, J., & Van Blitterswijk, C. A. (2014). Tissue Engineering: An Introduction. In *Tissue Engineering: Second Edition* (Second Edi, pp. 1–21). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420145-3.00001-8>
- Nagata, M., Machida, T., Sakai, W., & Tsutsumi, N. (1999). Synthesis, characterization, and enzymatic degradation of network aliphatic copolyesters. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 37(13), 2005–2011. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(19990701\)37:13<2005::AID-POLA14>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(19990701)37:13<2005::AID-POLA14>3.0.CO;2-H)
- National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. (n.d.). Tissue Engineering and Regenerative Medicine.
- OECD. (1996). Oecd guideline for testing of chemicals Determination of the low molecular weight content of polymer using gel permeation chromatography 119, 1–9.
- OPTN. (n.d.). The organ shortage continues.
- Pomerantseva, I., Krebs, N., Hart, A., Neville, C. M., Huang, A. Y., & Sundback, C. A. (2009). Degradation behavior of poly(glycerol sebacate). *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 91(4), 1038–1047. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32327>
- Rai, R., Tallawi, M., Grigore, A., & Boccaccini, A. R. (2012). Synthesis, properties and biomedical applications of poly(glycerol sebacate) (PGS): A review. *Progress in Polymer Science*, 37(8), 1051–1078. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.02.001>
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2013). *Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition* (Third Edit). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00153-4>
- Scadden, D. T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action, *441*(June), 1075–1079. <https://doi.org/10.1038/nature04957>
- Sengupta, D., Waldman, S. D., & Li, S. (2014). From in vitro to in situ tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(7), 1537–1545. <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1022-8>
- Serrano, M. C., Chung, E. J., & Ameer, G. A. (2010). Advances and applications of biodegradable elastomers in regenerative medicine. *Advanced Functional Materials*, 20(2), 192–208. <https://doi.org/10.1002/adfm.200901040>
- Skalak, R. (1993). Richard Skalak Institute for Biomedical Engineering, 1112–1113.
- Sun, Z.-J., Wu, L., Huang, W., Chen, C., Chen, Y., Lu, X.-L., ... Dong, D.-L. (2010). Glycolic acid modulates the mechanical property and degradation of poly(glycerol, sebacate, glycolic acid). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92A(1), 332–339. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32370>
- Sundback, C. A., Shyu, J. Y., Wang, Y., Faquin, W. C., Langer, R. S., Vacanti, J. P., & Hadlock, T. A. (2005). Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material. *Biomaterials*, 26(27), 5454–5464. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.004>
- Tabata, Y. (2009). Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of The Royal Society Interface*, 6(Suppl_3), S311–S324. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0448.focus>

- Treiser, M., Abramson, S., Langer, R., & Kohn, J. (2013). *Degradable and Resorbable Biomaterials. Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition* (Third Edit). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00021-8>
- Wang, Y., Ameer, G. A., Sheppard, B. J., & Langer, R. (2002). A tough biodegradable elastomer. *Nature Biotechnology*, *20*(6), 602–606. <https://doi.org/10.1038/nbt0602-602>
- Wang, Y., Robertson, J. L., Spillman, W. B., & Claus, R. O. (2004). Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *TL - 21. Pharmaceutical Research*, *21*(8), 1362–1373. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000036909.41843.18>
- Williams, D. F. (1987). *Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*.
- Wilson, C. J., Clegg, R. E., Ph, D., Leavesley, D. I., Ph, D., Percy, M. J., & Ph, D. (2005). Mediation of Biomaterial – Cell Interactions by Adsorbed Proteins : A Review, *11*(1).
- Ye, H., Zhang, K., Kai, D., Li, Z., & Loh, X. J. (2018). Polyester elastomers for soft tissue engineering. *Chemical Society Reviews*. <https://doi.org/10.1039/c8cs00161h>

DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

1. ALCANCE Y DESARROLLO DEL PRESUPUESTO

El presupuesto del presente Trabajo de Fin de Grado comprende los gastos correspondientes a la realización de las diferentes actividades en los laboratorios del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, así como los relacionados con el planteamiento, gestión y seguimiento del trabajo. Con ello, el objetivo del presupuesto es calcular el presupuesto de ejecución material para, finalmente, obtener el presupuesto total del trabajo llevado a cabo.

El presupuesto de ejecución material está constituido básicamente por tres factores: los gastos asociados a la mano de obra, la maquinaria y el material necesarios en los diferentes procesos del laboratorio. Además, se añaden los gastos auxiliares en cada una de las actividades realizadas. En los siguientes apartados, se detallan una serie de cuadros presupuestarios que plasman los gastos llevados a cabo. En todos ellos, tanto la columna correspondiente a precio como la correspondiente a importes, su unidad de medida es el euro.

Cuando se calcula el coste de la maquinaria se tiene en cuenta el precio de amortización el cual es considerado de 10 años para todas las máquinas empleadas. Los medios auxiliares suponen un coste adicional que equivale al 2% del total de la partida. Además, se han de tener en cuenta otros coeficientes a la hora de obtener el presupuesto total del trabajo que son los gastos generales los cuales suponen un 13%, el beneficio industrial el cual supone un 6% y el IVA el cual supone un 21%.

1.1 Cuadro de precios de recursos por clase

En este apartado, se ordenan los recursos según sean mano de obra, maquinaria, materiales o medios auxiliares y se definen los precios de cada uno de ellos.

		Pág.: 1
	CUADRO DE PRECIOS DE RECURSOS POR CLASE	Ref.: procdp1c
		Fec.:

Código	Descripción del recurso	Precio
1	Mano de Obra	
MO.DIR	h Director del proyecto	22,00
MO.INV	h Ingeniero investigador	13,50
MO.TLAB	h Técnico de laboratorio	12,30
2	Maquinaria	
MAQ.		
MAQ.BLZ	h Balanza Mettler AX205	0,01
MAQ.BT	h Baño termostático Digiterm 200	0,05
MAQ.BV		
MAQ.CAB	h Cabina de cultivo celular Tel Star AV-30/70	0,05
MAQ.CNT	h Centrífuga Eppendorf 5804	0,03
MAQ.DSC	h Calorímetro diferencial de barrido PerkinElmer 8000	1,55
MAQ.DV	h Desecador de vacío JP Selecta	0,02
MAQ.EM	h Espectrofotómetro de masas Victor3 Perkin Elmer	0,14
MAQ.FTIR	h Equipo de espectroscopía infrarroja Platinum ATR	0,23
MAQ.GPC	h Cromatógrafo de permeación en gel Waters	0,65
MAQ.HR	h Horno de ventilación forzada JP Selecta	0,12
MAQ.INC	h Incubador Hucoa-Erlöss	0,06
MAQ.LFL	h Liofilizadora Cool vacuum	0,20
MAQ.MC	u Microscopio invertido Nikon Eclipse TS 100	0,62
MAQ.PCA	h Placa calefactora con agitación MR Hei-Standard	0,01
MAQ.PH	h Medidor de pH EUTECH INSTRUMENTS pH 1500	0,01
MAQ.RMT	h Reómetro AR-200ex	0,52
3	Material	
000001	Acetona Sigma Aldrich 99.5% pureza	
MAT.	Adaptador balón esférico 1 vía	
MAT.ABE1	u Adaptador balón esférico 1 vía	32,90
MAT.AC	l Bala de aire comprimido	115,50
MAT.ACE	l Acetona Sigma Aldrich 99.5% pureza	3,15
MAT.AD	l Agua destilada	0,15
MAT.AGJ	u Aguja	0,60
MAT.AMQ	l Agua ultra pura Direct-Q® 3 Merck Millipore	3,40
MAT.ARA	u Arandelas	1,20
MAT.ARG	l Bala de argón	125,50
MAT.AS	kg Ácido sebácico Sigma Aldrich 99% pureza	98,38
MAT.BAM	u Barra de agitación magnética	0,68
MAT.BL	u Bata de laboratorio	14,90
MAT.BRT	u Bureta 25 ml	16,61
MAT.BTV	u Balón de reacción de tres vías	36,00
MAT.CA	u Cápsula de aluminio	1,68
MAT.CGL	u Caja de guantes de látex	5,72
MAT.CGN	u Caja de guantes de nitrilo	7,00
MAT.CN	u Cámara de Neubauer Marienfeld	24,01
MAT.CPM	u Caja de puntas de micropipeta 200 ul	31,77
MAT.DMEM	l Medio de cultivo con alto contenido en glucosa (DMEM HG)	50,00
MAT.DPBS	l Tampón fosfato salino	15,21
MAT.ENC	h Encapsulador de cápsulas para DSC PerkinElmer	0,02
MAT.EPP	u Tubo eppendorf 0.5 ml	0,01
MAT.EPP1	u Tubo eppendorf 1.5 ml	0,01
MAT.ET	l Etanol Sigma Aldrich 99.9% pureza	0,50
MAT.FBS	l Suero fetal bovino	137,00
MAT.FCN	u Falcon de 15 ml	84,40
MAT.FCN1	u Falcon de 50 ml	84,40
MAT.FI	l Frasco ISO 1L	17,42

		Pág.: 2
	CUADRO DE PRECIOS DE RECURSOS POR CLASE	Ref.: procdp1c
		Fec.:

Código	Descripción del recurso	Precio
MAT.FI1	l Frasco ISO 250 ml	12,32
MAT.FL	u Flask 75 cm2	267,40
MAT.GI	u Gafa integral	5,77
MAT.GLI	kg Glicerol VWR International 98% pureza	71,80
MAT.GLU	kg D-glucosa Sigma Aldrich 99.5% pureza	20,00
MAT.GTT	u Guantes térmicos	12,49
MAT.L929	u Línea celular de fibroblastos de ratón	256,00
MAT.LP	u Enzima lipasa porcina Sigma Aldrich	318,00
MAT.MA	u Matraz aforado 100 ml	2,72
MAT.ME	u Matraz de Erlenmeyer	5,95
MAT.MGA	u Máscara de gases	29,50
MAT.MPP	u Caja de puntas de micropipeta 1000 ul	29,31
MAT.MTS	l CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	335,00
MAT.NIT	l Bala de nitrógeno	61,60
MAT.OXI	l Bala de oxígeno	50,00
MAT.P96	u Placa de 96 pocillos	0,79
MAT.PA	u Papel de aluminio	85,00
MAT.PC	u Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit	696,00
MAT.PF	u Parafilm	34,00
MAT.PS	l Penicilina-estreptomicina	7,35
MAT.PV	u Probeta de vidrio 50 ml	22,58
MAT.RF	l Rojo fenol Sigma Aldrich	12,34
MAT.SC	u Soporte de corcho para balón de reacción de tres vías	4,90
MAT.TB	l Trypan blue GIBCO	32,15
MAT.THF	l Tetrahidrofurano Sigma Aldrich 99.9% pureza	125,00
MAT.VL	u Vial 15 ml	0,15
MAT.VP	u Vaso de precipitado 50 ml	3,10
MAT.VP1	u Vaso de precipitado 50 ml	3,10
MAT.VP2	u Vaso de precipitado 250 ml	1,15
MT.BRT	Bureta 25 ml	
MT.VL	Vial 10 ml	
4	Medio auxiliar	
C.AUX	Costes auxiliares 2%	

1.2 Cuadro de mediciones y presupuesto

En él se descomponen cada una de las unidades de obra consideradas y, en cada apartado correspondiente a las diferentes actividades se definen los recursos empleados y sus respectivos costes obteniendo así los precios por unidad de obra y el presupuesto de ejecución del material.

							Pág.: 1		
MEDICIONES Y PRESUPUESTO							Ref.: promyp2		
Síntesis de PGS							Fec.:		
Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Uds.	Longitud	Latitud	Altura	Subtotal	Medición	Precio	Importe
	Síntesis de PGS								
01-01	Fase de prepolimerización								
	MO.DIR h Director del proyecto						20,00	22,00	440,00
	MO.INV h Ingeniero investigador						20,00	13,50	270,00
	MAQ.PCA h Placa calefactora con agitación MR Hei-Standard						300,00	0,01	3,00
	MAQ.HR h Horno de ventilación forzada JP Selecta						30,00	0,12	3,60
	MAQ.BLZ h Balanza Mettler AX205						5,00	0,01	0,05
	MAT.BTV u Balón de reacción de tres vías						1,00	36,00	36,00
	MAT.ABE1 u Adaptador balón esférico 1 vía						1,00	32,90	32,90
	MAT.ACE l Acetona Sigma Aldrich 99.5% pureza						0,20	3,15	0,63
	MAT.AS kg Ácido sebácico Sigma Aldrich 99% pureza						0,03	98,38	2,46
	MAT.AD l Agua destilada						2,00	0,15	0,30
	MAT.AGJ u Aguja						1,00	0,60	0,60
	MAT.ARA u Arandelas						2,00	1,20	2,40
	MAT.BAM u Barra de agitación magnética						1,00	0,68	0,68
	MAT.ET l Etanol Sigma Aldrich 99.9% pureza						0,50	0,50	0,25
	MAT.GLI kg Glicerol VWR International 98% pureza						0,01	71,80	0,93
	MAT.NIT l Bala de nitrógeno						2,00	61,60	123,20
	MAT.AC l Bala de aire comprimido						1,00	115,50	115,50
	MAT.ARG l Bala de argón						1,00	125,50	125,50
	MAT.OXI l Bala de oxígeno						1,00	50,00	50,00
	MAT.PF u Parafilm						0,02	34,00	0,68
	MAT.PA u Papel de aluminio						0,01	85,00	0,85
	MAT.SC u Soporte de corcho para balón de reacción de tres vías						1,00	4,90	4,90
	C.AUX Costes auxiliares 2%						0,02	1.214,43	24,29
	Clase: Mano de Obra								710,00
	Clase: Maquinaria								6,65
	Clase: Material								497,78
	Clase: Medio auxiliar								24,29
	Total partida 01-01						1,00	1.238,72	1.238,72
01-02	Fase de curado								
	MO.DIR h Director del proyecto						2,00	22,00	44,00
	MO.INV h Ingeniero investigador						2,00	13,50	27,00
	MAQ.HR h Horno de ventilación forzada JP Selecta						48,00	0,12	5,76
	C.AUX Costes auxiliares 2%						0,02	76,76	1,54
	Clase: Mano de Obra								71,00
	Clase: Maquinaria								5,76
	Clase: Medio auxiliar								1,54
	Total partida 01-02						1,00	78,30	78,30
	Total capítulo								1.317,02

		Pág.: 2
MEDICIONES Y PRESUPUESTO		Ref.: promyp2
Ensayos de caracterización		Fec.:

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Uds.	Longitud	Latitud	Altura	Subtotal	Medición	Precio	Importe
Ensayos de caracterización									
02-01	Cromatografía de permeación en gel								
	MO.DIR h Director del proyecto						30,00	22,00	660,00
	MO.INV h Ingeniero investigador						20,00	13,50	270,00
	MAQ.GPC h Cromatógrafo de permeación en gel Waters						80,00	0,65	52,00
	MAQ.BLZ h Balanza Mettler AX205						1,00	0,01	0,01
	MAT.THF l Tetrahidrofurano Sigma Aldrich 99.9% pureza						1,00	125,00	125,00
	C.AUX Costes auxiliares 2%						0,02	1.107,01	22,14
	Clase: Mano de Obra								930,00
	Clase: Maquinaria								52,01
	Clase: Material								125,00
	Clase: Medio auxiliar								22,14
	Total partida 02-01						1,00	1.129,15	1.129,15
02-02	Análisis reométricos								
	MO.DIR h Director del proyecto						10,00	22,00	220,00
	MO.INV h Ingeniero investigador						50,00	13,50	675,00
	MAQ.RMT h Reómetro AR-200ex						1.440,00	0,52	748,80
	MAT.ET l Etanol Sigma Aldrich 99.9% pureza						0,50	0,50	0,25
	C.AUX Costes auxiliares 2%						0,02	1.644,05	32,88
	Clase: Mano de Obra								895,00
	Clase: Maquinaria								748,80
	Clase: Material								0,25
	Clase: Medio auxiliar								32,88
	Total partida 02-02						1,00	1.676,93	1.676,93
02-03	Calorimetría diferencial de barrido								
	MO.DIR h Director del proyecto						20,00	22,00	440,00
	MO.INV h Ingeniero investigador						20,00	13,50	270,00
	MAQ.DSC h Calorímetro diferencial de barrido PerkinElmer 8000						72,00	1,55	111,60
	MAT.CA u Cápsula de aluminio						36,00	1,68	60,48
	MAT.ENC h Encapsulador de cápsulas para DSC PerkinElmer						1,00	0,02	0,02
	MAQ.BLZ h Balanza Mettler AX205						2,00	0,01	0,02
	C.AUX Costes auxiliares 2%						0,02	882,12	17,64
	Clase: Mano de Obra								710,00
	Clase: Maquinaria								111,62
	Clase: Material								60,50
	Clase: Medio auxiliar								17,64
	Total partida 02-03						1,00	899,76	899,76
02-04	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier								
	MAQ.FTIR h Equipo de espectroscopia infrarroja Platinum ATR						2,00	0,23	0,46
	MO.DIR h Director del proyecto						10,00	22,00	220,00
	MO.INV h Ingeniero investigador						10,00	13,50	135,00
	MAT.ET l Etanol Sigma Aldrich 99.9% pureza						0,20	0,50	0,10
	C.AUX Costes auxiliares 2%						0,02	355,56	7,11
	Clase: Mano de Obra								355,00
	Clase: Maquinaria								0,46
	Clase: Material								0,10
	Clase: Medio auxiliar								7,11
	Total partida 02-04						1,00	362,67	362,67
02-05	Valoración química								
	MO.DIR h Director del proyecto						10,00	22,00	220,00
	MO.INV h Ingeniero investigador						28,00	13,50	378,00
	MAQ.BLZ h Balanza Mettler AX205						2,00	0,01	0,02
	MAT.AS kg Ácido sebácico Sigma Aldrich 99% pureza						0,00	98,38	0,30

		Pág.: 3
	MEDICIONES Y PRESUPUESTO	Ref.: promyp2
	Ensayos de caracterización	Fec.:

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Uds.	Longitud	Latitud	Altura	Subtotal	Medición	Precio	Importe
	MAT.AD Agua destilada						2,00	0,15	0,30
	MAT.ET Etanol Sigma Aldrich 99.9% pureza						1,00	0,50	0,50
	MAT.GLI kg Glicerol VWR International 98% pureza						0,00	71,80	0,22
	MAT.PF u Parafilm						0,02	34,00	0,68
	MAT.PV u Probeta de vidrio 50 ml						1,00	22,58	22,58
	MAT.THF Tetrahidrofurano Sigma Aldrich 99.9% pureza						2,00	125,00	250,00
	MAT.VP2 u Vaso de precipitado 250 ml						1,00	1,15	1,15
	MAT.ME u Matraz de Erlenmeyer						1,00	5,95	5,95
	MAT.RF l Rojo fenol Sigma Aldrich						0,01	12,34	0,12
	MAT.MA u Matraz aforado 100 ml						1,00	2,72	2,72
	MAT.BRT u Bureta 25 ml						1,00	16,61	16,61
	MAT.FI l Frasco ISO 1L						1,00	17,42	17,42
	MAT.FI1 l Frasco ISO 250 ml						1,00	12,32	12,32
	C.AUX Costes auxiliares 2%						0,02	928,89	18,58
	Clase: Mano de Obra								598,00
	Clase: Maquinaria								0,02
	Clase: Material								330,87
	Clase: Medio auxiliar								18,58
	Total partida 02-05						1,00	947,47	947,47
	Total capítulo								5.015,98

		Pág.: 4	
		Ref.: promyp2	
		Fec.:	

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Uds.	Longitud	Latitud	Altura	Subtotal	Medición	Precio	Importe
	Análisis de bioactividad								
03-01	Ensayo de biodegradación								
	MO.DIR h Director del proyecto						50,00	22,00	1.100,00
	MO.INV h Ingeniero investigador						50,00	13,50	675,00
	MAQ.LFL h Liofilizadora Cool vacuum						48,00	0,20	9,60
	MAQ.DV h Desecador de vacío JP Selecta						2,00	0,02	0,04
	MAQ.BLZ h Balanza Mettler AX205						2,00	0,01	0,02
	MAT.AD l Agua destilada						0,50	0,15	0,08
	MAT.BAM u Barra de agitación magnética						1,00	0,68	0,68
	MAT.CPM u Caja de puntas de micropipeta 200 ul						1,00	31,77	31,77
	MAT.VP1 u Vaso de precipitado 50 ml						1,00	3,10	3,10
	MAT.VL u Vial 15 ml						12,00	0,15	1,80
	MAT.LP u Enzima lipasa porcina Sigma Aldrich						1,00	318,00	318,00
	MAT.DPBS l Tampón fosfato salino						0,25	15,21	3,80
	MAT.EPP1 u Tubo eppendorf 1.5 ml						15,00	0,01	0,15
	MAT.MPP Caja de puntas de micropipeta 1000 ul						1,00	29,31	29,31
	C.AUX Costes auxiliares 2%						0,02	2.173,35	43,47
	Clase: Mano de Obra								1.775,00
	Clase: Maquinaria								9,66
	Clase: Material								388,69
	Clase: Medio auxiliar								43,47
	Total partida 03-01						1,00	2.216,82	2.216,82
03-02	Cultivo celular								
	MO.DIR h Director del proyecto						100,00	22,00	2.200,00
	MO.INV h Ingeniero investigador						100,00	13,50	1.350,00
	MAQ.BLZ h Balanza Mettler AX205						1,00	0,01	0,01
	MAQ.CAB h Cabina de cultivo celular Tel Star AV-30/70						100,00	0,05	5,00
	MAQ.EM h Espectrofotómetro de masas Victor3 Perkin Elmer						0,50	0,14	0,07
	MAQ.BT h Baño termostático Digiterm 200						2,00	0,05	0,10
	MAQ.PH h Medidor de pH EUTECH INSTRUMENTS pH 1500						1,00	0,01	0,01
	MAQ.INC h Incubador Hucoa-Erlöss						500,00	0,06	30,00
	MAQ.CNT h Centrifuga Eppendorf 5804						1,00	0,03	0,03
	MAT.AMQ l Agua ultra pura Direct-Q® 3 Merck Millipore						2,00	3,40	6,80
	MAT.ET l Etanol Sigma Aldrich 99.9% pureza						2,00	0,50	1,00
	MAT.CPM u Caja de puntas de micropipeta 200 ul						5,00	31,77	158,85
	MAT.P96 u Placa de 96 pocillos						6,00	0,79	4,74
	MAT.FBS l Suero fetal bovino						0,25	137,00	34,25
	MAT.PS l Penicilina-estreptomicina						0,10	7,35	0,74
	MAT.L929 u Línea celular de fibroblastos de ratón						1,00	256,00	256,00
	MAT.DMEM l Medio de cultivo con alto contenido en glucosa (DMEM HG)						0,50	50,00	25,00
	MAT.FCN u Falcon de 15 ml						1,00	84,40	84,40
	MAT.FCN1 u Falcon de 50 ml						1,00	84,40	84,40
	MAT.DPBS l Tampón fosfato salino						0,50	15,21	7,61
	MAT.EPP u Tubo eppendorf 0.5 ml						5,00	0,01	0,05
	MAT.EPP1 u Tubo eppendorf 1.5 ml						10,00	0,01	0,10
	MAT.TB l Trypan blue GIBCO						0,00	32,15	0,03
	MAT.CN u Cámara de Neubauer Marienfeld						1,00	24,01	24,01
	MAT.FL u Flask 75 cm2						2,00	267,40	534,80
	MAT.PC u Quant-IT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit						0,20	696,00	139,20
	MAT.MTS l CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)						0,05	335,00	16,75
	MAT.GLU kg D-glucosa Sigma Aldrich 99.5% pureza						0,00	20,00	0,02
	MAQ.MC u Microscopio invertido Nikon Eclipse TS 100						3,00	0,62	1,86
	MAT.MPP Caja de puntas de micropipeta 1000 ul						1,00	29,31	29,31
	C.AUX Costes auxiliares 2%						0,02	4.995,14	99,90
	Clase: Mano de Obra								3.550,00
	Clase: Maquinaria								37,08
	Clase: Material								1.408,06
	Clase: Medio auxiliar								99,90
	Total partida 03-02						1,00	5.095,04	5.095,04
	Total capítulo								7.311,86

		Pág.: 5
	MEDICIONES Y PRESUPUESTO	Ref.: promyp2
	Reuniones	Fec.:

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Uds.	Longitud	Latitud	Altura	Subtotal	Medición	Precio	Importe
	Reuniones								
04-01	Reuniones periodicas de gestión del trabajo								
	MO.DIR h Director del proyecto						50,00	22,00	1.100,00
	MO.INV h Ingeniero investigador						50,00	13,50	675,00
	MO.TLAB h Técnico de laboratorio						50,00	12,30	615,00
	C.AUX Costes auxiliares 2%						0,02	2.390,00	47,80
	Clase: Mano de Obra								2.390,00
	Clase: Medio auxiliar								47,80
	Total partida 04-01						1,00	2.437,80	2.437,80
	Total capitulo								2.437,80

		Pág.: 6
	MEDICIONES Y PRESUPUESTO	Ref.: promyp2
	Equipos de protección individual y seguridad	Fec.:

Nº Orden	Descripción de las unidades de obra	Uds.	Longitud	Latitud	Altura	Subtotal	Medición	Precio	Importe
	Equipos de protección individual y seguridad								
05-01	Material de protección individual								
	MAT.MGA u Máscara de gases						1,00	29,50	29,50
	MAT.GTT u Guantes térmicos						1,00	12,49	12,49
	MAT.GI u Gafa integral						1,00	5,77	5,77
	MAT.CGN u Caja de guantes de nitrilo						2,00	7,00	14,00
	MAT.CGL u Caja de guantes de látex						5,00	5,72	28,60
	MAT.BL u Bata de laboratorio						1,00	14,90	14,90
	C.AUX Costes auxiliares 2%						0,02	105,26	2,11
	Clase: Material								105,26
	Clase: Medio auxiliar								2,11
	Total partida 05-01						1,00	107,37	107,37
	Total capítulo								107,37
	Total presupuesto								14.873,01

1.3 Cuadro de presupuesto resumido

En este apartado, se muestran de manera más resumida los costes del cuadro de mediciones y presupuesto y, de este modo, se puede observar el precio que conlleva cada unidad de obra, la suma de ellas la cual establece el coste del capítulo y, la suma de todos ellos para dar lugar al presupuesto de ejecución del material.

		PRESUPUESTO RESUMIDO		Pág.: 1
		Síntesis de PGS		Ref.: propre2
				Fec.:
N.º Orden	Descripción de las unidades de obra	Medición	Precio	Importe
	Síntesis de PGS			
	Fase de prepolimerización	1,00	1.238,72	1.238,72
	Fase de curado	1,00	78,30	78,30
	Total Capítulo			1.317,02
	Ensayos de caracterización			
	Cromatografía de permeación en gel	1,00	1.129,15	1.129,15
	Análisis reométricos	1,00	1.676,93	1.676,93
	Calorimetría diferencial de barrido	1,00	899,76	899,76
	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier	1,00	362,67	362,67
	Valoración química	1,00	947,47	947,47
	Total Capítulo			5.015,98
	Análisis de bioactividad			
	Ensayo de biodegradación	1,00	2.216,82	2.216,82
	Cultivo celular	1,00	5.095,04	5.095,04
	Total Capítulo			7.311,86
	Reuniones			
	Reuniones periodicas de gestión del trabajo	1,00	2.437,80	2.437,80
	Total Capítulo			2.437,80
	Equipos de protección individual y seguridad			
	Material de protección individual	1,00	107,37	107,37
	Total Capítulo			107,37
	Total Presupuesto			14.873,01

1.4 Cuadro de resumen de capítulos

En este cuadro se muestra el coste de cada capítulo, el presupuesto de ejecución del material, el presupuesto por contrata al considerar los gastos generales y el beneficio industrial y, el presupuesto total al considerar el IVA.

		Pág.: 1	
		RESUMEN DE CAPÍTULOS	
		Ref.: prores3	
		Fec.:	
Nº Orden	Código	Descripción de los capítulos	Importe
01		Síntesis de PGS	1.317,02
02		Ensayos de caracterización	5.015,98
03		Análisis de bioactividad	7.311,86
04		Reuniones	2.437,80
05		Equipos de protección individual y seguridad	107,37
TOTAL EJECUCIÓN MATERIAL			16.190,03
13 % Gastos Generales			2.104,70
6 % Beneficio Industrial			971,40
TOTAL EJECUCIÓN POR CONTRATA			19.266,13
21 % I.V.A.			4.045,89
TOTAL PRESUPUESTO C/IVA			23.312,02

Asciende el presupuesto proyectado, a la expresada cantidad de:
VEINTITRES MIL TRESCIENTOS DOCE EUROS CON DOS CÉNTIMOS

29 de Junio de 2018