



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

Desarrollo de un viscosuplemento gelificable in situ basado  
en ácido hialurónico entrecruzado para liberación  
controlada de moléculas condroprotectoras

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Biomédica

AUTOR/A: Torregrosa Aragoneses, Irene

Tutor/a: Vilariño Feltrer, Guillermo

Director/a Experimental: MARTIN CABEZUELO, RUBEN

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUOLA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIERÍA  
INDUSTRIAL VALENCIA

Curso Académico:



*“Gracias a mi familia  
y en especial a mis tutores, Guillermo y Rubén  
por el apoyo y la dedicación constante.  
Sin vosotros no habría sido posible”*

*I.*



## RESUMEN

La osteoartritis (OA) es una enfermedad degenerativa que provoca la alteración estructural y funcional de las articulaciones con una elevada prevalencia a nivel mundial.

Para tratar la OA, actualmente existen terapias inyectables que solo sirven como tratamiento sintomático para aliviar el dolor, pero sin el objetivo de regenerar, por tanto, con escaso fin clínico. Por ello se pretende desarrollar un producto médico que consista en un hidrogel de ácido hialurónico (HA) autorreticulable e inyectable *in situ* y que a su vez tenga condroitín sulfato (CS) injertado para su posterior liberación controlada en el lugar del defecto. Se pretende que el hidrogel sirva como viscosuplemento, por tanto, que tenga propiedades muy similares al cartílago en cuanto a viscoelasticidad, retención de agua y estimulación de los condrocitos a partir del CS para sintetizar nueva matriz.

En este trabajo, a diferencia de las líneas de investigación de las últimas décadas de mimetizar uno de los componentes fundamentales de la matriz extracelular del cartílago (MEC), surge el interés de desarrollar estructuras basadas en glicosaminoglicanos (GAG) por tener efectos físicos deseables en vez de obtener los proteoglicanos miméticos empleando intermediarios polipeptídicos que provocan la activación de una respuesta inmunológica en el organismo.

Este hidrogel carecerá del riesgo inmunogénico asociado a las proteínas, permitirá una mejora en las propiedades viscoelásticas del tejido donde se inserta durante varios meses, tendrá una función condroprotectora y garantizará una liberación controlada y focalizada de estas biomoléculas.

Se emplea HA de alto peso molecular (1.5-1.8 MDa) modificándolo mediante la química EDC/NHS para introducir grupos sulfhidrilo (SH) terminales en el HA para conferirle la posibilidad de gelificar *in situ* a través de los puentes de disulfuro. Haciendo uso de esta técnica se pretende lograr que este hidrogel tenga un grado de tiolación adecuado, para ello se prueban distintas concentraciones de HA. Por último, para injertar CS, también se emplea la química EDC/NHS y diferentes concentraciones para obtener así la concentración óptima a través de la técnica de la fluorescamina. A su vez, se prueban dos técnicas diferentes para injertar y se determina el punto de gel de los hidrogeles.

**Palabras Clave:** Ácido hialurónico; condroitín sulfato; osteoartritis; Ácido hialurónico de alto peso molecular; glicosaminoglicanos; condroprotectora; química EDC/NHS; fluorescamina; gelificación *in situ*; viscosuplemento.



## RESUM

L'osteoartritis (OA) és una malaltia degenerativa que provoca l'alteració estructural i funcional de les articulacions amb una elevada prevalença a nivell mundial.

Per a tractar l'OA, actualment hi ha teràpies injectables que només servixen com a tractament simptomàtic per a alleujar el dolor, però sense l'objectiu de regenerar, per tant, amb escàs fi clínic. Per això es pretén desenrotllar un producte mèdic que consistisca en un hidrogel d'àcid hialurònic (HI HA) autorreticulable i injectable *in situ* i que al seu torn tinga condroitín sulfat (CS) empeltat per al seu posterior alliberament controlada en el lloc del defecte. Es pretén que l'hidrogel servisca com viscosuplement, per tant, que tinga propietats molt semblants al cartílag quant a viscoelasticitat, retenció d'aigua i estimulació dels condrocitos a partir del CS per a sintetitzar nova matriu.

En este treball, a diferència de les línies d'investigació de les últimes dècades de mimetitzar un dels components fonamentals de la matriu extracel·lular del cartílag (MEC), sorgix l'interés de desenvolupar estructures basades en glicosaminglicanos (GAG) per tindre efectes físics desitjables en compte d'obtindre els proteoglicans mimètics emprant intermediaris polipeptídics que provoquen l'activació d'una resposta immunològica en l'organisme.

Aquest hidrogel no tindrà el risc immunogénic associat a les proteïnes, permetrà una millora en les propietats viscoelàstiques del teixit on s'inserix durant uns quants mesos, tindrà una funció condroprotectora i garantirà un alliberament controlada i focalitzada d'estes biomolécules.

S'empra HA d'alt pes molecular (1.5-1.8 MDa) modificant-lo mitjançant la química EDC/NHS per introduir grups sulfhidril (SH) terminals a l'HA per conferir-li la possibilitat de gelificar *in situ* a través dels ponts de disulfur. Fent ús d'aquesta tècnica es pretén aconseguir que aquest hidrogel tingui un grau de tiolació adequat, per això es proven diferents concentracions d'HA. Finalment, per empeltar CS, també es fa servir la química EDC/NHS i diferents concentracions per obtenir així la concentració òptima a través de la tècnica de la fluorescamina. Alhora es proven dues tècniques diferents per empeltar i es determina el punt de gel dels hidrogels.

Paraules Clau: Àcid hialurònic; condroitín sulfat; osteoartritis; Àcid hialurònic d'alt pes molecular; glicosaminoglicans; condroprotectora; química EDC/NHS; fluorescamina; gel·lificació *in situ*; viscosuplement.





## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative disease that causes structural and functional alteration of the joints with a high prevalence worldwide.

To treat OA, there are currently injectable therapies that only serve as symptomatic treatment to relieve pain, but without the objective of regenerating, therefore, with little clinical purpose. For this reason, the aim is to develop a medical product consisting of a self-crosslinking hyaluronic acid (HA) hydrogel that can be injected *in situ* and which, in turn, has grafted chondroitin sulfate (CS) for its subsequent controlled release at the site of the defect. It is intended that the hydrogel serve as a viscosupplement, therefore, that it has very similar properties to cartilage in terms of viscoelasticity, water retention and stimulation of chondrocytes from CS to synthesize new matrix.

In this work, unlike the research lines of the last decades of mimicking one of the fundamental components of the extracellular matrix of cartilage (ECM), the interest arises in developing structures based on glycosaminoglycans (GAG) for having desirable physical effects on instead of obtaining mimetic proteoglycans using polypeptide intermediates that cause the activation of an immune response in the body.

This hydrogel will lack the immunogenic risk associated with proteins, it will allow an improvement in the viscoelastic properties of the tissue where it is inserted for several months, it will have a chondroprotective function and it will guarantee a controlled and focused release of these biomolecules.

High molecular weight HA (1.5-1.8 MDa) is used, it is modified by EDC/NHS chemistry to introduce terminal sulfhydryl (SH) groups on the HA to give it the ability to gel *in situ* through disulfide bridges. Using this technique, it is intended to achieve that this hydrogel has an adequate degree of thiolation, for which different concentrations of HA are tested. Finally, to graft CS, the EDC/NHS chemistry and different concentrations are also used to obtain the optimal concentration through the fluorescamine technique. In turn, two different grafting techniques are tested and the gel point of hydrogels.

Keywords: Hyaluronic acid; chondroitin sulfate; osteoarthritis; High molecular weight hyaluronic acid; glycosaminoglycans; chondroprotective; EDC/NHS chemistry; fluorescamine; *in situ* gelling; viscosupplement.

## Glosario

AINE	Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos
COX	Enzima ciclooxygenasa ( <i>Cyclooxygenase Enzyme</i> )
CS	Condroitín sulfato (Chondroitín Sulfate)
C6S	N-acetilgalactosamina sulfatada en el carbono 6
C4S	N-acetilgalactosamina sulfatada en el carbono 4
CSA	Cisteamina (Cysteamine)
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide)
ESCEO	Sociedad Europea para los Aspectos Clínicos y Económicos de la Osteoartritis y Osteoartrosis (European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis)
EULAR	Liga Europea contra las Enfermedades Reumáticas
FCA	Fluorescamina
GAG	Glicosaminglicano (GlycosAminoGlycano)
GalNac	N-acetilgalactosamina (N-acetylgalactosamine)
GlcA	Ácido glucurónico (Glucuronic acid)
HA	Ácido hialurónico (Hyaluronic Acid)
IGD	Dominio Interglobular (Interglobular Domain)
MEC	Matriz extracelular (Extracellular matrix)
NHS	N-hidroxisuccinimida (N-hydroxysuccinimide)
OA	Osteoartritis (Osteoarthritis)
PEG2	Prostaglandina E2
PG	Proteoglicanos (Proteoglycans)
SYSADOA	Fármacos de acción sintomática lenta para la osteoartritis ( <i>Symptomatic Slow Action Drug for Osteoarthritis</i> )
KS	Queratán sulfato (Keratan sulfate)



## Índice de figuras

Figura 1. Esquema del tratamiento de la OA.....	21
Figura 2. Ubicación del cartílago articular en la rodilla [11].....	21
Figura 3. Representación de la estructura del cartílago. En la figura se destacan las tres regiones diferenciadas: la región pericelular, la región territorial y la interterritorial. En azul se observan los condrocitos y la organización de las fibras de colágeno aparecen en los detalles [13].....	22
Figura 4. Estructura del proteoglicano a diferentes niveles de detalle. La estructura A muestra el agregado complejo y la estructura B se corresponde con la del agregado con todos los dominios (g1,g2,g3,ks,cs), representando su unión a la proteína núcleo así como la de esta con el ha.....	25
Figura 5. Unidad de repetición de un disacárido de condroitín sulfato, con sus grupos funcionales característicos coloreados, en rosa los grupos sulfato y en azul el ácido carboxílico [20]......	26
Figura 6. Estructura del ha, formada por la repetición de disacáridos de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico [28].....	27
Figura 7. Vía química EDC/NHS para generar modificaciones químicas de polisacáridos carboxilados que pueden dar lugar a hidrogeles HA-SH [35].....	30
Figura 8. Montaje para extraer la cisteamina en la cámara de nitrógeno donde se observa que esta se vierte sobre un tubo eppendorf® (rodeado en color rojo) para su pesado posterior. ....	33
Figura 9. En la parte izquierda se observa la molécula de HA modificada (HA-NHS), que al reaccionar con la cisteamina, forma el grupo químico amida dejando expuestos los sulfhidrilos (parte derecha) [33]. .....	33
Figura 10. Estructura molecular de la cisteamina [37]. .....	34
Figura 11. Explicación gráfica de la diálisis química.....	34
Figura 12. En la imagen de la izquierda se observa el montaje experimental de la diálisis de una muestra de HA, que se muestra esquemáticamente en la imagen de la derecha. Se parte de un vaso de precipitados con agua (con NaCl, ácida o destilada) y un agitador magnético, y se coloca la disolución dentro de la membrana entre dos pinzas de plástico. ....	35
Figura 13. Estructura química del reactivo de Ellman (DTNB; izquierda) y reacción del DTNB en presencia de -SH (sulfhidrilos; derecha) [38] .....	35
Figura 14. Montaje experimental que se realizó para determinar si el pH afectaba a las medidas.....	37
Figura 15. Reacción de la fluorescamina con una amina primaria .....	38
Figura 16. En la imagen se observan dos de los reactivos que se utilizaban para la recta patrón (glicina) y como control negativo (prolina)[42]. .....	38
Figura 17. Proceso de liofilización [43]. .....	40
Figura 18. Liofilizadora (freeze-drying). .....	40
Figura 19. Proceso de desoxigenación del agua.....	41

Figura 20. Kit de prueba de oxígeno de Hanna .....	41
Figura 21. Reómetro que se usa para determinar las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles.....	42
Figura 22. Montaje experimental para evitar la evaporación del agua. se disponían radialmente varias gotas de agua en el plato inferior, sin interferir con la rotación del plato superior.....	43
Figura 23. Resultado de hidratar los geles con diferentes H <sub>2</sub> O.....	44
Figura 24. Resultado de la muestra 1% ha antes de liofilizar. se observa claramente como la muestra está contenida (gelificada) y no tiende a llenar todo el recipiente. ....	45
Figura 25. La curva naranja representa el espectro de absorción del DTNB, mientras que la azul, representa el del DTNB en contacto con grupos SH.....	45
Figura 26. En la imagen A se observan las muestras de color amarillo gradualmente, siendo el tubo de la izquierda la muestra de HA 0.5%, el siguiente tubo el 0.25%, el tercer tubo el HA 0.1% y el tubo de la izquierda el medio de diálisis. En la imagen B se observa la recta patrón, siendo el tubo de la izquierda el blanco y el tubo de la derecha el estándar A. ....	47
Figura 27. Apariencia de las muestras tras la liofilización, siendo en este caso la muestra del ha 0.5%.....	48
Figura 28. Montaje experimental en la placa de 96 pocillos para determinar el grado de injerto de CS. En la imagen de la izquierda se muestra la recta patrón (a-f), el control negativo (c-), el control positivo (BSA), el blanco y las muestras a determinar. En la imagen de la derecha se pueden observar los valores de la fluorescamina obtenidos de cada uno de los pocillos. ....	48
Figura 29. En esta imagen se ve la muestra 1 muy viscosa previa a la diálisis.....	49
Figura 30. En el gráfico A se observan los datos del reómetro de la muestra SH-HA-g-CS hidratada con agua destilada. En el gráfico B se observa el cálculo del tiempo de refuerzo, donde aparece una flecha de color amarilla (113.36 s) del punto de estabilización entre las líneas naranja y azul.....	51
Figura 31. En el gráfico A se observa el comportamiento de G' en la muestra SH-HA-g-CS 24/48 con las 3 aguas y en el gráfico B se observa lo mismo pero de la muestra SH-HA-g-Cs 48/48. ...	52
Figura 32. Cronograma del proyecto .....	54

## Índice de tablas

Tabla 1. Composición del cartílago articular excepto los condrocitos (MEC)[14] .....	23
Tabla 2. Resultados del grado de tiolación de las muestras de HA-SH tras 24 horas de reacción .....	46
Tabla 3. Resultados del grado de tiolación de las muestras de HA-SH tras 48 horas de reacción .....	46
Tabla 4. Concentración de aminas primarias o grado de injerto de cs de las muestras SH-HA-g-CS .....	49
Tabla 5. Grado de injerto de las muestras SH-HA-g-CS.....	50
Tabla 6. Grado de tiolación de las muestras SH-HA-g-CS.....	50
Tabla 7. Concentración de $O_2$ disuelto en las diferentes aguas empleadas para determinar las propiedades viscoelásticas y el tiempo de refuerzo de los hidrogeles.....	50
Tabla 8. Tiempos de refuerzo de las dos muestras SH-HA-g-CS tras hidratarlas con las diferentes aguas. ....	52

# ÍNDICE

## DOCUMENTO I: MEMORIA

1.	Introducción.....	18
1.1	Osteoartritis (OA) .....	18
1.1.1	Tratamientos actuales de la OA.....	19
1.2	Cartílago.....	21
1.2.1	Matriz extracelular.....	22
1.2.2	Condrocitos .....	23
1.3	Bioquímica de la matriz extracelular del cartílago .....	24
1.3.1	Condroitín sulfato (CS) .....	25
1.3.2	Ácido hialurónico (HA) .....	26
1.4	Innovación en la viscosuplementación .....	28
1.4.1	La química EDC/NHS .....	29
2.	Objetivos y justificación.....	31
2.1	Resumen y contexto de la invención .....	31
2.2	Objetivos particulares.....	31
3.	Materiales y métodos.....	32
3.1	Obtención y modificación del HA mediante tiolación .....	32
3.1.1	Funcionalización .....	32
3.1.2	Diálisis .....	34
3.2	Determinación del grado de tiolación .....	35
3.3	Injerto de CS.....	37
3.4	Determinación del grado de injerto de CS.....	37
3.5	Síntesis de SH-HA-g-CS.....	39
3.6	Liofilización.....	39
3.6.1	Hidratación de las muestras liofilizadas.....	40
3.7	Reología de los hidrogeles .....	41
3.7.1	Determinación de la concentración de oxígeno disuelto.....	41
3.7.2	Caracterización de las propiedades viscoelásticas de los geles SH-HA-g-CS.....	42
4.	Resultados y discusión.....	44
4.1	Optimización del proceso de síntesis de HA-SH.....	44
4.1.1	Determinación del tiempo aproximado de gelificación .....	45
4.1.2	Determinación de la concentración óptima de HA.....	45



4.1.3	Comprobación gravimétrica de la funcionalización.....	47
4.2	Determinación de la concentración óptima de CS con FCA.....	48
4.3	Análisis de las muestras SH-HA-g-CS .....	49
4.3.1	Determinación del grado de injerto de CS de las muestras SH-HA-g-CS .....	49
4.3.2	Determinación del grado de tiolación de las muestras SH-HA-g-CS.....	50
4.4	Obtención y determinación de las propiedades viscoelásticas.....	50
4.4.1	Concentración de oxígeno disuelto en el agua.....	50
4.4.2	Caracterización de las propiedades viscoelásticas .....	51
5.	Conclusiones.....	53
6.	Trabajo en proceso y futuro .....	54
7.	Bibliografía.....	55
DOCUMENTO II: PRESUPUESTO		
1.	Alcance y desarrollo del presupuesto .....	59
1.1	Cuadro de precios por clase .....	59
1.2	Cuadro de unidades de obra .....	62
1.3	Cuadro de presupuesto resumido.....	69
1.4	Cuadro de resumen de capítulos.....	70



# DOCUMENTO I: MEMORIA

# 1. Introducción

## 1.1 Osteoartritis (OA)

Las enfermedades reumáticas son aquellas que afectan al aparato locomotor, es decir, aquellas relacionadas con tendones, articulaciones, músculos y ligamentos. También forman parte del conjunto las enfermedades del tejido conectivo y las metabólicas del hueso[1].

Representan un importante problema para la salud pública por ser muy prevalentes e incidentes, ya que, en España, 1 de cada 5 personas padece una enfermedad reumática. A pesar de tener una tendencia creciente conforme la edad, porque las cifras mencionadas anteriormente aumentan a 1 de cada 2 personas a partir de los 65 años, estas enfermedades reumáticas también pueden afectar a jóvenes y a niños [1].

Frecuentemente, las enfermedades reumáticas son más comunes en mujeres que en hombres. Habitualmente suelen ir acompañadas de un daño estructural irreversible, suponiendo una disminución o pérdida de la capacidad funcional, de la actividad física o laboral.

Se puede hacer una clasificación en función del órgano diana afectado:

- La artrosis tiene como órgano diana el cartílago articular. Esta enfermedad se produce por un envejecimiento, degradación o degeneración de las articulaciones de forma lenta y gradual y tiene una mayor prevalencia que la artritis[1].
- La artritis tiene como órgano diana el tejido sinovial, produciendo la inflamación o infección del mismo. Son las enfermedades con mayor complejidad y abarcan más de 100 distintas entidades nosológicas siendo la más común la artritis reumatoide. Esta, es un tipo de artritis inflamatoria que se caracteriza por ser el propio sistema inmune quien ataca a las articulaciones y tejidos sanos[1, 2].
- Los reumatismos de partes blandas tienen como órgano diana los tendones, las bursas y los músculos.
- Las enfermedades metabólicas óseas tienen como órgano diana el hueso.

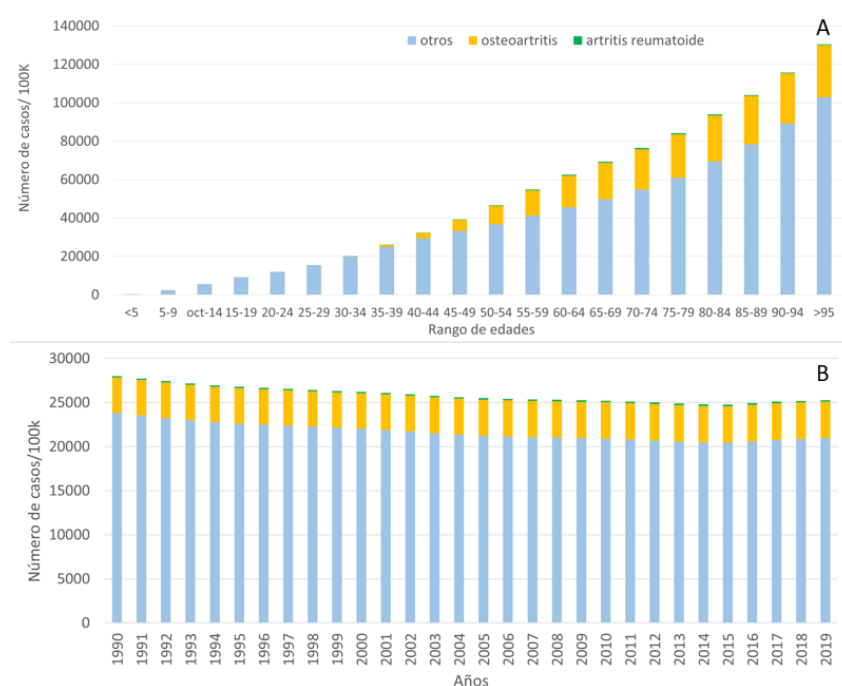
La artrosis es la traducción del inglés de la osteoartritis (OA), es por ello por lo que se empleará la OA durante el desarrollo de este documento. Es una enfermedad degenerativa, crónica y compleja que provoca la alteración estructural y funcional de las articulaciones y que afecta actualmente a 300 millones de personas [3]. Esta genera una pérdida del cartílago articular junto con una remodelación del hueso subcondral con presencia de sinovitis (inflamación)[4].

Se caracteriza por la degeneración del cartílago, un proceso en el que se produce la desestabilización del funcionamiento equilibrado entre la síntesis y degradación del cartílago, lo que favorece el catabolismo y como consecuencia la destrucción del tejido articular. También se caracteriza por el engrosamiento del hueso subcondral, la inflamación sinovial y las alteraciones estructurales de la cápsula articular, ligamentos y músculos[5].

Es una de las principales causas de dolor crónico musculoesquelético, sobre todo en rodilla y cadera ya que están expuestas a sobrecarga articular, infecciones y traumas [6], y de discapacidad física en personas con 50 años o más del mundo, como muestra la figura A del Gráfico 1. Además, tiene una prevalencia de 250 millones de personas actualmente pero creciente, como podemos observar en la figura B del Gráfico 1, debido al envejecimiento de la

población. Aun siendo la artritis reumatoide la causa más frecuente de artritis, se puede observar que es testimonial en comparación con la OA.

La OA un importante problema sanitario que representa un importante gasto en la salud. Hoy en día no existe cura para esta enfermedad, solo tratamientos para aliviar el dolor o retrasar su progresión.



**Gráfico 1. Prevalencia mundial de las enfermedades musculoesqueléticas en función de la edad (A) o en función del año (B)[7]**

### 1.1.1 Tratamientos actuales de la OA

La OA es una consecuencia de múltiples factores que contribuyen tanto de forma directa como indirecta a la degeneración de las articulaciones. Esta degeneración del cartílago y hueso está producida por un aumento del catabolismo de la matriz extracelular, modificación del hueso subcondral y consecuentemente una reacción inflamatoria. Debido a la tendencia creciente de la enfermedad con la edad y al aumento de la expectativa de edad de la población española, se prevé un aumento del consumo de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE)[8].

El principio básico según la Sociedad Europea para los Aspectos Clínicos y Económicos de la Osteoporosis, la Osteoartritis y Enfermedades Musculoesqueléticas (ESCEO, por sus siglas en inglés), es la combinación del el tratamiento farmacológico y no farmacológico de la OA de rodilla dividido en cuatro pasos (Figura 1). Según la Liga Europea contra las Enfermedades Reumáticas (EULAR), el tratamiento debe ser individualizado en función de los factores de riesgo según la localización (actividad física y obesidad), los factores de riesgo generales (edad y sexo), la intensidad del dolor y el grado de discapacidad, los signos de inflamación, la localización y grado del daño estructural y por último las preferencias y expectativas del paciente[8].

En el tratamiento no farmacológico se recurre a la terapia, que produce cambios en el estilo de vida en el que se incluye la educación e información del paciente, el ejercicio físico y la pérdida de peso.

El paso uno es el denominado “tratamiento de fondo”. Este tratamiento consiste en derivar a los pacientes al fisioterapeuta para comenzar un tratamiento con los dispositivos de apoyo (bastón, rodilleras y plantillas) en el caso de que exista una mala alineación. Si aparecen síntomas durante este primer caso, se puede realizar acupuntura china, terapia manual, agentes térmicos o Tai Chi, es decir, métodos alternativos no farmacológicos.

Si el paciente es sintomático se recurre al paracetamol de forma regular para aliviar el dolor. El paracetamol es un analgésico oral que puede administrarse en dosis de hasta 4 g/día durante periodos largos. Como alternativa al paracetamol se puede usar SYSADOA (*Symptomatic Slow Action Drug for Osteoarthritis* o fármacos de acción sintomática lenta para la osteoartritis) para reducir lentamente los síntomas sin haber recurrido a los antiinflamatorios no esteroideos porque sus agentes contienen ácido hialurónico, condroitín sulfato y glucosamina. Si el paciente continúa con los síntomas, se suele agregar la administración tópica de capsaicina y antiinflamatorios no esteroideos ya que se considera que es un método eficaz y seguro para aliviar el dolor y la inflamación, aunque no evite el daño en el cartílago. Los AINES son medicamentos encargados de inhibir la enzima ciclooxigenasa (COX), tanto la COX-1, como la COX-2 aunque es la inhibición de esta última la responsable de la acción antiinflamatoria y analgésica. La ciclooxigenasa es una enzima que sintetiza prostaglandinas, responsables de la realización de funciones relacionadas con el dolor y la inflamación.

Si el paciente continúa con síntomas o son más severos, se recurre a la fase dos, denominado por ESCEO “manejo farmacológico avanzado en el paciente sintomático persistente”. Es una técnica que consiste en prescribir AINE a los pacientes durante ciclos más largos. Hay que considerar el riesgo gastrointestinal, renal y cardiovascular antes de prescribir AINE [9], por ello se evitan o se prescriben AINE selectivos a COX-2 o no selectivos en función del riesgo asociado. Si permanece el dolor agudo, es decir, el paciente no responde a analgésicos, se recurre a la inyección intraarticular de corticoesteroides o ácido hialurónico. La inyección de ácido hialurónico, denominada clínicamente infiltración, restaura la viscoelasticidad del líquido sinovial además de promover la síntesis endógena de esta sustancia, que estaba reducida debido a la osteoartritis. Por tanto, se puede afirmar que esta técnica produce una mejora sintomática y funcional, proporciona una protección mecánica propia del ácido hialurónico, mejora tanto la función de los condrocitos como la ultraestructura de la membrana sinovial, entre otras [6, 9].

El paso tres, denominado “últimos intentos farmacológicos”, trata de administrar Duloxetina y/o analgésicos opiáceos débiles o a corto plazo como alternativa para aquellos pacientes a los que los AINE les haya sido ineficaces o lo hayan tolerado mal.

El último paso, denominado “tratamiento y cirugía de la enfermedad en etapa terminal”, se aplica para pacientes con una gran discapacidad o dolor, cuyas alteraciones radiológicas sean importantes y consiste en el reemplazo total de la articulación por una prótesis.

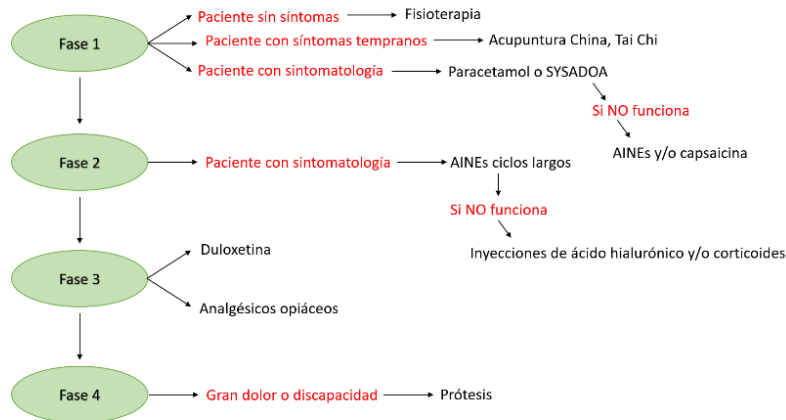


FIGURA 1. ESQUEMA DEL TRATAMIENTO DE LA OA.

## 1.2 Cartílago

El cartílago articular, que es un tipo de cartílago hialino, es el encargado de recubrir las superficies de las articulaciones diartrodiales para que, junto con el líquido sinovial, se forme una interfase que permita realizar los movimientos articulares de forma que se produzca una baja fricción y así se minimice el estrés mecánico [10]. Podemos observar un ejemplo de cartílago articular en la Figura 2.

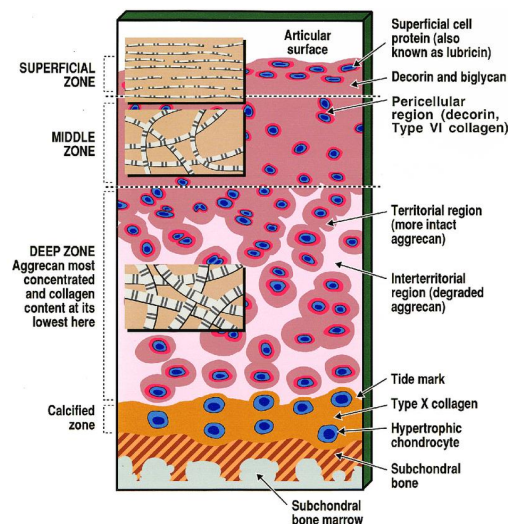


FIGURA 2. UBICACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR EN LA RODILLA [11].

El cartílago articular se caracteriza por su gran contenido en agua cuya función es proporcionar una superficie firme y lisa, resistente a la deformación plástica, con baja fricción y alta lubricación. Tiene una estructura única, formada por una base denominada matriz extracelular que constituye el 95% [10] de la masa y por un único tipo celular (condrocito), encargado de producir el resto de los componentes funcionales para el cartílago como el colágeno, los proteoglicanos (PG) y las enzimas. Además, no tiene ni vasos sanguíneos ni linfáticos, ni tampoco innervación[12].

La matriz extracelular se divide en diferentes regiones en función de la proximidad a los condrocitos y en función del contenido, el diámetro y la organización de las fibrillas de colágeno. Las tres regiones son:

- I. La región pericelular. Esta región, rodea a los condrocitos de forma que se genera una capa fina alrededor de la membrana de estas células. Además, tiene una función biomecánica de transducción de las señales en el momento en el que se realiza la carga. Carece de fibrillas de colágeno, aunque sí tiene el resto de componentes, como PG.
- II. La región territorial. Esta región rodea a la anterior y como sí contiene fibrillas de colágeno, forma una red fibrilar alrededor de la región pericelular aportando protección a los condrocitos.
- III. La región interterritorial. Esta región es la más grande y la que proporciona la mayoría de las propiedades del cartílago. Las fibrillas de colágeno en esta región se disponen de forma diferente en función de la zona del cartílago en la que se encuentren. Como bien se puede observar en la Figura 3, están orientadas paralelas a la superficie en la zona superficial, oblicuas a la superficie en la zona media, y perpendicular a la misma en la zona profunda.



**FIGURA 3. REPRESENTACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL CARTÍLAGO. EN LA FIGURA SE DESTACAN LAS TRES REGIONES DIFERENCIABLES: LA REGIÓN PERICELULAR, LA REGIÓN TERRITORIAL Y LA INTERTERRITORIAL. EN AZUL SE OBSERVAN LOS CONDROCITOS Y LA ORGANIZACIÓN DE LAS FIBRAS DE COLÁGENO APARECEN EN LOS DETALLES [13].**

### 1.2.1 Matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es una red tridimensional que engloba las células, formada por toda la masa que constituye el cartílago articular, excepto los condrocitos. Es decir, está formada mayoritariamente por agua, entre un 60-80% de la masa total, y por macromoléculas. Estas macromoléculas, son colágeno, PG y proteínas no colágenas, y representan el 20-40% de la masa total. En peso seco se corresponden con 60% el colágeno, 20-25% los PG y 15-20% las proteínas no colágenas y las glicoproteínas como se puede observar en la Tabla 1 [14].

La función de la matriz extracelular es conferir las propiedades mecánicas del cartílago además de ser un complejo donde las células pueden realizar sus funciones, como la multiplicación y la señalización. Generalmente, la MEC puede realizar la función de transducción de las señales



durante la carga. También puede interactuar indirectamente con las células a partir de las integrinas, receptores de superficie de la membrana celular.

**TABLA 1. COMPOSICIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR EXCEPTO LOS CONDROCITOS (MEC)[14]**

<b>Agua</b>		<b>Es el componente mayoritario</b>
<b>Colágeno</b>	Tipo II,V,VI,IX,X,XI	El 90-95% es de tipo II. Todas las estructuras de colágeno están formadas por triples hélices Alpha y atrapan PG de gran tamaño, es decir, su función es la de una malla.
<b>Proteoglicanos</b>	Agrecanos: Queratán sulfato, Hialuronato, Condroitín sulfato	Un proteoglicano tiene una estructura que se basa en un glicosaminoglicano unido al núcleo (proteína).
<b>Glicoproteínas</b>	Receptores de membrana, estructurales	Participan en el mantenimiento de la estructura.
<b>Moléculas de adhesión</b>	Laminina, integrinas, fibronectina	Tienen como función regular las relaciones entre las células y la matriz extracelular[15]
<b>Lípidos</b>		Participan en el desarrollo de la membrana celular.
<b>Proteasas</b>	Metaloproteasas	Enzimas encargadas de la degradación y renovación de los componentes de la MEC.

### 1.2.2 Condrocitos

Los condrocitos son las células que se encuentran en el cartílago, las cuales están muy diferenciadas y especializadas para producir y mantener la MEC para que pueda resistir la deformación física. Estas representan el 10% de la masa total tisular y en función de en qué articulación se encuentren, este porcentaje puede variar. Como se ha mencionado en el apartado 1.2, la actividad metabólica, el tamaño y la forma de los condrocitos varía en función de la zona del cartílago articular en la que se encuentren. Todas las zonas tienen en común que los condrocitos son los encargados de sintetizar los componentes de la MEC ya que tienen los organelos específicos para ello [16].

Los condrocitos son células que derivan de células mesenquimales, que tienen una vida muy larga pero una capacidad limitada de proliferación. Durante el proceso de formación del cartílago, estos proliferan muy rápido, de forma que ya en el cartílago articular maduro pocos de los condrocitos presentan una actividad metabólica alta. Los condrocitos presentes en el cartílago articular maduro, se encargan de realizar las funciones de síntesis y degradación de los componentes, es decir, tienen una actividad metabólica baja. Son capaces de aumentar esta actividad o incluso proliferar otros condrocitos en el caso de que se produzca una lesión o algún cambio que produzca una degeneración, pero no pueden reparar los defectos[16].

La carga mecánica es el principal regulador de la síntesis de la matriz ya que los condrocitos son sensibles a estos cambios estructurales y a las cargas de la superficie articular, de forma que también se inducen cambios en la composición intracelular de los condrocitos. Esta carga y/o el movimiento de la articulación modifican la estructura y la composición ya que se estimula la síntesis de macromoléculas. La ausencia de carga o la inmovilización producen un deterioro de la superficie articular porque el cartílago se adelgaza, de forma similar a como ocurre en la OA [10,11].

### 1.3 Bioquímica de la matriz extracelular del cartílago

La matriz extracelular está fundamentalmente formada por las glicoproteínas, los proteoglicanos, colágeno, moléculas de adhesión, lípidos y proteasas, según se ha explicado previamente en la Tabla 1. Pese a que la composición química de estas moléculas es tremendamente similar, el rol diferencial de cada una de ellas está totalmente definido por sutiles variaciones como los grupos funcionales que presentan, su masa molar o interacciones entre átomos vecinos, por lo que es relevante conocer algunos aspectos destacados de su bioquímica.

Las glicoproteínas tienen la función de unión entre la MEC y los condrocitos. Estas están compuestas por una base de naturaleza proteica a la que se le unen oligosacáridos y monosacáridos. Las glicoproteínas estructurales son a) la ancorina CII, que es una proteína que se encuentra en la superficie de los condrocitos encargada de unir colágeno, b) la proteína oligomérica del cartílago, que es considerada un marcador de recambio del cartílago y en el caso de personas con OA, de progresión de degeneración del cartílago articular, c) la fibronectina, que es grande y se encuentra tanto en forma de agregados en la MEC como unida a la superficie de los condrocitos y d) la tenascina [12, 17].

Por su parte, los proteoglicanos (PG) son moléculas biológicas formadas por una proteína central con cadenas de unos polisacáridos denominados glicosaminglicanos unidas covalentemente, sustituyendo así parte de esta proteína específica [18]. El número de glicosaminglicanos, y por tanto de sustituyentes de la proteína, es pequeño. Existen distintas familias de proteoglicanos:

- La familia de agregantes (grandes proteoglicanos que se unen a la cadena de ácido hialurónico, la cual se explicará en el apartado 1.3.2).
- Los lécticos (organizadores de la matriz extracelular cerebral), los cuales tienen cuatro miembros: el agrecano, el versicano, el neurocano y el brevicano. Estos dos últimos se concentran en las matrices extracelulares del cerebro, mientras que el versicano enriquece los grandes vasos y el agrecano es el principal PG del cartílago [18].
- Los sindecanos, que son receptores transmembrana que se encargan de señalar tanto de forma independiente como en combinación con otros receptores [18].

El agrecano es una supramolécula que participa en la hidratación y en la mecánica del tejido conectivo cuya composición se basa en glicosaminoglicanos (GAG; cadenas de condroitín sulfato y de queratán sulfato, mayoritariamente) unidas covalentemente a una proteína núcleo y los dominios, que son proteínas de unión y estabilización con una configuración en forma de “cepillo de botella” (Figura 4), y de la que el complejo toma su nombre. En ellas, se pueden distinguir tres dominios diferentes: G1, G2 Y G3. El dominio G1 es el que proporciona la unión con una cadena de un polisacárido denominado ácido hialurónico y está separado del G2 por el

dominio interglobular (IGD). El dominio G3 sirve para la señalización celular y además existen otros dominios, como el de condroitín sulfato (CS1 Y CS2) y el de queratán sulfato (KS)[19].

Un GAG es una cadena formada por unidades repetidas de disacáridos los cuales constan de un grupo sulfato una carga negativa controlando así la hidratación, la presión osmótica y las características mecánicas. Estos disacáridos son cadenas son: el condroitín sulfato, el queratán sulfato, los isómeros y el dermatán sulfato.

Por su parte, la cadena principal a la que se anclan los complejos de agregano, el ácido hialurónico, es un GAG no sulfatado. Este está presente en el cartílago articular como cadenas largas no ramificadas a las que se unen las cadenas de sulfato de condroitina y queratina a través del enlace vía proteínas.

Con la edad o fruto de alguna enfermedad musculoesquelética se pierde la proteína de unión generando una disminución del tamaño del PG y por tanto debilitando la MEC del cartílago articular.

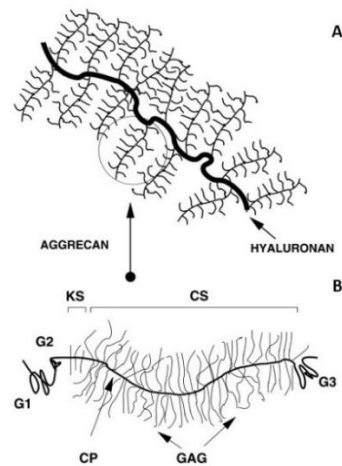


FIGURA 4. ESTRUCTURA DEL PROTEOGLICANO A DIFERENTES NIVELES DE DETALLE. LA ESTRUCTURA A MUESTRA EL AGREGADO COMPLEJO Y LA ESTRUCTURA B SE CORRESPONDE CON LA DEL AGREGANO CON TODOS LOS DOMINIOS (G1,G2,G3,KS,CS), REPRESENTANDO SU UNIÓN A LA PROTEÍNA NÚCLEO ASÍ COMO LA DE ESTA CON EL HA.

### 1.3.1 Condroitín sulfato (CS)

El condroitín sulfato es un importante constituyente de la MEC ya que está muy extendido dentro de la misma en forma de proteoglicanos (CSPG), actuando como regulador e involucrando así a un gran número de fenómenos biológicos.

Como se ha mencionado en el apartado 1.3, un GAG es una cadena formada por 25-30 unidades repetidas de disacáridos, estando formada la unidad de repetición en este caso por el N- ácido glucurónico (GlcA) y N-acetilgalactosamina (GalNAc),  $(-4GlcA\beta 1-3GalNAc\beta 1-)_n$ , por tanto el condroitín sulfato es un galactosaminoglicano que tiene sulfatada la molécula N-acetilgalactosamina en su carbono 4 (C4S) o 6 (C6S) [20]. En concreto, como se observa en la Figura 5, esta molécula tiene varios grupos funcionales entre los que cabe destacar los sulfatos por su gran capacidad de absorber agua, una característica muy distintiva de la macromolécula.

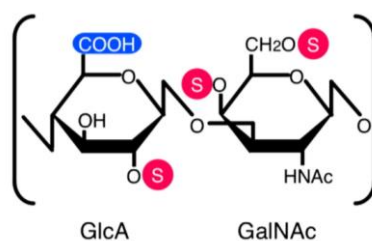


FIGURA 5. UNIDAD DE REPETICIÓN DE UN DISACÁRIDO DE CONDRITÍN SULFATO, CON SUS GRUPOS FUNCIONALES CARACTERÍSTICOS COLOREADOS, EN ROSA LOS GRUPOS SULFATO Y EN AZUL EL ÁCIDO CARBOXÍLICO [20].

Varios estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han apuntado a que el condroitín sulfato (CS) tiene propiedades antiinflamatorias, anticatabólicas, anabólicas y antiapoptóticas [21]. Las propiedades anabólicas y anticatabólicas son debido a su capacidad por promover la síntesis de colágeno y proteoglicanos, disminuir la actividad catabólica de los condrocitos inhibiendo algunas enzimas proteolíticas, como las colagenasas y agregcanasas, mediadores de inflamación como el PGE2 Y COX-2 y cualquier sustancia cuyo efecto sea el daño del cartílago. La propiedad antiinflamatoria es debido a la inhibición de la óxido nítrico sintetasa [21, 22] .

Actualmente existe una gran controversia sobre si se debiera replantear su uso como fármaco si no tiene efecto demostrado a nivel clínico. Por ejemplo, uno de los ensayos más sistemáticos realizados hasta la fecha es el de intervención de artritis con glucosamina/condroitina (GAIT). Tras seis meses de la realización del ensayo, en los análisis no se encontraron efectos estadísticamente significativos del condroitín sulfato para pacientes que tenían un dolor leve antes del ensayo, pero para los pacientes con dolor moderado o severo, sí hubo mejora del dolor y de la capacidad funcional. Según el estudio de Gabay [23], el tratamiento con condroitín sulfato en la mano después de seis meses mejoró la actividad funcional, la rigidez matinal y la reducción del dolor.

Por otro lado, el fármaco de condroitín sulfato está asociado a una menor toxicidad, coste y mejor tolerancia gastrointestinal que los AINE, según Vectra (Valoración Económica y Sanitaria de Condroitín Sulfato en el Tratamiento de la Artrosis). Tanto el CS como la glucosamina son seguros para la salud cardiovascular ya que no incrementan el riesgo de sufrir un ictus o un infarto de miocardio [24, 25].

La absorción del CS es inmediata en el segmento proximal al intestino delgado y su mayor concentración plasmática es alrededor de las dos horas después de la administración por vía oral, de forma que cuando este fármaco llega a la articulación diana, si se distribuye tanto por el cartílago como por el hueso subcondral pero la forma de penetrar en condrocitos es relativamente limitada. Por tanto, probablemente el uso vía oral del CS es el factor que limita el potencial terapéutico por no alcanzar fácilmente la zona.

### 1.3.2 Ácido hialurónico (HA)

El ácido hialurónico es un carbohidrato con un alto peso molecular tal y como se encuentra presente en el cartílago articular. Concretamente, es un mucopolisacárido que se sintetiza en los fibroblastos y está presente en numerosos tejidos. Está presente de forma abundante en el

humor vítreo, en los tejidos conectivos blandos y en el líquido sinovial. Es un componente de la matriz extracelular y está compuesto por repeticiones de disacáridos de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico (Figura 6) que están unidos por los enlaces glucosídicos beta-1,4 y beta-1,3 que van alternando. La estructura del disacárido del HA es muy rígida y estable energéticamente [26].

Las proteínas de unión del HA forman parte de la ECM y están involucradas en la trasducción de señales celulares. Una familia de estos receptores incluye los receptores CD44, el versicano y neurocano, entre otros [27].

El número de disacáridos repetidos puede ser incluso de más de 10000 y con una masa molecular de aproximadamente cuatro millones de Dalton. La longitud promedio de un disacárido es de un nanómetro [26].

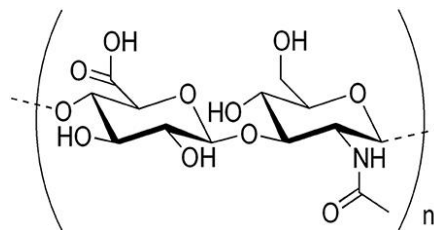


FIGURA 6. ESTRUCTURA DEL HA, FORMADA POR LA REPETICIÓN DE DISACÁRIDOS DE N-ACETILGLUCOSAMINA Y ÁCIDO GLUCURÓNICO [28]

Los grupos funcionales característicos del HA le confieren unas funciones determinadas:

- I. El mantenimiento de la viscosidad del líquido sinovial.
- II. Controlar la hidratación de los tejidos y el transporte de agua, ya que cuando no está ligado a otras moléculas se une con esta.
- III. Lubricar las articulaciones y los músculos.
- IV. El ensamblaje supramolecular de proteoglicanos en la MEC [26].
- V. Actuar como molécula de señalización al interactuar con los receptores de la superficie celular regulando la proliferación, la mitosis, la migración, la inflamación y el desarrollo tumoral.
- VI. Poseer una serie de funciones fisicoquímicas condroprotectoras.

La concentración y el peso del ácido hialurónico de los tejidos disminuye durante el envejecimiento y consecuentemente se produce la pérdida parcial o total de viscosidad de los tejidos afectados. No solo el envejecimiento es un factor para su reducción, sino que la OA produce una reducción desde la mitad hasta un tercio de la concentración de HA de las articulaciones, aumentando así la probabilidad de que se dañe el tejido.

La naturaleza viscoelástica y no inmunogénica del HA ha promovido investigaciones sobre su uso para aplicaciones clínicas como la suplementación del líquido articular e incluso como un agente de entrega de fármacos. En esta línea, la viscosuplementación sirve para restaurar la viscosidad y elasticidad del cartílago. Es un tratamiento que consiste en administrar por vía intraarticular soluciones de ácido hialurónico para reconstruir la homeostasis previamente modificada. Esta solución no es permanente, sino que en función de su naturaleza se degrada antes o después [29]. Este HA exógeno consigue restaurar las propiedades del cartílago porque

promueve la síntesis de condrocitos y de los proteoglicanos. Muchos de los efectos fisiológicos del HA exógeno pueden ser dependientes de su peso molecular [26]. Los resultados de algunos estudios [27], han demostrado que las inyecciones intraarticulares de ácido hialurónico de alto peso molecular ofrecen unos mejores resultados que el de bajo peso molecular. Esto es debido a que proporcionan una mejora de la calidad de vida del paciente porque se disminuye el número de inyecciones, es un procedimiento menos invasivo y tiene menos riesgos asociados. Pero existe un límite de la eficacia del alto peso molecular del HA, ya que si es demasiado elevado ( $\geq 3-6$  MDa), pese a que tiene la ventaja de proporcionar un mayor tiempo de permanencia, puede perder capacidad de unión al receptor CD44 [26].

#### 1.4 Innovación en la viscosuplementación

Los cambios patológicos del HA en el líquido sinovial en los pacientes con OA condujeron a la viscosuplementación mediante la inyección intraarticular. A finales de 1980 se empezó a investigar sobre la seguridad y eficacia de la inyección intraarticular de HA, pero no fue hasta 1990 cuando Puhl [30] demostró la seguridad de esta técnica desencadenando una amplia variedad de estudios para analizar el efecto de HA. Otro estudio, realizado por Bellamy, demostró la eficacia de HA como viscosuplementación en la rodilla de pacientes con OA [31].

La viscosuplementación comenzó a usarse clínicamente en Europa en 1995 aunque previamente ya se usaba Japón e Italia y en Canadá en 1992. Por último en 1997, entró en vigor en Estados Unidos [26].

Aunque existe una múltiple variedad de estudios donde se demuestran los efectos positivos del HA en pacientes con OA todavía no hay información suficiente para concluir el efecto de este tratamiento a largo plazo en humanos. Por tanto es necesaria la realización de estudios futuros para determinar los beneficios a largo, la cantidad de inyecciones necesarias y el momento ideal para su administración [30, 31].

Los dos productos más usados clínicamente en la actualidad son el HA natural (Hyalgan) y Synvisc, un hilano sintético G-F 20 [26]. El hilano es un HA reticulado y tiene mejores propiedades mecánicas (mayor peso molecular de cadena y viscoelasticidad). Esto provoca que el tratamiento con hilanos sea más eficaz porque perduran más tiempo en la articulación [26]. Otros productos comerciales análogos se basan igualmente en estrategias equivalentes al Hyalgan (Supartz, Orthovisc, Euflexxa) o al Synvisc (Monovisc, Gel-One), con sutiles diferencias en la concentración del soluto que afectan muy sutilmente al efecto clínico o la persistencia en el tejido. Actualmente en el mercado se emplean pesos moleculares de HA muy altos (3-6 MDa), medios-altos (0.5-2 MDa) y bajos (0.1-0.5 MDa). El peso molecular promedio de HA de una rodilla sana es de 5–6 MDa. Euflexxa es el producto que más se asemeja a este peso (2.4-3.6 MDa) siendo el resto de productos de menor peso molecular excepto Synvisc, que tiene 6 MDa.

La administración sistémica de fármacos en las articulaciones sigue siendo un reto debido a que el tejido es avascular y a la limitada permeabilidad, tanto de la membrana sinovial, como de la cápsula articular. Actualmente, las inyecciones intraarticulares no se usan para administrar fármacos antiinflamatorios o analgésicos. Esta falta de métodos para administrar fármacos en el tratamiento de la OA se debe a los problemas de formulación y a la invasión de la técnica.

A pesar de la existencia de diferentes formulaciones como micro o nanopartículas e hidrogeles que permiten una liberación controlada del fármaco y aumentan los tiempos de retención en

las articulaciones previos a los efectos sistémicos secundarios, lograr fármacos con cargas suficientemente elevadas para poder realizar la liberación de dosis terapéuticas de fármacos durante periodos prolongados de tiempo evitando así la inyección cíclica, es un desafío actual. Se considera un desafío por la deficiente irrigación y permeabilidad tanto de la cápsula articular como de la membrana sinovial de las articulaciones afectadas [32].

#### 1.4.1 La química EDC/NHS

Los hidrogeles son biomateriales con unas buenas propiedades mecánicas, con biocompatibilidad y con una alta permeabilidad. Para obtener estas propiedades mecánicas se han empleado muchos métodos diferentes de entrecruzamiento químico y agentes de entrecruzamiento para producir materiales de ácido hialurónico similares a un gel mediante la formación de redes covalentes [33].

A pesar de existir diferentes métodos como la reacción de adición tipo Michael y la reacción de base de Schiff, que eran capaces de obtener hidrogeles de HA biodegradables y con buenas propiedades mecánicas apropiados para la biomedicina, seguían existiendo algunos problemas como la citotoxicidad del aditivo exógeno o los agentes encargados de reticular. Otro problema era que el proceso de gelificación no ocurría de forma controlada. Es por ello por lo en un trabajo publicado por *Bian y otros* [33] crearon un hidrogel a partir gelificación *in situ* de un gel inteligente autorreticulante a partir de ácido hialurónico tiolado, obtenido mediante la modificación química de este. Se emplean modificaciones de HA basadas en tioles, o HA-SH, debido a su excelente compatibilidad, ya que el HA está presente de forma natural en el organismo, los compuestos de sulfhidrilo están distribuidos en tejidos animales y la formación de los puentes de disulfuro (reticulación) está promovida simplemente por la presencia de oxígeno molecular o atómico.

HA-SH se sintetiza utilizando la ruta química denominada EDC/NHS. El EDC es la carbodiimida 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)[34] y es un agente reticulante que se emplea para que se produzca el acoplamiento de los grupos carboxilo a aminas primarias [34, 35]. Esta reacción ocurre en dos pasos, como indica la Figura 7:

1. El EDC reacciona con los grupos carboxilo y en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS) forma un éster de NHS reactivos con amina. El uso de NHS es preferible ya que presenta mayor solubilidad al agua [34, 35].
2. En este punto, una amina primaria es capaz de entrar en contacto con este de forma que dona un par de electrones con el objetivo de formar una amida. Si la molécula a la que pertenecía la amina primaria contenía un sulfhidrilo terminal, este queda expuesto, con el potencial de poder generar puentes de disulfuro por oxidación.

Esta técnica de entrecruzamiento del hidrogel permite la incorporación de diferentes fármacos a su estructura logrando así obtener estructuras funcionalizadas de HA que además tienen la capacidad de mantener las propiedades viscoelásticas específicas para tratar diferentes enfermedades.

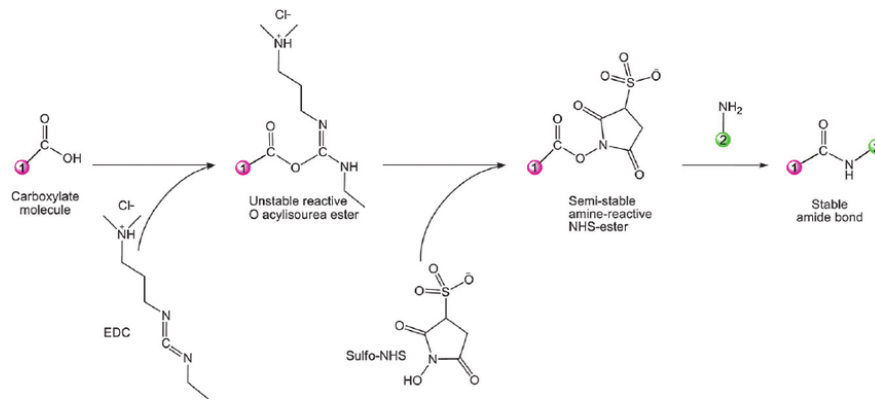


FIGURA 7. VÍA QUÍMICA EDC/NHS PARA GENERAR MODIFICACIONES QUÍMICAS DE POLISACÁRIDOS CARBOXILADOS QUE PUEDEN DAR LUGAR A HIDROGELES HA-SH [35]



## 2. Objetivos y justificación

### 2.1 Resumen y contexto de la invención

Este Trabajo Fin de Grado (TFG) está enmarcado en una de las primeras fases de un proyecto de investigación más amplio (para el que se ha solicitado financiación a la administración autonómica) que está llevando a cabo un grupo de investigación del CBIT y en el cual se ha participado. Así mismo, la planificación del TFG ha sido fruto de otro defendido previamente en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Valencia [36]

El objetivo principal es el desarrollo de un producto sanitario que sea un gel auto-reticulable *in situ* de HA modificado mediante tioles (HA-SH) que sirva como dispositivo viscosuplementador así como también produzca una liberación controlada de CS para el tratamiento de OA.

### 2.2 Objetivos particulares

En este trabajo, se han abordado las etapas preliminares (el desarrollo del hidrogel) y los tres objetivos más concretos, que se describen a continuación junto con la metodología seguida para llevarlos a cabo.

- Fabricación del gel a partir de la modificación del HA a diferentes concentraciones con cisteamina (CSA) recurriendo a la química EDC/NHS, para obtener así el HA-SH mencionado anteriormente. Se parte de cuatro diferentes concentraciones de HA y se produce su caracterización usando alguna técnica de cuantificación colorimétrica para determinar el grado de sustitución de los tioles. Una vez caracterizado, se podrá realizar la síntesis únicamente con la concentración de HA que mayor grado de sustitución presente.
  - Verificación del efecto del oxígeno en la disolución para formar el reticulado de las cadenas para poder garantizar la gelificación *in-situ*.
- Determinación de la concentración óptima (mayor grado de injerto) del CS en el HA empleando técnicas de cuantificación del residuo N-terminal de la macromolécula. Para ello se realizará la síntesis siguiendo la misma química que para la modificación del HA, probando 3 concentraciones distintas de CS.
- Determinación de la técnica de entrecruzamiento óptima (mayor grado de tiolación y de injerto de CS). Para ello se realizarán dos síntesis con la concentración óptima de CS y de HA empleando dos técnicas diferentes (añadiendo CSA al inicio de la síntesis o tras 48 h de reacción).
- El último objetivo es la obtención de un método de síntesis válido que permita aunar ambas modificaciones y permita la gelificación *in situ* del hidrogel en las condiciones adecuadas, para su posterior verificación preclínica *in vitro* y futura aplicación clínica.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Obtención y modificación del HA mediante tiolación

#### 3.1.1 Funcionalización

Para iniciar la tiolación del HA que dará lugar al hidrogel, previamente se prepararon las soluciones de ácido hialurónico con agua Milli-Q y se dejaron agitar en frío (5-8 °C) durante 24-72 horas. El agua Milli-Q que se emplea en los laboratorios es agua ultra pura y se denomina así ya que ha sido filtrada y purificada por ósmosis inversa. Cada solución contenía una concentración diferente de HA con el objetivo de poder determinar la óptima: 0.1%, 0.25%, 0.5% y 1% expresado en % m/v (1, 2.5, 5 y 10 mg/ml, respectivamente). El HA que se empleó tenía un peso molecular 1.5-1.8 MDa (Sigma Aldrich, 99% pureza, 401 g/mol).

Una vez preparadas las muestras de HA, se empezó la reacción EDC/NHS explicada en el apartado 1.4.1. Para ello se empleó una proporción 1/4/2/4, siendo estas proporciones las equivalentes a las proporciones molares de HA/EDC/NHS/CSA, por ser las proporciones más favorables para un injerto efectivo de CSA de acuerdo a estudios previos [33]. Cabe destacar, en este punto, que cuando se han realizado cálculos de concentraciones molares para el HA, se han hecho asumiendo que 1 mol en este caso no se refería a un número de Avogadro de macromoléculas de HA, sino de unidades de repetición del mismo. Esto se debe a que cada unidad de repetición cuenta con un único radical carboxilo, que es el grupo funcional susceptible de ser activado por el EDC. Para realizar esta reacción, primero se pesaron las respectivas masas de NHS (Sigma Aldrich, pureza 98%.115.09 g/mol) para cada concentración de HA y se depositaron en los frascos de vidrio donde estaban las muestras de HA y se agitaron. Se realizó el mismo procedimiento con EDC·HCl (Sigma Aldrich, pureza 99% ,191.70 g/mol) pero depositando estas cantidades en la solución anterior y dejando agitar durante 2 horas, para así facilitar la homogeneización de la disolución, puesto que el NHS requiere más tiempo para disolverse en fase acuosa (20 – 30 min) que el EDC·HCl, pero no es hasta que se añade el EDC·HCl cuando la reacción empieza a tener efecto, ya que este último es el responsable de que el NHS se “acople” al HA.

Por último, se pesó y se añadió la cisteamina hidrocloreto o CSA·HCl (Sigma Aldrich, pureza 97% 113.61 g/mol). La cisteamina es una sustancia muy higroscópica, es decir, que atrae agua en forma de vapor o de líquido de su ambiente, por tanto, se extrajo empleando una cámara estanca inundada de nitrógeno tal y como se muestra en la Figura 8 para protegerla de la humedad ambiental.

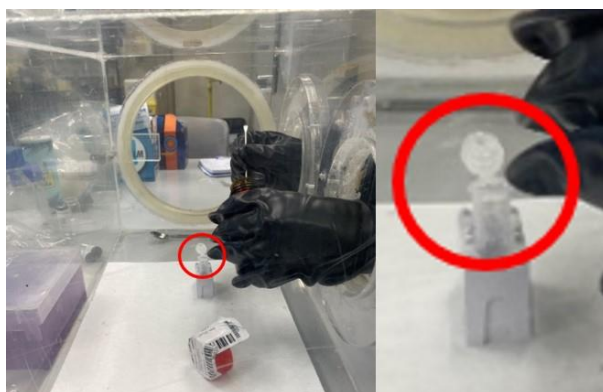


FIGURA 8. MONTAJE PARA EXTRAER LA CISTEAMINA EN LA CÁMARA DE NITRÓGENO DONDE SE OBSERVA QUE ESTA SE VIERTE SOBRE UN TUBO EPPENDORF® (RODEADO EN COLOR ROJO) PARA SU PESADO POSTERIOR.

Para controlar el agua que absorbe la cisteamina, se cogió una cantidad que se vertió en el Eppendorf® en un ambiente de nitrógeno y se pesó. Posteriormente, se procedió a diluirla en 1 ml de agua Milli-Q desoxigenada siendo capaces así de controlar la cantidad de moléculas de agua al que estaba sometida.

Una vez se añadió a cada muestra de HA sus respectivos volúmenes de CSA, se reguló el pH a 4.75 (añadiendo 1.0 M NaOH o 1.0 M HCl) y se midió mediante pH-metro o tiras reactivas, cuando la viscosidad impedía la determinación correcta del pH. El pH ácido se usó para favorecer la reacción ( $\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$ ) como se muestra en la Figura 9. Posteriormente se dejó la reacción 24 horas agitando. Finalmente, a juzgar por los resultados preliminares, se probó a repetir la síntesis durante 48 horas en lugar de 24 horas, para ver si el incremento en el grado de tiolación era considerable.

Tras esas 24 horas, se determinó el grado de tiolación de las muestras empleando el método de Ellman y midiéndolas en el espectrofotómetro, como se explicará en el apartado 3.2.

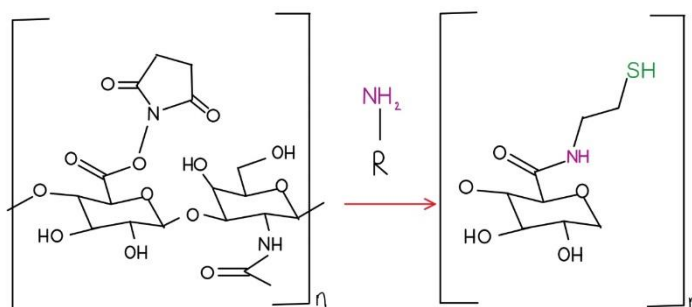


FIGURA 9. EN LA PARTE IZQUIERDA SE OBSERVA LA MOLÉCULA DE HA MODIFICADA (HA-NHS), QUE AL REACCIONAR CON LA CISTEAMINA, FORMA EL GRUPO QUÍMICO AMIDA DEJANDO EXPUESTOS LOS SULFIDRILLOS (PARTE DERECHA) [33].

La reacción explicada en la Figura 9 se produce porque la cisteamina tiene la estructura que muestra la Figura 10.



FIGURA 10. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA CISTEAMINA [37].

### 3.1.2 Diálisis

Se trasvasaron las muestras de HA a membranas de 3500 Da de masa molar límite para realizar la diálisis contra una disolución de NaCl 100 mM a pH 3.5, ácida por la adición de HCl[33], de forma que se eliminaran las posibles sales reactivas en las muestras mediante el proceso que se explica a continuación. Se colocaron las 3 muestras en el medio de diálisis (con un volumen de al menos 100 veces superior al volumen de la muestra, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante de las membranas) durante 24 horas en ácido y con NaCl y luego otras 24 horas en H<sub>2</sub>O destilada (48 horas de diálisis), para eliminar la NaCl y no tenerla sólida en el posterior proceso de liofilización. Esta segunda diálisis a pH neutro (pH≈7) sirvió también para hacer una prueba y poder determinar el momento aproximado de gelificación de las muestras. Una vez pasados 30 minutos se midió el pH de las 3 muestras de HA (0.1%,0.25% y 0.5%). Se realizó el mismo procedimiento a las 24 horas para ver si las muestras habían gelificado y así poder determinar un tiempo aproximado.

Se empleó un medio de diálisis ácido porque previene el entrecruzamiento de los hidrogeles durante la diálisis, es decir, para tener un control del momento de gelificación de las muestras.

La diálisis es una técnica que consiste en el intercambio de sustancias o moléculas en función de su tamaño a través de una membrana (Figura 11).

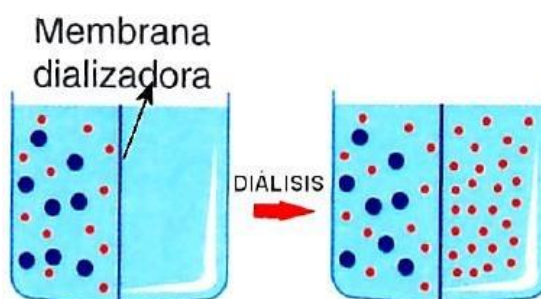


FIGURA 11. EXPLICACIÓN GRÁFICA DE LA DIÁLISIS QUÍMICA.

El intercambio se produce de más a menos concentración y depende de tanto la permeabilidad como de la superficie de la membrana. Como resultado se obtiene el paso de las moléculas pequeñas y el solvente, pero no de las moléculas grandes.

El HA de alto peso molecular (1.5 MDa) permaneció dentro de la membrana mientras que las sales reactivas se transfirieron por difusión al medio de diálisis. El montaje experimental que se llevó a cabo se muestra en la Figura 12 para cada muestra de HA.

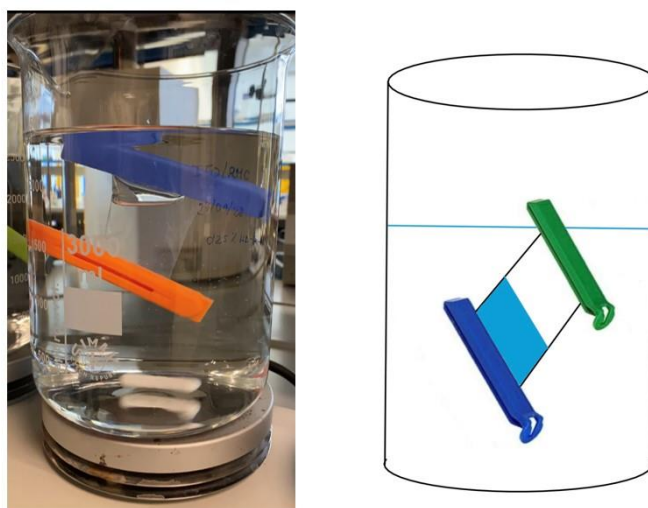


FIGURA 12. EN LA IMAGEN DE LA IZQUIERDA SE OBSERVA EL MONTAJE EXPERIMENTAL DE LA DIÁLISIS DE UNA MUESTRA DE HA, QUE SE MUESTRA ESQUEMÁTICAMENTE EN LA IMAGEN DE LA DERECHA. SE PARTE DE UN VASO DE PRECIPITADOS CON AGUA (CON NaCl, ÁCIDA O DESTILADA) Y UN AGITADOR MAGNÉTICO, Y SE COLOCA LA DISOLUCIÓN DENTRO DE LA MEMBRANA ENTRE DOS PINZAS DE PLÁSTICO.

### 3.2 Determinación del grado de tiolación

Para la determinación del número de sulfhidrilos libres presentes en las cadenas de HA-SH (recordemos que la CSA libre puede atravesar la membrana de diálisis) se empleó el método de Ellman [33]. Este método utiliza el DTNB o 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico) (Sigma Aldrich, 99% Pureza) que es un compuesto soluble en agua que permite cuantificar los grupos sulfhidriilo (-SH) expuestos en una solución a pH neutro porque, al reaccionar con estos, el resultado es un producto de color amarillo. Es una reacción rápida y de alto coeficiente de extinción molar [38]. El coeficiente de extinción molar es un parámetro que indica con qué intensidad una sustancia (a una determinada longitud de onda) absorbe la luz por concentración molar [39].

La reacción del DTNB con un grupo sulfhidriilo libre produce una mezcla de disulfuro y ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) como muestra la Figura 13. Algunos estudios han demostrado que el coeficiente de extinción molar del TNB se refleja con mayor precisión en un valor de  $14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a  $412 \text{ nm}$  [38].

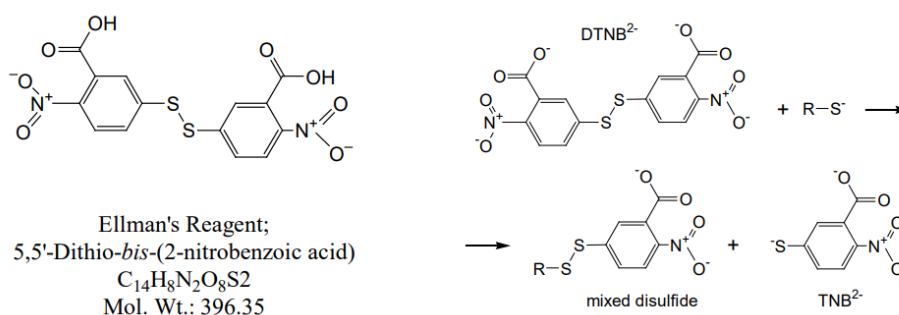


FIGURA 13. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL REACTIVO DE ELLMAN (DTNB; IZQUIERDA) Y REACCIÓN DEL DTNB EN PRESENCIA DE -SH (SULFHIDRILOS; DERECHA) [38]

Los grupos sulfhidrilo pueden cuantificarse empleando una curva patrón creada a partir de concentraciones conocidas de un compuesto que contiene sulfhidrilo, como la cisteína [38]. En este caso se empleó CSA, que al igual que la cisteína tiene una estructura molecular sencilla, con un grupo sulfhidrilo (Figura 10).

El procedimiento que se siguió es el que indica el protocolo de Thermo Scientific para Ellman's Reagent [38], de forma que primero se preparó el *reaction buffer* o disolución tampón con 0.1M fosfato de sodio a pH=8 y conteniendo 1 mM EDTA. También fue necesario disolver el reactivo de Ellman en la disolución tampón y tener preparada la cisteamina.

Se preparó una serie de estándares en 8 tubos diferentes nombrados de la A (CSA 1.5 mM) a la G (CSA 0.1 mM), el *blank* (o blanco de referencia, cuya concentración final tendrá que ser 0 mM) y las cuatro muestras de HA-SH (0.1%, 0.25%, 0.5%) en los que se disolvió 50 µl del reactivo de Ellman, 2.5 ml de la disolución tampón y 250 µl de cada una de las muestras diluidas de forma que la concentración de sulfhidrilos de estas muestras se encontrara dentro del rango de trabajo de la curva estándar (1.0 mM) incluso si el grado de tiolación fuera el 100%.

Consistía en una dilución seriada en la que se partió de la muestra A, para la que se hizo un cálculo del volumen inicial necesario de la disolución tampón a partir de CSA (expresada en mol/l), de la concentración del protocolo (1.5mM) y del volumen seleccionado:  $V_1 C_1 = V_2 C_2$

Después se cogió volumen del tubo anterior hasta llegar al *blank*. Tras hacer esta mezcla, se esperó durante mínimo 15 minutos para cada una de las muestras y se midió con el espectrofotómetro (Victor<sup>3</sup> Perkin Elmer 8000) a una longitud de onda de 412 nm con el objetivo de determinar la absorbancia de las mismas. Se realizaron las medidas con una diferencia de 1 minuto entre cada muestra, tiempo suficiente para poder limpiar y rellenar la cubeta del equipo.

El espectrofotómetro es un instrumento que sirve para medir o cuantificar sustancias muy diluidas en un medio que no contribuye en la medida. Este instrumento funciona proyectando un haz de luz monocromática a través de una muestra y midiendo la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra. Como resultado se obtiene o bien información de la naturaleza de la muestra o de forma indirecta la cantidad de la sustancia de interés que contiene la misma.

Análogamente, se hizo una prueba que consistía en añadir 3 ml de agua destilada a pH diferentes con 50 µl de reactivo de Ellman para determinar si el pH influía en las medidas, puesto que la diálisis se realizó a pH 3.5 y, por tanto, las muestras de HA podían ser ligeramente más ácidas que los patrones. Se probó con 8 tubos de ensayo a pH 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 y 7 respectivamente (Figura 14), añadiendo HCl/NaOH para regularlo. Acto seguido se midieron empleando el espectrofotómetro.

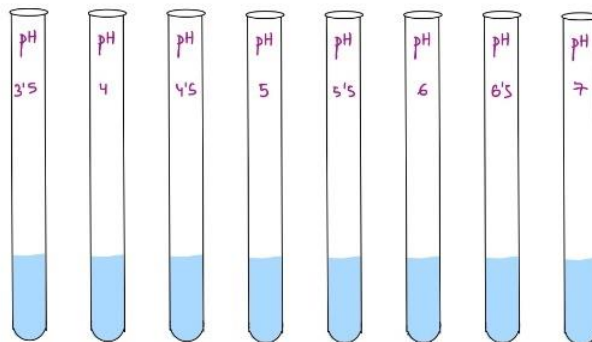


FIGURA 14. MONTAJE EXPERIMENTAL QUE SE REALIZÓ PARA DETERMINAR SI EL pH AFECTABA A LAS MEDIDAS.

### 3.3 Injerto de CS

Se realizó esta síntesis con el objetivo de que el CS se injertara en los grupos laterales de las cadenas de HA, dando lugar al HA-g-CS, una macromolécula con la apariencia de “cepillo de botella” como la que se ha descrito en 1.3.

Para llevar a cabo la síntesis, se siguió el procedimiento explicado en el apartado 3.1.1, es decir, se empleó la técnica EDC/NHS pero sustituyendo CSA por CS (Sigma Aldrich). Se probó con diferentes proporciones de CS 1:100, 1:50 y 1:15 (CS:Carboxilos de HA) [19] para determinar cuál era la óptima. Debe tenerse en cuenta que, por cada mol de carboxilos de HA, se requería un mol de macromoléculas enteras de CS, pues solo hay una amina terminal por cada macromolécula; de ahí que las proporciones no se hayan podido llevar más próximas a 1:1, puesto que las disoluciones habrían sido trabajosamente viscosas y difíciles de disolver. Posteriormente se realizó la diálisis conforme se explica en el apartado 3.1.2 para eliminar los reactivos y que al liofilizar únicamente quedara el HA y el CS.

### 3.4 Determinación del grado de injerto de CS

Para medir la cantidad de aminas terminales del CS no reaccionadas de las muestras, es decir, determinar el contenido de aminas primarias (PA), se llevó a cabo un estudio mediante la técnica de la fluorescamina (Sigma Aldrich,  $\geq 98\%$  pureza, 278.26 peso molecular) [40]. La fluorescamina (FCA) es un reactivo fluorométrico que reacciona con las PA de forma que la fluorescencia resultante de esta reacción directa es proporcional a la concentración de PA (Figura 15). Esta, se midió empleando el equipo un lector de placas por fluorescencia (espectrofotómetro de masas Victor<sup>3</sup> Perkin Elmer 8000) usando una placa negra de 96 pocillos de fondo plano para proteger de la luz tanto al reactivo (fluorescamina) como a las muestras que lo contenían. Además se usó el filtro de 355 nm (el más apropiado disponible en el laboratorio) porque cuando se excitan las muestras a 365 nm, la fluorescencia de las aminas primarias del compuesto tiene una longitud de onda de emisión de 470 nm [41].

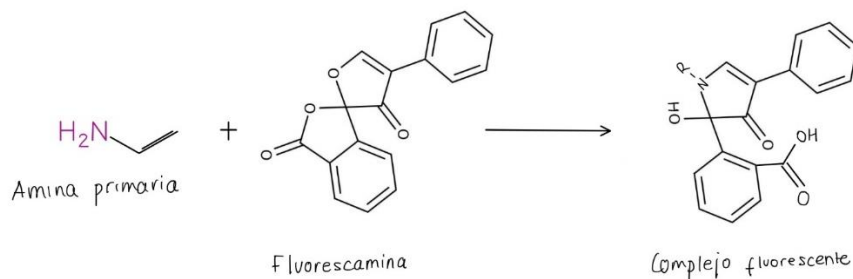


FIGURA 15. REACCIÓN DE LA FLUORESCAMINA CON UNA AMINA PRIMARIA

Para hacer la recta patrón (calibrado), se usó la glicina (Gly·HCl) (Sigma Aldrich,  $\geq 99\%$  pureza, 75.07 g/mol) cuya estructura se muestra en la Figura 16. Es un aminoácido muy similar al que el CS emplea para anclarse a la proteína del núcleo del proteoglicano naturalmente (serina), el cual tiene una amina primaria por molécula (luego la proporción molar es conocida).

Como blanco para las lecturas se empleó la solución tampón libre de muestras con reactivo de fluorescamina [41], como control positivo albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma Aldrich,  $\geq 98\%$  pureza, 66.430 g/mol) puesto que su alta proporción de PA/molécula es conocida ( $19,74 \pm 4,45$  PA por molécula) [41]. Es tan alta porque muchos de los aminoácidos en el esqueleto de la proteína BSA contienen PA. Como control negativo se usó la L-prolina (Sigma Aldrich, 115,13 g/mol) porque tiene una amina secundaria pero no primaria (Figura 16).

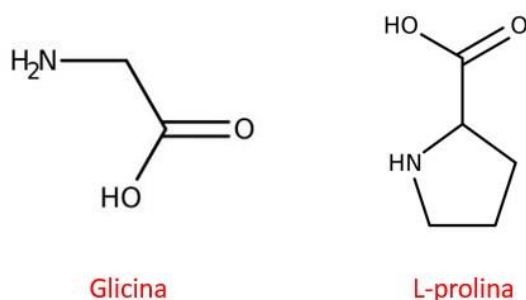


FIGURA 16. EN LA IMAGEN SE OBSERVAN DOS DE LOS REACTIVOS QUE SE UTILIZABAN PARA LA RECTA PATRÓN (GLICINA) Y COMO CONTROL NEGATIVO (PROLINA)[42].

Se empleó una disolución tampón tetraborato sódico (SBB, Ph 9,4) para crear la solución de cada muestra. Posteriormente se diluyeron de forma seriada con la fluorescamina como reactivo y finalmente se analizaron empleando el espectrofotómetro lector de placas Victor<sup>3</sup> (Perkin-Elmer), siguiendo el procedimiento establecido por Sarkar, *et al.* [41]. Se midieron las muestras de los patrones, Gly·HCl, CS, BSA, L-prolina y las muestras a determinar HA-g-CS a diferentes concentraciones) por triplicado en la placa negra de 96 pocillos [41].

A partir de la región lineal obtenida a partir de la curva estándar o recta patrón de la glicina se calculó la concentración de aminas primarias que contenía cada una de las muestras (cada una con una concentración de CS diferente) para poder determinar así el grado de injerto de CS y la concentración que permitía un grado satisfactorio de injerto.



### 3.5 Síntesis de SH-HA-g-CS

Gracias a que tanto la funcionalización como el injerto se basaban en el mismo mecanismo químico de reacción, se pudieron llevar a cabo dos síntesis de SH-HA-g-CS empleando únicamente la técnica EDC/NHS y la concentración óptima de CS. Estas se hicieron en paralelo, añadiéndole a ambas también CSA (SH-HA-g-CS), pero con la diferencia de que a la primera se le añadió tras 24 horas de reacción, dejándola reaccionar 24 horas más (SH-HA-g-CS 24/48) y a la segunda al inicio (SH-HA-g-CS 48/48), de forma que estuvo reaccionando las 48 horas seguidas. Después de la funcionalización, se dializaron las dos muestras durante 24 horas.

Estas síntesis se produjeron con el fin de poder determinar y comparar así sus propiedades viscoelásticas y el punto de gel de los hidrogeles.

Se esperaba que la síntesis SH-HA-g-CS 24/48 tuviera menor grado de tiolación que la SH-HA-g-CS 48/48 al estar CSA menos tiempo reaccionando, pero mayor grado de injerto de CS debido a la menor competencia con la misma. Además, se esperaba que la síntesis SH-HA-g-CS 24/48 fuera más viscosa (por tener mayor grado de injerto de CS) y por tanto más difícil de manejar. Finalmente, se puede concluir que ambas síntesis contaban con ventajas e inconvenientes.

### 3.6 Liofilización

Se neutralizaron todas las muestras a un  $\text{pH} \approx 6.5$  añadiendo 1.0M NaOH y se liofilizaron durante 48 horas. Este proceso se produjo por un doble propósito, el primero es que las muestras liofilizadas (secas) se conservan mejor que las muestras hidratadas (hidrogeles) debido a la alta degradación de estas últimas por la sensibilidad del HA a las enzimas específicas del cuerpo. La segunda, es que permite determinar gravimétricamente el HA (por diferencia de masa antes y después de la tiolación) y así poder comprobar que la funcionalización se ha producido de forma adecuada.

La liofilización inicialmente congela el material a  $-80^{\circ}\text{C}$  de forma que produce una transición de fases entre sólido-líquido. Después, se elimina el hielo mediante sublimación a muy bajas presiones (conversión directa a vapor) quedando una fase de soluto concentrado, que es el material liofilizado, tal y como se muestra en la Figura 17 [43].

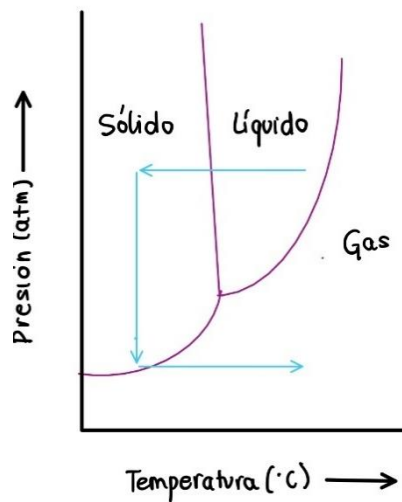


FIGURA 17. PROCESO DE LIOFILIZACIÓN [43].

En la Figura 18 se muestra el equipo que se empleó para liofilizar. En la zona superior de cristal es donde se colocaron las muestras (cámara estanca sobre la que se ejerce vacío), en recipientes con una superficie amplia para que se liofilizaran todas las partes de las muestras por igual.



FIGURA 18. LIOFILIZADORA (FREEZE-DRYING).

### 3.6.1 Hidratación de las muestras liofilizadas

Se hizo un ensayo preliminar que consistió en hidratar las muestras liofilizadas con agua desoxigenada, oxigenada y ácida ( $\text{pH} < 7$ ) para determinar cuál de ellas producía el entrecruzamiento y por tanto gelificación. Este ensayo no requirió el uso del reómetro (ver apartado siguiente) ya que su objetivo no era determinar el tiempo de entrecruzamiento ni las propiedades viscoelásticas, sino únicamente ver si las muestras gelificaban.

Se llevó a cabo el proceso de la desoxigenación del agua vertiendo la misma sobre un recipiente cilíndrico de vidrio. Posteriormente se colocó en una placa calefactora a alta temperatura a la vez que se conectó a una trampa de nitrógeno. Se abrió la bala de nitrógeno para que burbujeara mientras que se enfriaba a temperatura ambiente con el objetivo de desplazar el  $O_2$  por otro gas (Figura 19). Una vez finalizado este proceso, el bote se selló con Parafilm para evitar la entrada de  $O_2$ .

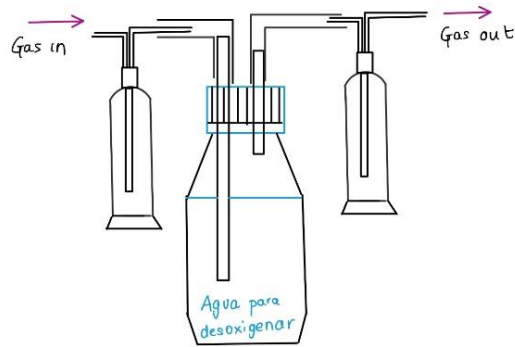


FIGURA 19. PROCESO DE DESOXIGENACIÓN DEL AGUA

### 3.7 Reología de los hidrogeles

#### 3.7.1 Determinación de la concentración de oxígeno disuelto

Para determinar el efecto del oxígeno de las diferentes disoluciones a emplear en la gelificación de las muestras liofilizadas SH-HA-g-CS 24/48 y SH-HA-g-CS 48/48, se estimó la concentración de oxígeno del agua Milli-Q, del agua destilada y de una disolución de peróxido de hidrógeno 20 mM (o agua oxigenada) usando el kit de prueba de oxígeno disuelto de Hanna (Figura 20). Este kit es una valoración química basada en el método Winkler ya que permite determinar la concentración de oxígeno disuelto en agua (en un rango de 0-10 mg/L de  $O_2$ ) de manera rápida y sencilla [44]. Se hizo una prueba de  $O_2$  disuelto porque este es el precursor de la formación de los puentes de disulfuro y por tanto de la gelificación del HA funcionalizado.



FIGURA 20. KIT DE PRUEBA DE OXÍGENO DE HANNA

### 3.7.2 Caracterización de las propiedades viscoelásticas de los geles SH-HA-g-CS

Se caracterizó las propiedades viscoelásticas del hidrogel SH-HA-g-CS empleando el reómetro Discovery HR 20 (Figura 21). Primero se procedió a la determinación del tiempo de gelificación de los hidrogeles usando una geometría que consistía en dos platos horizontales de 20 mm de diámetro de acero inoxidable y un *gap* (distancia plato-vástago) de 1000  $\mu\text{m}$ . Este barrido temporal se realizó dentro de un intervalo de tiempo determinado (1800 segundos) para controlar la gelificación *in situ* de las soluciones de hidrogel de SH-HA-g-CS .

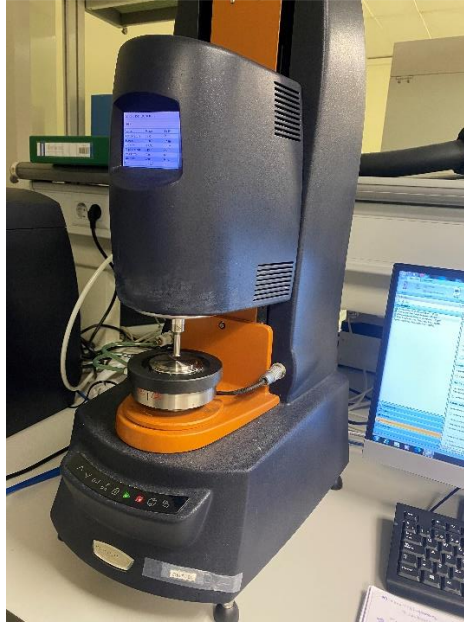
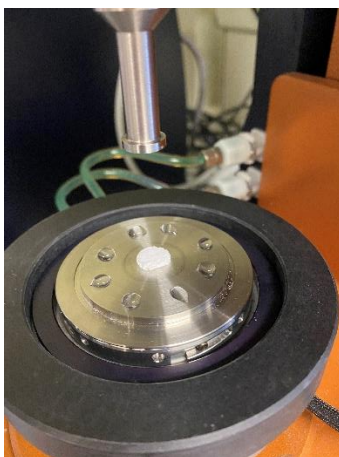


FIGURA 21. REÓMETRO QUE SE USA PARA DETERMINAR LAS PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS DE LOS HIDROGELES

El ensayo se realizó a 37°C para emular condiciones fisiológicas. Consistió en colocar las muestras SH-HA-g-CS de 24/48 y SH-HA-g-CS de 48/48 liofilizadas en el centro del platillo y del vástago e hidratarla con aguas con diferente concentración de O<sub>2</sub> disuelto: agua Milli-Q, agua destilada y agua oxigenada para ver con qué agua gelificaba *in situ*. Se probó tanto con diferentes aguas con un volumen conocido determinado en función del *gap* del reómetro con la finalidad de obtener un producto fácilmente manejable a la hora de su producción.

Durante el montaje, se pusieron gotas de la misma agua que se estaba implementando para reticular el gel alrededor de la muestra y se cubrió con un protector especial del reómetro para evitar obtener falsos resultados por la evaporación del agua durante el tiempo que dura el ensayo (Figura 22).



**FIGURA 22. MONTAJE EXPERIMENTAL PARA EVITAR LA EVAPORACIÓN DEL AGUA. SE DISPONÍAN RADIALMENTE VARIAS GOTAS DE AGUA EN EL PLATO INFERIOR, SIN INTERFERIR CON LA ROTACIÓN DEL PLATO SUPERIOR.**

Asimismo, se aplicó preliminarmente un barrido de frecuencia a unas amplitudes de deformación que se determinaron que estaban en el rango viscoelástico lineal (entre 0.01 Hz y 10 Hz) manteniendo una deformación constante de 1% y un barrido de amplitud a una frecuencia de 1 Hz constante y variando la deformación entre 0.01-100% sobre las muestras HA-g-CS para determinar los parámetros óptimos (*strain* y frecuencia)[45].

Una vez determinados los parámetros óptimos, se programó un barrido oscilatorio para seguir el proceso de gelificación, fijando el *strain* (deformación) al 1% y la frecuencia a 1 Hz. Este ensayo empezó una vez se había añadido el H<sub>2</sub>O que inicia la gelificación, en caso de que esta ocurriera.

Se registró la evolución temporal de G' (módulo de almacenamiento o elástico) y G''(módulo de pérdidas o viscoso) del barrido oscilatorio y del de frecuencia.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Optimización del proceso de síntesis de HA-SH

El objetivo era determinar la concentración de HA que más grado de tiolación presentara para poder realizar una funcionalización óptima de forma que se pudiera tener un mejor control del entrecruzamiento de los hidrogeles. Cabe recordar que el entrecruzamiento se produce en presencia de oxígeno ya que la formación de los puentes de disulfuro se produce por oxidación.

Inicialmente, se realizó una síntesis de prueba al HA 0.1% y, tras hidratar las muestras de HA-SH con agua con diferente concentración de  $O_2$  disuelto (desoxigenada, oxigenada y a  $pH < 7$ ), se comprobó que todas las muestras gelificaban (Figura 23), pese a que la gelificación no debería producirse cuando la concentración de  $O_2$  disuelto es muy baja y, sobre todo, cuando el pH es ácido. Este resultado demostraba que las muestras estaban gelificadas previamente a la hidratación y se obtuvo debido a un error experimental en la extracción de CSA. A partir de esta primera síntesis se empezó a emplear la caja de nitrógeno para extraer CSA en un ambiente controlado, pues es altamente higroscópico.

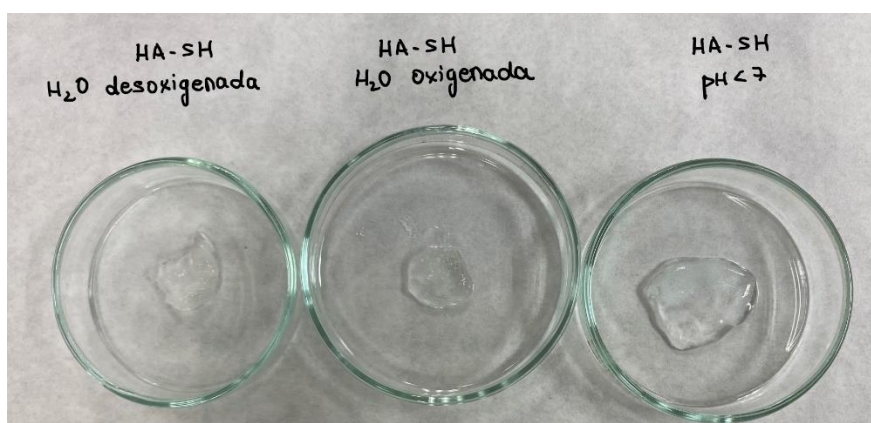
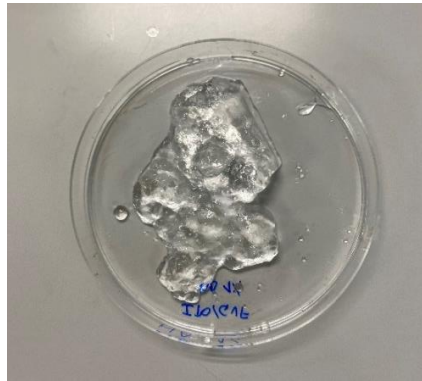


FIGURA 23. RESULTADO DE HIDRATAR LOS GELES CON DIFERENTES  $H_2O$

A partir de una segunda síntesis, se obtuvieron disoluciones homogéneas y con una viscosidad relativamente fácil de tratar, excepto la muestra con HA 1% inicial. Se observó que no era una sustancia líquida como el resto de muestras con diferente concentración, sino que tenía una

aparición ya similar a la de un gel y por tanto difícil de manejar para su posterior injerto de CS (Figura 24). Como consecuencia, se tomó la decisión de no volver a hacer la síntesis del HA 1%.



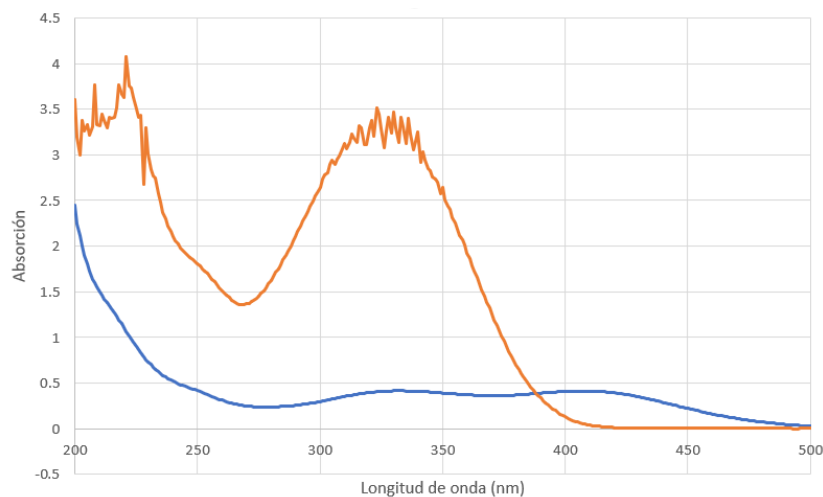
**FIGURA 24. RESULTADO DE LA MUESTRA 1% HA ANTES DE LIOFILIZAR. SE OBSERVA CLARAMENTE COMO LA MUESTRA ESTÁ CONTENIDA (GELIFICADA) Y NO TIENDE A LLENAR TODO EL RECIPIENTE.**

#### 4.1.1 Determinación del tiempo aproximado de gelificación

Los resultados obtenidos de la prueba que trataba de determinar el momento de gelificación durante la diálisis fueron inesperados, ya que el pH disminuyó ligeramente cuando en realidad se esperaba que aumentara, debido a que se estaba dializando frente a un pH mayor (las muestras estaban pH=4.75 y el medio de diálisis a pH=7). Se observó que las muestras no gelificaron durante el proceso de diálisis.

#### 4.1.2 Determinación de la concentración óptima de HA

Para determinar la concentración de grupos SH (modificación por CSA) que presentaba el HA a diferentes concentraciones y decidir cuál era más favorable para la síntesis en dos etapas se empleó el método de Ellman.



**FIGURA 25. LA CURVA NARANJA REPRESENTA EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL DTNB, MIENTRAS QUE LA AZUL, REPRESENTA EL DEL DTNB EN CONTACTO CON GRUPOS SH.**

Se realizó una comparación de los espectros de absorción del DTNB entre 200 y 800 nm sin modificar y cuando ha estado en contacto con moléculas de SH (en presencia de CSA) para demostrar el cambio en el espectro que permite cuantificar los SH. Como se puede observar en

la Figura 25, el DTNB en presencia de SH a 412 nm (longitud de onda que indica el protocolo de Ellman [38]) da más señal que únicamente el DTNB, por tanto podemos concluir que es un buen método para cuantificar los -SH.

Para calcular el grado de tiolación, se obtuvo previamente una recta patrón empleando las medidas que se realizó mediante el espectrofotómetro. Esta, se obtuvo a partir del *blank* o blanco, y de los estándares de la A-G (ver 3.2). A partir de la misma, se pudieron obtener las concentraciones de grupos SH. El grado de tiolación se calculó haciendo la división de la concentración (C) de SH entre la de grupos COOH provenientes de las unidades de repetición del HA introducido originalmente ( $\frac{C_{SH}}{C_{COOH\_HA}}$ ). Nótese que el resultado del cociente sería 1 si todos los grupos carboxilo del HA hubieran sido funcionalizados con la CSA.

Se pudo concluir que las muestras tenían un grado de tiolación mayor cuanto mayor era la concentración de HA en la disolución inicial preparada, teniendo mayor cantidad la muestra de HA 0.5%, como se observa en la Tabla 2. Estos resultados obtenidos a partir de los cálculos eran coherentes con lo que se observó experimentalmente, debido a que cuanto mayor fuera el grado de SH presente en las muestras, más amarillas serían las muestras porque tendrían un mayor número de SH que reaccionaran con DTNB.

**TABLA 2. RESULTADOS DEL GRADO DE TIOLACIÓN DE LAS MUESTRAS DE HA-SH TRAS 24 HORAS DE REACCIÓN**

<b>Muestras</b>	<b>Grado de tiolación</b>
HA 0.1%	<b>6.48%</b>
HA 0.25%	<b>10.30%</b>
HA 0.5%	<b>18.17%</b>

Se observó que la muestra de HA 0.1% era menos amarilla, la del HA 0.25% era de un color amarillo neutro y la muestra de HA 0.5% era amarillo más intenso. También se observó que el medio de diálisis tenía un color transparente y que por tanto no tenía SH (Figura 26).

Se realizó también un experimento de HA-SH reaccionando 48 horas y calculando el grado de tiolación para ver si este aumentaba al aumentar el tiempo de reacción. Los resultados obtenidos de este experimento fueron los que se muestran en la Tabla 3. Como se puede observar, la muestra HA 0.5% era la que mayor grado de tiolación contenía, pero con una diferencia sutil entre la reacción de 24 y 48 horas. El hecho de que el valor a 48 horas saliera más bajo que el de 24 horas, era porque la técnica también tenía un error asociado, y 18.17% y 15.45% se podían interpretar como "prácticamente el mismo valor". Por tanto, se seleccionó la síntesis de 24 horas (por ser más eficiente experimentalmente) y la concentración HA 0.5% (óptima) para las siguientes síntesis.

**TABLA 3. RESULTADOS DEL GRADO DE TIOLACIÓN DE LAS MUESTRAS DE HA-SH TRAS 48 HORAS DE REACCIÓN**

<b>Muestras</b>	<b>Grado de tiolación</b>
HA 0.1%	<b>6.12%</b>
HA 0.25%	<b>11.30%</b>
HA 0.5%	<b>15.45%</b>



Cabe destacar, que en el experimento realizado por Bian [33] con condiciones muy similares a las de este trabajo (mismas proporciones de HA/NHS/EDC/CSA), se obtuvo un mayor grado de tiolación (~ 50%). La diferencia con respecto a los resultados obtenidos en este trabajo es que aquí se emplearon pesos moleculares de HA mayores que los que usaba Bian y este factor pudo afectar incrementando la viscosidad de la mezcla y por tanto que la reacción fuera menos efectiva.

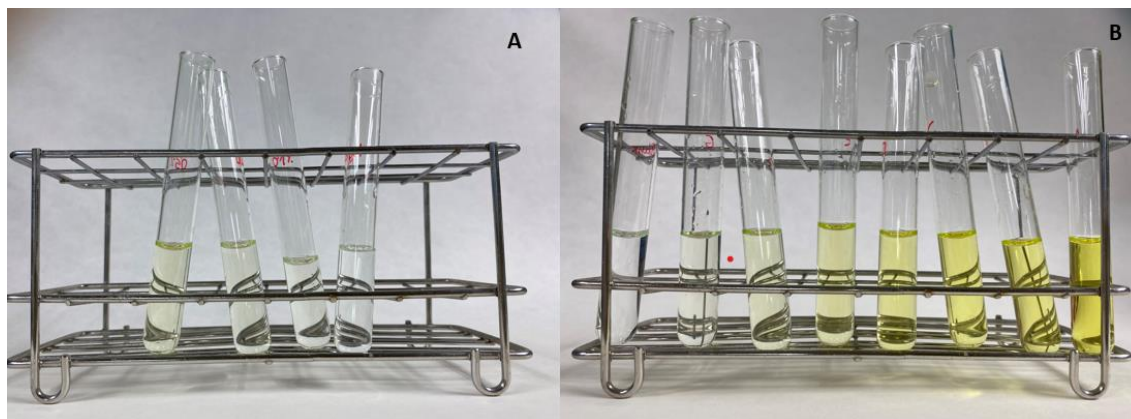


FIGURA 26. EN LA IMAGEN A SE OBSERVAN LAS MUESTRAS DE COLOR AMARILLO GRADUALMENTE, SIENDO EL TUBO DE LA IZQUIERDA LA MUESTRA DE HA 0.5%, EL SIGUIENTE TUBO EL 0.25%, EL TERCER TUBO EL HA 0.1% Y EL TUBO DE LA IZQUIERDA EL MEDIO DE DIÁLISIS. EN LA IMAGEN B SE OBSERVA LA RECTA PATRÓN, SIENDO EL TUBO DE LA IZQUIERDA EL BLANCO Y EL TUBO DE LA DERECHA EL ESTÁNDAR A.

El reactivo de Ellman o DTNB tiene puentes de disulfuro que consecuentemente pueden verse afectados tanto por las sales (NaCl 0.1 M) como por el pH, de forma que se rompan y den señal en el espectrofotómetro. Por ende, se realizó la prueba de la determinación de la influencia del pH añadiendo agua a distintos pH durante el método Ellman y se obtuvo que el pH no afectaba a las medidas porque todas las muestras que se estaban analizando tenían una señal de entre 0.03-0.05, que significa que no había casi absorbancia o señal.

#### 4.1.3 Comprobación gravimétrica de la funcionalización

Se comprobó que la funcionalización había sido correcta comparando, una vez las muestras ya estaban liofilizadas, el peso inicial de las que únicamente contenían HA (sin modificar) y las muestras HA-SH (modificadas). Se pesaron las muestras ya liofilizadas porque no es hasta que se realizó este paso hasta que la sustancia dejó de ser líquida (Figura 27).

Para las muestras de HA-SH, se obtuvo una masa más elevada del HA modificado respecto de la masa inicial de HA que se añadió para realizar la síntesis, por lo que se llegó a la conclusión de que efectivamente era debido al peso adicional de la funcionalización por CSA, si bien también cabe contar con un ligero incremento de las posibles trazas de sales que no pudieron difundir durante la diálisis y quedaron como parte de la muestra liofilizada.



FIGURA 27. APARIENCIA DE LAS MUESTRAS TRAS LA LIOFILIZACIÓN, SIENDO EN ESTE CASO LA MUESTRA DEL HA 0.5%.

#### 4.2 Determinación de la concentración óptima de CS con FCA

Para poder determinar esta concentración, se empleó la técnica de la fluorescamina realizando el montaje experimental que muestra la Figura 28, que variaba en función de las muestras que se querían caracterizar. Previamente, se tuvo que usar un agitador vórtex para que las muestras se disolvieran mejor, como era muy difícil, se provocó que la muestra que era muy viscosa quedara en la parte de abajo del Eppendorf® y usar la parte más líquida que estaba en la superficie (sobrenadante) para colocar las muestras en los pocillos. Inicialmente se pudo apreciar que, a más concentración de CS, peor se disolvían las muestras. Tras forzar la disolución, el HA-g-CS que más contenido de CS tenía, era la muestra más fácil de manejar.

Finalmente, tras realizar la prueba empleando el espectrofotómetro lector de placas Victor<sup>3</sup>, se obtuvo que la muestra con mayor grado de injerto de CS y por tanto la que tenía la concentración óptima era la HA-g-CS que tenía un ratio 1:50 ya que con menos cantidad que la del 1:15, tenía casi la misma señal. Esto último es debido a que parecía que la muestra con mayor concentración de CS no aceptaba más (estaba saturada). Es decir, que había una concentración límite a partir de la cual, el CS no reaccionaba más con los carboxilos del HA.

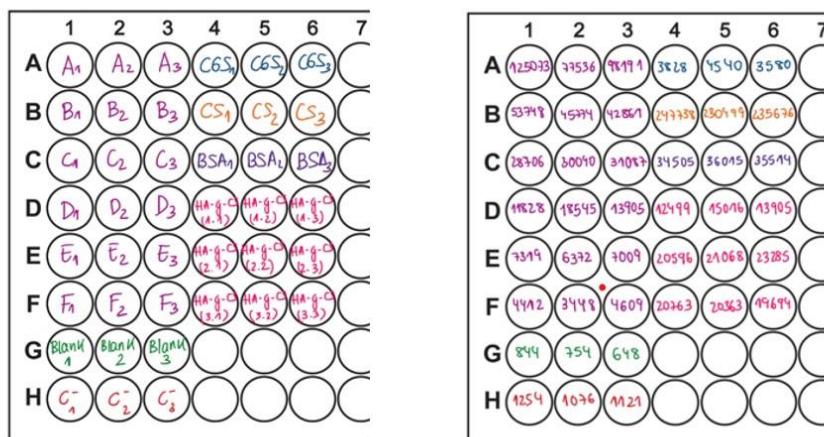


FIGURA 28. MONTAJE EXPERIMENTAL EN LA PLACA DE 96 POCILLOS PARA DETERMINAR EL GRADO DE INJERTO DE CS. EN LA IMAGEN DE LA IZQUIERDA SE MUESTRA LA RECTA PATRÓN (A-F), EL CONTROL NEGATIVO (C-), EL

CONTROL POSITIVO (BSA), EL BLANCO Y LAS MUESTRAS A DETERMINAR. EN LA IMAGEN DE LA DERECHA SE PUEDEN OBSERVAR LOS VALORES DE LA FLUORESCAMINA OBTENIDOS DE CADA UNO DE LOS POCILLOS.

### 4.3 Análisis de las muestras SH-HA-g-CS

Tras realizar la síntesis de SH-HA-g-CS 24/48 (1) y SH-HA-g-CS 48/48 (2), cabe destacar que la primera muestra inicialmente era muy viscosa (incluso con apariencia de gel), pero después de la diálisis, esta pasó a tener una composición más líquida (Figura 29). Este fenómeno pudo ser debido al elevado grado de injerto de CS inicialmente en la muestra 1, que al tener un alto peso molecular pudo elevar la viscosidad. Al dializarse, parte del mismo pudo pasar al medio de diálisis disminuyendo así la viscosidad. En cuanto a la muestra 2, es coherente que inicialmente tuviera menos viscosidad por tener menos grado de injerto de CS.

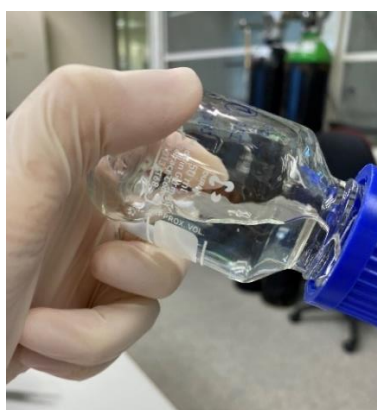


FIGURA 29. EN ESTA IMAGEN SE VE LA MUESTRA 1 MUY VISCOSA PREVIA A LA DIÁLISIS.

#### 4.3.1 Determinación del grado de injerto de CS de las muestras SH-HA-g-CS

Se llevó a cabo la prueba de la fluorescamina a las muestras SH-HA-g-CS sintetizadas de diferente forma para determinar cuál de ellas contenía una concentración mayor de aminas primarias, y por tanto de grado de injerto de CS. El resultado teórico esperado era que la muestra 1 presentara un mayor injerto que la 2 como consecuencia de que durante la síntesis no hubiera habido tanta competencia entre el CS y el CSA. A pesar de este razonamiento previo, se obtuvo que la muestra 2 tenía mayor concentración de CS injertado que la muestra 1. Este resultado pudo ser debido a que la elevada viscosidad de las muestras no permitía la distribución homogénea de la FCA, dificultando así la interacción con los grupos funcionales con los que reaccionaba. Como se ha mencionado en el apartado 4.3, la muestra 2 tras la diálisis era más viscosa que la 1, y por tanto presentó una mayor desviación en la lectura de aminas primarias (Tabla 4). Para determinar si la técnica de FCA era correcta, se calculó el número de cadenas modificadas de CS a partir de la masa del mismo añadida y se obtuvo que la muestra SH-HA-g-CS 24/48 tenía un 41% de aminas primarias (no injertadas) y que la muestra SH-HA-g-CS 48/48 tenía un 61%. Este resultado fue coherente ya que la muestra SH-HA-g-CS 24/48 tenía menos grado de tiolación que la muestra SH-HA-g-CS 48/48 (ver Tabla 6) y por tanto más grupos carboxilos libres para que se produjera injerto de CS.

TABLA 4. CONCENTRACIÓN DE AMINAS PRIMARIAS O GRADO DE INJERTO DE CS DE LAS MUESTRAS SH-HA-G-CS

Muestra	C <sub>PA</sub> (mM)	Desviación
SH-HA-g-CS 1	0.1232	0.018
SH-HA-g-CS 2	0.1789	0.086

Por último, se calculó el grado de injerto real para la técnica de FCA de CS de ambas muestras comparando las aminas injertadas de CS con los grupos COOH del HA y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 5). Se pudo concluir que la muestra SH-HA-g-CS 24/48 tenía mayor grado de injerto de CS que la SH-HA-g-CS 48/48.

**TABLA 5. GRADO DE INJERTO DE LAS MUESTRAS SH-HA-G-CS**

<b>Muestra</b>	<b>Grado de injerto</b>
<b>SH-HA-g-CS 1</b>	<b>8%</b>
<b>SH-HA-g-CS 2</b>	<b>5%</b>

#### 4.3.2 Determinación del grado de tiolación de las muestras SH-HA-g-CS

Así mismo, se realizó una determinación del grado de tiolación mediante la técnica de Ellman de ambas síntesis. Como el peso molecular de la CSA (113.61 g/mol) es muy inferior al de CS (20 kDa-50 kDa [41]), se sabe que reacciona antes que este último. Acorde con este conocimiento, el resultado obtenido fue que la muestra de HA-g-CS 2 tenía un mayor grado de tiolación que la 1 (Tabla 6), por haber estado la CSA reaccionando y compitiendo con CS desde el inicio de la síntesis aumentando así la viscosidad final del mismo.

Cabe destacar que los resultados de tiolación de las muestras son muy elevados respecto al 15% que encontrábamos al emplear Ellman con las muestras HA-SH (ver 4.1.2). Parece que el CS, pese a no tener grupos COOH como el HA, favorece sinérgicamente la reacción de sustitución del NHS por el CSA mucho más que cuando están sin el CS (Tabla 6).

**TABLA 6. GRADO DE TIOLACIÓN DE LAS MUESTRAS SH-HA-G-CS**

<b>Muestras</b>	<b>Grado de tiolación</b>
<b>SH-HA-g-CS 1</b>	<b>35.14%</b>
<b>SH-HA-g-CS 2</b>	<b>55.98%</b>

## 4.4 Obtención y determinación de las propiedades viscoelásticas

### 4.4.1 Concentración de oxígeno disuelto en el agua

Los resultados del empleo del kit fueron los que se muestra en la Tabla 7, ordenados de menor a mayor concentración de O<sub>2</sub> disuelto. Los resultados obtenidos fueron coherentes respecto a lo que se esperaba.

**TABLA 7. CONCENTRACIÓN DE O<sub>2</sub> DISUELTO EN LAS DIFERENTES AGUAS EMPLEADAS PARA DETERMINAR LAS PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS Y EL TIEMPO DE REFUERZO DE LOS HIDROGELES.**

<b>Agua</b>	<b>Concentración de O<sub>2</sub> disuelto</b>
<b>Milli-Q</b>	<b>2.45 mg/L</b>
<b>Destilada</b>	<b>7 mg/L</b>
<b>Oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	<b>47.7 mg/L</b>

Finalmente, se concluyó que si se controlaba la cantidad de  $O_2$  que tenía el agua se controlaba de forma más precisa el momento de gelificación.

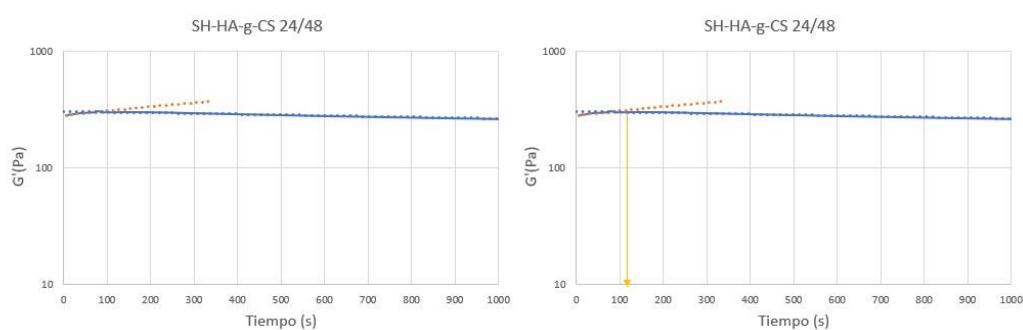
#### 4.4.2 Caracterización de las propiedades viscoelásticas

El objetivo era determinar el punto de gelificación las muestras SH-HA-g-CS de 24/48 y SH-HA-g-CS de 48/48 liofilizadas con la concentración óptima tanto de HA como de CS. Tras realizar el ensayo reométrico, se pudo observar que los hidrogeles ya habían gelificado previamente a la hidratación con las aguas con diferentes concentraciones de  $O_2$  disuelto en el proceso de la liofilización, y que por tanto no se podía obtener ese tiempo o punto de gelificación. Se llegó a esta conclusión debido a que la información obtenida indicó que el módulo de almacenamiento  $G'$ , era mayor que el módulo de pérdida  $G''$  en todas las muestras desde el inicio del ensayo.

Además, el módulo  $G'$  era creciente, indicando que se estaba reforzando la parte elástica y por tanto aumentando el número de entrecruzamientos mientras que el módulo  $G''$ , se mantuvo constante ya que el peso molecular de las muestras, como era de esperar, ni aumentó ni disminuyó. Por ende, se llegó a la conclusión de que se podía calcular el punto de refuerzo, en lugar del punto de gel, para dar cuenta de las diferencias con las diferentes aguas.

Como el módulo  $G'$  fue superior al  $G''$ , se analizaron sus datos para calcular el tiempo de refuerzo. Se denominó tiempo de refuerzo o estabilidad al punto donde el hidrogel previamente formado (de composición blanda) pasó a tener una composición más rígida por el aumento del número de entrecruzamientos y se calculó mediante el análisis de las pendientes del módulo  $G'$  (Figura 30). Si en su lugar se hubiera visualizado el punto de gel, el módulo  $G'$  inicialmente hubiera tenido valores menores que los del módulo  $G''$  hasta llegar a superarlo, cruzándose con este. Ese punto de cruce es donde se hubiera producido la gelificación.

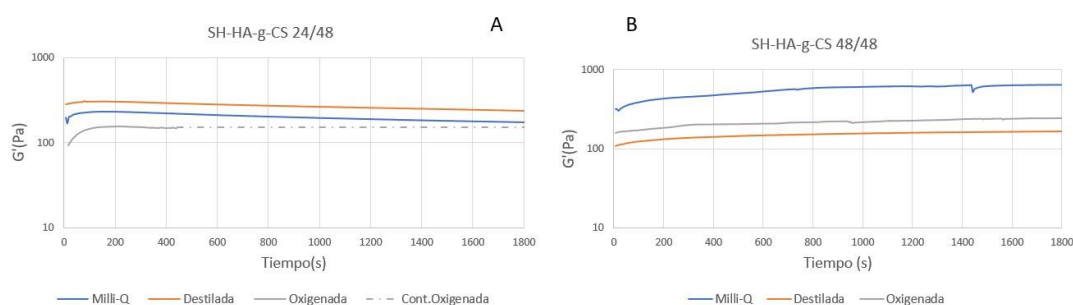
En la Figura 30 se observa un ejemplo de la obtención del punto de refuerzo de la muestra SH-HA-g-CS 24/48 con agua destilada, por ser la que menos tiempo tardó. Los tiempos de refuerzo del resto de las muestras con las distintas aguas se calcularon del mismo modo y sus resultados se muestran en la Tabla 8.



**FIGURA 30.** EN EL GRÁFICO A SE OBSERVAN LOS DATOS DEL REÓMETRO DE LA MUESTRA SH-HA-G-CS HIDRATADA CON AGUA DESTILADA. EN EL GRÁFICO B SE OBSERVA EL CÁLCULO DEL TIEMPO DE REFUERZO, DONDE APARECE UNA FLECHA DE COLOR AMARILLA (113.36 s) DEL PUNTO DE ESTABILIZACIÓN ENTRE LAS LÍNEAS NARANJA Y AZUL.

Se hizo una gráfica comparativa de las 2 muestras por separado, cada una hidratada con las 3 aguas para observar el comportamiento temporal del módulo  $G'$  (Figura 31). Como era de esperar, una vez alcanzado el punto de refuerzo, la línea se estabilizó porque las muestras no podían entrecruzarse más, es decir, ya estaban formados los hidrogeles completamente. En la gráfica A de la Figura 31 se observa una nueva serie llamada "Cont.Oxigenada" refiriéndose a

que es la serie que continúa con los datos de la oxigenada porque por errores experimentales, este ensayo no registró las muestras hasta completar los 1800 segundos. Se pudo añadir porque se conoce que las muestras una vez pasado el tiempo de refuerzo se mantienen estables.



**FIGURA 31. EN EL GRÁFICO A SE OBSERVA EL COMPORTAMIENTO DE  $G'$  EN LA MUESTRA SH-HA-g-CS 24/48 CON LAS 3 AGUAS Y EN EL GRÁFICO B SE OBSERVA LO MISMO PERO DE LA MUESTRA SH-HA-g-CS 48/48.**

Los tiempos de refuerzo de la muestra SH-HA-g-CS 24/48 son del orden 5-10 veces inferiores a los de la muestra SH-HA-g-CS 48/48 (Tabla 8). Este resultado podía ser debido a que la primera muestra ya tenía casi todos los puentes de disulfuro formados al iniciar el registro experimental y por tanto al añadir el  $O_2$  únicamente tenía que formar los pocos que le quedaba, o porque inicialmente partía de muchos menos puentes de disulfuro que la muestra 2 (tenía menos grado de tiolación), y por tanto tardó menos tiempo en formarlos.

**TABLA 8. TIEMPOS DE REFUERZO DE LAS DOS MUESTRAS SH-HA-g-CS TRAS HIDRATARLAS CON LAS DIFERENTES AGUAS.**

Muestras	Agua	Tiempo (s)
SH-HA-g-CS 24/48	Milli-Q	121.86
	Destilada	113.36
	Oxigenada	152.52
SH-HA-g-CS 48/48	Milli-Q	1358.57
	Destilada	798.5
	Oxigenada	524.67

Aunque el resultado obtenido de la muestra 2 era el esperado ( $t_{\text{Milli-Q}} > t_{\text{Destilada}} > t_{\text{Oxigenada}}$ ) ya que el agua oxigenada tiene mayor concentración de oxígeno que la destilada, y esta de la milli-Q, y por tanto debe producir el entrecruzamiento de forma más rápida, la diferencia temporal entre las diferentes aguas de la muestra 1 fue tan pequeña que era casi insignificante.

## 5. Conclusiones

El aumento de la incidencia de la OA a nivel mundial y la escasa presencia de productos efectivos para tratarla, ha provocado un interés en el desarrollo de productos o dispositivos clínicos y comerciales más innovadores y eficaces.

Este Trabajo de Fin de Grado busca poner una solución a la situación actual desarrollando un tratamiento innovador basado en la inyección intraarticular, de forma que tenga un efecto tanto condroprotector como viscosuplementador y que permita una mejor dosificación del fármaco. De esta forma se satisface tanto las necesidades de los pacientes como la tendencia comercial, ya que para desarrollarlo, se siguen dos de las estrategias de tratamiento más competentes.

Se emplea una ruta química sencilla y que no requiere la presencia de proteínas, produciendo un producto libre de posibles complicaciones como respuesta a cuerpo extraño. Esto es debido a que se trata de imitar estructuras basadas en los GAG presentes de forma natural en la MEC.

En este trabajo se ha obtenido que la concentración óptima de HA para la creación del hidrogel SH-HA-g-CS es del 0.5%. También se ha conseguido obtener el tiempo óptimo de síntesis de este, que es de 24 horas, mediante la técnica de espectrofotometría y empleando el método de Ellman. A su vez, se ha conseguido determinar la concentración que permite un mayor grado de injerto de CS en el HA, que es del ratio 1:50 (CS:Carboxilo) a partir de lecturas de fluorescencia empleando la técnica de la fluorescamina. Pese a que se habían obtenido hallazgos similares de manera independiente, con HA de masa molar más reducida, vinculando CS a macromoléculas sintéticas o generando proteoglicanos sintéticos con presencia de gelatina u otras moléculas de origen proteico como agente de mediación, es la primera vez que se consiguen los objetivos que se planteaban en el trabajo en una única estrategia.

Así mismo, se ha podido calcular el grado de injerto de las muestras SH-HA-g-CS obteniendo que la muestra SH-HA-g-CS 24/48 tenía mayor grado de injerto de CS que la muestra SH-HA-g-CS 48/48. A pesar de este resultado, la muestra SH-HA-g-CS 48/48 tenía un mayor grado de tiolación y una pequeña diferencia de grado de injerto con la muestra SH-HA-g-CS 24/48, por tanto, se considera que es mejor estrategia.

Por último, se ha podido analizar las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles SH-HA-g-CS con una concentración óptima tanto de CS como de HA haciendo uso del reómetro. Entre otras propiedades, se pudo visualizar el tiempo de refuerzo del entrecruzamiento de los hidrogeles al hidratarse con agua con distintas concentraciones de  $O_2$  disuelto. De forma que se obtuvo que la muestra 1 lo alcanzaba antes que la muestra 2 por tener menos grado de tiolación.

Las dos moléculas (CSA y CS) parecen actuar de manera simbiótica de cara a mejorar el grado de tiolación de los geles, lo que provocará un incremento en las propiedades finales del gel con respecto al HA-SH sin CS.

A pesar de haber caracterizado y determinado el grado de injerto mediante la técnica de la fluorescamina, hay ciertas dudas sobre la precisión de este procedimiento. Otro método para poder determinarlo o verificar los resultados sería emplear el método Blyscan, que es un ensayo basado en azul de dimetilmetileno (DMMB) para el análisis cuantitativo de GAG sulfatados [19].

## 6. Trabajo en proceso y futuro

El HA es un mucopolisacárido que se usa mucho en la clínica actual tanto como para tratamientos estéticos como tratar para enfermedades del cartílago. También se emplea en muchas líneas de investigación ya que es una sustancia presente de forma natural en el organismo y con la que se puede crear hidrogeles mediante químicas sencillas.

El proyecto de investigación científica en el que está basado este Trabajo de Fin de Grado tiene una duración total de 2 años. Este trabajo se ha centrado en obtener el hidrogel de HA modificado con CS injertado para poder determinar sus propiedades viscoelásticas, es decir, la parte coloreada en rosa del cronograma de la Figura 32.

En este TFG se ha cumplido parte de los objetivos del proyecto dentro de la duración considerada, así pues, para completar los objetivos restantes del proyecto principal se van a realizar experimentos tales como:

- 1) Optimizar la lectura mediante FCA de las muestras HA-g-CS.
- 2) Optimización de la caracterización de las propiedades viscoelásticas, intentando prevenir que la transición sol-gel se produzca antes que la rehidratación de los geles liofilizados.
- 3) Analizar las macromoléculas de injerto mediante Microscopía de Fuerza Atómica para ver si tienen la apariencia de cepillo de botella esperada.
- 4) Realizar un análisis mediante resonancia magnética de protones (RMN-H<sup>1</sup>) para determinar la estructura precisa del SH-HA-g-CS.
- 5) Validar el efecto de los hidrogeles en condiciones *in vitro* sobre los condrocitos primarios de humano, con respecto a la viabilidad, citotoxicidad, la proliferación y la expresión de genes asociados a la síntesis de MEC.

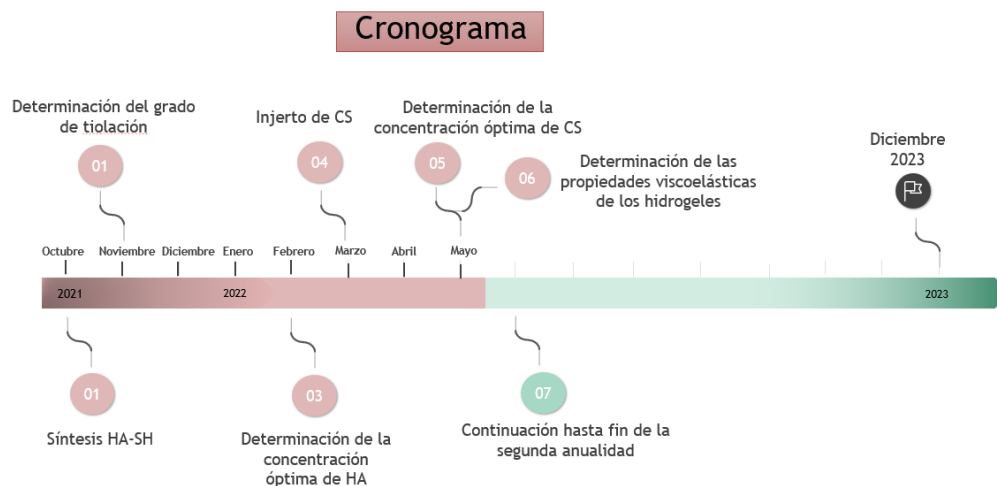


FIGURA 32. CRONOGRAMA DEL PROYECTO



## 7. Bibliografía

- [1] E. Batle Gualda, «Concepto y clasificación de las enfermedades reumáticas», en *Manual SER de enfermedades reumáticas*, M. Alperi López, A. Balsa Criado, R. Blanco, B. Hernández, J. Medina Luezas, S. Muñoz, J. Román Ivorra, y J. Nolla, Eds. Barcelona: Elsevier, 2014, pp. 3-6.
- [2] S. Vinaccia, S. Tobón, E. Moreno, S. Pedro, J. Cadena, y J. M. Anaya, «Evaluación de la calidad de vida en pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide», 2005.
- [3] S. L. James *et al.*, «Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017», *Lancet*, vol. 392, n.º 10159, pp. 1789-1858, nov. 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7.
- [4] U. S. Cartas y S. J. C. Bejarano, «Comorbilidades y calidad de vida en Osteoartritis Comorbidities and quality of life in Osteoarthritis», *Rev. Cuba. Reumatol.*, pp. 1-14, 2018, doi: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.1188918>.
- [5] C. G. Boer *et al.*, «Deciphering osteoarthritis genetics across 826,690 individuals from 9 populations», *Cell*, vol. 184, n.º 18, pp. 4784-4818.e17, 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.07.038.
- [6] O. Bruyère *et al.*, «An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO)», *Semin. Arthritis Rheum.*, vol. 49, n.º 3, pp. 337-350, 2019, doi: 10.1016/j.semarthrit.2019.04.008.
- [7] «WHO Rehabilitation Need Estimator | Viz Hub». <https://vizhub.healthdata.org/rehabilitation/>
- [8] S. Mendoza-Castaño, M. Noa-Puig, R. Más-Ferreriro, y M. Valle-Clara, «Osteoartritis . Fisiopatología y tratamiento Redalyc Sistema de Información Científica Centro Nacional de Investigaciones Científicas», *Rev. CENIC Ciencias Biológicas*, vol. 42, n.º mayo-agosto 2011, pp. 81-88, 2011.
- [9] «AINE y morbilidad». <https://www.dolorenap.com/wp-content/uploads/2018/09/AINE-y-morbilidad-.pdf> (accedido 23 de enero de 2022).
- [10] F. Del y C. Articular, «Fisiología del condrocito articular», *Rev. Colomb. Reumatol.*, vol. 15, n.º 1, pp. 21-33, 2008.
- [11] «Osteoartritis de rodilla». <https://orthoinfo.aaos.org/es/diseases--conditions/osteoartritis-de-rodilla-knee-osteoarthritis/> (accedido 3 de enero de 2022).
- [12] R. J. Williams Iii, L. Peterson, y B. J. Cole, *Cartilage Repair Strategies Library of Congress Cataloging in Publication Data*, vol. 4. 2007.
- [13] A. R. Poole, T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, y S. Lavery, «Composition and structure of articular cartilage: A template for tissue repair», *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 391, n.º SUPPL., 2001, doi: 10.1097/00003086-200110001-00004.
- [14] V. Álvarez, F. Monjil, y V. Soto, «Bioquímica y biología del cartílago articular», pp. 391-400, 2002.
- [15] L. Alba, S. Arenas, y C. Barrios De Zurbarán, «La matriz extracelular: El ecosistema de la célula».

- [16] F. Campos, «El cartilago articular : aspectos mecánicos y su repercusión en la reparación tisular», pp. 380-390, 2002.
- [17] O. Garcia-suarez, «Cartilago Articular : Estado Actual Del Problema», n.º December 2015, pp. 1-8, 2002.
- [18] John R. Couchman and Csilla A. Patak, «An Introduction to Proteoglycans and Their Localization», doi: 10.1369/0022155412464638.
- [19] K. Prudnikova *et al.*, «Aggrecan-like biomimetic proteoglycans (BPGs) composed of natural chondroitin sulfate bristles grafted onto a poly(acrylic acid) core for molecular engineering of the extracellular matrix», *Acta Biomater.*, vol. 75, pp. 93-104, 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.05.013.
- [20] T. Mikami y H. Kitagawa, «Biosynthesis and function of chondroitin sulfate», *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1830, n.º 10, pp. 4719-4733, oct. 2013, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.06.006.
- [21] D. O. y A. G. G. Francisco Abad Santos, «Actualización de la eficacia de condroitín sulfato y sulfato de glucosamina en el tratamiento de la artrosis», *ActuAlidA de n FArmAcoLogíA y tERApéuTicA*, vol. Volumen 9, n.º n.º 2, pp. 97-108, 2011.
- [22] L. Tío *et al.*, «Efecto del condroitín sulfato en la sinovitis de pacientes con artrosis de rodilla», *Med. Clin. (Barc.)*, vol. 149, n.º 1, pp. 9-16, 2017, doi: 10.1016/j.medcli.2016.12.045.
- [23] C. Gabay, C. Medinger-Sadowski, D. Gascon, F. Kolo, y A. Finckh, «Symptomatic Effects of Chondroitin 4 and Chondroitin 6 Sulfate on Hand Osteoarthritis A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial at a Single Center», *ARTHRITIS Rheum.*, vol. 63, n.º 11, pp. 3383-3391, 2011, doi: 10.1002/art.30574.
- [24] M. Bernad Pineda, «Current Status of Symptomatic Slow-acting Drugs for Osteoarthritis (SYSADOAs) in Spain», *Reumatol. Clínica (English Ed.)*, vol. 12, n.º 4, pp. 181-183, jul. 2016, doi: 10.1016/J.REUMAE.2016.06.001.
- [25] S. L. Kolasinski *et al.*, «Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee», *Arthritis Rheumatol.*, vol. 72, n.º 2, pp. 220-233, 2020, doi: 10.1002/art.41142.
- [26] J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, y J. Kolar, «Hyaluronic acid (hyaluronan): A review», *Vet. Med. (Praha)*, vol. 53, n.º 8, pp. 397-411, 2008, doi: 10.17221/1930-VETMED.
- [27] D. BARON, C. FLIN, J. PORTERIE, J. DESPAUX, y P. VINCENT, «Inyección Intraarticular Única de Ácido Hialurónico en la Artrosis de Rodilla: Estudio Multicéntrico Prospectivo Abierto (ART-ONE 75) mediante Comparación Post-Hoc con Placebo», *Curr. Ther. Res. - Clin. Exp.*, vol. 90, pp. 69-83, ene. 2019, doi: 10.1016/J.CURTHERES.2019.04.002.
- [28] N. Mestorino *et al.*, «Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory», *Front. Vet. Sci.*, vol. 6, p. 192, 2019, doi: 10.3389/fvets.2019.00192.
- [29] G. Sara y M. S. González, «Eficacia del ácido hialurónico en el tratamiento de las enfermedades articulares», *scielo*, vol. 20, n.º 3, 2018.
- [30] W. Puhl *et al.*, «Intra-articular sodium hyaluronate in osteoarthritis of the knee: a multicenter, double-blind study», *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 1, n.º 4, pp. 233-241, 1993, doi: 10.1016/S1063-4584(05)80329-2.
- [31] T. E. Clegg, D. Caborn, y C. Mauffrey, «Viscosupplementation with hyaluronic acid in the treatment for cartilage lesions: A review of current evidence and future directions», *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.*, vol. 23, n.º 2, pp. 119-124, 2013, doi: 10.1007/s00590-

012-0940-0.

- [32] C. Salgado, O. Jordan, y E. Allémann, «Osteoarthritis in vitro models: Applications and implications in development of intra-articular drug delivery systems», *Pharmaceutics*, vol. 13, n.º 1, pp. 1-23, 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13010060.
- [33] S. Bian *et al.*, «The self-crosslinking smart hyaluronic acid hydrogels as injectable three-dimensional scaffolds for cells culture», *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 140, pp. 392-402, 2016, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.01.008.
- [34] A. S. Hughes y M. Reeves, «Biosensing on the End of an Optical Fiber Dissertation directed by», n.º May 2011, 2015.
- [35] J. Bart, R. Tiggelaar, M. Yang, S. Schlautmann, H. Zuilhof, y H. Gardeniers, «Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices», *Lab Chip*, vol. 9, n.º 24, pp. 3481-3488, 2009, doi: 10.1039/b914270c.
- [36] J. de la C. Ausina, «Proyecto de gestión y desarrollo de un producto sanitario inyectable basado en ácido hialurónico para el tratamiento de la osteoartritis mediante la liberación de condroitín sulfato», *UPV*, pp. 1-164, 2019.
- [37] M. Besouw, R. Masereeuw, L. Van Den Heuvel, y E. Levtchenko, «Cysteamine: An old drug with new potential», *Drug Discov. Today*, vol. 18, n.º 15-16, pp. 785-792, 2013, doi: 10.1016/j.drudis.2013.02.003.
- [38] B. Cornils, «Collman's reagent», *Catal. from A to Z*, vol. 0747, n.º 22582, 2020, doi: 10.1002/9783527809080.cataz03843.
- [39] M. Chakir y F. Orlando, «2-Determinación experimental de los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) y de las secciones eficaces de absorción ( $\sigma$ ) UV de una serie de vinil éteres en distintas fases», pp. 17-56, 2003.
- [40] T. Fisher, «PROTOCOL NanoDrop 3300 Fluorescamine Protein Assay». <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Fluorescamine-protocol.pdf> (accedido 15 de mayo de 2022).
- [41] S. Sarkar, S. E. Lightfoot-Vidal, C. L. Schauer, E. Vresilovic, y M. Marcolongo, «Terminal-end functionalization of chondroitin sulfate for the synthesis of biomimetic proteoglycans», *Carbohydr. Polym.*, vol. 90, n.º 1, pp. 431-440, 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.05.062.
- [42] Thermo Fisher, «Fisher Scientific». <https://www.fishersci.es/shop/products/l-proline-99-13/10205490#?keyword=prolina> (accedido 15 de mayo de 2022).
- [43] P. Kumar, «Lyophilization: an Important Formulation Technique», *Int. J. Res. - GRANTHAALAYAH*, vol. 7, n.º 9, pp. 11-15, 2020, doi: 10.29121/granthaalayah.v7.i9.2019.552.
- [44] «Hanna Instruments». <https://www.hannainst.es/parametros/5368-test-kit-oxigeno-disuelto-00-a-100-mg-l-110-test.html> (accedido 6 de octubre de 2021).
- [45] E. Sanmartín-Masiá, «Síntesis y caracterización de hidrogeles inyectables inspirados en la matriz extracelular para la regeneración de tejidos blandos.», p. 115, 2016.

# DOCUMENTO II: PRESUPUESTO

## 1. Alcance y desarrollo del presupuesto

El presupuesto de este Trabajo de Fin de grado contiene los gastos de los materiales y realización de actividades del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT). También comprende aquellos relacionados con la seguridad, el seguimiento y el planteamiento del proyecto. Este, expresa lo que ha costado llevar a cabo la parte de la investigación que comprende el TFG.

El objetivo principal del cálculo es obtener el presupuesto de ejecución material ya que el presupuesto de ejecución por contrata considera los gastos generales, los cuales suponen un 13%, el beneficio industrial, el cual supone un 6%, y el presupuesto de ejecución del material. En los gastos generales se engloban conceptos como: equipamiento común electrónico pequeño como agitadores o balanzas, fungibles como cucharillas y viales y finalmente equipos de protección individual.

Para poder obtener el presupuesto base de licitación se ha de considerar todo lo anterior y el IVA, que supone un 21%.

El presupuesto de ejecución material está constituido por tres determinantes principales: los costes de la mano de obra de las personas responsables del trabajo y del alumno, los costes del material empleado en los diferentes procesos y de la maquinaria disponible en el laboratorio. El coste de la maquinaria se calcula considerando las horas que son empleadas por los operarios y se considera para todas las máquinas que el precio de amortización es de 10 años.

A continuación, se mostrarán cada uno de los cuadros de precios con sus gastos asociados. Se podrá identificar el gasto unitario, la cantidad empleada y el gasto total en la columna "Total", considerando que todos los precios se miden en su unidad de referencia, el euro.

### 1.1 Cuadro de precios por clase

En este punto, se muestran los cuadros de precios de la mano de obra, de la maquinaria y de los materiales. En cada uno de ellos se muestra el recurso empleado, la cantidad, el precio unitario y el precio total.

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Cantidad	Precio Unitario (€)	Precio total (€)
1	MO.1	Horas	Estudiante del grado ingeniería biomédica	325	10	3,250.00
2	MO.2	Horas	Tutor/a responsable del proyecto	161.5	40	6,460.00
<b>Precio total precio la mano de obra (€)</b>						<b>9,710.00</b>

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Cantidad	Precio Unitario (€)	Precio total (€)
1	MAT.01	g	Ácido hialurónico	1.62	31.00	50.22
2	MAT.02	g	Cisteamina	2.52	1.58	3.98
3	MAT.03	g	Condroitín sulfato	1.03	91.40	94.14
4	MAT.04	g	DNTB/ Reactor de Ellman	1.58	11.50	18.17
5	MAT.05	g	EDTA	0.07	0.04	0.00

6	MAT.06	g	Fluorescamina	0.18	0.96	0.18
7	MAT.07	m	Membrana de diálisis (35 kDa)	1.00	22.40	22.40
8	MAT.08	g	N-hidroxisuccinimida (NHS)	0.58	0.01	0.01
9	MAT.09	g	N-(3-dimetilaminopropil-N'-etilcarbodiimida (EDC)	1.16	0.05	0.06
10	MAT.10	g	Condroitin 6 sulfato (CS6)	0.29	69.20	20.24
11	MAT.11	g	Albúmina de suero bovino (BSA)	0.16	1.00	0.16
12	MAT.12	mL	Ácido clorídrico (HCl)	16.50	0.42	6.93
13	MAT.13	mL	Hidróxido de sodio (NaOH)	13.00	0.40	5.20
14	MAT.14	g	Cloruro de sodio (NaCl)	2.13	0.04	0.08
15	MAT.15	ud	Pinzas plástico	6.00	0.29	1.74
16	MAT.16	ud	Pipeta Pasteur	3.00	0.20	0.60
17	MAT.17	L	Agua miliQ	1.00	0.64	0.64
18	MAT.18	L	Agua destilada	10.50	0.20	2.10
19	MAT.19	ud	Kit de oxígeno disuelto (Hanna)	1.00	160.00	160.00
20	MAT.20	g	Tris (2-carboxietil) fosfina(TCEP)	0.14	236.55	33.02
21	MAT.21	ud	Tubos de ensayo	16.00	1.15	18.40
22	MAT.22	g	Reactivo de Ellman (DTNB)	0.80	3.06	2.45
23	MAT.23	g	N-Acetil-D-galactosamina	0.51	0.74	0.37
24	MAT.24	g	L-prolactina	5.19	1.21	6.28
25	MAT.25	g	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	0.11	0.38	0.04
26	MAT.26	ud	Accesorio plato reómetro	1.00	30.00	30.00
27	MAT.27	ud	Tiras reactivas	3.00	11.49	34.47
28	MAT.28	ud	Placa petri	12.00	3.38	40.56
29	MAT.29	ud	Plataforma para pesar	4.00	0.05	0.20
30	MAT.30	g	Glicina	0.14	0.22	0.03
31	MAT.31	g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.02	0.32	0.01
32	MAT.32	g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.02	1.90	0.04
33	MAT.33	L	Agua oxigenada	1.81	1.16	2.10
34	MAT.34	ud	Placa multipocillo p96 negra	3.00	3.10	9.30
35	MAT.35	ud	Punta pipeta 25 mL	10.00	0.47	4.70
36	MAT.36	ud	Punta micropipeta 100-1000 uL	32.00	0.03	0.96
37	MAT.37	ud	Punta micropipeta 2-200 uL	14.00	0.04	0.56
38	MAT.38	ud	Eppendorf 1,5 mL	15.00	0.07	1.05
39	MAT.39	ud	Tubos falcon 50 mL	3.00	0.12	0.36
40	MAT.40	ud	Espátula metálica laboratorio	2.00	3.99	7.98
41	MAT.41	ud	Espátula teflon laboratorio	1.00	1.99	1.99
42	MAT.42	ud	Frascos de vidrio Teqler 20 mL	11.00	2.24	24.64
43	MAT.43	m	Papel de aluminio	8.00	0.11	0.88

44	MAT.44	ud	Tamiz troquelar	1.00	5.50	5.50
45	MAT.45	ud	Bolsas zip	1.00	0.12	0.12
46	MAT.46	ud	Probeta 100 mL	2.00	4.36	8.72
47	MAT.47	ud	Tubos eppendorf 2 mL	5.00	0.08	0.38
48	MAT.48	ud	Parafilm	2.00	5.00	10.00
49	MAT.49	ud	Tubo de vidrio cilíndrico	1.00	10.00	10.00
<b>Total materiales (€)</b>						<b>621.96</b>

Nº	Código	Unidad	Descripción	Importe		
				Cantidad	Precio (€)	Precio total (€)
1	MAQ.01	Horas	Sistema de purificación de agua pura y ultrapura Direct-Q™ 3 de Merck Millipore	0.50	0.30	0.15
2	MAQ.02	Horas	Espectrofotómetro de masas Victor3 Perkin Elmer 8000	3.00	0.14	0.42
3	MAQ.03	Horas	Liofilizadora Cool vacuum	148.00	0.20	29.60
4	MAQ.04	Horas	Reómetro Discovery HR 20	10.00	0.52	5.20
5	MAQ.05	Horas	PH-metro de sobremesa PH50 marca Violab	17.00	0.23	3.91
6	MAQ.06	Horas	Espectrofotómetro Cary 60 uv-vis Agilent technologies	3.00	0.11	0.33
7	MAQ.07	Horas	Centrifugadora marca Eppendorf, modelo 5804R	0.50	3.63	1.81
<b>Total precio maquinaria (€)</b>						<b>41.42</b>

## 1.2 Cuadro de unidades de obra

En este apartado aparecen las unidades de obra que forman el presupuesto de forma descompuesta, por tanto, en cada una se determinan las diferentes actividades y se definen los recursos empleados con sus costes asociados. Finalmente, se obtiene los costes totales de cada unidad de obra y el presupuesto de ejecución del material.

Nº código	Descripción capítulo					
1. Tiolación de HA						
1.1	Química EDC/NHS	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Plataforma para pesar	3.50	ud	0.05	0.19	
	Agua Milli-Q	0.50	L	0.99	0.50	
	Ácido hialurónico	1.02	g	31.00	31.62	
	EDC	1.16	g	34.40	39.90	
	NHS	0.58	g	3.98	2.31	
	Cisteamina	2.51	g	1.58	3.97	
	Hidróxido de sodio (NaOH)	5.00	mL	0.40	2.00	
	Ácido clorídrico (HCl)	10.00	mL	0.42	4.20	
	Pipeta Pasteur	1.00	ud	0.20	0.20	
	pH-metro PH50 de Violab	15.00	Horas	0.23	3.45	
	Espátula teflón laboratorio	1.00	ud	1.99	1.99	
	Espátula metálica laboratorio	2.00	ud	3.99	7.98	
	Sistema de purificación de agua pura y ultrapura Direct-Q™ 3 de Merck Millipore	0.50	Horas	0.30	0.15	
	Frascos de vidrio Teqler 20 mL	5.00	ud	2.24	11.20	
	Bolsa Zip	1.00	ud	0.12	0.12	
	Probeta 100 mL	1.00	ud	4.36	4.36	
	Caja de guantes	0.50	Horas	0.01	0.01	
	Tutores responsables del proyecto	5.00	Horas	40.00	200.00	
	Estudiante de ing. Biomédica	7.00	Horas	10.00	70.00	
	Costes indirectos	3.00	%	384.14	11.52	
	Recursos auxiliares	3.00	%	395.66	11.87	



<b>Total del capítulo 1.1</b>						<b>407.53</b>
1.2	Diálisis	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Pinzas plástico	6.00	ud	0.29	1.74	
	Agua destilada	10.00	L	0.15	1.50	
	Cloruro de sodio (NaCl)	2.00	g	0.04	0.08	
	Membrana de diálisis (35 KDa)	1.00	m	22.40	22.40	
	Ácido clorídrico (HCl)	1.50	mL	0.42	0.63	
	Papel de aluminio	8.00	m	0.05	0.42	
	Cloruro de sodio (NaOH)	2.00	mL	0.40	0.80	
	Pipeta Pasteur	1.00	ud	0.20	0.20	
	pH-metro PH50 de Violab	2.00	Horas	0.23	0.46	
	Tutores responsables del proyecto	2.00	Horas	40.00	80.00	
	Estudiante de ing. Biomédica	2.00	Horas	10.00	20.00	
	Costes indirectos	3.00	%	28.23	0.85	
	Recursos auxiliares	3.00	%	28.23	0.85	
<b>Total del capítulo 1.2</b>						<b>129.92</b>
<b>2. Caracterización del grado de tiolación</b>						
2.1	Determinación de Ellman	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	DNTB	1.58	g	11.50	18.17	
	Tubos de ensayo	8.00	ud	1.15	9.20	
	Espectrofotómetro Cary 60 uv-vis Agilent technologies	1.00	Horas	0.11	0.11	
	Cisteamina	0.01	g	0.07	0.00	
	EDTA	0.07	g	0.20	0.01	
	Agua destilada	60.00	mL	0.15	9.00	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.02	g	0.32	0.01	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.02	g	1.90	0.04	
	Ácido clorídrico (HCl)	3.00	mL	0.42	1.26	
	Hidróxido de sodio (NaOH)	2.00	mL	0.40	0.80	
	Cloruro de sodio (NaCl)	0.13	g	0.04	0.01	

	Puntas micropipeta 2-200 uL	10.00	ud	0.04	0.40	
	Puntas micropipeta 100-1000 uL	10.00	ud	0.03	0.30	
	Punta pipeta 25 mL	10.00	ud	0.47	4.70	
	Eppendorf 1.5 mL	7.00	ud	0.07	0.49	
	Eppendorf 2 mL	7.00	ud	0.08	0.53	
	Tutores responsables del proyecto	3.50	Horas	40.00	140.00	
	Estudiante de ing. Biomédica	4.00	Horas	10.00	40.00	
	Costes indirectos	3.00	%	225.02	6.75	
	Recursos auxiliares	3.00	%	231.77	6.95	
<b>Total del capítulo 2.1</b>						<b>238.72</b>
<b>3. Liofilización</b>						
<b>3.1</b>	<b>Liofilización</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>	<b>Precio por unidad (€/ud)</b>	<b>Precio parcial (€)</b>	<b>Precio total (€)</b>
	Placa petri	4.00	Horas	3.38	13.52	
	Liofilizadora	148.00	Horas	0.20	29.60	
	Hidróxido de sodio(NaOH)	4.00	mL	0.40	1.60	
	Parafilm	2.00	ud	10.00	20.00	
	Tubo de vidrio cilíndrico	1.00	ud	10.00	10.00	
	Tubos falcon 50 mL	3.00	ud	3.10	9.30	
	Tutores responsables del proyecto	0.50	Horas	40.00	20.00	
	Estudiante de ing. Biomédica	0.50	Horas	10.00	5.00	
	Costes indirectos	3.00	%	109.02	3.27	
	Recursos auxiliares	3.00	%	112.29	3.37	
<b>Total del capítulo 3.1</b>						<b>115.66</b>
<b>4. Caracterización de las muestras HA-CS</b>						
<b>4.1</b>	<b>Injerto de CS</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>	<b>Precio por unidad (€/ud)</b>	<b>Precio parcial (€)</b>	<b>Precio total (€)</b>
	Condroitín sulfato	0.93	g	91.40	84.55	
	Plataforma para pesar	3.50	ud	0.05	0.19	
	Agua Milli-Q	0.50	L	0.99	0.50	
	Ácido hialurónico	1.02	g	31.00	31.62	
	EDC	1.16	g	34.40	39.90	
	NHS	0.58	g	3.98	2.31	

	Hidróxido de sodio (NaOH)	5.00	mL	0.40	2.00	
	Ácido clorídrico (HCl)	10.00	mL	0.42	4.20	
	Pipeta Pasteur	1.00	ud	0.20	0.20	
	pH-metro PH50 de Violab	15.00	Horas	0.23	3.45	
	Espátula metálica laboratorio	2.00	ud	3.99	7.98	
	Frascos de vidrio Teqler 20 mL	5.00	ud	2.24	11.20	
	Probeta 100 mL	1.00	ud	4.36	4.36	
	Tutores responsables del proyecto	5.00	Horas	40.00	200.00	
	Estudiante de ing. Biomédica	7.00	Horas	10.00	70.00	
	Costes indirectos	3.00	%	377.90	11.34	
	Recursos auxiliares	3.00	%	389.24	11.68	
<b>Total del capítulo 4.1</b>						<b>485.46</b>
<b>4.2</b>	<b>Grado de injerto CS</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>	<b>Precio por unidad (€/ud)</b>	<b>Precio parcial (€)</b>	<b>Precio total (€)</b>
	Plataforma para pesar	1.00	Horas	0.05	0.05	
	Glicina	0.14	g	0.22	0.03	
	Fluorescamina	0.18	g	0.96	0.18	
	Condroitín sulfato	0.08	g	2.50	0.19	
	Condroitín 6 sulfato	0.29	g	0.46	0.13	
	L-prolactina	1.25	g	0.04	0.05	
	Espectrofotómetro de masas Victor3 Perkin Elmer 8000	1.00	Horas	0.14	0.14	
	Albúmina de suero bovino (BSA)	0.16	g	0.23	0.04	
	Na2B4O7	0.10	mL	0.42	0.04	
	Puntas micropipeta 100-1000 uL	20.00	ud	0.03	0.60	
	Puntas micropipeta 2-200 uL	15.00	ud	0.04	0.60	
	Eppendorf 1.5mL	8.00	ud	0.47	3.76	
	Frasco de vidrio Teqler 20 mL	1.00	ud	2.24	2.24	
	Placa multipocillo p96 negra	1.00	ud	0.79	0.79	

	N-Acetil-D-galactosamina	5.07	mg	0.74	3.75	
	Tutores responsables del proyecto	4.00	Horas	40.00	160.00	
	Estudiante de ing. Biomédica	4.00	Horas	10.00	40.00	
	Costes indirectos	3.00	%	212.59	6.38	
	Recursos auxiliares	3.00	%	218.96	6.57	
<b>Total del capítulo 4.2</b>						<b>225.53</b>
5. Obtención de las muestras SH-HA-g-CS						
5.1	Síntesis	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Plataforma para pesar	3.50	ud	0.05	0.19	
	Agua Milli-Q	0.50	L	0.99	0.50	
	Ácido hialurónico	1.02	g	31.00	31.62	
	EDC	1.16	g	34.40	39.90	
	NHS	0.58	g	3.98	2.31	
	Condroitín sulfato	0.93	g	91.40	84.55	
	Cisteamina	2.51	g	1.58	3.97	
	Hidróxido de sodio (NaOH)	5.00	mL	0.40	2.00	
	Ácido clorídrico (HCl)	10.00	mL	0.42	4.20	
	Pipeta Pasteur	1.00	ud	0.20	0.20	
	pH-metro PH50 de Violab	15.00	Horas	0.23	3.45	
	Espátula teflón laboratorio	1.00	ud	1.99	1.99	
	Espátula metálica laboratorio	2.00	ud	3.99	7.98	
	Sistema de purificación de agua pura y ultrapura Direct-Q™ 3 de Merck Millipore	0.50	Horas	0.30	0.15	
	Frascos de vidrio Teqler 20 mL	5.00	ud	2.24	11.20	
	Bolsa Zip	1.00	ud	0.12	0.12	
	Probeta 100 mL	1.00	ud	4.36	4.36	

	Tutores responsables del proyecto	5.00	Horas	40.00	200.00	
	Estudiante de ing. Biomédica	7.50	Horas	10.00	75.00	
	Costes indirectos	3.00	%	473.68	14.21	
	Recursos auxiliares	3.00	%	487.89	14.64	
<b>Total del capítulo 5.1</b>						<b>502.52</b>
<b>6. Determinación propiedades viscoelásticas del hidrogel</b>						
<b>6.1</b>	<b>Gelificación</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>	<b>Precio por unidad (€/ud)</b>	<b>Precio parcial (€)</b>	<b>Precio total (€)</b>
	Placa petri	12.00	ud	0.00	0.00	
	Hidróxido de sodio (NaOH)	1.00	mL	0.40	0.40	
	Agua oxigenada	0.50	L	1.16	0.58	
	Puntas micropipeta 2-200 uL	3.00	ud	0.04	0.12	
	Ácido clorídrico (HCl)	2.00	mL	0.42	0.84	
	Frascos de vidrio Teqler 20 mL	1.00	ud	2.24	2.24	
	Tutores responsables del proyecto	5.00	Horas	40.00	200.00	
	Estudiante de ing. Biomédica	6.00	Horas	10.00	60.00	
	Costes indirectos	3.00	%	264.18	7.93	
	Recursos auxiliares	3.00	%	272.11	8.16	
<b>Total del capítulo 6.1</b>						<b>280.27</b>
<b>6.2</b>	<b>Reómetro</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>	<b>Precio por unidad (€/ud)</b>	<b>Precio parcial (€)</b>	<b>Precio total (€)</b>
	Reómetro AR-200ex	14.00	Horas	0.52	7.28	
	Punta micropipeta 100-1000 uL	1.00	ud	0.03	0.03	
	Accesorio plato reómetro	1.00	ud	30.00	30.00	
	Tamiz troquelar	1.00	ud	5.50	5.50	
	Agua milli-Q	0.50	L	0.99	0.50	
	Agua destilada	0.10	L	0.15	0.02	
	Agua oxigenada	1.314	mL	1.16	1.52	

	Tutores responsables del proyecto	10.00	Horas	40.00	400.00	
	Estudiante de ing. Biomédica	10.00	Horas	10.00	100.00	
	Costes indirectos	3.00	%	544.84	16.35	
	Recursos auxiliares	3.00	%	561.19	16.84	
<b>Total del capítulo 6.2</b>						<b>578.03</b>
<b>7. Reuniones del proyecto</b>						
7.1	Reuniones de planificación (Horas)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Estudiante de ing. Biomédica	8.00	Horas	10.00	80.00	
	Tutores responsables del proyecto	2.00	Horas	40.00	80.00	
	Costes indirectos	3.00	%	160.00	4.80	
	Recursos auxiliares	3.00	%	164.80	4.94	
<b>Total del capítulo 7.1</b>						<b>169.74</b>
7.2	Redacción y correcciones (Horas)	Cantidad	Unidad	Precio por unidad (€/ud)	Precio parcial (€)	Precio total (€)
	Estudiante de ing. Biomédica	8.00	Horas	10.00	80.00	
	Costes indirectos	3.00	%	80.00	2.40	
	Recursos auxiliares	3.00	%	82.40	2.47	
<b>Total del capítulo 7.2</b>						<b>84.87</b>

### 1.3 Cuadro de presupuesto resumido

En este apartado, se muestra el cuadro de costes anterior de forma resumida, consecuentemente, se puede determinar el coste asociado a cada unidad de obra y el resultado del sumatorio, el cual determina el coste del capítulo. Además, se puede observar que la suma de todo da lugar al presupuesto de ejecución del material.

Nº código	Descripción capítulo				
1	1. Síntesis HA-SH				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
1.1	Química EDC/NHS (ud)	ud	9	407.53	3,667.76
1.2	Diálisis (ud)	ud	11	129.92	
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 1</b>					<b>3,667.76</b>
2	2. Grado de tiolación				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
2.1	Determinación de Ellman (ud)	ud	4	954.76	3,819.03
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 2</b>					<b>3,819.03</b>
3	3.Liofilización				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
3.1	Liofilización (ud)	ud	9	115.66	1,040.93
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 3</b>					<b>1,040.93</b>
4	4. Caracterización de las muestras HA-CS				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
4.1	Injerto de CS	ud	4	485.46	1,941.86
4.2	Grado de injerto de CS	ud	4	225.53	902.13
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 4</b>					<b>902.13</b>
5	5. Obtención de las muestras SH-HA-g-CS				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
5.1	Síntesis	ud	1	502.52	502.52
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 5</b>					<b>502.52</b>
6	6. Determinación propiedades viscoelásticas del hidrogel				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
6.1	Gelificación	ud	1	280.27	280.27
6.2	Reómetro	ud	1	578.03	578.03
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 6</b>					<b>858.29</b>
7	7. Reuniones del proyecto				
	Descripción	Unidad	Medición	Precio (€)	Precio total (€)
7.1	Reuniones de planificación	ud	10	169.74	1,697.44
7.2	Redacción y correcciones	ud	9	84.87	763.85
<b>Presupuesto parcial del Capítulo 7</b>					<b>2,461.29</b>

## 1.4 Cuadro de resumen de capítulos

En presupuesto final se muestra el coste de cada capítulo obtenido en el apartado anterior, el presupuesto de ejecución del material, el presupuesto por contrata (considerando los gastos generales y el beneficio industrial) y, el presupuesto total (considerando el IVA).

<b>Presupuesto de ejecución material, por contrata y base de licitación</b>	
1. Síntesis HA-SH	3,667.76 €
2. Grado de tiolación	3,819.03 €
3. Liofilización	1,040.93 €
4. Caracterización de las muestras HA-CS	902.13 €
5. Obtención de las muestras SH-HA-g-CS	502.52 €
6. Determinación propiedades viscoelásticas del hidrogel	858.29 €
7. Reuniones del proyecto	2,461.29 €
<b>Total:</b>	<b>13,251.95 €</b>

Presupuesto de ejecución material	<b>13,251.95</b>
Gastos generales (13 %)	1,722.75 €
Beneficio industrial (6%)	795.12 €
Presupuesto de ejecución por contrata	<b>15,769.82 €</b>
IVA (21%)	3,311.66 €
Presupuesto base de licitación	<b>19,081.49 €</b>